

(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2014-12659
(P2014-12659A)**

(43) 公開日 平成26年1月23日(2014.1.23)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 31/765 (2006.01)	A 61 K 31/765	4 C 086
A61K 36/18 (2006.01)	A 61 K 35/78	C 4 C 088
A61K 36/00 (2006.01)	A 61 K 35/78	X
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 O 5
A61P 21/00 (2006.01)	A 61 P 21/00	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2013-114288 (P2013-114288)	(71) 出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1 0号
(22) 出願日	平成25年5月30日 (2013.5.30)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(31) 優先権主張番号	特願2012-131036 (P2012-131036)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(32) 優先日	平成24年6月8日 (2012.6.8)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ミオスタチン／S m a d シグナル阻害剤

(57) 【要約】

【課題】ミオスタチン / S m a d シグナル阻害剤の提供。

【解決手段】プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を有効成分とするミオスタチン / S m a d シグナル阻害剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を有効成分とするミオスタチン / Smadシグナル阻害剤。

【請求項 2】

発酵茶抽出物中の高分子ポリフェノールとカフェインとの質量比率が15：2以上である、請求項1記載のミオスタチン / Smadシグナル阻害剤。

【請求項 3】

発酵茶抽出物が、発酵茶葉の水溶出液と親水性ビニルポリマーを材質とする吸着剤を混合した後、吸着剤の非吸着成分を除去してから、水を含んでいてもよいエタノールを用いて吸着剤の吸着成分を溶出させることにより得られる請求項1記載のミオスタチン / Smadシグナル阻害剤。

【請求項 4】

水を含んでいてもよいエタノールがエタノール濃度40%以上の含水エタノールである請求項3記載のミオスタチン / Smadシグナル阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミオスタチン / Smadシグナル阻害剤に関する。

10

【背景技術】

【0002】

近年、交通手段の発達や情報・通信技術の発展に伴い、運動が不足している。運動不足による筋量・筋力の低下は、運動機能の低下の原因となり、特に高齢者にとっては、加齢による筋変化と相俟って、その後の生活の質(QOL)に重大な悪影響をもたらすと考えられる。筋委縮、筋量・筋力の低下を起因とする日常動作中の転倒、及びそれに伴う骨折等は高齢者における主要な寝たきりの原因である。

一般的に、筋委縮、筋量・筋力の低下を防ぐ手段としては、適度な運動を実践する、或いはリハビリテーションを実践する等がある。しかし、時間的・物理的理由、モチベーションの維持の困難さ等から現実的には難しく、より効果的な方法が望まれている。

20

【0003】

斯かる観点から、栄養学的アプローチにより運動機能を調節し得る成分の探索が行われ、例えば、プロアントシアニジンを有効成分とする筋萎縮抑制剤(特許文献1)、果実由来のポリフェノールを有効成分とする筋張力増強剤及び体脂肪調整剤(特許文献2)等が提案されている。

【0004】

一方、ミオスタチンは、形質転換成長因子- β (TGF- β)スーパーファミリーに属し、筋肉成長を負に調節することにおいて役割を果たしていると考えられている。ミオスタチンは、筋芽細胞の増殖及び分化を阻害すること(非特許文献1)、サテライト細胞の増殖を抑制し、サテライト細胞を休止状態としていること(非特許文献2)等が明らかにされている。また、ミオスタチン欠損マウスでは正常なマウスよりも筋線維の過形成及び肥大のために骨格筋量が約2倍に増大すること(非特許文献3)、さらに、ミオスタチンの内因性阻害剤であるフォリスタリンの過剰発現マウスで筋量増加が認められること(非特許文献4)が報告されている。

30

【0005】

ミオスタチンの活性は、ミオスタチンが、アクチビンII型受容体(ActRII)に結合し、さらにI型受容体(ALK4又はALK5)のリン酸化を引き起こすことで、細胞内シグナルカスケードが働き、リン酸化されたI型受容体は細胞内のSmad2、3をリン酸化し、リン酸化されたSmad2、3はヘテロダイマーを形成し、さらにSmad4との複合体を形成することで核内へと移行可能となり、標的遺伝子上流のSBE(Sm

40

50

ad binding element)に結合して、転写を開始することにより起こることが知られている(非特許文献5)。

したがって、当該ミオスタチンシグナル経路の何れかの段階を阻害すること、例えば、ミオスタチンのAkt RIIへの結合を阻害すること、Smadタンパク質を不活性化すること等によってミオスタチンの活性を阻害することで、未分化の幹細胞であるサテライト細胞の活性を高めて筋肉の肥大・再生を促し、筋力の向上、筋量の調節・増加、筋萎縮の予防又は改善等が期待できると考えられている。

【0006】

一方、ウーロン茶や紅茶などの発酵茶には、その製造過程(発酵、熟成や乾燥など)でカテキン類が高度に重合して生成する高分子ポリフェノールが含まれることが報告され、このうち、プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000~18000である高分子ポリフェノールには、脂肪肝の予防・治療(特許文献3)、異常型プリオントンパク質の形成抑制(特許文献4)に有用であることが報告されている。また最近、当該高分子ポリフェノールに筋肉の遅筋化を促進する作用があり、持久力の増強や疲労回復に有用であることが報告されている(特許文献5)。さらに当該高分子ポリフェノールを簡便に調製する方法が報告されている(特許文献6)。

しかしながら、当該高分子ポリフェノールに、ミオスタチン/Smadシグナル阻害作用があることはこれまでに知られていない。

尚、特許文献5では、持久性運動と組み合わせたときの骨格筋の筋線維タイプの変化(IIbからIIaへの移行、遅筋化)促進が検討されているが、当該作用は、AMPキナーゼの活性化などに基づくPGC-1の発現促進などにより、筋肉の遅筋化を促進する作用を有するものであり、これと加齢等に伴う速筋線維タイプの筋委縮や筋力の低下とは何ら関係するものではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2002-338464号公報

【特許文献2】国際公開第2005/074962号パンフレット

【特許文献3】特開2007-320958号公報

【特許文献4】特開2009-29752号公報

【特許文献5】特開2010-37323号公報

【特許文献6】特開2012-5413号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Thomas et al., J Biol Chem 2000 275: 40235-40243

【非特許文献2】McCroskery S et al., J Cell Biol. 2003 162: 1135-1147

【非特許文献3】McPherron AC et al., NATURE 1997 387: 83-90

【非特許文献4】Gioson H et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 2009 297: E157-E164

【非特許文献5】Joulia-Ekaza D et al., Curr Opin Pharmacol. 2007 7: 310-5

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、ミオスタチン/Smadシグナル阻害剤を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0010】

本発明者は、ミオスタチンの細胞内シグナル伝達（ミオスタチン / Smad シグナル）を阻害する物質について鋭意研究を重ねた結果、特定の高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物に優れたミオスタチン / Smad シグナル阻害作用があることを見出した。

【0011】

すなわち、本発明は、プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を有効成分とするミオスタチン / Smad シグナル阻害剤に係るものである。

【発明の効果】

10

【0012】

本発明のミオスタチン / Smad シグナル阻害剤等は、細胞におけるミオスタチンのシグナル伝達を阻害することから、筋力向上、筋萎縮の抑制等の効果を発揮し得る医薬品、医薬部外品、食品等として、或いはこれらへ配合するための素材又は製剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明発酵茶抽出物のミオスタチン / Smad シグナル依存的な転写活性（ルシフェラーゼ活性）を示す図。

20

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書において「ミオスタチン / Smad シグナル」とは、AktRII、Smadタンパク質が関与するミオスタチンの細胞内シグナル伝達経路であり、「ミオスタチン / Smad シグナル阻害」とは、例えば、ミオスタチンのAktRIIへの結合阻害、Smadタンパク質の不活性化等により当該シグナル伝達のいずれかを減少、調節或いは阻害することを意味する。これにより細胞におけるミオスタチンの活性を抑制することができる。「ミオスタチン / Smad シグナル阻害作用」は、後記実施例に示すように、Smad複合体のSBEへの結合、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を判別することにより評価することができる。

【0015】

30

本明細書において、「筋力向上」とは、筋収縮力が増強することを意味する。

また、「筋萎縮」とは、筋蛋白の分解速度が合成速度を上回ることにより筋細胞が縮小し、筋量が低下することをいい、長期間の安静臥床や骨折等によるギプス固定、あるいは微小重力暴露によるもの（廃用性筋萎縮という）と筋萎縮性側索硬化症（ALS）等の疾患による進行性筋萎縮に大別される。さらに、加齢に伴っても筋萎縮と同様の症状が起きることがあり、これは加齢性筋減弱症（サルコペニア）と呼ばれている。したがって「筋萎縮の抑制」とは、不活動や加齢、疾病等による筋量の低下を抑制することをいう。

【0016】

本発明の発酵茶抽出物は、プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有するものである。

40

斯かる高分子ポリフェノールは、発酵茶の製造過程（発酵、熟成や乾燥など）でカテキン類が高度に重合することで生成すると考えられる。

【0017】

ここで、発酵茶とは、茶葉の発酵を進行させてなる茶を意味し、その具体例としては、半発酵茶であるウーロン茶や発酵茶である紅茶などが挙げられる。

【0018】

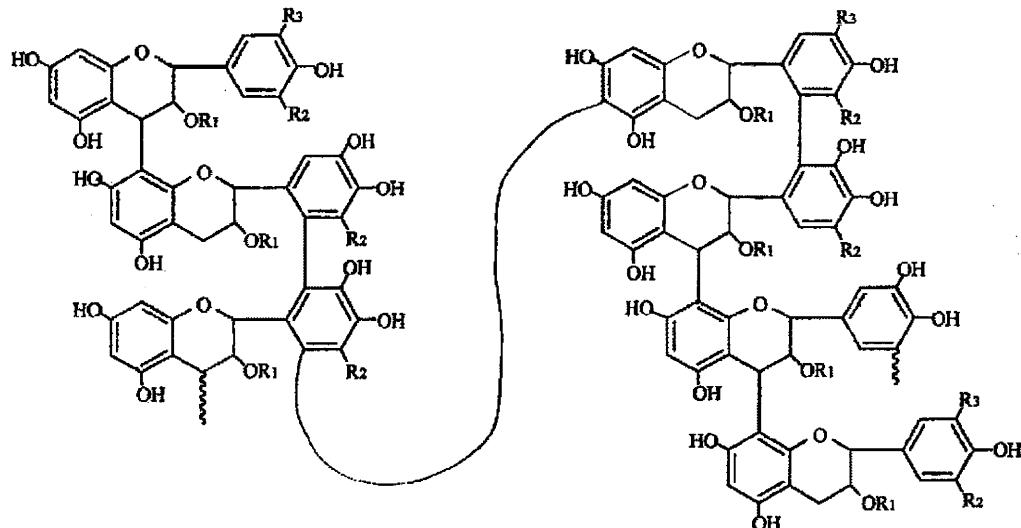
プロシアニジン構造とは、カテキン類のC環と他のカテキン類のA環が結合した構造である。発酵茶から抽出される高分子ポリフェノールは、プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造の他に、カテキン類のB環と他のカテキン類のA環が結合し

50

た構造などを含んでいてもよい。発酵茶から抽出される高分子ポリフェノールが有する部分構造の具体例としては以下に示すものが挙げられる。なお、以下に示す部分構造はあくまで例示に過ぎず、発酵茶から抽出される高分子ポリフェノールは、ベンゾトロポロン、ベンゾキノン、ナフトキノンなどを含む部分構造をはじめとする多種多様の部分構造を有するものと考えられる。

【0019】

【化1】



10

20

【0020】

当該高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物は、(1)発酵茶葉の水溶出液と吸着剤を混合する工程と、(2)吸着剤の非吸着成分を除去する工程と、(3)水を含んでいてもよいエタノールを用いて吸着剤の吸着成分を溶出させる工程により得ることができる。

上記工程(1)において、発酵茶葉の水溶出液は、例えば50以上の温水ないし熱水、または沸騰水に発酵茶葉を投入することで得られる、発酵茶葉に含まれる高分子ポリフェノールをはじめとする水溶性成分を含む水溶液であることが望ましい。

また、吸着剤としては、高分子ポリフェノールを吸着するものであれば特に限定されないが、親水性ビニルポリマーが好ましく、メタクリレート共重合体がより好ましく、グリシジルメタクリレートとエチレングリコールジメタクリレートとの共重合体がさらに好ましい。具体的には、例えば親水性ビニルポリマー樹脂(東ソー社製「トヨパールHW-40」)を挙げることができる。

この工程は、例えば、発酵茶葉の水溶出液を満たした容器に吸着剤を添加して攪拌する態様(攪拌時間は例えば5秒間~1時間とすればよい)で行ってもよいし、吸着剤を充填したカラムに発酵茶葉の水溶出液をアプライする態様で行ってもよい。なお、発酵茶葉の水溶出液と吸着剤との混合割合は、例えば1:0.1~1:5(容積比)とすればよい。

【0021】

上記工程(2)は、(1)の工程を発酵茶葉の水溶出液を満たした容器に吸着剤を添加して攪拌する態様で行った場合、例えば吸着剤を濾紙上に濾取した後、十分量の水を用いて吸着剤を洗浄することで行えばよい。また、(1)の工程を吸着剤を充填したカラムに発酵茶葉の水溶出液をアプライする態様で行った場合、十分量の水をカラムに流してカラム内の吸着剤を洗浄することで行えばよい。

【0022】

上記工程(3)において、水を含んでいてもよいエタノールとして、含水エタノールを用いる場合、そのエタノール濃度は、高分子ポリフェノールの溶出効率の点から、40容量%以上、60容量%以上が好ましく、90以下、80以下が好ましい。また、60~8

30

40

50

0容量%がより好ましく、80容量%がより好ましい。

なお、この工程は、(1)の工程を発酵茶葉の水溶出液を満たした容器に吸着剤を添加して攪拌する態様で行った場合、(2)の工程で洗浄した吸着剤に対して溶出溶媒を添加することで行えればよい。また、(1)の工程を吸着剤を充填したカラムに発酵茶葉の水溶出液をアプライする態様で行った場合、(2)の工程で洗浄したカラムに溶出溶媒を流すことで行えればよい。

【0023】

以上の工程により得られた発酵茶抽出物について、エタノールを例えれば減圧濃縮を行って除去した後、凍結乾燥や噴霧乾燥を行えば、発酵茶抽出物を粉末状物として得ることができる(粉碎操作は要しない)。また、凍結乾燥や噴霧乾燥のかわりに減圧濃縮を行えば、発酵茶抽出物を液状濃縮物として得ることができる。その高分子ポリフェノールの含量は概ね7.5重量%以上であり(上限は概ね30重量%)、それ以外の成分としてはフラボノイド系化合物が主体を占め(50重量%以上)、その他にカテキン類やテアフラビン類が含まれる。尚、この発酵茶抽出物にはカフェインがほとんど含まれていないので(1重量%以下)、カフェインの副作用が殆ど無いという特徴が挙げられる。

斯かる観点から、本発明の発酵茶抽出物においては、高分子ポリフェノールとカフェインとの質量比が15:2以上であることが好ましい。

【0024】

後記実施例で示すとおり、本発明の発酵茶抽出物は、ミオスタチン/Smadシグナルに着目した、SBEを利用したレポータージーンアッセイ系において優れたミオスタチン/Smadシグナル阻害作用を示した(実施例1)。すなわち、本発明の発酵茶抽出物は、ミオスタチンシグナル経路の何れかの段階を抑制することによりミオスタチンの活性を阻害する。これにより、サテライト細胞の活性が高められ、筋肉の肥大・再生を促し、筋力の向上、筋量の調節・増加、筋萎縮の予防又は改善等が期待できると考えられる。

したがって、本発明の発酵茶抽出物は、ミオスタチン/Smadシグナルの阻害のために使用することができる。当該使用は、ヒト若しくは非ヒト動物、又はそれらに由来する検体における使用であり得、また治療的使用であっても非治療的使用であってもよい。ここで、「非治療的」とは、医療行為、すなわち治療による人体への処理行為を含まない概念である。

【0025】

また、本発明の発酵茶抽出物は、ミオスタチン/Smadシグナル阻害剤として使用することができ、さらにこれらの剤を製造するために使用することができる。このとき、当該ミオスタチン/Smadシグナル阻害剤等には、本発明の発酵茶抽出物を単独で、又はこれ以外に、必要に応じて適宜選択した担体等の、配合すべき後述の対象物において許容されるものを使用してもよい。なお、当該製剤は配合すべき対象物に応じて常法により製造することができる。

【0026】

当該ミオスタチン/Smadシグナル阻害剤は、それ自体、ミオスタチン/Smadシグナルの阻害効果を発揮する、ヒト若しくは動物用の医薬品、医薬部外品、食品又は飼料であってもよく、又は当該医薬品、医薬部外品等に配合して使用される素材又は製剤であってもよい。食品としては、ミオスタチン/Smadシグナルの阻害、筋力の向上、筋萎縮の抑制等の生理機能をコンセプトとし、必要に応じてその旨を表示した飲食品、機能性飲食品、病者用飲食品、特定保健用食品等を包含する。

【0027】

上記医薬品(医薬部外品も含む)の剤形は、例えば注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、各種外用剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等の何れでもよく、投与形態も、経口投与(内用)、非経口投与(外用、注射)の何れであってもよい。

このような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、本発明の発酵茶抽出物を単独で、又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嗜味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を適宜組み合わせて用いる

10

20

30

40

50

ことができる。

【0028】

これらの投与形態のうち、好ましい形態は経口投与であり、製剤中の本発明の発酵茶抽出物の含有量は、一般的に0.00001~10質量%とするのが好ましく、0.0001~1質量%とするのがより好ましい。

【0029】

上記食品の形態は、固体、半固体又は液状であり得、例えば、パン類、ケーキ類、麺類、菓子類、ゼリー類、冷凍食品、アイスクリーム類、乳製品、飲料等の各種食品の他、上述した経口投与製剤と同様の形態（錠剤、カプセル剤、シロップ等）が挙げられる。

種々の形態の食品を調製するには、本発明の発酵茶抽出物を単独で、又は他の食品材料や、溶剤、軟化剤、油、乳化剤、防腐剤、香料、安定剤、着色剤、酸化防止剤、保湿剤、増粘剤等を適宜組み合わせて用いることができる。当該食品中の本発明の発酵茶抽出物の含有量（抽出物の乾燥物換算）は、一般的に0.01~100質量%とするのが好ましく、0.1~100質量%とするのがより好ましく、更に好ましくは1~100質量%とするのが好ましい。

【0030】

また、上記飼料としては、例えば牛、豚、鶏、羊、馬等に用いる家畜用飼料、ウサギ、ラット、マウス等に用いる小動物用飼料、マグロ、ウナギ、タイ、ハマチ等に用いる魚介類用飼料、犬、猫、小鳥、リス等に用いるペットフード等が挙げられる。

尚、飼料を製造する場合には、本発明の発酵茶抽出物の他に、牛、豚、羊等の肉類、蛋白質、穀物類、ぬか類、粕類、糖類、野菜、ビタミン類、ミネラル類等一般に用いられる飼料原料、更に一般的に飼料に使用されるゲル化剤、保型剤、pH調整剤、調味料、防腐剤、栄養補強剤等を組み合わせて用いることができる。

また、飼料中の、本発明の発酵茶抽出物の含有量は、その使用形態により異なるが、通常0.0001~20質量%であり、0.001~10質量%が好ましく、0.01~5質量%がより好ましい。

【0031】

本発明のミオスタチン/Smadシグナル阻害剤の投与量又は摂取量は、対象者の状態、体重、性別、年齢又はその他の要因に従って変動し得るが、経口投与又は摂取の場合成人1人当たり、本発明の発酵茶抽出物として、1日あたり0.01mg~100mg/kgとすることが好ましく、更に0.1mg~10mg/kgとするのが好ましい。また、上記製剤は、任意の投与計画に従って投与又は摂取され得るが、1日1回~数回に分けて投与又は摂取することが好ましい。

【0032】

投与又は摂取対象者としては、それを必要としている者であれば特に限定されないが、本発明のミオスタチン/Smadシグナル阻害剤はミオスタチン/Smadシグナルの阻害及び筋力の向上を図ることができることから、特に、運動愛好者やアスリート、ロコモティブシンドローム発症者、加齢性筋減弱症（サルコペニア）者、神経・筋疾患（炎症性筋疾患、内科的疾患に伴うミオパシー、筋ジストロフィー、先天性ミオパシー、ミトコンドリア脳筋症、糖原病等）者、運動不足者、ベッドレスト者、外科的/内科的疾患後のリハビリトレーニング者における投与又は摂取が有効である。

【0033】

上述した実施形態に関し、本発明においては以下の態様が開示される。

<1> プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000~18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を有効成分とするミオスタチン/Smadシグナル阻害剤。

<2> プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000~18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を有効成分とする筋力向上剤。

<3> ミオスタチン/Smadシグナル阻害剤を製造するための、プロシアニジン構造と

10

20

30

40

50

、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物の使用。

<4>筋力向上剤を製造するための、プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物の使用。

<5>ミオスタチン/Smadシグナル阻害に使用するための、プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物。

<6>筋力向上に使用するための、プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物。
10

<7>プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を投与又は摂取するミオスタチン/Smadシグナル阻害方法。

<8>プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を投与又は摂取する筋力向上方法。

<9>プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を投与又は摂取するミオスタチン/Smadシグナルの非治療的阻害方法。
20

<10>プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を投与又は摂取する非治療的筋力向上方法。

<11>プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を有効成分とする食品を用いたミオスタチン/Smadシグナルの非治療的阻害方法。

<12>プロシアニジン構造と、カテキン類のB環同士が結合した構造を部分構造中に少なくとも含み、数平均分子量が9000～18000である高分子ポリフェノールを含有する発酵茶抽出物を有効成分とする食品を用いた非治療的筋力向上方法。
30

<13>前記<1>～<12>において、発酵茶抽出物中の高分子ポリフェノールとカフェインとの質量比率は、好ましくは15：2以上である。

<14>前記<1>～<12>において、発酵茶抽出物は、発酵茶葉の水溶出液と親水性ビニルポリマーを材質とする吸着剤を混合した後、吸着剤の非吸着成分を除去してから、水を含んでいてもよいエタノールを用いて吸着剤の吸着成分を溶出させることにより得られるものである。

<15>前記<14>において、水を含んでいてもよいエタノールは、好適にはエタノール濃度40%以上の含水エタノールである。

<16>前記<14>において、親水性ビニルポリマーは、好適にはメタクリレート共重合体、より好適にはグリシジルメタクリレートとエチレングリコールジメタクリレートとの共重合体である。
40

【実施例】

【0034】

製造例1 [発酵茶抽出物の調製と高分子ポリフェノールの分析]

(A) 発酵茶抽出物の調製

特開2012-5413号公報記載の調製方法及び分析を行った。

市販の紅茶（デイリークラブ：三井農林の商品名）30gを弱く沸騰させた水1Lに投入し、約1分間そのままの状態を保ち、さらに時々攪拌しながら10分間保つことで、紅茶に含まれる水溶性成分の抽出を行った。その後、ブナーロートにNo.2濾紙（アド

パンテック) 2枚を敷いて吸引濾過を行って濾液(紅茶の水溶出液)を得た。この濾液に、親水性ビニルポリマーを材質とする吸着剤として水で予め洗浄した東ソー株式会社のトヨパールHW-40F(製品名、粒子径:30μm~60μm)250mLを加えて1分間攪拌した後、ブナーロートにNo.2濾紙(アドバンテック)1枚を敷いて吸引濾過を行い、濾紙上に吸着剤を濾取し、濾紙上の吸着剤を1回につき水150mLを用いて10回洗浄した。次に、濾紙上の吸着剤に対して150mLのエタノール濃度が80%の含水エタノールを添加して吸着剤の吸着成分を溶出させる操作を12回行った。12回分の吸着剤の吸着成分の溶出液を50で減圧濃縮を行ってエタノールを除去した後、凍結乾燥を行うことで、紅茶由来の高分子ポリフェノールを含有する抽出物2.96gを茶褐色粉末として得た。この紅茶由来の抽出物に含まれる成分の含量を以下の方法によって定量した。

10

【0035】

(B) 高分子ポリフェノールの分析

(ア) 分析装置: 中圧ポンプ(S P 1 1、東京理化器械)2台、トヨパールHW-40Fを充てんした中圧液体クロマト用カラム(1×30cm)、試料注入器(I n j e c t o r V I、東京理化器械)、フラクションコレクター(C H F 1 6 1 R A、アドバンテック)を用い、溶媒の直線的濃度勾配が可能な装置を組み立てた。

(イ) 展開溶媒: A溶媒としてアセトン濃度が20%の含水アセトン90mL、B溶媒としてアセトン濃度が50%の含水アセトン90mLを用い、流速を1.5g/4分とし、A溶媒とB溶媒の割合を100:0から0:100に直線的に変化させた。

20

(ウ) 試料注入: サンプル40mgをアセトン濃度が20%の含水アセトン2mLに溶解して行った。

20

(エ) 分画: 溶出液をフラクションコレクターで1.5gずつ分取した(フラクション総数:115)。溶出液の350nmの吸光度の測定結果をもとに溶出曲線を描き、これに従って分画した。各画分を50で減圧濃縮してアセトンを除去した後、凍結乾燥を行ってから秤量し、その重さから画分を構成する成分のサンプル中の割合を求めた。

【0036】

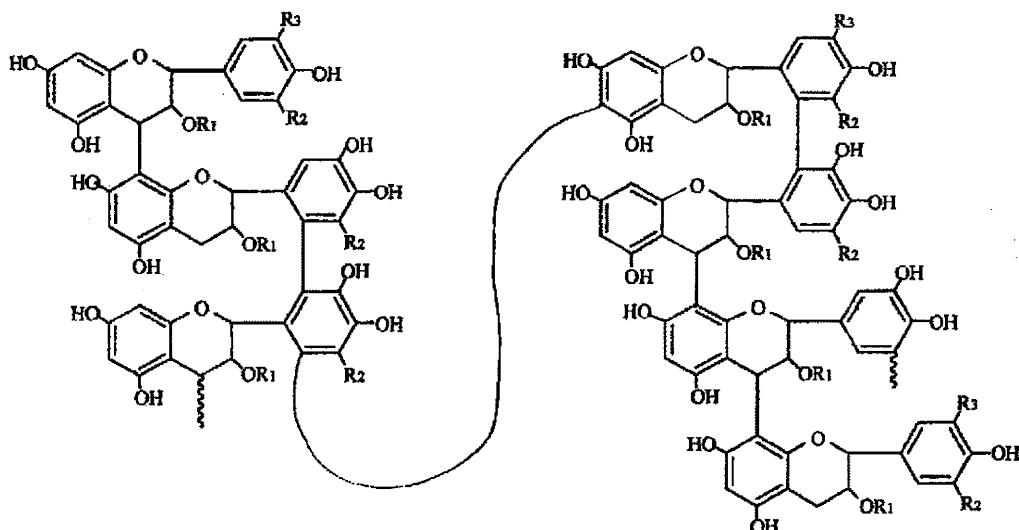
(C) 分析結果

目的とする高分子ポリフェノールは、フラクションNo.75~110の画分として得られ、サンプルに含まれるその含量は25.6重量%であった。なお、この画分が目的とする高分子ポリフェノールであることは、特開2007-320958号公報に記載の方法による平均分子量の測定結果(数平均分子量:1.36×10⁴、重量平均分子量:1.58×10⁴)と構造解析の結果に基づいて確認した(以下に示す部分構造を有する)。ラボノイド系化合物は、フラクションNo.20~74の画分として得られ、サンプルに含まれるその含量は60.6重量%であった。

30

【0037】

【化2】



$R_1 = H \text{ or Galloyl}$, $R_2 = R_3 = H \text{ or OH}$

【0038】

(D) その他成分の分析

サンプルを精密に秤量し、アセトニトリル濃度が10%の含水アセトニトリルの一定量に溶解して調製した分析試料を用いて分析を行った。

(ア) 分析装置：島津製作所のLC-10Aシステム（ポンプLC-10AD、カラムオーブンCTO-10A、検出器SPD-M10AVP）を用いた。カラムはInertisil ODS-3、 $4.6 \times 250 \text{ mm}$ 、粒子径 $5 \mu\text{m}$ （ジーエルサイエンス）を用いた。

(イ) 分析条件：分析試料の注入量は $4.0 \mu\text{L}$ とし、流速は $0.7 \text{ mL}/\text{分}$ とした。カラム温度は 40°C とした。

(ウ) 展開溶媒：A溶媒としてアセトニトリル濃度が5%の含水アセトニトリル（0.02%TFA含有）、B溶媒としてアセトニトリル濃度が40%の含水アセトニトリル（0.02%TFA含有）を用い、A溶媒とB溶媒の割合を70分間で100:0から0:100に直線的に変化させた。

(エ) 検出： 280 nm と 375 nm を検出波長とし、標準物質のエリア数と分析試料のエリア数から、サンプルに含まれる成分のサンプル中の割合を求めた。

(オ) 結果：サンプルには、カテキン類（エピガロカテキン：3.5重量%、エピガロカテキンガレート：3.8重量%）やテアフラビン類（テアフラビン1:1.1重量%、テアフラビン2ab:1.2重量%、テアフラビン3:3.8重量%）が含まれていることがわかった。サンプルに含まれるカフェインの含量は0.38重量%であった。

【0039】

(E) その他成分の分析結果

以上の結果から、上述の調製方法で得られた紅茶由来の抽出物は、その約1/4が高分子ポリフェノールから構成されていることがわかった。また、この抽出物のカフェインの含量は1重量%以下であったことから、上述の調製方法にて、紅茶由来の高分子ポリフェノールを高含量で含み、しかも脱カフェイン化された抽出物を、水とエタノールだけを用いて簡易に調製することができる方法であることがわかった。

【0040】

また紅茶のかわりにウーロン茶を用いる方法、またはエタノール濃度が80%の含水エタノールのかわりにエタノール濃度が40%の含水エタノールを用いる方法においても同様の高分子ポリフェノールが得られることを確認した。

【0041】

実施例1 [ミオスタチン / Smadシグナル阻害活性試験]

10

20

30

40

50

H E K 2 9 3 細胞を 9 6 穴プレートに播種し、D M E M (1 0 % F B S) 中で一晩培養した。C i g n a l TM R e p o r t e r A s s a y K i t s (S A B i o s c i e n c e s 社製) に含まれる C i g n a l R e p o r t e r p l a s m i d (ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に S m a d B i n d i n g E l e m e n t をつないだレポータープラスミドと内部標準用ウミシイタケルシフェラーゼが 4 0 : 1 の比率で混合されたもの) を、トランスフェクション試薬 (L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 ; I n v i t r o g e n) を用いて細胞に導入した。

その 6 時間後に被験物質として、製造例 1 で調製された発酵茶抽出物を終濃度 0 . 0 0 1 (w / v) % 、 0 . 0 0 2 (w / v) % でそれぞれ含む D M E M (0 . 2 % F B S) へと培地交換を行い、さらに 2 時間後に M y o s t a t i n (0 . 0 5 μ g / m l) を含む D M E M (0 . 2 % F B S) を加え、一晩培養した。翌日、D u a l - G l o (登録商標) L u c i f e r a s e R e p o r t e r A s s a y S y s t e m (P r o m e g a) を用い、ルミノメーターにてホタル及びウミシイタケルシフェラーゼ活性を各々測定した。コントロール (C N T) として高分子ポリフェノールの代わりに 2 0 (v / v) % エタノールを用いた。結果を図 1 に示す。
10

【 0 0 4 2 】

M y o s t a t i n / S m a d シグナル依存的な転写活性 (ルシフェラーゼ活性) は以下のように定義した。

M y o s t a t i n / S m a d シグナル依存的な転写活性 (ルシフェラーゼ活性) = (ホタルルシフェラーゼ活性) / (ウミシイタケルシフェラーゼ活性)
20

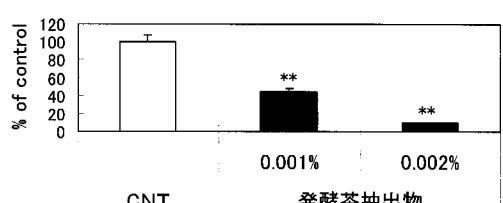
ミオスタチン / S m a d シグナル阻害活性試験の結果は、M y o s t a t i n 非刺激のルシフェラーゼ活性を 0 % 、 M y o s t a t i n 刺激によるルシフェラーゼ活性を 1 0 0 % とした際の転写活性化率を、 % 表示した。

【 0 0 4 3 】

図 1 に示すように、発酵茶抽出物によりミオスタチン / S m a d シグナル依存的な転写活性 (ルシフェラーゼ活性) が濃度依存的に抑制され、当該発酵茶抽出物は、有意なミオスタチン / S m a d シグナル阻害作用を有していることが確認された。

【図1】

ルシフェラーゼ活性



Mean±S.E. (n=3) ** <0.01 v.s. CNT: (t-test)

フロントページの続き

(72)発明者 北澤 秀文
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 太田 宣康
栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 沼田 治
茨城県つくば市天王台 1丁目 1番 1 国立大学法人筑波大学内

(72)発明者 小澤 哲夫
茨城県土浦市東崎町 13 - 1 - 105

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 FA02 NA14 ZA94 ZB21
4C088 AB45 BA09 BA25 BA26 CA14 CA25 NA14 ZA94 ZB21