

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年9月8日(08.09.2017)

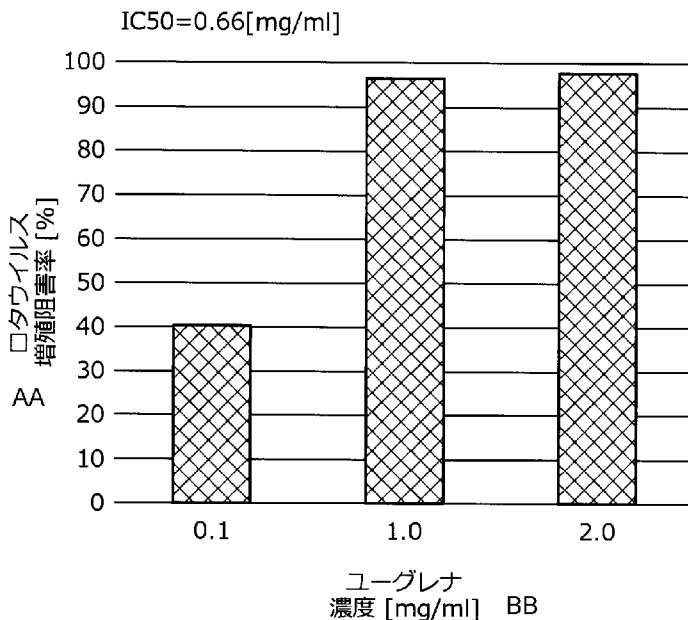


(10) 国際公開番号
WO 2017/149858 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/68 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/084571
- (22) 国際出願日: 2016年11月22日(22.11.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-041911 2016年3月4日(04.03.2016) JP
- (71) 出願人: 株式会社ユーグレナ (EUGLENA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1080014 東京都港区芝五丁目3番1号 Tokyo (JP). 学校法人武庫川学院 (EDUCATIONAL CORPORATION MUKOGAWA GAKUIN) [JP/JP]; 〒6638137 兵庫県西宮市池開町137番地 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 中島 綾香 (NAKASHIMA, Ayaka); 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユーグレナ内 Kanagawa (JP). 鈴木 健吾 (SUZUKI, Kengo); 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユーグレナ内 Kanagawa (JP). 伊勢川 裕二 (ISEGAWA, Yuji); 〒6638558 兵庫県西宮市池開町6番46号 武庫川女子大学内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 秋山 敦, 外 (AKIYAMA, Atsushi et al.); 〒1076033 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル33階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC,

[続葉有]

(54) Title: ANTIVIRAL AGENT AND ANTIVIRAL FOOD
(54) 発明の名称: 抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品



(57) Abstract: Provided are an antiviral agent and an antiviral food as novel methods for utilizing a euglena-derived substance. The antiviral agent and antiviral food, both comprising a euglena-derived substance as an active ingredient, are to be used for preventing or treating an infectious disease caused by an envelope-free RNA virus. Examples of the envelope-free RNA virus include rotaviruses belonging to *Reoviridae*. Examples of the euglena-derived substance include euglena, a hot water extract of euglena, paramylon and an alkali-treated paramylon.

(57) 要約: ユーグレナ由来物質の新規な利用方法となる抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品を提供する。ユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、エンペロープを有さないRNAウイルス感染症の予防又は治療に用いられる抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品である。例えば、エンペロープを有さないRNAウイルスは、レオウイルス科に属するロタウイルスである。また例えば、ユーグレナ由来物質は、ユーグレナ、ユーグレナの熱水抽出物、パラミロン、またはパラミロンのアルカリ処理物である。

AA Rotavirus growth inhibitory ratio [%]
BB Euglena concentration [mg/ml]



WO 2017/149858 A1



LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

ロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品

技術分野

[0001] 本発明は、新規な抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品、特にユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、ウイルス感染症の予防又は治療に用いられる抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品に関する。

背景技術

[0002] ウイルス感染症は、環境中（大気、水、土壌、動物など）に存在する病原体であるウイルスが、ヒトの体内に侵入することで引き起こされる感染性疾患であって、局地的な流行で終息することもあるが、動物（特にヒト）の移動によって世界的な規模で感染が拡大し、公衆衛生上の問題となることがある。

ウイルスは、一般に約0.02～0.3 μ mの大きさからなる微小な寄生体であって、主にタンパク質の殻（カプシド）と、その殻内部にある核酸（RNA又はDNA）から構成されている。

ウイルスは、その複製については完全に細胞に依存しており、まず宿主細胞に吸着して細胞内に侵入する。そして、細胞内でDNAやRNAを放出（脱殻）して複製されるが、その過程では特異的酵素を必要とする。ウイルスに感染した宿主細胞は、正常に機能できなくなって通常は死滅し、その宿主細胞から新しいウイルスが放出されて他の宿主細胞へさらに感染する。

ウイルスは、ゲノムとしてDNAを有するDNAウイルスと、RNAを有するRNAウイルスとに大別され、RNAウイルスの中には、代表的なウイルスとして呼吸器疾患を引き起こすインフルエンザウイルスのほか、消化器疾患を引き起こすロタウイルス及びノロウイルスが知られている。

[0003] ロタウイルスは、消化器疾患である感染性胃腸炎を引き起こすウイルスであって、一般に乳児下痢症や嘔吐下痢症の原因として知られている。特に、冬季に見られる乳児下痢症は、主に2歳以下の幼児に対して発熱、嘔吐、下

痢及び脱水症状を引き起こす重症の下痢症疾患である。

わが国では、ロタウイルス胃腸炎による年間の患者数は約80万人、入院者数は約7～8万人に及ぶと推計されており、毎年数名の死亡者が報告されている。ロタウイルスは感染力が非常に強く、衛生環境の整った先進国であっても、概ね5歳までにほぼ100%のヒトがロタウイルスに一度は感染すると考えられている。アメリカ合衆国では年間約50万人以上が主に下痢症状で受診し、特に小児は重篤な下痢を起こし易く、罹患患者の約10%は入院すると言われている。地域差があると考えられるが、全世界で毎年約70万人程度が亡くなっていると考えられている（非特許文献1参照）。

先進国の疫学調査によると、衛生状態の改善ではロタウイルスの有病率を減少させることはできないとされている。また、ロタウイルスに対するワクチンが一応開発されているものの、ワクチンの無効な型や組み替え体が存在するため、それらの対策が求められている。そこで、新規メカニズムのロタウイルス治療剤の開発が期待されている。

[0004] また、ノロウイルスは、消化器疾患である感染性胃腸炎を引き起こすウイルスであって、カキなどの貝類の摂食による食中毒の原因になるほか、感染したヒトの糞便や吐瀉物、あるいはそれらが乾燥したものから出る塵埃を介して経口感染する。ノロウイルス属による集団感染は、世界各地の学校や乳幼児施設、高齢者施設などで散発的に発生しており、脱水症状から重症となって死亡する例もある。

ノロウイルス感染症は近年増加傾向にあり、ノロウイルスは変異を繰り返して、ヒトからヒトへ感染するよう変異することがあり、新型のノロウイルスに対する抗体をもたないために大流行することが多い。しかしながら、ノロウイルスに対するワクチンは、一部有効性が認められるものもあるがまだ開発途上にあって、ノロウイルスワクチンの開発や、新規メカニズムのノロウイルス治療剤の開発が期待されている。

[0005] 一方で、食糧、飼料、燃料等としての利用が有望視されている生物資源として、ユーグレナ（属名：Euglena, 和名：ミドリムシ）が注目されている。

ユーグレナは、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、不飽和脂肪酸など、人間が生きていくために必要な栄養素の大半に該当する59種類もの栄養素を備え、多種類の栄養素をバランスよく摂取するためのサプリメントとしての利用や、必要な栄養素を摂取できない貧困地域での食糧供給源としての利用の可能性が提案されている。

[0006] ユーグレナは、食物連鎖の最底辺に位置し、捕食者により捕食されることや、光、温度条件、攪拌速度などの培養条件が他の微生物に比べて難しいなどの理由から、大量培養が難しいとされてきたが、近年、本発明者らの鋭意研究によって、大量培養技術が確立され、ユーグレナ及びユーグレナから抽出されるパラミロンの大量供給の途が開かれた。

ユーグレナは、鞭毛運動をする動物的性質をもちながら、同時に植物として葉緑体を持ち光合成を行うユニークな生物であり、ユーグレナ自体やユーグレナ由来の物質に、多くの機能性があることが期待されている。

そのため、大量供給可能となったユーグレナ及びパラミロン等のユーグレナ由来物質の機能や、機能性発現のメカニズムの解明、ひいては、これらの物質の利用法等の開発が望まれている。

[0007] 例えば、特許文献1では、ユーグレナ由来物質を有効成分とし、インフルエンザウイルス感染症の予防又は治療に用いられる抗ウイルス剤が挙げられている。

具体的には、ユーグレナ又はパラミロンを経口摂取させたマウスでは、コントロールのマウスと比較して、インフルエンザウイルス感染後の生存率が有意に高く、ウイルス力価が低下したことが明らかとなっている。

また特許文献2では、ユーグレナ由来のパラミロンを硫酸化して得られる硫酸化パラミロンを有効成分とするレトロウイルス感染症の治療剤が挙げられている。

こうしたユーグレナ由来物質の抗ウイルス活性については未だ一部しか明らかになっておらず、上述した機能以外の機能の解明、これら物質の利用法等の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第2015/156339号公報

特許文献2：特開平4-54125号公報

非特許文献

[0009] 非特許文献1：河本聡志「ウイルス」、第64巻、第2号、2014、p.179-190

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、新規な抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品を提供することにある。

本発明の他の目的は、ユーグレナ由来物質の新規な利用方法となる抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、鋭意研究した結果、ユーグレナ由来物質が、エンベロープを有さないRNAウイルス、特にロタウイルス及びノロウイルスの増殖を阻害させる作用を有することを見出した。

詳しく言うと、これらウイルスは、生体内の宿主細胞に吸着して細胞内に侵入し、細胞内でRNAを放出（脱殻）して複製され、宿主細胞から複製されたウイルスが放出されて増殖するところ、本発明者らは、ユーグレナ由来物質が、これらウイルスの増殖メカニズムにおいてウイルスの宿主細胞への吸着を阻害することを明らかにし、また、当該ウイルスの宿主細胞内での複製・放出を阻害することを明らかにして、本発明をするに至った。

また、本発明者らは、ユーグレナ由来物質が、ロタウイルス及びノロウイルスの増殖メカニズムにおいて、これらウイルスの吸着時期、また複製時期に必要な結合タンパク質や特異的酵素の活性を阻害することを明らかにして、本発明をするに至った。

[0012] 従って、前記課題は、本発明の抗ウイルス剤によれば、ユーグレナ由来物

質を有効成分として含有し、エンベロープを有さないRNAウイルス感染症の予防又は治療に用いられること、により解決される。

このとき、前記エンベロープを有さないRNAウイルスは、レオウイルス科に属するウイルスであると良く、前記レオウイルス科に属するウイルスのうち、ロタウイルスであるとさらに良い。

上記構成により、例えばヒト、特にウイルス感染患者にユーグレナ由来物質を投与するとユーグレナ由来物質が生体内においてウイルス増殖を阻害する作用を果たすため、本発明をウイルス感染症の予防剤又は治療剤として用いることができる。

そして、RNAウイルス感染症のうち、特にその強烈な伝播力によって社会に莫大な被害を及ぼすロタウイルス感染症又はノロウイルス感染症の予防剤又は治療剤として好適に用いることができる。

[0013] このとき、前記ユーグレナ由来物質は、ユーグレナの熱水抽出物であると良い。

または、前記ユーグレナ由来物質は、パラミロンをアルカリ処理して得られるアルカリ処理物であると良い。

上記のように、ユーグレナ由来物質の抽出物や、抽出物の濃度を最適化することで、RNAウイルス増殖の阻害作用の効果が一層向上する。

[0014] このとき、前記ユーグレナ抽出物由来であって、ウイルスの細胞への吸着を阻害するためのウイルス吸着阻害剤として用いられると良い。

上記構成により、ウイルスは、一般に生体内の宿主細胞に吸着して細胞内に侵入し、細胞内でRNAを放出（脱殻）して複製され、宿主細胞から複製されたウイルスが放出されることで増殖するところ、本発明の抽出物が、ウイルス増殖を阻害するために宿主細胞への吸着時期において抗ウイルス活性を発揮することができる。

そのため、例えば、ウイルス感染症患者に対して、ウイルス増殖がどの時期まで進行しているかを把握して最適な投与タイミングで本抗ウイルス剤を投与することができる。

[0015] また、ユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、ウイルスを病原体とする感染性胃腸炎の予防又は治療に用いられる抗ウイルス剤や、エンベロープを有さないRNAウイルス感染症の予防又は改善に用いられる抗ウイルス用食品も提供することができる。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、新規な抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品を提供することができる。

また、ユーグレナ由来物質の新規な利用方法となる抗ウイルス剤及び抗ウイルス用食品を提供できる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]ユーグレナによるロタウイルス増殖阻害率の結果を示すデータである。
[図2]ユーグレナ熱水抽出物によるロタウイルス増殖阻害率の結果を示すデータである。
[図3]パラミロンによるロタウイルス増殖阻害率の結果を示すデータである。
[図4]アモルファスパラミロンによるロタウイルス増殖阻害率の結果を示すデータである。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明の実施形態について、図1～図4を参照しながら説明する。

本実施形態は、ユーグレナ由来物質を有効成分とし、ヒトに投与することでヒト体内のウイルスの増殖を阻害して、ウイルス感染症の予防又は治療に用いられることを特徴とする抗ウイルス剤の発明に関するものである。

詳しく言うと、ウイルス増殖を阻害するためにウイルスの宿主細胞への吸着時期、また複製・放出時期において抗ウイルス活性を発揮することを特徴とする抗ウイルス剤の発明に関するものである。

[0019] <ウイルスの概要>

ウイルスは、ゲノムがDNAであるかRNAであるかによって、DNAウイルスとRNAウイルスに大別される。

またDNAウイルスは、DNAが一本鎖であるか二本鎖であるかによって

、主に2つに分類することができる。

具体的には、一本鎖のDNAウイルス（エンベロープを有しないもの）として、パルボウイルス科などが存在し、また、二本鎖のDNAウイルスのうち、エンベロープを有するものとしてヘルペスウイルス科、ポックスウイルス科及びヘパドナウイルス科などが存在し、エンベロープを有しないものとしてアデノウイルス科及びパピローマウイルス科などのウイルスが存在する。

一本鎖のDNAウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患としては、ヒトパルボB19（伝染性紅班）などが挙げられ、また、二本鎖のDNAウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患としては、単純ヘルペス（歯肉口内炎、唇ヘルペス、性器ヘルペスウイルス感染症）、水痘・带状疱疹、痘瘡、B型肝炎、アデノ（咽頭結膜熱、急性出血性結膜炎、流行性角結膜炎）、ヒトパピローマなどが挙げられる。

[0020] RNAウイルスは、RNAが一本鎖であるか二本鎖であるか、一本鎖RNAウイルスの場合にはゲノムのセンスがプラス鎖(+鎖)であるかマイナス鎖(-鎖)であるかによって、主に3つに分類することができる。

具体的には、まず一本鎖の-鎖RNAウイルス（エンベロープを有するもの）として、オルトミクソウイルス科、ラブドウイルス科、パラミクソウイルス科、フィロウイルス科、ブニヤウイルス科及びアレナウイルス科などのウイルスが存在する。なお、インフルエンザウイルスは、オルトミクソウイルス科に属している。

これら一本鎖の-鎖RNAウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患としては、インフルエンザ、鳥インフルエンザ、狂犬病、麻疹、ムンプス（流行性耳下腺炎）、RS（呼吸器感染症）、エボラ（出血熱）、マールブルグ（出血熱）、クリミア・コンゴ出血熱、SFTS、ラッサ（出血熱）、フニン／サビア／ガナリト／マチュポ（出血熱）などが挙げられる。

[0021] 次に、一本鎖の+鎖RNAウイルスのうち、エンベロープを有するものとしてフラビウイルス科、コロナウイルス科、トガウイルス科及びレトロウイ

ルス科などが存在し、エンベロープを有しないものとしてカリシウイルス科及びピコルナウイルス科などのウイルスが存在する。なお、ノロウイルスは、カリシウイルス科に属している。

これら一本鎖の+鎖RNAウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患としては、デング、ウエストナイル、日本脳炎、C型肝炎、黄熱、SARSコロナ、MERSコロナ、風疹、ヒト免疫不全（AIDS）、ヒトTリンパ好性（成人T細胞白血病）、E型肝炎、ノロ（感染性胃腸炎）、ポリオ（急性灰白髄炎）、A型肝炎、コクサッキー（手足口病、ヘルパンギーナ）、ライノ（感冒）などが挙げられる。

[0022] 最後に、二本鎖RNAウイルス（エンベロープを有しないもの）として、レオウイルス科などが存在する。

なお、ロタウイルスは、レオウイルス科に属している。

二本鎖RNAウイルスによって引き起こされるウイルス性疾患としては、ロタ（感性的胃腸炎）などが挙げられる。

[0023] ロタウイルスは、レオウイルス科のロタウイルス属に属するRNAウイルスである。

ロタウイルス粒子は、コア、内殻及び外殻の3層で構成される二重殻粒子からなり、ウイルス粒子内にRNAポリメラーゼやキャップ合成関連酵素を有する。コアは、タンパク質VP1、VP2、VP3からなり、内殻タンパク質VP6によって覆われて一重殻粒子を形成し、さらに外殻タンパク質VP4、VP7で覆われて二重殻粒子つまり感染性ウイルス粒子を形成する。

ロタウイルスは、内殻タンパク質VP6の抗原性によってA～H群の8種類に分類される。ヒトへの感染が報告されているロタウイルスは主にA群～C群である。

ロタウイルスは、ヒトの小腸の腸管上皮細胞に感染し、微絨毛の配列の乱れや欠落などの組織病変の変化を引き起こす。これによって腸からの水の吸収が阻害され下痢症を発症する。通常約48時間の潜伏期間をおいて発症し、主に乳幼児に急性胃腸炎を引き起こす。

主症状は下痢（血便、粘血便は伴わない）、嘔気、嘔吐、発熱、腹痛であり、通常約1～2週間で自然に治癒するが、脱水がひどくなるとショック、電解質異常、時には死に至ることもある。

[0024] ロタウイルスを含むRNAウイルスが細胞内で増殖する過程を説明すると、ウイルスが宿主細胞に吸着する「吸着時期」、吸着したウイルスが細胞内に侵入する「侵入時期」、侵入したウイルスが細胞内でRNAを放出する（脱殻する）「脱殻時期」、脱殻したRNAから新たなウイルスが複製される「複製時期」、そして、複製されたウイルスが細胞から放出される「放出時期」を経ていく。

ウイルスは、核酸やタンパク質の合成に必要な素材を有しておらず、必ず生体細胞を必要とする。生体細胞内に寄生して、細胞の代謝を利用して増殖し、材料、宿主細胞の代謝酵素、タンパク質合成のための宿主細胞リボソームを利用して自己成分を合成する。

例えば細菌は基本的に2分裂によって増殖していくのに対し、ウイルスは1つの粒子が感染した宿主細胞内で一気に数を増やしていく。

[0025] 「吸着時期」では、ウイルス表面にある結合タンパク質（リガンド）が、宿主細胞の表面の受容体（レセプター）に結合する。ウイルスへの感染性は、そのウイルスに対するレセプターを宿主細胞が有しているかどうか依存する。

ロタウイルスの場合、ウイルス表面にある結合タンパク質（外殻タンパク質VP4、VP7）が細胞側にある受容体に結合する。

[0026] 「侵入時期」では、ウイルスは、一般に細胞の飲食作用（エンドサイトーシス）によって細胞内のエンドソームに取り込まれる。そして、エンドソーム内の酸性化によって、ウイルス表面の結合タンパク質（リガンド）と、宿主細胞の細胞膜とが融合する。

ロタウイルスの場合、宿主細胞由来のプロテアーゼ（トリプシン）によって、外殻タンパク質VP4が、タンパク質VP5とタンパク質VP8に開裂している必要がある。この開裂の後、まずタンパク質VP8がシアル酸を含

む分子（第1レセプター）と接触し、次にタンパク質VP5及び外殻タンパク質VP7がインテグリン（第2レセプター）と結合することによって、直接侵入あるいはエンドサイトーシスで細胞内へ侵入すると考えられている。

[0027] 「脱殻時期」では、細胞内へ侵入したウイルスの結合タンパク質（カプシド）が分解され、RNAが宿主細胞内を遊離する（脱殻）。脱殻からウイルス粒子が再構成されるまでの期間は、ウイルス粒子が見かけ上存在しなくなり、この期間を暗黒期とも言う。

ロタウイルスの場合、細胞侵入の際に外殻タンパク質VP4、VP7が除去される。外殻タンパク質VP4、VP7が外れることで、細胞内に放出された内殻タンパク質VP6の再配置が起こり、RNA転写が開始される。

[0028] 「複製時期」では、脱殻したRNAが宿主細胞の核内に取り込まれて、新たなRNAが大量に複製されると同時にRNAの転写（mRNAの合成）を経てウイルス独自のタンパク質が大量に合成される。RNAの複製の際には、RNA複製酵素となるRNA依存性のRNAポリメラーゼが機能する。また、mRNAからタンパク質への合成の際には、宿主細胞の持つリボソームなどのタンパク質合成系が機能する。複製されたRNAと、合成されたタンパク質とが細胞内で集合し、新たなウイルスが組み立てられる（複製される）。

「放出時期」では、ウイルスは、宿主細胞の細胞膜や核膜をかぶって出芽することや宿主細胞が死滅することで、宿主細胞外へ放出される（詳細は非特許文献1参照）。

[0029] 現在のところでは、ロタウイルスに効果のある一般的な抗ウイルス剤はなく、脱水症状を防止するための水分補給や、体力消耗を防ぐために栄養補給をすることが治療の中心となっている。

[0030] ノロウイルスは、カリシウイルス科に属するRNAウイルスであって、培養細胞や実験動物への感染がいまだに成功しておらず、ヒトが唯一の感受性動物であると言われている。

ノロウイルスは、ヒトに対して嘔吐、下痢等の急性胃腸炎症状を引き起こ

し、症状が消失した後も約3～7日間ほど患者の便中に排出されるため、2次感染に注意が必要である。

ノロウイルスはヒトの空腸の上皮細胞に感染して繊毛の委縮と扁平化、さらに剥離と脱落を引き起こして下痢を生じると考えられている。

潜伏期間は約24～48時間であると考えられ、嘔気、嘔吐、下痢が主症状であるが、腹痛、頭痛、発熱、悪寒、筋痛、咽頭痛、倦怠感などを伴うこともある。特別な治療を必要とせずに軽快するが、乳幼児や高齢者およびその他、体力の弱っている者での嘔吐、下痢による脱水や窒息には注意をする必要がある。

現在のところでは、ノロウイルスに効果のある一般的な抗ウイルス剤はなく、通常、対症療法が行われており、脱水症状を防止するための水分補給や、体力消耗を防ぐために栄養補給をすることが治療の中心となっている。また臨床症状からだけではノロウイルス感染症を特定することは難しいとされている。

[0031] <抗ウイルス剤>

本発明の抗ウイルス剤の有効成分となる「ユーグレナ由来物質」とは、ユーグレナ又はユーグレナの乾燥物や熱水抽出物のほか、ユーグレナ細胞から抽出されたパラミロン、パラミロン粉末や、パラミロンの加工品等が含まれる。

[0032] 「ユーグレナ細胞」としては、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*)、特に、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*) Z株を用いることが望ましい。そのほか、ユーグレナ・グラシリス・クレブス、ユーグレナ・グラシリス・バルバチラス等の種、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*) Z株の変異株SM-ZK株（葉緑体欠損株）や変種のvar. bacillaris、これらの種の葉緑体の変異株等の遺伝子変異株由来の β -1, 3-グルカナーゼ、*Euglena intermedia*、*Euglena piride*、及びその他のユーグレナ類、例えば*Astaia longa*であっても良い。

ユーグレナ属は、池や沼などの淡水中に広く分布しており、これらから分

離して使用しても良く、また、既に単離されている任意のユーグレナ属を使用してもよい。

本発明に係るユーグレナは、その全ての変異株を包含する。また、これらの変異株の中には、遺伝的方法、例えば組換え、形質導入、形質転換等により得られたものも含有される。

[0033] ユーグレナ細胞の培養において、培養液としては、例えば、窒素源、リン源、ミネラルなどの栄養塩類を添加した培養液、例えば、改変Cramer-Myers培地（ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mg/L, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, チアミン塩酸塩（ビタミンB1）0.1 mg/L, シアノコバラミン（ビタミンB12）、（pH 3.5））を用いることができる。なお、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ や NH_3aq に変換することも可能である。また、そのほか、ユーグレナ 生理と生化学（北岡正三郎編、株式会社学会出版センター）の記載に基づき調製される公知のHutner培地、Koren-Hutner培地を用いてもよい。

[0034] 培養液のpHは好ましくは2以上、また、その上限は、好ましくは6以下、より好ましくは4.5以下である。pHを酸性側にするることにより、光合成微生物は他の微生物よりも優勢に生育することができるため、コンタミネーションを抑制することができる。

ユーグレナ細胞の培養は、太陽光を直接利用するオープンポンド方式、集光装置で集光した太陽光を光ファイバー等で送り、培養槽で照射させ光合成に利用する集光方式等により行っても良い。

また、ユーグレナ細胞の培養は、例えば供給バッチ法を用いて行われ得るが、フラスコ培養や発酵槽を用いた培養、回分培養法、半回分培養法（流加培養法）、連続培養法（灌流培養法）等、いずれの液体培養法により行って

も良い。

ユーグレナ細胞の分離は、例えば培養液の遠心分離又は単純な沈降によって行われる。

[0035] 「パラミロン (paramylon)」とは、約700個のグルコースが β -1, 3-結合により重合した高分子体 (β -1, 3-グルカン) で多孔質であり、ユーグレナ属が含有する貯蔵多糖である。パラミロン粒子は、扁平な回転楕円体粒子であり、 β -1, 3-グルカン鎖がらせん状に絡まりあって形成されている。

[0036] パラミロンは、すべての種、変種のユーグレナ細胞内に顆粒として存在し、その個数、形状、粒子の均一性は、種により特徴がある。

パラミロンは、グルコースのみからなり、*E. gracilis* Zの野生株と葉緑体欠損株SM-ZKから得られたパラミロンの平均重合度は、グルコース単位で約700である。

パラミロンは、水、熱水には不溶性であるが、希アルカリ、濃い酸、ジメチルスルホキシド、ホルムアルデヒド、ギ酸に溶ける。

パラミロンの平均密度は、*E. gracilis* Zでは、1.53、*E. gracilis* var. *b* *acillaris* SM-L1では、1.63である。

なお、パラミロン ((株) ユーグレナ製) の粒度分布は、レーザ回折/散乱式粒度分布測定装置で測定したときのメジアン径が、1.5~2.5 μ mである。

[0037] パラミロン粒子は、培養されたユーグレナ細胞から任意の適切な方法で単離及び微粒子状に精製され、通常、粉末体として提供されている。

例えば、パラミロン粒子は、(1) 任意の適切な培地中でのユーグレナ細胞の培養；(2) 当該培地からのユーグレナ細胞の分離；(3) 分離されたユーグレナ細胞からのパラミロンの単離；(4) 単離されたパラミロンの精製；および必要に応じて(5) 冷却及びその後の凍結乾燥によって得ることができる。

パラミロンの単離は、例えば、大部分が生物分解される種類の非イオン性又は陰イオン性の界面活性剤を用いて行われる。パラミロンの精製は、実質

的には単離と同時に行われる。

[0038] なお、ユーグレナからのパラミロンの単離および精製は周知であり、例えば、E. Ziegler, "Die natuerlichen und kunstlichen Aromen" Heidelberg, Germany, 1982, Chapter 4.3 "Gefriertrocken", DE 43 28 329、又は特表2003-529538号公報に記載されている。

[0039] 「パラミロンの加工品」としては、例えば、アモルファスパラミロン、エマルジョンパラミロンが挙げられる。

「アモルファスパラミロン」とは、ユーグレナ由来の結晶性パラミロンをアモルファス化した物質である。

アモルファスパラミロンは、ユーグレナから公知の方法で生成された結晶性のパラミロンに対する相対結晶度が、1~20%である。

但し、この相対結晶度は、特許第5612875号記載の方法により求めたものである。

つまり、アモルファスパラミロン及びパラミロンを、それぞれ、粉砕機(Retsh社製ボールミルMM400)にて、振動数20回/秒で5分間粉砕後、X線回折装置(スペクトリス社製H' PertPRO)を用い、管電圧45KV、管電流40mAにて、 2θ が 5° 乃至 30° の範囲でスキャンを行い、パラミロンとアモルファスパラミロンの $2\theta = 20^\circ$ の付近の回折ピーク P_c 、 P_a を得る。

この P_c 、 P_a の値を用い、アモルファスパラミロンの相対結晶度を、

アモルファスパラミロンの相対結晶度 = $P_a / P_c \times 100$ (%)

により算出する。

[0040] アモルファスパラミロンは、特許第5612875号記載の方法に従い、結晶性のパラミロン粉末を、アルカリ処理した後に酸で中和し、その後洗浄、水分除去工程を経て、乾燥を行うことにより調製されるアルカリ処理物である。

[0041] 「エマルジョンパラミロン」とは、その加工方法及び物性が乳化物に類似していることから、エマルジョンパラミロンとも呼ばれる物質であって、パラミロンに水を加えて得た流体を超高圧で細孔ノズルから噴出させて被衝突

物に衝突させる衝突処理を行うことにより得られ、4倍以上の水と結合して膨潤した加工パラミロンである。

エマルジョンパラミロンは、粉体等の固体に水溶性溶媒を加えたスラリーを、細孔ノズルから超高压で噴出させて被衝突物に衝突させる公知の物性改質装置（例えば、特開2011-88108号公報、特開平6-47264号公報記載の装置）で、噴出時のノズル圧力245MPaで、1回以上衝突処理を行うことにより得ることができる。

エマルジョンパラミロンは、レーザ回折／散乱式粒度分布測定装置で粒度を測定したときのメジアン径が、パラミロンの5倍以上であり、7 μ m以上であって、光学電子顕微鏡により、粒子が、隣接する粒子と付着していることが観察され、パラミロンに対して4倍以上の水と結合して膨潤している。

原料パラミロンと水を混合したスラリーは、さらさらした流体であるが、エマルジョンパラミロンは、パラミロンが水分子中に分散して、粘度が増加して粘性を有し、触ったときに手に付着するような粘着性と、弾力性を有し、糊のような触感を備えている。

なお、その処理方法と物性から、得られた加工パラミロンを本明細書においてエマルジョンパラミロンと呼んでいるが、エマルジョン化しているか否かは不明であり、パラミロンが水と結合して膨潤している状態である。

[0042] パラミロンの加工品としては、そのほか、公知の種々の方法によりパラミロンを化学的又は物理的に処理して得た水溶性パラミロン、硫酸化パラミロン等や、パラミロン誘導体も含まれる。

[0043] <<ウイルス増殖阻害作用>>

抗ウイルス剤は、ユーグレナ由来物質が有するウイルス増殖の阻害作用、特にRNAウイルス増殖の阻害作用を通じて、抗ウイルス作用を発揮するものである。

具体的な作用メカニズムは、以下の通りである。

(1) ユーグレナ由来物質は、RNAウイルスの増殖過程のうち「吸着時期」において当該ウイルス表面にある結合タンパク質（リガンド）が宿主細

胞表面にある受容体（レセプター）に結合する際に、当該ウイルスの宿主細胞への吸着を阻害する作用を果たす。

詳しく言うと、RNAウイルスがロタウイルスの場合、ユーグレナ由来物質が、当該ウイルスの吸着時期に関与する結合タンパク質（外殻タンパク質VP4、VP7）や特異的酵素の活性を阻害する作用を果たす。

[0044] （2）また、ユーグレナ由来物質は、RNAウイルスの増殖過程のうち「複製時期」において複製されたRNAと、合成されたタンパク質とが集合し、新たなウイルスが組み立てられる際に、当該ウイルスの宿主細胞内での複製を阻害する作用を果たす。

詳しく言うと、RNAウイルスがロタウイルスの場合、ユーグレナ由来物質が、当該ウイルスの複製時期に関与する結合タンパク質や特異的酵素の活性を阻害する作用を果たす。

[0045] 従って、抗ウイルス剤の有効主成分となるユーグレナ由来物質は、従来の抗ウイルス剤にはない作用として、ウイルスの増殖過程のうち少なくとも「吸着時期」及び「複製時期」において当該ウイルス増殖を阻害する作用を果たす。

そのため、ウイルスの増殖過程のうち特定の一時期においてのみ抗ウイルス活性を発揮する従来の抗ウイルス剤と比較して、本抗ウイルス剤であれば、ウイルス増殖過程の前半の吸着時期であったとしても、また後半の複製時期であったとしても抗ウイルス活性を発揮することが可能となる。

[0046] <<用途>>

本実施形態の抗ウイルス剤は、ウイルス感染症患者、ウイルス感染症に罹患したヒト以外の動物に投与されることで、ウイルス感染症の治療剤として、またウイルス性疾患の治療剤として用いることができる。

また、ウイルス感染症を罹患する前のヒト、ウイルス感染症予備軍のヒト、これらヒト以外の動物を対象としたウイルス感染症の予防剤として、またウイルス性疾患の予防剤として用いることもできる。

また、本実施形態の抗ウイルス剤は、ウイルスを病原体とする感染性胃腸

炎の予防剤又は治療剤として用いることもできる。

[0047] 本実施形態の抗ウイルス剤は、ウイルスのうち、特にロタウイルス及びノロウイルスに感染した患者に対して投与されることが望ましい。

ロタウイルスの場合、A群ロタウイルスに感染した患者に対して投与されることが望ましく、さらに当該ウイルスがA群ロタウイルスWa株（G1P[8]）であることが望ましい。

[0048] 本実施形態の抗ウイルス剤は、ウイルスのうち、特にロタウイルス及びノロウイルスに対して上記作用効果を発揮する抗ウイルス剤を含有する医薬組成物、食品組成物等の組成物等として利用することができる。

（医薬組成物）

医薬の分野では、ウイルス増殖を阻害する作用、すなわち、ウイルスの宿主細胞への吸着阻害作用、または、ウイルスの宿主細胞からの放出阻害作用を有効に発揮できる量のユーグレナ由来物質と共に、薬学的に許容される担体や添加剤を配合することにより、当該作用を有する医薬組成物が提供される。当該医薬組成物は、医薬品であっても医薬部外品であってもよい。

当該医薬組成物は、内用的に適用されても、また外用的に適用されても良い。従って、当該医薬組成物は、内服剤、静脈注射、皮下注射、皮内注射、筋肉注射及び／又は腹腔内注射等の注射剤、経粘膜適用剤、経皮適用剤等の製剤形態で使用することができる。

当該医薬組成物の剤型としては、適用の形態により、適当に設定できるが、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、粉末剤、散剤などの固形製剤、液剤、懸濁剤などの液状製剤、軟膏剤、またはゲル剤等の半固形剤が挙げられる。

[0049] （食品組成物）

食品の分野では、ウイルス増殖を阻害する作用を生体内で発揮できる有効な量のユーグレナ由来物質を食品素材として、各種食品に配合することにより、当該作用を有する食品組成物を提供することができる。

すなわち、本発明は、食品の分野において、ウイルス増殖阻害用等と表示

された食品組成物を提供することができる。当該食品組成物としては、一般の食品のほか、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品、病院患者用食品、サプリメント等が挙げられる。また、食品添加物として用いることもできる。

当該食品組成物としては、例えば、調味料、畜肉加工品、農産加工品、飲料（清涼飲料、アルコール飲料、炭酸飲料、乳飲料、果汁飲料、茶、コーヒー、栄養ドリンク等）、粉末飲料（粉末ジュース、粉末スープ等）、濃縮飲料、菓子類（キャンディ（のど飴）、クッキー、ビスケット、ガム、グミ、チョコレート等）、パン、シリアル等が挙げられる。また、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品等の場合、カプセル、トローチ、シロップ、顆粒、粉末等の形状であっても良い。

[0050] ここで特定保健用食品とは、生理学的機能等に影響を与える保健機能成分を含む食品であって、消費者庁長官の許可を得て特定の保健の用途に適する旨を表示可能なものである。本発明においては、特定の保健用途としてウイルス感染症の予防、治療、ウイルス増殖の阻害、感染性胃腸炎の予防、治療などと表示して販売される食品となる。

また栄養機能食品とは、栄養成分（ビタミン、ミネラル）の補給のために利用される食品であって、栄養成分の機能を表示するものである。栄養機能食品として販売するためには、一日当たりの摂取目安量に含まれる栄養成分量が定められた上限値、下限値の範囲内にある必要があり、栄養機能表示だけでなく注意喚起表示等もする必要がある。

また機能性表示食品とは、事業者の責任において、科学的根拠に基づいた機能性を表示した食品である。販売前に安全性及び機能性の根拠に関する情報などが消費者庁長官へ届け出られたものである。

上記において本発明は、ユーグレナ由来物質を有効成分として含み、ウイルス感染症患者、ウイルス感染症を罹患したヒト以外の動物を対象とした抗ウイルス剤用特定保健用食品や、抗ウイルス剤栄養機能食品、抗ウイルス剤機能性表示食品として用いることができる。

また本発明は、ユーグレナ由来物質を有効成分として含み、生体、例えばウイルス感染症を罹患する前のヒト、ウイルス感染症予備軍のヒト、これらヒト以外の動物を対象とした抗ウイルス剤用特定保健用食品や、抗ウイルス剤用栄養機能食品、抗ウイルス剤用機能性表示食品として用いることができる。

[0051] <<用法及び用量>>

本実施形態の抗ウイルス剤の用法としては、例えばロタウイルスやノロウイルスの場合、ヒトの腸内で感染し易いため、腸内で抗ウイルス剤が溶解するように（胃では溶解しないように）処方すると良い。例えば、カプセル剤、錠剤、顆粒又はシロップ等によって経口投与すると良い。

実施例

[0052] <実施例 1>

ユーグレナ由来物質として、ユーグレナ・グラシリス粉末（（株）ユーグレナ製）を用いた。当該ユーグレナ・グラシリス粉末100mgをエタノール1mlにて溶解し、0.45 μ M滅菌フィルターにて濾過することで、ユーグレナ溶液（100mg/ml）を調製した。当該溶液を抗ウイルス剤として用いた。

[0053] <実施例 2>

ユーグレナ由来物質としてのユーグレナの熱水抽出物を、以下の手順により調製した。

ユーグレナグラシリス粉末（（株）ユーグレナ社製）を、常圧下、熱水で抽出処理した後、減圧濾過して残渣を分離し、熱水抽出液を得た。

調製した熱水抽出液を0.45 μ M滅菌フィルターにて濾過することで、ユーグレナの熱水抽出液（原液）を得た。当該抽出液を抗ウイルス剤として用いた。

[0054] <実施例 3>

ユーグレナ由来物質としてのパラミロンを、以下の手順により調製した。ユーグレナグラシリス粉末（（株）ユーグレナ社製）を蒸留水に入れ、室

温で2日間攪拌した。これを超音波処理して細胞膜を破壊し、遠心分離により粗製パラミロン粒子を回収した。回収したパラミロン粒子を1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液に分散し、95℃で2時間処理し、再度遠心分離により回収したパラミロン粒子を0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液に分散して50℃で30分間処理した。当該操作により脂質やタンパク質を除去し、その後アセトン及びエーテルで洗浄した後、50℃で乾燥して、精製パラミロン粒子を得た。

調製したパラミロン粉末100mgをジメチルスルホキシド(DMSO)1mlにて溶解し、0.45μM滅菌フィルターにて濾過することで、パラミロン溶液(100mg/ml)を得た。当該溶液を抗ウイルス剤として用いた。

[0055] <実施例4>

ユーグレナ由来物質としてのアモルファスパラミロン(パラミロンのアルカリ処理物)を、以下の手順により調製した。

実施例2で調製したパラミロン粉末を、1Nの水酸化ナトリウム水溶液に5%(w/v)添加して溶解させ、1~2時間スターラで攪拌して、アルカリ処理した。その後、1Nの塩酸を、パラミロン粉末が溶解した1N水酸化ナトリウム水溶液に滴下して中和した。遠心分離の後上澄みを捨て、沈殿を蒸留水で洗浄する工程を繰り返した後、沈殿したゲルを回収し、凍結させた後凍結乾燥機で凍結乾燥し、アモルファスパラミロンを得た。

調整したアモルファスパラミロン粉末10mgをジメチルスルホキシド(DMSO)1mlにて溶解し、0.45μM滅菌フィルターにて濾過することで、アモルファスパラミロン溶液(10mg/ml)を得た。当該溶液を抗ウイルス剤として用いた。

[0056] <試験例1 ロタウイルスの増殖過程における感染阻害試験>

実施例1~4の抗ウイルス剤を用いて、ロタウイルス増殖を阻害する作用を確認する試験を行った。宿主細胞としてMA-104細胞(アカゲザル腎細胞)を使用し、またウイルスとしてロタウイルスWa株(G1P[8])を

使用し、また液体培地として10%FBS (Fetal Bovine Serum) 含有のDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地を使用した。

[0057] まず、MA-104細胞を 1.0×10^4 cells/wellになるように24wellプレートにそれぞれ播種し、37℃、5%CO₂の条件下で24時間単層培養した。

そして培養したMA-104細胞にロタウイルスを0.1moi (感染多重度) で感染させて室温で1時間放置した (吸着させた)。

その後、液体培地に対して、実施例1のユーグレナ溶液を所定濃度含むように添加し、CO₂インキュベータにて48時間培養した。

その後、感染細胞から放出されたウイルスを含む上清を回収し、フォーカス減少法を用いて上清中のウイルス力価 (FFU/ml) を測定し、ウイルス増殖阻害率 (%) を算出した。また、細胞のウイルス感染を50%阻害する抗ウイルス剤の濃度 (IC50) を算出した。

比較対象として、(1) 実施例2のユーグレナ熱水抽出液を添加して培養したもの、(2) 実施例3のパラミロン溶液を添加して培養したもの(3) 実施例4のアモルファスパラミロン溶液を添加して培養したものについて、それぞれ同様にウイルス増殖阻害率を算出した。

[0058] (試験例1の結果)

上記試験結果を解析して、ユーグレナ (実施例1) による各濃度 (0.1 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml) のウイルス増殖阻害率を比較したグラフを図1に示す。

各濃度のウイルス増殖阻害率は、順に40.4%、96.8%、98.0%であって、IC50は、0.66 mg/mlであった。

ウイルス増殖阻害率は、ユーグレナの濃度が高くなるにつれてさらに増加した。

なお、「ユーグレナの濃度0.1 mg/ml」とは、液体培地1 mlに対して0.1 mgのユーグレナが含まれる濃度であることを示し、言い換えれ

ば、液体培地に対してユーグレナ溶液（100 mg/ml）が0.1体積%含まれる濃度であることを示す。

[0059] また図2において、ユーグレナ熱水抽出物（実施例2）による各濃度（0.02 mg/ml、0.04 mg/ml、0.06 mg/ml）のウイルス増殖阻害率を比較したグラフを示す。

各濃度のウイルス増殖阻害率は、順に95.2%、94.9%、93.9%であって、IC50は、0.012 mg/mlであった。

ウイルス増殖阻害率は、ユーグレナ熱水抽出物の上記全ての濃度で90%以上となった。

[0060] また図3において、パラミロン（実施例3）による各濃度（0.1 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml）のウイルス増殖阻害率を比較したグラフを示す。

各濃度のウイルス増殖阻害率は、順に0%、17.8%、30.1%であった。

ウイルス増殖阻害率は、パラミロンの濃度が高くなるにつれてさらに増加した。

[0061] また図4において、アモルファスパラミロン（実施例4）による各濃度（0.1 mg/ml、1.0 mg/ml、2.0 mg/ml）のウイルス増殖阻害率を比較したグラフを示す。

各濃度のウイルス増殖阻害率は、順に3.8%、33.3%、53.4%であって、IC50は、1.74 mg/mlであった。

ウイルス増殖阻害率は、アモルファスパラミロンの濃度が高くなるにつれてさらに増加した。

なお、これら試験は複数回行い、同様の再現性が得られた。

[0062] （試験例1の考察）

試験例1の結果から、ユーグレナを添加したもの、ユーグレナ熱水抽出物を添加したものについては、全ての濃度においてロタウイルス増殖を阻害する作用が確認された。また、ユーグレナを添加したものについては、濃度依

存的にウイルス増殖を阻害する作用が高くなった。

また、パラミロンを添加したものについては、比較的高濃度（例えば2.0 mg/ml以上）になると、ロタウイルス増殖を阻害する作用が確認された。また、濃度依存的にウイルス増殖を阻害する作用が高くなった。

また、アモルファスパラミロンを添加したものについては、比較的高濃度（例えば0.1 mg/ml以上）になると、ロタウイルス増殖を阻害する作用が確認された。また、濃度依存的にウイルス増殖を阻害する作用が高くなった。

[0063] 試験例1の結果から、ユーグレナよりも、ユーグレナ熱水抽出物を添加したもののほうが、より低い濃度でロタウイルス増殖を阻害する作用を有していることが確認された。

このことから、ユーグレナを熱水抽出処理することで多く得られる物質がロタウイルス増殖を阻害する作用を有していることが分かった。

また、パラミロン、アモルファスパラミロンよりも、ユーグレナを添加したもののほうが、より低い濃度でロタウイルス増殖を阻害する作用を有していることが確認された。

このことから、ユーグレナに含まれる物質のうち、パラミロン以外の物質がロタウイルス増殖を阻害する作用を有していることが分かった。

また、パラミロンよりも、アモルファスパラミロン（パラミロンのアルカリ処理物）を添加したもののほうが、より低い濃度でロタウイルス増殖を阻害する作用が確認された。

このことから、パラミロンをアルカリ処理して多く得られる物質がロタウイルス増殖を阻害する作用を有していることが分かった。

[0064] 試験例1の結果から、ロタウイルス増殖を阻害する作用におけるユーグレナの好適な濃度は0.1 mg/ml以上であって、より好適な濃度（IC50）は0.66 mg/ml以上であることが分かった。

ユーグレナ熱水抽出物の好適な濃度（IC50）は0.012 mg/ml以上であることが分かった。

パラミロンの好適な濃度は2.0 mg/ml以上であることが分かった。

アモルファスパラミロンの好適な濃度は1.0 mg/ml以上であって、より好適な濃度（IC50）は1.74 mg/ml以上であることが分かった。

[0065] 試験例1の結果から、例えばユーグレナ由来物質としてユーグレナを少なくとも0.66 mg/ml以上の濃度で含有する抗ウイルス剤が、腸内で溶解するように（胃では溶解しないように）、カプセル剤、錠剤、顆粒又はシロップ等によって経口投与されると良いことが分かった。

[0066] <試験例2 ネコカリシウイルスの不活性化試験>

実施例1の抗ウイルス剤を用いて、ネコカリシウイルスの不活性化試験を行った。

なお、ネコカリシウイルスは、細胞培養が不可能なノロウイルスの代替ウイルスとして広く使用されているウイルスである。

[0067] （細胞及び培地）

宿主細胞としてCRFK細胞（大日本製薬株式会社）を使用し、ウイルスとしてネコカリシウイルスF9株（Feline calicivirus F-9 ATCC VR-782）を使用した。

細胞増殖培地として、イーグルMEM培地「ニッスイ」1（日水製薬株式会社）にFBSを10%加えたものを使用した。細胞維持培地として、イーグルMEM培地「ニッスイ」1にFBSを2%加えたものを使用した。

[0068] （ウイルス浮遊液の調製）

・細胞の培養

細胞増殖培地を用い、CRFK細胞を組織培養用フラスコ内に単層培養した。

・ウイルスの接種

単層培養後にフラスコ内から細胞増殖培地を除き、ネコカリシウイルスを接種した。次に、細胞維持培地を加えて37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター（CO₂濃度：5%）内で1～5日間培養した。

・ ウイルス浮遊液の調製

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態を観察し、細胞に形態変化（細胞変性効果）が起こっていることを確認した。次に、培養液を遠心分離（3000rpm/分、10分間）し、得られた上澄み液をウイルス浮遊液とした。

[0069] （試験操作）

実施例1のユーグレナ粉末の検体懸濁液（99.5%エタノールを用いて調製したもの）を静置後、得られた上澄み液を細胞維持培地で希釈したものを検体溶液とした。細胞維持培地を用いて希釈した検体溶液を用いてウイルス液を10倍希釈し、ウイルス感染価を測定した。なお、対照については、細胞維持培地を用いて同様に試験した。

[0070] （ウイルス感染価の測定）

まず、細胞増殖培地を用い、CRFK細胞を組織培養用マイクロプレート（96well）内で単層培養した後、細胞増殖培地を除き検体溶液または細胞維持培地を0.1mlずつ加えた。

次に、作用液の希釈液0.1mlを4wellずつに接種し、37℃±1℃の炭酸ガスインキュベーター（CO₂濃度：5%）内で、4～7日間培養した。

培養後、倒立位相差顕微鏡を用いて細胞の形態変化（細胞変性効果）の有無を観察し、Reed-Muench法により50%組織培養感染量（TCID₅₀）を算出して作用液1ml当たりのウイルス感染価に換算した。

[0071] （試験例2の結果）

試験例2の結果を表1に示す。

[表1]

試験ウイルス	対象	濃度	log TCID ₅₀ /mL		
			測定-1	測定-2	測定-3
ネコカリシウイルス	検体	0.5mg/mL	6.5	6.3	6.5
	対照 (細胞維持培地)	—	7.0	7.0	6.7

表1中の「TCID₅₀」は、50%組織培養感染量 (median tissue culture dose) を意味し、「log TCID₅₀/ml」は、作用液1 mL当たりのTCID₅₀の常用対数値を示す。

なお、検体濃度0.5 mg/mlでは、細胞変性効果が認められなかった。

測定は3回行い、t検定 (t-test) にて $p < 0.05$ であった。

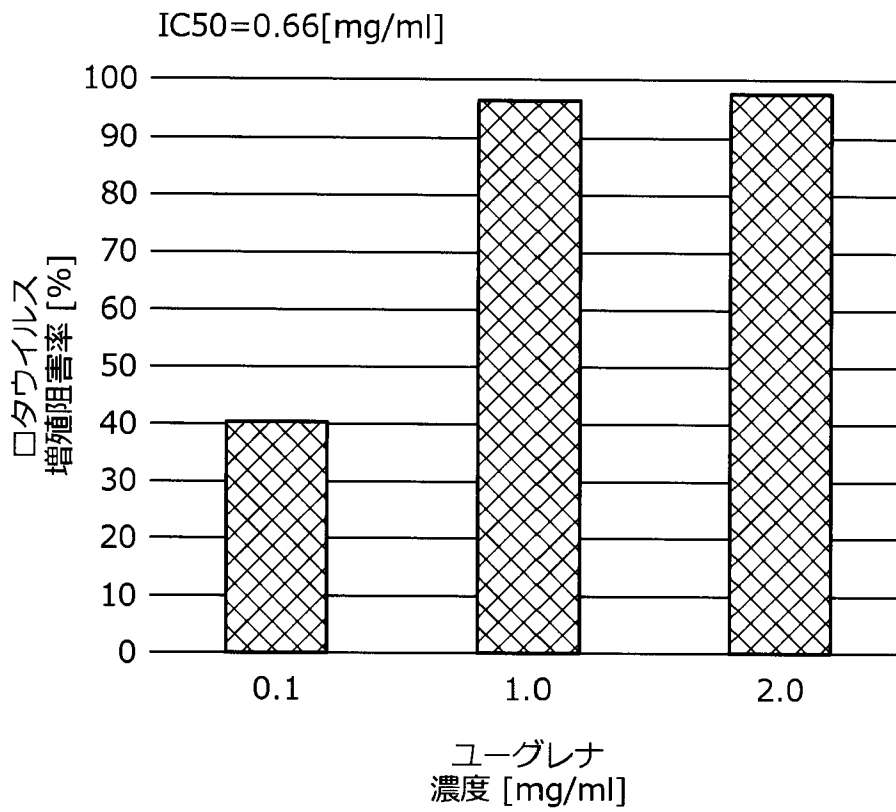
[0072] (試験例2の考察)

試験例2の結果から、ユーグレナを添加した場合、ネコカリシウイルスを不活性化する作用が確認された。ネコカリシウイルスは、ノロウイルスの代替ウイルスであり、本試験の結果から、ユーグレナがノロウイルスを不活性化作用を有しており、ノロウイルスに対する抗ウイルス剤として用いることができることがわかった。

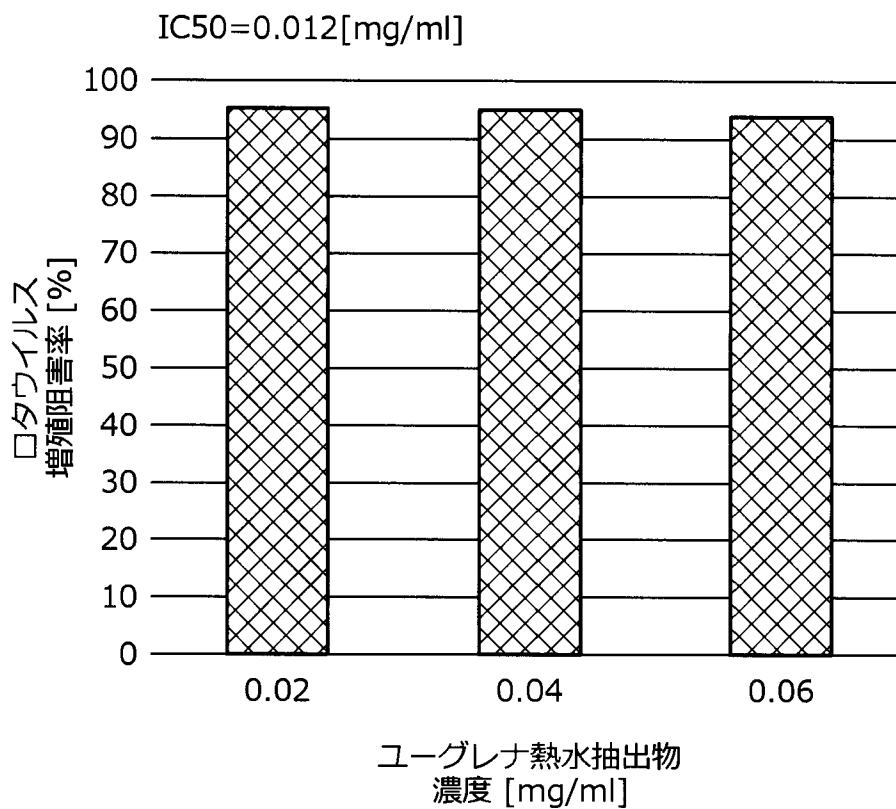
請求の範囲

- [請求項1] ユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、エンベロープを有さないRNAウイルス感染症の予防又は治療に用いられることを特徴とする抗ウイルス剤。
- [請求項2] 前記エンベロープを有さないRNAウイルスは、レオウイルス科に属するウイルスであることを特徴とする請求項1に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項3] 前記レオウイルス科に属するウイルスは、ロタウイルスであることを特徴とする請求項2に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項4] 前記ユーグレナ由来物質は、ユーグレナの熱水抽出物であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項5] 前記ユーグレナ由来物質は、パラミロンをアルカリ処理して得られるアルカリ処理物であることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項6] 前記ユーグレナ由来であって、ウイルスの細胞への吸着を阻害するためのウイルス吸着阻害剤として用いられることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載の抗ウイルス剤。
- [請求項7] ユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、ウイルスを病原体とする感染性胃腸炎の予防又は治療に用いられることを特徴とする抗ウイルス剤。
- [請求項8] ユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、エンベロープを有さないRNAウイルス感染症の予防又は改善に用いられることを特徴とする抗ウイルス用食品。

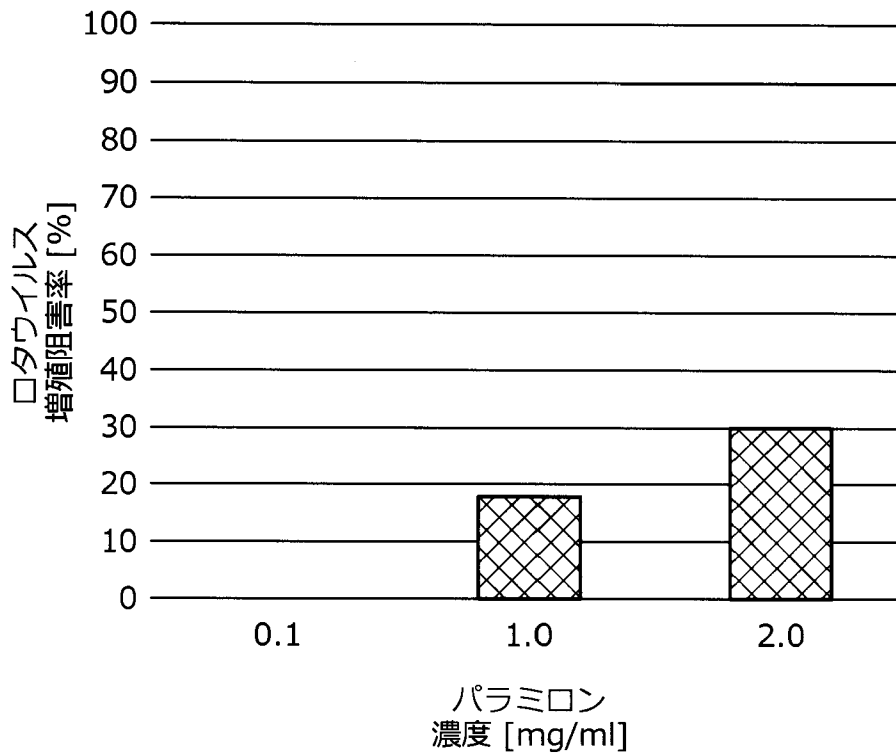
[図1]



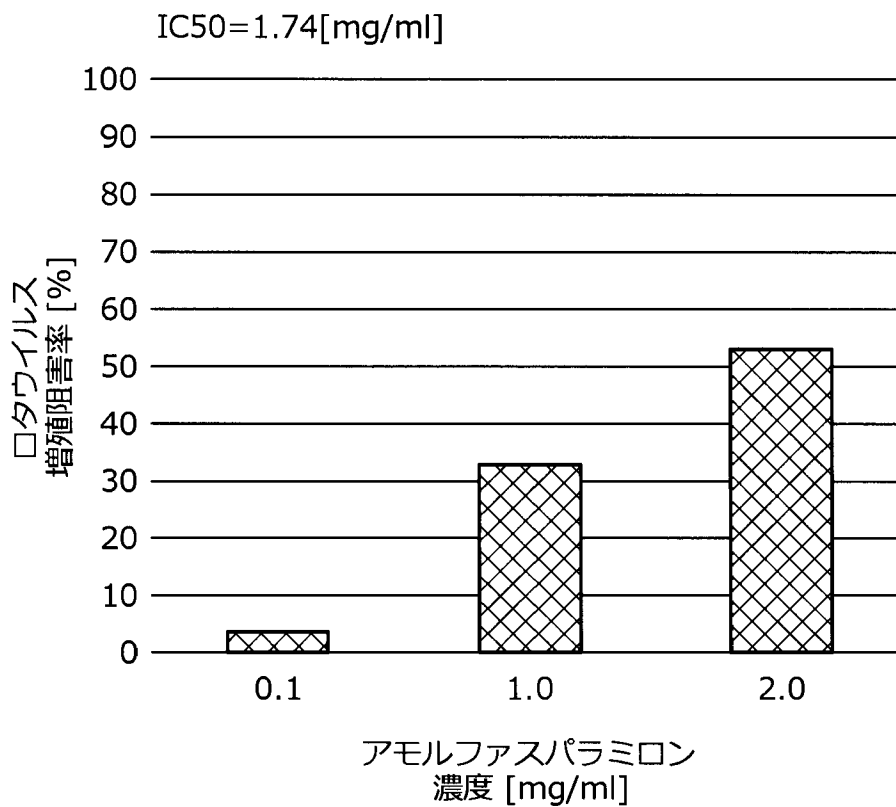
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/084571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K35/68(2006.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K31/716(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K35/68, A23L33/10, A61K31/716, A61P1/04, A61P31/14 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	VICTOR R. VILLANUEVA, et al., Cell cycle related changes in polyamine content in euglena, Phytochemistry, 1980, 19, 962-4 See Fig. 1	1-4, 6-8 5
Y A	LAZARUS L. H., et al., Activity of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: Inhibition by polyamines and polyamino acids, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1973, 156(1), 154-60 See FIG. 1	1-4, 6-8 5
A	WO 2015/156339 A1 (EUGLENA CO., LTD.), 15 October 2015 (15.10.2015), examples (Family: none)	5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"Y" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 09 December 2016 (09.12.16)		Date of mailing of the international search report 27 December 2016 (27.12.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K35/68(2006.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K31/716(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K35/68, A23L33/10, A61K31/716, A61P1/04, A61P31/14</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年	
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2016年											
日本国実用新案登録公報	1996-2016年											
日本国登録実用新案公報	1994-2016年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:70%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">Y A</td> <td>VICTOR R. VILLANUEVA, et al., Cell cycle related changes in polyamine content in euglena, Phytochemistry, 1980, 19, 962-4 See Fig. 1</td> <td style="text-align:center;">1-4, 6-8 5</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">Y A</td> <td>LAZARUS L. H., et al., Activity of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: Inhibition by polyamines and polyamino acids, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1973, 156(1), 154-60 See FIG. 1</td> <td style="text-align:center;">1-4, 6-8 5</td> </tr> </tbody> </table>				引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y A	VICTOR R. VILLANUEVA, et al., Cell cycle related changes in polyamine content in euglena, Phytochemistry, 1980, 19, 962-4 See Fig. 1	1-4, 6-8 5	Y A	LAZARUS L. H., et al., Activity of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: Inhibition by polyamines and polyamino acids, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1973, 156(1), 154-60 See FIG. 1	1-4, 6-8 5
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
Y A	VICTOR R. VILLANUEVA, et al., Cell cycle related changes in polyamine content in euglena, Phytochemistry, 1980, 19, 962-4 See Fig. 1	1-4, 6-8 5										
Y A	LAZARUS L. H., et al., Activity of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: Inhibition by polyamines and polyamino acids, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1973, 156(1), 154-60 See FIG. 1	1-4, 6-8 5										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p>		<p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">09. 12. 2016</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">27. 12. 2016</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:60%;">特許庁審査官 (権限のある職員)</td> <td style="width:10%; text-align:center;">4U</td> <td style="width:30%; text-align:center;">4496</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">安藤 公祐</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>電話番号 03-3581-1101</td> <td>内線</td> <td style="text-align:center;">3439</td> </tr> </table>		特許庁審査官 (権限のある職員)	4U	4496	安藤 公祐			電話番号 03-3581-1101	内線	3439
特許庁審査官 (権限のある職員)	4U	4496										
安藤 公祐												
電話番号 03-3581-1101	内線	3439										

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2015/156339 A1 (EUGLENA CO., LTD.) 2015.10.15, 実施例等 (ファミリーなし)	5