(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
2011 年 9 月 1 日(01.09.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/105465 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/327 (2006.01) *A61P 17/16* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/054069

(22) 国際出願日: 2011 年 2 月 24 日(24.02.2011)

(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 2010-038455 2010 年 2 月 24 日(24.02.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北海道大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 生方　信 (UBUKATA Makoto). 永松　龍一郎(NAGAMATSU Ryuichiro). 三橋　進也(MITSUHASHI Shinya).

(74) 代理人: 津国　肇(TSUKUNI, Hajime); 〒1000013 東京都千代田区霞が関３－７－１　霞が関東急ビル 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2011/105465 A1

(54) **Title**: MAILLARD REACTION INHIBITOR, α-DICARBONYL COMPOUND DECOMPOSING AGENT, AND METHOD FOR INHIBITING THE MAILLARD REACTION

(54) 発明の名称 : メイラード反応抑制剤、α－ジカルボニル化合物分解剤、およびメイラード反応抑制方法

(57) **Abstract**: Disclosed is a novel Maillard reaction inhibitor producing highly effective inhibition of the Maillard reaction, and a method for using same. The Maillard reaction inhibitor has as an active ingredient at least one terpene peroxide.

(57) 要約: 本発明は、優れたメイラード反応抑制効果を発揮する新規なメイラード反応抑制剤及びその使用方法を提供することを目的とする。本発明は、少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するメイラード反応抑制剤を提供する。

明　細　書

発明の名称 ：

メイラード反応抑制剤、α－ジカルボニル化合物分解剤、およびメイラード反応抑制方法

技術分野

[0001] 本発明は、メイラード反応抑制剤、α－ジカルボニル化合物分解剤、およびメイラード反応抑制方法に関する。

背景技術

[0002] メイラード反応は、古くから食品などの褐変化反応として知られており、アミノ酸、タンパク質、ペプチド等のアミノ基と、還元糖などのカルボニル基が非酵素的に結合する反応であって、この反応は初期段階と後期段階とに分けられている（Drug Discovery Today, 11, 646-654 (2006)）。

[0003] 初期段階は、アミノ基とカルボニル基とが反応しシッフ塩基を形成することから始まり、１，２－エナミノールを経てケトアミンなどのアマドリ化合物を形成する反応である。また、後期段階は、前記のアマドリ化合物が脱水、転位、縮合、酸化的解裂など非可逆的反応を受け、非常に反応性に富みタンパク質の架橋形成を起こす３－デオキシグルコソンのようなα－ジカルボニル化合物を経て、最終的に褐色や蛍光などの物理化学的特徴を持つペントシジンなどの後期反応産物（ＡＧＥ：ａｄｖａｎｃｅｄ　ｇｌｙｃａｔｉｏｎ　ｅｎｄ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ）に変化する反応である。

[0004] これらの一連の反応により、食品の色、香り、物性などが劣化するため、メイラード反応を効果的に抑制することにより、食品の品質劣化を防止することができる。

[0005] 一方、メイラード反応は生体内でも起こっており、特に糖尿病患者においては高血糖によるＡＧＥの蓄積とタンパク質架橋形成物が生じ、神経障害、網膜症、アテローム性動脈硬化などの糖尿病合併症が引き起こされる（J. Neuropathol. Exp., 59, 1094-1105 (2000)、Diabetes, 24, 479-482 (2001)、

Cardiovasc. Res., 63, 582-592 (2004)、及びNature, 414, 813-820 (2001))。また老化に伴い、同様な反応が進行し、皮膚のハリや弾力性の低下などの老化症状の原因になっていると云われている（J. Clin. Invest., 91, 2463-2469 (1993)、及びArchives of Biochemistry and Biophysics, 419, 89-96 (2003))。従って、メイラード反応の進行を阻害することは重要である。

[0006] ＡＧＥｓ形成経路の中間体としてα－ジカルボニル化合物が存在する。主に３－デオキシグルコソン(3-DG)、メチルグリオキサール(MG)などが生体内で生成する。これらのα－ジカルボニル化合物は、グルコースに比べ１万倍という高い反応性を有し、タンパク質のリシン、アルギニン、トリプトファン残基などを修飾してＡＧＥｓ形成に寄与しているため重要である。糖尿病患者の血漿中では、これらのα－ジカルボニル化合物の存在量が増加しており、合併症発症に大きく関与していると考えられている。例えば、3-DGは細胞内外の酵素を修飾・失活あるいは酸化ストレスを介して機能障害を引き起こすことが考えられている。よって、ＡＧＥｓ形成経路の中間体として存在するα－ジカルボニル化合物の炭素－炭素間の結合を解裂し、ＡＧＥの蓄積及びタンパク質間の架橋形成を阻害する物質を開発することは、糖尿病や合併症の予防や治療に有用であるだけでなく、老化の防止においても重要である。

[0007] メイラード反応後期反応産物であるα-ジカルボニル化合物などの架橋形成物の分解除去を可能とする、ＡＧＥ形成阻害剤としては、Ｎ－フェナシルチアゾリウムブロミド(PTB)(Nature, 382, 275-278 (1996))、4,5-ジメチルチアゾリウム誘導体(ALT-711)(Pro. Natl. Acd. Sci. U.S.A., 95, 4630-4634 (1998))などがある。推定されている反応機構によれば、いずれも生体内には存在しない断片がタンパク質に残ることになる。このタイプの薬は、一端認可されたものの、副作用が確認されたため現在使用されていない。

[0008] 柑橘類の揮発性油状物やテルペン類は、α－ジカルボニル化合物切断活性を有し、メイラード反応抑制剤として有用であることが知られている（特許文献１）。これらテルペン類は、天然物由来の物質であるので、安全性に優

れている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開２００４－３５４２４号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Drug Discovery Today, 11, 646-654 (2006)

非特許文献2：J. Neuropathol. Exp., 59, 1094-1105 (2000)

非特許文献3：Diabetes, 24, 479-482 (2001)

非特許文献4：Cardiovasc. Res., 63, 582-592 (2004)

非特許文献5：Nature, 414, 813-820 (2001)

非特許文献6：J. Clin. Invest., 91, 2463-2469 (1993)

非特許文献7：Archives of Biochemistry and Biophysics, 419, 89-96 (2003)

非特許文献8：Nature, 382, 275-278 (1996)

非特許文献9：Pro. Natl. Acd. Sci. U.S.A., 95, 4630-4634 (1998)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] しかしながら、かかるテルペン類の活性は弱く、十分な効果を再現性よく得ることができなかった。そこで、優れたジカルボニル化合物切断活性を有し、優れたメイラード反応抑制効果を発揮する化合物を特定することを試みた。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、単なるモノテルペンがジケトンを弱いながらも切断することに興味を持ち、その解裂機構を明らかにすべく鋭意研究した結果、かかるテルペン類のペルオキシドが格別に顕著なジカルボニル化合物切断活性を有し、優れたメイラード反応抑制効果を発揮することを見出し、本発明を完成した。

[0013] すなわち、本発明によれば、少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するメイラード反応抑制剤が提供される。かかるメイラード反応抑制剤によれば、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れたαージカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを含有するので、メイラード反応を効果的にかつ再現性よく抑制することができ、優れたメイラード反応抑制効果が発揮される。また、出発物質が天然物由来であり副作用が生じにくいため、有利に使用することができる。

[0014] また、本発明によれば、少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するαージカルボニル化合物分解剤が提供される。かかるαージカルボニル化合物分解剤によれば、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れたαージカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを含有するので、剤全体としても優れたαージカルボニル化合物分解効果が得られることになる。

[0015] さらに、本発明によれば、少なくとも１つのテルペン類を使用するメイラード反応抑制方法において、該テルペン類をペルオキシド化することを特徴とする、メイラード反応抑制方法が提供される。かかるメイラード反応抑制方法によれば、テルペン類をペルオキシド化することにより、ペルオキシド化していないテルペン類と比較してより優れたαージカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを得ることができ、当該得られたテルペン類のペルオキシドによって優れたメイラード反応抑制効果が得られることになる。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、優れたメイラード反応抑制効果を得ることができる。

発明を実施するための最良の形態

[0017] ＜発明の経緯＞

これまで、テルペン類によるαージカルボニル化合物切断の作用機序は明らかではなかった。本発明者らは、テルペン類の酸素酸化が起こり、そのア

リル位にペルオキシドが生成した後、そのペルオキシドがＡＧＥｓ形成経路の中間体であるα－ジカルボニル化合物を攻撃し、Baeyer-Villigerタイプの反応、次いで加水分解という一連の反応が起こり、ジカルボニルが２つのカルボン酸へと分解するという作業仮説を立て、α－ジカルボニル化合物切断活性を有することが公知のテルペン類のペルオキシド化合物を合成し、ジカルボニルに対する切断反応をみたところ、驚くべきことに、極めて効率的に解裂反応が進行することを見出した。本発明によれば、テルペン類をペルオキシド化することにより、そのα－ジカルボニル化合物切断活性を容易に高めることができる。

[0018] 本発明のテルペン類のペルオキシドは、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れたα－ジカルボニル化合物切断活性を有し、メイラード反応を効果的にかつ再現性よく抑制することができる。

[0019] メイラード反応抑制剤として公知のPTBやALT-711またはそれらの誘導体は、効果的にジケトンを解裂できるが、その解裂により生体内にあり得ない官能基がタンパク質又は小分子として残ることになり、原理的に副作用が生じやすい。一方、本発明のメイラード反応抑制剤は、天然物由来の物質を有効成分とするため、ジカルボニル化合物の解裂によって生成するタンパク質又は小分子は、生体内に普通に存在するカルボン酸であり、はるかに副作用が生じにくい。

[0020] ＜用語の説明＞

本明細書及び請求の範囲において、各種用語の意味を以下のとおり定義する。

[0021] （１）メイラード反応

「メイラード反応」とは、アミノ酸、タンパク質、ペプチド等のアミノ基と、還元糖などのカルボニル基が非酵素的に結合する反応である（Drug Discovery Today, 11, 646-654 (2006)）。詳細には、この反応は初期段階と後期段階とを含み、初期段階は、アミノ基とカルボニル基とが反応しシッフ塩基を形成することから始まり、１，２－エナミノールを経てケトアミンなどの

アマドリ化合物を形成する反応である。また、後期段階は、前記のアマドリ化合物が脱水、転位、縮合、酸化的解裂など非可逆的反応を受け、非常に反応性に富みタンパク質の架橋形成を起こす３－デオキシグルコソン(3-DG)のようなα－ジカルボニル化合物を経て、最終的に褐色や蛍光などの物理化学的特徴を持つペントシジンなどの後期反応産物（ＡＧＥ：ａｄｖａｎｃｅｄ　ｇｌｙｃａｔｉｏｎ　ｅｎｄ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ）に変化する反応である。

[0022] （２）α－ジカルボニル化合物

本明細書で使用される場合、「α－ジカルボニル化合物」とは、その分子中にα－ジカルボニル部分（１，２－ジカルボニル基とも呼ぶ）を少なくとも１つ有する化合物をいう。特に、生体、環境、食品など自然界に広く存在するα－ジカルボニル化合物をいい、かかるα－ジカルボニル化合物の例としては、メイラード反応における中間生成物である３－デオキシグルコソン（３－ＤＧ）、メチルグリオキサール（ＭＧ）及びグリオキサール（ＧＯ）、ならびにメラニン合成における中間生成物であるドーパキノン（Ｌ－ドーパキノン）等が挙げられる。

[0023] （３）α－ジカルボニル化合物切断活性

本明細書で使用される場合、「α－ジカルボニル化合物切断活性を有する」とは、α－ジカルボニル化合物の炭素－炭素間の結合を解裂する活性を有することをいい、例えば、後述する実施例２のα-ジカルボニル化合物解裂活性試験条件下で、１－フェニル－１，２－プロパンジオンのジカルボニル基（－ＣＯ－ＣＯ－）に対する炭素間結合切断率が５％以上、好ましくは１０％以上である場合をいう。「優れたα－ジカルボニル化合物切断活性を有する」とは、例えば、１－フェニル－１，２－プロパンジオンのオキサリル基（－ＣＯ－ＣＯ－）に対する炭素間結合切断率が３０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは７０％以上であることをいう。

[0024] （４）テルペン類

本明細書で使用される場合、「テルペン類」とは、イソプレンを構成単位

とする炭化水素であり、イソプレン単位(C5)の数に応じて、それぞれモノテルペン(C10)、セスキテルペン(C15)、ジテルペン(C20)、セスタテルペン(C25)、トリテルペン(C30)、テトラテルペン(C40)と呼ぶ。本明細書中で使用される場合、テルペン類には、テルペンアルコール、テルペンエステル、及びこれらの塩が含まれる。

[0025] （５）ペルオキシド

「ペルオキシド」とは、広義では過酸化物の総称であり、狭義ではペルオキシ基（－Ｏ－Ｏ－）を有し、一般構造式がＲ－Ｏ－Ｏ－Ｒと表される有機過酸化物をいう。酸素上に水素が置換したＲ－Ｏ－Ｏ－Ｈの形の化合物をヒドロペルオキシドと呼ぶ。

[0026] 以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。なお、同様な内容については、繰り返しの煩雑を避けるために、適宜説明を省略する。

[0027] ［実施形態１：メイラード反応抑制剤］

本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するメイラード反応抑制剤である。ここで、テルペン類のペルオキシドは、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れたα－ジカルボニル化合物切断活性を有し、かつ、ＡＧＥ形成阻害活性を有することが後述する実施例で実証されている。したがって、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、当該ペルオキシドを含有するので、剤全体としても優れたメイラード反応抑制効果が得られることになる。

[0028] （テルペン類）

本発明のメイラード反応抑制剤の出発原料となるテルペン類としては、いずれのテルペン類を使用することができるが、好ましくは、α－ジカルボニル化合物切断活性を有するいずれのテルペン類を使用することができる。かかるα－ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類は、特開２００４－３５４２４号公報に記載されており、特開２００４－３５４２４号公報の内容は本明細書中に参照として援用される。

[0029] かかるテルペン類は、柑橘類、ティーツリー、ジュニパー又はスイートマジョラムを非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。柑橘類を使用する場合、本発明のテルペン類は、例えば柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。ティーツリーを使用する場合、本発明のテルペン類は、新鮮な葉もしくは小枝の先端部分又はその破砕物を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。ジュニパーを使用する場合、本発明のテルペン類は、果実又はその破砕物を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。スイートマジョラムを使用する場合、本発明のテルペン類は、葉又はその破砕物を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。

[0030] 柑橘類としては、例えば、ユズ、ハッサク、ナツミカン、オレンジ、レモン、ミカンなどが挙げられ、ユズがより好ましい。

[0031] 非極性有機溶媒抽出の場合に用いる抽出溶媒としては、エチルエーテル、ｎ－ヘキサン、シクロヘキサン、ｎ－ペンタンなどの非極性有機溶媒の１種、又は２種以上の混合物が挙げられる。溶媒の使用量は特に制限はないが、一般に柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣１００質量部に対して、１～１０００質量部程度である。抽出条件は、室温程度で１０～３００分間程度であるが、これに限定されるものではない。柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣に所定量の非極性有機溶媒を加え、還流して抽出し、得られた抽出液から溶媒を留去することにより、非極性有機溶媒抽出による柑橘類のテルペン類が得られる。

[0032] また、水蒸気蒸留による場合、公知の水蒸気蒸留装置を用いて原料植物を水蒸気蒸留し、得られた水蒸気蒸留液を遠心分離し、上層を回収することにより、水蒸気蒸留によるテルペン類が得られる。柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣を水蒸気蒸留に供することができる。

[0033] このようにして得られるテルペン類について、更に各種有機溶媒による分画や、シリカゲルによるクロマト分画などによって精製をした後に、溶媒を

除去して用いることができる。また、かかるテルペン類は、必要に応じて化学合成物を利用することもできる。

[0034] 本発明のテルペン類としては、市販品のエッセンシャルオイル、アロマオイル、ユズ湯、レモンパックなどに含まれるものも挙げられる。

[0035] かかるテルペン類は、好ましくは、モノテルペン類、セスキテルペン類、モノテルペンアルコール類及びモノテルペンエステル類（特に、モノテルペンアセテート類）からなる群より選択される１種以上を少なくとも含有する。

[0036] モノテルペン類としては、様々なものがあるが、例えば、オシメン、ｄ－リモネン、α－テルピネン、カレン、カンフェン、或いはこれらの２種以上の混合物が挙げられる。

[0037] セスキテルペン類としては、様々なものがあるが、例えば、β－ファルネセン、β－ビサボレン、或いはこれらの混合物が挙げられる。

[0038] モノテルペンアルコール類としては、様々なものがあるが、例えば、テルピネン－４－オール、α－テルピネオール、トランス－カルベノール、ボルネオール、或いはこれらの２種以上の混合物が挙げられる。そのペルオキシドが固体であり比較的安定である点から、テルピネン－４－オールが好ましい。

[0039] また、必要に応じて、これらの化学合成物を利用することもできる。

[0040] オシメン、ｄ－リモネン、α－テルピネン、カレン、カンフェン、β－ファルネセン、β－ビサボレン、テルピネン－４－オール、α－テルピネオール、トランス－カルベノール、ボルネオールは、α－ジカルボニル化合物切断活性を有することが、特開２００４－３５４２４号公報に記載されている。よって、これらテルペン類を使用することが好ましい。

[0041] （テルペン類のペルオキシド）

本発明の少なくとも１つのテルペン類のペルオキシド（本明細書中において、単に「テルペン類のペルオキシド」とも呼ぶ）は、かかるテルペン類を当該分野で公知のペルオキシド化方法によりペルオキシド化することにより

、容易に得ることができる。

[0042] （ペルオキシド化）

ペルオキシド化方法としては、特に限定されないが、例えば、光増感法（あるいは化学的方法、マイクロ波放電など）による一重項酸素酸化；光照射、熱、AIBNなどを用いたによるラジカル的酸素酸化；塩基触媒を用いた炭素アニオンを経る酸素酸化；塩基や金属塩や金属錯体などを用いた酸素酸化による方法；トシルヒドラジンに導いた後、ナトリウムペルオキシドの存在下過酸化水素水で処理する方法；グリニャール試薬や有機ホウ素化合物などの有機金属化合物に導いた後に酸素酸化を行う方法；酵素酸化による方法などが挙げられる。

[0043] 本明細書で使用される場合、「光照射」とは、反応系に光を照射することをいう。光を照射することにより、酸素の存在下、光酸素酸化反応を行うことができる。光は、可視光線～紫外線であることが好ましく、可視光線であることが更に好ましい。具体的には、人工灯、高輝度放電ランプ、太陽光を利用することができる。照射時間は特に制限はないが、高輝度放電ランプを使用する場合、１０分～７２時間であることが好ましく、１５分～４８時間であることが更に好ましく、１５分～１０時間であることが特に好ましい。照射時間が上記の範囲内にあると、効率よくペルオキシドが製造される。照射温度は、通常０～５０℃であり、好ましくは室温である。

[0044] 本明細書で使用される場合、「酸化」とは、対象化合物と酸素とを接触させて酸化すること、及び酸素の存在下で光を照射して光酸素酸化することをいう。酸素と接触させる反応は、光増感触媒下で行ってもよく、使用される触媒としては、チオニン／ＮａＹ ゼオライトが挙げられるが、これらに限定されない。または、対象化合物を振盪又は撹拌して酸素と接触させる方法、バブリングすることにより酸素と接触させる方法、テルペン類を皮膚に外用する際に物理的刺激（摩擦、マッサージなど）を与えて酸素と接触させる方法などで酸化を行ってもよい。酸素とは、空気中の酸素を含む。接触時間としては特に制限はないが、通常、１０分～７２時間であることが好ましく、

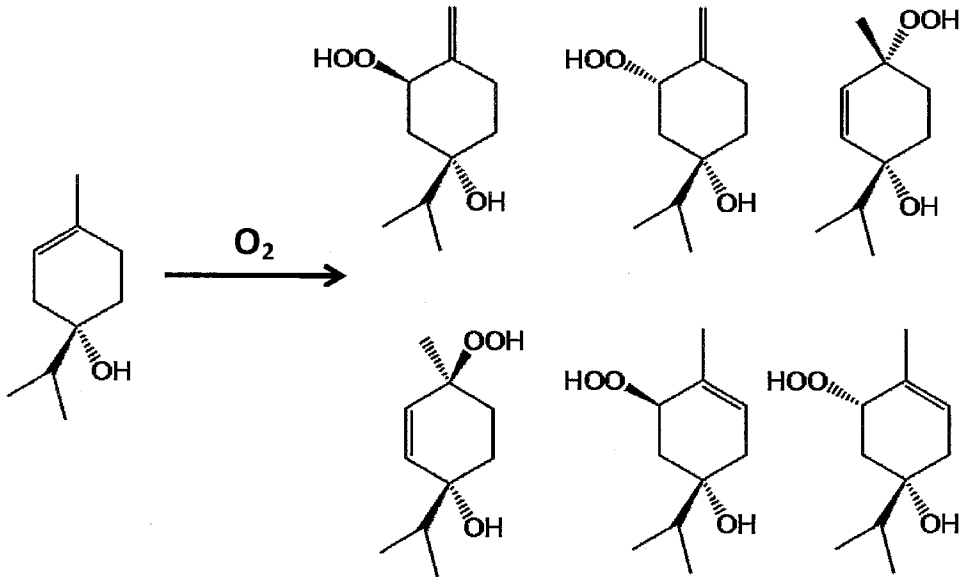
１５分～４８時間であることが更に好ましく、１５分～１０時間であることが特に好ましい。反応温度は、合成的には－７８℃～１００℃、通常０～５０℃であり、好ましくは室温である。酸素の存在下で光を照射して光酸素酸化することとは、上記「光照射」と同義である。

[0045] 例えば、テルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドは、Tetrahedron 56 (2000) 6927-6943並びにTetrahedron Letters 45 (2004) 5433-5436に記載の方法にしたがって調製することができる。

[0046] テルペン類がアリル型不飽和化合物やベンジル型化合物である場合は、上記のような光増感法（又は化学的方法、マイクロ波放電など）を用いた一重項酸素酸化；光照射、熱、AIBNなどを用いたラジカル条件による酸素酸化；または塩基触媒を用いた炭素アニオンを経る酸素酸化により、そのペルオキシドを容易に得ることができるので好ましい。

[0047] 例えば、アリル型不飽和化合物であるテルピネン－４－オールをペルオキシド化することにより、以下の構造式のペルオキシドを得ることができる（Tetrahedron Letters 45 (2004) 5433-5436）。本発明において、テルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドとは、下記ペルオキシド構造を包含する。

[化1]

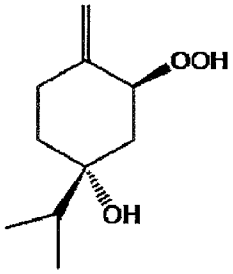


[0048] テルペン類がアリル型不飽和化合物やベンジル型化合物ではない場合であっても、塩基や金属塩や金属錯体などを用いた酸素酸化による方法、トシルヒドラジンに導いた後、ナトリウムペルオキシドの存在下過酸化水素水で処理する方法、グリニャール試薬や有機ホウ素化合物などの有機金属化合物に導いた後に酸素酸化を行う方法、酵素酸化による方法でペルオキシド化を行うことができるが、これらに限定されない。

[0049] 本発明におけるテルペン類のペルオキシドとしては、例えば、以下の式の化合物が挙げられる。

（１）下記式：

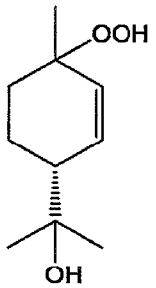
[化2]



で表されるテルピネン－４－オールのヒドロペルオキシド。

[0050] （２）下記式：

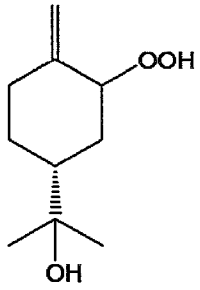
[化3]



で表される、α－テルピネオールのヒドロペルオキシド。

[0051] （３）下記式：

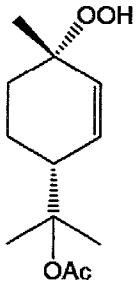
[化4]



で表される、α－テルピネオールのヒドロペルオキシド。

[0052] （４）下記式：

[化5]



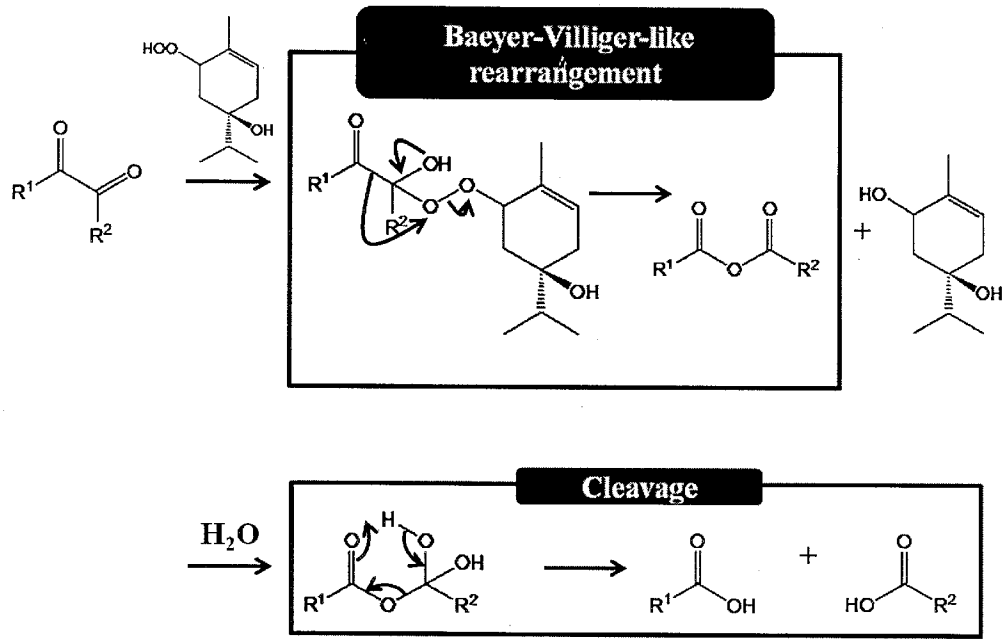
で表される、α－テルピニルアセテートのヒドロペルオキシド。

[0053] （ペルオキシドによるα－ジカルボニル化合物解裂の作用機序）

本発明のペルオキシドによるα－ジカルボニル化合物解裂の作用機序としては、以下が推測され、そして確認された。テルピネン－４－オールによるα－ジカルボニル化合物の解裂機構は、酸化反応で生成したテルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドによる求核攻撃、Baeyer－Villiger-like rearrangement、酸無水物の加水分解を経て起こる。この作用機序によれば、ペルオキシド基が導入される位置に関係なく、解裂反応が効果的に進むと考えられる。

（スキーム１）

[化6]



[0054] （メイラード反応抑制剤の使用の態様）

本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を食品等の製品に添加して、褐変などの品質劣化の抑制を目的として使用することができる。すなわち、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、食品の褐色抑制剤である。その場合のメイラード反応抑制剤の食品への添加量は、食品成分によって依存し、特に限定されない。一つの目安としては、例えば、ドレッシングで効果を発揮させるためには、有効成分であるテルペン類のペルオキシドの量を、一般に０．０００１～５%の範囲、更に望ましくは０．００１～０．１%の範囲となるように設計することが望ましい。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を食品に添加することを含む、メイラード反応抑制方法又は食品の品質劣化防止方法もまた、本発明の一実施形態である。

[0055] また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を糖尿病又は糖尿病の合併症（例えば、神経障害、網膜症、アテローム性動脈硬化）の予防、治療を目的として使用することができる。すなわち、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、糖尿病又は糖尿病合併症の治療剤又は予防剤である。その場合、メイラード反応抑制剤の投与量は、年齢、症状程度などに依存して決定す

ることができ、特に限定されない。なお、摂取形態としては、錠剤でも液剤でも、製剤として許容され得る形態で投与することができる。さらに、非経口的に皮下注射、経鼻投与などの形態で投与することでも効果が得られ、摂取、投与方法に限定はない。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の有効量を被検体に投与することを含む、糖尿病又は糖尿病合併症の治療又は予防方法も、本発明の一実施形態である。また、糖尿病又は糖尿病合併症の予防又は治療のための医薬の製造における、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の使用も、本発明の一実施形態である。また、糖尿病又は糖尿病合併症の予防又は治療のために使用される、少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドも、本発明の一実施形態である。

[0056] 本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を、皮膚のシワ及び／又はシミ改善を目的として用いることもできる。すなわち、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、皮膚のシワ及び／又はシミ改善剤である。その場合、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を単独で用いることもできるし、皮膚化粧料、皮膚外用剤、乳剤、クリーム類、ローション類、乳液類、クリーム類、パック類、入浴剤、医薬品又はローション類、乳液類、クリーム類、パック類、入浴剤などに配合して用いることもできる。本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の配合量は、皮膚化粧料又は外用剤の総量を基準として、有効成分であるテルペン類のペルオキシドの量を、０．０１～１０．０質量%の範囲となるように設計することが好ましく、より好ましくは、０．０５～５．０質量%である。なお、本発明の皮膚のシワ及び／又はシミ改善剤には、色素、香料、防腐剤、界面活性剤、顔料等を本発明の目的を達成する範囲内で適宜配合することができる。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の有効量を被検体に投与することを含む、皮膚老化防止のための方法も、本発明の一実施形態である。また、少なくとも１つのテルペン類を有効成分として含み、皮膚のシワ及び／又はシミ改善のために光照射又は酸化しながら使用するための指示書をともに含む、商品包装物もまた、本発明の一実施形態である。これにより、使用中テルペン類をペルオキシド化することに

より、より優れたα－ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを得ることができ、当該得られたテルペン類のペルオキシドによって優れたメイラード反応抑制効果が得られることになるので好ましい。

[0057] ［実施形態２：α－ジカルボニル化合物分解剤］

本実施形態に係るα－ジカルボニル化合物分解剤は、少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するα－ジカルボニル化合物分解剤である。ここで、当該テルペン類のペルオキシドは、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れたα－ジカルボニル化合物切断活性を有することが後述する実施例で実証されている。したがって、本実施形態に係るα－ジカルボニル化合物分解剤は、テルペン類のペルオキシドを含有するので、剤全体としても優れたα－ジカルボニル化合物分解効果が得られることになる。

[0058] 本実施形態に係るα－ジカルボニル化合物分解剤に使用される少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドは、基本的には、実施形態１において具体的に説明された少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドと同様の構成及び作用効果を有する。よって、実施形態１と同様の内容については、適宜説明を省略する。

[0059] 本実施形態に係るα－ジカルボニル化合物分解剤は、生体、環境、食品など自然界に広く存在するα－ジカルボニル化合物を分解することができるので、実施形態１で記載のとおり、メイラード反応における中間生成物である３－デオキシグルコソン（３－ＤＧ）、メチルグリオキサール（ＭＧ）及びグリオキサール（ＧＯ）を分解してメイラード反応を抑制することができる。また、メラニン合成における中間生成物であるドーパキノン（Ｌ－ドーパキノン）を分解して皮膚におけるメラニン合成を抑制することができる。

[0060] ［実施形態３：メイラード反応抑制方法］

本実施形態に係るメイラード反応抑制方法は、少なくとも１つのテルペン類を使用するメイラード反応抑制方法において、該テルペン類をペルオキシド化することを特徴とする、メイラード反応抑制方法である。かかる方法に

よれば、テルペン類をペルオキシド化することにより、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れたα－ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを得ることができ、当該得られたテルペン類のペルオキシドによって優れたメイラード反応抑制効果が得られることになる。

[0061] 本実施形態に係るメイラード反応抑制方法に使用される少なくとも１つのテルペン類、及び該テルペン類をペルオキシド化する方法は、基本的には、実施形態１において具体的に説明した少なくとも１つのテルペン類、及びペルオキシド化方法と同様の構成及び作用効果を有する。よって、実施形態１と同様の内容については、適宜説明を省略する。

[0062] 本実施形態に係るメイラード反応抑制方法では、該テルペン類をペルオキシド化する方法には、少なくとも１つのテルペン類を含有してなるメイラード反応抑制剤を、光照射療法と併用して使用することも含まれる。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制方法では、該テルペン類をペルオキシド化する方法には、少なくとも１つのテルペン類を含有してなるメイラード反応抑制剤を、皮膚に外用する際に物理的刺激（摩擦、マッサージなど）を与えながら使用することも含まれる。使用する量および使用条件は得られる治療効果に対して望ましくない副作用が起こらないか最小になるよう決定されるべきであることは云うまでもない。

実施例

[0063] 以下、本発明について実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0064] ［実施例１：テルペン類のヒドロペルオキシドの調製］

１．テルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドの調製

Tetrahedron 56 (2000) 6927-6943並びにTetrahedron Letters 45 (2004) 5433-5436に記載の方法にしたがってテルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドを調製した。以下、テルピネン－４－オールをT4と、テルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドをT4-Hとも呼ぶ。

[0065] （チオニン担持 Na-Y ゼオライトの調製）

2.5mgのチオニンアセテートを脱イオン水333mlに加えた。その溶液に5.0gのNa-Y ゼオライトを加え、3時間撹拌した。その後、桐山ロートでろ過し、チオニン担持 Na-Y ゼオライトをオーブン乾燥した。使用する前に1～2時間、サンプルオーブン（120℃）に入れ真空ポンプで乾燥した。

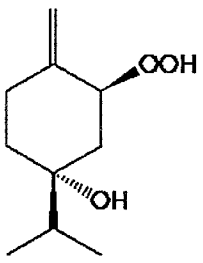
[0066] （チオニン担持 Na-Y ゼオライトによる光酸化反応）

3.0gのチオニン担持 Na-Y ゼオライトを乾燥させた二口ナスフラスコに入れ、サンプルオーブン（120℃）にて1時間半乾燥した。その後アルゴン置換し、セプタム、三方コックで密閉した。蒸留したヘキサンを30ml、ピリジンを30μl加え5時間半撹拌した。その後テルピネン-4-オールを30μl加え、0℃にて酸素を導入しながら光を照射し（ウシオ高圧UVランプ　型式UM-102）、50分間反応させた。

[0067] （ヒドロペルオキシドの単離・精製）

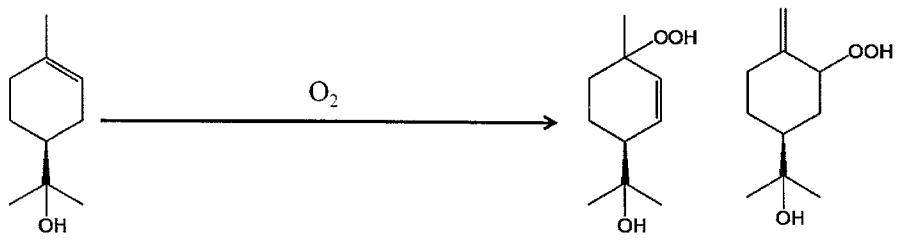
反応終了後、反応溶液にアセトニトリルを加え撹拌し、10～15時間抽出した。その後桐山ロートでろ過しゼオライトを除去し、ろ過溶液をエバポレーターにて濃縮した。濃縮後の液体をフラッシュクロマトグラフィー（クロロホルム：ジエチルエーテル＝4：1）にて主ピークを示したRf値0.2付近の化合物を単離した。収率43%にて下記構造式のヒドロペルオキシドを白色固体として得た（^{1}H及び^{13}C ＮＭＲ）。

[化7]



[0068] ２．αーテルピネオールのヒドロペルオキシドの調製

[化8]



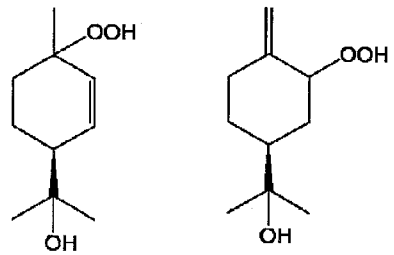
[0069] （チオニン担持Na-Yゼオライトによる光酸化反応）

チオニン担持 Na-Y ゼオライト 3.0 gを二口フラスコに入れ、120 ℃のサンプルオーブンにて1.5時間真空乾燥した。乾燥後アルゴン置換し、密栓した。蒸留したヘキサン30 ml、ピリジン30 μlを加え、室温にて5時間撹拌した。α－テルピネオール36.7 mg（ヘキサン溶液）を加え、O_2を吹き込みながら光分解した(0 ℃, 1時間)。

[0070] （ヒドロペルオキシドの単離・精製）

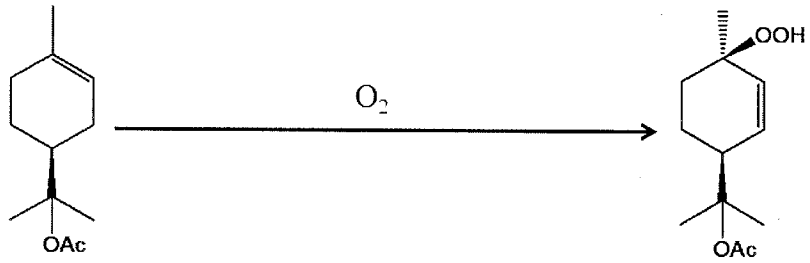
反応終了後、アセトニトリル50 mlを加え、12時間以上撹拌し抽出した。その後、セライト濾過し減圧濃縮後、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー(クロロホルム：ジエチルエーテル = 3：1)によってR_f = 0.17の画分を回収、減圧濃縮し、α－テルピネオールヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物(17.3 mg、収率39%, a ： b = 2.9 ： 1)を白色固体として得た。以下、α－テルピネオールをT-olと、α－テルピネオールヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物をT-ol-Hとも呼ぶ。

[0071] [化9]



[0072] 3．α－テルピニルアセテートのヒドロペルオキシドの調製

[化10]



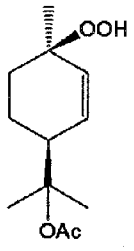
[0073] （チオニン担持Na-Yゼオライトによる光酸化反応）

チオニン担持 Na-Y ゼオライト 3.0 gを二口フラスコに入れ、120 ℃のサンプルオーブンにて1.5時間真空乾燥した。乾燥後アルゴン置換し、密栓した。蒸留したヘキサン30 ml、ピリジン30 mlを加え、室温にて5時間撹拌した。α－テルピニルアセテート30.7 mgを加え、O_2を吹き込みながら光分解した(0 ℃, 1時間)。

[0074] （ヒドロペルオキシドの単離・精製）

反応終了後、アセトニトリル50 mlを加え、12時間以上撹拌し抽出した。その後、セライト濾過し減圧濃縮後、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー(クロロホルム：ジエチルエーテル = 16：1)によってR_f = 0.30の画分を回収、減圧濃縮しα－テルピニルアセテートヒドロペルオキシド(17.1 mg、収率48%)を白色固体として得た。以下、α－テルピニルアセテートをT-aceと、α－テルピニルアセテートヒドロペルオキシドをT-ace-Hとも呼ぶ。

[0075] [化11]



[0076] [実施例２：ヒドロペルオキシドのα-ジカルボニル化合物解裂活性試験]

ヒドロペルオキシドについて、ＡＧＥｓ形成経路の中間体であるα－ジカルボニル化合物の炭素－炭素間の結合を解裂する活性を測定した。

[0077] （実施例２－１）

評価方法として、α-ジカルボニル化合物である１－フェニル－１，２－プロパンジオン（ＰＰＤ）に、テルピネン－４－オール（Ｔ４）もしくはテルピネン－４－オールのヒドロペルオキシド（Ｔ４－Ｈ）を加え、解裂して生成する安息香酸をHPLCで定量した。１－フェニル－１，２－プロパンジオンは自動酸化により解裂するので、試料を加えないものをコントロールとした。反応溶液の組成を、以下の表１に示す。

[0078] [表1]

試薬 (μl)	試料 コントロール	T4	T4-H	最終濃度
50%MeOH / 50 mM PB[*1] (pH 7.4)	180	175	174.2	
100 mM PB (pH 7.4)	-	-	2.91	
1-フェニル-1,2-プロパンジオン (PPD, コントロール)	20	20	20	10 mM
テルピネン-4-オール (T4)	-	4.96	-	150 mM
T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	-	-	2.91	10 mM
合計	200.00	199.96	200.02	

*1 PB:リン酸緩衝液

[0079] １－フェニル－１，２－プロパンジオンは50%MeOH / 50mM PB(pH 7.4)に溶かし、100mMに調製したものを用いた。またテルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドは100% MeOHに12.8mg溶かしたものを用いた。１－フェニル－１，２－プロパンジオン、テルピネン－４－オール、テルピネン－４－オールのヒドロペルオキシドの最終濃度はそれぞれ10 mM、150 mM、10 mMである。

[0080] 上記の組成の反応溶液を300μlのPCRチューブに調製した。37℃、300rpm、サーモミキサーにて振とうした。反応終了後、2M HClを40μl加えて酸性条件とした。その後、本溶液を0.45μmのフィルターで濾過しHPLC測定溶液とした。HPLC測定条件は以下の通りである。

[0081] [HPLC測定条件]

・ポンプ　：HITACHI L6200

・カラム　：ODS Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5μm) (関東化学社製)

・溶媒　：20% MeOH / 0.1% TFA水溶液

・流速　：1 ml / min

・温度　：40℃

・検出波長　：254nm

・試料注入量：20μl

[0082] 以上の方法で実験した結果を表２に示す。切断率は全ての１－フェニル－１，２－プロパンジオンが切断された場合には、10mMの安息香酸が生成すると仮定できるので、以下の式に従って算出した。

切断率(%) ＝ (各試料溶液から生成する安息香酸の濃度(mM) / 10(mM))×100

[0083] また、各試料溶液から生成する安息香酸の濃度は、標品のピーク面積から検量線を作成し、算出した。結果を、以下の表２に示す。

[0084] [表2]

	切断率 (%)		
反応時間 (時間)	コントロール	テルピネン-4-オール (T4)	T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)
1	1	5	35
4	4	10	62
8	6	14	70
24	12	24	79

*データ: 平均 (n = 2)

[0085] 以上の結果、テルピネン－４－オールが150 mMの濃度を用いても最大２４%の切断率であったのに対し、テルピネン－４－オールヒドロペルオキシドは10mMの濃度にもかかわらず最大７９%の切断率を示した。すなわち、テルピネン－４－オールヒドロペルオキシドは、テルピネン－４－オールと比較して、約５０倍の解裂活性を示した。

[0086] （実施例２－２）

評価方法として、α－ジカルボニル化合物である1-フェニル-1,2-プロパンジオン(PPD)に各試料溶液を加え、解裂して生成する安息香酸をHPLCで定量した。試料溶液として、テルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドを使用した。またポジティブコントロールとしてN-フェナシルチアゾリウムブロミド(PTB)を使用した。試料を加えないものをコントロールとした。なお、テルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドはメタノールに溶解したもの、PTB及びPPDはメタノールーリン酸緩衝液に溶解したものを使用した。表３の組成の反応溶液を300 μlのPCRチューブに調製し、24時間サーモミキサーにて振

とうした(37 ℃, 300 rpm)。

[0087] [表3]

試薬 (μl)		試料 コントロール	PTB	T4	T4-H	最終濃度
	50% MeOH / 50 mM PB (pH 7.4)	180	160	160	140	
100 mM	PB	-	-	10	20	
100 mM	1-フェニル-1,2-プロパンジオン (PPD, コントロール)	20	20	20	20	10 mM
100 mM	PTB (ポジティブコントロール)	-	20	-	-	10 mM
200 mM	テルピネン-4-オール (T4)	-	-	10		10 mM
100 mM	T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	-	-	-	20	10 mM
	合計	200	200	200	200	

試薬 (μl)		試料 T-ol	T-ol-H	T-ace	T-ace-H	最終濃度
	50% MeOH / 50 mM PB (pH 7.4)	160	140	160	140	
100 mM	PB	10	20	10	20	
100 mM	1-フェニル-1,2-プロパンジオン (PPD, コントロール)	20	20	20	20	10 mM
200 mM	α-テルピネオール (T-ol)	10	-	-	-	10 mM
100 mM	T-ol ヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物 (T-ol-H)	-	20	-	-	10 mM
200 mM	α-テルピニルアセテート (T-ace)	-	-	10	-	10 mM
100 mM	T-ace ヒドロペルオキシド (T-ace-H)	-	-	-	20	10 mM
	合計	200	200	200	200	

[0088] 反応終了後、2 M HCl水溶液を40 μl加え酸性条件とした。その後本溶液をメタノールーリン酸緩衝液にて5倍希釈し、0.45 μmのフィルターで濾過しHPLC測定溶液とした。HPLC測定条件は以下の通りである。

[0089] [HPLC測定条件]

ポンプ : HITACHI L-6200

カラム : 関東化学 ODS. Mightysil RP-18 250 x 4.6 mm (5 μm) lot. 802 6375

溶離液 : 35% MeOH / 0.1% TFA水溶液

流速 : 1.0 ml / min

温度 : 40 ℃

検出波長 : 254 nm

注入量 : 20 μl

[0090] 以上の方法で実験した結果を表４に示す。切断率は全ての1-フェニル-1,2-プロパンジオンが切断された場合には10 mMの安息香酸が生成すると仮定できるので、以下の式に従って算出した。

切断率 (%) = 各試料溶液から生成する安息香酸の濃度 (mM) / 10 (mM) x 10

0

[0091] [表4]

試料	切断率 (%)
コントロール	13
PTB (ポジティブコントロール)	36
テルピネン-4-オール (T4)	6
T4 ヒドロペルオキシド(T4-H)	81
α-テルピネオール(T-ol)	6
T-ol ヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物(T-ol-H)	68
α-テルピニルアセテート(T-ace)	6
T-ace ヒドロペルオキシド(T-ace-H)	74

*データ: 平均 (n = 3)

[0092] 以上の結果、試料溶液の最終濃度が10 mMにおいて、テルペン類には解裂活性がみられなかったが、テルペン類ヒドロペルオキシドには68-81%と高い解裂活性が見られた。またテルペン類ヒドロペルオキシドはポジティブコントロールであるPTBの36%の解裂活性を上回った。

[0093] [実施例３：ＡＧＥ形成阻害活性試験]

ＡＧＥｓ形成経路の中間体であるα－ジカルボニル化合物は、タンパク質のリシン、アルギニン、トリプトファン残基などを修飾してＡＧＥｓ形成に寄与し、形成されたＡＧＥが糖尿病及び糖尿病合併症を引き起こす。ヒドロペルオキシドについて、ＡＧＥ形成の阻害活性を測定した。

[0094] リボヌクレアーゼＡ（RNase A）は10個のリシン残基、4個のアルギニン残基を持つ酵素である。これらの残基部分がα－ジカルボニル化合物としてメチルグリオキサール（MG）によって修飾される、もしくはMGを介してRNase A分子間でAGEsを形成することで酵素活性が低下すると考えられる。またRNase Aの触媒残基はヒスチジン-12、ヒスチジン-119、リシン-41であるため、リシン-41がMGによって修飾されると酵素活性に大きく影響すると考えられる。

[0095] （実施例３－１）

評価方法は以下のようにした。タンパク質としてウシのリボヌクレアーゼＡ（RNase A）、α－ジカルボニル化合物としてメチルグリオキサール（MG）を混ぜた反応溶液に、試料として、アミノグアニジン（AG）、テルピネン－４－オール(T4)、テルピネン－４－オールのヒドロペルオキシド（T4-H）又

はＮ－フェナシルチアゾリウムブロミド（PTB）を加えて反応させた。その後RNase Aの酵素活性試験を行い、酵素活性を保持しているか評価した。なおテルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドはエタノールに溶解したもの、AGは水に溶解したものを使用した。RNase Aのみを反応させたものを標準コントロール(C-)、RNase AにMGを加え反応させたものをAGEsコントロール(C+)、MGのみを反応させたものをブランクとした。またポジティブコントロールとしてカルボニル捕捉作用を持つAGを用いた。また、比較として、αージカルボニル化合物解裂活性を持つ公知のAGE形成阻害剤としてPTBを用いた。

表５の組成の反応溶液を300 μlのPCRチューブに調製し、24時間インキュベートした（37℃）。

[0096] [表5]

	試薬 (μl)	ブランク	標準コントロール (C-)	AGEsコントロール (C+)	ポジティブコントロール (AG)	最終濃度
	ビヒクル (EtOH)	2	2	2	2	1%
100 mM	PB (pH7.2)	40	40	40	40	20 mM
5 mg /ml	RNase A	-	40	40	40	1 mg /ml
6.49 M	メチルグリオキサール (MG)	3.08	-	3.08	3.08	100 mM
	H_2O	154.9	118	114.9	112.9	-
1M	アミノグアニジン (AG)	-	-	-	2	10 mM
	合計	199.98	200.00	199.98	199.98	

	試薬 (μl)	試料 T4	T4-H	PTB	最終濃度
	ビヒクル (EtOH)	2	-	-	1%
100 mM	PB (pH7.2)	40	40	40	20 mM
5 mg /ml	RNase A	40	40	40	1 mg /ml
6.49 M	メチルグリオキサール (MG)	3.08	3.08	3.08	100 mM
	H_2O	111.6	114.9	114.9	-
6.05M	テルピネン-4-オール (T4)	3.31	-	-	100 mM
1M	T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	-	2	-	10 mM
1M	PTB	-	-	2	10 mM
	合計	199.99	199.98	199.98	

[0097] 反応終了後の溶液を5%グリセロールにて200倍に希釈し、tRNAを基質として酵素実験を行った。下記の組成（表６）の反応溶液のうち、PBとtRNA溶液をエッペンチューブに加え、37℃、10分間、300rpm、サーモミキサーにてプレインキュベートした。その後希釈溶液を加え、37℃、20分間、300rpm、サー

モミキサーにてインキュベートした。Perchloric acid / lanthanum solutionを250μl加え、酵素反応を停止させた。反応溶液を冷蔵庫で静置後、4℃、10分間、13000rpmにて遠心した。この反応溶液を260nmにて吸光度を測定した。結果を以下の表７に示す。

[0098] [表6]

	試薬 (μl)		最終濃度
100 mM	PB (pH 8.0)	150	60 mM
0.5 mg / ml	tRNA	50	0.1 mg /ml
	200倍希釈反応溶液	50	-
	合計	250	

[0099] [表7]

試料	吸光度 (260 nm)
MG (ブランク)	0.423
RNase A (C-)	1.031
RNase A + MG (C+)	0.453
RNase A + MG + AG	0.935
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	0.844
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	1.002
RNase A + MG + PTB	0.689

*データ: 平均 (n = 3)

[0100] tRNAがRNase Aによって分解されると吸光度が上昇する。またtRNA自身も吸収を持つ。表７の結果より、標準コントロール(C-)の酵素活性を100とした時の相対的な酵素活性を以下の式に従って求めた。

[0101] 残存活性 (%) = (C-B) / (A-B) * 100

A: (C-の吸光度) - (ブランクの吸光度)

B: (C+の吸光度) - (ブランクの吸光度)

C: (RNase反応溶液と各試料溶液の吸光度) - (ブランクの吸光度)

[0102] RNase A相対活性試験の結果を、以下の表８に示す。

[0103]

[表8]

試料	残存活性 (%)
RNase A (C-)	100
RNase A + MG (C+)	0
RNase A + MG + AG	83
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	68
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	95
RNase A + MG + PTB	41

*データ: 平均 (n = 3)

[0104] 以上の結果、テルピネンー４ーオールのヒドロペルオキシド(10mM)は、テルピネンー４ーオール(100mM)と比較し、高い酵素活性を保持していた。またPTB(10mM)とは２倍以上、ポジティブコントロールであるAG(10mM)とは同程度以上の酵素活性を保持していた。なお、括弧内は最終濃度を示す。

[0105] （実施例３－２）

評価方法は以下のようにした。タンパク質としてRNase A、αージカルボニル化合物としてメチルグリオキサール(MG)を混ぜた反応溶液に、各試料溶液を加え反応させた。その後RNase Aの酵素活性試験を行い、各試料溶液によって酵素活性が保護されるか評価した。試料溶液として、テルペン類、テルペン類ヒドロペルオキシド、アミノグアニジン(AG、ポジティブコントロール)及び経口糖尿病治療薬であるメトホルミンを使用した。なおテルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドはエタノールに溶解したもの、AG及びメトホルミンは水に溶解したものを使用した。またRNase Aのみを反応させたものを標準コントロール(C-)、RNase AにMGを加え反応させたものをAGEsコントロール(C+)、MGのみを反応させたものをブランクとした。

表９の組成の反応溶液を300 μlのPCRチューブに調製し、24時間インキュベートした(37 ℃)。

[0106]

[表9]

	試薬 (μl)	ブランク	標準コントロール (C-)	AGEsコントロール (C+)	ポジティブコントロール (AG)	最終濃度
	ピヒクル (EtOH)	2	2	2	2	1%
100 mM	PB (pH7.2)	40	40	40	40	20 mM
5 mg /ml	RNase A	-	40	40	40	1 mg /ml
1 M	メチルグリオキサール (MG)	20	-	20	20	100 mM
	H_2O	138	118	98	78	-
100 mM	アミノグアニジン (AG)	-	-	-	20	10 mM
	合計	200	200	200	200	

	試薬 (μl)	試料 メトホルミン	T4	T4-H	T-ol	T-ol-H	T-ace	T-ace-H	最終濃度
	ピヒクル (EtOH)	2	-	-	-	-	-	-	1%
100 mM	PB (pH7.2)	40	40	40	40	40	40	40	20 mM
5 mg /ml	RNase A	40	40	40	40	40	40	40	1 mg /ml
1 M	メチルグリオキサール (MG)	20	20	20	20	20	20	20	100 mM
	H_2O	78	98	98	98	98	98	98	-
100 mM	メトホルミン	20	-	-	-	-	-	-	10 mM
1 M	テルビネン-4-オール (T4)	-	2	-	-	-	-	-	10 mM
1 M	T4 ヒドロペルオキシド(T4-H)	-	-	2	-	-	-	-	10 mM
1 M	α-テルピネオール (T-ol)	-	-	-	2	-	-	-	10 mM
1 M	T-ol ジアステレオマー混合物 (T-ol-II)	-	-	-	-	2	-	-	10 mM
1 M	α-テルピニルアセテート (T-ace)	-	-	-	-	-	2	-	10 mM
1 M	α-テルピニルアセテートヒドロペルオキシド (T-ace-II)	-	-	-	-	-	-	2	10 mM
	合計	200	200	200	200	200	200	200	

[0107] 反応終了後の溶液を5%グリセロール水溶液にて200倍希釈し、tRNAを基質とした酵素実験を行った。下記の組成(表１０)の反応溶液のうち、PBとtRNA溶液をマイクロチューブに調製し、サーモミキサーを使用して10分間プレインキュベーションした(37 ℃, 300 rpm)。希釈反応溶液を加え、サーモミキサーを使用して20分間インキュベーションした(37 ℃, 300 rpm)。その後、perchloric acid / lanthanum 溶液を250 μl加え、酵素反応を停止させた。反応溶液を10分間遠心した(4 ℃, 13,000 rpm)。この反応溶液の吸光度をパーソナルスペクトルメーターGene Quant pro (GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社)で測定した(260 nm)。結果を表１１に示す。

[0108] [表10]

	試薬 (μl)		最終濃度
100 mM	PB (pH 8.0)	150	60 mM
0.5 mg / ml	tRNA	50	0.1 mg /ml
	200倍希釈反応溶液	50	-
	合計	250	

[0109]

[表11]

試料	吸光度 (260 nm)
MG (ブランク)	0.567
RNase A (C-)	1.183
RNase A + MG (C+)	0.661
RNase A + MG + AG	1.099
RNase A + MG + メトホルミン	0.696
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	0.611
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	1.127
RNase A + MG + α-テルピネオール (T-ol)	0.619
RNase A + MG + T-ol ヒドロペルオキシド(T-ol-H)	1.084
RNase A + MG + α-テルピニルアセテート (T-ace)	0.682
RNase A + MG + T-ace ヒドロペルオキシド(T-ace-H)	1.135

*データ: 平均 (n = 3)

[0110] 表１１の結果より、標準コントロール(C-)の酵素活性を100とした時の相対的な酵素活性を以下の式に従って求めた。

残存活性(%) = (C -B) / (A - B) x 100

A : (C-の吸光度) - (ブランクの吸光度)

B : (C+の吸光度) - (ブランクの吸光度)

C : (RNase A反応溶液+各試料溶液の吸光度) - (ブランクの吸光度)

[0111] RNase A酵素活性保護試験の結果を表１２に示す。

[0112] [表12]

試料	残存活性 (%)
RNase A (C-)	100
RNase A + MG (C+)	0
RNase A + MG + AG	84
RNase A + MG + メトホルミン	7
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	0
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	89
RNase A + MG + α-テルピネオール (T-ol)	0
RNase A + MG + T-ol ヒドロペルオキシド(T-ol-H)	81
RNase A + MG + α-テルピニルアセテート (T-ace)	4
RNase A + MG + T-ace ヒドロペルオキシド(T-ace-H)	91

*データ: 平均 (n = 3)

[0113] 以上の結果、テルペン類を添加した溶液では、RNase Aが失活していた(0-4%)が、テルペン類ヒドロペルオキシドを添加した溶液では、酵素活性を保護していた(81-91%)。テルペン類ヒドロペルオキシドはポジティブコントロー

ルであるAGと同程度以上の保護効果が見られた。

産業上の利用可能性

[0114] 本発明によれば、優れたメイラード反応抑制効果を得ることができる。本発明のメイラード反応抑制剤を使用することにより、食品の品質劣化防止、糖尿病及び糖尿病合併症の予防又は治療、並びに皮膚老化防止（皮膚のシワ及び／又はシミの改善）が可能である。

請求の範囲

[請求項1] 少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するメイラード反応抑制剤。

[請求項2] 前記テルペン類が、オシメン、ｄ－リモネン、α－テルピネン、カレン、カンフェン、β－ファルネセン、β－ビサボレン、テルピネン－４－オール、α－テルピネオール、トランス－カルベノール、ボルネオールからなる群より選択される、請求項１記載のメイラード反応抑制剤。

[請求項3] テルピネン－４－オールペルオキシドを有効成分として含有する、請求項１記載のメイラード反応抑制剤。

[請求項4] α－テルピニルアセテートのヒドロペルオキシドを有効成分として含有する、請求項１記載のメイラード反応抑制剤。

[請求項5] 食品の褐色抑制剤である、請求項１～４のいずれか１項記載のメイラード反応抑制剤。

[請求項6] 糖尿病又は糖尿病合併症の治療剤又は予防剤である、請求項１～４のいずれか１項記載のメイラード反応抑制剤。

[請求項7] 皮膚のシワ及び／又はシミ改善剤である、請求項１～４のいずれか１項記載のメイラード反応抑制剤。

[請求項8] 少なくとも１つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するα－ジカルボニル化合物分解剤。

[請求項9] 少なくとも１つのテルペン類を使用するメイラード反応抑制方法において、該テルペン類をペルオキシド化することを特徴とする、メイラード反応抑制方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/054069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/327(2006.01)i, *A61P3/10*(2006.01)i, *A61P17/16*(2006.01)i, *A61P43/00*(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)
A61K31/327, A61P3/10, A61P17/16, 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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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(JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Siegel B and Lanphear J, Kinetics and Mechanisms for the Acid-Catalyzed OxidativeDecarboxylation of Benzoylformic Acid, J. Org. Chem., 1979, Vol.44 no.6, pp.942-946	8
Y	Stratakis M. et al., Dye-sensitized intrazeolite photooxygenation of 4-substituted cyclohexenes. Remote substituent effects in regioselectivity and diastereoselectivity, Tetrahedron Letters, 2004.07.05, Vol.45 no.28, pp.5433-5436	8
A	JP 2004-035424 A (Mizkan Group Corp.), 05 February 2004 (05.02.2004), entire text; particularly, claims (Family: none)	1-8

☒ 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	Date of mailing of the international search report
17 March, 2011 (17.03.11)	29 March, 2011 (29.03.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/054069

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ryuichiro NAGAMATSU, Nobu UBUKATA, "Terpinen-4-ol ni yoru α-dicalbonyl Kagobutsu Kairetsu Kiko no Kaimei", Dai 59 Kai Abstracts of the Annual Meeting of the Japan Wood Research Society, 28 February 1999 (28.02.1999)	1-8
A	Rao T.S.S. and Awasthi S., Oxidative cleavage of carbon-carbon triple bond-a review, J. Indian Chem. Soc., 2003.12, Vol.80, pp.1129-1141	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2011/054069

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The disclosure in paragraph [0062] in the description of the present international application clearly indicates that the invention in claim 9 of the present international application involves a therapeutic performance for humans, such as externally applying a (continued to extra sheet)

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

peroxidized terpene to the human skin.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０５４０６９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/327(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P17/16(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.　A61K31/327, A61P3/10, A61P17/16, 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　　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　　１９７１－２０１１年
日本国実用新案登録公報　　１９９６－２０１１年
日本国登録実用新案公報　　１９９４－２０１１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(JDreamII)

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
Y	Siegel B and Lanphear J, Kinetics and Mechanisms for the Acid-Catalyzed OxidativeDecarboxylation of Benzoylformic Acid, J. Org. Chem., 1979, Vol.44 no.6, pp.942-946	8

☑　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	国際調査報告の発送日
１７．０３．２０１１	２９．０３．２０１１

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
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）　４Ｃ　４７６５
前田　佳与子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

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	Stratakis M. et al., Dye-sensitized intrazeolite photooxygenation of 4-substituted cyclohexenes. Remote substituent effects in regioselectivity and diastereoselectivity, Tetrahedron Letters, 2004.07.05, Vol.45 no.28, pp.5433-5436	8
A	JP 2004-035424 A（株式会社ミツカングループ本社）2004.02.05, 全文、特に特許請求の範囲（ファミリーなし）	1-8
A	永松　龍一郎　と　生方　信, Ｔｅｒｐｉｎｅｎ－４－ｏｌによるα－ｄｉｃａｌｂｏｎｙｌ化合物解裂機構の解明, 第５９回日本木材学会大会研究発表要旨集, 1999.02.28	1-8
A	Rao T.S.S. and Awasthi S., Oxidative cleavage of carbon-carbon triple bond-a review, J. Indian Chem. Soc.,, 2003.12, Vol.80, pp.1129-1141	1-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１１／０５４０６９

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　9　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
本国際出願の請求項９に係る発明は、本国際出願の明細書の段落【００６２】の記載からみて、ペルオキシド化されたテルペン類をヒトの皮膚に外用するなどの、ヒトを治療する行為を包含することが明らかである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。