

(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2004-10488

(P2004-10488A)

(43) 公開日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/216	A 6 1 K 31/216	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/405	A 6 1 K 31/405	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7034	A 6 1 K 31/7034	4 C 0 8 8
A 6 1 K 31/7048	A 6 1 K 31/7048	4 C 2 0 6
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/78 C	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-161695 (P2002-161695)	(71) 出願人	501145295 独立行政法人食品総合研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12
(22) 出願日	平成14年6月3日(2002.6.3)	(74) 代理人	110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
特許法第30条第1項適用申請有り	2002年3月25日 開催の「日本農芸化学会2002年度(平成14年度)大会」において文書をもって発表	(72) 発明者	渡辺 道子 千葉県松戸市上矢切1452-3
		(72) 発明者	渡辺 純 茨城県つくば市観音台1-29-1
		(72) 発明者	中嶋 光敏 茨城県つくば市観音台1-17-11
		Fターム(参考)	4C084 AA02 BA01 BA08 BA14 BA15 BA16 BA23 CA59 DC50 NA14 ZA661 ZB131 ZC012

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アレルゲンの腸管透過抑制剤

(57) 【要約】

【課題】食物アレルギー予防に有効な、腸管透過抑制効果を有する新たな物質を提供すること。

【解決手段】トリプトファンエステル、フェニルアラニンエステルまたはチロシンエステルを有効成分とするアレルゲンの腸管透過抑制剤。2～5個のアミノ酸からなり、少なくとも1つのトリプトファン、フェニルアラニンまたはチロシンを含むペプチドを有効成分とするアレルゲンの腸管透過抑制剤。香辛料からの抽出物を有効成分とするアレルゲンの腸管透過抑制剤。

【選択図】

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

トリプトファンエステル、フェニルアラニンエステルまたはチロシンエステルを有効成分とするアレルゲンの腸管透過抑制剤。

**【請求項 2】**

前記エステルが炭素数 1 ~ 6 の低級アルキルエステルである請求項 1 に記載の腸管透過抑制剤。

**【請求項 3】**

2 ~ 5 個のアミノ酸からなり、少なくとも 1 つのトリプトファン、フェニルアラニンまたはチロシンを含むペプチドを有効成分とするアレルゲンの腸管透過抑制剤。

10

**【請求項 4】**

前記ペプチドが W S N S G、W S N、W S または W G である請求項 3 に記載の腸管透過抑制剤。

**【請求項 5】**

香辛料からの抽出物を有効成分とするアレルゲンの腸管透過抑制剤。

**【請求項 6】**

香辛料からの抽出物が、ルテオリン - 7 - O - グルクロニド、ロスマリン酸、ケルセチン - 3 - O - グルクロニド、ルチンまたはピメントールである請求項 5 に記載の腸管透過抑制剤。

**【請求項 7】**

アレルゲンが食物由来である請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の腸管透過抑制剤。

20

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、アレルゲンの腸管透過抑制剤に関する。さらに詳しくは、アミノ酸誘導体、オリゴペプチドまたは香辛料からの抽出物を有効成分とするアレルゲンの腸管透過抑制剤に関する。

本発明の腸管透過抑制剤は、腸管でのアレルゲン物質などの透過を抑制するので、アレルギー疾患などの予防や治療に有用である。

**【0002】**

30

**【従来の技術】**

食物アレルギー患者数の増加が社会問題となっている。食物アレルギーの症状は下痢、皮膚炎、喘息症状など様々である。食物アレルギーは腸管から吸収された食物由来のアレルギー原因物質（アレルゲン）により惹起される。実際、食物アレルギー患者では腸管からのアレルゲン吸収量が増加しており、このことがアレルギー発症に深く寄与していると考えられている（J. Allergy Clin. Immunol. 2000 97 985 - 990）。

**【0003】**

腸管における物質の透過には、腸管の上皮細胞間に存在するタイト・ジャンクション（tight junction）が関与している。タイト・ジャンクションは、膜表層細胞同士を洩れなくシールし、表層細胞の周囲を鉢巻き状に取り囲んでおり、イオンなどの低分子物質は、このタイト・ジャンクションの間を通り抜けて体内に吸収される。消化されずに残った細菌、ウイルス、蛋白質などの巨大分子も腸管の上皮細胞間を通り抜けて体内に吸収される場合がある。この吸収が感染症や食物アレルギーを引き起こす原因のひとつと考えられている。

40

**【0004】**

タイト・ジャンクションの物質に対する透過性は一定でなく、グルコース、サイトカラシン D などの存在は、タイト・ジャンクションの透過性を緩めるものである。さらに、ラクトグロブリンのようなホエー蛋白質またはその分解物は、タイト・ジャンクションの透過性を減少させることも知られている（特開平 8 - 73375 号公報）。このほかに、

50

高分子量化合物の透過性を減少させる物質は他に知られていない。一方、アレルギーに起因する疾患は、現代病と言われるほどに多く、特に、食物アレルギー予防には、腸管透過抑制効果を有する探索が欠かせない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明の目的は、食物アレルギー予防に有効かつ、製造、加工が容易で安全性が高い、腸管透過抑制効果を有する物質を提供することである。

【0006】

本発明者らは、腸管上皮細胞間の物質透過を抑制する物質について鋭意検討した結果、特定のアミノ酸誘導体、オリゴペプチド及び香辛料抽出物がアレルギーの腸管物質透過を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

10

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するための本発明は、以下の通りである。

本発明のアレルギーの腸管透過抑制剤は、トリプトファンエステル、フェニルアラニンエステルまたはチロシンエステルを有効成分とする。このアレルギーの腸管透過抑制剤において、前記エステルは、炭素数1～6の低級アルキルエステルであることが好ましい。

さらに、本発明のアレルギーの腸管透過抑制剤は、2～5個のアミノ酸からなり、少なくとも1つのトリプトファン、フェニルアラニンまたはチロシンを含むペプチドを有効成分とする。このアレルギーの腸管透過抑制剤において、前記ペプチドは、WSNSG、WSN、WSまたはWGであることが好ましい。

20

【0008】

加えて本発明は、アレルギーの腸管透過抑制剤は、香辛料からの抽出物を有効成分とする。このアレルギーの腸管透過抑制剤において、香辛料からの抽出物は、ルテオリン-7-O-グルクロニド、ロスマリン酸、ケルセチン-3-O-グルクロニド、ルチンまたはピメントールである。

本発明の腸管透過抑制剤は、種々のアレルギーに対して腸管透過抑制効果を有するが、特に、腸管から吸収される食物由来のアレルギーに対して効果的である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明のアレルギーの腸管透過抑制剤の有効成分である、トリプトファンエステル、フェニルアラニンエステル及びチロシンエステルを構成する低級アルキルエステルとしては、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル等を挙げることができる。但し、生体に対する安全性、生産コスト、及び腸管透過抑制効果という観点からは、エチルエステルであることが好ましい。また、同一種のエステルである場合、トリプトファンエステル、フェニルアラニンエステル及びチロシンエステルの間では、ほぼ同様の腸管透過抑制効果を有する。

30

【0010】

上記アミノ酸エステルは、例えば、アミノ酸(トリプトファン、フェニルアラニン又はチロシン)を酸触媒条件下、アルカノールと反応させることにより製造することができる。アルカノールとしては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール等を挙げることができる。具体的には、エチルエステルは、アミノ酸と1Nになるように塩化水素を吹き込んだエタノールを0.5～2時間還流することで製造できる。還流の後、塩化水素とエタノールを溜去した残渣をそのまま用いればよい。塩化水素以外の酸を用いても良く、また、溜去を省いても良い。さらに、エタノール-ヘキサンで結晶化すること等の公知の精製方法で精製することもできる。

40

【0011】

本発明の2～5個のアミノ酸からなるアレルギーの腸管透過抑制剤は、少なくとも1つのトリプトファン、フェニルアラニンまたはチロシンを含むオリゴペプチドを有効成分とする。このオリゴペプチドは、トリプトファン、フェニルアラニン及びチロシンのいずれか

50

1つまたは2つ以上を含むことができ、例えば、WSNSG、WSN、WS、WG等であることが好ましい。尚、Wはトリプトファン、Sはセリン、Nはアスパラギン、Gはグリシンである。

【0012】

上記オリゴペプチドは、公知のアミノ酸合成方法（固相合成法）を用いて製造することができる。または、上記ペプチドを含むタンパク質を分解し、フラグメントを常法により分離回収することでも製造することができる。

【0013】

本発明の香辛料からの抽出物を有効成分とするアレルギーの腸管透過抑制剤における香辛料は、例えば、タイム、オールスパイス、コリアンダー、タラゴン等を挙げることができる。

10

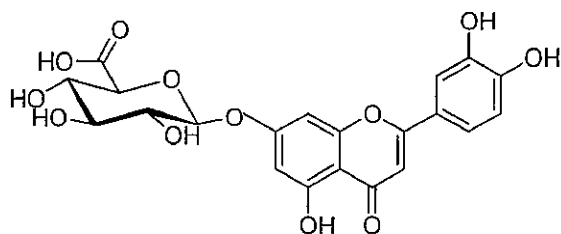
さらに、香辛料からの抽出物としては、フラボノイド等を挙げることができる。

香辛料からの抽出物の具体例であるルテオリン-7-O-グルクロニド及びロスマリン酸は、それぞれ以下の化学式で表される化合物である。ルテオリン-7-O-グルクロニド及びロスマリン酸は、それぞれタイムから常法により抽出することができる。抽出法について実施例で具体的に説明する。

【0014】

ルテオリン-7-O-グルクロニド

【化1】

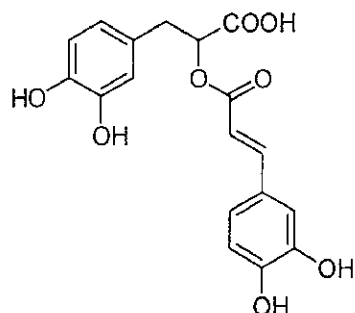


20

【0015】

ロスマリン酸

【化2】



30

【0016】

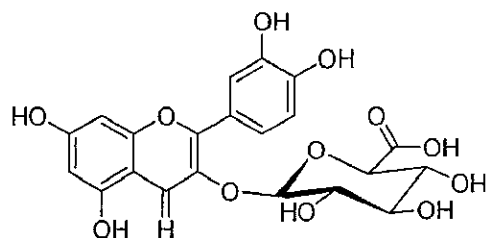
ケルセチン-3-O-グルクロニドは、以下の化学式で表される化合物である。ケルセチン-3-O-グルクロニドは、コリアンダーから常法により抽出することができる。抽出法について実施例で具体的に説明する。

40

【0017】

ケルセチン-3-O-グルクロニド

【化3】



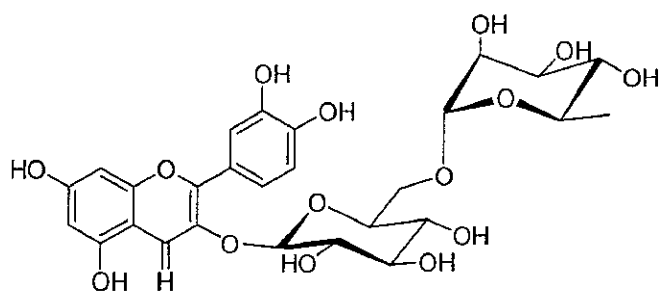
【 0 0 1 8 】

ルチンは、以下の化学式で表される化合物である。ルチンは、それぞれコリアンダー及び  
10 タラゴンから常法により抽出することができる。抽出法について実施例で具体的に説明す  
る。

【 0 0 1 9 】

ルチン

【 化 4 】



20

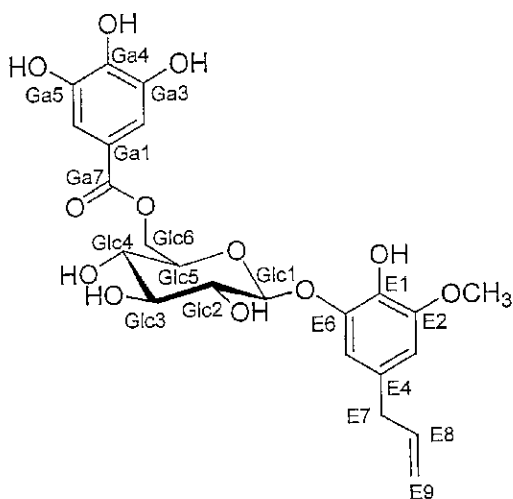
【 0 0 2 0 】

また、ピメントールは、以下の化学式で表される化合物である。ピメントールは、オール  
スパイスから常法により抽出することができる。抽出法について実施例で具体的に説明す  
る。

【 0 0 2 1 】

ピメントール

【 化 5 】



40

【 0 0 2 2 】

本発明の腸管透過抑制剤を投与するに際しては、有効成分であるアミノ酸誘導体、オリゴ  
ペプチドまたは香辛料抽出物をそのままの状態でも用いることもできるが、常法に従って、  
粉末、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、乳化剤、ドリンク剤など製剤化して用いることもでき  
る。さらに、この腸管透過抑制剤を各種栄養剤や食品などに混ぜてアレルギーを予防する  
50

ことも可能である。

【0023】

例えば、本発明の腸管透過抑制剤は、トリパルミチンからなる担体を用いたマイクロカプセルにすることが、製造の容易さ、腸管での溶出の容易さ、無味化等の観点から好ましい。さらに、前記担体に界面活性剤が含まれていてもよい。界面活性剤としては、造粒方法に応じて油性及び水性界面活性剤を用いることができる。油性界面活性剤としては、例えば、P O 5 0 0 (花王社製)、水性界面活性剤としては、M L 7 5 0 (花王社製)等を挙げることができる。

【0024】

上記マイクロカプセルは、例えば、腸管透過抑制剤、トリパルミチン及び界面活性剤の溶解物、水溶液又は水分散体をスプレイドライすることで製造することができる。また、例えば、腸管透過抑制剤及びトリパルミチンをトリパルミチン飽和ヘキサンに添加し、得られるスラリーをスプレイドライすることでも、上記マイクロカプセルを製造することができる。スプレイドライの条件は、溶解物、水溶液、水分散体又はスラリーに含まれる固形分濃度や腸管透過抑制剤の耐熱性、酸化安定性等を考慮して適宜決定される。具体的には、例えば、スプレイドライの加熱温度を約80 とすることができる。

10

【0025】

本発明の腸管透過抑制剤の投与量は、年齢、治療効果、病態などにより異なるが、通常、一人当たり一回に体重1kg当たり約1µg~100mgの範囲で、一日一回から数回投与すればよい。

20

【0026】

なお、本発明の腸管透過抑制剤の効果の確認は、Caco-2細胞を透過性フィルター上で約14日間培養したものをを用いて行った。詳細は実施例において説明する。

【0027】

本発明の腸管透過抑制剤は、種々のアレルゲンに対して腸管透過抑制効果を有する。本発明の腸管透過抑制剤は、特に、腸管から吸収される食物由来のアレルゲンに対して効果的であり、食物由来のアレルゲンとしては、例えば、卵白アルブミン、オボムコイド、ラクトグロブリン、G l y M B d 3 0 K (大豆アレルゲン)、アミラーゼインヒビター、ペルオキシダーゼ、低分子量グルテニン、等を挙げることができる。但し、これらに限定されるものではない。

30

【0028】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに説明する。

腸管透過性試験方法

食物アレルゲンとして蛍光標識した卵白アルブミン(FITC-OVA)を、腸管モデルとしてCaco-2細胞を透過性フィルター上で約14日間培養したものをを用いた。蛍光標識した卵白アルブミン(FITC-OVA)は、市販卵白アルブミンを常法(微アルカリ性)でフルオレッセンイソチオシアネートと反応させて結合後、流水透析、Sephadex G-15カラムクロマトグラフィーで精製して調製した。

【0029】

Caco-2細胞の培養は以下の方法で行った。

Caco-2細胞を American Type Culture Collection (U.S.A.)から入手し、継代数30~40のものを透過試験に用いた。培養液の組成はDulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Life Technologies, Inc., U.S.A.)にウシ胎仔血清(20%,大日本製薬)、非必須アミノ酸溶液(1%, Gibco, Life Technologies, Inc.)、ペニシリン(100 IU/ml, 和光純薬)、ストレプトマイシン(100µg/ml, 和光純薬)およびゲンタマイシン(50µg/ml, 和光純薬)を加えたものとした。細胞を37、5%CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養し、3、4日おきに継代を行った。透過試験に際しては、細胞を12穴

40

50

トランズウェル内のメンブレンフィルター (No. 3460, Corning, U.S.A.) で培養した。培養液をベイサル (basal) 側には 1.5 ml、アピカル (apical) 側には 0.5 ml を加え約 2 週間培養した。Millicell-ESR (Millipore Co., U.S.A.) を用いて経上皮電気抵抗 (TEER) を測定し、TEER が  $300 \cdot \text{cm}^{-2}$  以上となり単層が完成したものを透過試験に用いた。

#### 【0030】

透過試験前夜より試料溶液をアピカル (apical) 側ベイサル (basal) 側両方に加え、前培養した。培養後、試料共存下でOVAを 1 mg/ml の濃度でハックス平衡塩溶液に溶解したものをアピカル (apical) 側に添加し、30 分間培養した。30 分後ベイサル (basal) 側の透過液を回収し、透過したOVA量を蛍光強度により測定した。

10

蛍光強度測定は、島津製作所社製の分光蛍光光度計を用いて励起波長 495 nm、蛍光波長 520 nm で行った。

#### 【0031】

##### 実施例 1

トリプトファンエチルエステル、フェニルアラニンエチルエステル及びチロシンエチルエステルをそれぞれ以下の方法により合成した。

アミノ酸 (10 g) と 1 N になるように塩化水素を吹き込んだエタノール (100 ml) を 1 時間還流することで製造した。還流の後、塩化水素とエタノールを溜去した残渣をそのまま用いた。

20

得られた各エステルのOVA透過抑制作用を、上記腸管透過性試験方法により求めた。その結果、いずれのエステルも  $10^{-7}$  M の濃度において、OVAの透過を顕著に抑制した。いずれのエステルも、OVAの透過を対照に対して約 50% 阻害した。

#### 【0032】

##### 実施例 2

##### アミノ酸オリゴマー

WG は市販品であり、WSNSG、WSN 及び WS は、固相合成法により調製した。

得られた各アミノ酸オリゴマーのOVA透過抑制作用を、上記腸管透過性試験方法により求めた。その結果、いずれのアミノ酸オリゴマーも  $10^{-7}$  M の濃度において、OVAの透過を顕著に抑制した。いずれのペプチドも、OVAの透過を対照に対して約 50% 阻害した。

30

#### 【0033】

##### 実施例 3

33 種の食品の 50% メタノール抽出物について上記腸管透過性試験方法によりスクリーニングを行った。その結果、オールスパイス、タイム、コリアンダー、タラゴンに強い活性が認められた。そこで、これらの食品から、以下に示す方法により抽出し、さらに抽出物から非逆相 HPLC を用いて活性成分を単離した。

#### 【0034】

##### ピメントールの抽出

オールスパイス 537.7 g を 50% メタノール 800 ml に浸漬し、吸引濾過し、濾液を減圧濃縮し、約 1 g の抽出物を得た。この抽出物を 100 ml の水に加え、Sep-Pak に吸着させ、60% メタノール水溶液で溶出し、減圧濃縮によりメタノールを除去した。得られた溶液を以下の条件の逆相 HPLC に付し、活性成分を単離した。

40

#### 【0035】

##### HPLC 条件

##### ファーストラン

カラム: Shodex RS pak RP18-415

溶媒: 40% メタノール 0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 水溶液

流速: 1 ml/min.

50

検出波長：220 nm

クロマトグラムを図1に示す。

#### セカンドラン

カラム：Shodex RS pak DE613

溶媒：アセトニトリル / 0.1% TFA 水溶液 25 ~ 35% (15分) リニアグラジェント

流速：1 ml / min .

検出波長：220 nm

クロマトグラムを図2に示す。

#### 【0036】

単離した活性成分は、NMRおよび質量分析 (FAB-MS (Negative) m/z 493 [M-H]<sup>-</sup>) の結果、オールスパイスの活性成分はピメントールであった。

#### 【0037】

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 3.01 (2H, br. dd, J = 5.5, 5.6 Hz, H-E7), 3.45 (m, H-Glc4), 3.50 (m, H-Glc3), 3.51 (m, H-Glc2), 3.72 (ddd, J = 2.0, 6.8, 9.2 Hz, H-Glc5), 3.78 (3H, s, H-E10 (OMe)), 4.44 (dd, J = 6.8, 11.8 Hz, H-Glc6a), 4.58 (dd, J = 2.0, 11.8 Hz, H-Glc6b), 4.73 (d, J = 7.7 Hz, H-Glc1), 4.90 (2H, m, H-E9), 5.74 (m, H-E8), 6.46 (d, J = 1.6 Hz, H-E3), 6.52 (d, J = 1.6 Hz, H-E5), 7.08 (2H, s, H-Ga2, 6).

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 40.7 (C-E7), 56.7 (C-E10 (OMe)), 64.8 (C-Glc6), 71.8 (C-Glc4), 74.8 (C-Glc2), 75.8 (C-Glc5), 77.4 (C-Glc3), 104.1 (C-Glc1), 108.5 (C-E3), 110.2 (C-Ga2, Ga6), 115.6 (C-E9), 111.6 (C-E5), 121.1 (C-Ga1), 132.6 (C-E4), 135.6 (C-E1), 139.0 (C-E8), 140.2 (C-Ga4), 146.6 (C-Ga3, Ga5), 146.7 (C-E6), 149.5 (C-E2), 168.3 (C-Ga7).

#### 【0038】

#### ルテオリン-7-O-グルクロニド及びロスマリン酸の抽出

タイムを原料として上記オールスパイスの場合と同様に抽出溶液を得、以下の条件の逆相HPLCに付し、活性成分を単離した。

HPLC条件

#### ファーストラン

カラム：Shodex RS pak RP18-415

溶媒：メタノール / 0.1% TFA 水溶液 30 ~ 50% (15分) リニアグラジェント

流速：1 ml / min .

検出波長：220 nm

クロマトグラムを図3に示す。2つの活性ピークを得た (タイム3及び4)。

#### タイム3及び4のセカンドラン

カラム：Shodex RS pak DE613

溶媒：アセトニトリル / 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 10 ~ 30% (15分) リニアグラジェント

流速：1 ml / min .

検出波長：220 nm

クロマトグラムを図4に示す。

10

20

30

40

50

タイム3のサードラン

カラム：Shodex RS pak DE613

溶媒：アセトニトリル / 0.1% TFA 水溶液 25 ~ 50% (15分) リニアグラジェント

流速：1 ml / min .

検出波長：220 nm

クロマトグラムを図5に示す。

タイム4のサードラン

カラム：Shodex RS pak DE613

溶媒：アセトニトリル / 0.1% TFA 水溶液 40 ~ 60% (15分) リニアグラジェント 10

流速：1 ml / min .

検出波長：220 nm

クロマトグラムを図6に示す。

## 【0039】

単離した活性成分は、NMRおよび質量分析の結果、タイム3がルテオリン-7-O-グルクロニドであり、タイム4がロスマリン酸であった。

## 【0040】

ロスマリン酸 (Rosmarinic acid)

FAB-MS (negative) m/z 483 [M-H+Na-H]<sup>-</sup> . 20

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 2.96 (dd, J = 8.9, 14.3 Hz, H-7'), 3.09 (dd, J = 3.3, 14.3 Hz, H-7'), 5.14 (dd, J = 3.3, 8.9 Hz, H-8'), 6.26 (d, J = 16.0 Hz, H-8), 6.61 (dd, J = 1.5, 8.1 Hz, H-6'), 6.68 (d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.75 (d, J = 1.5 Hz, H-2'), 6.76 (d, J = 8.1 Hz, H-5), 6.93 (dd, J = 2.0, 8.1 Hz, H-6), 7.03 (d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.52 (d, J = 16.0 Hz, H-7) .

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 38.3 (C-7'), 76.3 (C-8'), 115.0 (C-8), 115.2 (C-2), 116.3 (C-5'), 116.5 (C-5), 117.6 (C-2'), 121.8 (C-6'), 123.1 (C-6), 127.8 (C-1), 130.1 (C-1'), 145.1 (C-3'), 146.1 (C-4'), 146.8 (C-3), 147.3 (C-7), 149.6 (C-4), 168.8 (C-9) . 30

これらのデータは文献値と一致していた。J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 2-8 .

## 【0041】

ルテオリン-7-O-グルクロニド (Luteolin-7-O-glucuronide) 40

FAB-MS (negative) m/z 461 [M-H]<sup>-</sup> .

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 3.54 (3H, m, H-Glc2, 3 and 4), 3.85 (br.d, J = 9.1 Hz, H-Glc5), 5.08 (d, J = 7.3 Hz, H-Glc1), 6.49 (d, J = 2.2 Hz, H-8), 6.59 (s, H-3), 6.82 (d, J = 2.2 Hz, H-6), 6.89 (d, J = 8.9 Hz, H-5'), 7.39-7.41 (2H, m, H-2' and 6') .

これらのデータは文献値と一致していた。Phytochemistry. 2000, 55, 263-267 .

## 【0042】

ケルセチン - 3 - O - グルクロニドの抽出

コリアンダーを50%メタノール水溶液で抽出した。抽出物をSep - Packに吸着させ、60%メタノール水溶液で溶出し、溶出画分を分取HPLCに供した。

逆相分取HPLCの条件

ファーストラン

カラム：Shodex RS pak RP 18 - 415

溶媒：40%メタノール0.1%TFA水溶液

流速：1ml/min.

検出波長220nm

クロマトグラムを図7に示す。

10

## 【0043】

セカンドラン

カラム：Shodex RS pak RP 18 - 415

溶媒：アセトニトリル/10mM酢酸アンモニウム水溶液

アセトニトリル濃度が10~30%(15分)リニアグラジェント

流速：1ml/min.

検出波長220nm

クロマトグラムを図8に示す。

20

## 【0044】

サードラン

カラム：Shodex RS pak RP 18 - 415

溶媒：アセトニトリル/0.1%TFA水溶液

アセトニトリル濃度が0~30%(15分)リニアグラジェント

流速：1ml/min.

検出波長220nm

クロマトグラムを図9に示す。

## 【0045】

ケルセチン - 3 - O - グルクロニド (Quercetin - 3 - O - glucuronide)

30

FAB - MS (negative) m/z 477 [M - H]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) 3.46 - 3.64 (4H, m, H - Glc 2, 3, 4 and 5), 5.30 (d, J = 7.6 Hz, H - Glc 1), 6.19 (br. s, H - 6), 6.38 (br. s, H - 8), 6.85 (d, J = 8.4 Hz, H - 5'), 7.48 (dd, J = 2.1, 8.4 Hz, H - 6'), 7.93 (br. s, H - 2').

<sup>13</sup>C NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) 73.4, 75.6, 77.6 and 78.1 (C - Glc 2, 3, 4 or 5), 94.3 (C - 8), 100.0 (C - 6), 104.4 (C - Glc 1), 103.8 (C - 10), 116.2 (C - 5'), 118.1 (C - 2'), 122.8 (C - 6'), 135.8 (C - 3), 145.9, 149.9, 158.5 (C - 9), 159.2 (C - 2), 163.0 (C - 5), 166.1 (C - 7), 176.3 (C - Glc 6), 179.5 (C - 4).

40

これらのデータは文献値と一致していた。Phytochemistry. 1985, 24, 465 - 467.

## 【0046】

ルチンの抽出

タラゴンの乾燥葉を50%メタノール水溶液で抽出した。抽出物をSep - Packに吸着させ、60%メタノール水溶液で溶出し、溶出画分を分取HPLCに供した。

50

逆相分取 H P L C の条件ファーストラン

カラム：Shodex RS pak RP 18 - 415

溶媒：メタノール / 0.1% TFA 水溶液

メタノール濃度が 30 ~ 70% (15分) リニアグラジェント

流速：1 ml / min .

検出波長 220 nm

クロマトグラムを図 10 に示す。

## 【0047】

タラゴン 3 は水で結晶化したので少量を取り、水に溶かして H P L C でチェックした。

10

## 分析条件

カラム：Shodex RS pak RP 18 - 415

溶媒：アセトニトリル / 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液

アセトニトリル濃度が 0 ~ 30% (15分) リニアグラジェント

流速：1 ml / min .

検出波長 220 nm

クロマトグラムを図 11 に示す。

## 【0048】

ルチン (Quercetin - 3 - O - (6 - O - rhamnosyl) - glucoside (rutin))

20

FAB - MS (negative) m/z 499 [M - H + Na - H]<sup>-</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 1.08 (3H, d, J = 6.2 Hz, H - Rha6), 3.22 ~ 3.26 (2H, m, H - Glc4, Rha4), 3.30 (br. s, H - Glc5), 3.35 (m, H - Glc6), 3.39 ~ 3.45 (3H, m, H - Glc2 and 3, Rha5), 3.51 (br. d, J = 9.4 Hz, H - Rha3), 3.61 (br. s, H - Rha2), 3.76 (br. d, J = 10.5 Hz, H - Glc6), 4.48 (br. s, H - Rha1), 5.06 (d, J = 7.4 Hz, H - Glc1), 6.14 (br. s, H - 6), 6.32 (br. s, H - 8), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, H - 5'), 7.58 (br. d, J = 8.4 Hz, H - 6'), 7.62 (br. s, H - 2').

30

<sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 17.9 (C - Rha6), 68.6 (C - Glc6), 69.7 (C - Rha5), 71.4 (C - Glc4), 72.1 (C - Rha2), 72.3 (C - Rha3), 74.0 (C - Rha4), 75.8 (C - Glc2), 77.2 (C - Glc5), 78.2 (C - Glc3), 94.9 (C - 8), 100.0 (C - 6), 102.4 (C - Rha1), 104.8 (C - Glc1), 105.6 (C - 10), 116.1 (C - 5'), 117.8 (C - 2'), 123.2 (C - 1'), 123.6 (C - 6'), 135.7 (C - 3), 145.8 (C - 3'), 149.8 (C - 4'), 158.5 (C - 9), 159.3 (C - 2), 162.9 (C - 5), 166.1 (C - 7), 179.4 (C - 4).

40

これらのデータは文献値と一致していた。J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 4880 - 4882.

## 【0049】

得られたピメントール、ルテオリン - 7 - O - グルクロニド及びロスマリン酸、ケルセチン - 3 - O - グルクロニド、ルチンの OVA 透過抑制作用を、上記腸管透過性試験方法により求めた。その結果、いずれの抽出物も 10<sup>-7</sup> M の濃度において、OVA の透過を顕著に抑制した。抑制結果を表 1 に示す。

50

【 0 0 5 0 】

【 表 1 】

化合物	相対OVA透過量
ルテオリン-7-O-グルクロニド	30
ロスマリン酸	36
ピメントール	33
ケルセチン-3-O-グルクロニド	30
ルチン	49
コントロール	100%

10

【 0 0 5 1 】

参考例 1

マイクロカプセルの作製

カプセル材料としてトリパルミチン (TP) 3 g 及び脂溶性界面活性剤 PO-500 (HLB 4.9) (TP の 1%) の混合物を 70 で融解し、42 ~ 43 にまで冷却してからシリカゲル上で乾燥したトリプトファンエチルエステル 150  $\mu$ g を加え、攪拌しながら TP 飽和ヘキサン (3 重量) に流し込んでスラリーとし、スプレー乾燥した。マイクロカプセル化した後、180  $\mu$ m の篩を通過する画分は口腔内でのざらつきがなかったため、カプセルはこの篩で分級した。1% ML-750 (HLB 14.8) で表面処理し、200 メッシュ篩で濾過した後に減圧乾燥して、3.1 g のマイクロカプセルを得た (トリプトファンエチルエステルの回収率 90% 以上)。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 オールスパイス抽出物の HPLC ファーストランのクロマトグラム。

【 図 2 】 オールスパイス抽出物の HPLC セカンドランのクロマトグラム。

【 図 3 】 タイム抽出物の HPLC ファーストランのクロマトグラム。

【 図 4 】 タイム抽出物の HPLC セカンドランのクロマトグラム。

30

【 図 5 】 タイム 3 の HPLC サードランのクロマトグラム。

【 図 6 】 タイム 4 の HPLC サードランのクロマトグラム。

【 図 7 】 コリアンダー抽出物の HPLC ファーストランのクロマトグラム。

【 図 8 】 コリアンダー抽出物の HPLC セカンドランのクロマトグラム。

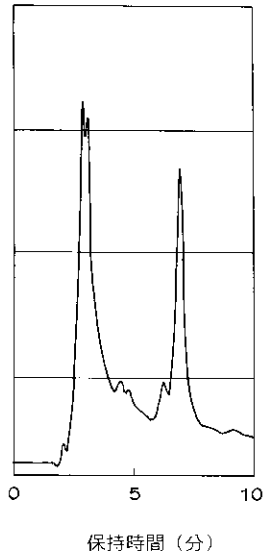
【 図 9 】 コリアンダー抽出物の HPLC サードランのクロマトグラム。

【 図 10 】 タラゴン抽出物の HPLC ファーストランのクロマトグラム。

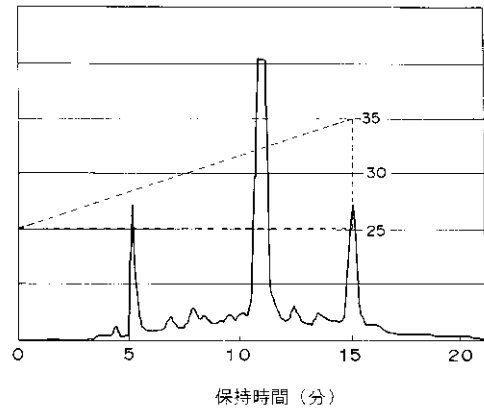
【 図 11 】 タラゴン 3 の HPLC クロマトグラム。

【 図 12 】 香辛料抽出物の OVA 透過抑制活性を示す。

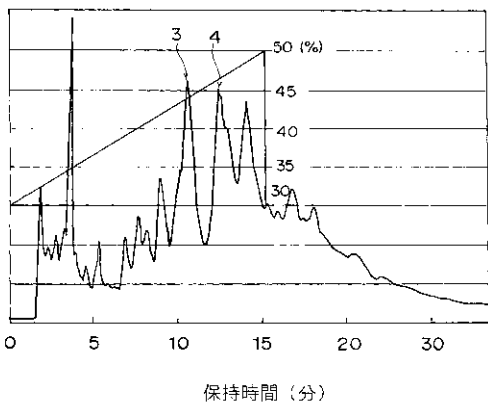
【 図 1 】



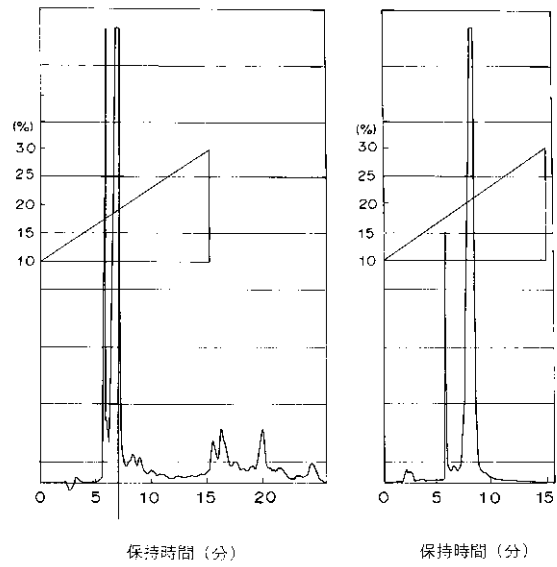
【 図 2 】



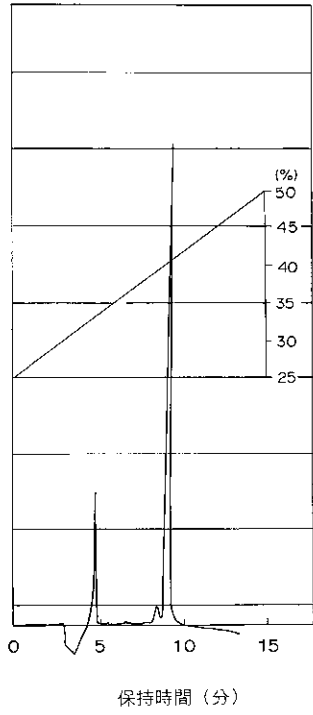
【 図 3 】



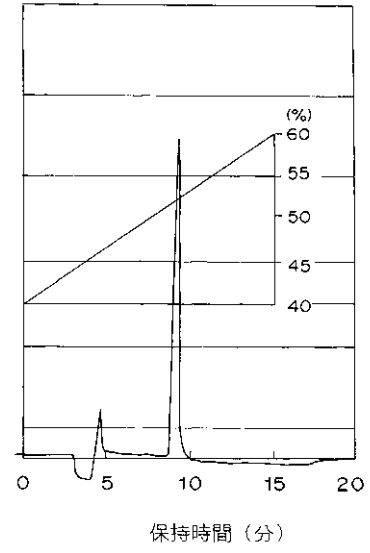
【 図 4 】



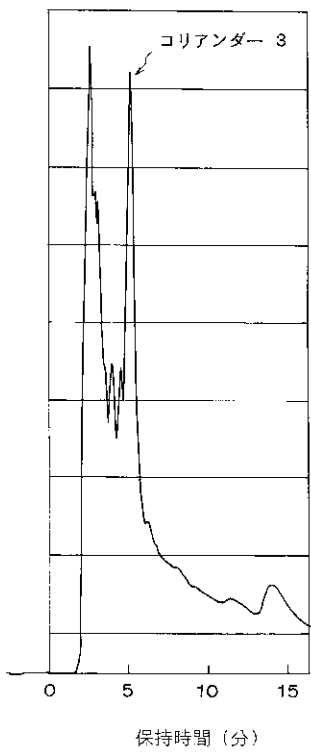
【 図 5 】



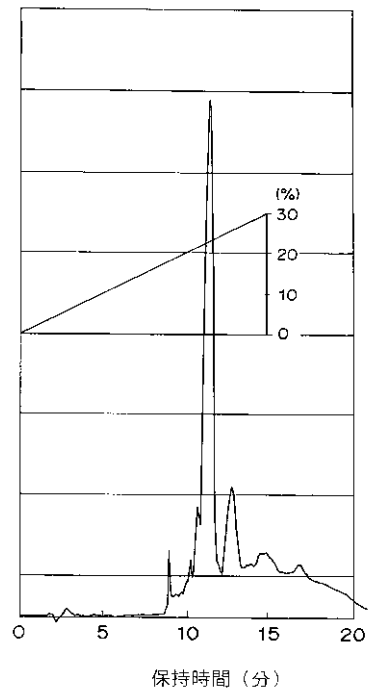
【 図 6 】



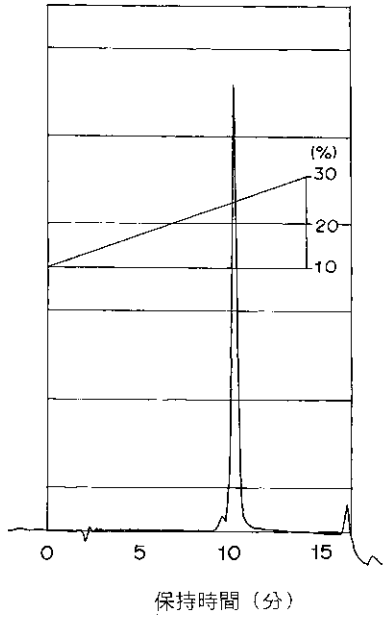
【 図 7 】



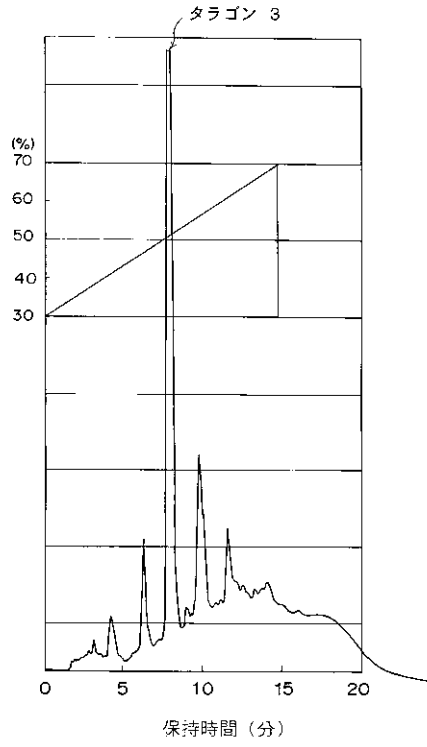
【 図 8 】



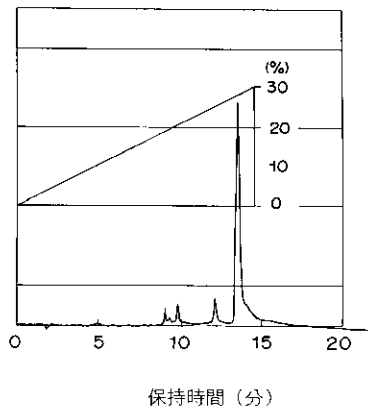
【 図 9 】



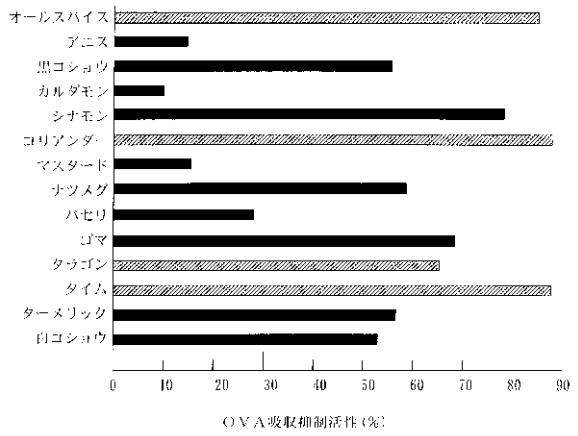
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 35/78	N
A 6 1 P 1/04	A 6 1 K 35/78	Q
A 6 1 P 37/08	A 6 1 K 35/78	T
A 6 1 P 39/00	A 6 1 K 35/78	X
	A 6 1 P 1/04	
	A 6 1 P 37/08	
	A 6 1 P 39/00	
	A 6 1 K 37/02	

F ターム(参考)	4C086	AA01	AA02	BC13	EA08	EA11	GA17	MA01	MA04	NA14	ZA66
		ZB13	ZC01								
	4C088	AB29	AB38	AB40	AB57	AC05	BA09	BA10	BA14	BA18	BA23
		BA32	CA08	CA14	MA02	MA52	NA14	ZA66	ZB13	ZC01	
	4C206	AA01	AA02	DB20	DB54	FA53	KA01	KA18	MA01	MA04	NA14
		ZA66	ZB13	ZC01							