

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-504607

(P2014-504607A)

(43) 公表日 平成26年2月24日(2014.2.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 36/18 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/78 C	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 3/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 8
<b>A 6 1 P 9/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 9/10 1 0 1	
<b>A 6 1 K 36/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/78 Y	
<b>A 6 1 K 31/704 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/78 X	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-550742 (P2013-550742)	(71) 出願人	513187900
(86) (22) 出願日	平成23年12月21日 (2011.12.21)		北京大学
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月19日 (2013.8.19)		PEKING UNIVERSITY
(86) 国際出願番号	PCT/CN2011/084377		中華人民共和国・100871・ベイジン
(87) 国際公開番号	W02012/100612		・ハイディアン ディストリクト・ユイヒ
(87) 国際公開日	平成24年8月2日 (2012.8.2)		ユアン ロード・ナンバー5
(31) 優先権主張番号	201110026026.X		No. 5, Yiheyuan Road
(32) 優先日	平成23年1月24日 (2011.1.24)		, Haidian District
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		Beijing 100871 CHIN
		(74) 代理人	100064621
			弁理士 山川 政樹
		(74) 代理人	100098394
			弁理士 山川 茂樹
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 苦丁茶冬青の葉の抽出方法、総サポニンおよびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、苦丁茶冬青の葉の抽出方法、およびこの方法を用いることにより抽出された、苦丁茶冬青の葉の総サポニン、ならびにコレステロールおよび血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化抑制のための薬物の調製における総サポニンの使用を提供する。抽出方法は下のステップ：苦丁茶冬青の葉をエタノール水溶液での還流抽出に付し、抽出溶液を得るステップ；その抽出溶液を濾過し、エタノールを除去し、次に、多孔質樹脂カラムを用いることによりその溶液を分離および精製するステップを含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

苦丁茶冬青の葉の抽出方法であって、この方法は、

(1) 苦丁茶冬青の葉を 50 ~ 70 % エタノール水溶液での還流抽出に付し、抽出液を得るステップ；

(2) 該抽出液を濾過し、該抽出液からエタノールを除去するステップ；

(3) ステップ(2)で得られた溶液を多孔質樹脂カラムに吸着させ、該樹脂カラムから、 $H_2O$ 、pH 9 ~ 11 の 10 ~ 30 % アルカリ性エタノール水溶液、10 ~ 30 % エタノール水溶液および 50 ~ 70 % エタノール水溶液で順次溶出させるステップ；

(4) 50 ~ 70 % エタノール水溶液の溶出液を回収し、濃縮し、乾燥させ、苦丁茶冬青の葉の抽出物を得るステップ  
とから成る方法。

10

**【請求項 2】**

ステップ(1)でのエタノール水溶液の濃度は、55 ~ 65 %、最も好ましくは 60 % であり；ステップ(3)でのエタノール水溶液の濃度は、55 ~ 65 %、最も好ましくは 60 % である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

ステップ(1)において、抽出は 1 ~ 8 回、好ましくは 2 ~ 4 回行われ、各還流抽出の時間は 0.5 ~ 5 時間、好ましくは 0.5 ~ 2 時間である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

ステップ(2)において、エタノールを除去する方法は減圧下であり；ステップ(4)において、濃縮する方法は減圧下であり、乾燥させる方法は真空乾燥である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

ステップ(3)において、多孔質樹脂カラムの直径と長さの比は 1 : 3 ~ 10、好ましくは、1 : 4 ~ 7、最も好ましくは 1 : 6 であり、多孔質樹脂と苦丁茶冬青の葉の重量比は 5 ~ 15 : 1、好ましくは 6 ~ 10 : 1 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

ステップ(3)において、アルカリ性エタノール水溶液の pH は 10 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

**【請求項 7】**

ステップ(5) : 10 ~ 30 % アルカリ性エタノール水溶液 (pH 9 ~ 11) の溶出液 (eluent) と 10 ~ 30 % エタノール水溶液の溶出液 (eluent) を合わせ、合わせた溶液の pH を pH 2 ~ 3 に調整し、その後、該溶液を濃縮し、乾燥させ、総イソクロロゲン酸を得るステップをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

ステップ(2)で分離されたエタノールおよび/またはステップ(4)で分離されたエタノールは回収され、ステップ(1)での還流抽出に再び使用されることをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法を用いることにより抽出された、苦丁茶冬青の葉の総サポニン。

**【請求項 10】**

コレステロールおよび血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化抑制のための薬物の調製における、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法を用いることにより抽出された、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの使用。

**【請求項 11】**

請求項 9 に記載の苦丁茶冬青の葉の総サポニンを用いることによるコレステロールおよ

50

び血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化抑制のための、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、苦丁茶冬青(*Ilex kudingcha* C. J. Tseng)の葉の抽出方法、およびこの方法で抽出された、苦丁茶冬青の葉の総サポニン、ならびにその使用に関する。具体的には、本発明は、苦丁茶冬青の葉から総サポニンを抽出するための方法に関し、この方法により抽出された総サポニンは、コレステロールおよび血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化抑制のために使用することができる。

【背景技術】

【0002】

高脂血症は高コレステロールおよび高トリグリセリドを含むが、高コレステロールの有害性は高トリグリセリドの有害性よりもはるかに大きい。高脂血症に関しては、高脂血症の治療に最も効果的な手段は薬物による脂質低下療法である。現在のところ、トリグリセリドを低下させるには多くの効果的な薬物が存在しているが、コレステロールを低下させるための薬物は主にスタチン類である。これらのスタチン系薬剤は、高コレステロール血症誘発性アテローム性動脈硬化症の抑制を主に目的としており、これらの薬剤の作用機構は肝臓コレステロール合成の阻害である。しかしながら、スタチンの長期使用により、肝臓や筋肉は明らかに有害な影響を受け、トランスアミナーゼの増加も起こり、少ないながら横紋筋融解症や急性腎不全に苦しむ患者もいる。数世代の薬物構造改変を経たものの、スタチンの毒性と副作用の問題はまだ解決していない。

【0003】

苦丁茶(*Kudingcha*)は伝統的な民間飲料であり、健康茶として千年近く飲み続けられており、体重減少、血中脂質および血圧の低下、ならびに解熱および解毒などの効用がある。市場には様々な苦丁茶が存在するが、調査によれば、苦丁茶は22種類の異なる植物の葉から作られている。しかし、どの種類の苦丁茶が血中脂質および血圧の低下により良好な効果を示すのかは分かっておらず、その結果、消費者が費やす金額は非常に高額になるが、脂質低下効果はわずかであり、効果がない場合すらある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

近年に至って、本発明の発明者らは、系統的比較研究の後に、モチノキ(*Ilex*)属の植物である苦丁茶冬青の葉にのみ、血中脂質低下およびアテローム性動脈硬化抑制についての特有の効果があることを見出した。これに関しては、有効成分はサポニンであり、苦丁茶冬青のサポニンのアグリコンは他の苦丁茶品種のものとはかなり異なる。有効成分および薬理学的効果についての系統的研究の後に、本発明者らは、苦丁茶冬青のサポニンは、コレステロールの低下およびアテローム性動脈硬化抑制に対して重要な効果を有し、その効果はスタチン系薬剤の効果と等しいが、苦丁茶冬青のサポニンの機構はスタチン系薬剤のものとは全く異なることを見出した。加えて、そのようなサポニンは、トリグリセリド低下、耐酸化性、腎臓保護および血液レオロジー改善などの効用も有する。作用機構についての研究により、苦丁茶冬青のサポニンによる脂質低下の機構は、腸管および肝臓でのアシル補酵素Aコレステロールアシルトランスフェラーゼ(ACAT)の活性の阻害を通じたものであり、その結果として、コレステロールの腸管吸収は抑制され得るということが示されている。しかしながら、従来の抽出方法により抽出された苦丁茶冬青の抽出物ではサポニンの含量よりもイソクロロゲン酸の含量がずっと高い。さらに、本発明者らは、イソクロロゲン酸は血中脂質を増加させ得ることも見出した。

【0005】

よって、本発明の1つの目的は、苦丁茶冬青の葉の抽出方法を提供することである。その方法は、総サポニンと総イソクロロゲン酸を分離することができるため、高含量のサポニンを含有する抽出物と高含量の総イソクロロゲン酸を含有する抽出物それぞれを得るこ

10

20

30

40

50

とができる。本発明のもう1つの目的は、本発明の方法を用いることにより抽出された苦丁茶冬青の葉の総サポニンを提供することである。その抽出物は80%を超えるサポニンを含み、血中脂質低下、アテローム性動脈硬化抑制ならびに肝臓および腎臓の保護のために使用することができる。本発明の第3の目的は、コレステロールおよび血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化抑制のための薬物の調製における上記総サポニンの使用を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上に記載した本発明の目的のために、本発明は下の技術的解決法を提供する。

【0007】

本発明は苦丁茶冬青の葉の抽出方法を提供し、その方法は、以下のステップ：(1)苦丁茶冬青の葉を50~70%エタノール水溶液での還流抽出に付し、抽出液を得るステップ；(2)該抽出液を濾過し、該抽出液からエタノールを除去するステップ；(3)ステップ(2)で得られた溶液を多孔質樹脂カラムに吸着させ、該樹脂カラムから、H<sub>2</sub>O、10~30%アルカリ性エタノール水溶液(pH9~11)、10~30%エタノール水溶液および50~70%エタノール水溶液で順次溶出させるステップ；(4)50~70%エタノール水溶液の溶出液を回収し、濃縮し、乾燥させ、苦丁茶冬青の葉の抽出物を得るステップを含む。

【0008】

本発明の抽出方法では、ステップ(1)でのエタノール水溶液の濃度は、好ましくは55~65%、最も好ましくは60%であってよく；ステップ(3)でのエタノール水溶液の濃度は、好ましくは55~65%、最も好ましくは60%であってよい。本発明において、エタノール水溶液の濃度とは、エタノール水溶液中のエタノールの体積百分率を意味する。

【0009】

本発明の抽出方法では、ステップ(1)での還流抽出の操作は当業者には公知であり、該操作でのエタノール水溶液の量は原料の量に応じて決定することができる。例えば、エタノール水溶液と原料の重量比は、2~20:1、好ましくは5~15:1であってよい。抽出回数は、1~8回、好ましくは2~4回であってよく；各還流抽出の時間は、0.5~5時間、好ましくは0.5~2時間であってよい。各還流抽出の時間は同じであっても異なってもよく、各還流抽出用のエタノール水溶液の濃度も同じであっても異なってもよく、各還流抽出用のエタノール水溶液の量も同じであっても異なってもよい。例えば、本発明の好ましい実施形態では、最初に、1時間の還流に原料重量の10倍量の60%エタノールを使用し；濾過後、該材料を原料重量の8倍量の60%エタノールで1時間還流し；次に、濾過後、原料重量の8倍量の60%エタノールで1時間還流し、3回の還流抽出により得られた濾液を合わせる。

【0010】

本発明の抽出方法では、ステップ(2)でのエタノールの除去方法およびステップ(4)の溶出液(eluent)の濃縮方法は当業者には公知である。例えば、それらの2つの方法はどちらの場合も減圧下での濃縮であってよい。ステップ(4)での乾燥方法は、好ましくは、真空乾燥である。エタノールの量を節約するために、本発明の方法に、ステップ(2)で分離されたエタノールおよび/またはステップ(4)で分離されたエタノールを回収し、ステップ(1)での還流抽出に再使用することをさらに含めてもよい。

【0011】

本発明の抽出方法では、ステップ(3)で使用される多孔質樹脂カラムは、当技術分野で一般的に使用されている樹脂カラムである。本発明において好ましいのは、D101、HPD100、HPD400A、AB-8およびNKAなどのスチレン系多孔質吸着樹脂である。多孔質樹脂カラムの直径と長さの比は、1:3~10、好ましくは1:4~7、最も好ましくは1:6であってよい。該樹脂と苦丁茶冬青の葉の重量比は、5~15:1、好ましくは6~10:1、最も好ましくは7:1であってよい。

10

20

30

40

50

## 【0012】

好ましくは、高力価の総サポニン抽出物を得るために、ステップ(3)での溶出プロセスに、糖類が検出されなくなるまでカラム体積の4~10倍量の水で樹脂カラムから溶出させ、次に、カラム体積の5~10倍量の10~30%アルカリ性エタノール水溶液(pH9~11)で該樹脂カラムから溶出させること;さらに、カラム体積の2~5倍量の10~30%エタノール水溶液で該樹脂カラムから溶出させること;最後に、カラム体積の3~6倍量の50~70%エタノール水溶液で該樹脂カラムから溶出させることを含めてもよい。例えば、本発明の好ましい実施形態では、ステップ(3)は、ステップ(2)で得られた溶液をHPD400A多孔質樹脂カラム(該樹脂カラムの直径と長さの比は1:4であり、該樹脂と薬草の重量比は7:1である)に30分間静的吸着させ、上のプロセスを3回繰り返すこと;吸着後、糖類が検出されなくなるまで水で該樹脂カラムから溶出させ、次に、カラム体積の8倍量の25%アルカリ性エタノール水溶液(pH=10)で該樹脂カラムから溶出させること;さらに、該樹脂カラムが中性になるまでカラム体積の3倍量の25%中性エタノール水溶液で該樹脂カラムから溶出させること;最後に、カラム体積の4倍量の60%エタノール水溶液で該樹脂カラムから溶出させること;60%エタノール水溶液の溶出液(eluent)を回収し、濃縮し、乾燥させ、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの抽出物を得ることを含む。

10

## 【0013】

本発明の抽出方法では、ステップ(3)でのアルカリ性エタノール水溶液のpHは、最も好ましくは10である。

20

## 【0014】

本発明の方法は、ステップ(5):10~30%アルカリ性エタノール水溶液(pH9~11)の溶出液と10~30%エタノール水溶液の溶出液を合わせ、合わせた溶液のpHをpH2~3に調整し、その後、該溶液を濃縮し、乾燥させ、総イソクロロゲン酸を得るステップをさらに含んでよい。

## 【0015】

本発明はまた、上記方法を用いることにより抽出された、苦丁茶冬青の葉の総サポニンも提供する。これに関しては、総サポニンの含量は80%を上回り得る。本発明の総サポニンは、血中脂質を低下させることができ、アテローム性動脈硬化症を抑制することができ、肝臓および腎臓に対する保護作用もある。

30

## 【0016】

本発明はまた、コレステロールおよび血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化症の抑制のための薬物の調製における、上記方法を用いることにより抽出された、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの使用も提供する。苦丁茶冬青の葉の総サポニンは、単独で使うことができ、または効力を高め、スタチン系薬剤の毒作用および副作用を減少させるためにスタチン系薬剤と組み合わせて使用することもできる。

## 【0017】

本発明はまた、本発明において提供される、苦丁茶冬青の葉の総サポニンを用いることによるコレステロールおよび血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化抑制のための方法も提供する。

40

## 【0018】

本発明により提供される、苦丁茶冬青の葉の総サポニンは、コレステロールの低下およびアテローム性動脈硬化抑制に対して著しい効果を有し、その効果はスタチン系薬剤の効果と等しいが、苦丁茶冬青のサポニンの機構はスタチン系薬剤のものとは全く異なる。加えて、本発明における総サポニンの抽出物は、トリグリセリド低下、耐酸化性、腎臓保護および血液レオロジー改善などの効用も有する。作用機構についての研究により、苦丁茶冬青の葉のサポニンによる血中脂質低下の機構は次の通りであることが示された:苦丁茶冬青の葉のサポニンは、腸管および肝臓でのアシル補酵素Aコレステロールアシルトランスフェラーゼ(ACAT)の活性を阻害することができ、その結果として、腸管でのコレステロールの吸収は抑制され得る。

50

## 【0019】

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態を詳細に記載する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0020】

【図1】図1は、実施例1で調製したサンプルA1の高速液体クロマトグラムである。

【図2】図2は、比較例1で調製したサンプルC1の高速液体クロマトグラムである。

【図3】図3は、比較例2で調製したサンプルC2の高速液体クロマトグラムである。

【図4】図4は、比較例3で調製したサンプルC3の高速液体クロマトグラムである。

【図5】図5は、ApoE-/-マウス血漿中の総コレステロールレベルに対する、苦丁茶冬青の総サポニンの効果を示す。

10

【図6】図6は、ApoE-/-マウス血漿中のMDAレベルに対する、苦丁茶冬青の総サポニンの効果を示す。

【図7】図7は、アテローム性動脈硬化症に対する、苦丁茶冬青の総サポニンの効果を示す。

【図8】図8は、糞便における総コレステロール含量に対する、苦丁茶冬青の総サポニンの効果を示す。

【図9】図9は、Caco-2細胞におけるACAT2 mRNAの発現に対する、苦丁茶冬青の総サポニンの効果を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0021】

20

具体的な実施形態と合わせて本発明をさらに説明する。しかしながら、これらの実施形態は単に本発明を例示するために用いるものであり、本発明の範囲を限定するものではない。実施形態に記載している様々な百分率濃度のエタノールは、対応する体積百分率濃度のエタノール水溶液を意味することに留意されたい。

## 【0022】

実施例1

本実施例を用いることにより、本発明において提供される、苦丁茶冬青の葉の抽出方法を説明する。

## 【0023】

抽出：苦丁茶冬青の医療用材料0.5kgを秤量し、次に、60%エタノール5Lを用いて0.5時間、60%エタノール4Lを用いて1時間それぞれ還流抽出を行い、濾過後に濾液を合わせた。

30

## 【0024】

エタノールの除去：抽出した濾液を、アルコールがなくなるまで減圧下で濃縮して、エタノールを回収した。その際、濃縮した溶液の相対密度は1.06~1.08であった(室温)。

## 【0025】

吸着：濃縮した溶液をHPD400A多孔質樹脂カラムに適用し、溶離剤を樹脂カラムに再度3回流し込んだ。その際、樹脂カラムには樹脂5kgを充填し、樹脂カラムの直径と長さの比は1:4である。流し込みを行ったカラムは30分間静置した。

40

## 【0026】

不純物の洗浄：糖類が検出されなくなるまでカラム体積の4倍量の脱イオン水で樹脂カラムから溶出させ、次に、カラム体積の8倍量の20%アルカリ性エタノール(NaOH、pH=10)で溶出させ、さらに、中性になるまでカラム体積の3倍量の20%エタノールで溶出させた。

## 【0027】

溶出：樹脂に吸着した抽出物をカラム体積の6倍量の60%エタノールでさらに溶出させた。

## 【0028】

濃縮および乾燥：溶出液を減圧下で濃縮してエタノールを回収し、その後、真空乾燥さ

50

せた。乾燥させた固体を粉砕し、100メッシュのスクリーンで選別し、苦丁茶冬青の葉の抽出物65.35gを得た。この抽出物をA1と示し、抽出収率は13.07%であった。

【0029】

#### 実施例2

本実施例を用いることにより、本発明において提供される、苦丁茶冬青の葉の抽出方法を説明する。

【0030】

抽出：苦丁茶冬青の医療用材料0.5kgを秤量し、次に、65%エタノール4Lを用いて2時間、60%エタノール3Lを用いて1時間、50%エタノール3Lを用いて0.5時間それぞれ還流抽出を順次行い、濾過後に濾液を合わせた。

10

【0031】

エタノールの除去：抽出した濾液を、アルコールがなくなるまで減圧下で濃縮して、エタノールを回収した。その際、濃縮した溶液の相対密度は1.06~1.08であった(室温)。

【0032】

吸着：濃縮した溶液をAB-8多孔質樹脂カラムに付した。その際、樹脂カラムには樹脂3.5kgを充填し、樹脂カラムの直径と長さの比は1:8である。

【0033】

不純物の洗浄：糖類が検出されなくなるまでカラム体積の8倍量の脱イオン水で樹脂カラムから溶出させ、次に、カラム体積の10倍量の30%アルカリ性エタノール(NaOH、pH=10.5)で溶出させ、さらに、中性になるまでカラム体積の4倍量の30%エタノールで溶出させた。

20

【0034】

溶出：樹脂に吸着した抽出物をカラム体積の3倍量の65%エタノールでさらに溶出させた。

【0035】

濃縮および乾燥：溶出液を減圧下で濃縮し、その後、真空乾燥させ、乾燥させた固体を粉砕し、100メッシュのスクリーンで選別し、苦丁茶冬青の葉の抽出物50.31gを得た。この抽出物をA2と示し、抽出収率は10.06%であった。

30

【0036】

#### 比較例1

本比較例を用いることにより、不純物洗浄ステップでの溶出を水のみ用いて行った、苦丁茶冬青の葉の抽出方法を説明する。

【0037】

抽出、エタノール除去および吸着のプロセスは、実施例1と同じ方法を用いることにより行った。

【0038】

不純物の洗浄：糖類が検出されなくなるまでカラム体積の4倍量の脱イオン水で樹脂カラムから溶出させた。

40

【0039】

溶出：樹脂に吸着した抽出物をカラム体積の4倍量の60%エタノールでさらに溶出させた。

【0040】

濃縮および乾燥：溶出液を減圧下で濃縮し、その後、真空乾燥させ、乾燥させた固体を粉砕し、100メッシュのスクリーンで選別し、苦丁茶冬青の葉の抽出物150gを得た。この抽出物をC1と示し、抽出収率は30.00%であった。

【0041】

#### 比較例2

本比較例を用いることにより、不純物洗浄ステップでの溶出を水とエタノールのみ用い

50

て行った、苦丁茶冬青の葉の抽出方法を説明する。

【0042】

抽出、エタノール除去および吸着のプロセスは、実施例1と同じ方法により行った。

【0043】

不純物の洗浄：糖類が検出されなくなるまでカラム体積の4倍量の脱イオン水で樹脂カラムから溶出させ、次に、カラム体積の5倍量の10%エタノールで溶出させた。

【0044】

溶出：樹脂に吸着した抽出物をカラム体積の4倍量の60%エタノールでさらに溶出させた。

【0045】

濃縮および乾燥：溶出液を減圧下で濃縮し、その後、真空乾燥させ、乾燥させた固体を粉碎し、100メッシュのスクリーンで選別し、苦丁茶冬青の葉の抽出物110.23gを得た。この抽出物をC2と示し、抽出収率は22.05%であった。

【0046】

### 比較例3

本比較例を用いることにより、不純物洗浄ステップでの溶出を水とエタノールのみ用いて行った、苦丁茶冬青の葉の抽出方法を説明する。

【0047】

抽出、エタノール除去および吸着のプロセスは、実施例1と同じ方法により行った。

【0048】

不純物の洗浄：糖類が検出されなくなるまでカラム体積の4倍量の脱イオン水で樹脂カラムから溶出させ、次に、カラム体積の11倍量の20%エタノールで溶出させた。

【0049】

溶出：樹脂に吸着した抽出物をカラム体積の4倍量の60%エタノールでさらに溶出させた。

【0050】

濃縮および乾燥：溶出液(eluent)を減圧下で濃縮し、その後、真空乾燥させ、乾燥させた固体を粉碎し、100メッシュのスクリーンで選別し、苦丁茶冬青の葉の抽出物102.8gを得た。この抽出物をC3と示し、抽出収率は20.56%であった。

【0051】

### 成分の測定

1. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による測定

クロマトグラフィーカラム：Kromasil C18(4.6×250mm、5μm)；

流速：0.8ml/分；

検出波長：226nm；

カラム温度：30；

移動相：アセトニトリル-0.1%リン酸溶液、勾配溶出；

溶出条件を表1に示す；

【0052】

10

20

30

40



## 【表 1】

表 1 : 勾配溶出条件

時間/分	アセトニトリル/%
0~12	15~23
12~20	23~30
20~40	30~40
40~50	40~95

10

## 【0053】

図 1 は、実施例 1 で調製したサンプル A 1 のクロマトグラムであり、図 2 は、比較例 1 で調製したサンプル C 1 のクロマトグラムであり、図 3 は、比較例 2 で調製したサンプル C 2 のクロマトグラムであり、図 4 は、比較例 3 で調製したサンプル C 3 のクロマトグラムである。図 1 ~ 図 4 において、スペクトルピーク K c、K a および K d はそれぞれ、苦丁茶冬青の 3 つの主要なサポニン [ イレクジノシド C ( K D C - C )、イレクジノシド A ( K D C - A ) およびイレクジノシド D ( K D C - D ) ] を示しており；スペクトルピーク I a、I b および I c はそれぞれ、3 つのイソクロロゲン酸成分 ( イソクロロゲン酸 B、イソクロロゲン酸 A およびイソクロロゲン酸 C ) を示している。

20

## 【0054】

実施例 1 および実施例 2 で調製したサンプル A 1 および A 2、ならびに比較例 1、比較例 2 および比較例 3 で調製したサンプル C 1、C 2 および C 3 についての H P L C 検出結果を表 2 に挙げた。

## 【0055】

## 【表 2】

表 2 : H P L C 法により検出された、各抽出物中のサポニンとイソクロロゲン酸の含量の結果

サン プル	抽出 率	苦丁茶冬青サポニン成分/%				イソクロロゲン酸成分/%			
		KDC-C	KDC-A	KDC-D	合計	isoB	isoA	isoC	合計
A1	13.07%	4.27	19.50	4.26	28.03	0.15	0.33	0.56	1.04
A2	10.06%	4.45	20.06	4.78	29.69	0.26	0.63	1.29	2.18
C1	30%	2.15	4.82	2.50	9.47	4.24	13.31	15.50	33.05
C2	22.05%	2.68	5.90	3.19	11.77	4.02	12.51	14.52	31.04
C3	20.56%	3.21	6.59	3.37	13.17	3.16	10.87	12.92	26.95

30

## 【0056】

図 1 ~ 図 4 の結果と表 2 のデータの比較により、水および / または低濃度のエタノールを用いた場合にはイソクロロゲン酸 (isochlorogenic acids) 成分は除去されないが、一方、溶出を行うために低濃度のアルカリ性エタノールを用いた場合にはイソクロロゲン酸 (isochlorogenic acids) 成分は除去され、結果として、高純度の総サポニンを含む苦丁茶冬青抽出物を得ることができることが分かる。

40

## 【0057】

## 2 . U V 吸収による総サポニンの測定

抽出物約 10 mg を正確に秤量し (合計 3 バッチ)、次に、25 ml メスフラスコに入れ、メタノールで定容に希釈し、その後、0.8 ml 溶液を正確に計量し、10 ml ガラス製共栓試験管に移し、水浴中 80 で蒸発乾固させ、3 バッチのサンプルを得た。イレ

50

クジノシド A ( 0 . 5 3 5 m g / m l ) を標準溶液として用い、0 . 1 m L、0 . 2 m L および 0 . 4 m L の標準溶液それぞれを 1 0 m l ガラス製共栓試験管に移し、水浴中 8 0 で蒸発乾固させた。

【 0 0 5 8 】

バニリン 0 . 1 g を秤量し、1 0 m l ガラス製共栓試験管に入れ、そのガラス製試験管に氷酢酸 2 m l を加え、次に、バニリンが溶解したらそのガラス製試験管に過塩素酸 8 m l を加え、その後、混合物を振盪し、その結果として、金色発色物質を得た。

【 0 0 5 9 】

その後、発色物質 1 m l を、乾燥サンプルの入ったガラス製試験管と標準サンプルの入ったガラス製試験管それぞれに入れた。それらのガラス製試験管を水浴中 6 0 で 1 5 分間加熱したらすぐに冷却し、次に、上記ガラス製試験管に氷酢酸 5 m l を加え、その後、混合物を振盪した後 U V 吸収値を 5 3 8 n m で検出した。

【 0 0 6 0 】

実施例 1 および実施例 2 で調製したサンプル A 1 および A 2、ならびに比較例 1、比較例 2 および比較例 3 で調製したサンプル C 1、C 2 および C 3 についての総サポニン含量の測定結果を表 3 に挙げる。

【 0 0 6 1 】

【表 3】

表 3 : U V 法による各抽出物中の総サポニン含量の結果

サンプル	総サポニン含量/%
A1	88.24
A2	86.02
C1	53.11
C2	65.03
C3	68.02

【 0 0 6 2 】

表 3 に示したデータを比較することにより、サンプル A 1 および A 2 の総サポニン含量は、サンプル C 1、C 2 および C 3 の総サポニン含量よりも著しく高いことが分かる。これにより、総サポニン含量は不純物を除去することによって大幅に増加し得ることが示される。しかしながら、U V 法による含量測定に一部誤りがあることが分かった。例えば、U V 法により測定したサンプル C 2 および C 3 中の総サポニン含量は高いが、H P L C 検出によりサンプル C 2 および C 3 中にまだ多量のイソクロロゲン酸が存在することが分かった。これは、氷酢酸 - バニリン比色定量は特異度が低く、グリコシドに類似した多くの化合物が全て上記呈色反応を示し、その結果、測定結果が不正確なものとなることが理由である。

【 0 0 6 3 】

有効性試験

実施例 1 で調製した、苦丁茶冬青の葉の抽出物の治療効果を検証するために、次の実験を行った。

【 0 0 6 4 】

A p o E - / - マウスを体重により無作為に 4 群に分けた。

( 1 ) 陰性対照群 ( C G ) : この群のマウスには通常の食餌を 7 週間与え、生理食塩水を胃内投与した。

( 2 ) 高脂肪対照群 ( H G ) : この群のマウスには 0 . 2 % コレステロールを含有する高脂肪食を 7 週間与え、同時に毎日生理食塩水を胃内投与した。

( 3 ) アトルバスタチン ( A t o r ) 治療群 ( A G ) : この群のマウスには高脂肪食を

1 週間与え、その後、毎日6週間アトルバスタチン(50 mg/kg/日)を胃内投与し、同時に連続して高脂肪食を与えた。

(4) 苦丁茶冬青総サポニン治療群(SG)：治療過程はAGの場合と同様であるが、SGとAGとでは、苦丁茶冬青の総サポニンの用量が300 mg/kg/日であるという点のみ異なる。

#### 【0065】

1. 血漿中の総コレステロール(TC)レベルに対する、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの効果

ApoE-/-マウス血漿中の総コレステロール(TC)レベルに対する、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの効果を図5に示している。ApoE-/-マウスに高脂肪食を1週間与えた後、血漿中のTCレベルは300~400 mg/dLから約800 mg/dLまで上昇し、その結果、高コレステロール血症が生じ、その後、マウスに薬物を胃内投与した。結果は、HGのマウスと比べ、全ての投与群でマウスの血漿TCレベルが低下していることを示した。AG群およびSG群のマウスの血漿TCレベルは双方30%~35%低下しており、それら2群の有効性は実質的に同じであり、有意差はない。薬物の有効性は6週間持続し、安定に保たれた。

10

#### 【0066】

2. 血漿マロンジアルデヒド(MDA)レベルに対する、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの効果

図6に示されるように、ApoE-/-マウスの血漿MDAレベルは苦丁茶冬青の葉の総サポニンの影響を受けた。マウスに毎日高脂肪食を与えたため、6週間投与後のHG群のマウスの血漿MDAレベルは、投与前のマウスのレベルの約5倍を超えていた。HG群のマウスと比べて、AG群およびSG群のマウスでの血漿MDAレベルの上昇は投与2週目(W2)以降に大幅に抑制され、有効性は投与終了まで保たれた。AG群のマウスの血漿MDAレベルは投与4週目(W4)以降に上昇し始め、投与6週目(W6)に16.5 nmol/Lに達し、この値は、投与前のマウスのレベルよりほぼ1.5倍高い値であった。しかしながら、SG群のマウスの血漿MDAレベルは投与開始から実験終了までほとんど上昇しなかった。上記結果は、アトルバスタチンと苦丁茶冬青の葉のサポニンは双方とも血漿脂質の酸化を抑制することができることを示しているが、SG群のマウスの血漿MDAレベルの上昇は投与5週目(W5)以降も苦丁茶冬青の葉の総サポニンによってAG群のマウスよりはるかに効果的に抑制され、それら2群の間での有効性の差は有意であった。

20

30

#### 【0067】

3. 動脈硬化症に対する、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの効果

ApoE-/-マウス大動脈流出路の動脈硬化部位に対する、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの効果を図7に示している。CG群とHG群との間に有意差があり( $p < 0.05$ )、そのモデルは成功したことが示される。また、SG群およびHG群との間と、AG群とHG群との間にも有意差があり( $p < 0.01$ )、アトルバスタチンと苦丁茶冬青の葉の総サポニンは双方とも大動脈流出路のアテローム斑形成を有意に抑制することができ、抑制率が約40%に達することが示される。

40

#### 【0068】

4. 糞便中の総コレステロール含量に対する、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの効果

苦丁茶冬青の葉の総サポニンによる血漿コレステロール低下についての考えられる機構を調査するために、ApoE-/-マウス糞便中の総コレステロール含量を測定し、マウスにおけるコレステロール吸収に対する薬物の効果を判定した。図8に示されるように、SG群とCG群との間に有意差があり( $^{\#}P < 0.05$ )、SG群とHG群との間にも有意差がある( $^{\#}P < 0.05$ )。結果は、マウスにおけるコレステロールの排泄は、マウスに高コレステロール食を与えた後に75%増加し、それはCG群のマウスの場合と有意に異なることを示している。SGを投与したマウスの糞便中へのコレステロールの排泄はHG群のマウスと比べて約40%増加し、これら2群の間での差は有意であった。

50

【 0 0 6 9 】

5 . C a c o - 2 細胞における肝臓 A C A T 2 mRNA の発現に対する、苦丁茶冬青の葉の総サポニンの効果

これまでの調査は、苦丁茶冬青の葉の総サポニンはコレステロールの排泄を増加させ、小腸でのTC含量を低下させることができることを示したため、関連遺伝子のmRNA発現レベルを検出した。結果によれば、ACAT2のmRNAの発現レベルは苦丁茶冬青の葉の総サポニンの影響を受けることが示され、その結果は図9に示している。図9では、TSは苦丁茶冬青の総サポニンを表し、Atorはアトルバスタチンを表している。CGとの比較では有意差がある(#p<0.05)。結果から、10μg/mLおよび100μg/mLの総サポニンそれぞれによりACAT2のmRNA発現は50%低下したことが認められ、それはCG群の場合と有意に異なる。しかしながら、苦丁茶冬青の総サポニンは他のスクリーニングされた遺伝子の発現に対して全く効果がなかった。この調査によれば、苦丁茶冬青の葉の総サポニンによる血中脂質低下の機構は、苦丁茶冬青の葉の総サポニンが腸管および肝臓でのACATの活性を阻害し、その結果として、腸管でのコレステロールの吸収が抑制され得ることにより、血中脂質を低下させ得るという機構であり得ることが示される。

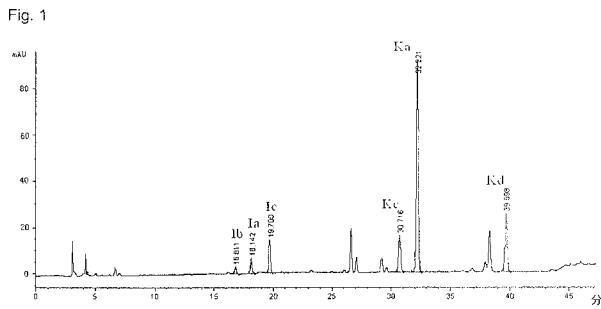
10

【 0 0 7 0 】

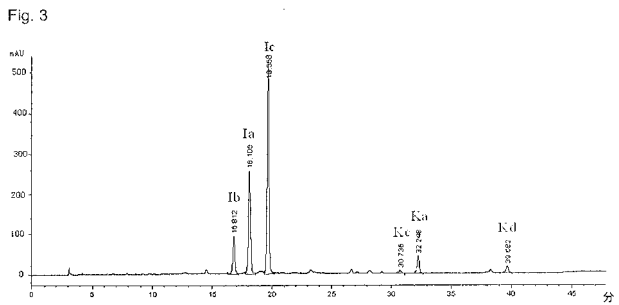
有効性検出の結果から、本発明により調製された、苦丁茶冬青の葉の抽出物は、コレステロールおよび血中脂質の低下ならびにアテローム性動脈硬化症の抑制に対して重要な効果を有し、スタチン系薬剤と類似した効果を有することが分かる。

20

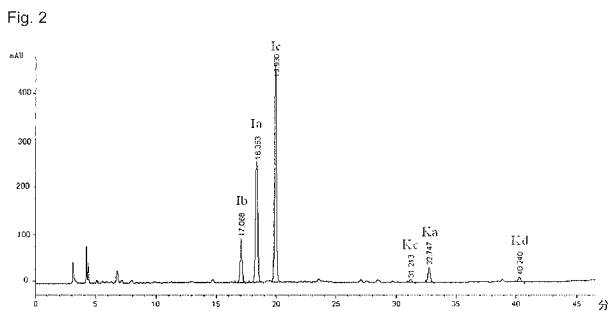
【 図 1 】



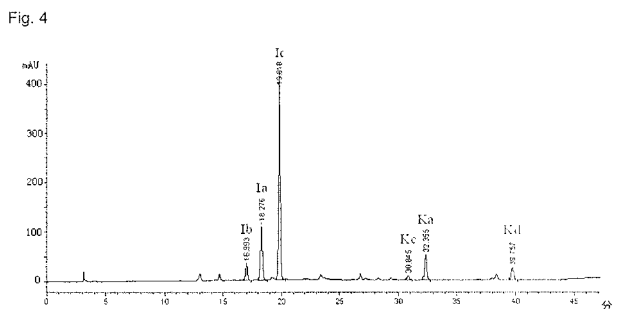
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



【 图 5 】

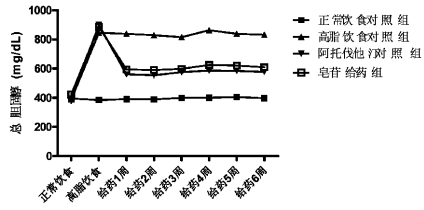
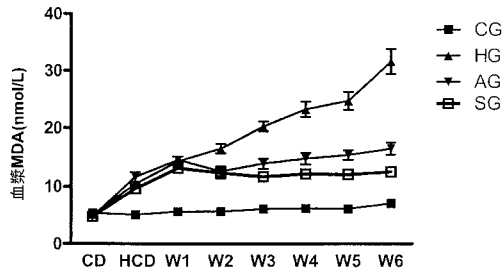


图 5

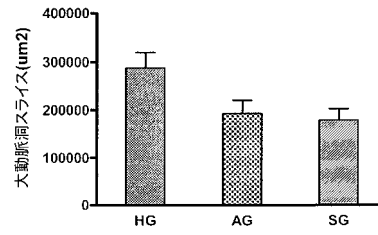
【 图 6 】

Fig. 6



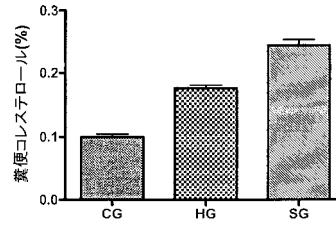
【 图 7 】

Fig. 7



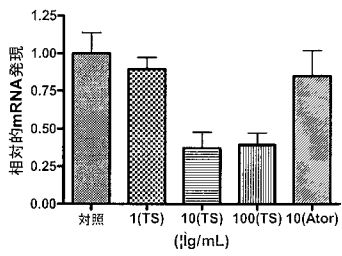
【 图 8 】

Fig. 8



【 图 9 】

Fig. 9



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. <b>PCT/CN2011/084377</b>
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:11 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claim 11 relates to a method for treatment of the human or animal body.	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
<b>Remark on protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2011/084377**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101361766 A	11 February 2009 (11.02.2009)	None	
CN 1521175 A	18 August 2004 (18.08.2004)	None	
CN 101766664 A	07 July 2010 (07.07.2010)	None	
CN 101284031 A	15 October 2008 (15.10.2008)	None	
CN 1981803 A	20 June 2007 (20.06.2007)	None	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2011/084377**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A61K 36/185 (2006.01) i

A61P 3/06 (2006.01) i

A61P 9/10 (2006.01) i

A61K 127/00 (2006.01) n



国际检索报告		国际申请号 <b>PCT/CN2011/084377</b>
<b>A. 主题的分类</b>		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS, CPRSABS, TWABS, MOABS, HKABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CNTXT, EPODOC, WPI, CJFD, CNKI, CA, MEDLINE, 中国药物专利数据库, 中国药学文摘(冬青, 苦丁茶, 苦丁茶冬青, 总皂苷, 总皂甙, 皂苷, 皂甙, 异绿原酸, 有机酸, 黄酮, 大孔树脂, 大孔吸附树脂, 醇, 乙醇, 碱性, 胆固醇, 血脂, 粥样硬化, 动脉硬化, ilex, ilicis, holly, saponin, isochlorogenic acid, organic acid, flavone, resin+, macroporous resin, macroporous adsorptive resin+, macroreticular resin, alcohol, ethanol, alkal+, cholesterin, cholesterol, Ch, Chl, CHO, Chol, ChS, blood fat, scleratheroma, atherosclerosis, AS, AT, AR, ATH)		
<b>C. 相关文件</b>		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN101361766A(贺震旦)11.2月2009(11.02.2009), 权利要求3-7	9
Y	CN101361766A(贺震旦)11.2月2009(11.02.2009), 权利要求3-7, 说明书第1页第3段	10
Y	苦丁茶冬青皂苷对 ApoE 基因缺陷小鼠高胆固醇血症致肾脏损害的保护作用, 中国新药杂志, 第18卷第5期, 31.12月2009(31.12.2009) 第430页第1-7行, 第429页摘要第4行	10
A	CN1521175A(浙江养生堂天然药物研究所有限公司)18.8月2004 (18.08.2004), 参见全文	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 24.2月2012(24.02.2012)		国际检索报告邮寄日期 <b>15.3月2012(15.03.2012)</b>
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员  <b>凌宇静</b> 电话号码: (86-10) 62411056

## 国际检索报告

国际申请号 <b>PCT/CN2011/084377</b>
-----------------------------------

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN101766664A (广州中医药大学)07.7 月 2010(07.07.2010), 参见全文	1-8
A	CN101284031A (上海雷允上科技发展有限公司)15.10 月 2008 (15.10.2008), 参见全文	1-8
A	CN1981803A (黄伟民)20.6 月 2007(20.06.2007), 参见全文	1-8

## 国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2011/084377
----------------------------

**第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)**

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求: 11  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:  
权利要求 11 属于治疗人体或者动物体的疗法。
  
2.  权利要求:  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,  
具体地说:
  
3.  权利要求:  
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

**第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)**

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1.  由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
  
2.  由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。
  
3.  由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。  
具体地说, 是权利要求:
  
4.  申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明:  申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。  
 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。  
 缴纳附加检索费时未提交异议书。

**国际检索报告**  
关于同族专利的信息国际申请号  
**PCT/CN2011/084377**

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101361766A	11.2 月 2009(11.02.2009)	无	
CN1521175A	18.8 月 2004(18.08.2004)	无	
CN101766664A	07.7 月 2010(07.07.2010)	无	
CN101284031A	15.10 月 2008(15.10.2008)	无	
CN1981803A	20.6 月 2007(20.06.2007)	无	

国际检索报告

国际申请号  
**PCT/CN2011/084377**

**A. 主题的分类**

A61K 36/185 (2006.01) i

A61P 3/06 (2006.01) i

A61P 9/10 (2006.01) i

A61K 127/00 (2006.01) n

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 31/704

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 トウ, ペンフェイ

中華人民共和国・100191・ Beijing・ハイディアンの ディストリクト・シュエユアン ロード・ナンバー38

(72) 発明者 ザン, トンメイ

中華人民共和国・100191・ Beijing・ハイディアンの ディストリクト・シュエユアン ロード・ナンバー38

(72) 発明者 ゼン, ジアオ

中華人民共和国・100191・ Beijing・ハイディアンの ディストリクト・シュエユアン ロード・ナンバー38

(72) 発明者 ジアン, ヨン

中華人民共和国・100191・ Beijing・ハイディアンの ディストリクト・シュエユアン ロード・ナンバー38

(72) 発明者 ゾウ, ハイヤン

中華人民共和国・100191・ Beijing・ハイディアンの ディストリクト・シュエユアン ロード・ナンバー38

(72) 発明者 タン, リ

中華人民共和国・100191・ Beijing・ハイディアンの ディストリクト・シュエユアン ロード・ナンバー38

(72) 発明者 マ, ジゾン

中華人民共和国・100191・ Beijing・ハイディアンの ディストリクト・シュエユアン ロード・ナンバー38

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA19 MA01 MA04 NA14 ZA45 ZC33

4C088 AB65 AC05 BA09 BA10 BA13 CA08 CA11 CA14 NA14 ZA45

ZC33