

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-111680

(P2018-111680A)

(43) 公開日 平成30年7月19日(2018.7.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/045 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/045	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 P 25/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/04	4 C 0 8 8
<b>A 6 1 K 36/752 (2006.01)</b>	A 6 1 K 36/752	4 C 2 0 6
<b>A 2 3 L 33/10 (2016.01)</b>	A 2 3 L 33/10	
<b>A 2 3 L 33/105 (2016.01)</b>	A 2 3 L 33/105	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2017-4735 (P2017-4735)  
 (22) 出願日 平成29年1月14日 (2017.1.14)

特許法第30条第2項適用申請有り 平成28年11月11日、公益社団法人日本薬学会北陸支部発行の「日本薬学会北陸支部第128回例会 プログラム&要旨集」にて発表 及び、平成28年11月27日、日本薬学会北陸支部平成28年度総会及び第128回例会において発表

(71) 出願人 504160781  
 国立大学法人金沢大学  
 石川県金沢市角間町ヌ7番地  
 (71) 出願人 501203344  
 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
 茨城県つくば市観音台3-1-1  
 (74) 代理人 100088904  
 弁理士 庄司 隆  
 (74) 代理人 100124453  
 弁理士 資延 由利子  
 (74) 代理人 100135208  
 弁理士 大杉 卓也  
 (74) 代理人 100152319  
 弁理士 曾我 亜紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物

(57) 【要約】

【課題】 神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物を提供すること。

【解決手段】 -クリプトキサンチンが、神経因性疼痛を特異的に緩和することを見出し、本発明を完成した。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

キサントフィルを有効成分として含む、神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物。

## 【請求項 2】

キサントフィルが、クリプトキサンチンである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

前記組成物が、神経因性疼痛の予防又は緩和用食品である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

10

## 【請求項 4】

前記組成物が、神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用治療剤である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記神経因性疼痛が、機械刺激性アロディニアである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記クリプトキサンチンが、ミカン抽出物に由来する、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

20

## 【請求項 7】

経口投与用組成物である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、キサントフィル、特にクリプトキサンチンを有効成分として含む、神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

## &lt; 疼痛 &gt;

「疼痛」とは、広く痛みを意味する医学用語である。疼痛は、痛みの種類により、さらに「神経因性疼痛（神経障害性疼痛）」、「傷害受容性疼痛」及び「心因性疼痛」に分類できる。

「傷害受容性疼痛」は、切り傷、骨折、火傷等のような刺激、炎症、熱等に起因する疼痛である。傷害受容性疼痛は、その原因である外傷の治癒により治まり、又は、炎症を抑制する消炎鎮痛剤が有効である。

「心因性疼痛」は、器質的・機能的病変が無い、又はあっても痛みの訴えと合致しない場合で、心理的要因が大きく影響している可能性のある疼痛である。心因性疼痛は、その原因である心理・社会的要因に適応するための認知療法等が有効であるとされている。

40

## 【0003】

## &lt; 神経因性疼痛 &gt;

「神経因性疼痛」とは、末梢神経系の損傷に関連して、頻繁に生じる病態であり、癌、糖尿病、帯状疱疹に伴うウイルス感染、重篤な虚血発作、又は自己免疫疾患等の病状により引き起こされる（非特許文献 1）。

神経因性疼痛の症状は、自発痛、痛覚過敏、機械刺激性アロディニア（機械的アロディニア）を含む。

自発痛は、外部刺激とは無関係に痛みを感じる症状である。

50

痛覚過敏は、通常でも痛みを引き起こす刺激に対して、痛みが増す過敏症である。

【0004】

< 機械刺激性アロディニア >

「機械刺激性アロディニア」は、通常は無害である刺激に対する過敏症であり、神経因性疼痛の最も特徴的な症状である。

神経因性疼痛、特にアロディニアは、多くの場合、鎮痛剤又は鎮静剤に対して、抵抗性を有するため、新しい治療及び予防のアプローチが必要とされている（非特許文献2）。

【0005】

< -クリプトキサンチン >

「カロテノイド」は、動植物が有する黄色や赤色等の天然色素のグループである。 10

「-クリプトキサンチン(-Cryptoxanthin、-CRY)」は、ヒト血清中に常に存在する主要なキサントフィルカロテノイドであり、主に柑橘類から得られる（非特許文献3）。-クリプトキサンチンの血清レベルは、ヒト及び動物において、ウンシュウミカン(Citrus unshiu Marc.)等の高-クリプトキサンチン食品の摂取量に反映される（非特許文献4）。

これまでの知見より、-クリプトキサンチンの様々な生活習慣病に対する予防効果が示唆されている（非特許文献4）。例えば、本発明者らは、最近、-クリプトキサンチンが、破骨細胞活性を抑制することにより、卵巣除去誘発性骨減少を予防することを立証した（非特許文献5）。

さらに、-クリプトキサンチンは、炎症遺伝子発現の抑制により、食事性非アルコール性脂肪性肝炎を緩和する（非特許文献6）。さらに、高レベルの血清中-クリプトキサンチンは、肺癌による死亡リスクの低減と関連がある（非特許文献7）。 20

しかし、神経因性疼痛に対する-クリプトキサンチンの効果については報告が無く、知られていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】J Pharmacol Sci. 2013; 121(2): 89-94.

【非特許文献2】Nat Rev Immunol. 2014; 14(4): 217-31.

【非特許文献3】Burri BJ. Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. Journal of the science of food and agriculture. 2014. 30

【非特許文献4】Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 2015; 135(1): 67-76.

【非特許文献5】Ozaki K et al. Daily intake of beta-cryptoxanthin prevents bone loss by preferential disturbance of osteoclastic activation in ovariectomized mice. J Pharmacol Sci. 2015.

【非特許文献6】PloS one. 2014; 9(5): e98294.

【非特許文献7】Cancer science. 2014; 105(6): 736-43.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】 40

【0007】

本発明は、神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、-クリプトキサンチンが、神経因性疼痛を特異的に緩和することを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、以下の通りである。

1.キサントフィルを有効成分として含む、神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物。 50

2. キサントフィルが、クリプトキサンチンである、前項1に記載の組成物。

3. 前記組成物が、神経因性疼痛の予防又は緩和用食品である、前項1又は2に記載の組成物。

4. 前記組成物が、神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用治療剤である、前項1又は2に記載の組成物。

5. 前記神経因性疼痛が、機械刺激性アロディニアである、前項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

6. 前記クリプトキサンチンが、ミカン抽出物に由来する、前項2～5のいずれか一項に記載の組成物。

7. 経口投与用組成物である、前項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

10

#### 【発明の効果】

##### 【0010】

本発明の神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物は、疼痛の中でも神経因性疼痛を特異的に緩和することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0011】

【図1】 - クリプトキサンチンの経口補給による神経因性疼痛の改善の評価。8週齢オスd d Yマウスに、28日間連続(0～28日)で、10 mg/Lの - クリプトキサンチン( C R Y )を含有する水( C R Y投与群)又は C R Yを含有しない水(水投与群)を経口投与し、14日目に脊髄神経損傷手術又は偽手術に供した(偽手術 - 水投与群、n = 6 ; 偽手術 - C R Y投与群、n = 10 ; 神経損傷手術 - 水投与群、n = 12 ; 神経損傷手術 - C R Y投与群、n = 11)。A : 実施例の概要。B : 偽手術マウスの足挙げ閾値。縦軸は、50%足挙げ閾値(50% g Threshold)を示す。横軸は、 - C R Y (又は水)投与開始後の経過日数(日)を示す。 は、偽手術、水投与、反対側の後足の結果を示す。 は、偽手術、水投与、手術側の後足の結果を示す。 は、偽手術、 - C R Y投与、反対側の後足の結果を示す。 は、偽手術、 - C R Y投与、手術側の後足の結果を示す。C : 神経損傷手術マウスの足挙げ閾値。縦軸は、50%足挙げ閾値(50% g Threshold)を示す。横軸は、 - C R Y (又は水)投与開始後の経過日数(日)を示す。 は、神経損傷手術、水投与、反対側の後足の結果を示す。 は、神経損傷手術、水投与、手術側の後足の結果を示す。 は、神経損傷手術、 - C R Y投与、反対側の後足の結果を示す。 は、神経損傷手術、 - C R Y投与、手術側の後足の結果を示す。 - C R Y投与群又は水投与群のそれぞれで得られた各値の反対側の後足及び手術側の後足の有意差に関し、\*がP < 0.05、\*\*がP < 0.01を、それぞれ示す。手術側の後足で得られた値に関し、 - C R Y投与群及び水投与群の有意差は、#がP < 0.05を示す。

20

30

【図2】 - クリプトキサンチンの経口投与の炎症性疼痛への効果の評価。8週齢オスd d Yマウスに、42日間連続(0～42日)で、10 mg/Lの - クリプトキサンチン( C R Y )を経口投与し、14日目および28日目の2度、フロイント完全アジュバント(C F A投与群)又はP B S ( P B S投与群)を投与した( P B S投与 - 水投与群、n = 4 ; P B S投与 - C R Y投与群、n = 4 ; C F A投与 - 水投与群、n = 4 ; C F A投与 - C R Y投与群、n = 4)。A : 実施例の概要。B : P B S投与マウス及びC F A投与マウスの足挙げ閾値。縦軸は、50%足挙げ閾値(50% g Threshold)を示す。横軸は、 - C R Y (又は水)投与開始後の経過日数(日)を示す。 は、P B S投与、水投与の結果を示す。 は、C F A投与、水投与の結果を示す。 は、P B S投与、 - C R Y投与の結果を示す。 は、C F A投与、 - C R Y投与の結果を示す。P B S投与マウスにおいて得られた各値との有意差に関し、\*がP < 0.05、\*\*がP < 0.01を、それぞれ示す。

40

【図3】 - クリプトキサンチンの経口投与の急性熱疼痛への効果の評価。8週齢オスd d Yマウスに、14日間連続(0～14日)で、10 mg/Lの - クリプトキサンチン( C R Y )を経口投与し、14日目に55 に設定されたホットプレート装置に置

50

いた（水投与群、 $n = 4$ ；CRY投与群、 $n = 4$ ）。A：実施例の概要。B：後足舐め又は飛び跳ねのいずれかが観察されるまでの時間。縦軸は、マウスをホットプレートに置いてから後足舐め、足のばたつかせ又は飛び跳ねのいずれかが観察されるまでの時間（秒）を示す。は、水投与の結果を示す。は、CRY投与の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の神経因性疼痛の治療、予防又は緩和用組成物を、以下で詳細に説明する。

【0013】

<有効成分>

本発明の組成物は、キサントフィル、特に -クリプトキサンチンを有効成分として含有する。なお、本明細書において -クリプトキサンチンは、化学式が  $C_{40}H_{56}O$  である化合物、若しくはその医薬的に許容される誘導体若しくは異性体を指す。

また、 -クリプトキサンチン以外のキサントフィルとして、アスタキサンチン、カンタキサンチン、カプサンチン、ルテイン、ゼアキサンチン、 -クリプトキサンチン等を例示することができるが特に限定されない。

【0014】

<有効成分の含有量>

本発明の組成物に含まれる有効成分の含有量は、特に限定されないが、単回投与による投与量にして、例えば、食品 1 g あたり、以下の範囲よりそれぞれ選択される量を含めることができる。

キサントフィル又は -クリプトキサンチン：2 ng / g 食品 ~ 0.2 g / g 食品

【0015】

< -クリプトキサンチンを含有する植物>

本発明の組成物に含まれる -クリプトキサンチンは、ミカン抽出物自体又は該抽出物に由来してもよい。

本明細書において、「ミカン」は、柑橘類、好ましくはミカン属、より好ましくはウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marc.) を指す。本発明に用いられるウンシュウミカンの品種は限定されない。

なお、「柑橘類」の例としては、ウンシュウミカン、キシウミカン、オレンジ、イヨカン、ダイダイ、シラヌヒ、ナツミカン、ハッサク、ハナユズ、ヒュウガナツ、ブンタン、ポンカン、マンダリンオレンジ、キノット、コウジ、ジャバラ、タチバナ、タンゴール、グレープフルーツ、レモン、ライム、カボス、サンボウカン、ヒラミレモン、シトロン、スダチ、ユズ等を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0016】

<ミカン抽出物の抽出方法>

本明細書において、「抽出物」の形態には、果実、好ましくはパルプ、遠心パルプ、果皮、搾汁残渣又は果汁由来である、抽出液、酵素分解物、搾汁、搾粕若しくはそれら混合物の形態、並びに、該酵素分解物、該抽出液、該搾汁、該搾粕若しくはそれら混合物を濃縮、希釈及び / 又は乾燥した、濃縮物、希釈物又は乾燥物の形態が含まれる。

本発明の組成物に含まれる -クリプトキサンチンが、ミカン抽出物に由来する場合、その調製方法は、特に限定されないが、例えば、以下の方法が挙げられる。

(1) ウンシュウミカンのパルプにペクチナーゼ含有酵素剤及び / 又はセルラーゼ / ヘミセルラーゼ酵素剤を添加し、攪拌して室温で、静置反応を行う。

(2) 前記反応により得られた反応液を遠心分離し、上清を除去した後、水を添加して攪拌する。

(3) 再度遠心分離により上清を除去し、沈殿物としてミカン抽出物を得られる。必要に応じて、凍結乾燥により乾燥し、自体公知の方法により粉碎後の粉碎物として得ることができる。前記粉碎物は、必要に応じて、さらに、篩等を用いて、サイズを揃えてもよい。

。

10

20

30

40

50

## 【0017】

## &lt; -クリプトキサンチンの抽出方法 &gt;

ミカンから -クリプトキサンチンを抽出する場合の方法は、特に限定されないが、公知のいずれをも適用でき、有機溶媒を用いた抽出方法等、例えば、以下の方法が挙げられる（参考：PloS one. 2014; 9(5): e98294.）。

（１）ミカンのパルプ、遠心パルプ又は果皮を、酵素分解に供した後、必要に応じて破碎・均質化し、遠心分離し、沈殿物を回収する。

「パルプ」、「遠心パルプ」又は「果皮」は、例えば、ミカン製品（例えば、ジュース等）を製造する工程で生じたものを使用してもよい。

「酵素」は、例えば、アクレモニウムセルラーゼ含有酵素剤、ペクチナーゼ含有酵素剤等が使用できる。「アクレモニウムセルラーゼ含有酵素剤」は、市販されているアクレモニウムセルラーゼ含有の酵素剤であってもよい。市販されているアクレモニウムセルラーゼ含有の酵素剤としては、例えば、協和化成株式会社製の「アクレモセルラーゼKM」（商品名）等を用いることができる。

（２）回収した沈殿物に、沈殿物と同程度の体積の有機溶媒を加え、振盪（混和）する。

「有機溶媒」としては、例えば、ヘキサン、アセトン、エタノール又はそれらの混合物等を使用できる。

（３）振盪後、遠心分離し、得られた上清を回収し、沈殿物に同程度の体積の有機溶媒を加え、振盪（混和）する。この操作を必要に応じて1回～複数回繰り返す。

（４）上記操作にて得られた上清を濃縮し、水酸化カリウムで加水分解する。

（５）加水分解後、反応溶液に水を加え、混和後に遠心分離し、上層（有機溶媒層）を濃縮物として回収する。

（６）濃縮物を超音波処理によって、ヘキサン中に分散させる。不溶性物質を濾過し、エタノールから再結晶し、-クリプトキサンチン（非エステル化 -クリプトキサンチン）を得られる。必要に応じて、HPLC分析により、得られる -クリプトキサンチンの純度を測定する。

## 【0018】

## &lt; -クリプトキサンチンの入手方法 &gt;

本発明の有効成分である -クリプトキサンチンは、上記の他に、市販品を使用してもよい。

さらに、本発明の有効成分である -クリプトキサンチンは、他の成分との混合物である、市販されているミカン抽出物（ミカンエキス）を使用してもよい。

市販されているミカン抽出物としては、例えば、オリザ油化社製の「温州みかんエキス-P」（商品名）等を用いることができる。

## 【0019】

## &lt; 食品の形態 &gt;

本発明の組成物は、食品の形態で用いることができる。ここで、食品の形態には、特に限定されないが、例えば、サプリメント、ジュース、果汁飲料、米飯類、パン類、穀類、野菜、食肉、各種加工食品、菓子類、牛乳、清涼飲料水、アルコール飲料、ゼリー、ガム、タブレット、栄養補助食品、食品添加物等が含まれる。なお、食品には、機能性食品、健康食品、健康志向食品等も含まれる。

## 【0020】

## &lt; 他の成分 &gt;

本発明の組成物は、全体が上記有効成分のみからなるものであってもよいし、上記有効成分と他の成分とを含むものであってもよい。「他の成分」は、食品において許容される成分である限り特に限定されず、例えば、目的の食品を構成する諸成分、油性成分、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、着色剤、発色剤、矯味剤、着香剤、酸化防止剤、防腐剤、呈味剤、酸味剤、甘味剤、強化剤、ビタミン剤、膨張剤、増粘剤、界面活性剤等を挙げることができ、本発明の組成物の形態に応じて、適当なものを選択し、適

10

20

30

40

50

宜組み合わせ用いることができる。

【0021】

<治療剤の形態>

本発明の組成物は、治療剤の形態で用いることができる。

剤形は、特に限定されず、種々の剤形とすることができる。例えば、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することもできる。また持続性剤形及び徐放性剤形であってもよい。

本発明の治療剤は、哺乳動物（ヒト、ウマ、ウシ、ブタ等）又は鳥類（ニワトリ等）に用いることができ、通常の医薬（製剤）に用いられる担体、賦形剤等の添加剤を用いて調製される。

10

【0022】

本発明の治療剤の投与経路は、全身投与及び局所投与のいずれも選択することができる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。本発明に係る治療剤は、経口経路及び非経口経路のいずれによっても投与できる。本発明の治療剤の投与は、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等の形態での経口投与、又は注射剤（例えば、静注、筋注等）、坐剤、経皮剤、経鼻剤、吸入剤等の形態での非経口投与であり得る。

【0023】

本発明による経口投与のための治療剤は、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等の固体制剤であり得る。このような製剤は、一つ又はそれ以上の活性物質を不活性な賦形剤、滑沢剤、崩壊剤、又は溶解補助剤等と混合することにより常法に従って製造される。賦形剤は、例えば、乳糖（ラクトース）、セルロース、マンニトール、ブドウ糖であり得る。滑沢剤は、例えば、ステアリン酸マグネシウムであり得る。崩壊剤は、例えば、カルボキシメチルスターチナトリウムであり得る。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性コーティング剤で被膜してもよい。

20

【0024】

経口投与のための治療剤は、薬理的に許容されるエキス剤、乳剤、液剤、懸濁剤、シロップ剤、酒精剤、又はエリキシル剤等の液体製剤であり得る。このような製剤は、一般的に用いられる不活性な溶剤（例えば、精製水、エタノール等）を含有し、さらに可溶化剤、湿潤剤、懸濁化剤、甘味剤、矯味剤、芳香剤、緩衝剤（例えば、クエン酸ナトリウム等）、安定化剤又は防腐剤を含有してもよい。

30

【0025】

非経口投与のための治療剤は、無菌の水性若しくは非水性の液剤、懸濁剤、若しくは乳剤等の注射剤、軟膏及びローション、口腔内投与のための舌下剤、口腔貼付剤、経鼻投与のためのエアゾール剤又は坐剤であり得る。

注射剤の場合、通常静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への注射により投与できる。注射剤用の水性の溶剤は、例えば、蒸留水又は生理食塩水であり得る。注射剤用の非水性の溶剤は、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、又はポリソルベート80（局方名）であり得る。このような製剤は、さらに等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖等）、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、pH調節剤（例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等）、緩衝剤、局所麻酔剤（例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等）又は溶解補助剤を含有してもよい。

40

これらの製剤は、例えば、バクテリア保留フィルターによる濾過、殺菌剤の配合、又は放射線照射によって無菌化され得る。また、無菌の固体組成物を使用前に無菌の水又は注射用溶媒に溶解又は懸濁して得られた組成物をこれらの製剤として使用することもできる。これらの製剤は、製剤工程において通常用いられる公知の方法により製造することができる。

【0026】

<神経因性疼痛を抑制する方法>

50

本発明の治療剤の投与量又は摂取量については、本発明の効果が得られるものであれば特に限定されるものではなく、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、性別、病状および他の医薬の使用の有無等）、及び担当医師の判断等に応じて適宜選択される。

本発明の治療剤の投与量は、経口投与の場合、通常成人1回当たり0.001 mg/kg体重～100 mg/kg体重であり、静脈投与の場合、通常成人1回当たり0.0001 mg/kg体重～10 mg/kg体重である。

投与回数は、通常1日1回～6回、又は1日1回～7日に1回である。透析を受けている患者への投与は、当該患者が受ける各透析の前後（好適には、透析の前）に1回行なわれることも好ましい。

#### 【実施例】

##### 【0027】

以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

すべての実施例は、日本薬理学会のガイドラインを満たし、金沢大学動物実験委員会（the Committee for Ethical Use of Experimental Animals at Kanazawa University）により承認済である。

##### 【実施例1】

##### 【0028】

[神経因性疼痛モデルを用いた -CRYによる疼痛軽減の評価]

-CRYの毎日の経口摂取が、脊髄神経損傷後の神経因性疼痛、特に機械刺激性アロディニアの症状を軽減できるかどうかを調べた。概要を図1Aに示す。

具体的には、以下の<手順>により、-CRYを飲水投与したマウスを用いて、神経因性疼痛モデルを作製し、機械刺激による痛みの評価を行った。

##### 【0029】

<手順>

(1) 8週齢オスddYマウスを、28日間、-CRYを10 mg/Lの濃度で、毎日、新しく溶解した飲水を、自由に経口補給（自由飲水）できる環境下で飼育した（CRY投与群）。対照として、-CRYを含有しない水を飲水として用い、飲水以外は同様の条件で、別のマウスを飼育した（水投与群）。CRY投与群のマウスにおいて、毎日の飲水の摂取（約7 mL/日/マウス）の有意な変化又は自発的行動の有意な変化は観察されなかった。

本実施例において使用したCRY（より詳しくは、非エステル化CRY）は、公知の方法により調製及び加工し、その純度は、HPLC解析により96%であった（参考：PloS one. 2014; 9(5): e98294.）。より詳しくは、CRYは、日本果実工業株式会社、株式会社えひめ飲料より入手した、ジュース製造工程におけるウンシュウミカンのパルプを用いて上述の<-クリプトキサンチンの抽出方法>により調製及び加工した。

(2) -CRY投与群及び水投与群について、それぞれ、-CRY投与及び水投与開始後14日目に、下記の<神経因性疼痛モデルの作製>に従って、マウスを手術した（神経損傷手術群）。一部のマウスについては、偽手術（背中を切開し、神経を露出させる手術）を行い、対照とした（偽手術群）。

(3) -CRY（又は水）投与開始後14日目、15日目、17日目、19日目、21日目、28日目〔神経損傷手術（又は偽手術）当日（手術前）、手術後1日目、3日目、5日目、7日目及び14日目〕に、下記の<機械刺激による痛みの評価>を行い、手術側及び反対側の後足への触覚刺激の足挙げ閾値を調べた（図1A）。

(4) 統計学的有意差は、Bonferroni/Dunnett post hoc testを用いた分散のone-way解析により、決定した。全ての結果は、平均±標準誤差として表した。

##### 【0030】

10

20

30

40

50



< 神経因性疼痛モデルの作製 >

文献 (Pain. 1992; 50: 355-63.) に記載されているラットの神経因性疼痛モデル (C hung model) をマウス用に改変し、マウスに脊髄神経損傷を外科的に誘導した神経因性疼痛モデルを作製した。

より詳しくは、傍脊柱筋群及び脂肪を、第3 (L3) 及び第4 (L4) 腰髄神経に平行して露出した第5 (L5) 横突起から除去した。その後、L4 腰髄神経を、注意深く隔離し、切断した。

当該モデルマウスにおいては、機械刺激性アロディニアが発症する。

【0031】

< 機械刺激による痛みの評価 >

機械刺激による痛み (神経因性疼痛モデルにおいては、機械刺激性アロディニアに該当する) を評価するため、目盛を付けた von Frey フィラメント (0.02 ~ 2.0 g、Stoelting 社製) を、網状の床の下から、マウスの後足の足底の表面に当て、足挙げ閾値を up-down 法を用いて測定した (参考: J Neurosci Methods. 1994; 53(1):55-63. 及び The EMBO journal. 2011; 30(9): 1864-73.: Von Frey test と呼ばれる)。「足挙げ閾値」(50% g Threshold) とは、50% のマウスが痛みを認識する (足を挙げる) 負荷を表す。より詳しくは、50% のマウスが痛みを認識した (足を挙げた) 際に使用した von Frey フィラメントについて、その von Frey フィラメントが曲がるまで押した際にかかる負荷を表す。この値が高いほど、刺激を認識しにくいこと、すなわち疼痛が軽減したことを示す。

【0032】

< 結果 >

偽手術群のマウスにおいて、手術側及び反対側の後足の足挙げ閾値は、-CRY の有無にかかわらず、いずれの時点においても有意に変化しなかった (図1B)。

一方、神経損傷手術群のマウスは、神経損傷手術後15日目~28日目に、水投与群 (神経損傷手術 - 水投与群) において、マウスの反対側後足と比較して、手術側の後足において、足挙げ閾値が有意に減少した (図1C)。この結果は、神経損傷手術群のマウスに神経因性疼痛、より詳しくは機械刺激性アロディニアが発症したことを示している。

また、神経損傷手術群のマウスにおいて、CRY 投与群 (神経損傷手術 - CRY 投与群) のマウスは、神経損傷手術後15日目~28日目の手術側の後足において、足挙げ閾値の有意な減少を示したが、17日目及び28日目の手術側の足挙げ閾値は、水投与群 (神経損傷手術 - 水投与群) のマウスよりも CRY 投与群 (神経損傷手術 - CRY 投与群) のマウスにおいて、有意に高かった (図1C)。

これらの結果は、-クリプトキサンチン投与により脊髄神経損傷後の神経因性疼痛、特に機械刺激性アロディニアの進行を軽減・抑制したことを示している。

【実施例2】

【0033】

[ 炎症性疼痛モデルを用いた -CRY による疼痛軽減の評価 ]

-CRY の毎日の経口摂取が、フロイント完全アジュバント (CFA) - 誘導性炎症性疼痛を軽減できるかどうかを調べた。概要を図2Aに示す。

具体的には、以下の<手順>により、-CRY を飲水投与したマウスを用いて、炎症性疼痛モデルを作製し、機械刺激による痛みの評価を行った。

【0034】

< 手順 >

(1) 8週齢オス ddY マウスを、42日間、-CRY を 10 mg/L の濃度で、毎日、新しく溶解した飲水を、自由に経口補給 (自由飲水) できる環境下で飼育した (CRY 投与群)。対照として、-CRY を含有しない水を飲水として用い、飲水以外は同様の条件で、別のマウスを飼育した (水投与群)。CRY 投与群のマウスにおいて、毎日の飲水の摂取 (約 7 mL/日/マウス) の有意な変化又は自発的行動の有意な変化は観察されなかった。

10

20

30

40

50

本実施例で使用した C R Y は、実施例 1 と同様に調製及び加工した。

( 2 ) - C R Y 投与群及び水投与群について、それぞれ、下記の < 炎症性疼痛モデルの作製 > に従って、 - C R Y 投与及び水投与開始後 1 4 日目及び 2 8 日目の合計 2 回、C F A を投与した ( C F A 投与群 ) 。一部のマウスについては、C F A の代わりに P B S を投与し、対照とした ( P B S 投与群 ) 。

( 3 ) - C R Y 投与開始後 2 8 日目、2 9 日目、3 1 日目、3 3 日目、3 5 日目、4 2 日目に、実施例 1 と同様に < 機械刺激による痛みの評価 > を行い、手術側及び反対側の後足への触覚刺激の足挙げ閾値を調べた ( 図 2 A ) 。機械刺激による痛みは、炎症性疼痛モデルにおいては、炎症性疼痛に該当する。

( 4 ) 統計学的有意差は、Bonferroni / Dunnett post hoc test を用いた分散の one - way 解析により、決定した。全ての結果は、平均 ± 標準誤差として表した。

#### 【 0 0 3 5 】

< 炎症性疼痛モデルの作製 >

フロイント完全アジュバント ( C F A 、 Difco Laboratories 社製 ) 及び I I 型コラーゲン ( コスモバイオ社製 ) のエマルジョンをマウスの尾の付け根及び背に、麻酔下で注射した { - C R Y ( 又は水 ) 投与開始後 1 4 日目 } 。1 4 日後 { - C R Y ( 又は水 ) 投与開始後 2 8 日目 } 、同様の実験プロトコルを用いて 2 回目の免疫化を行った ( 参考 : Nat Protoc. 2007; 2(5): 1269-75. ) 。

#### 【 0 0 3 6 】

< 結果 >

足挙げ閾値は、 - C R Y の摂取条件下又は非摂取条件下で、C F A 投与による免疫化 3 1 日目 ~ 4 2 日目のマウスにおいて、有意に減少した。この結果は、C F A 投与群のマウスに炎症性疼痛が発症したことを示している。

- C R Y 投与群及び水投与群の間での差はみられず、同等であった ( 図 2 B ) 。

この結果は、 - クリプトキサンチン投与は、炎症性疼痛への効果が無いことを示している。

#### 【 実施例 3 】

#### 【 0 0 3 7 】

[ 急性熱疼痛モデルを用いた - C R Y による疼痛軽減の評価 ]

- C R Y の経口摂取が、ホットプレート試験による急性熱疼痛を軽減できるかどうかを調べた。概要を図 3 A に示す。

具体的には、以下の < 手順 > により、 - C R Y を飲水投与したマウスを用いて、熱による痛みの評価を行った。

#### 【 0 0 3 8 】

< 手順 >

( 1 ) 8 週齢オス d d Y マウスを、1 4 日間、 - C R Y を 1 0 m g / L の濃度で、毎日、新しく溶解した飲水を、自由に経口補給 ( 自由飲水 ) できる環境下で飼育した ( C R Y 投与群 ) 。対照として、 - C R Y を含有しない水を飲水として用い、飲水以外は同様の条件で、別のマウスを飼育した ( 水投与群 ) 。C R Y 投与群のマウスにおいて、毎日の飲水の摂取 ( 約 7 m L / 日 / マウス ) の有意な変化又は自発的行動の有意な変化は観察されなかった。

本実施例で使用した C R Y は、実施例 1 と同様に調製及び加工した。

( 2 ) - C R Y 投与群及び水投与群について、それぞれ、 - C R Y 投与及び水投与投与開始後 0 日目 ( 投与開始前 ) 、1 4 日目に、下記の < ホットプレート試験 > に供した ( 図 3 A ) 。ホットプレートの熱による痛みは、急性熱疼痛に該当する。

( 3 ) 統計学的有意差は、two - tailed unpaired Student ' s t - test により、決定した。全ての結果は、平均 ± 標準誤差として表した。

#### 【 0 0 3 9 】

< ホットプレート試験 >

10

20

30

40

50

マウスを55に設定したホットプレート装置に置き、後足舐め、足のばたつかせ又は飛び跳ねのいずれかの行動を起こすまでの時間を記録した(参考: J Pharmacol Exp Ther . 2007; 323(1): 265-76.)。

【0040】

< 結果 >

- C R Y 投与マウス及び水投与マウスの間で、後足舐め、足のばたつかせ又は飛び跳ねのいずれかの行動を起こすまでの時間における有意差は観察されなかった(図3B)。

この結果は、- クリプトキサンチン投与は、急性熱疼痛への効果が無いことを示している。

【0041】

[ 総論 ]

以上の実施例1~3の結果をまとめると、- C R Y 経口補給(経口投与)が、炎症性疼痛又は急性熱疼痛に影響を及ぼすことなく、有意に、かつ、優先的に、脊髄神経損傷により生じた神経因性疼痛を緩和・予防することが明らかになった。すなわち、- クリプトキサンチンは、疼痛の中でも神経因性疼痛を特異的に緩和・予防することが明らかになった。

マウスは、本実施例において、10 mg/L - クリプトキサンチン含有飲水の平均1日摂取量(約7 mL/日/マウス)を考慮すると、28日連続で1日127 nmol - クリプトキサンチンを投与された。

したがって、本実施例で使用された - クリプトキサンチンの用量は、高 - クリプトキサンチン食品の1日摂取量の薬理的妥当性の観点から適切である。

以上より、- クリプトキサンチンを有効成分として含む、本発明の組成物の適切な摂取は、神経因性疼痛の治療、予防及び緩和のために有効であることが明らかになった。

【産業上の利用可能性】

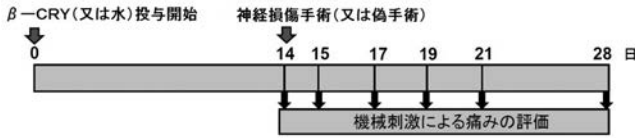
【0042】

本発明の組成物は、キサントフィル、特に - クリプトキサンチンを有効成分として含む、神経因性疼痛の治療、予防又は緩和に有用である。

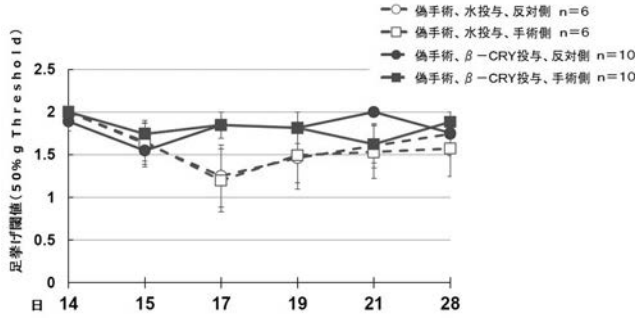
10

20

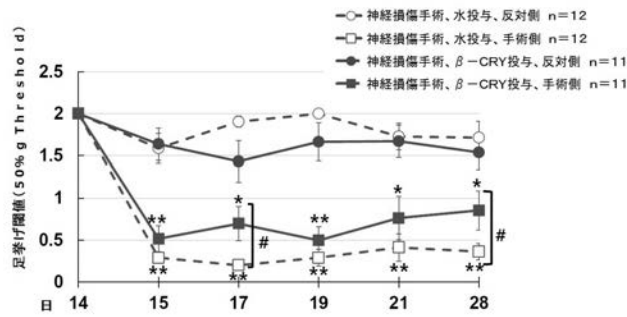
【図 1 A】



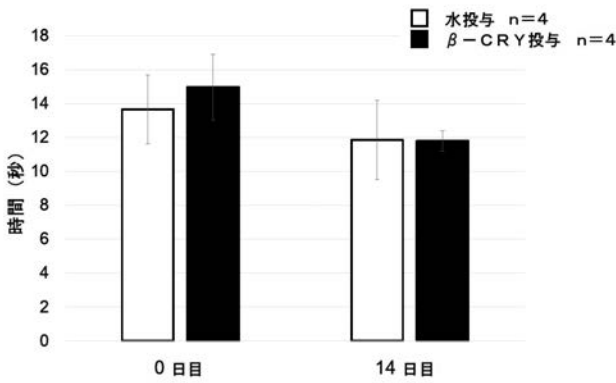
【図 1 B】



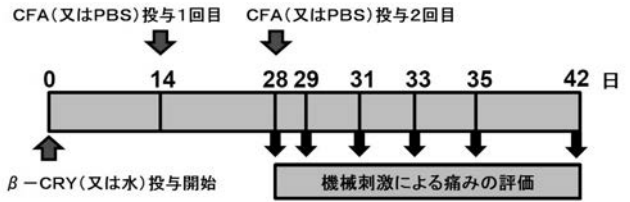
【図 1 C】



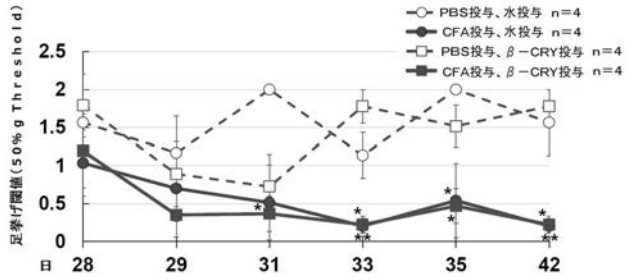
【図 3 B】



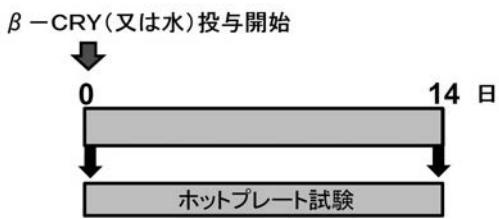
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 3 A】



## フロントページの続き

(72)発明者 檜井 栄一

石川県金沢市角間町又7番地 国立大学法人金沢大学内

(72)発明者 杉浦 実

静岡県静岡市清水区興津中町485番地6 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
果樹茶業研究部門内

Fターム(参考) 4B018 MD07 MD08 MD52 ME14 MF01

4C088 AB62 AC04 BA07 BA08 BA11 CA02 CA03 CA11 CA12 CA25

MA13 MA16 MA21 MA22 MA23 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43

MA52 MA55 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA08 ZC54

4C206 AA01 AA02 CA13 KA01 MA01 MA04 MA33 MA36 MA41 MA42

MA43 MA51 MA55 MA57 MA61 MA63 MA72 MA75 MA76 MA79

MA80 MA83 MA86 NA14 ZA08 ZC54