

(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2013-190420

(P2013-190420A)

(43) 公開日 平成25年9月26日(2013.9.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2G045
A 6 1 K 31/05 (2006.01)	A 6 1 K 31/05	4C085
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	4C086
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	4C088
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 C	4C206
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 17 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-26994 (P2013-26994)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学
(22) 出願日	平成25年2月14日 (2013. 2. 14)		北海道帯広市稲田町西2線11番地
(31) 優先権主張番号	特願2012-31335 (P2012-31335)	(74) 代理人	100112874 弁理士 渡邊 薫
(32) 優先日	平成24年2月16日 (2012. 2. 16)	(74) 代理人	100147865 弁理士 井上 美和子
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	清水 隆 北海道帯広市稲田町西2線11番地 帯広畜産大学内
		Fターム(参考)	2G045 AA40 4C085 HH20 KB41 KB78 4C086 AA01 AA02 EA11 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZC61 4C088 AB12 BA08 NA14 ZA81 ZC61 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法及び細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤

(57) 【要約】

【課題】細菌感染誘発卵巣機能障害及びその改善作用を有する物質の評価系の提供。

【解決手段】動物に過排卵処置を行う手順と、前記動物にリポポリサッカライド及びノ又はリポタイコ酸を投与する手順と、前記動物に被検物質を投与する手順と、これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含む、細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法では、過排卵処置とリポポリサッカライド及びノ又はリポタイコ酸の投与により作出される細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルを用いて、被検物質投与の有無による排卵数の変化を調べることにより、被検物質の細菌感染誘発卵巣機能障害改善作用を簡便に評価することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物に過排卵処置を行う手順と、
前記動物にリボポリサッカライド及び／又はリボタイコ酸を投与する手順と、
前記動物に被検物質を投与する手順と、
これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含む、
細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】

動物に過排卵処置を行う手順と、
前記動物にリボポリサッカライド及び／又はリボタイコ酸を投与する手順と、を含む、
細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルの作出方法。

10

【請求項 3】

過排卵処置とリボポリサッカライド及び／又はリボタイコ酸の投与により作出される、
細菌感染誘発卵巣機能障害のモデル動物。

【請求項 4】

動物に過排卵処置を行う手順と、前記動物にリボポリサッカライド及び／又はリボタイ
コ酸を投与する手順と、
前記動物に被検物質を投与する手順と、
これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含む、
細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法によって得られ
る細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤。

20

【請求項 5】

ヒドロキシチロソールを含有する、請求項 4 記載の細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤。

【請求項 6】

アントシアニンを含有する、請求項 4 記載の細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤。

【請求項 7】

ハスカップ抽出物を含有する、請求項 4 記載の細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤。

【請求項 8】

請求項 4 から 7 の何れか一項に記載の細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤を有効成分とし
て含有する医薬品組成物。

30

【請求項 9】

請求項 4 から 7 の何れか一項に記載の細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤を含有する飼料
。

【請求項 10】

動物に過排卵処置を行う手順と、
前記動物にリボポリサッカライド及び／又はリボタイコ酸を投与する手順と、
前記動物に被検物質を投与する手順と、
これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含む、
細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法によって得られ
る細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤を投与する手順を含む、
細菌感染に起因する家畜又は家禽の卵巣機能障害の改善方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌感染に起因する卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング
方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

細菌感染に起因した家畜及び家禽の繁殖障害は、ブタ及びウシなどでは産仔数の低下に

50

よる食肉生産量の減少及び搾乳不能による牛乳生産量の減少を引き起こし、ニワトリなどでは産卵数の低下を引き起こすため、生産効率上大きな問題となっている。繁殖障害を引き起こす細菌感染には、子宮内膜炎及び乳房炎などがある。これらの細菌感染による卵巢機能障害が繁殖障害の原因と推察されている。

【0003】

細菌感染による卵巢機能障害を防止するため、家畜に抗生物質を投与することが行われている。しかし、抗生物質投与期間中あるいは投与後一定期間の間は食肉や生乳の出荷が制限される。このため、抗生物質によらず、天然物由来成分を用いて卵巢機能障害を改善する方法が求められている。

【0004】

また、ヒトにおいても、分娩又は性行為の際に膣から移入する細菌によって引き起こされる骨盤内炎症疾患が、卵巢機能障害に伴う不妊症の原因として知られている。骨盤内炎症疾患の再発を繰り返すことにより、不妊症のリスクが高まるとされている。

【0005】

細菌感染による卵巢機能障害を改善し、正常な排卵を促すことは、産業動物における生産効率向上、並びに動物及びヒトの不妊治療のために極めて重要である。

【0006】

本発明に関連して、特許文献1には、ラクトフェリンを有効成分として含有する卵巢機能改善剤が開示されている。また、特許文献2には、オレウロペイン、オレウロペイン誘導体又はヒドロキシチロソールから選択される一以上を有効成分として含有する不妊治療剤が開示されている。なお、特許文献1に開示される卵巢機能改善剤は抗癌化学療法による卵巢機能障害のためのものであり、特許文献2に開示される不妊治療剤は暑熱ストレスあるいは酸化ストレスによる卵巢機能障害に適用されるものである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2009/101789号

【特許文献2】特開2009-191012号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

細菌感染による卵巢機能障害の改善のため、その病態を適切に再現でき、改善作用を有する物質のスクリーニングに利用可能な評価系の開発が求められる。

【0009】

そこで、本発明は、細菌感染誘発卵巢機能障害及びその改善作用を有する物質の評価系を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記課題解決のため、本発明は、動物に過排卵処置を行う手順と、前記動物にリポポリサッカライド及びノ又はリポタイコ酸を投与する手順と、前記動物に被検物質を投与する手順と、これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含む、細菌感染誘発卵巢機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法を提供する。

このスクリーニング方法では、過排卵処置とリポポリサッカライド及びノ又はリポタイコ酸の投与により作出される細菌感染誘発卵巢機能障害動物モデルを用いて、被検物質投与の有無による排卵数の変化を調べることにより、被検物質の細菌感染誘発卵巢機能障害改善作用を簡便に評価することができる。

【0011】

また、本発明は、動物に過排卵処置を行う手順と、前記動物にリポポリサッカライド及びノ又はリポタイコ酸を投与する手順と、を含む、細菌感染誘発卵巢機能障害の動物モデルの作出方法を提供する。

10

20

30

40

50

さらに本発明は、過排卵処置とリポポリサッカライド及び/又はリポタイコ酸の投与により作出される、細菌感染誘発卵巣機能障害のモデル動物を提供する。

【0012】

本発明は、動物に過排卵処置を行う手順と、前記動物にリポポリサッカライド及び/又はリポタイコ酸を投与する手順と、前記動物に被検物質を投与する手順と、これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含む、細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法によって得られる細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤をも提供する。前記細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤は、ヒドロキシチロソールを含有してもよく、アントシアニンを含有してもよく、ハスカップ抽出物を含有してもよい。

【0013】

さらに、本発明は、動物に過排卵処置を行う手順と、前記動物にリポポリサッカライド及び/又はリポタイコ酸を投与する手順と、前記動物に被検物質を投与する手順と、これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含む、細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング方法によって得られる細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤を投与する手順を含む、細菌感染に起因する家畜又は家禽の卵巣機能障害の改善方法をも提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、細菌感染誘発卵巣機能障害及びその改善作用を有する物質の評価系が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルを作出するための実験スケジュールを説明する図である（実験例1）。

【図2】リポポリサッカライド又はペプチドグリカンの投与と過排卵処置を行ったマウスの排卵数を計測した結果を示す図面代用グラフである（実験例1）。

【図3】リポポリサッカライドの投与と過排卵処置のスケジュールを説明する図である（実験例1）。

【図4】リポポリサッカライドの投与と過排卵処置を行ったマウスの排卵数を計測した結果を示す図面代用グラフである（実験例1）。

【図5】21～25日齢の各日齢のマウスの卵巣中のLPS受容体の発現をRT-PCRにより確認した結果を示す図面代用写真である（実験例1）。

【図6】リポタイコ酸の投与と過排卵処置を行ったマウスの排卵数を計測した結果を示す図面代用グラフである（実験例2）。

【図7】リポポリサッカライドの投与と過排卵処置のスケジュールを説明する図である（実験例3）。

【図8】リポポリサッカライドの投与と過排卵処置を行ったマウスの排卵数を計測した結果を示す図面代用グラフである（実験例3）。

【図9】細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニングの実験スケジュールを説明する図である（実験例4）。

【図10】ヒドロキシチロソール、オレウロペイン及びグリチルリチンの細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を評価した結果を示す図面代用グラフである（実験例4）。

【図11】細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニングの実験スケジュールを説明する図である（実験例5）。

【図12】アントシアニンの細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を評価した結果を示す図面代用グラフである（実験例5）。

【図13】細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニングの実験スケジュールを説明する図である（実験例6）。

【図14】ハスカップ抽出液の細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を評価した結果を示す図面代用グラフである（実験例6）。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】**【0016】****1. スクリーニング方法****(1) 細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルの作出**

本発明者は、過排卵処置に細菌の構成成分投与を組み合わせた「過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデル」が、細菌感染誘発卵巣機能障害の適切な病態モデルとなり得ることを初めて見出した(実験例1及び実験例2参照)。過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルでは、過排卵処置によって刺激された卵巣から排卵される卵子数が、細菌の構成成分投与によって減少する。この排卵数の減少は、細菌の構成成分による卵巣機能障害のために引き起こされていると考えられるため、同動物モデルは、細菌感染による卵巣の機能障害の病態を反映したものとなり得る。

10

【0017】

細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルは、定法に従った過排卵処置と細菌の構成成分投与とを組み合わせることによって作出できる。過排卵処置は、通常、PMSG(妊馬血清性腺刺激ホルモン)とhCG(ヒト絨毛性腺刺激ホルモン)とを動物に投与することによって行われている。細菌の構成成分としては、例えば、グラム陰性菌の構成成分であり、内毒素と呼ばれるLPS(リポポリサッカライド)や、グラム陽性菌の構成成分であるLTA(リボタイコ酸)等が挙げられる。これらの細菌の構成成分を腹腔内に投与する。

【0018】

モデル動物は、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ及びサルなどであってよく、卵巣機能を備える動物であれば特に限定されない(ただし、ヒトは除く)。例えばマウスをモデル動物に用いる場合、PMSGを腹腔投与し、48時間後にhCGを腹腔投与することで、さらに24時間後に過排卵を誘起できる。マウスにおけるPMSG及びhCGの投与量は、0.1~100IU(インターナショナルユニット)、好ましくは1~10IUとされる。また、LPSやLTAは、PMSG及び/又はhCGの投与の前後あるいは同時に腹腔内投与する。マウスにおけるLPSの投与量は、0.01~10mg/kg体重、好ましくは0.04~4mg/kg体重程度とされる。マウスにおけるLTAの投与量は、0.4mg/kg体重以上、好ましくは4.1mg/kg体重以上、より好ましくは20mg/kg体重以上とされる。ただし、PMSG、hCG、LPS及びLTAの投与タイミング及び投与量は、使用するモデル動物に応じて適宜調整され得るものとする。

20

30

【0019】

卵巣機能障害を確実に誘発するため、LPS及び/又はLTAは、後述する実験例3に示すように、2回以上投与することが望ましい。モデル動物において卵巣機能障害が確実に誘発されることによって、後述する細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニングをモデル動物で行う場合に、スクリーニング結果の評価の精度が増す。

【0020】

例えばマウスをモデル動物に用いる場合、PMSG投与と同時にLPS及び/又はLTAの1回目の投与を、PMSG投与24時間後にLPS及び/又はLTAの2回目の投与を行う。ただし、PMSG、hCG、LPS及びLTAの投与回数は、投与タイミング及び投与量に応じて適宜設定され得るものとする。例えばマウスでは、PMSG投与24時間後にLPSを単回投与することで、卵巣機能障害を誘発することも可能である。

40

【0021】

モデル動物には、未性成熟動物を用いることが好ましい。性成熟後の動物では、内因性の排卵周期が存在し、過排卵処置に影響を与えるためである。マウスをモデル動物とする場合には、27~28日齢の個体を用いることが適当である。また、後述する細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニングにおいては、被検物質のマウスへの投与期間に応じて、さらに日齢の少ない個体を用いてもよい。

【0022】

細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルは、排卵数を指標として細菌の構成成分による卵

50

巣機能障害の程度を簡便に評価することができるため、細菌感染誘発卵巣機能障害の病態メカニズムの解明、予防又は治療方法の開発などのために有用である。

【 0 0 2 3 】

さらに、細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルに被検物質を投与し、排卵数の減少を抑制し得る物質を探索することで、細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質をスクリーニングすることが可能である。次に、このスクリーニング方法について説明する。

【 0 0 2 4 】

(2) 細菌感染誘発卵巣機能障害改善作用を有する物質のスクリーニング方法

本発明に係るスクリーニング方法は、細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルに被検物質を投与し、被検物質を投与しない場合に比しての排卵数の変化を調べることにより、被検物質の細菌感染誘発卵巣機能障害改善作用の有無を判定するものである。

【 0 0 2 5 】

このスクリーニング方法は、具体的には、動物に過排卵処置を行う手順と、前記動物に L P S 及び / 又は L T A を投与する手順と、前記動物に被検物質を投与する手順と、これらの手順の後に、前記動物の排卵数を計測する手順と、を含んでいる。このうち、過排卵処置及び L P S 及び / 又は L T A の投与の両手順は、上述の細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルの作出と同様にして行うことができる。

【 0 0 2 6 】

被検物質投与の手順は、過排卵処置及び L P S 及び / 又は L T A の投与の前後あるいは同時に被検物質を動物に投与することによって行われる。被検物質の投与は、腹腔投与、経口投与及び皮下投与などのいずれの投与方法によって行ってもよい。

【 0 0 2 7 】

排卵数の計測手順では、動物を開腹し、排卵卵子数を数える。本発明に係るスクリーニング方法では、被検物質を投与した場合にこの手順で計測される排卵数が、投与していない場合に計測される排卵数に比べて多いときに、被検物質が細菌感染誘発卵巣機能障害改善作用を有していると判定できる。一方、被検物質を投与した場合にこの手順で計測される排卵数が、投与していない場合に計測される排卵数に比べて同等又は少ないとき、被検物質は細菌感染誘発卵巣機能障害改善作用を有しないと判定される。

【 0 0 2 8 】

本発明に係るスクリーニング方法における被検物質は、天然化合物であっても合成化合物であってもよいが、特に天然物由来成分とすることが好適である。細菌感染誘発卵巣機能障害改善作用を有する天然物由来成分が見出されれば、抗生物質によらずに細菌感染誘発卵巣機能障害を治療又は予防することが可能となる。

【 0 0 2 9 】

2 . 細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤

(1) 細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤

本発明者は、本発明に係るスクリーニング方法を用いて、暑熱ストレスあるいは酸化ストレスによる卵巣機能障害に改善効果を示すことが知られているオレウロペインとヒドロキシチロソールについて細菌感染誘発卵巣機能障害の改善効果を検討した。なお、ヒドロキシチロソール (3,4 dihydroxyphenylethanol) は、オリーブに含まれる成分であり、ポリフェノール的一种である。ヒドロキシチロソールは、同じくオリーブに含まれるオレウロペインの分解物である。

【 0 0 3 0 】

その結果、本発明者は、ヒドロキシチロソールのみで改善効果を確認した。実験例 4 に示すように、ヒドロキシチロソールは、細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルにおいて、L P S 投与による排卵数の減少を顕著に抑制した。従って、ヒドロキシチロソールは、細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤となり得る。即ち、ヒドロキシチロソールを含有する細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤の有効性が示された。

【 0 0 3 1 】

また、本発明者は、本発明に係るスクリーニング方法を用いて、アントシアニン及びハ

10

20

30

40

50

スカップ（スイカズラ科スイカズラ属クロミノウグイスカグラ、*Lonicera caerulea* L.）抽出物について細菌感染誘発卵巣機能障害の改善効果を検討した。アントシアニン（anthocyanin）とは、アントシアニンジンがアグリコンとして糖と結合した配糖体であり、果実類等の植物に含まれる水溶性色素である。アントシアニンとしては、例えば、デルフィニジン、シアニンジン、マルピジン、ペラルゴニジン、ペオニジン、ペチュニジンなどが挙げられる。

【0032】

その結果、本発明者は、アントシアニン及びハスカップ抽出物についても改善効果を確認した。実験例5及び実験例6に示すように、アントシアニン及びハスカップ抽出物は、細菌感染誘発卵巣機能障害動物モデルにおいて、LPS投与による排卵数の減少を顕著に抑制した。従って、アントシアニン及びハスカップ抽出物は、細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤となり得る。即ち、アントシアニンを含有する細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤、及びハスカップ抽出物を含有する細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤、の有効性が示された。

10

【0033】

細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤としてヒドロキシチロソール、アントシアニン又はハスカップ抽出物を家畜又は家禽に投与すれば、子宮内膜炎及び乳房炎などの細菌感染に起因した卵巣機能障害を治療又は予防することができ、産仔数及び産卵数の低下を防止して生産効率を向上させることが可能である。また、細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤をヒトに適用すれば、骨盤内炎症疾患を原因とする卵巣機能障害及び不妊症を治療又は予防することも可能と考えられる。

20

【0034】

（2）医薬品組成物

上記細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤は、これを有効成分として含有する医薬品組成物として適用できる。

【0035】

この医薬品組成物は、天然物由来成分であるヒドロキシチロソール、アントシアニン、又は、果実類であるハスカップ由来の抽出物を有効成分とするため、長期にわたって連続的に適用できる可能性が高く、副作用も少ない可能性が高い。

【0036】

本発明に係る医薬品組成物は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液又は懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。医薬品組成物は、本発明に係る細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤を、生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ペヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造される。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。

30

40

【0037】

医薬品組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、投与対象（動物を含む）の年齢や体重、症状等を考慮して決定されるものである。

【0038】

（3）飼料等

また、上記細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤は、これを有効成分として含有する飼料又は食品組成物としても適用できる。

【0039】

この飼料又は食品組成物を産業動物に給餌すれば、細菌感染誘発卵巣機能障害を予防で

50

きる可能性がある。なお、食品組成物は、健康補助食品（機能的食品）としてヒトへの適用も考えられる。

【0040】

本発明に係る飼料は、上記細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤と、生草や乾草、青刈飼料作物（青刈トウモロコシ等）、わら類、生草や乾草、青刈飼料作物（青刈トウモロコシ等）、わら類等と混合することにより得ることができる。

【0041】

一般に、家畜の飼料は、粗飼料、濃厚飼料、及び特殊飼料の3種類に大別される。このうち、粗飼料は相対的に粗繊維含量が多く、容積が多い割には可消化栄養分が少ない飼料を指す。粗飼料には、生草や乾草、青刈飼料作物（青刈トウモロコシ等）、根菜類、わら類などが用いられている。また、濃厚飼料は比較的養分含量が高く、水分や粗繊維含量の低い飼料を指す。濃厚飼料には、トウモロコシ、マイロ、大麦、エンバク、米、アワ、ヒエ、キビ、コーリヤンなどの穀類や、米糠、ふすま類などの穀物副産物（糠類）、落花生粕、綿実粕、ヒマワリ粕、菜種粕、胡麻粕、亜麻仁粕などの油粕類などが用いられている。

10

【0042】

本発明に係る飼料は、これらの飼料に、オリーブの実や花、茎、根、好ましくは葉を、生の状態であるいは乾燥物として添加することにより製造することもできる。オリーブ葉等は、そのままあるいは粉碎して粉状としたものを添加し得る。また、オリーブオイルの搾油の際に発生した絞りかすを添加することもできる。

20

【0043】

また、アントシアニンを含む果実類等やハスカップの実についても、上記の飼料に、生の状態であるいは乾燥物として、添加することにより製造することもできる。アントシアニンを含む果実類等やハスカップの実などは、そのままあるいは粉碎して粉状としたものを添加し得る。

【0044】

また、食品組成物は、上記細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤に、ブドウ糖、果糖、ショ糖、マルトース、ソルビトール、ステビオサイド、ルブソサイド、コーンシロップ、乳糖、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、L-アスコルビン酸、d1-トコフェロール、エリスルビン酸ナトリウム、グリセリン、プロピレングリコール、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、アラビアガム、カラギーナン、カゼイン、ゼラチン、ペクチン、寒天、ビタミンB類、ニコチン酸アミド、パントテン酸カルシウム、アミノ酸類、カルシウム塩類、色素、香料、保存剤等の通常食品原料として使用されているものを適宜配合することにより製造することができる。また、一般に食品材料として使用される米、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ、スイートポテト、大豆、昆布、ワカメ、テングサなどと混合してもよい。

30

【0045】

食品組成物としては、例えば、健康食品、機能的食品、特定保健用食品、栄養補助食品、経腸栄養食品等を挙げることができる。これらの食品組成物は、動物に給餌することも可能である。

40

【0046】

上記の細菌感染誘発卵巣機能障害改善剤及びこれを有効成分とする医薬品組成物等において、ヒドロキシチロソール及びアントシアニンは、天然物抽出成分及び該抽出物の精製成分に由来するものとできる。また、化学合成されたヒドロキシチロソール及びアントシアニンを使用することも当然に可能である。

【0047】

ヒドロキシチロソールを天然物抽出成分として得る場合、特にオリーブ(*Olea europaea*)からの抽出が好適である。オリーブは、地中海原産の常緑樹であり、その実から得られるオリーブオイルは古くから食用されている。

50

【 0 0 4 8 】

ヒドロキシチロソールは、オリーブに多く含まれることが既に知られており、水、アルコール等の有機溶剤や油等によりオリーブから抽出できる。抽出のための有機溶剤には、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、グリセリン、アセトン、メチルエチルケトン、酢酸エチル、エーテル類、クロロホルム、及びジクロロメタン等を用いることができる。さらに、得られた抽出物を公知の方法で濃縮すれば、ヒドロキシチロソールを精製成分として得ることができる。

【 0 0 4 9 】

オリーブには、その実、葉、花、茎、根のいずれの部分も用いることができ、これらは生の状態で用いてもよく、あるいは乾燥物を用いてもよい。このうち、オレウロペイン等は、特にオリーブ葉に多いため、剪定や伐採されたオリーブの葉を有効に利用してヒドロキシチロソールを抽出することができる。

10

【 0 0 5 0 】

また、アントシアニンは、ブルーベリーやブドウなどの果実類や、サツマイモなどの野菜類など、多くの植物に含まれていることが知られている。アントシアニンを天然物抽出成分として得る場合、これらの植物の実や花などからの抽出が好適である。アントシアニンの抽出方法については、公知の抽出方法から適宜選択することができる。

【 0 0 5 1 】

本発明にかかる飼料及び食品組成物には、必要に応じて、細菌感染による卵巣機能障害の改善に用いられるものである旨が表示される。

20

【実施例】

【 0 0 5 2 】

< 実験例 1 >

1. 細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルの作出 1

本実験例では、マウスを用い、定法に従った過排卵処置に、細菌の構成成分投与を組み合わせることにより、細菌感染誘発卵巣機能障害の病態作出を試みた。

【 0 0 5 3 】

実験スケジュールを図 1 に示す。

本実験例では、細菌の構成成分として、リポポリサッカライド (L P S) とペプチドグリカン (P G N) を用いた。

30

実験 1 日目に、27 ~ 28 日齢の未性成熟マウスの腹腔に、L P S 又は P G N と、妊馬血清性腺刺激ホルモン (P M S G)、5 I U を投与した。

実験 2 日目に、再度、L P S 又は P G N を腹腔投与した。

実験 3 日目に、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (h C G)、5 I U を腹腔投与した。

実験 4 日目に開腹し、排卵数を計測した。

【 0 0 5 4 】

結果を図 2 に示す。図 2 A は異なる濃度の L P S を投与したマウスの排卵数、図 2 B は異なる濃度の P G N を投与したマウスの排卵数を示す。L P S を投与したマウスでは、コントロール群 (0 m g / k g b o d y w e i g h t (m g / k g B . W)) に比して濃度依存的に排卵数の減少が認められ、最大濃度 (4 . 0 m g / k g B . W) 投与群では排卵数が半減した。一方、P G N を投与したマウスでは、コントロール群に比して排卵数の有意な変化は認められなかった。

40

【 0 0 5 5 】

また、L P S の投与スケジュールと排卵数との関係についても検討した。投与スケジュールを図 3 に示す。図 3 において黒い矢印は、L P S 投与 (2 . 0 m g / k g B . W) を表わしている。結果を図 4 に示す。実験 1 日目のみに単回投与し、実験 2 日目に 2 度目の L P S 投与を行わない場合 (図 3 及び図 4、投与回数 1 回 (前半) 参照) では、L P S を投与していない場合に比べ、排卵数が数個程度減少した。一方、実験 1 日目の L P S 投与を行わず、実験 2 日目のみに単回投与した場合 (図 3 及び図 4、投与回数 1 回 (後半)

50

参照)では、LPSを投与していない場合に比べ、排卵数が半分程度まで減少した。

【0056】

これらの結果は、過排卵処置により刺激された卵巣の機能が、細菌の構成成分の一つである、内毒素と呼ばれるLPS投与によって障害され、排卵数の低下が生じていることを示している。従って、過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルは、細菌感染誘発卵巣機能障害の病態を反映し得るものであることが分かった。細菌の構成成分の一つであるLPS(内毒素)投与による卵巣機能障害は、非絶食マウス及び絶食マウスの両方で同様に確認できた。

【0057】

なお、本実験例に先立って、21~25日齢の各日齢のマウスの卵巣中のLPS受容体の発現をRT-PCRにより確認した結果を図5に示す。LPS受容体として機能するTLR4(Toll like receptor 4)は24日齢以降のマウスの卵巣中で発現していることが確認された。また、24日齢以降では、TLR4と複合体を形成し共同して機能するMD-2及びCD14の発現も確認された。なお、実験に供した27~28日齢のマウスの卵巣中では、PGNの受容体であるTLR2、NOD-1、NOD-2も発現が確認された。

10

【0058】

<実験例2>

2. 細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルの作出2

本実験例では、マウスを用い、定法に従った過排卵処置に、リポタイコ酸(LTA)の投与を組み合わせることにより、細菌感染誘発卵巣機能障害の病態作出を試みた。

20

【0059】

実験スケジュールは、実験例1(図1参照)と同様に行った。

実験1日目に、27~28日齢の未性成熟マウスの腹腔にPMSG、5IUと、リポタイコ酸(LTA)を、0.4、2.0、4.0、20mg/kg body weight(mg/kg B.W)の何れかの濃度で投与した。また、27~28日齢の未性成熟マウスに、LTAを投与せず、PMSG、5IUのみを投与し、コントロール群とした。

実験2日目に、再度、実験1日目と等量のLTAを上記のマウスに腹腔投与した。

実験3日目に、上記のマウスに、hCG、5IUを腹腔投与した。

実験4日目に、上記のマウスについて開腹し、排卵数を計測した。

30

【0060】

結果を図6に示す。図6は、異なる濃度のLTAが投与されたマウスの排卵数を示す。LTAが、0.4~4.0mg/kg B.Wの範囲で投与されたマウスにおいては、コントロール群(0mg/kg B.W)に比べ、排卵数が減少していた。さらに、LTAを最大濃度(20mg/kg B.W)で投与されたマウスでは、排卵数がコントロール群に比べ、半分程度にまで減少していた。

【0061】

これらの結果は、過排卵処置により刺激された卵巣の機能がLTAの投与によって障害され、排卵数の低下が生じていることを示している。従って、過排卵処置とLTA投与を組み合わせた動物モデルは、細菌感染誘発卵巣機能障害の病態を反映し得るものであることが分かった。なお、マウスにおいて、LTA投与による採食量の減少は見られなかった。

40

【0062】

<実験例3>

3. 細菌の構成成分の投与回数の検討

本実験例では、マウスにおいて細菌感染誘発卵巣機能障害の病態を作り出すために必要な細菌の構成成分の投与回数を検討した。

【0063】

実験スケジュールを図7に示す。

本実験例では、27~28日齢の未性成熟マウスに対して、過排卵処置として、実験例

50

1及び実験例2と同様にPMSG(5IU)及びhCG(5IU)を投与した。PMSGは実験1日目に、hCGは実験3日目に、各々マウスに対して投与した。

また、本実験例では、実験例1と同様に、マウスにおいて細菌感染誘発卵巣機能障害の病態を作り出すために、過排卵処置と併せてLPS(2.0mg/kg body weight(mg/kg B.W))を投与した。

【0064】

図7に示すように、LPSの投与回数1回のマウスについては、実験1日目のみLPSを上記濃度で投与した(図7、矢印(黒)参照)。投与回数2回のマウスについては、実験1日目と2日目に、各々上記の濃度のLPSを投与した。投与回数3回のマウスについては、実験1日目、2日目、3日目の計3回、毎回上記の濃度のLPSを投与した。

10

これらのマウスについては、実験4日目に開腹し、排卵数を計測した。また、過排卵処置のみを行い、LPS投与を行っていないコントロール群(LPS投与回数0回)も用意した。

【0065】

結果を図8に示す。LPSを1回投与したマウスにおいては、コントロール群(LPS投与回数0回)に比べ、排卵数が減少していた。また、LPSを2回投与したマウスにおいては、コントロール群に比べ排卵数が半分程度にまで減少していた。さらに、LPSを3回投与したマウスにおいては、コントロール群に比べ排卵数が4割程度までに減少していた。

【0066】

本実験例の結果から、細菌の構成成分の単回投与であっても過排卵処置されたマウスにおいて排卵数の減少が見られるが、マウスにおいて細菌感染誘発卵巣機能障害の病態を作り出すためには、細菌の構成成分の投与回数は、2回以上が好ましいことが示された。また、本実験例及び上述した実験例1に示すように、LPSの投与回数が1回であっても排卵数を減少させることはできるが、少なくとも1回のLPS投与は、PMSG投与24時間後に行われることが好ましいことが示された。

20

【0067】

<実験例4>

4. 過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルを用いた細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング1

30

本実験例では、実験例1で確立した細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルを用いて、同障害の改善作用を有する天然物由来成分のスクリーニングを行った。

【0068】

実験スケジュールを図9に示す。

実験1日目に、27~28日齢の未性成熟マウスにLPS(4.0mg/kg body weight(mg/kg B.W))とPMSG(5IU)を腹腔投与し、同時に被検物質を経口投与した。被検物質には、オリーブの葉の成分であるヒドロキシチロソール及びオレウロペイン、並びに甘草の根の成分であるグリチルリチンを用いた。

実験2日目に、再度、LPSの腹腔投与と被検物質の経口投与を行った。

実験3日目にhCG(5IU)を腹腔投与した。

40

実験4日目に開腹し、排卵数を計測した。

【0069】

結果を図10に示す。図10Aは、ヒドロキシチロソールについての結果を示し、図10Bは、オレウロペインについての結果を示し、図10Cは、グリチルリチンについての結果を示す。LPSにヒドロキシチロソールを5.0µg/kg B.Wで同時投与したマウスでは、ヒドロキシチロソールを投与していないコントロール群(0µg/kg B.W)に比して排卵数の減少が抑止され、排卵数がLPS非投与群と同程度(実験例1参照)にまで回復した。一方、LPSにオレウロペインを同時投与したマウスでは、0.5, 2.5, 5.0µg/kg B.Wのいずれの投与量においても排卵数の減少抑止効果は認められなかった。また、グリチルリチンも、投与量0.05g/kg B.Wでは、

50

排卵数の減少抑止効果はみられなかった。

【 0 0 7 0 】

これらの結果は、ヒドロキシチロソールが内毒素などの細菌の構成成分投与による排卵数低下を抑止し、細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有していること、及び過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルが同改善作用を有する物質をスクリーニングするための有効な評価系となり得ることを示している。

【 0 0 7 1 】

< 実験例 5 >

5 . 過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルを用いた細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング 2

本実験例では、実験例 4 と同様に、実験例 1 で確立した細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルを用いて、同障害の改善作用を有する天然物由来成分のスクリーニングを行った。

【 0 0 7 2 】

実験スケジュールを図 1 1 に示す。

実験 1 日目から 4 日目まで、23 ~ 24 日齢の未性成熟マウスに被検物質であるアントシアニン（常盤植物化学研究所、ビルベロン - 25）を経口投与し、試験群 1 及び試験群 2 とした。1 回に投与するアントシアニンの量は、4000 mg / kg body weight (mg / kg B.W) とした。

実験 5 日目に、試験群 2 のマウスに L P S (2 . 0 mg / kg B . W) と P M S G (5 I U) を腹腔投与し、同時に被検物質を上記濃度で経口投与した。試験群 1 のマウスについては、上記濃度で P M S G のみを腹腔投与し、同時に被検物質を上記濃度で経口投与した。また、被検物質を投与していない 27 ~ 28 日齢の未性成熟マウスに上記濃度で P M S G のみを腹腔投与し、コントロール群 1 とした。さらに、被検物質を投与していない 27 ~ 28 日齢の未性成熟マウスに上記濃度で L P S と P M S G を腹腔投与し、コントロール群 2 とした。

実験 6 日目に、試験群 2 及びコントロール群 2 のマウスに、再度、上記濃度で L P S の腹腔投与を行った。また、試験群 1 及び試験群 2 のマウスに、再度、上記濃度で被検物質の経口投与を行った。

実験 7 日目に、試験群 1、2 及びコントロール群 1、2 の各々のマウスに、h C G (5 I U) を腹腔投与した。

実験 8 日目に、試験群 1、2 及びコントロール群 1、2 の各々のマウスについて、開腹し、排卵数を計測した。

【 0 0 7 3 】

結果を図 1 2 に示す。図 1 2 は、コントロール群 1 の排卵数を 100 とした時の、コントロール群 2、試験群 1 及び試験群 2 の排卵数の割合 (%) を示す。

【 0 0 7 4 】

L P S 及びアントシアニンを投与した試験群 2 では、アントシアニンを投与していないコントロール群 2 に比して排卵数の減少が抑止され、L P S が投与されていないコントロール群 1 と同程度にまで回復した。一方、L P S が投与されず、アントシアニンのみが投与された試験群 1 においても、排卵数は、コントロール群 1 と同程度であった。これは、細菌に感染していない状態で上記濃度のアントシアニンを投与しても排卵に影響を与えないことを示している。

【 0 0 7 5 】

本実験例の結果は、アントシアニンが内毒素などの細菌の構成成分投与による排卵数低下を抑止し、細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有していること、及び過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルが同改善作用を有する物質をスクリーニングするための有効な評価系となり得ることを示している。

【 0 0 7 6 】

< 実験例 6 >

6. 過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルを用いた細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有する物質のスクリーニング3

本実験例では、実験例4及び5と同様に、実験例1で確立した細菌感染誘発卵巣機能障害の動物モデルを用いて、同障害の改善作用を有する天然物由来成分のスクリーニングを行った。

【0077】

実験スケジュールを図13に示す。

本実験例では、被検物質としてハスカップ抽出物を選び、ハスカップ抽出物を含む液体（ハスカップ抽出液）として、果皮を除いた生のハスカップを絞って得たハスカップ果汁を用いた。

実験1日目から4日目まで、23～24日齢の未性成熟マウスにハスカップ果汁を経口投与し、試験群3及び試験群4とした。1回に投与するハスカップ果汁の量は、100μlとした。

実験5日目に、試験群4のマウスにLPS（2.0mg/kg body weight (mg/kg B.W.))とPMSG（5IU）を腹腔投与し、同時に上記と同量のハスカップ果汁を経口投与した。試験群3のマウスについては、上記濃度でPMSGのみを腹腔投与し、同時に上記と同量のハスカップ果汁を経口投与した。また、上記のハスカップ果汁を投与していない27～28日齢の未性成熟マウスに上記濃度でPMSGのみを腹腔投与し、コントロール群3とした。さらに、上記のハスカップ果汁を投与していない27～28日齢の未性成熟マウスに上記濃度でLPSとPMSGを腹腔投与し、コントロール群4とした。

実験6日目に、試験群4及びコントロール群4のマウスに、再度、上記濃度でLPSの腹腔投与を行った。また、試験群3及び試験群4のマウスに、再度、上記と同量のハスカップ果汁を経口投与した。

実験7日目に、試験群3、4及びコントロール群3、4の各々のマウスに、hCG（5IU）を腹腔投与した。

実験8日目に、試験群3、4及びコントロール群3、4の各々のマウスについて、開腹し、排卵数を計測した。

【0078】

結果を図14に示す。図14は、コントロール群3の排卵数を100とした時の、コントロール群4、試験群3及び試験群4の排卵数の割合（％）を示す。

【0079】

LPS及びハスカップ果汁を投与した試験群4では、ハスカップ果汁を投与していないコントロール群4に比して排卵数の減少が抑止され、LPSが投与されていないコントロール群3に対して90％程度まで回復した。一方、LPSを投与せず、ハスカップ果汁のみを投与した試験群3においても、排卵数は、コントロール群3と同程度であった。これは、細菌に感染していない状態で上記の容量のハスカップ果汁を投与しても排卵に影響を与えないことを示している。

【0080】

これらの結果は、ハスカップ果汁に含まれる成分、即ちハスカップ抽出物が内毒素などの細菌の構成成分投与による排卵数低下を抑止し、細菌感染誘発卵巣機能障害の改善作用を有していること、及び過排卵処置・細菌の構成成分投与動物モデルが同改善作用を有する物質をスクリーニングするための有効な評価系となり得ることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0081】

本発明に係る細菌感染誘発卵巣機能障害改善作用を有する物質のスクリーニング方法等は、産業動物における生産効率向上、並びに動物及びヒトの不妊治療を目的として、細菌感染による卵巣機能障害を改善し、正常な排卵を促す作用を有する物質を見出すために用いることができる。

10

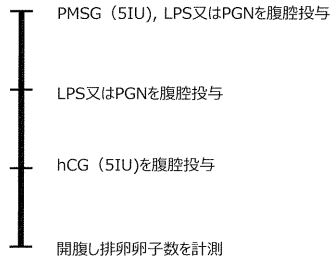
20

30

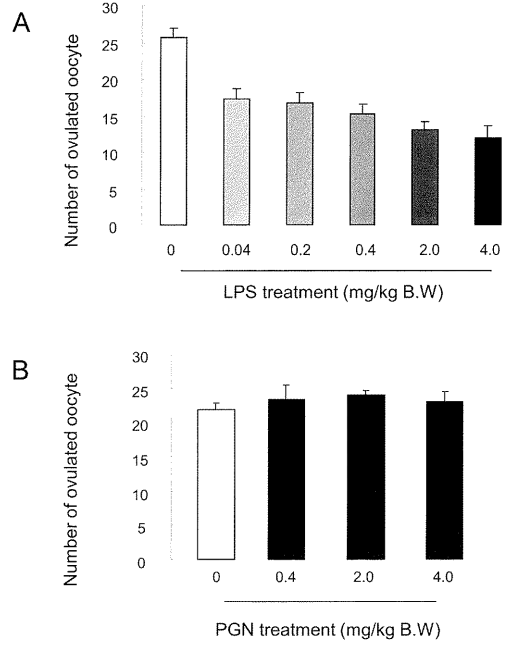
40

50

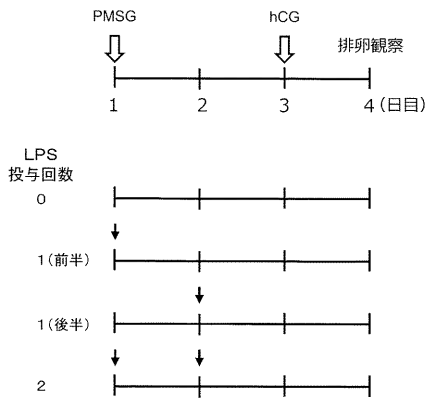
【 図 1 】



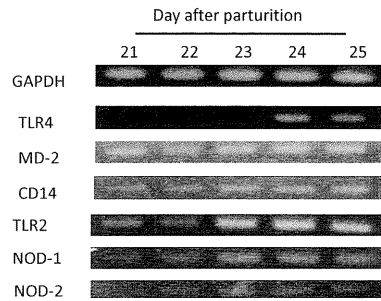
【 図 2 】



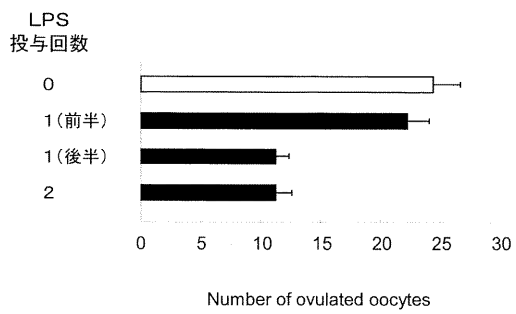
【 図 3 】



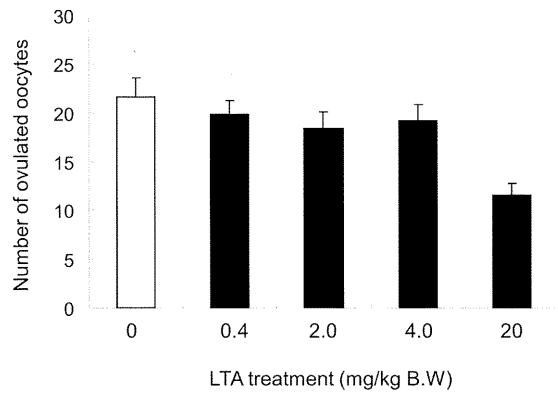
【 図 5 】



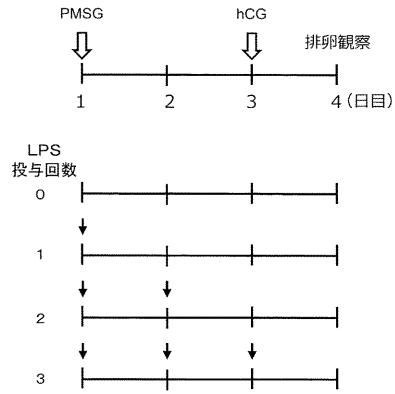
【 図 4 】



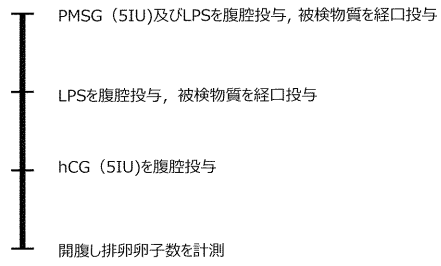
【 図 6 】



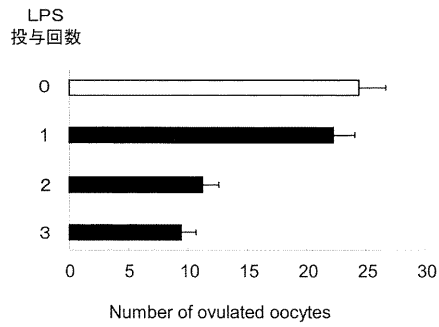
【図7】



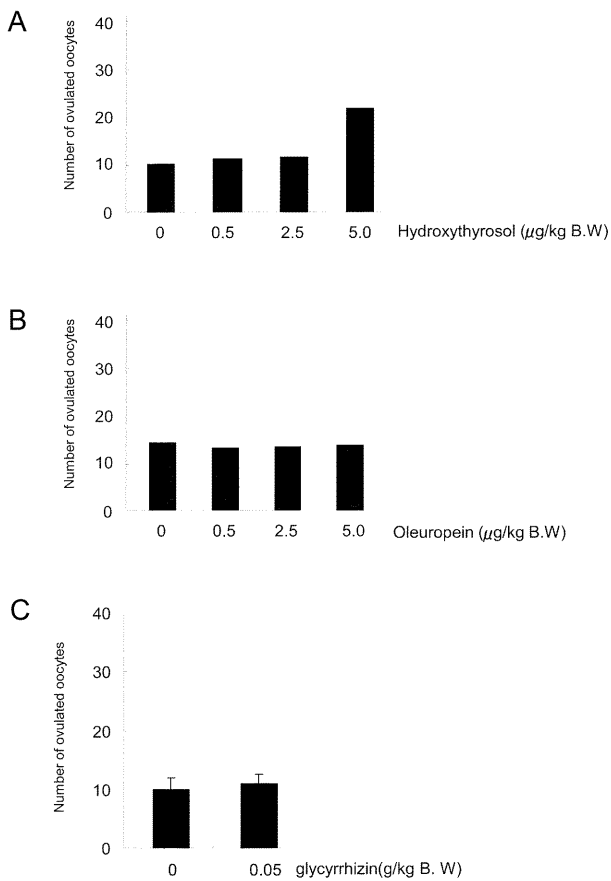
【図9】



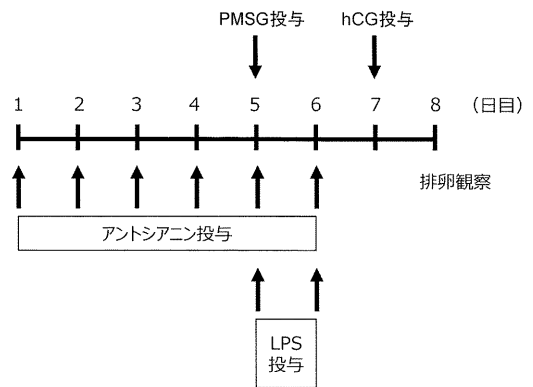
【図8】



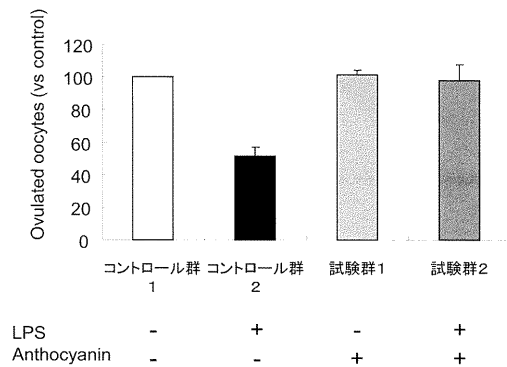
【図10】



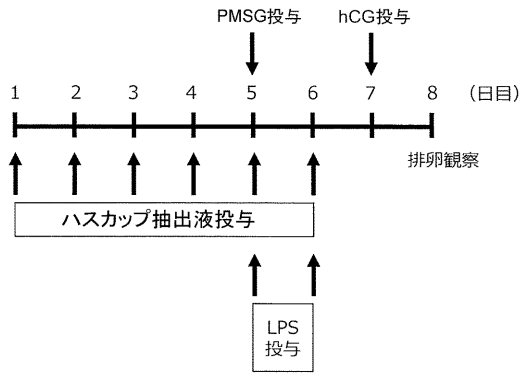
【図11】



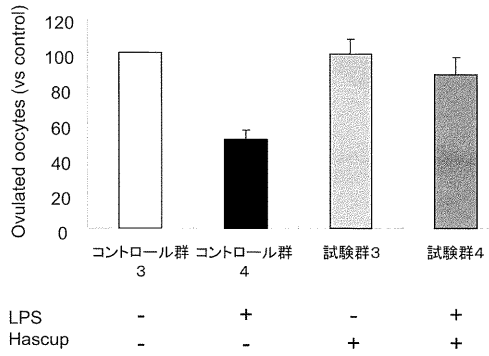
【図12】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



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 49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00		A
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15		Z

Fターム(参考) 4C206 AA01 AA02 CA20 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZC61