(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2012-102041
(P2012-102041A)
(43)公開日　平成24年5月31日(2012.5.31)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/121	(2006.01)	A61K 31/121		4C083
A61P 11/00	(2006.01)	A61P 11/00		4C206
A61P 27/12	(2006.01)	A61P 27/12		
A61P 9/10	(2006.01)	A61P 9/10	101	
A61P 25/16	(2006.01)	A61P 9/10		

審査請求 未請求　請求項の数 7　OL　（全 17 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-251333 (P2010-251333)
(22)出願日　平成22年11月9日 (2010.11.9)

(71)出願人　591082421
丸善製薬株式会社
広島県尾道市向東町１４７０３番地の１０
(74)代理人　100108833
弁理士　早川　裕司
(74)代理人　100162156
弁理士　村雨　圭介
(72)発明者　村上　敏之
広島県福山市新市町相方１０８９－８　丸善製薬株式会社総合研究所内
(72)発明者　佐々木　正倫
広島県福山市新市町相方１０８９－８　丸善製薬株式会社総合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗酸化剤及び抗炎症剤

(57)【要約】
【課題】優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用又は抗炎症作用を有する物質を見出し、それを有効成分とする過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤を提供する。
【解決手段】過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤の有効成分として、ダビジゲニンを含有させる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とする過酸化水素細胞障害の予防・改善剤。
【請求項２】
ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とするグルタチオン産生促進剤。
【請求項３】
ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とする抗酸化剤。
【請求項４】
ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とする腫腫腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤。
【請求項５】
ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とするヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤。
【請求項６】
ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とするシクロオキシゲナーゼ－２阻害剤。
【請求項７】
ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とする抗炎症剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤、抗炎症剤、及びダビジゲニンの製造方法に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
近年、生体成分を酸化させる要因として活性酸素が注目されており、生体への悪影響が問題となっている。活性酸素は、主に生体細胞内におけるエネルギー代謝過程で生じるものであり、スーパーオキサイド（すなわち酸素分子の一電子還元で生じるスーパーオキシドアニオン：・O_2^-）、過酸化水素（H_2O_2）、ヒドロキシラジカル（・ＯＨ）及び一重項酸素（$^1O_2$）などがある。これらの活性酸素は、好中球やマクロファージなどの食細胞による細胞内殺菌機構に関与するものであり、ウイルスや癌細胞の除去に重要な役割を果たしているが、活性酸素が過剰に生成されると、活性酸素が細胞膜や組織を構成する生体内分子を攻撃し、各種疾患を誘発するおそれがある。
【０００３】
例えば、過酸化水素は、炎症、過酸化脂質の生成、種々のタンパク質の変性・失活及びＤＮＡの損傷などを引き起こすことが知られており、これらが原因となって誘発される疾患として、喫煙等が原因の肺疾患、白内障、各種動脈硬化症（虚血性心疾患、心筋梗塞、脳虚血、脳梗塞等）、加齢に伴う老化現象、神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病等）、癌化等が知られている。
【０００４】
そのため、過酸化水素によって生じる細胞障害を予防・改善して、細胞の恒常性を高めることができれば、過酸化水素による酸化ストレスが原因となって誘発される上記の疾患群を予防・改善できるものと考えられる。このような過酸化水素細胞障害の予防・改善作用を有するものとして、五斂子花部の抽出物（特許文献３参照）等が知られている。
【０００５】
また、グルタチオンは、グルタミン酸、システイン及びグリシンの３つのアミノ酸からなるトリペプチドであり、細胞内の主要なシステイン残基を有する化合物である。細胞内におけるグルタチオンは、ラジカルの捕捉、酸化還元による細胞機能の調節、異物代謝、

各種酵素のＳＨ供与体としての機能を果たすものであり、抗酸化成分としても知られている。その作用発現は、システイン残基に由来すると考えられている。しかしながら、過剰な酸化ストレスや異物の付加、加齢などにより、細胞内のグルタチオン量が欠乏又は低下することが報告されており、このことが細胞の酸化ストレスに対する防御能を低下させ、細胞のＤＮＡ及びタンパク質等の構成成分にダメージを与える一因であると考えられている。

【０００６】

このような、細胞内のグルタチオン量の低下又は欠乏が病態と関連することが知られている疾患として、酸化ストレスが原因となって誘発される上記の疾患群のほか、肝障害（アルコールの多飲、又は重金属や化学物質等の異物の摂取が原因となる）等が知られている。

【０００７】

すなわち、グルタチオンの産生を促進することは、細胞の酸化ストレスに対する防御能を高め、細胞内のグルタチオン量が低下又は欠乏することに起因する上記の疾患群を予防・治療することができると考えられる。このようなグルタチオン産生促進作用を有するものとして、テンニンカ抽出物（特許文献１参照）、クチナシ属植物の抽出物（特許文献２参照）等が知られている。

【０００８】

炎症性疾患、例えば、接触性皮膚炎（かぶれ）、乾癬、尋常性天疱瘡、アトピー性皮膚炎、その他肌荒れを伴う各種皮膚疾患、関節リウマチ、変形性関節症、喘息等の原因及び発症機構は、多種多様である。その原因として、主にマクロファージから産生される腫瘍壊死因子（以下「ＴＮＦ－α」と称することもある。）によるもの、ヒスタミンの遊離によるもの、及びシクロオキシゲナーゼ－２の活性の亢進によるもの等が知られている。

【０００９】

ＴＮＦ－αは、腫瘍を壊死させる因子として見出されたが、最近では腫瘍に対してだけでなく、正常細胞の機能を調節するメディエーター的な役割を担うサイトカインであると考えられている。ＴＮＦ－αは、炎症の初発から終息までの過程において重要な役割を担っているが、その持続的かつ過剰な産生は、皮膚を含む組織の障害を引き起こし、全身的には発熱やカケクシアの原因となり、炎症の悪化を引き起こす。したがって、病的な炎症においては、ＴＮＦ－αの過剰な産生を抑制することが重要となる。このようなＴＮＦ－α産生抑制作用を有するものとして、例えば、土貝母抽出液（特許文献３参照）、マルツロシルアルギニン及びフルクトシルアルギニン（特許文献４参照）等が知られている。

【００１０】

ヒスタミン遊離は、肥満細胞内のヒスタミンが細胞外に遊離する現象であり、遊離されたヒスタミンが炎症反応を引き起こす。そのため、ヒスタミン遊離を阻害又は抑制する物質により、アレルギー性疾患及び炎症性疾患を予防又は治療する試みがなされている。しかし、ヒスタミンの遊離を直接的に評価することは困難であり、ヒスタミンの遊離と同時に遊離されることが確認されているヘキソサミニダーゼの遊離を指標にヒスタミンの遊離を評価することができる。したがって、ヘキソサミニダーゼの遊離を抑制することにより、同時にヒスタミンの遊離も抑制でき、これにより炎症性疾患等の予防、治療又は改善に効果があるものと考えられる。このようなヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用を有する植物抽出物としては、藤茶からの抽出物（特許文献５参照）等が知られている。

【００１１】

また、炎症は、発赤、浮腫、発熱、痛み、機能障害等の症状を示す複雑な反応である。微視的に見ると、炎症は、血漿漏出を起こす血管反応、白血球の浸潤、炎症性細胞による組織破壊等の共通する反応からなり、発熱反応や痛覚過敏等の中枢神経系も関与する、全身反応も引き起こす場合もある。このような炎症の個々の反応には、プロスタグランジンが重要な役割を果たしており、この炎症時におけるプロスタグランジンの産生には、主として誘導型のシクロオキシゲナーゼであるシクロオキシゲナーゼ－２が関与することが明らかとなっている。

【００１２】
このため、炎症反応の防止及び予防を図る目的で、アスピリンに代表される多くのシクロオキシゲナーゼ阻害剤が用いられている（非特許文献１参照）。また、シクロオキシゲナーゼ阻害作用を有する植物抽出物としては、バーベリー抽出物等が知られている（特許文献６参照）。また、シクロオキシゲナーゼ－２活性阻害作用を有する化合物としては、２－フェニル－１，２－ベンズイソセレナゾール－３（２Ｈ）－オン、その塩又はその水和物等が知られている（特許文献７参照）。
【００１３】
しかしながら、優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用又は抗炎症作用を有し、安価である過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤に対する消費者の要望は強く、さらなる新しい過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤の開発及び提供が強く求められているのが現状である。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１４】
【特許文献１】特開２００８－２８５４２２号公報
【特許文献２】特開２００６－３４７９３４号公報
【特許文献３】特開２００６－５６８５４号公報
【特許文献４】特開２０１０－９００７６号公報
【特許文献５】特開２００３－１２５３２号公報
【特許文献６】特開２００４－３４６０１９号公報
【特許文献７】特開２０００－１６９３５号公報
【非特許文献】
【００１５】
【非特許文献１】「薬理学アトラス」，福原武彦監訳，文光堂，1995年，p.184
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１６】
本発明は、優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用又は抗炎症作用を有する化合物を見出し、それを有効成分とする過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１７】
上記課題を解決するために、本発明の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、ダビジゲニンを有効成分として含有することを特徴とする。
【発明の効果】
【００１８】
本発明によれば、過酸化水素細胞障害の予防・改善作用に優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進作用に優れたグルタチオン産生促進剤、抗酸化作用に優れた抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用に優れた腫腫瘍壊死因子（

ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用に優れたヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、又はシクロオキシゲナーゼ－２阻害作用に優れたシクロオキシゲナーゼ－２阻害剤、抗炎症作用に優れた抗炎症剤を提供することができる。

【発明を実施するための形態】

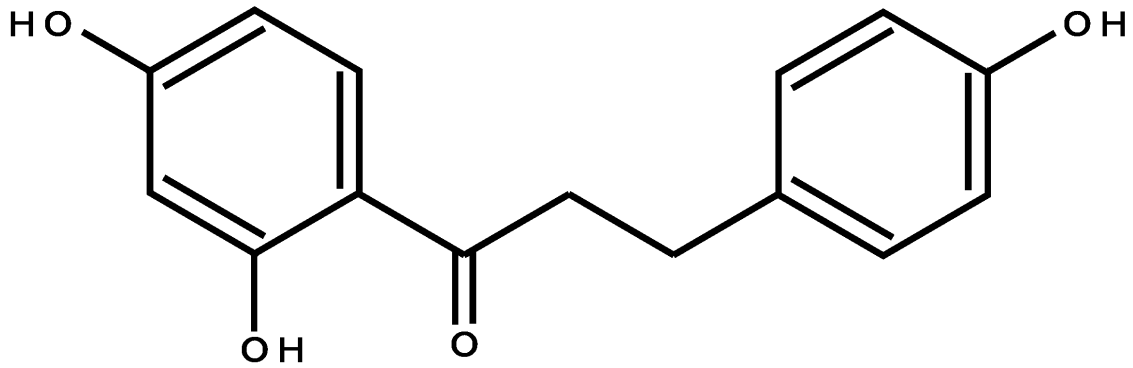
【００１９】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、下記式で表されるダビジゲニンを有効成分として含有するものである。

【００２０】

【化１】



【００２１】

ダビジゲニンは、合成により製造することもできるし、ダビジゲニンを含有する植物の抽出物から単離・精製することにより製造することもできる。さらに、２’，４，４’－トリヒドロキシカルコン（イソリクイリチゲニン）を含有する植物の抽出物を還元処理し、当該抽出物に含まれる２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンをダビジゲニンに還元した後、単離・精製することにより製造することも可能である。

【００２２】

ダビジゲニンを合成により製造する場合、公知の方法により合成することができる。例えば、ｐ－ヒドロキシベンズアルデヒドと２，４－ジヒドロキシアセトフェノンとを塩基の存在化でアルドール縮合させ、２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンを得る。得られた２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンにさらに水素を添加することによりダビジゲニンを得ることができる。

【００２３】

アルドール縮合反応において使用し得る溶媒としては、水；メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール；ｎ－ヘキサン、ベンゼン等の炭化水素系有機溶媒；ジメチルスルホキシド等が挙げられ、これらを１種又は２種以上の混合溶媒として使用することができる。また、アルドール縮合において触媒として使用し得る塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラート等が挙げられる。これらの塩基は、適宜溶媒に溶解して加えても良い。アルドール縮合における反応温度は－１０～８０℃であることが好ましい。反応後、再結晶などの一般的な精製手法により、２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンを得ることができる。

【００２４】

このようにして得られた２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンに水素を添加する方法としては、接触還元を用いることができる。接触還元において使用する溶媒としては、水；メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール；酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジオキサン等が挙げられ、これらを１種又は２種以上の混合溶媒として使用するこ

とができる。接触還元において使用し得る触媒としては、パラジウム、パラジウムカーボン、白金、酸化白金などが挙げられる。接触還元における反応温度は－１０～８０℃であることが好ましい。反応後、再結晶などの一般的な精製手法により、ダビジゲニンを得ることができる。

【００２５】

なお、上記の方法において、ｐ－ヒドロキシベンズアルデヒドと２，４－ジヒドロキシアセトフェノンとに代えて、これらの化合物に存在する１又は２以上のヒドロキシル基を保護基によりあらかじめ保護した化合物を用いてアルドール縮合を行い、得られた縮合物を還元する前又は還元した後に脱保護を行うことにより、ダビジゲニンを得ることとしても良い。

【００２６】

また、２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンを含有する植物の抽出物を還元処理し、２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンをダビジゲニンに還元した後、単離・精製することにより製造する場合、以下の方法により製造することができる。この方法により、後述する好ましい生理作用を有するダビジゲニンを、天然物から安価にかつ大量に製造することが可能となる。

【００２７】

２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンを含有する植物としては、例えば、甘草（Glychyrrhiza属）の植物が挙げられる。２’，４，４’－トリヒドロキシカルコンを含有する植物抽出物は、植物の抽出に一般に用いられている方法によって得ることができる。例えば、抽出原料を乾燥した後、そのまま又は粗砕機を用いて粉砕し、抽出溶媒による抽出に供することにより得ることができる。抽出溶媒としては、極性溶媒を使用するのが好ましく、例えば、水、親水性有機溶媒等が挙げられ、これらを単独で又は２種以上を組み合わせて、室温又は溶媒の沸点以下の温度で使用することが好ましい。

【００２８】

抽出処理は、抽出原料に含まれる可溶性成分を抽出溶媒に溶出させ得る限り特に限定はされず、常法に従って行うことができる。例えば、抽出溶媒に抽出原料を浸漬し、常温又は還流加熱下で可溶性成分を抽出させた後、濾過して抽出残渣を除去することにより抽出液を得ることができ、得られた抽出液から溶媒を留去すると濃縮物が、さらに乾燥すると乾燥物が得られる。

【００２９】

以上のようにして得られた抽出液、当該抽出液の濃縮物又は当該抽出液の乾燥物に還元処理を行う方法としては、接触還元を用いることができる。接触還元において使用する溶媒としては、水；メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール；酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジオキサン等が挙げられ、これらを単独で又は２種以上を組み合わせて使用することができる。接触還元において使用し得る触媒としては、パラジウム、パラジウムカーボン、白金、酸化白金などが挙げられ、中でもパラジウムカーボンが好ましい。また、接触還元における反応温度は－１０～８０℃であることが好ましい。

【００３０】

以上のようにして還元処理を行った抽出物は、そのままダビジゲニンの単離・精製を行えば良い。なお、還元処理の前後に、酸又は塩基等を用いた加水分解処理を行うことで、ダビジゲニンの収量を高めてもよい。ダビジゲニンを単離・精製する方法は、特に限定されるものではなく、常法により行うことができる。例えば、抽出物を、多孔質物質や多孔性樹脂等を用いたカラムクロマトグラフィーに付すことにより、ダビジゲニンを含有する画分として得ることができる。さらに、得られた画分を、ＯＤＳを用いた逆相シリカゲルクロマトグラフィー、再結晶、液－液向流抽出、イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィー等の任意の有機化合物精製手段を用いて精製してもよい。

【００３１】

以上のようにして得られるダビジゲニンは、優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用

、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用及び抗炎症作用を有しているため、過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤及び抗炎症剤の有効成分として用いることができる。

【００３２】

本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、ダビジゲニンのみからなるものでもよいし、ダビジゲニンを製剤化したものでもよい。

【００３３】

本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、デキストリン、シクロデキストリン等の薬学的に許容し得るキャリアーその他任意の助剤を用いて、常法に従い、粉末状、顆粒状、錠剤状、液状等の任意の剤形に製剤化することができる。この際、助剤としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味・矯臭剤等を用いることができる。過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、他の組成物（例えば，皮膚外用剤，飲食品等）に配合して使用することができるほか、軟膏剤、外用液剤、貼付剤等として使用することができる。

【００３４】

本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤を製剤化した場合、ダビジゲニンの含有量は、特に限定されるものではなく、目的に応じて適宜設定することができる。

【００３５】

なお、本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、必要に応じて、過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用又は抗炎症作用を有する他の天然抽出物等を、ダビジゲニンとともに配合して有効成分として用いることができる。

【００３６】

本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤の患者に対する投与方法としては、経皮投与、経口投与等が挙げられるが、疾患の種類に応じて、その予防・治療等に好適な方法を適宜選択すればよい。

【００３７】

また、本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤の投与量も、疾患の種類、重症度、患者の個人差、投与方法、投与期間等によって適宜増減すればよい。

【００３８】

本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤は、有効成分であるダビジゲニンが有する過酸化水素細胞障害の予防・改善作用を通じて、過酸化水素の過剰生成が病態と関連していることが知られている疾患等の治療・予防の用途に使用することができる。このような疾患として、喫煙等が原因の肺疾患、白内障、各種動脈硬化症（虚血性心疾患、心筋梗塞、脳虚血、脳梗塞等）、加齢に伴う老化現象、神経変性疾患（アルツハイマー病、パ

ーキンソン病、ハンチントン舞踏病等）、癌化等が挙げられる。ただし、本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤は、これらの用途以外にも、過酸化水素細胞障害の予防・改善作用を発揮することに意義のあるすべての用途に用いることができる。

【００３９】

本実施形態のグルタチオン産生促進剤は、有効成分であるダビジゲニンが有するグルタチオン産生促進作用を通じて、細胞内グルタチオン量の低下又は欠乏が病態と関連することが知られている疾患等を予防、治療又は改善することができる。このような疾患として、喫煙等が原因の肺疾患、白内障、各種動脈硬化症（虚血性心疾患、心筋梗塞、脳虚血、脳梗塞等）、加齢に伴う老化現象、神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病等）、癌化、肝障害（アルコールの多飲、又は重金属や化学物質等の異物の摂取が原因となる）等が挙げられる。ただし、本実施形態のグルタチオン産生促進剤は、これらの用途以外にも、グルタチオン産生促進作用を発揮することに意義のあるすべての用途に用いることができる。

【００４０】

本実施形態の抗酸化剤は、ダビジゲニンが有するグルタチオン産生促進作用及び／又は過酸化水素細胞障害の予防・改善作用を通じて、酸化ストレスにより誘発される各種疾患、すなわち過酸化水素の過剰生成又は細胞内グルタチオン量の低下若しくは欠乏が病態と関連することが知られている上記の疾患群を予防・改善することができる。ただし、ダビジゲニンが有する抗酸化作用は、上記作用に基づいて発揮される抗酸化作用に限定されるものではない。

【００４１】

本実施形態の腫腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤は、有効成分であるダビジゲニンが有する腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用を通じて、接触性皮膚炎（かぶれ）、乾癬、尋常性天疱瘡、アトピー性皮膚炎、その他肌荒れを伴う各種皮膚疾患、関節リウマチ、変形性関節症、喘息等を予防、治療又は改善することができる。ただし、本実施形態の腫腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤は、これらの用途以外にも、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用を発揮することに意義あるすべての用途に用いることができる。

【００４２】

本実施形態のヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤は、ダビジゲニンが有するヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用を通じて、接触性皮膚炎（かぶれ）、乾癬、尋常性天疱瘡、アトピー性皮膚炎、その他肌荒れを伴う各種皮膚疾患、関節リウマチ、変形性関節症、喘息等を予防、治療又は改善することができる。ただし、本実施形態のヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤は、これらの用途以外にもヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用を発揮することに意義のあるすべての用途に用いることができる。

【００４３】

本実施形態のシクロオキシゲナーゼ－２阻害剤は、ダビジゲニンが有するシクロオキシゲナーゼ－２阻害作用を通じて、接触性皮膚炎（かぶれ）、乾癬、尋常性天疱瘡、アトピー性皮膚炎、その他肌荒れを伴う各種皮膚疾患、関節リウマチ、変形性関節症、喘息等を予防、治療又は改善することができる。ただし、本実施形態のシクロオキシゲナーゼ－２阻害剤は、これらの用途以外にもシクロオキシゲナーゼ－２阻害作用を発揮することに意義のあるすべての用途に用いることができる。

【００４４】

本実施形態の抗炎症剤は、ダビジゲニンが有する腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用及びシクロオキシゲナーゼ－２阻害作用からなる群より選ばれる１種又は２種以上の作用を通じて、各種炎症性疾患、すなわち接触性皮膚炎（かぶれ）、乾癬、尋常性天疱瘡、アトピー性皮膚炎、その他肌荒れを伴う各種皮膚疾患、関節リウマチ、変形性関節症、喘息等を予防・改善することができる。ただし、ダビジゲニンが有する抗炎症作用は、上記作用に基づいて発揮される抗炎症作用に限定されるものではない。

【００４５】
また、本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用又は抗炎症作用を有するため、例えば、皮膚外用剤に配合するのに好適である。
【００４６】
ここで、皮膚外用剤としては、その区分に制限はなく、経皮的に使用される皮膚化粧料、医薬部外品、医薬品等を幅広く含むものであり、具体的には、例えば、軟膏、クリーム、乳液、美容液、ローション、パック、ファンデーション、リップクリーム、入浴剤、ヘアートニック、ヘアーローション、石鹸、ボディシャンプー等が挙げられる。
【００４７】
また、本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用又は抗炎症作用を有するため、例えば、飲食品に配合するのに好適である。飲食品としては、その区分に制限はなく、経口的に摂取される一般食品、健康食品、保健機能食品、医薬部外品、医薬品等を幅広く含むものである。
【００４８】
さらに、本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用、グルタチオン産生促進作用、抗酸化作用、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制作用、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用、シクロオキシゲナーゼ－２阻害作用又は抗炎症作用を有するので、線維芽細胞や細胞外マトリックス等に関連する疾患の研究のための試薬としても好適に利用することができる。
【００４９】
なお、本実施形態の過酸化水素細胞障害の予防・改善剤、グルタチオン産生促進剤、抗酸化剤、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤又は抗炎症剤は、ヒトに対して好適に適用されるものであるが、それぞれの作用効果が奏される限り、ヒト以外の動物（例えば，マウス，ラット，ハムスター，イヌ、ネコ，ウシ，ブタ，サル等）に対して適用することもできる。
【実施例】
【００５０】
以下、製造例及び試験例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の各例に何ら制限されるものではない。
【００５１】
〔製造例１〕ダビジゲニンの製造－１
甘草の一種であるグリチルリーザ・インフラータ（Glychyrrhiza inflata）の根茎部を粉砕し、チップ状にした。この甘草チップ１．０ｋｇをフラスコに取り、１０Ｌの５０容量％エタノール水溶液を加え、８０℃で２時間抽出した後、ろ過した。得られたろ液を４０℃以下の温度で減圧下濃縮した後、４０℃で減圧乾燥を行い、黄褐色粉末である甘草根茎部５０％エタノール抽出物（１５０ｇ）を得た。
【００５２】
このようにして得られた甘草根茎部５０％エタノール抽出物１０ｇに水２５ｍＬを加えて懸濁させ、次いでエタノール２５ｍＬおよび５質量％パラジウムカーボンを加えて撹拌し、室温にて懸濁液中に水素ガスを１６時間吹き込んだ。次いで、ろ過により触媒を除去

し、ろ液として甘草抽出物の還元処理物（１０ｇ）を得た。

【００５３】

このようにして得られた甘草抽出物の還元処理物１０ｇに９５質量％硫酸５．０ｍＬを加え、８０℃で２時間反応させた。得られた反応液を多孔性樹脂（三菱化学社製，Ｄｉａｉｏｎ　ＨＰ－２０，５００ｍＬ）上に付し、水２Ｌ、エタノール２Ｌの順で溶出させた。エタノール２Ｌで溶出させた画分からエタノールを留去し、エタノール溶出画分２．５ｇを得た。このエタノール溶出画分２．５ｇをメタノール：水＝６０：４０（容量比）の混合液に溶解し、ＯＤＳ（富士シリシア化学社製，クロマトレックスＯＤＳ　ＤＭ１０２０Ｔ）を充填したガラス製のカラム上部より流入して、ＯＤＳに吸着させた。移動相としてメタノール：水＝６０：４０（容量比）を流し、その溶出液を集め、溶媒を留去し、ダビジゲニン濃縮液３００ｍｇを得た。得られたダビジゲニン濃縮液を、下記の条件で液体クロマトグラフィーを用いて分画した。

【００５４】

＜液体クロマトグラフィー条件＞

固定相：ＪＡＩＧＥＬ　ＧＳ－３１０（日本分析工業社製）

カラム径：２０ｍｍ

カラム長：２５０ｍｍ

移動相流量：５ｍＬ／ｍｉｎ

検出：ＲＩ

【００５５】

ここで、保持時間４０分～５０分に溶出する画分をリサイクルＨＰＬＣにより精製を行い、精製物を得た（２２０ｍｇ）。得られた精製物について、^{13}Ｃ－ＮＭＲにより分析した結果を以下に示す。

【００５６】

＜^{13}Ｃ－ＮＭＲケミカルシフトδ（帰属炭素）＞

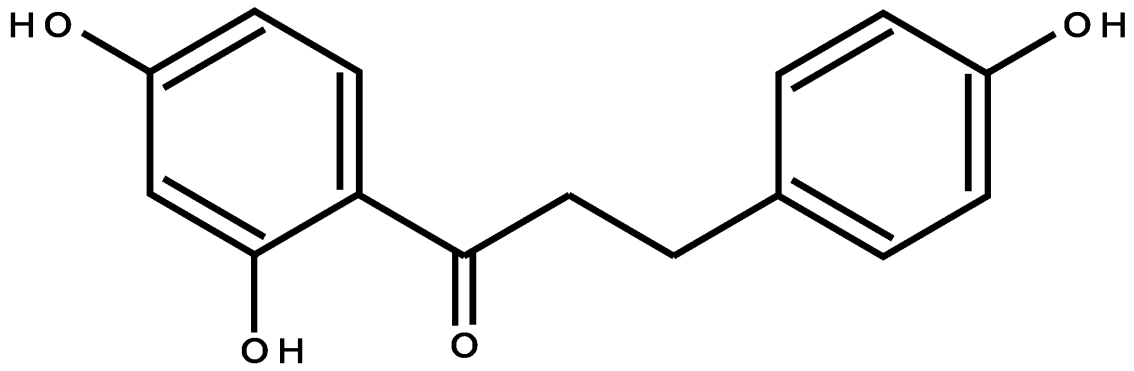
２０５．６（Ｃ＝Ｏ），１６６．４（４’－Ｃ），１６６．３（２’－Ｃ），１５６．７（４－Ｃ），１３３．７（６’－Ｃ），１３３．２（１－Ｃ），１３０．４（２，５－Ｃ），１１６．２（３，５－Ｃ），１１４．１（１’－Ｃ），１０９．１（５’－Ｃ），１０３．７（３’－Ｃ），４０．９（α－Ｃ），３１．０（β－Ｃ）

【００５７】

以上の結果から、甘草抽出物の還元処理物を多孔性樹脂により分画し、ＯＤＳにより分離し、さらに液体クロマトグラフィーにより精製して得られた精製物が、下記式で表されるダビジゲニン（試料１）であることが確認された。

【００５８】

【化２】



【００５９】

〔製造例２〕ダビジゲニンの製造－２

４８％質量水酸化ナトリウム水溶液１０ｍＬにイオン交換水１０ｍＬを加えて希釈した。これを６０℃に加熱し、撹拌しながらｐ－ヒドロキシベンズアルデヒド１．２ｇを加え

て溶解し、次いで２’，４’－ジヒドロキシアセトフェノン１．５ｇを加えて溶解した。この反応液を６０℃に加熱したまま２４時間撹拌し、さらに加熱を止めて室温で４８時間撹拌した。得られた反応液を氷浴上で冷却しながら、水８０ｍＬを用いて希釈した後、あらかじめ調製した１０％硫酸水溶液４０ｍＬを加えて黄色結晶を析出させた。この懸濁液からろ紙を用いたろ過によって沈殿部をろ取した。ろ取した沈殿を４０℃にて減圧乾燥し、２’，４，４’－トリヒドロキシカルコン５００ｍｇを黄色結晶として得た。

【００６０】

上記の反応を繰り返すことで得られた２’，４，４’－トリヒドロキシカルコン１０ｇを、密封可能な反応容器内でエタノール５０ｍＬに溶解し、５質量％パラジウムカーボン１．０ｇを加えた。この懸濁液を激しく撹拌しながら、容器内を減圧しては水素ガスを吹き込む操作を数回繰り返し、容器内を水素ガスで充満させた。反応液を４時間激しく撹拌した後に、ろ過によって触媒を除去した。得られたろ液に水１００ｍＬを加えた。析出した白色結晶をろ紙ろ過によってろ取し、これを４０℃にて減圧乾燥することで白色結晶を得た（９．５ｇ）。

【００６１】

得られた白色結晶を^{13}Ｃ－ＮＭＲにより分析したところ、試料１の結果と一致し、得られた白色結晶がダビジゲニンであることが確認された。

【００６２】

〔試験例１〕過酸化水素細胞障害の予防・改善試験

製造例１で得られたダビジゲニン（試料１）について、下記の試験方法により過酸化水素細胞障害の予防・改善作用を試験した。

【００６３】

ヒト正常皮膚線維芽細胞（ＮＢ１ＲＧＢ）を、１０％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地を用いて培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。回収した細胞を２．５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞濃度になるように５％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地で希釈した後、４８ウェルのマイクロプレートに１ウェル当たり２００μＬずつ播種し、一晩培養した。

【００６４】

培養後、培養液を除去し、１％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地で溶解した被験試料（試料１，試料濃度は下記表１を参照）を、各ウェルに２００μＬずつ添加し、２４時間培養した。培養終了後、各ウェルから培地を抜き、４００μＬのＰＢＳ緩衝液で洗浄し、過酸化水素を溶解したＨａｎｋ’ｓ緩衝液（過酸化水素最終濃度：１ｍＭ）を２００μＬ添加し、２時間培養した。

【００６５】

また、過酸化水素を溶解していないＨａｎｋ’ｓ緩衝液を２００μＬ添加し、同様の条件で培養した。さらに、試料溶液を添加せずに培養し、培養後、過酸化水素を溶解したＨａｎｋ’ｓ緩衝液を２００μＬ添加し、同様の条件で培養した。

【００６６】

培養後、４００μＬのＰＢＳ緩衝液で洗浄し、１％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地で溶解した０．０５ｍｇ／ｍＬのニュートラルレッド溶液を、２００μＬずつ添加し、２．５時間培養した。この後、ニュートラルレッド溶液を除去し、エタノール・酢酸溶液（エタノール：酢酸：水＝５０：１：４９）３００μＬを各ウェルに加え、色素を抽出した。その後、マイクロプレートリーダーを用い５４０ｎｍでの吸光度を測定し、過酸化水素障害抑制率（％）を求めた。なお、過酸化水素障害抑制率は、下記の計算式により算出した。

【００６７】

過酸化水素障害抑制率(％)＝{１－(Ｃ－Ａ)}／(Ｃ－Ｂ)×１００

上記式において、Ａは「被験試料添加・過酸化水素処理」の吸光度を、Ｂは「試料無添加・過酸化水素処理」の吸光度を、Ｃは「試料無添加・過酸化水素無処理」の吸光度を、示す。

上記試験の結果を表１に示す。

【００６８】

【表１】

試料濃度（μg/mL）	過酸化水素障害抑制率（%）
6.25	5.7
25	8.8
100	9.7

【００６９】
表１に示すように、ダビジゲニン（試料１）は、高い過酸化水素障害抑制率を示した。この結果から、ダビジゲニンは、優れた過酸化水素細胞障害の予防・改善作用を有することが確認された。
【００７０】
〔試験例２〕グルタチオン産生促進作用試験
製造例１により得られたダビジゲニン（試料１）について、以下のようにしてグルタチオン産生促進作用を試験した。
【００７１】
ヒト正常皮膚線維芽細胞（ＮＢ１ＲＧＢ）を、１０％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地を用いて培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。回収した細胞を２．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞密度になるように１０％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地で希釈した後、４８ウェルプレートに１ウェル当たり２００μＬずつ播種し、一晩培養した。
【００７２】
培養後、１％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地で溶解した被験試料（試料１，試料濃度は下記表２を参照）を各ウェルに２００μＬ添加し、２４時間培養した。培養終了後、各ウェルから培地を抜き、４００μＬのＰＢＳ緩衝液にて洗浄後、１５０μＬのＭ－ＰＥＲ（ＰＩＥＲＣＥ社製）を使用して細胞を溶解した。
【００７３】
このうちの１００μＬを使用して総グルタチオンの定量を行った。すなわち、９６ウェルプレートに溶解した細胞抽出液１００μＬ、０．１Ｍのリン酸緩衝液５０μＬ、２ｍＭのＮＡＤＰＨ２５μＬ及びグルタチオンレダクターゼ２５μＬ（終濃度１７．５ｕｎｉｔ／ｍＬ）を加え３７℃で１０分間加温した後、１０ｍＭの5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)２５μＬを加え、５分後までの波長４１２ｎｍにおける吸光度を測定し、ΔＯＤ／ｍｉｎを求めた。総グルタチオン濃度は、酸化型グルタチオン（和光純薬社製）を使用して作成した検量線をもとに算出した。得られた値を総タンパク量当たりのグルタチオン量に補正した後、下記式によりグルタチオン産生促進率（%）を算出した。
【００７４】
グルタチオン産生促進率(%)＝Ｂ／Ａ×１００
式中、Ａは「試料無添加時の細胞中における総タンパク量当たりのグルタチオン量（対照）」を表し、Ｂは「被験試料添加時の細胞中における総タンパク量当たりのグルタチオン量」を表す。
結果を表２に示す。
【００７５】

【表２】

試料濃度（μg/mL）	グルタチオン産生促進率（%）
1.56	100.1
6.25	127.4
25	142.7

【００７６】
表２に示すように、ダビジゲニン（試料１）は優れたグルタチオン産生促進作用を有することが確認された。
【００７７】
〔試験例３〕ＴＮＦ－α産生抑制作用試験
製造例１により得られたダビジゲニン（試料１）について、以下のようにしてＴＮＦ－α産生抑制作用を試験した。
【００７８】
マウスマクロファージ細胞（ＲＡＷ２６４．７）を、１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地を用いて培養した後、セルスクレーパーにより細胞を回収した。回収した細胞を１．０×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞密度になるように１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地で希釈した後、９６ウェルプレートに１ウェル当たり１００μＬずつ播種し、４時間培養した。
【００７９】
培養終了後、培地を抜き、終濃度２％ＤＭＳＯを含む１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地で溶解した被験試料（試料１，試料濃度は下記表３を参照）を各ウェルに１００μＬずつ添加し、終濃度１μｇ／ｍＬで１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地に溶解したリポポリサッカライド（DIFCO社製，ＬＰＳ，E.coli0111;B4）を１００μＬ加え、２４時間培養した。培養終了後、各ウェルの培養上清中のＴＮＦ－α量を、サンドイッチＥＬＩＳＡ法を用いて測定し、測定結果から下記式によりＴＮＦ－α産生抑制率（%）を算出した。
【００８０】
ＴＮＦ－α産生抑制率(%)＝{(Ｂ－Ａ)／Ｂ}×１００
式中、Ａは「被験試料添加時のＴＮＦ－α量」を表し、Ｂは「試料無添加時のＴＮＦ－α量」を表す。
結果を表３に示す。
【００８１】
【表３】

試料濃度（μg/mL）	TNF－α産生抑制率(%)
12.5	27.5
50	85.9

【００８２】
表３に示すように、ダビジゲニン（試料１）は、優れたＴＮＦ－α産生抑制作用を有することが確認された。
【００８３】
〔試験例４〕ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用試験

製造例１により得られたダビジゲニン（試料１）について、以下のようにしてヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用を試験した。

【００８４】

ラット好塩基球白血病細胞（ＲＢＬ－２Ｈ３）を１５％ＦＢＳ添加Ｓ－ＭＥＭ培地を用いて培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。回収した細胞を４．０×10^5ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞密度となるように１５％ＦＢＳ添加Ｓ－ＭＥＭ培地で希釈し、終濃度０．５μｇ／ｍＬとなるようにDNP-specific IgEを添加した後、９６ウェルプレートに１ウェルあたり１００μＬずつ播種し、一晩培養した。

【００８５】

培養終了後、培地を抜き、シリガリアン緩衝液５００μＬにて洗浄を２回行った。次に、同緩衝液３０μＬ及び同緩衝液にて調製した被験試料（試料１，試料濃度は下記表４を参照）を１０μＬ加え、３７℃にて１０分間静置した。その後、１００ｎｇ／ｍＬのＤＮＰ－ＢＳＡ溶液１０μＬを加え、３７℃にて１５分間静置し、ヘキソサミニダーゼを遊離させた。

【００８６】

その後、９６ウェルプレートを氷上に静置することにより遊離を停止した。各ウェルの細胞上清１０μＬ及び１ｍＭのｐ－ＮＡＧ（ｐ－ニトロフェニル－Ｎ－アセチル－β－Ｄ－グルコサミニド）溶液１０μＬを、新たな９６ウェルプレートに添加し、３７℃で１時間反応させた。

【００８７】

反応終了後、各ウェルに０．１ＭのNa_2CO_3／$NaHCO_3$２５０μＬを加え、波長４１５ｎｍにおける吸光度を測定した。また、空試験として、細胞上清１０μＬと、０．１ＭのNa_2CO_3／$NaHCO_3$２５０μＬとの混合液の波長４１５ｎｍにおける吸光度を測定し、補正した。得られた測定結果から、下記式によりヘキソサミニダーゼ遊離抑制率（％）を算出した。

【００８８】

ヘキソサミニダーゼ遊離抑制率(％)＝{１－(Ｂ－Ｃ)／Ａ}×１００

式中、Ａは「試料無添加での波長４１５ｎｍにおける吸光度」を表し、Ｂは「被験試料添加での波長４１５ｎｍにおける吸光度」を表し、Ｃは「被験試料添加・ｐ－ＮＡＧ無添加での波長４１５ｎｍにおける吸光度」を表す。

結果を表４に示す。

【００８９】

【表４】

試料濃度(μg/mL)	ヘキソサミニダーゼ遊離抑制率(%)	IC_{50}(μg/mL)
6.25	－11.0	28.8
25	56.8	
100	88.8	
400	88.5	

【００９０】

表４に示す結果から、ダビジゲニン（試料１）は、優れたヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用を有することが確認された。また、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制作用の程度は、ダビジゲニンの濃度によって調節できることが確認された。

【００９１】

〔試験例５〕シクロオキシゲナーゼ－２（ＣＯＸ－２）活性阻害作用試験

製造例１で得られたダビジゲニン（試料１）について、以下のようにしてシクロオキシゲナーゼ－２活性阻害作用を試験した。

【００９２】

マウスマクロファージ細胞（ＲＡＷ２６４．７）を、１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地を用いて培養した後、セルスクレーパーにより細胞を回収した。回収した細胞を２．０×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞密度になるように１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地で希釈した後、９６ウェルプレートに１ウェルあたり１００μＬずつ播種し、１８時間培養した。

【００９３】

培養終了後、すでに存在するＣＯＸ－１及び少量発現しているＣＯＸ－２をアセチル化して失活させるため、培地を５００μｍｏｌ／Ｌアスピリン含有培地に交換し、４時間培養した。細胞をＰＢＳ緩衝液で３回洗浄し、終濃度０．５％ＤＭＳＯを含む１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地で溶解した被験試料（試料１，試料濃度は下記表５を参照）を各ウェルに１５０μＬずつ添加した後、終濃度１μｇ／ｍＬで１０％ＦＢＳ含有ダルベッコＭＥＭ培地に溶解したリポポリサッカライド（DIFCO社製，ＬＰＳ，E.coli 0111；B4）を５０μＬ添加し、２４時間培養した。

【００９４】

培養終了後、各ウェルの培養上清中のプロスタグランジンＥ$_{2}$（ＰＧＥ$_{2}$）量を、ＰＧＥ$_{2}$ ＥＩＡ Ｋｉｔ（Cayman Chemical社製）を用いて定量した。定量結果から、下記式によりシクロオキシゲナーゼ－２活性阻害率（％）を算出した。

【００９５】

ＣＯＸ－２活性阻害率(％)＝{１－(Ａ－Ｃ)／(Ｂ－Ｃ)}×１００

式中、Ａは「被験試料添加・ＬＰＳ刺激時のＰＧＥ$_{2}$量」を表し、Ｂは「試料無添加・ＬＰＳ刺激時のＰＧＥ$_{2}$量」を表し、Ｃは「試料無添加・ＬＰＳ無刺激時のＰＧＥ$_{2}$量」を表す。

結果を表５に示す。

【００９６】

【表５】

試料濃度(μg/mL)	ＣＯＸ－２活性阻害率(%)	IC_{50}(μg/mL)
3.13	3.6	5.97
6.25	54.6	
12.5	92.3	
25	103.4	
50	108.0	

【００９７】

表５に示すように、ダビジゲニン（試料１）は、シクロオキシゲナーゼ－２活性阻害作用を有することが確認された。また、シクロオキシゲナーゼ－２活性阻害作用の程度は、ダビジゲニンの濃度によって調節できることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【００９８】

本発明のグルタチオン産生促進剤、過酸化水素細胞障害の予防・改善剤及び抗酸化剤は、酸化ストレスにより誘発される各種疾患の予防又は改善に大きく貢献できる。また、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－α）産生抑制剤、ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤及び抗炎症剤は、各種炎症性疾患の予防又は改善に大きく貢献できる

。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 25/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16	
Ａ６１Ｐ 25/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/14	
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ 17/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ 11/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１
Ａ６１Ｐ 39/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06	
Ａ６１Ｐ 17/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１
Ａ６１Ｋ 8/35	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	39/06	
Ａ６１Ｑ 19/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/18	
		Ａ６１Ｋ	8/35	
		Ａ６１Ｑ	19/00	

(72)発明者　岩橋　弘恭
広島県福山市新市町相方１０８９－８　丸善製薬株式会社総合研究所内
(72)発明者　大戸　信明
広島県福山市新市町相方１０８９－８　丸善製薬株式会社総合研究所内

Ｆターム(参考) 4C083 AC211 BB51 CC04 CC05 CC07 CC12 CC23 CC25 CC33 DD22
DD23 DD31 EE11
4C206 AA01 AA02 CB19 KA01 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA16 ZA33
ZA36 ZA59 ZA89 ZB11 ZB15 ZC20