

(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
2015 年 10 月 1 日(01.10.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/147251 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/221 (2006.01) *A61K 31/205* (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01) *A61K 36/70* (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01) *A61P 9/08* (2006.01)
A61K 31/194 (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/059578
- (22) 国際出願日: 2015 年 3 月 27 日(27.03.2015)
- (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 2014-070226 2014 年 3 月 28 日(28.03.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人信州大学(SHINSHU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭三丁目 1 番 1 号 Nagano (JP).
- (72) 発明者: 中村浩蔵(NAKAMURA, Kozo); 〒3994598 長野県上伊那郡南箕輪村 8 3 0 4 国立大学法人信州大学 農学部内 Nagano (JP).
- (74) 代理人: 葛和清司(KUZUWA, Kiyoshi); 〒1600023 東京都新宿区西新宿 6 丁目 2 4 番 1 号 西新宿三井ビルディング 1 7 階 葛和国際特許事務所 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, 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.
- (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).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 補正された請求の範囲 (条約第 19 条(1))

(54) Title: FERMENTED FOOD EXTRACT COMPOSITION

(54) 発明の名称: 発酵食品抽出組成物

(57) Abstract: Provided is a fermented food extract that has a blood pressure-lowering action and is useful as a functional health food or pharmaceutical composition. This fermented food extract is obtained by: subjecting a fermented food, preferably a fermented fagopyrum esculentum lyophilisate, to acetone extraction; eluting the fermented fagopyrum esculentum acetone extract using a solid-phase extract cartridge filled with a resin to which a phenyl group is bonded, with formic acid-containing water used as an eluent; and fractionating and purifying the eluate using a column (PFP column) filled with a carrier to which a pentafluorophenyl group is bonded, with formic acid/methanol-containing water used as a mobile phase. This functional health food or pharmaceutical composition contains said extract or at least a part thereof as an active ingredient.

(57) 要約: 血圧降下作用を有し、機能性健康食品あるいは医薬品組成物として有用な発酵食品抽出物を提供する。発酵食品、好ましくは発酵キョウバク凍結乾燥物を、アセトン抽出し、当該発酵キョウバクアセトン抽出物を、フェニル基が結合した樹脂を充填した固相抽出カートリッジを用い、溶出液として、ギ酸含有水を用いて溶出し、当該溶出物を、ペンタフルオロフェニル基が結合した担体を充填したカラム(PFP カラム)を用い、移動相として、ギ酸・メタノール含有水を用いて分画、精製して得られる発酵食品抽出物、当該抽出物または少なくともその一部を有効成分として含有する機能性健康食品あるいは医薬品組成物に関する。



WO 2015/147251 A1

明 細 書

発明の名称：発酵食品抽出組成物

技術分野

[0001] 本発明は、発酵食品等、例えば、発酵キョウバク等から抽出される、抽出組成物に関する。より詳細には、少なくともアセチルコリンおよびプロピオニルコリンを含有し、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示す、発酵食品抽出組成物およびその抽出方法に関する。

また本発明は、当該抽出組成物を活性成分として含有する食品または医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 本発明者らは、発酵食品、特にソバ発芽体搾汁の発酵物について研究を進め、当該発酵物の凍結乾燥粉末がACE阻害作用を示すことを見出し、当該粉末からなる機能性食品や機能性飲料を報告し（特許文献1）、さらに、このACE阻害物質の分画方法および当該方法で分離された画分についても報告した。

（特許文献2）

その後、本発明者は、より高い機能性を有するソバ植物体粉碎物の乳酸発酵物（発酵キョウバク）を開発し、当該発酵物に含まれる血圧降下作用および血管拡張作用活性成分を単離、精製すべく研究を重ね、その活性成分として、いくつかの新規なペプチドを含有する発酵ソバ抽出物を見出し、特許出願を行った。（特許文献3）

一方、これまでに、血管拡張作用を有するソバ由来化合物およびそれらを含有する組成物については、種々報告されている。（特許文献4～7）

[0003] 本発明者は、さらに、発酵キョウバクに含まれる血圧降下作用および血管拡張作用活性成分について鋭意研究を行い、上記特許文献3の活性成分とは別の、血管拡張作用成分を分画した。

そして、当該分画に含まれる成分を同定確認した結果、少なくともアセチルコリンとプロピオニルコリンを含む、複数のコリンエステルを主体とした

第4級アルキルアンモニウム化合物を含有していることを見出した。

[0004] コリンエステルの中で、アセチルコリンは哺乳類の神経伝達物質として生命活動に不可欠な物質であることが知られている。また、1929年に、ウマの脾臓からヒスタミンとは異なる血圧降下物質が単離され、その活性物質がアセチルコリンであることが化学的に同定された。（非特許文献1）

このように動物組織中にアセチルコリンが存在することは古くから知られている。さらに、麦角の血圧降下物質がアセチルコリンであることが解明され、菌類がアセチルコリンを産生することが確認されている。（非特許文献2）

アセチルコリンは、食用植物、食用菌類、ローヤルゼリー、牛乳等に含まれており、枯草菌、酵母にもアセチルコリンが存在し、乳酸菌の一種であるラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) がアセチルコリンを生産したことを生物アッセイで確認したという報告もある。（非特許文献3～7）

[0005] また、アセチルコリンの他、複数のコリンエステル類も発見されている。アセチル基より1つ炭素鎖が長いプロピオニル基を有するプロピオニルコリンは、1953年に牛の脾臓から発見されている。（非特許文献8，9）

その後、牡牛の精液中、ヨーロッパザリガニ、アメリカカブトガニ、ヨーロッパザルガイ、オオノガイ、ムラサキイガイ、ホンドブガイ、リンゴマイマイ中の血リンパと平滑筋中、シビレエイの電気発生組織培養中の他、ヘンヨウボク、緑豆、オオバコ、ポプラ、シラカバ中などに、プロピオニルコリン産生が確認されている。（非特許文献10～13）

しかしながら、これまでに、発酵食品中にプロピオニルコリンが存在することは報告も示唆もされていない。

[0006] また、ブチリルコリンについては、1954年に脳抽出物から発見され（非特許文献14）、節足動物、軟体動物中に、アセチルコリン、プロピオニルコリンと共に存在することが示されている。（非特許文献11）

[0007] さらに、プロピオニルコリン、ブチリルコリン以外にも軟体動物から、い

くつかのコリンエステル類が確認されている。たとえば、ウロカノイルコリンがアクキガイの一種から、 $\beta\beta$ -ジメチルアクロイルコリン（セネシオイルコリン）がレイシガイの一種から、アクロイルコリンがエゾバイの一種から、イミダゾールプロピオニルコリンがレイシガイの一種から構造決定されている。（非特許文献15～18）

しかしながら、これまでに、発酵食品中にコリンエステル類が存在することは化学的には全く確認されておらず、その抽出、分画方法についても報告も示唆もされていない。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特開2005-304355号公報
特許文献2：特開2008-239498号公報
特許文献3：特開2012-162503号公報
特許文献4：特開2007-254410号公報
特許文献5：特開2006-76903号公報
特許文献6：特開2006-76904号公報
特許文献7：特開平5-97798号公報

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Dale HH, Dudley HW. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. J Physiol 68:97-123, 1929.
非特許文献2：Ewins AJ. Acetylcholine, a new active principle of ergot. Biochem J 8: 44-49, 1914.
非特許文献3：桃木芳枝, 植物におけるアセチルコリン, 植物の化学調節, 30(1), 49-61 (1995)
非特許文献4：川島紘一郎, アセチルコリンのルーツと非神経性アセチルコリン, 基礎老化研究, 34(4), 12-24 (2010)
非特許文献5：篠田雅人ら, ローヤルゼリー中の血流増加因子について, 薬学

雑誌, 98(2), 139-145 (1978)

非特許文献6: Whittaker VP. Acetylcholine in Milk. *Nature* 181:856-857, 1958.

非特許文献7: Stephenson M, Rowatt E. The production of acetylcholine by a strain of *Lactobacillus plantarum*. *J Gen Microbiol* 1(3):279-298, 1947.

非特許文献8: Banister J, Whittaker VP, Wijesundera S. The occurrence of homologues of acetylcholine in ox spleen. *J Physiol* 121(1):55-71, 1953.

非特許文献9: Gardiner JE, Whittaker VP. The identification of propionylcholine as a constituent of ox spleen. *Biochem J* 58(1):24-29, 1954.

非特許文献10: Bishop MR, Sastry BV, Stavinocha WB. Identification of acetylcholine and propionylcholine in bull spermatozoa by integrated pyrolysis, gas chromatography and mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 500(2):440-444, 1977.

非特許文献11: Wolfgang W, Jutta N, Dettmar W. Distribution of cholinesterases and cholinesterases in haemolymphs and smooth muscles of molluscs. *Comp Biochem Phys C* 61(1):121-131, 1978.

非特許文献12: O'Regan S. The synthesis, storage, and release of propionylcholine by the electric organ of *Torpedo marmorata*. *J Neurochem* 39(3):764-772, 1982.

非特許文献13: Miural GA, Shin TM. Identification of propionylcholine in higher plants. *Physiol Plant* 62:341-343, 1984.

非特許文献14: Holtz P, Schumann HJ. Butyrylcholine in brain extracts. *Naturwissenschaften* 41:306, 1954.

非特許文献15: Erspamer V, Benati O. Identification of murexine as β -[imidazolyl-(4)]acrylcholine. *Science* 117:161-162, 1953.

非特許文献16: Keyl MJ, Michaelson IA, Whittaker VP. Physiologically a

ctive choline esters in certain marine gastropods and other invertebrates. J Physiol 139:434, 1957.

非特許文献17: Whittaker VP. Acrylylcholine: a new naturally occurring pharmacologically active choline ester from *Buccinum undatum*. Biochem Pharmacol 1(4):342-346, 1959.

非特許文献18: Roseghini M. Occurrence of dihydromurexine (imidazole propionylcholine) in the hypobranchial gland of *Thais (purpura) haemastoma*. Experientia 27(9):1008-1009, 1971.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明の目的は、血圧降下作用および血管拡張作用を有し、機能性健康食品あるいは医薬品組成物として有用な、新規な発酵食品抽出物、当該抽出物または当該抽出物に含まれている活性成分の少なくともその一部を有効成分として含有する機能性健康食品あるいは医薬品組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ね、本発明を成した。すなわち、発酵食品、特に、ソバ植物体の乳酸発酵物（発酵キョウバク）に含まれる成分について研究を重ねた結果、極めて顕著な血圧降下作用および血管拡張作用を発揮する活性成分を分離することに成功し、さらに、その中のいくつかの活性成分を同定し、本発明を完成した。
- [0012] より詳細には、本発明は、
- [1] 発酵食品抽出組成物であって、少なくとも、アセチルコリンおよびプロピオニルコリンを含有し、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示す、発酵食品抽出組成物、
 - [2] 発酵食品が、発酵キョウバク、黒酢、ヨーグルト、納豆、日本酒の群から選ばれる一種である、[1]に記載の抽出組成物、
 - [3] 発酵食品が、発酵キョウバクである、[2]に記載の抽出組成物、

および、

[4] さらに、ブチリルコリン、ラクチルコリン、レブリルコリン、カルニチン、メチルカルニチン、トリメチルグリシン（ベタイン）、メチルトリメチルグリシン、エチルトリメチルグリシン、プロピオニルトリメチルグリシンおよびホスホコリンの群から選ばれる少なくとも1種を含有する、[1]に記載の抽出組成物、に関する。

[0013] また、本発明は、

[5] [1]～[4]の何れかに記載の抽出組成物を活性成分として含有する食品または医薬品組成物、

[6] さらに、チロシンおよび γ -アミノ酪酸（GABA）の群から選ばれる少なくとも1種を活性成分として含有する[5]に記載の食品または医薬品組成物、および、

[7] さらに、乳酸、酢酸およびクエン酸の群から選ばれる少なくとも1種を含有する[5]または[6]に記載の食品または医薬品組成物、に関する。

[0014] さらに、本発明は、

[8] （1）発酵キョウバク凍結乾燥物または濃縮物をアセトンに懸濁し、振とう攪拌後、遠心分離して得た上清を減圧濃縮する工程（工程1）、

（2）当該減圧濃縮物を、フェニル基が結合した担体を充填した固相抽出カートリッジを用い、溶出液として、酸含有水を用いて溶出する工程（工程2）、

（3）当該溶出物を、ペンタフルオロフェニル基が結合した担体を充填したカラム（PFPカラム）を用い、移動相として、酸性メタノール含有水を用いて分画、精製する工程（工程3）

を含む工程からなることを特徴とする、[1]に記載の発酵食品抽出組成物の製造方法、

および、

[9] （1）工程2で、固相抽出カートリッジとして、固相抽出カートリッ

ジ (GL Science InertSep) (登録商標) を用い、溶出液として、0.01%ギ酸含有水を用い、(2) 工程3で、逆相カラムとして、PFPカラム (YMC-Triart PFP) を用い、移動相として、0.01%ギ酸-33%メタノール含有水を用いることを特徴とする、[8]に記載の製造方法、に関する。

[0015] さらにまた、本発明は、

[10] [8]または[9]に記載の製造方法によって製造される、少なくとも、アセチルコリンおよびプロピオニルコリンを含有し、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示すことを特徴とする、発酵食品抽出組成物、に関する。

発明の効果

[0016] 本発明の新規な発酵食品抽出物は、顕著な血圧降下作用および血管拡張作用を有しており、機能性健康食品あるいは医薬品組成物の有効成分として有用である。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、PFPカラムを用いた、発酵キョウバク固相抽出物の成分分離条件検討試験における、メタノール含量変化に伴うアセチルコリンの溶出挙動変化を示す検出ピークのチャートである。

[図2]図2は、PFPカラムを用いた、発酵キョウバク固相抽出物の成分分離条件検討試験における、酸含量変化に伴うアセチルコリンの溶出挙動変化を示す検出ピークのチャートである。

[図3]図3は、同じく、発酵キョウバク固相抽出物の成分分離条件検討試験における、酸含量(0.01%)固定条件下メタノール含量変化に伴う発酵キョウバク精製物中アセチルコリンの溶出挙動を示す検出ピークのチャートである。

[図4]図4は、同じく、発酵キョウバク固相抽出物の成分分離条件検討試験における、酸含量(0.01%)固定条件下で、さらにメタノール含量を細かく変動 (38%、36%、33%) させたときの、酸含量(0.01%)固定条件下メタノール含量変化に伴う発酵キョウバク精製物中アセチルコリンの溶出挙動を示す検出ピーク

クのチャートである。

[図5]図5は、同じく、発酵キョウバク固相抽出物の成分分離条件検討試験において、0.01%ギ酸-33%メタノール含有水での分離温度を30℃と40℃に設定して分離を検討したときの、分離温度に伴う発酵キョウバク精製物中アセチルコリンの溶出挙動を示すチャートである。

[図6]図6は、同定コリン化合物の血管等尺性張力測定試験結果を示すグラフである。

[図7]図7は、同定コリン化合物投与後の収縮期血圧変化を示すグラフである。

[図8-1]図8-1は、ゲルろ過物のLC-MS分析試験におけるラクチルコリンのマススペクトルである。

[図8-2]図8-2は、ゲルろ過物のLC-MS/MS分析試験におけるラクチルコリンのマススペクトルである。

[図9-1]図9-1は、同じく、ゲルろ過物のLC-MS分析試験におけるレブリルコリンのマススペクトルである。

[図9-2]図9-2は、同じく、ゲルろ過物のLC-MS/MS分析試験におけるレブリルコリンのマススペクトルである。

発明を実施するための形態

[0018] ソバ植物体を乳酸発酵させた「発酵キョウバク」は、高血圧自然発症ラット（SHR）に対して優れた血圧降下作用を有している。

本発明者は、この発酵キョウバク中の血圧降下物質について研究を行い、いくつかの新規なペプチドを含有する発酵ソバ抽出物を見出し、特許出願を行った。（特許文献3）

[0019] 発明者は、さらに、発酵キョウバク中の血管拡張成分に関する研究を進め、新たな分画、精製方法を開発し、当該、発酵キョウバク中の血管拡張成分を分画、精製することに成功した。

本発明の分画、精製で用いた発酵キョウバクはpH3.6の酸性であり、雄性12週齢SHRの胸部大動脈血管標本に対し0.5 $\mu\text{g/mL}$ から血管拡張作用を示し EC_{50}

は8.30 $\mu\text{g/mL}$ であった。

この発酵キョウバクに水酸化ナトリウム溶液を添加してpH12で室温で放置すると、0.5時間で血管拡張活性は失われた。

また、発酵キョウバク凍結乾燥物の有機溶媒抽出物の血管拡張作用を調べたところ、酢酸エチル抽出物には血管拡張作用が無く、エタノールとアセトン抽出物に活性があり、アセトン抽出物の血管拡張作用が最も強かった。

以上の結果から、発酵キョウバク血管拡張成分は、酸性または中性条件で精製や投与を行う必要があり、アセトンで効果的に抽出できることを見出した。

[0020] 次に、クロマトグラフィによる血管拡張成分の精製条件を検討した。まず、発酵キョウバク凍結乾燥物のアセトン粗抽出物をゲルろ過クロマトグラフィで精製して活性を比較した。その結果、溶出時間から判断して比較的分子量の物質を含む画分に血管拡張作用が見られた。

発酵キョウバクの血管拡張成分は塩基性で失活するため、酸性条件で操作を行う陽イオン交換樹脂での精製を検討した。その結果、強酸性陽イオン交換樹脂処理における塩酸溶出画分に比較的強い血管拡張作用が見られた。この結果は、発酵キョウバク血管拡張成分がプラス電荷を有するため、樹脂上のマイナス電荷を有する交換基であるスルホン酸基と相互作用したためと推察された。

[0021] しかし、血管拡張成分の陽イオン交換樹脂への吸着はかなり強く、十分な血管拡張成分を回収するための塩酸溶出操作の繰り返しによって生じた大量の溶出液から塩酸と溶媒を除去する操作が煩雑であった。そこで、血管拡張成分のプラス電荷と π 電子を有するフェニル基とのカチオン- π 相互作用を利用した分離が有効であると考え、フェニル基結合担体を用いた固相抽出を行ったところ、血管拡張成分だけが濃縮された画分を分離することが出来た。

このことは、血管拡張物質が共存する他の化合物に比べて特に強いカチオン- π 相互作用を形成するためと考え、より強いカチオン- π 相互作用が期待されるペンタフルオロフェニル基が結合した担体を充填したカラム（PFPカラ

ム)を用いたHPLC分離条件の検討を行ったところ、さらに、血管拡張成分を濃縮、分離することができた。

[0022] 以上のような知見に基づいて、以下に示す、本発明の発酵食品抽出物の製造方法を確立した。

すなわち、例えば、発酵キョウバク凍結乾燥物または濃縮物をアセトンに懸濁し、振とう攪拌後、遠心分離して得た上清を減圧濃縮する工程（工程1）、当該減圧濃縮物を、フェニル基が結合した担体を充填した固相抽出カートリッジを用い、溶出液として、酸含有水を用いて溶出する工程（工程2）、

次いで、当該溶出物を、ペンタフルオロフェニル基が結合した担体を充填したカラム（PFPカラム）を用い、移動相として、酸性メタノール含有水を用いて分画、精製する工程（工程3）ことにより、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示す、発酵食品抽出組成物を製造する。

[0023] 本発明の製造方法において用いる発酵キョウバクは、特開2012-162503号公報（特許文献3）記載の製造方法に従って製造することができる。具体的には、栽培床および種殻を取り除いたソバスプラウトを100 ppmの次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬し殺菌した後、切断、破碎し、当該粉碎物を密封容器に入れ、破碎物1.0 kgあたり25 mLの乳酸菌スターター（ラクトバチルス・プランタラム）を添加し、窒素置換後、室温で6日間静置発酵させたものをろ過または遠心分離して赤褐色の液体として発酵キョウバクを得、これを凍結乾燥または減圧濃縮して、発酵キョウバクの凍結乾燥物または減圧濃縮物を得ることができる。

[0024] 工程2で用いる、固相抽出カートリッジとしては、例えば、固相抽出カートリッジ（HyperSep Phenyl SPE Columns、Shimadzu STRATA Phenyl、Agilent Bond Elut PH）等を挙げることができ、固相抽出カートリッジ（GL Science InertSep）（登録商標）が最も好ましい。また、溶出液として用いる酸含有水としては、塩酸含有水、酢酸含有水、トリフルオロ酢酸（TFA）含有水、リン酸含有水等を挙げることができ、ギ酸含有水が好ましく、0.01%ギ酸含有

水が最も好ましい。

工程3で用いる、逆相カラムとしては、例えば、フェニルカラム (Imtakt Unison UK-Phenyl、GL Science InertSustain Phenyl、GL Science Inertsil Ph-3、COSMOSIL 5PFP Packed Column) 等を挙げることができ、PFPカラム (YMC-Triart PFP) が最も好ましい。また、移動相として用いる酸性メタノール含有水としては、塩酸・メタノール含有水、酢酸・メタノール含有水、TFA・メタノール含有水、リン酸・メタノール含有水等を挙げることができ、ギ酸・メタノール含有水が好ましく、0.01%ギ酸-33%メタノール含有水が最も好ましい。

[0025] 上記のような分画、精製方法により、発酵キョウバクの血管拡張作用成分を分離したところ、アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンを純度よく単離することができ、NMRおよび質量分析で構造を決定した。

[0026] また、PFPカラムを用いたLC-MS/MS分析では、これら3種類のコリンエステルの他にラクチルコリン、レブリルコリン、カルニチンとそのメチルエステル、トリメチルグリシン (ベタイン) とそのメチルエステル、エチルエステルおよびプロピオニルエステルとホスホコリンが特定された。

本知見は、ラクチルコリンを天然物として特定した初めての事例であり、さらに、本発明の分画、精製方法で単離されたレブリルコリンは、これまでに、全く報告も示唆もされていない。

[0027] 本発明の分画、精製方法により単離、精製されたアセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンの塩酸塩を用いて、SHRの胸部大動脈標本を用いた血管等尺性張力試験およびSHRへの単回経口投与試験を行った。

血管等尺性張力試験では、アセチルコリンは 10^{-9} Mから血管拡張作用を示し、最大拡張率は 10^{-6} Mで89.9%、 EC_{50} は 2.72×10^{-8} Mであった。

プロピオニルコリンは 10^{-7} Mから拡張反応を示し、 10^{-4} Mで最大拡張率は95.2%、 EC_{50} は 2.27×10^{-6} Mであった。

ブチリルコリンは 10^{-4} M添加で7.14%拡張と弱い血管拡張作用であった。

単回経口投与試験では、発酵キョウバクの単回経口試験結果および含量を

考慮し投与量 10^{-11} mol/kgで試験を行った。

その結果、アセチルコリン投与群およびプロピオニルコリン投与群で、投与9時間後にコントロール群と比較して有意な血圧降下作用を引き起した。

[0028] 本結果は、アセチルコリンは経口投与では生理活性を引き起こさないとするこれまでの定説を覆すものである。

また、プロピオニルコリンが経口投与で生理活性を引き起すという知見は、これまで全く報告も示唆もされていない。

[0029] 発酵キョウバクには、その他の第4級アルキルアンモニウム化合物（ブチリルコリン、ラクチルコリン、レブリルコリン、ホスホコリン、カルニチンとそのメチルエステル、トリメチルグリシン（ベタイン）とそのメチルエステルとエチルエステルおよびプロピオニルエステル）が混在し優れた血管拡張作用、血圧降下作用を引き起すことが推察されることから、例え単独で血管拡張作用、血圧降下作用が弱くとも、これらの化合物はアセチルコリンやプロピオニルコリンと共に相乗的に血圧降下作用に寄与していると考えられる。

[0030] また、発酵キョウバクに含まれる有機酸類（乳酸、酢酸、クエン酸）は、溶液を酸性に保つことでアセチルコリンやプロピオニルコリンなどのコリンエステルを安定化させて経口投与で効果を発揮させるために寄与しており、既知の血圧降下成分であるアミノ酸類（チロシン、GABA）などもアセチルコリンおよびプロピオニルコリンなどと共に血圧降下作用に寄与しているものと考えられる。

[0031] 本発明の発酵食品原料としては、植物由来の茎葉、種子（穀類、豆類）など、動物由来の乳など、可食なものであれば特に限定されない。また、本発明の発酵食品の発酵に用いる菌としては、病原性のないものであればどのようなものでもよく、特に限定されない。

[0032] 本発明者は、発酵キョウバク以外の発酵食品について、同様な分画、精製を検討した結果、アセチルコリン、プロピオニルコリン、ラクチルコリン、ホスホコリン、カルニチン、トリメチルグリシンとそのメチルエステルおよ

びエチルエステルが、ヨーグルト、黒酢、納豆、日本酒中など様々な発酵食品に含まれていることを見出した。

特に、上記発酵食品中に、プロピオニルコリンが比較的高い含有量を示すことを確認することができた。本知見は、これまでに全く報告も示唆もされていない新しい知見である。

[0033] その他、黒酢にはブチリルコリン、ラクチルコリン、ホスホコリン、カルニチン、トリメチルグリシン（ベタイン）とそのメチルエステルおよびエチルエステルが、ヨーグルトには、ラクチルコリン、ホスホコリン、カルニチンとそのメチルエステル、トリメチルグリシン（ベタイン）とそのメチルエステル、エチルエステルおよびプロピオニルエステルが、納豆にはブチリルコリン、ラクチルコリン、ホスホコリン、カルニチンとそのメチルエステル、トリメチルグリシン（ベタイン）とそのメチルエステル、エチルエステルおよびプロピオニルエステルが、日本酒にはブチリルコリン、ラクチルコリン、ホスホコリン、カルニチンとそのメチルエステル、トリメチルグリシン（ベタイン）とそのメチルエステルおよびエチルエステルが含まれていることを見出した。

この事から、少なくとも、上記、ヨーグルト、黒酢、納豆、日本酒等の発酵食品において、本発明の発酵キョウバク抽出組成物の製造方法に準じて、活性成分の分画、精製を行うことにより、発酵キョウバク抽出組成物と同様な活性を示す抽出組成物が得られるものと推測される。

[0034] 本発明の抽出組成物は、各種の機能性健康食品あるいは医薬品組成物の有効成分として用いることができる。

食品の場合、適当な食品添加物と組み合わせて、食品用組成物として用いることができる。また、このような食品用組成物に限らず、緑茶、紅茶、烏龍茶、雑穀茶等に配合して飲料として、あるいはビスケット、パン、飴等に配合して食品として、日常的に摂取可能な形態で提供することも可能である。また、下記医薬品の調剤に準じて適当な剤形として、所謂サプリメントとして利用することも可能である。

[0035] 医薬品とする場合は、適当な医薬品添加剤と組み合わせて、通常の調剤の手法に従って各種の剤形として用いることができる。このような剤形としては、例えば散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤等の固形製剤、水剤、懸濁剤、乳剤等の液剤等の経口投与剤が挙げられる。

[0036] 本発明の抽出物を食品として用いる場合、一般的な飲食品としてだけでなく、特定の機能を発揮して健康増進を図る機能性健康食品としての使用が挙げられる。

この場合の具体的な形態としては、本発明の組成物を有効成分として含有するカプセル剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤等からなるサプリメント類、パン、ケーキ、クッキー等のベーカリー食品類、ソース、スープ、ドレッシング、マヨネーズ等の調味料類、牛乳、ヨーグルト、クリーム類等の乳製品類、チョコレート、キャンデー等の菓子類、あるいは緑茶、紅茶、烏龍茶、麦茶、雑穀茶、果汁、野菜、乳飲料、清涼飲料および炭酸飲料等の各種飲料類等が挙げられる。

[0037] 本発明の抽出組成物を医薬品組成物の有効成分として使用する場合の投与量は、各成分の比率によっても異なり、また、患者の年齢、体重、性別、症状、投与方法などの種々の要因によって異なるが、成人で、1日当たり、経口投与の場合は、概ね、0.1 mg～100 g、非経口投与の場合は、概ね0.1 mg～1000 mgの範囲で選択することができる。また、症状改善の度合いによって、適宜増減することもできる。投与回数としては、1日1回～数回に分けて投与することができる。

本発明の抽出組成物を食品として使用する場合の摂取量は、上記医薬品の経口投与の場合に準じて選択することができる。但し、飲食物の場合は医薬品とは異なり、投与用量および投与回数が特に制限されないことから、特に重篤な症状を発生しない限りにおいて、健康維持という目的、並びに、呈味性、嗜好性を考慮して、上記の範囲に限定されずに摂取量を選択してもよい。

実施例

[0038] 以下に、本発明の実施の態様について実施例および試験例を挙げて説明するが、本発明は以下の例に限定されるものではない。

実施例 1

[0039] 発酵キョウバクの製造

発酵キョウバクは、特開2012-162503号公報（特許文献3）記載の製造方法に従って製造した。

ソバスプラウトは、播種から約10日栽培し収穫されたものをサラダコスモ株式会社から購入した。栽培床および種殻を取り除いたソバスプラウト（10 kg）を100 ppmの次亜塩素酸ナトリウム（20 L）に10分間浸漬し殺菌した後、約2.0 cmの長さに切断したものを細かく破碎した。

粉碎物を密封容器（10 L）に入れ、破碎物1.0 kgあたり25 mLの乳酸菌スターター（ラクトバチルス・プランタラム）を添加し、窒素置換後、室温で6日間静置発酵させたものをろ過または遠心分離し赤褐色の液体として発酵キョウバクを得た（6.8 kg）。これを、常法に従い、凍結乾燥または減圧濃縮を行って発酵キョウバクの凍結乾燥物または減圧濃縮物を得、これを、血管拡張成分の単離精製に供した。

実施例 2

[0040] 発酵キョウバク血管拡張成分の分画

[試験例 1]

血管拡張成分の精製条件検討

まず、2 kgの発酵キョウバクから得られた凍結乾燥物を用いて、発酵キョウバク血管拡張物質の化学的性質を明らかにすると共に精製条件検討を行った。発酵キョウバク（2 kg）を遠心分離（3220 g、30 min、4℃）後、残渣を取り除き、得られた上清を凍結乾燥し、濃赤色、吸湿性の発酵キョウバク凍結乾燥物を得た（収率2.05%）。

各条件検討では、各精製段階で血管等尺性張力測定試験により血管拡張作用を示す画分の特定を行うことで、活性成分の濃縮を確認した。

[0041] pH安定性試験

本条件検討に用いた発酵キョウバク(液体)はpH3.6の酸性であり、雄性12週齢SHRの胸部大動脈血管標本に対し0.50 $\mu\text{g/mL}$ から血管拡張作用を示し EC_{50} は8.30 $\mu\text{g/mL}$ であった。

発酵キョウバクのpH安定性を試験するために、発酵キョウバク凍結乾燥物(10 mg)を精製水に溶解させ1N水酸化ナトリウムを添加してpH7.0、pH9.0、pH12.0に調整した後精製水を1 mLになるまで加えた。発酵キョウバク凍結乾燥物(10 mg)を精製水(1 mL)に溶解させたものを対照試料とした(pH4.0)。0.5、1、3、6、12、24時間室温で放置後、血管等尺性張力測定試験で、発酵キョウバク濃度50 $\mu\text{g/mL}$ における各溶液の血管拡張作用を確認した。その結果、対照試料、pH7.0では24時間後も血管拡張作用が維持されたものの、pH9.0では6時間後に、pH12.0では0.5時間後に血管拡張作用が消失した。

[0042] 有機溶媒抽出試験

発酵キョウバク凍結乾燥物(100 mg)を、それぞれ1 mLのエタノール、アセトン、酢酸エチルに懸濁し、シェイキングインキュベーターで振とう(181 g、6時間、室温)後、遠心分離(3220 g、30 min、4°C)して上清と沈殿に分けた。

沈殿は再び各有機溶媒に懸濁し、同様に遠心分離して上清と沈殿に分けた。上清は、合わせて減圧濃縮後、真空ポンプで溶媒を完全に除去した。

各有機溶媒抽出物収量は、エタノール抽出物975 μg (0.98%)、アセトン抽出物512 μg (0.51%)、酢酸エチル抽出物210 μg (0.21%)であった。

血管等尺性張力測定試験で、各抽出物濃度50 $\mu\text{g/mL}$ における各溶液の血管拡張作用を確認した。その結果、エタノール抽出物、アセトン抽出物、酢酸エチル抽出物の血管拡張率は、それぞれ、22%、49%、0%であった。

[0043] ゲルろ過クロマトグラフィ

発酵キョウバク凍結乾燥物(1.25 g)を純水(10 mL)に溶解させ、分画分子量700~1500のSephadex G-15(30 g)を充填したオープンカラム(4.2 cm×50 cm)に注入した。ボイドボリューム300 mLを除いた後、50 mLずつ分取し、ゲルろ過画分1~8を得た。分取した各画分は凍結乾燥し、凍結乾燥物は血管

等尺性張力測定試験に供した。ゲルろ過クロマトグラフィにより分画した際の各画分の収量と収率を表1に示す。

[0044] [表1]

表1. ゲルろ過画分収量

画分	1	2	3	4	5	6	7	8	計
収量 (mg)	77.2	109.0	160.1	238.0	192.9	136.1	116.2	36.2	1103.3
収率 (%)	6.2	8.7	12.8	19.0	15.4	10.9	9.3	2.9	88.3

[0045] 血管等尺性張力測定試験で各画分25 $\mu\text{g/mL}$ における血管拡張作用を確認した結果、ゲルろ過画分3、4で血管拡張作用が見られた。累積添加によってゲルろ過画分3～5の血管拡張作用を調べた結果、ゲルろ過画分3は1.0 ng/mL の添加で4.80%の拡張率を示し、用量依存的な血管拡張反応が認められ、最大拡張率は5.0 $\mu\text{g/mL}$ 添加時の61.9%であった。ゲルろ過画分4は、1.0 ng/mL の添加で2.74%の拡張率を示し、最大拡張率は5.0 $\mu\text{g/mL}$ 添加時の71.2%であった。ゲルろ過画分3および4には発酵キョウバクの1/500という低濃度で血管拡張を開始し、強い血管拡張作用を示す物質が含まれていることが分かった。一方、ゲルろ過画分5は用量依的に血管収縮反応が認められ、発酵キョウバク中には血管拡張成分だけでなく血管収縮成分も含まれていた。ゲルろ過クロマトグラフィでゲルろ過画分5に含まれる血管収縮成分が除去され血管拡張物質が濃縮されたと考えられた。

[0046] イオン交換処理

強酸性陽イオン交換樹脂処理

発酵キョウバク凍結乾燥物 (2000 mg) を純水 (5 mL) で溶解し、1N NaOH でpH7に調整した後、遠心分離 (3220 g、4℃、20分間) で上清を回収し10 mL にメスアップした。この上清 (2.5 mL) をプロトン型強酸性陽イオン交換樹脂 (アンバーライトIR120B、5 mL) と純水 (2 mL) との懸濁液に加えて緩やかに攪拌しながら室温2時間処理した後、ろ過して処理溶液と樹脂を分離した。樹脂を純水 (15 mL) で2回洗浄し、処理溶液と合わせた。洗浄した樹脂に2 N HCl (30 mL) を加え、緩やかに攪拌しながら室温で30分間処理して吸着成分を溶出させ、ろ過して塩酸溶出液と樹脂を分離した。さらに得られた処理

溶液をイオン交換樹脂で処理する操作を2回繰り返し、各操作で得られた溶出液は全て混合した。処理溶液（99 mL）と塩酸溶出液（90 mL）はそれぞれ300 mLにメスアップ後、4倍希釈して血管等尺性張力測定試験で血管拡張作用を確認した。その結果、塩酸溶出画分に血管拡張作用が見られ、塩酸溶出画分100 μ L添加時に56.0%であった。発酵キョウバク中の全ての血管拡張成分がイオン交換樹脂に吸着されたと仮定すると、この時の発酵キョウバク濃度は10 μ g/mLに相当する。処理溶液には血管拡張作用はみられなかった。

[0047] 弱酸性陽イオン交換樹脂処理

発酵キョウバク凍結乾燥物（2000 mg）を純水（5 mL）で溶解し、1N NaOHでpH7に調整した後、遠心分離（3220 g、4℃、20分間）で上清を回収し10 mLにメスアップした。この上清（2.5 mL）をナトリウム型弱酸性陽イオン交換樹脂（アンバーライトIRC76、5 mL）と純水（2 mL）との懸濁液に加えて緩やかに攪拌しながら室温で2時間処理した後、ろ過して処理溶液と樹脂を分離した。樹脂を純水（15 mL）で2回洗浄し、処理溶液と合わせた。洗浄した樹脂に2N HCl（30 mL）を加え、緩やかに攪拌しながら室温で30分間処理して吸着成分を溶出させ、ろ過して塩酸溶出液と樹脂を分離した。さらに得られた処理溶液をイオン交換樹脂で処理する操作を2回繰り返し、各操作で得られた溶出液は全て混合した。処理溶液（94 mL）と塩酸溶出液（90 mL）はそれぞれ300 mLにメスアップ後、4倍希釈して血管等尺性張力測定試験で血管拡張作用を確認した。その結果、処理溶液および塩酸溶出画分共に血管拡張作用が見られ、処理溶液100 μ L添加時に血管拡張率は7.3%、塩酸溶出画分100 μ L添加時に血管拡張率は23.3%であった。弱酸性陽イオン交換樹脂への発酵キョウバク血管拡張成分の吸着は不十分であると考えられた。

[0048] 固相抽出

固相抽出カートリッジ（GL Science InertSep PH、5 g）（登録商標）をメタノール（30 mL）で活性化し、0.01%ギ酸含有水（30 mL）で洗浄し純水（30 mL）で平衡化した後、発酵キョウバクアセトン抽出物（1.0 g）を純水（2.5 mL）に溶かしてアプライし、純水（30 mL）と0.01%ギ酸含有水（30 mL）で

溶出を行った。純水溶出画分と0.01%ギ酸含有水溶出画分を凍結乾燥し、血管等尺性張力測定試験で血管拡張作用を確認した。その結果、0.01%ギ酸含有水溶出画分に血管拡張作用が見られ、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 時に血管拡張率は35.6%であった。純水溶出画分に血管拡張作用はみられなかった。

[0049] HPLC分離条件

ペンタフルオロフェニル基が結合した逆相カラム (YMC-Triart PFP、5 μm 、4.6 mm $\times$ 250 mm) を用いて発酵キョウバク固相抽出物 (1 mg/mL) 中の血管拡張成分分離条件を検討した。まず、血管拡張成分候補であるアセチルコリン標品を用い、溶離液のメタノール含量と酸含量を変化させて条件検討を行った。すなわちアセチルコリン標品 (0.1 mg/mL) を60 μL 注入、流速0.5 mL/minで、分離温度30 $^{\circ}\text{C}$ で、溶離液に0、5、15、30、50、60%メタノール含有水および0.002、0.004、0.006、0.008、0.01、0.015%ギ酸含有50%メタノールを用いてアセチルコリンの溶出挙動変化を調べた。その結果、メタノール含量が高くなるにつれて、アセチルコリンの溶出時間は早まると共にピーク形状が良好になった。また、ギ酸含量はアセチルコリンの保持時間にあまり影響を及ぼさないものの酸含量が多いほどバックグラウンドの上昇によって検出ピークが小さくなった。以上の結果から、0.01%ギ酸-50%メタノール含有水がアセチルコリンの分析に最も適していることがわかった。メタノール含量変化に伴うアセチルコリンの溶出挙動の変化を図1に、酸含量変化に伴うアセチルコリンの溶出挙動の変化を図2に示した。

[0050] 次に、発酵キョウバク固相抽出物の分離条件を検討した。アセチルコリン分析条件での結果を基に、ギ酸含量を0.01%、メタノール含量を25、30、35、40、45、50%と変化させてHPLC分析を行った。その結果、メタノール含量35%での分離が良好であった。酸含量(0.01%)固定条件下メタノール含量変化に伴う発酵キョウバク精製物の挙動を図3に示した。

[0051] さらにメタノール含量を細かく変動 (38、36、33%) させたところ、クロマトグラム後半の分離が33%メタノールのとき最良であった。酸含量(0.01%)固定条件下メタノール含量変化に伴う発酵キョウバク精製物の挙動を図4に示

した。

[0052] 最後に、0.01%ギ酸-33%メタノール含有水での分離温度を30℃と40℃に設定して分離を検討したところ、40℃の方がより分離が良かった。分離温度に伴うクロマトグラム変化を図5に示した。

[0053] 以上の結果から、最適分離条件は以下のとおり決定した。

カラム：YMC-Triart（登録商標） PFP、5 μ m、4.6 mm×250 mm

注入量：発酵キョウバク固相抽出物（0.1 mg/mL）60 μ L

移動相：0.01%ギ酸-33%メタノール含有水（アイソクラティック）

流速：0.5 mL/min

温度：40℃

実施例 3

[0054] 発酵キョウバク血管拡張成分の精製

発酵キョウバク100 kgを減圧濃縮し、アセトン抽出、固相抽出、ゲルろ過クロマトグラフィ、HPLCで発酵キョウバク中の血管拡張成分を精製した。

[0055] 発酵キョウバク血管拡張成分のアセトン抽出

発酵キョウバクを遠心分離（3220 g、30 min、4℃）し、遠心分離後残渣を取り除いた。得られた上清は、減圧条件下でロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、発酵キョウバク濃縮物とした。2 L乳鉢に発酵キョウバク濃縮物（約120 g）とアセトン（300 mL）を加え、乳棒で5分間すりつぶしながら血管拡張成分を抽出し、上清を吸引器で回収した。残渣にさらにアセトン（300 mL）を加え、乳棒で5分間十分にすりつぶした後、同様に上清を回収した。この操作を計12回繰り返した。得られたアセトン溶液を減圧条件下でロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、アセトン粗抽出物とした。500 mLナスフラスコにアセトン粗抽出物（約60 g）と酢酸エチル（約200 mL）を加え、ガラス棒で5分間よく攪拌後、10分間氷冷してから上清を除去した。残渣に再び酢酸エチル（約200 mL）を加え、ガラス棒で5分間よく攪拌し、同様にして上清を除去した。この操作を計12回繰り返し、得られた残渣をデシケーターで3時間以上減圧乾燥させアセトン抽出物とした。

[0056] 発酵キョウバク血管拡張成分の固相抽出精製とゲルろ過クロマトグラフィによる分画

ゲルろ過クロマトグラフィの前処理として、固相抽出カートリッジ (GL Science InertSep (登録商標) PH、50 g) をメタノール (300 mL) で活性化し、0.01%ギ酸含有水 (300 mL) で洗浄し純水 (300 mL) で平衡化した後、発酵キョウバクアセトン抽出物 (10 g) を純水 (20 mL) に溶解してアプライし、純水 (300 mL) で夾雑物を溶出させた後0.01%ギ酸含有水 (300 mL) で血管拡張物質の溶出を行った。得られた溶出液は減圧条件下でロータリーエバポレーターを用いて濃縮し固相抽出物とした。

続いて、ゲルろ過クロマトグラフィでは、カラム (4.2 cm×50 cm) にSephadex G-15 (230 g) を充填し、純水で500 mg/mLに調製した固相抽出物 (2 mL) を注入後、純水で溶出して410-485 mLの溶出液を分取した。分取した溶出液は減圧濃縮・凍結乾燥後、ゲルろ過物とした。

発酵キョウバク血管拡張成分のLC-MS、LC-MS/MS分析

ゲルろ過物のLC-MS分析およびLC-MS/MS分析を行った。1.5 mL容マイクロチューブにゲルろ過物と分析溶媒を加えて1 mg/mLの濃度のサンプル溶液を調製し、Millex-LHフィルター (0.45 μ m) (登録商標) を通したものをLC-MS分析サンプルとした。カラムにはPFP基が結合した逆相カラムYMC-Triart (登録商標) PFP (5 μ m、4.6 mm×250 mm) を用い、移動相に0.01%ギ酸-33%メタノール含有水を使用した。イオン化モード ESI⁺、流速は0.5 mL/min (LC) および0.3 mL/min (MS)、分離温度が40°C、注入量が10 μ L、Capillary 電圧が3500 V、N₂ gas flow (cone) が50 L/h、N₂ source tempが120°C、N₂ desolvation tempが350°Cである。また、イオン化電圧は分析を行うピークごとに10~60 Vで検討を行い、最もイオン化が良好であったCone voltage 10 V、Collision voltage 30 Vの条件を用いた。LC-MS分析で観測された主要なイオンピークに対して、ニュートラルロススキャンを実施し第4級アルキルアンモニウム化合物としてトリメチルアンモニウム基 (質量電荷比59) を有するものを特定した。そして、特定された第4級アルキルアンモニウム化合物の質量電荷

比をプリカーサーイオンとしてLC-MS/MS分析を行った。その結果、第4級アルキルアンモニウム化合物として、アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリン、ラクチルコリン、レブリルコリン、カルニチンとそのメチルエステル、トリメチルグリシン（ベタイン）とそのメチルエステル、エチルエステルおよびプロピオニルエステルとホスホコリンが特定された。

実施例 4

[0057] アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンの単離、精製

発酵キョウバク血管拡張成分のHPLC精製

前述のLC-MS分析結果を参照し、ゲルろ過物に含まれる血管拡張成分をHPLC精製し、血管拡張成分を単離した。1.5 mL容マイクロチューブにゲルろ過物とHPLC分析溶媒を加えて100 mg/mLの濃度のサンプル溶液を調製し、Millex-L Hフィルター（0.45 μ m）（登録商標）を通したものを分離サンプルとした。分析システムにはProminence HPLC system、カラムにはYMC-Triart PFP（5 μ m、20 mm×250 mm）（登録商標）を使用した。分析条件は、移動相に0.01%ギ酸-33%メタノール含有水、流速が5.671 mL/min、分離温度が40℃、検出波長が215 nm、注入量がゲルろ過物50 μ Lである。血管拡張成分が含まれるフラクションを分取し、必要であれば同様の精製を繰り返して3種類の純粋な成分を得た。最終的な精製物には塩酸を加えて減圧濃縮、凍結乾燥して塩酸塩とし、構造決定および試験に用いた。

[0058] 発酵キョウバク血管拡張成分のNMR分析

3種類のHPLC精製物に対しNMR分析を行った。得られた分取物について、それぞれ凍結乾燥物（1.6 mg）に重水（D₂O、0.16 mL）を加えて溶解したものをNMRサンプルとした。¹H共鳴周波数500 MHzのNMR装置（ADVANCE DRX500、ブルカー・バイオスピン株式会社、横浜）を用い積算回数は128回とした。その結果、3種類のHPLC精製物のNMRチャートは、市販の特級アセチルコリン塩酸塩、合成したプロピオニルコリン、ブチリルコリンと同一であり、アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンであると同定された。

[0059] 発酵キョウバク血管拡張成分の質量分析

3種類のHPLC精製物に対しMALDI-TOF/MS分析を行った。得られた分取物について、それぞれの凍結乾燥物 (0.01 mg) を0.1%TFA含有50%アセトニトリル (15 μ L) で溶解し測定用サンプルとした。サンプルとMatrixである2,5-ジヒドロキシ安息香酸の0.1%TFA含有50%アセトニトリル溶液 (7500、1500、750 μ g/mL) をそれぞれ1 μ Lずつプレート上で混合しデシケーターで乾燥させた。MALDI-TOF MS分析は、MALDI-TOF MS質量分析装置 (AB SCIEX TOF/TOF 5800、株式会社エービー・サイエックス、東京) を用い、リフレクターモード、スキャンレンジ10~300 m/z、レーザー強度5500 eVで行った。その結果、アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンの精密質量に該当する、146.1182 m/z (理論値 : 146.1176) 、160.1337 m/z (理論値 : 160.1332) 、174.1497 m/z (理論値 : 174.1489) がそれぞれ観測された。

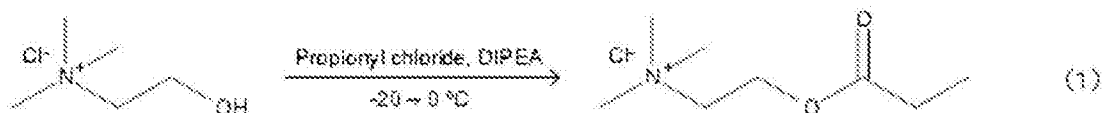
[0060] 発酵キョウバク血管拡張物質の特徴付け

標準物質合成

単離、精製されたアセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンの各塩酸塩の標準物質として、アセチルコリンは市販の特級アセチルコリン塩酸塩を、プロピオニルコリン、ブチリルコリンは当研究室で合成しHPLCで精製し塩酸塩として凍結乾燥したものをを用いた。プロピオニルコリンおよびブチリルコリンは、下記、式 (1) および式 (2) で示される合成チャートに従って合成することができる。

[0061] プロピオニルコリンの合成

[0062] [化1]

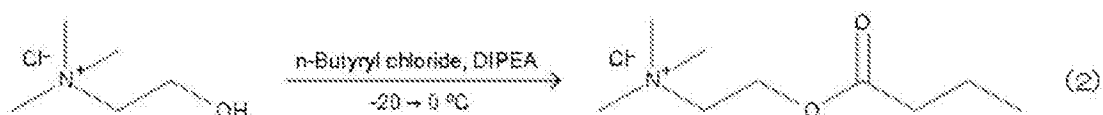


[0063] プロピオニルコリンの合成 : コリン塩酸塩 (0.42 g、3.0 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (DMF、6.0 mL) に溶解させ、プロピオン酸クロライド (0.56 g、6.0 mmol) 、およびジイソプロピルエチルアミン (DIPEA、0.78 g、4.5 mmol) を加えて0°Cから室温に戻し、1時間反応させた。反応終了後、DMF

を留去し、ジクロロメタン (DCM) -酢酸エチル (1:1) で生成物を沈殿させた。沈殿をDCM-酢酸エチル (5:1) で再結晶したものをさらにDCMで再結晶し、白色粉末のプロピオニルコリン塩酸塩を得た。収率92%、 ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ (ppm) : 0.96 (3H, t, $J = 7.8$ Hz, CH_3) , 2.32 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, CH_2) , 3.08 (9H, s, CH_3) , 3.60 (2H, t, $J = 2.5$ Hz, CH_2) , 4.42 (2H, t, $J = 2.3$ Hz, CH_2)

[0064] ブチリルコリンの合成

[0065] [化2]



[0066] ブチリルコリンの合成：コリン塩酸塩 (0.42 g, 3.0 mmol) をDMF (6.0 mL) に溶解させ、ブチリル酸クロライド (0.62 g, 6.0 mmol) 、およびDIPEA (0.78 g, 4.5 mmol) を加えて0℃から室温に戻し、1時間反応させた。反応終了後、DMFを留去し、DCM-酢酸エチル (1:1) で生成物を沈殿させた。沈殿をDCM-酢酸エチル (5:1) で再結晶したものをさらにDCMで再結晶し、白色粉末のブチリルコリン塩酸塩を得た。収率89%、 ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ (ppm) : 0.78 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_3) , 1.49 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, CH_2) , 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_2) , 3.08 (9H, s, CH_3) , 3.60 (2H, t, $J = 2.3$ Hz, CH_2) , 4.43 (2H, t, $J = 2.3$ Hz, CH_2)

[0067] 使用実験動物

動物実験は、信州大学動物実験ガイドラインに従って行った。本試験では、実験動物として雄性10-13週齢の高血圧自然発症ラット (SHR/NCrlCrlj、日本チャールスリバー、横浜) を用いた。SHRは、個別のケージ中で、明暗周期12時間、室温22-23℃に制御された飼育室で飼育した。順化飼育では、ラット用標準飼料 (MF ; チャールスリバー株式会社) および水道水を自由摂取とした。SHRは、京都大学の動物実験センターで飼育されていたWistar-Kyoto系ラットの中から選択交配で1963年に分離されたラット系統である。高血圧自然

発症ラットもしくは本態性高血圧ラットと呼ばれ、分離母体であるWistar-Kyotoの収縮期血圧は成熟雄が約135 mmHg、同雌が約132 mmHgであるのに対し、SHRの血圧は生後2ヶ月までにほぼ全例が150 mmHg以上となり、4-5ヶ月でほぼ最高に達し、多くは180-210 mmHgを示す。一般的にはヒトの高血圧の約90%を占めるとされる本態性高血圧のモデル動物として、薬理作用や食品機能、血圧上昇メカニズムの解明に用いられている。

[0068] 発酵キョウバク血管拡張成分含有物の血管等尺性張力測定

試験に用いた胸部大動脈は雄性10-12週齢SHRから摘出し、結合組織を除去後、長さ2-3 mmに切断してリング標本を作製した。作製したリング標本は、95%O₂-5%CO₂混合ガスを通気した37℃のクレブス溶液（119 mM NaCl/4.7 mM KCl/1.1 mM KH₂PO₄/1.2 mM MgSO₄/25 mM NaHCO₃, pH7.4）を満たしたオーガンバスに取り付け、1.5 gの静止張力を負荷した（UFER UC-05A; いわしや岸本医科産業, 京都）。血管張力は、UFER UM-203トランスデューサー（いわしや岸本医科産業）により計測した。取り付けから60分間のインキュベーション後、リング標本は収縮剤であるフェニレフリン（終濃度0.30 μM）を用いて収縮させた。収縮させたリング標本には内皮依存性血管拡張剤である市販アセチルコリン（終濃度100 μM）を添加し、血管拡張作用の有無により血管内皮の有無を判断した。その後、薬剤を除去するためクレブス液でリング標本を洗浄し、10分間静止張力でインキュベートした後、再び0.30 μMフェニレフリンにより収縮させた。この操作を2回繰り返した後、0.30 μMフェニレフリンを再度添加し、収縮が最大に達したことを確認して、クレブス溶液に溶解させた各サンプルを終濃度10⁻⁹、10⁻⁸、10^{-7.5}、10⁻⁷、10^{-6.5}、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ Mになるように累積添加した。血管拡張作用（拡張率、%）は、フェニレフリンにより収縮した際の血管張力を基準として表した。精製アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンの血管等尺性張力試験結果を図6に示した。

[0069] 精製アセチルコリンは10⁻⁹ Mの添加で1.52%の拡張率を示し、それ以降10⁻⁶ Mまで用量依存の拡張反応を示したが、それ以上の高濃度ではやや収縮した。最大拡張率は10⁻⁶ Mの添加で89.9%と低用量で高い拡張を確認した。EC₅₀は2.72

$\times 10^{-8}$ Mであった。また、精製プロピオニルコリンは 10^{-7} Mから拡張反応を示し、 10^{-4} Mで最大拡張率は95.2%、 EC_{50} は 2.27×10^{-6} Mであった。一方、精製ブチリルコリンは 10^{-4} M添加で7.14%拡張と、アセチルコリンやプロピオニルコリンと比較すると、弱い拡張作用であった。市販アセチルコリンおよび合成プロピオニルコリン、ブチリルコリンも同様な血管拡張作用を示した。以上の結果から、発酵キョウバクから単離精製したアセチルコリンおよびプロピオニルコリンは強い血管拡張作用を有していることが明らかとなった。

[0070] 発酵キョウバク血管拡張成分含有物の単回経口投与試験

単回経口投与試験は、体重280-320 gの雄性12週齢SHRを用いて行った。1週間の馴化飼育後、12時間絶食させ、サンプルを単回経口投与した。投与サンプルは純水に溶解させ、 10^{-11} mol/kg (b.w.) の用量でそれぞれ6匹のSHRに単回経口投与した。精製アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリン投与サンプル水溶液のpHは、それぞれ4.7、4.3、4.4の酸性であった。対照群には純水を投与した。収縮期血圧および拡張期血圧変化は非観血式血圧測定器Softron BP-98A（ソフトロン株式会社、東京）を用いてテイルカフ法により、試料投与前および投与後3、6、9、24時間後に測定した。精製アセチルコリン、プロピオニルコリン、ブチリルコリンの単回経口投与試験結果を図7に示した。

[0071] その結果、アセチルコリン投与群は投与9時間後にコントロール群と比較して有意な収縮期血圧低下作用 ($p < 0.01$) を引き起し、この時の最大血圧降下作用は24.7 mmHgであった。また、プロピオニルコリン投与群では、投与9時間後に最大8.05 mmHgの有意な収縮期血圧低下 ($p < 0.05$) が確認された。一方、ブチリルコリン投与群では、 10^{-11} mol/kgでは有意な血圧低下を確認することができなかった。市販アセチルコリンおよび合成プロピオニルコリン、ブチリルコリンも同様な降圧作用を示した。

実施例 5

[0072] ラクチルコリン、レブリルコリンの単離精製

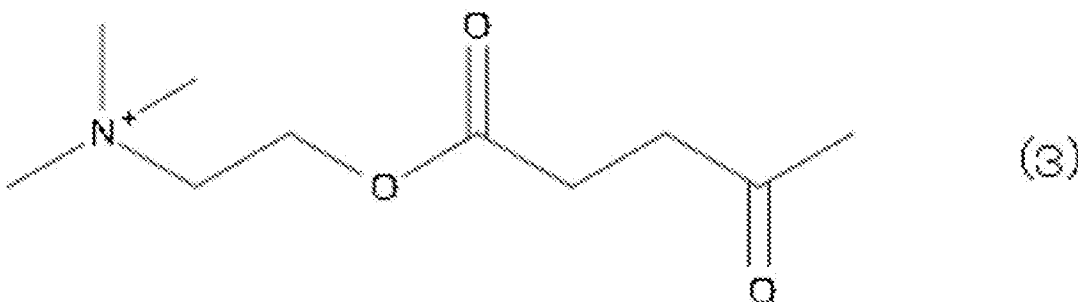
実施例3に記載の方法により、天然物としては初の、ラクチルコリンを特

定した。

ラクチルコリンのLC-MS分析試験におけるマススペクトルを図8-1に、LC-MS/MS分析試験におけるマススペクトル図8-2に、それぞれ示した。

さらに、新規化合物であると考えられる、下記、式(3)で表されるレブリルコリンを単離、精製した。

[0073] [化3]



[0074] レブリルコリンのLC-MS分析試験におけるマススペクトルを図9-1に、LC-MS/MS分析試験におけるマススペクトル図9-2に、それぞれ示した。

実施例 6

[0075] 発酵キョウバクおよび他の発酵食品中の第4級アルキルアンモニウム化合物のLC-MS/MS分析

発酵キョウバク、黒酢、ヨーグルト、日本酒に含まれる第4級アルキルアンモニウム化合物のLC-MS分析を行った。各凍結乾燥物（発酵キョウバク1 g、黒酢、ヨーグルト、納豆、日本酒各10 g）を乳鉢に量り取り、内部標準としてカルバコールを1 mg加えた。アセトンを30 mL加え3分間攪拌し、上清を50 mL容遠沈管に採取後、遠心分離（4℃、1811 g、10min）し、上清を得た。残渣に再びアセトン30 mLを加え攪拌し、遠心分離、上清採取という操作をさらに4回繰り返し、アセトン抽出物を得た。アセトン抽出物を減圧濃縮後、凍結乾燥し、純水（2.5 mL）で溶解し固相抽出カートリッジ（GL Science InertSep PH、5 g）（登録商標）を用いて固相抽出を行った。固相抽出では、まず、メタノール（30 mL）で活性化、0.01%ギ酸含有水（30 mL）で洗浄し、純水で平衡化（30 mL）後、サンプルを添加した。純水（30 mL）で夾雑物を除

去し、0.01%ギ酸含有水（30 mL）で溶出して第4級アルキルアンモニウム化合物を含む固相抽出物を得た。固相抽出物は、減圧濃縮、凍結乾燥した後、分析溶媒（0.01%ギ酸-33%メタノール含有水、1 mL）に溶解させLC-MS分析を行った。化合物の定量は、発酵キョウバクで特定された第4級アルキルアンモニウム化合物の質量電荷比をシングルイオンモニタリング（SIM）モードで指定して行った。化合物で指定した質量電荷比は、アセチルコリン：146.1、プロピオニルコリン：160.1、ブチリルコリン：174.2、ラクチルコリン：176.1、レプリルコリン：202.1、ホスホコリン：184.1、カルニチン：162.1、メチルカルニチン：176.1、トリメチルグリシン：118.1、メチルトリメチルグリシン：132.1、エチルトリメチルグリシン：146.1、プロピオニルトリメチルグリシン：160.1である。その他の分析条件は、前出の発酵キョウバク血管拡張成分のLC-MS分析と同様である。第4級アルキルアンモニウム化合物の定量結果を表2に示す。各化合物含量は、内部標準の定量結果を用いて精製過程での物質損失を補正し、新鮮重量100 g（100gFW）中の各第4級アルキルアンモニウム化合物含量をアセチルコリン当量で表した。

[0076] [表2]

表2. 発酵食品中第4級アルキルアンモニウム化合物定量結果(μg/100gFWアセチルコリン当量)

第4級アルキルアンモニウム化合物	発酵キョウバク	黒酢	ヨーグルト	納豆	日本酒
アセチルコリン	236.8	11.8	5.8	1.1	41.7
プロピオニルコリン	457.9	27.3	1576.5	95.2	134.0
ブチリルコリン	94.4	24.1	N.D.	66.4	16.8
ラクチルコリン	37.3	10.7	10.5	37.5	7.5
レプリルコリン	31.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ホスホコリン	16.1	9.7	11.7	11.7	2.7
カルニチン	164.1	10.8	127.0	21.7	9.8
メチルカルニチン	9.4	N.D.	3.2	39.0	12.2
トリメチルグリシン	23.8	30.8	98.6	3447.8	13.9
メチルトリメチルグリシン	76.1	30.8	3.5	12622.1	20.7
エチルトリメチルグリシン	147.7	6.78	3.1	33.2	48.2
プロピオニルトリメチルグリシン	217.4	N.D.	4.2	88.1	N.D.

ND: 不検出(検出限界以下)

産業上の利用可能性

[0077] 本発明の発酵食品抽出物は、顕著な血圧降下作用を有しており、これを活性成分として含有させることにより、機能性健康食品あるいは高血圧症等の治療用医薬品を製造することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 発酵食品抽出組成物であって、少なくとも、アセチルコリンおよびプロピオニルコリンを含有し、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示す、発酵食品抽出組成物。
- [請求項2] 発酵食品が、発酵キョウバク、黒酢、ヨーグルト、納豆、日本酒の群から選ばれる一種である、請求項1に記載の抽出組成物。
- [請求項3] 発酵食品が、発酵キョウバクである、請求項2に記載の抽出組成物。
- [請求項4] さらに、ブチリルコリン、ラクチルコリン、レブリルコリン、カルニチン、メチルカルニチン、トリメチルグリシン（ベタイン）、メチルトリメチルグリシン、エチルトリメチルグリシン、プロピオニルトリメチルグリシンおよびホスホコリンの群から選ばれる少なくとも1種を含有する、請求項1に記載の抽出組成物。
- [請求項5] 請求項1～4の何れかに記載の抽出組成物を活性成分として含有する食品または医薬品組成物。
- [請求項6] さらに、チロシンおよびγ-アミノ酪酸（GABA）の群から選ばれる少なくとも1種を活性成分として含有する請求項5に記載の食品または医薬品組成物。
- [請求項7] さらに、乳酸、酢酸およびクエン酸の群から選ばれる少なくとも1種を含有する請求項5または6に記載の食品または医薬品組成物。
- [請求項8] （1）発酵キョウバクの凍結乾燥物または濃縮物をアセトンに懸濁し、振とう攪拌後、遠心分離して得た上清を減圧濃縮する工程（工程1）、
- （2）当該減圧濃縮物を、フェニル基が結合した担体を充填した固相抽出カートリッジを用い、溶出液として、酸含有水を用いて溶出する工程（工程2）、
- （3）当該溶出物を、ペンタフルオロフェニル基が結合した担体を充填したカラム（PFPカラム）を用い、移動相として、酸性メタノール

含有水を用いて分画、精製する工程（工程３）

を含む工程からなることを特徴とする、請求項１記載の発酵食品抽出組成物の製造方法。

[請求項９] （１）工程２で、固相抽出カートリッジとして、固相抽出カートリッジ（GL Science InertSep PH）（登録商標）を用い、溶出液として、０.０１％ギ酸含有水を用い、

（２）工程３で、逆相カラムとして、ＰＦＰカラム（YMC-Triart PFP）を用い、移動相として、０.０１％ギ酸-３３％メタノール含有水を用いることを特徴とする、請求項８に記載の製造方法。

[請求項１０] 請求項８または９に記載の製造方法によって製造される、少なくとも、アセチルコリンおよびプロピオニルコリンを含有し、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示すことを特徴とする、発酵食品抽出組成物。

補正された請求の範囲
[2015年7月22日(22.07.2015)国際事務局受理]

- [請求項 1] (補正後) 発酵食品抽出組成物であって、少なくとも、アセチルコリンならびにプロピオニルコリンおよび／またはラクチルコリンを含有し、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示す、発酵食品抽出組成物。
- [請求項 2] 発酵食品が、発酵キョウバク、黒酢、ヨーグルト、納豆、日本酒の群から選ばれる一種である、請求項 1 に記載の抽出組成物。
- [請求項 3] 発酵食品が、発酵キョウバクである、請求項 2 に記載の抽出組成物。
- [請求項 4] (補正後) さらに、ブチリルコリン、レブリルコリン、カルニチン、メチルカルニチン、トリメチルグリシン(ベタイン)、メチルトリメチルグリシン、エチルトリメチルグリシン、プロピオニルトリメチルグリシンおよびホスホコリンの群から選ばれる少なくとも 1 種を含有する、請求項 1 に記載の抽出組成物。
- [請求項 5] 請求項 1～4 の何れかに記載の抽出組成物を活性成分として含有する食品または医薬品組成物。
- [請求項 6] さらに、チロシンおよびγ-アミノ酪酸(GABA)の群から選ばれる少なくとも 1 種を活性成分として含有する請求項 5 に記載の食品または医薬品組成物。
- [請求項 7] さらに、乳酸、酢酸およびクエン酸の群から選ばれる少なくとも 1 種を含有する請求項 5 または 6 に記載の食品または医薬品組成物。
- [請求項 8] (1) 発酵キョウバクの凍結乾燥物または濃縮物をアセトンに懸濁し、振とう攪拌後、遠心分離して得た上清を減圧濃縮する工程(工程 1)、
(2) 当該減圧濃縮物を、フェニル基が結合した担体を充填した固相抽出カートリッジを用い、溶出液として、酸含有水を用いて溶出する工程(工程 2)、
(3) 当該溶出物を、ペンタフルオロフェニル基が結合した担体を充

填したカラム（PFP カラム）を用い、移動相として、酸性メタノール含有水を用いて分画、精製する工程（工程 3）を含む工程からなることを特徴とする、請求項 1 記載の発酵食品抽出組成物の製造方法。

[請求項 9] （１）工程 2 で、固相抽出カートリッジとして、固相抽出カートリッジ（GL Science InertSep PH）（登録商標）を用い、溶出液として、0.01%ギ酸含有水を用い、

（２）工程 3 で、逆相カラムとして、PFP カラム（YMC-Triart PFP）を用い、移動相として、0.01%ギ酸-33%メタノール含有水を用いることを特徴とする、請求項 8 に記載の製造方法。

[請求項 10] （補正後） 請求項 8 または 9 に記載の製造方法によって製造される、少なくとも、アセチルコリンならびにプロピオニルコリンおよび／またはラクチルコリンを含有し、経口投与において、血圧降下作用および血管拡張作用を示すことを特徴とする、発酵食品抽出組成物。

[図1]

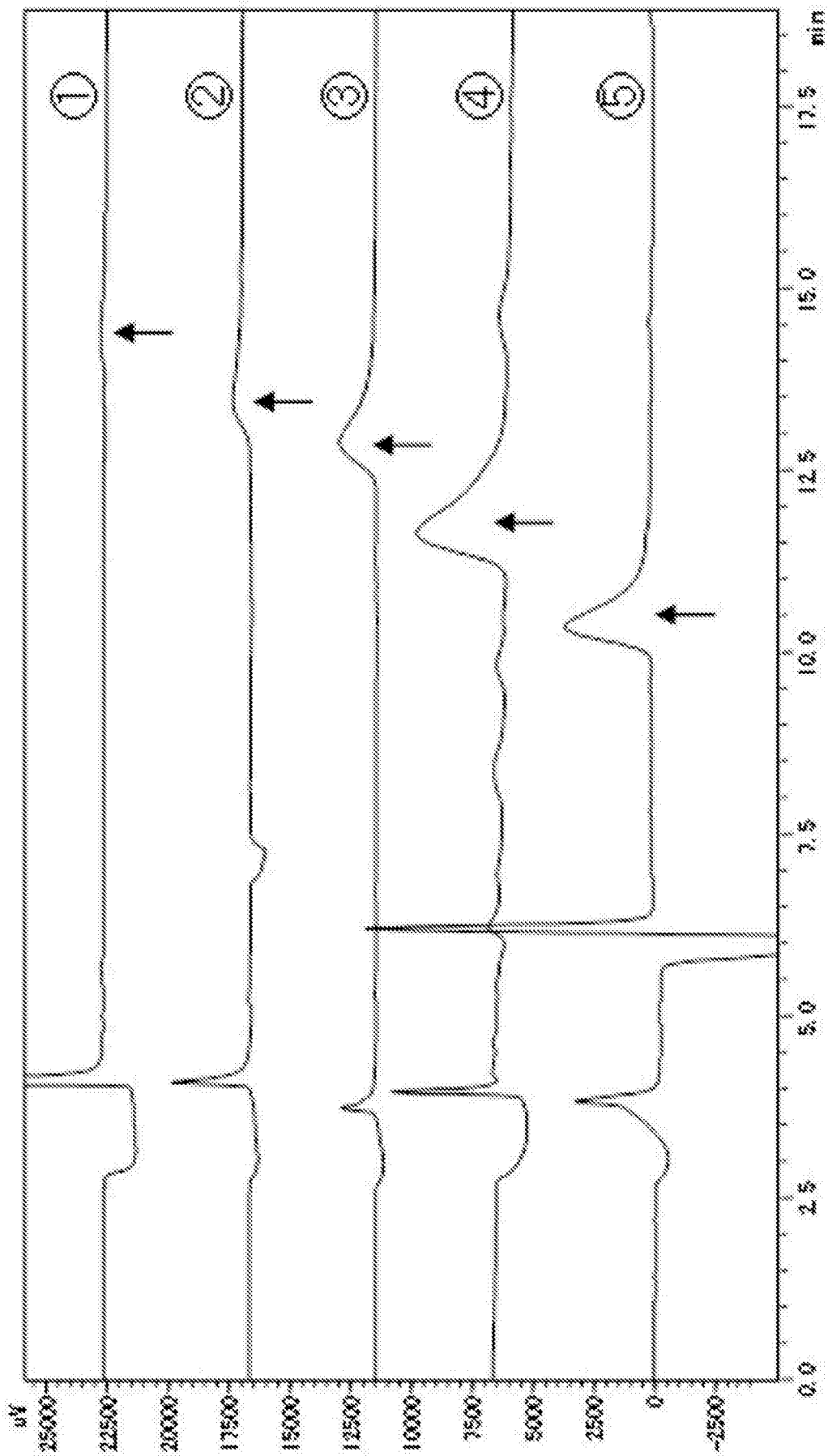


図1. メタノール含量変化に伴うアセチルコリンの溶出挙動変化
①0% ②15% ③30% ④45% ⑤60%

[図2]

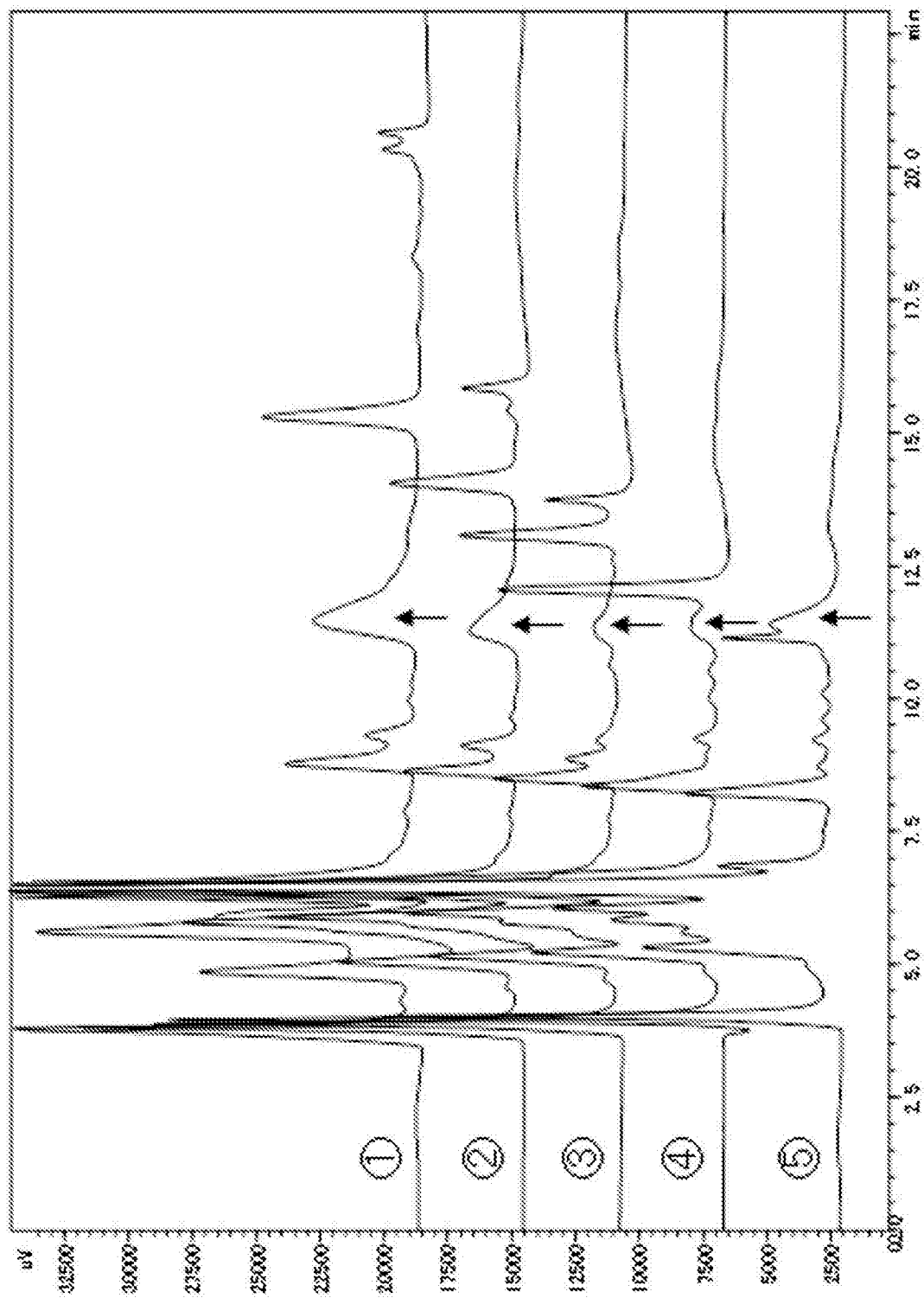


図2. 酸含量変化に伴うアセチルコリンの溶出挙動変化(50%メタノール)

①0.0002% ②0.0004% ③0.0006% ④0.0008% ⑤0.01%

[図3]

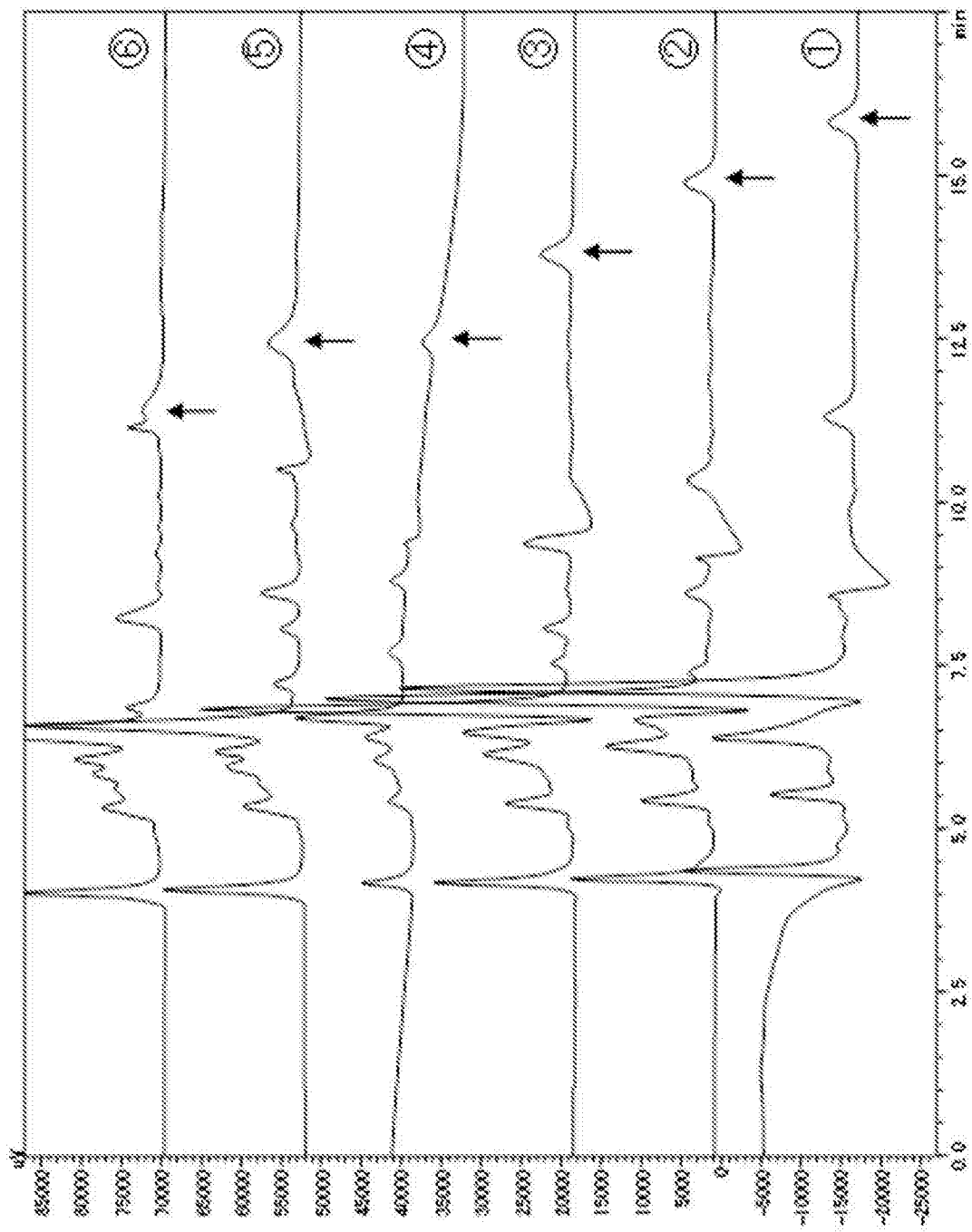


図3. メタノール含量変化に伴う発酵キヨウバク精製物中アセチルコリンの溶出挙動(0.01%干酸) ①50% ②45% ③40% ④35% ⑤30% ⑥25%

[図4]

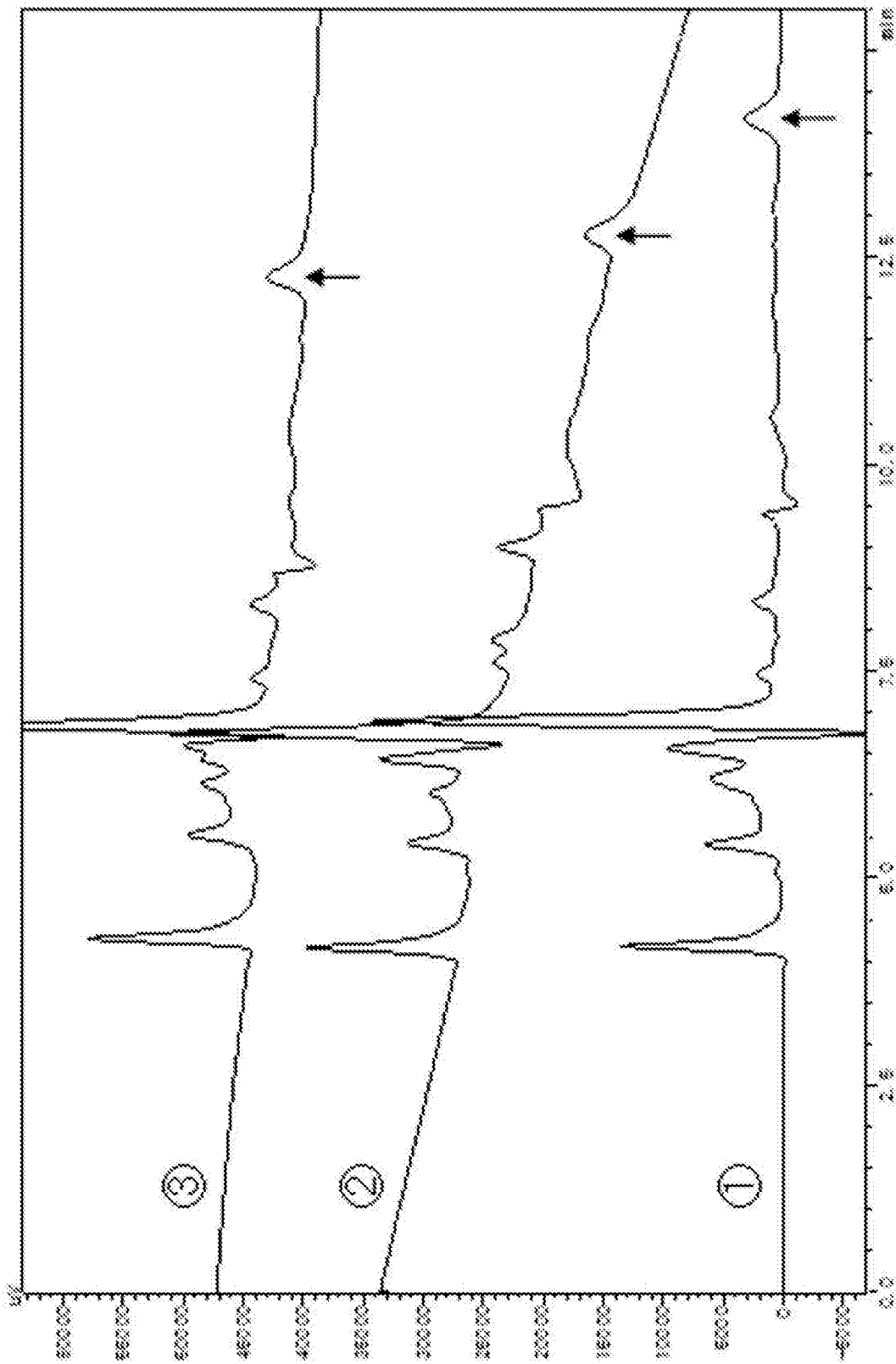


図4. 微量メタノール含量変化に伴う発酵キョウバク精製物中アセチルコリンの
溶出挙動(0.01%ギ酸) ①38% ②36% ③33%

[図5]

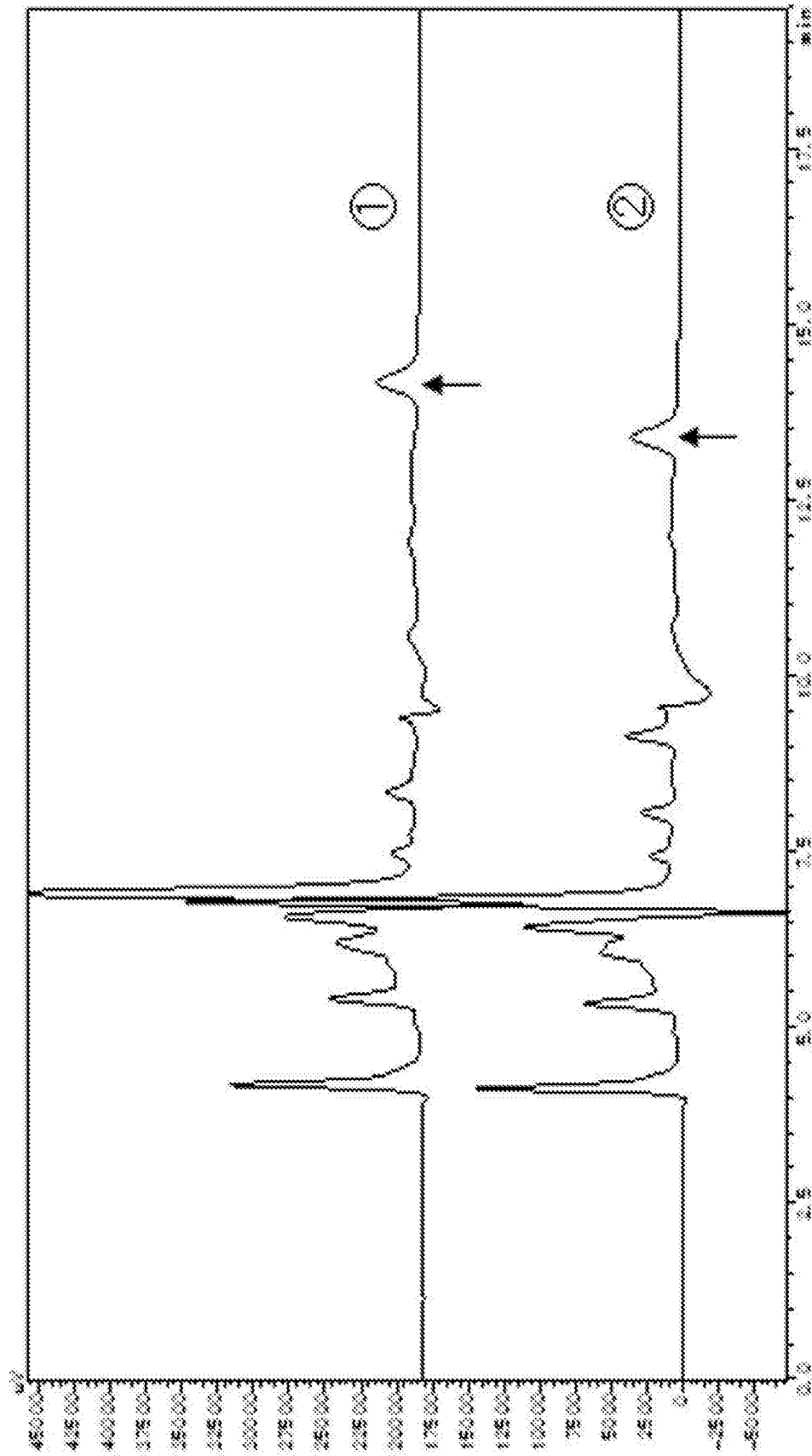


図5. 分離温度に伴う発酵キョウバク精製物中アセチルコリンの溶出挙動(0.01%ギ酸-33%メタノール含有水) ①30°C ②40°C

[図6]

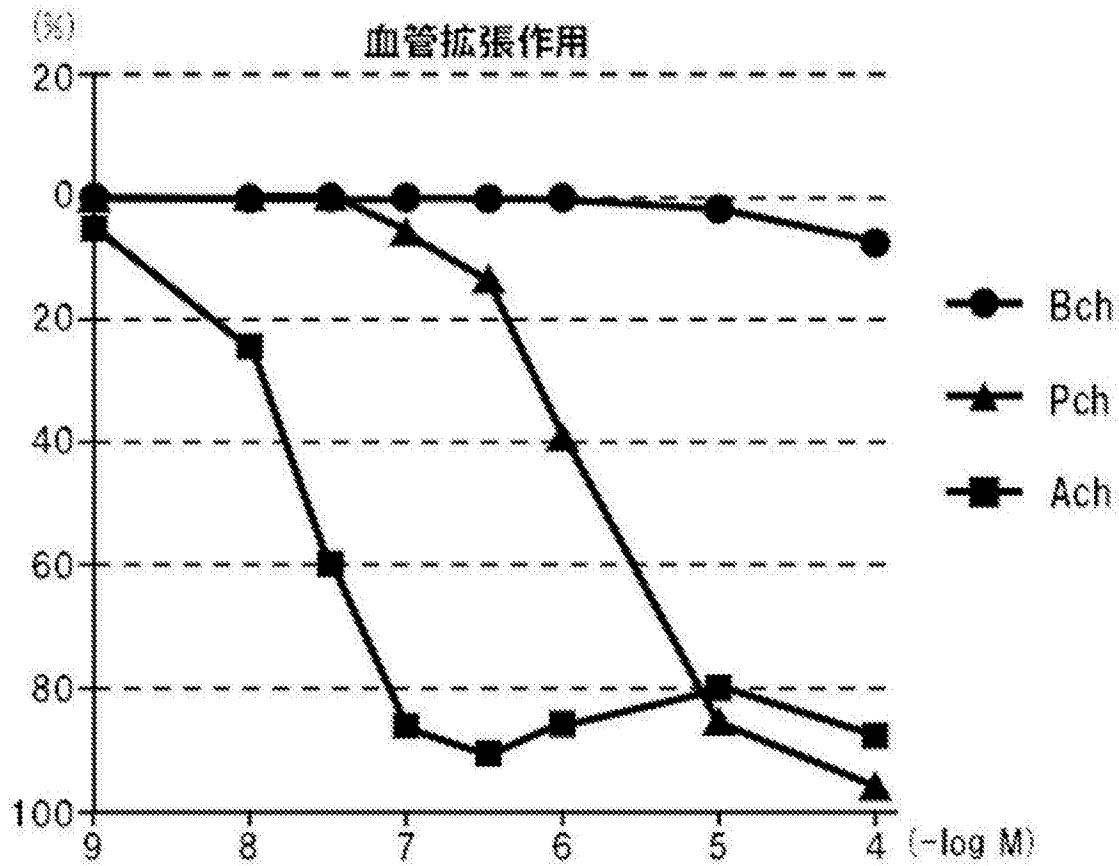


図6. 同定コリン化合物の血管等尺性張力測定試験結果

[図7]

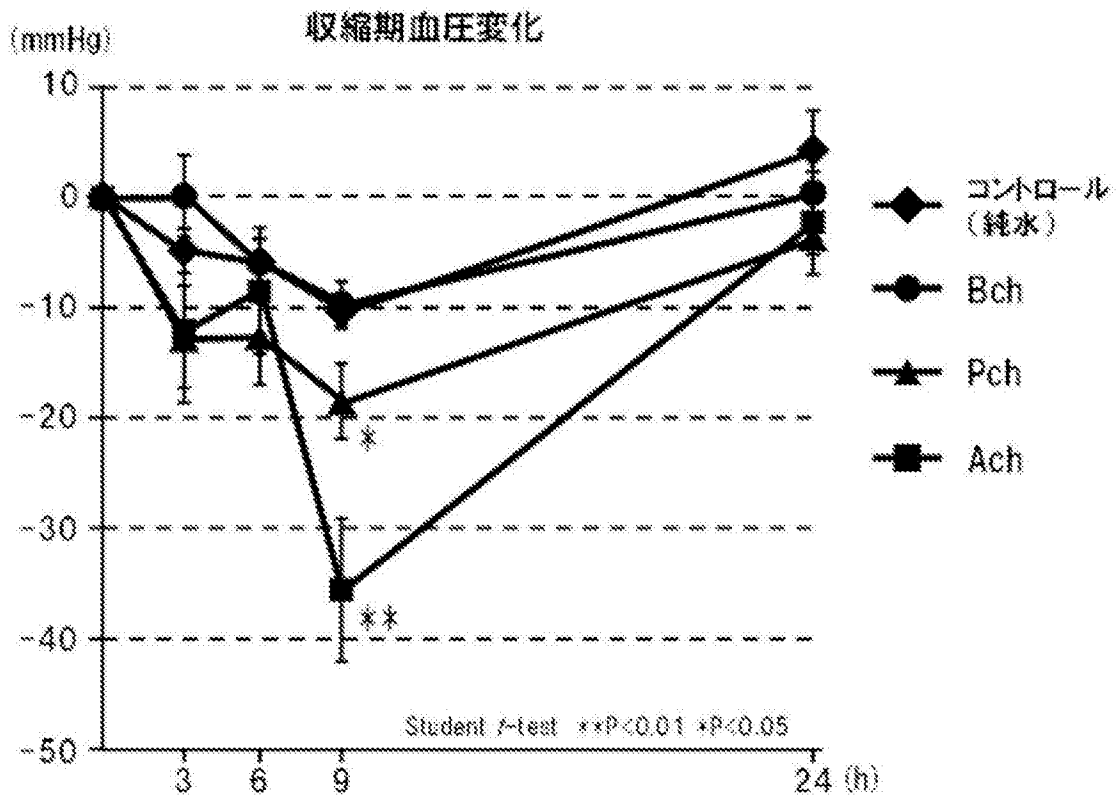


図7. 同定コリン化合物投与後の拡張期血圧変化

[図8-1]

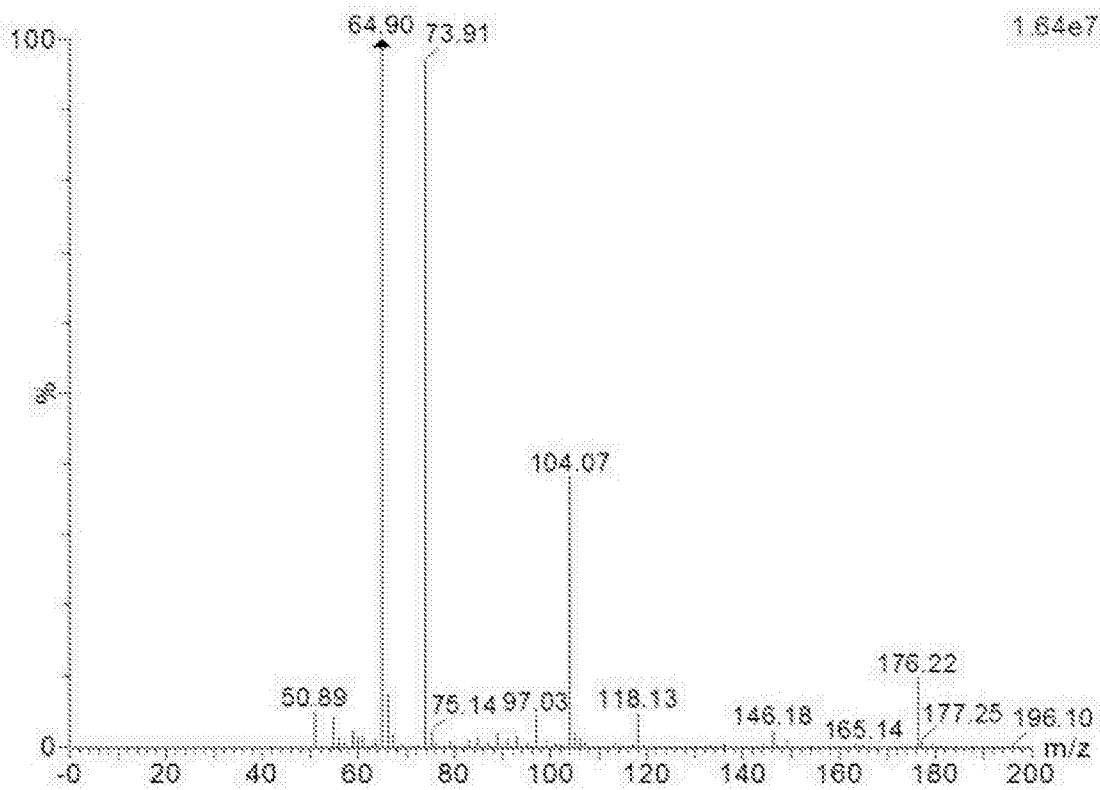


図8-1. ラクチルコリンのLC-MSスペクトル

[図8-2]

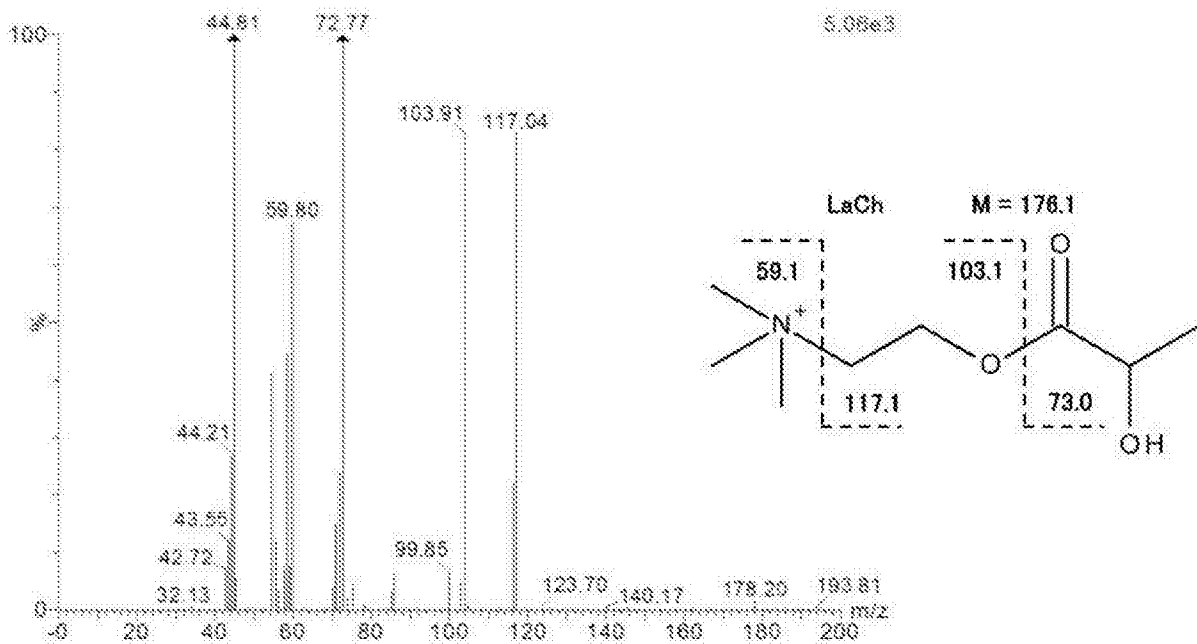


図8-2. ラクチルコリンのLC-MS/MSスペクトル

[図9-1]

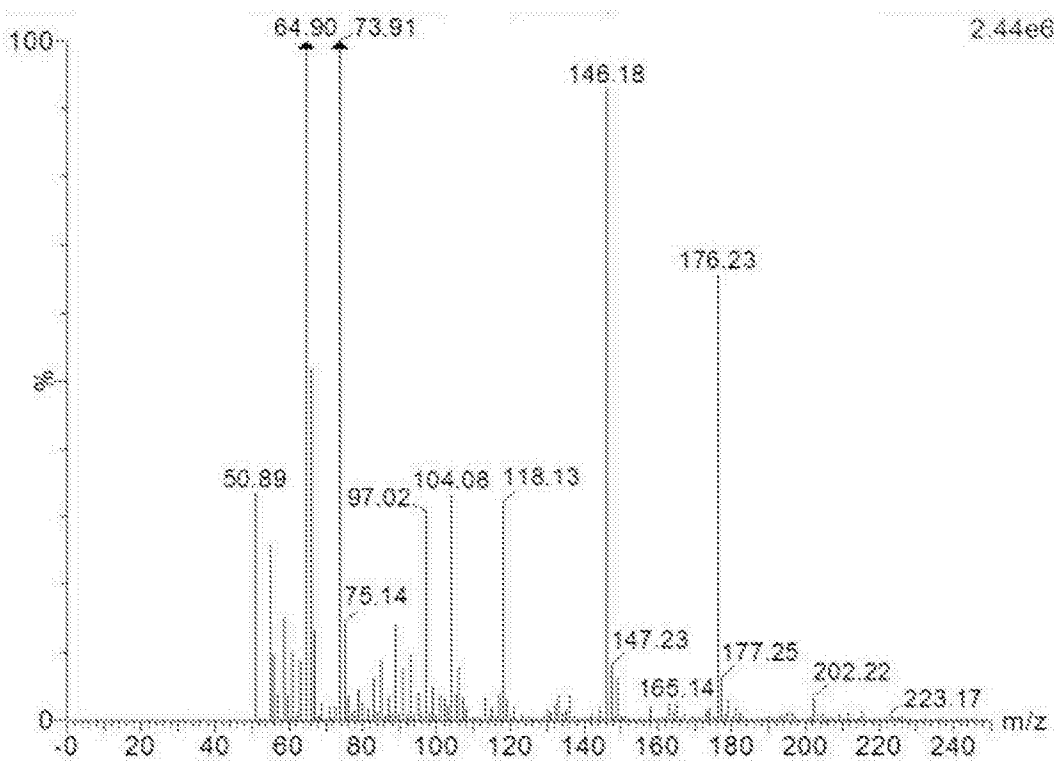


図9-1. レブリルコリンのLC-MSスペクトル

[図9-2]

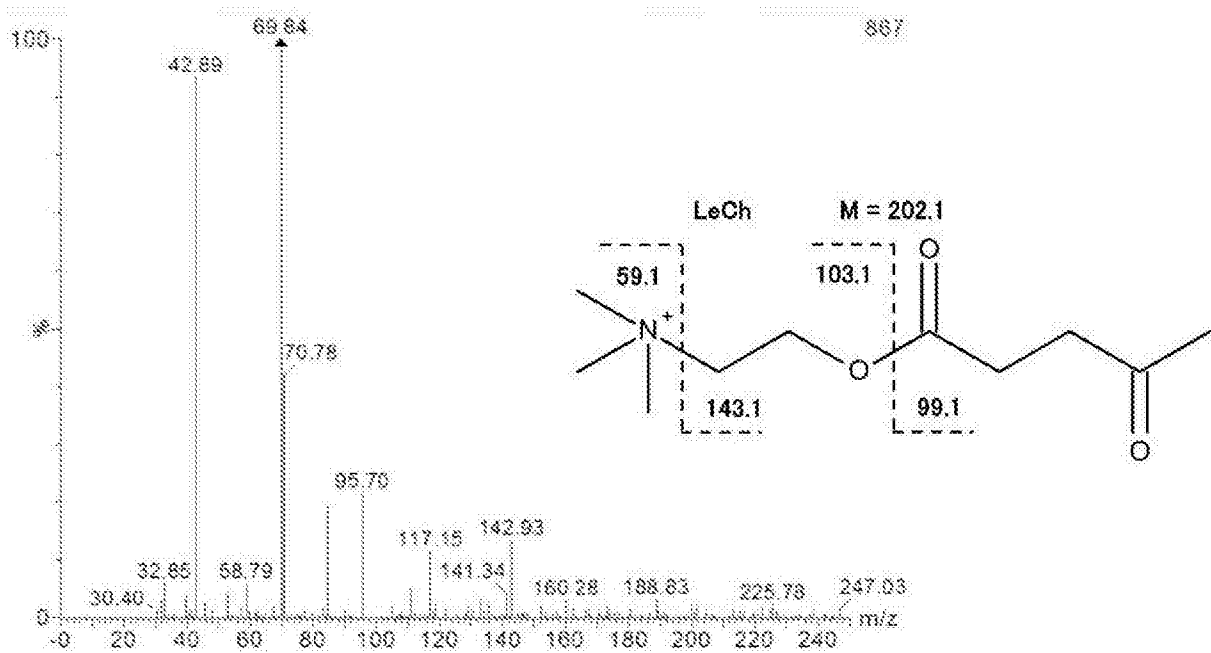


図9-2. レブリルコリンのLC-MS/MSスペクトル

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/221(2006.01)i, A23L1/29(2006.01)i, A61K31/19(2006.01)i, A61K31/194(2006.01)i, A61K31/197(2006.01)i, A61K31/198(2006.01)i, A61K31/205(2006.01)i, A61K36/70(2006.01)i, A61P9/08(2006.01)i, A61P9/12(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)

A61K31/221, A23L1/29, A61K31/19, A61K31/194, A61K31/197, A61K31/198, A61K31/205, A61K36/70, A61P9/08, A61P9/12, A61P43/00

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Masahiro KOYAMA et al., "Koketsuatsu Shizen Hassho Rat ni Okeru Hakko Kyobaku no Ketsuatsu Josho Yokusei Sayo", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu (Web), 05 March 2014 (05.03.2014), vol.2014, page 3B03a16, particularly, lines 1 to 2, 15 to 24	1-7
X	Masahiro KOYAMA et al., "Soba Shokubutsutai o Genryo to shita Hakko Shokuhin ga Seitainai ACE Kassei ni Oyobosu Eikyo", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu, 2010, vol.2010, page 176, particularly, lines 1 to 2	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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

"T" 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
15 May 2015 (15.05.15)

Date of mailing of the international search report
26 May 2015 (26.05.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059578

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-162503 A (Shinshu University), 30 August 2012 (30.08.2012), particularly, claims; paragraphs [0001], [0002] (Family: none)	8-10
Y	JP 2008-239498 A (Shinshu University), 09 October 2008 (09.10.2008), particularly, claims; paragraph [0001] (Family: none)	8-10
Y	Masahiro KOYAMA et al., "Hakko Kyobaku ni Fukumareru Yuko Seibun no Dotei to Koatsu Sayo", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry Taikai Koen Yoshishu (Web), 2013, vol.2013, page 2A15P08, entire text	8-10
A	JP 2007-143473 A (Nikkoku Seifun Co., Ltd.), 14 June 2007 (14.06.2007), (Family: none)	1-10
A	JP 2005-304355 A (Kabushiki Kaisha Kaiyo Bokujo), 04 November 2005 (04.11.2005), (Family: none)	1-10
A	JP 4-334323 A (Orion Machinery Co., Ltd.), 20 November 1992 (20.11.1992), (Family: none)	1-10
A	KOYAMA M.et al,Purification and identification of antihypertensive peptides from fermented buckwheat sprouts., Journal of Agricultural and Food Chemistry,2013, 61(12), p. 3013-3021	1-10
P,A	KOYAMA M.et al,Blood pressure-lowering peptides from neo-fermented buckwheat sprouts:A new approach to estimating ACE-inhibitory activity., PLoS One, SEP.2014,9(9), p. Article No.: e105802	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/059578

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P43/00(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K31/221(2006.01)i, A23L1/29(2006.01)i, A61K31/19(2006.01)i, A61K31/194(2006.01)i, A61K31/197(2006.01)i, A61K31/198(2006.01)i, A61K31/205(2006.01)i, A61K36/70(2006.01)i, A61P9/08(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K31/221, A23L1/29, A61K31/19, A61K31/194, A61K31/197, A61K31/198, A61K31/205, A61K36/70, A61P9/08, A61P9/12, A61P43/00

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

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）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)

C. 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
X	小山正浩他, 高血圧自然発症ラットにおける発酵キョウバクの血圧上昇抑制作用, 日本農芸化学会大会講演要旨集(Web), 2014. 03. 05, Vol. 2014, p. 3B03a16 特に第 1~2 行、第 15~24 行	1-7
X	小山正浩他, ソバ植物体を原料とした発酵食品が生体内ACE活性に及ぼす影響, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2010, Vol. 2010, p. 176 特に第 1~2 行	1-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「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
「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
「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）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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
「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
「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
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 6 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（ISA/J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

六笠 紀子

4 U

9 7 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

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
Y	JP 2012-162503 A (国立大学法人信州大学) 2012. 08. 30, 特に特許請求の範囲、段落【0001】、【0002】 (ファミリーなし)	8-10
Y	JP 2008-239498 A (国立大学法人信州大学) 2008. 10. 09, 特に特許請求の範囲、段落【0001】 (ファミリーなし)	8-10
Y	小山正浩他, 発酵キョウバクに含まれる有効成分の同定と降圧作用, 日本農芸化学会大会講演要旨集(Web), 2013, Vol. 2013, p. 2A15P08 文献全体	8-10
A	JP 2007-143473 A (日穀製粉株式会社) 2007. 06. 14, (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2005-304355 A (株式会社海洋牧場) 2005. 11. 04, (ファミリーなし)	1-10
A	JP 4-334323 A (オリオン機械株式会社) 1992. 11. 20, (ファミリーなし)	1-10
A	KOYAMA M. et al, Purification and identification of antihypertensive peptides from fermented buckwheat sprouts., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(12), p. 3013-3021	1-10
P, A	KOYAMA M. et al, Blood pressure-lowering peptides from neo-fermented buckwheat sprouts: A new approach to estimating ACE-inhibitory activity., PLoS One, SEP. 2014, 9(9), p. Article No.: e105802	1-10