

(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2010-11846

(P2010-11846A)

(43) 公開日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 L 1/076 (2006.01)	A 2 3 L 1/076	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 A	4 B 0 4 1
A 6 1 K 35/64 (2006.01)	A 6 1 K 35/64	4 C 0 8 7
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	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 11 頁)		

(21) 出願番号	特願2009-134692 (P2009-134692)	(71) 出願人	592207809
(22) 出願日	平成21年6月4日 (2009.6.4)		森川健康堂株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2008-146732 (P2008-146732)		熊本県上益城郡甲佐町大字田口2 1 7 〇番地
(32) 優先日	平成20年6月4日 (2008.6.4)	(74) 代理人	100088904
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		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
		(72) 発明者	三浦 雅博
			熊本県上益城郡甲佐町田口2 1 7 〇番地
			森川健康堂株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法

(57) 【要約】

【課題】血圧降下作用、特にアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するローヤルゼリーを得ることのできる新しい技術を提供すること。

【解決手段】ローヤルゼリーにパエニバチルス ポリミキサ (Paenibacillus polymyxa) 由来のタンパク質分解酵素を作用させる工程を含むことを特徴とする、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法、並びに該製造方法によって得られるローヤルゼリーを含有するローヤルゼリー組成物および血圧降下剤。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ローヤルゼリーにバエニバチルス ポリミキサ (Paenibacillus polymyxa) 由来のタンパク質分解酵素を作用させる工程を含むことを特徴とする、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法。

【請求項2】

血圧降下作用がアンジオテンシン変換酵素阻害作用である請求項1に記載のローヤルゼリーの製造方法。

【請求項3】

ローヤルゼリーが実質的に完全消化されたローヤルゼリーである請求項1または2に記載のローヤルゼリーの製造方法。

10

【請求項4】

請求項1から3のいずれか1項に記載の製造方法によって得られるローヤルゼリーを含有するローヤルゼリー組成物。

【請求項5】

請求項1から3のいずれか1項に記載の製造方法によって得られるローヤルゼリーを含有する血圧降下剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法、並びに、該方法によって得られるローヤルゼリーを含有するローヤルゼリー組成物および血圧降下剤に関する。

【背景技術】

【0002】

ローヤルゼリーとは、若い働き蜂の咽頭腺により分泌される乳白色したペースト状物質であり、その成分は必須アミノ酸をはじめとするアミノ酸が豊富に含まれ良質なタンパク質などから構成されている。さらに、ビタミン類、ミネラル類、炭水化物などの微量成分を含んでいる。例えばビタミン類ではビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ナイアシン、成長促進や老化防止に効果のあるパントテン酸、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンEなどが挙げられる。ミネラル類ではカリウム、マグネシウム、カルシウム、銅、鉄、リンなどが挙げられる。炭水化物ではブドウ糖、果糖などが挙げられる。さらに、アセチルコリン様物質、有機酸（10-ヒドロキシデセン酸など）、脂肪、タンパク質性の抗菌物質であるロイアリシンなどが含まれている。

30

【0003】

このようにローヤルゼリーは様々な栄養成分を含んでおり、例えば、抗菌作用、免疫増強作用、抗炎症作用、老化防止作用、更年期障害の予防・治療作用、抗がん作用など数多くの効果が知られている。

【0004】

一方、生活習慣病の中でも高血圧患者数は我が国では30歳以上で2000万人と推定され、高血圧は現在の国民病ともいわれる側面をもっている。高血圧は各種慢性疾患に対するリスクファクターとなり、脳血管障害、心筋梗塞などの血管障害を誘発することが知られている。今後ますます高齢化が進むにつれ、高血圧症者も増大することが予想され、高血圧の改善あるいは発症の予防が課題となっている（非特許文献1）。

40

【0005】

アンジオテンシン変換酵素（以下ACEと略することがある）はアンジオテンシンIを血圧上昇物質であるアンジオテンシンIIに変換し、血圧降下作用をもつブラジキニンを分解するため血圧を上昇させる働きがある。したがってACEを阻害する物質（ACE阻害物質）があれば血圧を下げることができ、高血圧症予防又は治療に効果があることが期待される。

ACE活性を抑制させることにより血圧を降下させるACE阻害物質として、例えば、カプトプリルが開発され医薬品として利用されている。

50

【0006】

一方、食品分野においては、乳カゼイン（非特許文献2）、わかめタンパク質（特許文献1、非特許文献3）、かつお節（非特許文献4、非特許文献5）、イワシ（非特許文献6）などの酵素分解物、発酵乳（非特許文献7）、ブナハリタケエキス（非特許文献8）などACE阻害物質を含む食品が数多く市販されている。

【0007】

ローヤルゼリーを動物の消化酵素であるトリプシンや枯草菌（*Bacillus subtilis*）由来のタンパク質分解酵素を用いて加水分解することによりACE阻害物質を得る試みがなされている（特許文献2、特許文献3、非特許文献9）。さらに、枯草菌由来のタンパク質分解酵素を用いてローヤルゼリーを加水分解した際の血圧降下の関与成分としてはイソロイシン-チロシン、バリニン-チロシンおよびイソロイシン-バリニン-チロシンなどのペプチドが知られている（非特許文献10）。しかし、ローヤルゼリーの消化に用いるトリプシンは動物由来の消化酵素であり、トリプシンで加水分解したローヤルゼリーは動物由来の感染性物質の混入を完全に否定することは困難であるという問題があり、より安全なローヤルゼリー由来のACE阻害物質が望まれている。さらに、枯草菌由来のタンパク質分解酵素で加水分解したローヤルゼリーはACE阻害活性が低いという問題があり、よりACE阻害活性が高いACE阻害物質が望まれている。

10

上記のように種々の食品素材に対してそれぞれ異なったタンパク質分解酵素が用いられている。これは食品素材に含まれるタンパク質がそれぞれ異なっているため、それぞれのタンパク質に最適なタンパク質分解酵素が選択されているためだと考えられる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2002-138100号公報

【特許文献2】特開平4-279597号公報

【特許文献3】特開2006-28065号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】藤田裕之 他、薬理と治療 第25巻（8号）、147（2155）－151（2159）（1997）

30

【非特許文献2】Maruyama S., Agr. Biol. Chem., 51, 1581 (1987)

【非特許文献3】Health Sciences, 20, 82-90 (2004)

【非特許文献4】Yokoyama K., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1541 (1992)

【非特許文献5】Fujita H. et al., J. Food Sci., 65, 564 (2000)

【非特許文献6】関英治 他、日本農芸化学会誌 第69巻（8号）、1013－1020（1995）

【非特許文献7】Yamamoto N. et al., J Dairy Sci, 77, 917-922 (1994)

【非特許文献8】坂元雄二 他、応用薬理 第61巻（4/5）、221－229（2001）

【非特許文献9】丸山広恵 他、日本食品科学工学会誌 第50巻（7号）、310－315（2003）

【非特許文献10】Tokunaga K. et al., Bio. Pharm. Bull., 27 (2), 189-192 (2004)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、血圧降下作用、特にアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するローヤルゼリーを得ることのできる新しい技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは鋭意検討を行った結果、ローヤルゼリーにパエニバチルス ポリミキサ（*Paenibacillus polymyxa*）由来のタンパク質分解酵素を作用させることにより、前記課題が解決できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

50

【0012】

すなわち本発明は、

1. ローヤルゼリーにパエニバチルス ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*) 由来のタンパク質分解酵素を作用させる工程を含むことを特徴とする、血圧降下作用を有するローヤルゼリーの製造方法、
 2. 血圧降下作用がアンジオテンシン変換酵素阻害作用である前記ローヤルゼリーの製造方法、
 3. ローヤルゼリーが実質的に完全消化されたローヤルゼリーである前記いずれかのローヤルゼリーの製造方法、
 4. 前記いずれかの製造方法によって得られるローヤルゼリーを含有するローヤルゼリー組成物、および
 5. 前記いずれかの製造方法によって得られるローヤルゼリーを含有する血圧降下剤、
- からなる。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明によるとより安全で簡便な方法により血圧降下作用、特にアンジオテンシン変換酵素阻害作用を有するローヤルゼリーを製造することができ、この血圧降下作用を有するローヤルゼリーを利用して、ローヤルゼリー組成物や血圧降下剤を提供することができる。

20

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明のローヤルゼリーは、パエニバチルス ポリミキサ (*Paenibacillus polymyxa*) 由来のタンパク質分解酵素を作用させることにより製造される。

【0015】

ローヤルゼリーの原産国は例えば日本、中国、台湾、タイ、ブラジル、ヨーロッパ諸国、オセアニア諸国、アメリカなどを挙げることができ、いずれの原産国のローヤルゼリーを用いてもよい。また、複数の原産国のローヤルゼリーを適宜混合して用いてもよい。ローヤルゼリーは液体であることが好ましく、凍結乾燥状態のローヤルゼリーを用いる場合は精製水、水道水または適当な緩衝液などで溶解して用いることができる。また、凍結状態のローヤルゼリーは融解して用いることができる。

30

【0016】

さらに、ローヤルゼリーは加熱、遠心分離、アルコール抽出、ろ過、フリーズドライまたは熱風乾燥などの加工並びに各種栄養素などが添加されたものであってもよい。

【0017】

ローヤルゼリーに作用させる、パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素はパエニバチルス ポリミキサを培養することにより得られ、培養液、精製品であってもよい。また、パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素は遺伝子組換えにより得られたものであってもよく、さらに、例えば糖やポリエチレングリコールなどで修飾されたものであってもよい。さらに、培養を行ったパエニバチルス ポリミキサをローヤルゼリーに添加して、一定の条件で発酵を行ってもよい。また、パエニバチルス ポリミキサは、バチルス ポリミキサ (*Bacillus polymyxa*) とも呼ばれる。

40

【0018】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素は単独でローヤルゼリーに作用させてもよく、さらに、パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素と他のタンパク質分解酵素を併用してローヤルゼリーに作用させてもよい。また、タンパク質分解酵素は必要な量を一度にローヤルゼリーに作用させてもよいし、必要な量を2回以上に分けてローヤルゼリーに作用させてもよい。また、パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素と他のタンパク質分解酵素を併用するように2種類以上のタンパク質分解酵素をローヤルゼリーに作用させる場合、それぞれのタンパク質分解酵素を同時にローヤルゼリーと作用させてもよく、別々に分けてローヤルゼリーと作用させてもよい。

50

【0019】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素と混合した後のローヤルゼリーの固形分濃度は、0.1~30W/W%を挙げることができ、好ましくは1~15W/W%、より好ましくは4~10W/W%を挙げることができる。ここで、例えば10W/W%は、100gのローヤルゼリーを凍結乾燥などにより乾燥させたとき10gの乾燥品が得られることを意味している。

【0020】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素によるローヤルゼリーの処理条件、例えば処理時間、pH、および温度などの条件は、目的とする血圧降下物質が産生される条件であれば特に限定されず、ローヤルゼリーの安定性およびパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素の安定性や反応性などを考慮して適宜設定することが可能である。高い血圧降下作用を有するローヤルゼリーを得るためには、ローヤルゼリーがパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素により実質的に完全消化されて血圧降下物質が十分に産生されることが好ましい。ここで、実質的に完全消化とは、ローヤルゼリーに含まれるタンパク質がタンパク質分解酵素により加水分解され、該酵素による加水分解がもはや実質的に生じない断片に加水分解されることをいう。このような条件は、パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を種々の条件でローヤルゼリーに作用させ、得られたローヤルゼリーの血圧降下作用、好ましくはACE阻害作用を公知方法で測定し、高い作用を得られる条件を選択することにより決定できる。

10

【0021】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素とローヤルゼリーを作用させる時間は、目的とする血圧降下物質が産生される時間であれば特に限定されないが、数時間~10日間、好ましくは10時間~24時間が好ましい。24時間以上反応させても血圧降下物質の産生は変化がなかった。

20

【0022】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素をローヤルゼリーに作用させる際のpHは、目的とする血圧降下物質が産生されるpHであれば特に限定されないが、pH3~11、好ましくはpH5~11、さらに好ましくはpH7~10が適当である。

【0023】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素をローヤルゼリーに作用させる際の温度は、血圧降下物質が産生される温度であれば特に限定されないが、30℃~80℃、好ましくは30℃~60℃が適当である。

30

【0024】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素をローヤルゼリーに反応させている間は静置であってもよく、さらに、振とう、攪拌などを行ってもよい。

【0025】

本発明のローヤルゼリーの製造においては、一般に、如上のパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を失活させる工程を含む。パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を失活させる方法は、食品として問題がない程度にパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を失活させればよい。失活の方法としては、加熱により失活する方法、薬剤を用いて失活する方法、ろ過によりパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を除く方法が例示でき、これら方法を単独で用いてもよいし、二種類以上を組み合わせてもよい。好ましくは、加熱によりパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を失活させる。加熱温度は60℃以上、好ましくは80℃以上、より好ましくは90℃以上で加熱することが適当である。さらに、食品の殺菌工程が必要な場合は、本パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を失活させる工程と兼ねてもよい。

40

【0026】

さらにパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素をローヤルゼリーに作用させる際にパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素の安定化剤や反応促進剤などを添加してもよい。

50

【0027】

パエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素を作用させることにより製造されるローヤルゼリーは、血圧降下作用、好ましくはACE阻害作用を有するローヤルゼリーである。本ローヤルゼリーはパエニバチルス ポリミキサ由来のタンパク質分解酵素により実質的に完全消化されたローヤルゼリーであることが好ましい。

【0028】

本発明のローヤルゼリーを各種クロマトグラフィーを用いて処理することにより、ACE阻害物質を精製してもよい。精製方法としてはゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、限外ろ過、電気泳動などを挙げることができる。これらは単独で若しくは組み合わせて精製に使用できる。

10

【0029】

ゲルろ過クロマトグラフィーは、種々な分子量のタンパク質を分離できるゲルろ過クロマトグラフィー用の担体があり、分子量が約1万以下のタンパク質を分離できるゲルろ過クロマトグラフィー用の担体が好ましい。イオン交換クロマトグラフィーに用いられているイオン交換基としては、陰イオン交換体、陽イオン交換体などがあり、陰イオン交換体としては、ジエチルアミノエチル基（DEAE基）、四級アミノエチル基（QAE）などを例示することができる。また、陽イオン交換体としては、カルボキシメチル（CM）基、スルホプロピル（SP）基を例示することができる。疎水クロマトグラフィーに用いられる担体としてはブチル基（Butyl基）、エチル基（Ethyl基）、フェニル基（Phenyl基）が結合した担体を例示することができる。逆相クロマトグラフィーに用いられる担体としてはオクタデシル基（C18）、オクタデシル基とはアルキル基の長さが異なるC30、C8、C4などが結合した担体が例示される。順相クロマトグラフィーに用いられる担体としてはシリカゲルのほか、シアノプロピル基、ジオール構造を有する官能基、アミノプロピル基、ポリアミンなどが結合した担体が例示される。

20

【0030】

本発明のローヤルゼリーは、上記のクロマトグラフィーなどを用いて精製を行なうことにより血圧降下剤として利用することができる。また、本発明の血圧降下性ローヤルゼリーまたはその精製品に各種成分を添加することによりローヤルゼリー組成物として供することができる。各種成分としては、例えば食品、糖、脂質、乳化剤、増粘剤、調味料、香料、酸味調整剤、保存料、果汁、香料、各種栄養成分などが挙げられ、本発明の効果を損なわない範囲で使用することができる。また、各種成分は単独で用いてもよいし二種以上を混合して用いてもよい。例えば糖としては、蔗糖、異性化糖、グルコース、フラクトース、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロースなどを例示することができる。乳化剤としては、蔗糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、レシチンなどを例示することができる。増粘剤としてはカラギーナン、アラビアガム、キサントガム、グァーガム、ペクチン、ローカストビーンガム増粘剤澱粉、ジェランガムなどを例示することができる。酸味調整剤としては、クエン酸、乳酸、リンゴ酸、フマル酸、グルコン酸、酒石酸などを例示することができる。保存料としては、安息香酸およびその塩、ソルビン酸およびその塩、パラベン、亜硫酸ナトリウム、ペクチン分解物、グリシンなどを例示することができる。果汁としては、トマト果汁、梅果汁、リンゴ果汁、レモン果汁、オレンジ果汁、ベリー系果汁などを例示することができる。香料としては、ハーブ、スパイスなどの香辛料、フルーツ系香料、バニラなどの香料などを例示することができる。このほか、好ましい他の栄養成分として、ビタミンDなどのビタミン類やカルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン、亜鉛などのミネラル類などが挙げられる。

30

40

【0031】

本発明のローヤルゼリー、ローヤルゼリー組成物または血圧降下剤はそれらを添加・配合して調製した食品として供することもできる。そのような食品の具体的形態としては、例えば、飲料類、菓子、キャンディ、ガム、パン、畜肉製品、乳製品、レトルト食品、即席食品、冷凍食品、ゼリー状食品、養蜂産品、漬物、調味料などを挙げることができる。

50

これらの食品は、いわゆる健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養機能食品、栄養補助食品、サプリメントなどとしても有用である。また、それらの食品としての形状としては、顆粒、粉末、タブレット、カプセル、チュアブル、ドリンク、ゼリー、ペースト、粒などを挙げることができる。

【0032】

以下、本発明の実施例について説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0033】

血圧降下作用を有するローヤルゼリーを得るための処理に適当なタンパク質分解酵素のスクリーニングを実施した。表1に試験に供したタンパク質分解酵素とその起源を示す。血圧降下作用はACE阻害活性を指標にして測定した。

【0034】

【表1】

No	タンパク質分解酵素	メーカー	起源
(1)	P6141-5G	シグマ	Paenibacillus polymyxa
(2)	モルシンF	天野エンザイム株式会社	Aspergillus phoenicis
(3)	プロテアーゼM「アマノ」G	天野エンザイム株式会社	Aspergillus oryzae
(4)	プロテアーゼP「アマノ」3G	天野エンザイム株式会社	Aspergillus melleus
(5)	ペプシン	天野エンザイム株式会社	Animal stomach

P6141-5G:シグマ社の商品コードを示す

【0035】

具体的にはまず、30W/W%のローヤルゼリー10gに約50mLの精製水を加えHClまたはNaOHを加えpHを調整後、精製水を加え60mLにし、ローヤルゼリー希釈液を調製した。表1に示すタンパク質分解酵素を添加し、40℃で14時間反応させた後、沸騰水中で30分加熱しタンパク質分解酵素を失活させ、放冷後、3,000rpmで10分間遠心分離を行い上清を得た。この上清のACE阻害活性を測定した。ACE阻害活性は下記に示す方法で行った。なおローヤルゼリー希釈液のpHは、表1の(1)および(4)に示すタンパク質分解酵素についてはpH7.0に、表1の(2)、(3)および(5)に示すタンパク質分解酵素についてはpH3.0に調整した。

【0036】

また、タンパク質分解酵素の添加量はP6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）をローヤルゼリー希釈液100mL当り594mg添加し、そのほかのタンパク質分解酵素は下記に示す「タンパク質分解酵素活性測定方法」に従って活性測定を行いP6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）と同じ活性（ΔA660）になるようにローヤルゼリー希釈液に添加した。

【0037】

〔ACE阻害活性測定方法〕

＜ホウ酸緩衝液の調製＞

50mM Na₂B₄O₇ 450mLと220mM H₃BO₃ 550mLを混合し、pH8.3のホウ酸緩衝液を調製した。

＜サンプルの調製＞

上清をホウ酸緩衝液（pH8.3）で10倍希釈しサンプルとした。

＜基質溶液の調製＞

約30mLのホウ酸緩衝液にBz-Gly-His-Leu・H₂O（分子量447.49 ペプチド研究所社製）170mg、NaCl 1.78gを溶解後、1N NaOHでpH8.3に調整し、ホウ酸緩衝液で50mLにメスアップして、基質溶液とした。

10

20

30

40

50

<ACE溶液の調製>

アンジオテンシン変換酵素（ウサギ肺由来、シグマ社製）をホウ酸緩衝液で溶解して60 mU/mLの溶液をACE溶液とした。

<ACE阻害活性の測定方法>

(1) 阻害活性の測定

サンプル30 μ Lと基質溶液250 μ Lを混合し、37℃で5分間放置した。5分間放置した後、ACE溶液を100 μ L添加し、37℃で30分間反応後、1N HClを250 μ L添加し、反応を停止させた。反応停止後1.5mLの酢酸エチルを添加し、激しく1分間攪拌した。次に3,000rpmで10分間遠心分離を行い上層の酢酸エチル層を0.5mL分取し、遠心エバポレーター（40℃、1.5時間）で蒸発乾固させた。蒸発乾固させたものに2mLの精製水を加え、溶解後、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をAとする。

10

(2) ブランクの測定

サンプル30 μ Lと基質溶液250 μ Lを混合し、37℃で35分間放置した。35分間放置した後、1N HCl 250 μ Lを添加し、その後ACE溶液を100 μ L添加した。さらに、1.5mLの酢酸エチルを添加し、激しく1分間攪拌した。次に3,000rpmで10分間遠心分離を行い上層の酢酸エチル層を0.5mL分取し、遠心エバポレーター（40℃、1.5時間）で蒸発乾固させた。蒸発乾固させたものに2mLの精製水を加え、溶解後、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をBとする。

(3) コントロールの測定

前記（1）阻害活性の測定でサンプルの代わりにホウ酸緩衝液を用いて同様に操作を行い、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をCとする。さらに、前記（2）ブランクの測定でサンプルの代わりにホウ酸緩衝液を用いて同様に操作を行い、228nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をDとする。

20

(4) 計算

下式によりACE阻害活性を求めた。

$$\text{ACE残存活性 (\%)} = (A - B) \times 100 / (C - D)$$

$$\text{ACE阻害活性 (\%)} = 100 - \text{ACE残存活性 (\%)}$$

【0038】

[タンパク質分解酵素活性測定方法]

(1) 基質溶液の調製

30

基質液Aの調製：75mLの100mM 乳酸緩衝液（pH3.0）に0.6gのカゼイン（ハマルステイン処方）を懸濁させ、沸騰水中で加熱溶解した。放冷後、pHを3.0に調整し、100mLにメスアップして、基質液Aとした。

基質液Bの調製：75mLの100mM ビスートリスプロパン緩衝液（pH7.0）に0.6gのカゼイン（ハマルステイン処方）を懸濁させ、沸騰水中で加熱溶解した。放冷後、pHを7.0に調整し、100mLにメスアップして、基質液Bとした。

なお、表1に示す（2）、（3）および（5）のタンパク質分解酵素活性測定には基質液Aを使用し、表1に示す（1）および（4）のタンパク質分解酵素活性測定には基質液Bを使用した。さらに、タンパク質分解酵素活性が高く希釈が必要な場合は表1に示す（2）、（3）および（5）のタンパク質分解酵素活性測定には100mM 乳酸緩衝液（pH3.0）を使用し、表1に示す（1）および（4）のタンパク質分解酵素活性測定には100mM ビスートリスプロパン緩衝液（pH7.0）を使用し希釈した。

40

(2) タンパク質分解酵素活性の測定

2mLの基質溶液を40℃で5分間放置した後、サンプル液を0.4mL添加し、40℃で30分間反応後、0.44M トリクロロ酢酸溶液を2mL添加し、反応を停止させた。反応停止後10分間室温に放置して、No2のろ紙（アドバンテック東洋）でろ過を行った。ろ液0.5mLに0.55M Na_2CO_3 溶液1.25mLおよび精製水で3倍希釈したフェノール試薬0.25mLを添加し、37℃で30分間放置後660nmにおける吸光度を測定した。このときの吸光度をAとする。

(3) ブランクの測定

0.44M トリクロロ酢酸溶液を2mL添加後にサンプル液0.4mLを加えた以外は上記（2）タ

50

ンパク質分解酵素活性の測定と同様に行った。このときの660nmにおける吸光度をBとする。

(4) 計算

下式により $\Delta A660$ を求めた。下式中、Dは希釈率を意味する。

$$\Delta A660 = (A - B) \times D$$

【0039】

表2に、各タンパク質分解酵素で処理したローヤルゼリーのACE阻害活性を示した。試験したタンパク質分解酵素のうち、P6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）処理ローヤルゼリーの凍結乾燥品の方が良好なACE阻害活性を示した。

【0040】

【表2】

No	タンパク質分解酵素	ACE阻害活性(%)
(1)	P6141-5G	73
(2)	モルシンF	58
(3)	プロテアーゼM「アマノ」G	57
(4)	プロテアーゼP「アマノ」3G	38
(5)	ペプシン	33

P6141-5G:シグマ社の商品コードを示す

【0041】

なお、P6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）をローヤルゼリー希釈液100mL当たり594mg添加したもののタンパク質分解酵素活性は、100mM ビスートリスプロパン緩衝液（pH7.0）で100倍希釈したときの「A-B」の値は0.25であった（ $\Delta A660 = 25$ ）。

【実施例2】

【0042】

P6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）とプロテアーゼN「アマノ」G（天野エンザイム株式会社社製、Bacillus subtilis由来）のIC50の比較を行った。

【0043】

30W/W%のローヤルゼリー10gに約50mLの精製水を加えHClまたはNaOHを加えpH7.0に調整後、精製水を加え60mLにし、ローヤルゼリー希釈液を調製した。P6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）をローヤルゼリー希釈液100mL当たり594mg添加し、40℃で14時間反応させた後、沸騰水中で30分加熱しタンパク質分解酵素を失活させ、放冷後、凍結乾燥を行い、凍結乾燥品を得た。プロテアーゼN「アマノ」Gについても実施例1に示す「タンパク質分解酵素活性測定方法」に従いタンパク質分解酵素活性の測定を行いローヤルゼリー希釈液に添加するタンパク質分解酵素活性（ $\Delta A660$ ）を同じにし、P6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）と同様に操作を行い、凍結乾燥品を調製した。なお、プロテアーゼN「アマノ」Gは「タンパク質分解酵素活性測定方法」に示す基質液Bを用いて活性測定を行った。

【0044】

凍結乾燥品をホウ酸緩衝液で溶解し、IC50を測定した。IC50の測定は実施例1の「ACE阻害活性測定方法」に従って行った。

【0045】

結果を表3に示す。表3に示すようにP6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）処理ローヤルゼリーの凍結乾燥品の方がIC50の値が低く、ACEの阻害活性が高い結果が得られた。なお、表3に示すIC50はサンプルの濃度を示す。

【0046】

【表 3】

タンパク質分解酵素	IC50(mg/mL)
P6141-5G	2.5
プロテアーゼ N「アマノ」G	4.0

P6141-5G:シグマ社の商品コードを示す

【実施例 3】

【0047】

10

実施例2で得られたP6141-5G（パエニバチルス ポリミキサ由来）処理ローヤルゼリーの凍結乾燥品を単回投与血圧降下薬効試験に供した。自然発症高血圧ラット（SHR）を3週間予備飼育後、14週齢のSHR（一群6匹、雄）に、前記凍結乾燥品を2.5mg/mLになるように精製水で懸濁したものを、体重1kg当り10mL経口投与した（25mg/kg）。その結果、投与後6時間後の凍結乾燥品投与群の血圧の平均は181mmHgであった。一方、対象群の血圧の平均は208mmHgであり、凍結乾燥品を経口投与することにより有意（ $p<0.05$ ）に血圧降下作用を示した。なお、対象群は精製水を10mL投与した。

【産業上の利用可能性】

【0048】

20

本発明によって得られる血圧降下作用を有するローヤルゼリーは、ローヤルゼリー組成物または血圧降下剤として飲食物などに好適に使用することができ、特に健康食品などに好適に使用することができる。

フロントページの続き

- (72)発明者 永松 剛
熊本県上益城郡甲佐町田口2 1 7 0 番地 森川健康堂株式会社内
- (72)発明者 許 昌国
熊本県上益城郡甲佐町田口2 1 7 0 番地 森川健康堂株式会社内
- (72)発明者 坂平 光
熊本県上益城郡甲佐町田口2 1 7 0 番地 森川健康堂株式会社内
- Fターム(参考) 4B018 LB01 LB08 LB10 MD76 ME04 MF12
4B041 LC10 LD06 LK13 LK14 LK44
4C087 AA01 AA02 AA03 BB22 BB70 CA06 NA14 ZA42 ZC20