

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6284257号
(P6284257)

(45) 発行日 平成30年3月7日(2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月9日(2018.2.9)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 36/09	(2006.01)	A 6 1 K	36/09
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 2 3 L 33/105	(2016.01)	A 2 3 L	33/105

請求項の数 10 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2014-19845 (P2014-19845)	(73) 特許権者	501174550
(22) 出願日	平成26年2月4日(2014.2.4)		国立研究開発法人国際農林水産業研究センター
(65) 公開番号	特開2015-147736 (P2015-147736A)		茨城県つくば市大わし1-1
(43) 公開日	平成27年8月20日(2015.8.20)	(73) 特許権者	591108178
審査請求日	平成27年12月25日(2015.12.25)		秋田県 秋田県秋田市山王4丁目1番1号
		(74) 代理人	100082876 弁理士 平山 一幸
		(74) 代理人	100151367 弁理士 柴 大介
		(74) 代理人	100184262 弁理士 森田 義則

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤、並びにレニン阻害活性及び／又はキマーゼ阻害活性を有する食品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ、又はスルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有する、レニン阻害剤。

【請求項 2】

前記抽出物が、メタノール抽出物、エタノール抽出物又は水抽出物である、請求項 1 に記載のレニン阻害剤。

【請求項 3】

スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ、又はスルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有する、キマーゼ阻害剤。

【請求項 4】

前記抽出物が、メタノール抽出物、エタノール抽出物又は水抽出物である、請求項 3 に記載のキマーゼ阻害剤。

【請求項 5】

スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ、又はスルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有する、降圧剤。

【請求項 6】

前記抽出物が、メタノール抽出物、エタノール抽出物又は水抽出物である、請求項 5 に記載の降圧剤。

【請求項 7】

スルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有する、レニン阻害用食品。

【請求項 8】

スルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物が、メタノール抽出物、エタノール抽出物又は水抽出物である、請求項 7 に記載のレニン阻害用食品。

【請求項 9】

スルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有する、キマーゼ阻害用食品。

【請求項 10】

スルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物が、メタノール抽出物、エタノール抽出物又は水抽出物である、請求項 9 に記載のキマーゼ阻害用食品。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、レニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤、並びにレニン阻害活性及び/又はキマーゼ阻害活性を有する食品に関する。

【背景技術】

【0002】

高血圧は、食生活、肥満、老化、遺伝等の様々な要因により進行し、種々の疾患の発症リスクを高めることが知られている。肥満の増加、ストレスの蔓延、高齢化の進行等に伴い、高血圧への対策の重要性が高まっている。

20

【0003】

レニン・アンジオテンシン系は、ヒトを含む哺乳類全般において最も重要な血圧調節系である。

レニンは、主に腎臓の傍糸球体細胞で生合成され様々な刺激で血中に放出される。血中のレニンは、図 3 に示すように、肝臓で合成された基質タンパクであるアンジオテンシノーゲンに作用してアンジオテンシン I を遊離する。アンジオテンシン I は、主に肺循環中において、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) によりアンジオテンシン II に変換される。生じたアンジオテンシン II は、直接血管壁に作用して血管を収縮させ血圧を上昇させ、また、副腎に作用してアルドステロンの分泌を促進する。

30

アルドステロンの分泌が促進されると、腎臓でのナトリウムの再吸収が促進され、その作用で血液中の体液量が増加し、さらに、血圧上昇を引き起こす要因となる。

以上のことから、レニン・アンジオテンシン系の制御が血圧調節上非常に重要である。

【0004】

他方、肥満細胞から分泌されるキモトリプシン様セリンプロテアーゼであるキマーゼがアンジオテンシン II の生成に関与することが知られている。

【0005】

降圧療法は原則として長期にわたって継続する必要があるので、副作用の恐れが少ない食物由来の化学物質による降圧剤が期待されていた。

食物由来のレニン阻害に関する研究としては、ヒト型組換えレニンと消光性蛍光基質を組み合わせたレニン阻害活性の測定方法に関するもの (非特許文献 1) があり、食物由来のレニン阻害物質に関する研究として、大豆成分であるソヤサポニン I に関するもの (非特許文献 2 及び特許文献 1) 及び米から単離した脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸に関するもの (非特許文献 3)、及び山菜のウドから単離したレニン阻害物質に関するもの (非特許文献 4) がある。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特開 2010 - 018552 号公報

【非特許文献】

50

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 1】Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, 2610-2613, 2007

【非特許文献 2】Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 3232-3236, 2008

【非特許文献 3】Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 1713-1715, 2010

【非特許文献 4】J. Biol. Macromol, 11, 83-89, 2011

【非特許文献 5】ライケン, 13, 6-9 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

しかしながら、これまでのレニン・アンジオテンシン系の標的酵素は、アンジオテンシン I からアンジオテンシン II を生成する ACE にもっぱら限定されており、レニンおよびキマーゼの阻害に關与する食物由来の化学物質の研究報告はほとんど見られない。また、食物由来の化学物質によるキマーゼ阻害効果に關する研究報告も無い。

10

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、食物由来のレニン阻害剤又はキマーゼ阻害剤又は降圧剤、並びに食物又は食物由来の抽出物を含有するレニン阻害活性及び/又はキマーゼ阻害活性を有する食品を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 0 】

本発明は、スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエを含有するレニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤、並びにスルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有するレニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤を提供する。

20

さらに、本発明は、スルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有するレニン阻害活性及び/又はキマーゼ阻害活性を有する食品を提供する。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明によって、スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエ由来のレニン阻害剤、キマーゼ阻害剤及び降圧剤、並びにスルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含有するレニン阻害活性及び/又はキマーゼ阻害活性を有する食品が提供される。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 2 】

【図 1】スルカリア・スルカタ抽出物の降圧効果の動物実験結果を示す図である。

【図 2】ロバリア・クロカワエ抽出物の降圧効果の動物実験結果を示す図である。

【図 3】アンジオテンシノーゲンの代謝経路を略記した図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

スルカリア・スルカタもロバリア・クロカワエも、地衣類に分類されており、和名では、それぞれバンダイキノリ、カプトゴケモドキと呼ばれている。また、スルカリア・スルカタやロバリア・クロカワエは、日本や中国で食用とされていることが報告されている（非特許文献 5）。

40

【 0 0 1 4 】

本発明では、スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエをレニン阻害剤又はキマーゼ阻害剤として利用する。レニン阻害剤又はキマーゼ阻害剤はアンジオテンシン I 又はアンジオテンシン II の生成を阻害するため、降圧剤として使用することができる。

スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエは、乾燥して、粉碎等して粉末にすることで、そのまま、又は、必要な他の成分と混合してレニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤として利用してもよい。

【 0 0 1 5 】

また、スルカリア・スルカタから得られる抽出物又はロバリア・クロカワエから得られ

50

る抽出物をレニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤として利用する。

【0016】

抽出物は、有機溶媒又は水溶液による抽出法のほか、超臨界二酸化炭素抽出法によって得ることができる。有機溶媒は、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、ベンゼン、トルエン、クロロホルム、ヘキサン、エタノール、メタノール等を単独又は混合して用いることができる。水溶液は、水のほか、塩酸、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等の酸を抽出溶媒として用いることができる。とりわけ、メタノール、アルコール等のアルコール抽出又は水抽出が好ましい。

【0017】

抽出にあたり、スルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエをそのまま用いてもよいが、乾燥したスルカリア・スルカタ又はロバリア・クロカワエを裁断・粉碎等して、例えば、粉末状にしてから抽出してもよい。

10

【0018】

アルコールによる抽出では、抽出温度を、0 ~ 80、好ましくは4 ~ 50、更に好ましくは15 ~ 40とし、抽出時間を1分~3時間、好ましくは5分~2時間、更に好ましくは10分~1時間とする。

【0019】

水による抽出の場合、煮沸抽出又はオートクレーブ等による加熱抽出が好ましい。煮沸抽出の場合、抽出温度は、好ましくは50 ~ 100、より好ましくは80 ~ 100、更に好ましくは90 ~ 100であり、抽出時間は、1分~1時間、より好ましくは3分~30分、更に好ましくは5分~15分である。

20

【0020】

なお、煮沸抽出して得た煮沸後の抽出物中の固形分を、さらに、アルコール抽出してもよい。

【0021】

オートクレーブ抽出の場合、抽出温度は、80 ~ 140、好ましくは90 ~ 130、更に好ましくは100 ~ 120であり、圧力条件を1気圧~3気圧、好ましくは1気圧~2気圧、更に好ましくは1気圧~1.5気圧とし、抽出時間を1分~90分、好ましくは3分~60分、更に好ましくは5分~30分とする。

【0022】

抽出は静置抽出しても良いが、棒、マグネティックスターラー、ホモジナイザーなどで攪拌して抽出しても良い。

30

【0023】

得られた抽出物を上清と残渣に分離する。分離方法は、特に制限されないが、例えば、遠心分離を行う。遠心処理条件は、材料の量にもよるが、5000×g~12000×gで20~60分行えばよい。遠心分離後、上清を回収し、抽出液とする。

【0024】

抽出液は、そのまま、又は、必要な他の成分と混合して降圧剤として利用することができるが、抽出液を乾燥し、又は必要な他の成分と混合して降圧剤として利用することもできる。

40

【0025】

本発明のレニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤は、液状、粉末、顆粒又は錠剤等の固体状、カプセル状等の形態としてもよい。

【0026】

レニン阻害剤、キマーゼ阻害剤又は降圧剤の投与量は、被投与体の単位重量当りの乾燥抽出物換算で、0.5~200mg/Kg、好ましくは1~100mg/Kg、更に好ましくは3~20mg/Kgを経口投与すればよい。

【0027】

本発明の食品は、本発明におけるスルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を含む。

50

本発明の食品は、食品の形態等の設計に応じて、スルカリア・スルカタの抽出物又はロバリア・クロカワエの抽出物を液状、粉末、顆粒又は錠剤等の固体状、カプセル状等の形態で、食品の製造工程において食品原料等に添加すればよい。

【0028】

本発明の食品は、ヒト用及び動物用でもよく、食品の形態は、固形又は飲料としてもよい。

【0029】

以下に、本発明に係る発明を実施例に基づき説明する。なお、本発明は、実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

10

【0030】

スルカリア・スルカタ及びロバリア・クロカワエを水、メタノール又はエタノールで抽出し、それぞれのレニン阻害活性、キマーゼ阻害及びACE阻害率を測定した。

なお、中国産のスルカリア・スルカタは樹花菜、ロバリア・クロカワエは樹蝴蝶として販売されているものを使用した。

【0031】

[抽出条件]

スルカリア・スルカタ及びロバリア・クロカワエを室温で1日以上乾燥し、得られた乾燥物を粉碎して、粉末にした。

乾燥粉末1gを、表1の抽出条件で抽出して抽出処理物を得た。得られた抽出処理物を、表1の条件で遠心分離し、採取した上清を乾燥、秤量した後、抽出物が10mg/mlの濃度になるように表1の溶解液に溶かし、試料とした。

20

【0032】

【表 1】

地衣類	試料 No.	抽出溶媒等	溶媒量 g	抽出 温度 ℃	抽出 時間 分	圧力	遠心分離 条件 rpm×分	溶解液
スルカリア ・スルカタ	1-1 (青森県産)	メタノール	25	25	30	常圧	10,000× 20	10%メタ ノール
	1-2 (青森県産)	エタノール	25	25	30	常圧	〃	10%エタ ノール
	1-3 (青森県産)	水、煮沸	25	98	30	常圧	〃	水
	1-4 1-3の抽出残 渣	メタノール	25	25	30	常圧	〃	10%メタ ノール
	1-5 (青森県産)	水、オート クレーブ	25	115	30	1.7気 圧	〃	水
	1-6 (秋田県産 A)	メタノール	25	25	30	常圧	〃	10%メタ ノール
	1-7 (秋田県産 B)	メタノール	25	25	30	常圧	〃	10%メタ ノール
	1-8 (岐阜県産)	メタノール	25	25	30	常圧	〃	10%メタ ノール
	1-9 (中国産)	メタノール	25	25	30	常圧	〃	10%メタ ノール
	1-10 (中国産)	水、オート クレーブ	25	115	30	1.7気 圧	〃	水
ロバリア・ クロカワエ	2-1 (中国産)	メタノール	25	25	30	常圧	〃	水
	2-2 (中国産)	水、オート クレーブ	25	115	30	1.7気 圧	〃	水

10

20

30

【0033】

[組換え型ヒトレニンの作成]

非特許文献1に従い、組換え型ヒトレニンを作成した。

組換え型ヒトキマーゼ、ウサギ肺由来アンジオテンシン変換酵素は、シグマ社(セントルイス、米国)から購入した。レニン用基質及びキマーゼ用蛍光消光基質の構造は、2-メチルアミノベンゾイル(Nma)-イソロイシン(Ile)-ヒスチチン(His)-プロリン(Pro)-フェニルアラニン(Phe)-ヒスチジン(His)-ロイシン(Leu)-バリン(Val)-イソロイシン(Ile)-ヒスチジン(His)-トレオニン(Thr)-[N-(2,4-ジニトロフェニル)-リシル][Lys(Dnp)]-[D-アルギニン(Arg)]-[D-アルギニン(Arg)]-アミド(NH₂)であり、アンジオテンシン変換酵素用蛍光消光基質の構造は、2-メチルアミノベンゾ

40

50

イル (N m a) - フェニルアラニン (P h e) - ヒスチジン (H i s) - [N - (2 , 4 - ジニトロフェニル) - リシル] [L y s (D n p)] である。

【 0 0 3 4 】

[レニン阻害活性の測定]

蛍光消光基質の分解は、蛍光分光光度計 (ダブルモノクロメーター式 S A F I R E - N A M Y 、テカンジャパン株式会社) を用いて計測した。反応溶液は、39 μ L の 50 m M リン酸緩衝液 (p H 6 . 5) 、 0 . 1 M N a C l 、 0 . 0 2 % N a N 3 、 0 . 0 2 % ツイーン 2 0 、 1 μ L の 1 m M の蛍光消光基質ジメチルスルフォキシド溶液、5 μ L の組換え型ヒトレニン、および 5 μ L の阻害剤溶液の計 5 0 μ L の系で反応した。反応溶液を 3 7 で 3 0 分間保温したのち、0 . 2 m l の 0 . 1 M トリエタノールアミン (p H 9 . 5) を添加し、反応を停止した。その後、励起波長 3 4 0 n m および蛍光波長 4 4 0 n m で蛍光強度を測定した。

10

【 0 0 3 5 】

[キマーゼ阻害活性の測定]

蛍光消光基質の分解は、蛍光分光光度計ダブルモノクロメーター式 S A F I R E - N A M Y 、テカンジャパン株式会社) を用いて計測した。反応溶液は、39 μ L の 0 . 1 M グリシン - H C l , p H 9 . 0 , 0 . 1 M N a C l , 0 . 0 2 % T r i t o n X - 1 0 0 , 0 . 0 2 % N a N 3 、 1 μ L の 1 m M の蛍光消光基質ジメチルスルフォキシド溶液、5 μ L の組換え型ヒトキマーゼ、および 5 μ L の阻害剤溶液の計 5 0 μ L の系で反応した。反応溶液を 3 7 で 3 0 分間保温したのち、0 . 2 m l の 0 . 1 M ホウ酸ナトリウム (p H 1 0 . 5) を添加し、反応を停止した。その後、励起波長 3 4 0 n m および蛍光波長 4 4 0 n m で蛍光強度を測定した。

20

【 0 0 3 6 】

[A C E 阻害活性の測定]

蛍光消光基質の分解は、蛍光分光光度計を用いて計測した。反応溶液は、39 μ L の 0 . 1 M H E P E S - H C l 、 p H 7 . 5 、 0 . 3 M N a C l 、 0 . 0 1 % T r i t o n X - 1 0 0 、 0 . 0 2 % N a N 3 、 1 μ L の 1 m M の蛍光消光基質ジメチルスルフォキシド溶液、5 μ L の組換え型ヒトキマーゼ、および 5 μ L の阻害剤溶液の計 5 0 μ L の系で反応した。反応溶液を 3 7 で 3 0 分間保温したのち、0 . 2 m l の 0 . 1 M ホウ酸ナトリウム (p H 1 0 . 5) を添加し、反応を停止した。その後、励起波長 3 4 0 n m および蛍光波長 4 4 0 n m で蛍光強度を測定した。結果を表 2 に示す。

30

【 0 0 3 7 】

【表 2】

試料 No.	産地	抽出法	レニン阻害 (%)	キマーゼ阻害 (%)	ACE 阻害 (%)
1-1	青森県	メタノール	99	80	26
1-2	青森県	エタノール	69	90	22
1-3	青森県	煮沸	77	99	45
1-4	青森県	メタノール	98	100	27
1-5	青森県	オートクレーブ	100	97	25
1-6	秋田県	メタノール	92	71	0
1-7	秋田県	メタノール	83	87	19
1-8	岐阜県	メタノール	95	75	15
1-9	中国	メタノール	74	94	10
1-10	中国	オートクレーブ	96	92	26
2-1	中国	メタノール	74	59	12
2-2	中国	オートクレーブ	95	95	2

【0038】

いずれの材料、抽出法でも高いレニン阻害活性、キマーゼ阻害活性が認められる。一方、ACE阻害活性は比較的低い特徴がある。

【実施例 2】

【0039】

[動物実験]

スルカリア・スルカタ及びロバリア・クロカワエの乾燥物をハサミで各片 1 cm^2 以下に細かくした材料 1 g に水 25 g を加えて、 115°C 、 30 分間オートクレーブを行った。オートクレーブした材料を $10,000 \times \text{g}$ 、 20 分間遠心分離し、上清を回収して抽出液とした。抽出液を凍結乾燥し乾燥抽出物とした。乾燥抽出物を $1 \sim 5 \text{ mg/ml}$ になるように水に溶解し、動物実験用の試料とした。

【0040】

12 週齢の雄性高血圧自然発症ラット (SHR) に、対照群には一匹あたり 1 ml の蒸留水を、試験群には一匹あたり 1 ml の試料を単回経口投与した。試料には、 $1 \sim 5 \text{ mg/ml}$ の乾燥抽出物が含まれているため、試験群には一匹あたり $1 \sim 5 \text{ mg}$ の乾燥抽出物を投与していることになる。対照群および試験群としてそれぞれ 8 匹の SHR を用いた。投与前 (0)、投与後 4 、 6 、 8 及び 24 時間毎に、小動物用非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A-L、株式会社ソフトロン) で血圧を測定した。

【0041】

結果を図 1 及び 2 に示す。

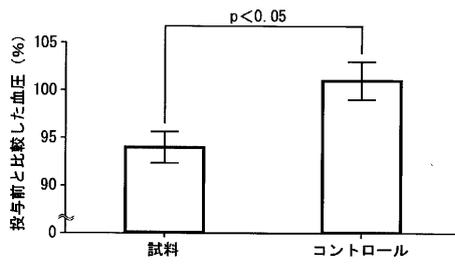
試験中 SHR の一般状態 (外観、行動、呼吸等) は、対照群と有意差は認められなかった。血圧に関しては、全ての試料投与群が対照群に比べ有意に低下が認められた。

すなわち、スルカリア・スルカタ由来の試料投与群 4 時間後 ($94 \pm 2\%$ 、平均値 \pm 標準誤差) 及び、ロバリア・クロカワエ由来の試料投与群 6 時間後 ($94 \pm 1\%$ 、平均値 \pm 標準誤差) が共に、対照群 6 時間後 (コントロール、 $102 \pm 2\%$ 、平均値 \pm 標準誤差) に比べ有意に低下が認められた (図 1 及び 2 参照)。

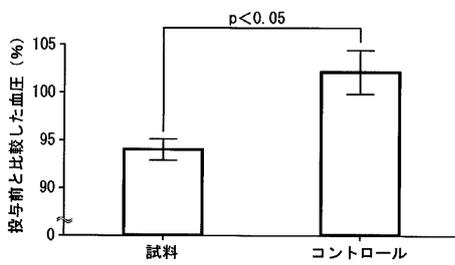
血圧の実測値の平均値は、スルカリア・スルカタ抽出液投与群 4 時間後 ($201 \pm 3 \text{ mmHg}$ 、平均値 \pm 標準誤差)、対照群 4 時間後 ($211 \pm 3 \text{ mmHg}$ 、平均値 \pm 標準誤差)、ロバリア・クロカワエ由来の試料投与群 6 時間後 ($199 \pm 6 \text{ mmHg}$ 、平均値 \pm 標準誤差)、対照群 6 時間後 ($212 \pm 3 \text{ mmHg}$ 、平均値 \pm 標準誤差) であった。以上の

結果から、試料が血圧降下作用を持つことが確認された。

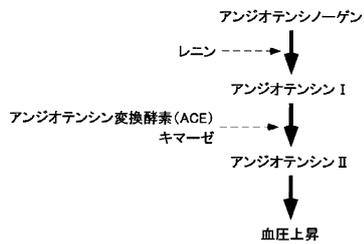
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

- (72)発明者 菲澤 悟
茨城県つくば市大わし1 - 1 独立行政法人国際農林水産研究センター内
- (72)発明者 程 永強
茨城県つくば市大わし1 - 1 独立行政法人国際農林水産研究センター内
- (72)発明者 高橋 砂織
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番26号 秋田県総合食品研究センター内

審査官 春田 由香

- (56)参考文献 特開2006 - 225315 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 36/00 - 36/9068
A23L 33/00 - 33/29
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
PubMed
Science Direct
Cinii
医中誌WEB