

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5830316号
(P5830316)

(45) 発行日 平成27年12月9日 (2015. 12. 9)

(24) 登録日 平成27年10月30日 (2015. 10. 30)

(51) Int. Cl. F 1
A 6 1 K 36/28 (2006. 01)
A 6 1 P 3/10 (2006. 01)

A 6 1 K 36/28
A 6 1 P 3/10

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2011-199077 (P2011-199077)	(73) 特許権者	593106918
(22) 出願日	平成23年9月13日 (2011. 9. 13)		株式会社ファンケル
(65) 公開番号	特開2013-60382 (P2013-60382A)		神奈川県横浜市中区山下町 8 9 番地 1
(43) 公開日	平成25年4月4日 (2013. 4. 4)	(74) 代理人	100122954
審査請求日	平成26年4月14日 (2014. 4. 14)		弁理士 長谷部 善太郎
		(74) 代理人	100150681
			弁理士 佐藤 莊助
		(74) 代理人	100162396
			弁理士 山田 泰之
		(74) 代理人	100105061
			弁理士 児玉 喜博
		(72) 発明者	落合 優
			神奈川県横浜市戸塚区上品濃 1 2 番 1 3 号
			株式会社ファンケル総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食後高血糖改善剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カレープラント抽出物を有効成分とする食後高血糖改善剤。

【請求項 2】

カレープラント抽出物が水又は有機溶媒抽出物である請求項 1 記載の食後高血糖改善剤

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、食後高血糖改善剤に関する。

【背景技術】

【0002】

アディポネクチンは、脂肪細胞から特異的に産生および分泌される善玉アディポサイトカインであり、循環器系疾患、糖尿病、肥満などの生活習慣病と密接に関連することが知られている。血中でのアディポネクチンの産生を促進する成分の研究・開発が進められている。

【0003】

アディポネクチンは分子量約30KDaの、脂肪細胞で最も豊富に発現している善玉アディポサイトカインである。補体のC1qと構造上の相同性があり、N末端よりシグナルペプチド、コラーゲン様ドメイン、球状ドメインよりなる。血中では12-18量体の高分子量アデ

ィポネクチン、6量体の中分子量アディポネクチン、3量体の低分子量アディポネクチンの3種類の多量体を形成している。

肥満や内臓脂肪蓄積に伴って、アディポネクチンの血中レベルが低下する。アディポネクチンは遺伝子の多型など遺伝的要因によっても低下する。アディポネクチン遺伝子欠損マウスは、インスリン抵抗性、耐糖能異常、脂質異常、高血圧などのメタボリックシンドロームの諸徴候を呈する。アディポネクチンの補充は、インスリン抵抗性やメタボリックシンドロームを改善する。

【0004】

アディポネクチン産生促進に関し、多数の提案が成されている。

特許文献1（特開2009-209080号公報）には、大豆蛋白加水分解物を有効成分とし、特に大豆蛋白加水分解物がジペプチド又は／及びトリペプチドを主成分とするオリゴペプチド混合物であるような組成物が、アディポネクチン分泌促進作用があり、血中アディポネクチン濃度を強く亢進することが開示されている。

特許文献2（特開2009-249341号公報）には、紅麴抽出物およびプロアントシアニジンを実効成分とする、アディポネクチン産生促進剤が開示されている。

特許文献3（特開2008-255040号公報）には、レスベラトロールを実効成分とするアディポネクチン産生促進剤が開示されている。

【0005】

一方、キク科ムギワラギク属に属する多年草の一種であるカレープラントについて様々な研究がなされている。

カレープラントは学名*Helichrysum italicum*もしくは*Helichrysum augustifolium*で、別名はカレープラントの他にイモートル、インモートル、immortelle、カレープランツ、ヘリクリサムと総称されている。花卉頭頂部は乾燥させた状態でも鮮やかな黄色を呈していることから、サンディーエバーラスティング、エバーラスティングフラワー（永久花）とも呼ばれている。原産地は南欧であり、それらの地域を中心に調理用として用いられ、若い枝は、米、野菜、香味料理に入れて穏やかなカレーの香り付ける香辛料として用いられて食用されている（非特許文献1：Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Doeling Kindersley, London. 1995 p292、翻訳本 ハーブ大百科（発行(株)誠文堂新光社）p292）。

また、葉を細切しミンチ状にしてスクランブルエッグやオムレツの香り付けに、そして、抽出物や精油は、果実様のフレーバーとしてキャンディ、アイスクリーム、ソフトドリンク、チューニングガムに配合されている（非特許文献2：Cornucopia - A Source Book of Edible Plants Kampong Publications. 1990 p34）。また、花卉頭頂部はお茶として用いられ、煎汁（乾燥花1gを熱湯150mlに5分から10分煎じた後、花をこし取って調整）1杯が1日数回にわたって飲用される。この場合乾燥花の平均的な1日使用量は3gである（非特許文献3：健康食品データベース、監訳：独立行政法人 国立健康・栄養研究所、第一出版、p425）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2009-209080号公報

【特許文献2】特開2009-249341号公報

【特許文献3】特開2008-255040号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Doeling Kindersley, London. 1995 p292、翻訳本 ハーブ大百科（発行(株)誠文堂新光社）p292）。

【非特許文献2】Cornucopia - A Source Book of Edible Plants Kampong Publications. 1990 p34）

【非特許文献3】健康食品データベース、監訳：独立行政法人 国立健康・栄養研究所、

10

20

30

40

50

第一出版、p425)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、新規なアディポネクチンの産生・分泌促進剤を提案することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、517種の植物抽出物を調査分析した結果、キク科ムギワラギク属の植物であるカレープラントの抽出物について、食後高血糖改善作用を知見したので提案する。

すなわち、本発明の主な構成は、次のとおりである

(1) カレープラント抽出物を有効成分とする食後高血糖改善剤。

(2) カレープラント抽出物が水又は有機溶媒抽出物である (1) 記載の食後高血糖改善剤。

【発明の効果】

【0010】

本発明の有効成分であるカレープラント抽出物は、アディポネクチン産生促進作用を有するため、アディポネクチン産生が低下した状態を改善する。これによりアディポネクチンが関与する種々のインスリン抵抗性を改善し、メタボリックシンドロームに基づく種々の病態の治療・予防に役立つことが期待される。特にアディポネクチン産生促進によって食後血糖の上昇を抑制するため、糖尿病などの血糖コントロールを必要とする患者にとって有効な治療剤となる。また、カレープラントから高濃度に抽出された抽出物を含有する飲食品を摂取することは、日常的な血糖の改善作用をもたらす。また本発明は核内受容体 PPAR γ を活性化するので、PPAR γ の活性が低下することに起因する疾患の治療剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】前駆脂肪細胞の分化の相対割合を示すグラフ。

【図2】前駆脂肪細胞のadiponectin産生量を示すグラフ。

【図3】核内因子PPAR γ に対してカレープラント抽出物が濃度依存性リガンドすることを示すグラフ。

【図4】in vivo試験でモデル動物の食餌量を示すグラフ。

【図5】in vivo試験でモデル動物の体重変化を示すグラフ。

【図6】糖負荷試験での血中グルコース濃度の変化を示すグラフ。

【図7】糖負荷試験での血中グルコースAUCを示すグラフ。

【図8】モデル動物の尿糖測定結果を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明で用いる抽出物は、カレープラント地上部が好適である。また、カレープラントの植物体はそのままの形態で抽出してもよい。抽出効率を高めるために好ましくは粉碎して抽出する。

【0013】

抽出には、溶媒抽出や圧搾抽出等種々の抽出方法を用いることができるが、好ましくは、溶媒抽出を用いることができる。抽出に使用される溶媒としては、水、アルコール、エーテル、アセトン、ヘキサン、クロロホルム、トルエン、酢酸エチル、テトラヒドロフラン等が挙げられるがこれに限定されるものではない。これらの溶媒の中から1種または2種以上選択して使用するが、安全性の見地から、水、エタノールが好ましく、更に好ましくは、水とエタノールの混合物、例えば1～99%のエタノール水溶液、特に20～80%のエタノール水溶液を使用することが好ましい。

【0014】

抽出方法は、植物体の粉碎物100gに対して0.1～10リットル、好ましくは1リットルの溶媒を加え、1時間～1週間、室温にて放置、あるいは抽出効率を高めるため攪拌する。あるいは溶媒を加温してもよい。

【0015】

抽出は不溶物と抽出液を濾過あるいは沈降法等により分離する。好ましくは、不溶物は同様の抽出操作を繰り返し、適当な濃縮処理により、例えばエバポレーターのような減圧濃縮装置や加熱による溶媒除去などにより濾別後、濾液を濃縮し濃縮液を得ることが出来る。さらに濃縮液を凍結乾燥させて濃縮乾固物を得ることも出来る。さらには、カラムクロマトグラフィー等各種のクロマトグラフィー等、植物成分の分離、抽出に利用される公知の方法を用いて有効成分を分画し、その純度を高めてもよい。

10

【0016】

カレープラント抽出物は、ラットの血中アディポネクチン量の増加作用をもたらす。従って上記作用を有することにより、カレープラント抽出物はアディポネクチンの欠乏や不足に伴う各種疾患、特に肥満や糖尿病の改善剤として使用できる。

【0017】

上述のようにして得られるカレープラント抽出物は、アディポネクチン産生促進剤としてそのまま直接使用してもよいが、種々の剤型での投与が可能であり、一般的には薬学的に許容される適当な液体担体に溶解するか若しくは分散させ、または薬学的に許容される適当な粉末担体と混合するか若しくはこれに吸着させ、例えば、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤等の経口投与剤や、座薬や点滴剤などの非経口投与剤として使用

20

【0018】

また、本発明のアディポネクチン産生促進剤は、通常の飲食品に上記のカレープラントから得られた抽出物を添加することもできる。例えば、チョコレート、キャンディ、ゼリー、ビスケット、チューインガム、アイスクリーム、シャーベット、氷菓、和菓子等の菓子、清涼飲料、ジュース、ウーロン茶等の飲料、畜肉加工品、魚肉・水産加工肉、乳・卵加工品、野菜加工品、穀類加工品、冷凍食品、調味料、スプレッド等の飲食品に用いることができる。添加量は、対象の飲食品に対して重量を基準として乾燥抽出物を0.01～10%、好ましくは0.05～5%の範囲で添加するのが好ましい。

30

本発明のアディポネクチン産生促進剤の有効投与量は、経口摂取において成人1日当り1～10gである。

以下実施例を示し、本発明をさらに説明する。

【実施例】

【0019】

カレープラント抽出物のアディポネクチン産生促進効果試験

[材料]

カレープラントの抽出物は以下の方法で調製した。

地上部全草を採取したカレープラントは乾熱乾燥を経て室温保管した乾燥物を使用した。採取物に対する植物乾燥物の乾燥歩留は15%から30%の範囲で、一般的な植物の乾燥歩留と大差無かった。

40

カレープラント水抽出物（以下CP-W）は1時間60℃に加温した水に浸潤抽出して得た抽出液を減圧濃縮により固形化し、ドラムドライヤーにて加熱乾燥させた固形物として調製した。

カレープラント40%エタノール抽出物（以下CP-E）は、室温で1時間40%（v/v）エタノールに浸潤抽出して得た抽出液を減圧濃縮により固形化し、ドラムドライヤーにて加熱乾燥させた固形物として調製した。

またアディポネクチン産生促進試験の陽性対照としてピオグリタゾン（以下PGZ、シグマ）を用いた。

50

【0020】

[in vitro試験]

前駆脂肪細胞の分化促進作用、およびアディポネクチン産生促進作用

1. 試験方法

マウス由来前駆脂肪細胞（3T3-L1、DSファーマバイオメディカル）を10%FBS、1%Penicilin-Streptomycinを含有したDulbecco's変法Eagle培地（DMEM）にて継代・培養した。これを試験細胞とする。

試験は、ラット尾コラーゲンIをコートしたマルチウェルプレート（48ウェル、BD BioCoat、BD Bioscience）に1ウェル当たり 5×10^4 個の3T3-L1細胞を播種し、コンフルエントになるまで培養した（6～8日）。その後、1mMデキサメタゾン（シグマ）5.55mLと3-イソブチルメチルキサンチン（シグマ）61.05mg、10mg/mLインスリン（ウシ膵臓由来、シグマ）（氷酢酸を添加してpH調製した酸性水（pH 2.0））555 μ Lを含む誘導培地500mLにて3～4日間培養して前駆脂肪細胞から未熟脂肪細胞へ分化誘導した。次いで、10mg/mLインスリン555 μ LとDMSOに溶解させた被験サンプルを含む維持培地にて1週間培養した。1週間の培養の後、成熟脂肪細胞中の脂肪滴の量をOil Red O染色法にて測定した。測定方法は、培養上清に存在する産生・分泌されたアディポネクチンの量をELISAキット（マウス/ラットアディポネクチンELISAキット、大塚製薬）を用いて測定した。

すなわち、未熟脂肪細胞に被験サンプルを添加し、維持培地にて培養したのち、各ウェルを0.1Mリン酸緩衝液（PBS）200 μ Lで2回洗浄した。洗浄後、各ウェルに100 μ Lの10%中性ホルマリンを加えて1時間室温にて放置し、細胞を固定させた。その後ホルマリンを除去し、イソプロパノールで溶解した5.0g/L Oil Red O染色液（予め半日攪拌し、使用前に濾紙にて濾過した）を各ウェルに100 μ L加えて、15分間室温で放置した。その後各ウェルを蒸留水200 μ Lで3回洗浄し、洗浄後各ウェルに150 μ Lのイソプロパノールを加えて15分間室温で放置し、細胞内の脂肪滴の色素を脱色した。15分後、脱色されたイソプロパノールを96ウェルプレート（IWAKI）に移し、490nmの吸光度を測定した。コントロールにはDMSOのみ添加し、前駆脂肪細胞からの分化促進作用の相対的な活性を求めた。

【0021】

アディポネクチン濃度の測定は、1週間の維持培地での培養後、培養上清（500 μ L）を1.5mLのチューブに移し、-80℃で凍結後、凍結乾燥させた。その後、蒸留水100 μ Lを加えて再溶解させ、ELISAキット（マウス/ラットアディポネクチンELISAキット、大塚製薬）のマニュアルに従い測定した。

【0022】

2. 試験結果

前駆脂肪細胞の分化促進作用、およびアディポネクチン産生・分泌促進作用に対する各サンプルの結果を図1、図2に示した。カレーブランド抽出物は濃度依存性で、前駆脂肪細胞を脂肪細胞へ分化させることが確認できた。また同様にアディポネクチン産生を促進させることが確認できた。アディポネクチン産生促進効果はエタノール抽出物（CP-E）の方が強かった。

【0023】

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ に対するリガンド活性の測定

核内転写因子であるPPAR γ は主に脂肪組織に分布して脂肪細胞分化などに関与する他、マクロファージや血管内皮細胞などにも発現が見られる。インスリン抵抗性改善薬の標的分子でもある。このリガンド活性を測定することでアディポネクチンが脂肪組織に有効に作用し、脂肪組織においてインシュリン抵抗性が改善し、グルコースが細胞内に取り込まれ、抗糖尿病作用を示すことを確認できる。

【0024】

1. 試験方法

被験サンプルのPPAR γ に対するリガンド活性の測定は被験サンプルをDMSOに溶解して、市販のキット（EnBio RCAS for PPAR γ 、藤倉化成）のマニュアルに従い測定した。なおこの測定はコアクチベータの関与を確認できる測定方法である。

【0025】

2. 試験結果

前駆脂肪細胞のインスリン抵抗性の指標となるPPAR γ に対するリガンド活性は、CP-E、CP-Wとも有していた。図3に示すとおり、エタノール抽出物CPEは濃度依存的に、PPAR γ に対するリガンド活性を有しており、この核内レセプターを介してアディポネクチンの産生を促進していることが裏付けられた。またこの反応はコアクチベータが関わっていることが確認できた。

【0026】

[in vivo試験]

1. 試験方法

試験動物には4週齢の雄性のKKAy-TaJclマウス（日本クレア）27匹を用いた。マウス搬入後、7日間は馴化期間とし、食餌はCRF-1（オリエンタル酵母）、給水は水道水の自由摂取とした。5週齢より本飼育を開始した。試験食として、高脂肪高ショ糖食（オリエンタル酵母、F2HFHSD粉末飼料、以下HFとする）、HFにカレープラント水抽出物（以下CP-Wとする）、カレープラント40%エタノール抽出物（以下CP-Eとする）を1.0%となるように添加した。また、HFの対照となる試験飼料はAIN-93G（オリエンタル酵母、以下LFとする）を用いた。

in vitro試験と同様にカレープラント（地上部全草）は乾熱乾燥を経て室温保管した乾燥物を使用した。採取物に対する植物乾燥物の乾燥歩留は15%から30%の範囲で、一般的な植物の乾燥歩留と大差無かった。各カレープラント抽出物の製造詳細に関しては、CP-Wは60℃、1時間水に浸潤抽出して得た抽出液を減圧濃縮により固形化し、ドラムドライヤーにて加熱乾燥させた固形物として調整した。CP-Eは、室温にて1時間、40%（v/v）エタノールに浸潤抽出して得た抽出液を減圧濃縮により固形化し、ドラムドライヤーにて加熱乾燥させた固形物として調整した。

【0027】

試験動物の馴化終了後、上記の各試験食を4週間摂取させた。試験期間中、食餌摂取量、および体重を週2回測定した。4週間の食餌摂取後に約16時間の絶食処置をし、経口グルコース負荷試験（OGTT）を実施した。OGTTでは絶食時に尾切断により採血したのち、D-グルコース（2g/10ml/kg）溶液を強制経口投与して投与開始30分、60分、120分後に尾切断により採血した。血液は6,200g、5分間遠心分離して血漿を得た。得られた血漿を用いて血漿中のグルコース濃度を富士ドライケム3500（富士フィルム）（測定キットは富士ドライケムスライド GLU-PIIIを使用）にて測定した。

OGTT後、各群に1週間各試験群の試験飼料を再摂食させ、1週間後に16時間以上の絶食下にて解剖を実施した。また、解剖までの約16時間に排泄された尿を全量採取した。

解剖は絶食下にて断頭屠殺にて実施し、血液を採取し、6,200g、15分間遠心分離して得られる血漿を採取し、分析まで-80℃で保存した。

尿を用いて尿糖のレベルをプレテスト3aII（和光純薬）にて測定した。

【0028】

2. 統計解析

in vivo試験における尿糖の分析以外のすべての結果を平均値±標準誤差（Means±SE）で示した。HF群との有意差の検定には、Dunnett法を用いて統計学的な解析を行った。尿糖の分布の分析にはクラスカルウォルズ検定を行い、HF群との有意差の検定にはSteel法を用いた。いずれの検定も統計学的な有意差を $p<0.05$ とした。

【0029】

3. 試験結果

<食餌摂取量、および体重推移>

試験期間中の食餌摂取量、および体重推移を図4、図5以下に示した。

試験期間を通じての総食餌摂取量については、HF群と比較して有意な差は確認されなかった。体重推移については、試験期間を通じてLF群においてHF群と比較して有意に低値であった（試験期間3日目～35日目）。また、CP-W群において3日目、7日目、14日目の時点

でHF群と比較して低くなる結果となったが、その後の体重においてはHF群と比較して有意な差は確認されなかった。

【0030】

＜グルコース付加試験（耐糖能試験）＞

OGTTでの血漿グルコース濃度の推移を図6に示した。糖負荷後の血中グルコース濃度はLF群、CP-W群、CP-E群においてHF群と比較して有意に低値に推移した。この結果はカレープラント抽出物が食後血糖を低下させる効果を有することを意味している。

また血中グルコース濃度の曲線下面積（AUC）を図7に示す。エタノール抽出物CP-Eは、AUCも有意に低く、血中に出現するグルコース総量を引き下げる作用を有することがわかった。すなわちカレープラント抽出物は食後血糖を低下させる作用を有していることが明らかとなった。

10

【0031】

＜尿糖の測定結果＞

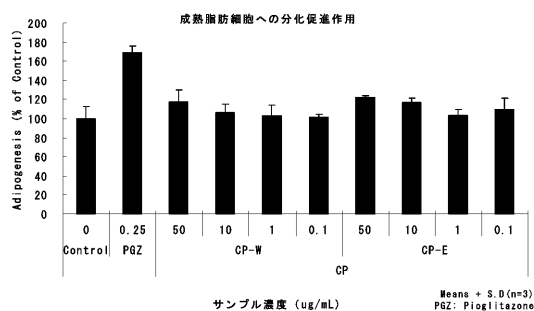
高脂肪食摂取することで肥満に伴う血中グルコースが尿糖に漏出すると糖尿病と呼ばれる。図8に示すとおりカレープラント抽出物は尿糖を低下させる。特にエタノール抽出物CP-Eは顕著に尿糖を低下させた。

【0032】

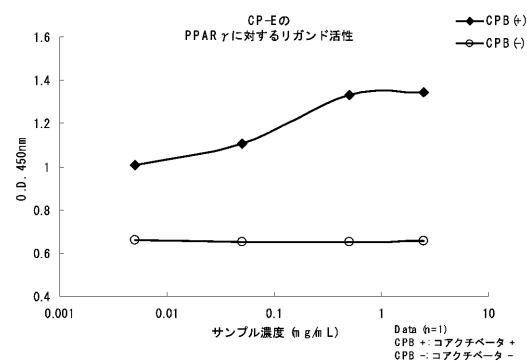
以上のin vitro、in vivo試験から、カレープラント抽出物はアディポネクチン産生を促進し、血中グルコース濃度を低下させ、糖尿病治療に有用であることが明らかとなった。

20

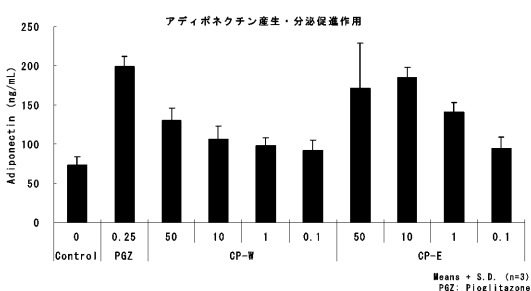
【図1】



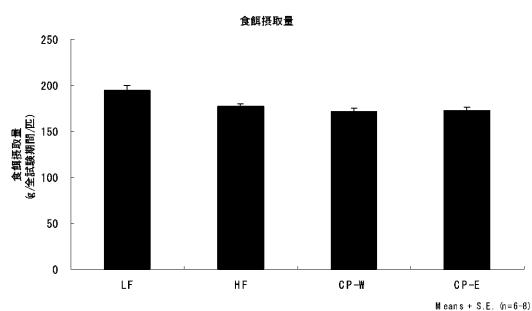
【図3】



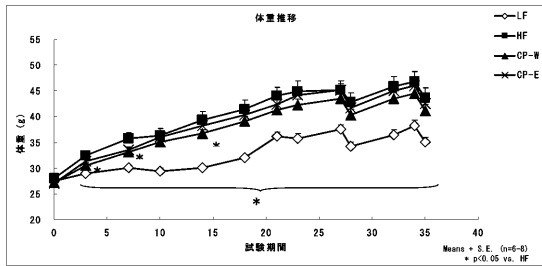
【図2】



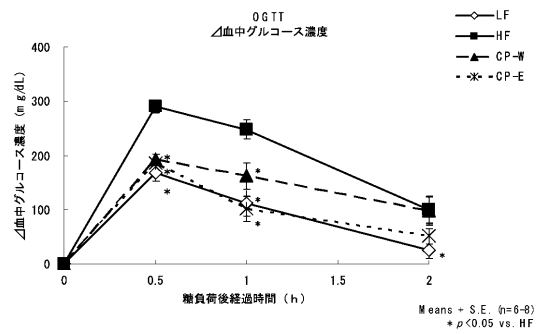
【図4】



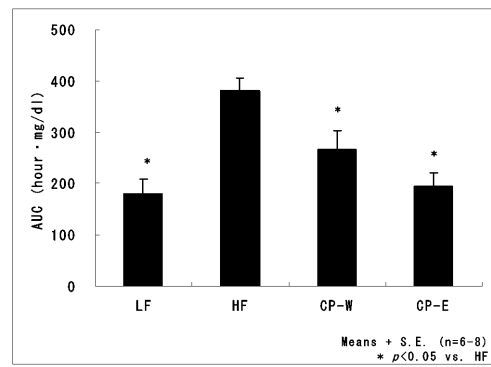
【図 5】



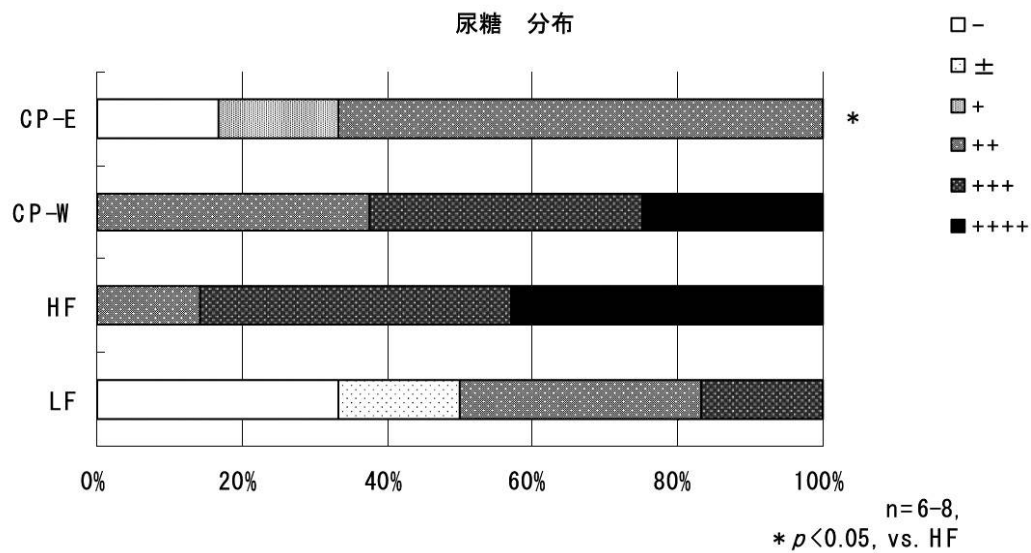
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

- (72)発明者 金 辰也
神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号 株式会社ファンケル総合研究所内
- (72)発明者 吉積 一真
神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号 株式会社ファンケル総合研究所内
- (72)発明者 加藤 千尋
神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号 株式会社ファンケル総合研究所内
- (72)発明者 魚津 伸夫
神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号 株式会社ファンケル総合研究所内

審査官 佐々木 大輔

- (56)参考文献 特開2006-016312 (JP, A)
特開2006-036788 (JP, A)
Food Chemistry, 2009, Vol.117, pp.660-667
日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.), 2003, Vol.122, pp.294-300
Molecular Medicine, 2002, Vol.39, No.4, pp.438-447
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 36/00-36/9068
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)