

(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2012-254980

(P2012-254980A)

(43) 公開日 平成24年12月27日(2012.12.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/12 (2006.01)	A 6 1 K 31/12	4 B 0 1 7
A 6 1 K 31/23 (2006.01)	A 6 1 K 31/23	4 B 0 1 8
A 6 1 K 31/232 (2006.01)	A 6 1 K 31/232	4 C 0 8 8
A 6 1 K 36/81 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 R	4 C 2 0 6
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 13 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-122390 (P2012-122390)
 (22) 出願日 平成24年5月29日 (2012.5.29)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0055137
 (32) 優先日 平成23年6月8日 (2011.6.8)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0054734
 (32) 優先日 平成24年5月23日 (2012.5.23)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 508375974
 イーエスバイオテック カンパニーリミテ
 ッド
 大韓民国 チュンチョンナムード 330
 -863 チョンアン-シ ドナムムグ
 ビョンチョン-ミョンソンジョン-リ
 531-18
 (74) 代理人 100091409
 弁理士 伊藤 英彦
 (74) 代理人 100096792
 弁理士 森下 八郎
 (74) 代理人 100091395
 弁理士 吉田 博由
 (74) 代理人 100137246
 弁理士 田中 勝也

最終頁に続く

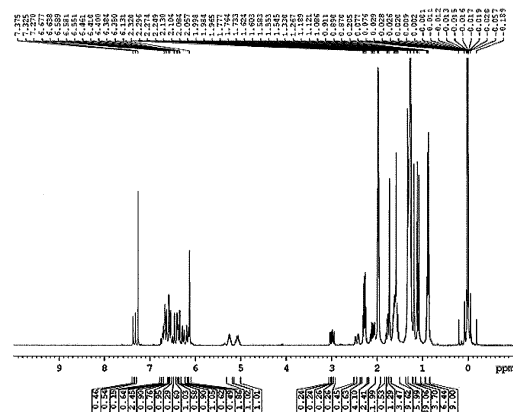
(54) 【発明の名称】 脂肪細胞形成抑制活性を有する遊離型及びエステル型カプサンチンを含む抗肥満用の機能性食品及び医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含む、肥満抑制用の機能性食品または肥満の治療若しくは予防するための医薬組成物を提供する。

【解決手段】遊離型及びエステル型カプサンチンの脂肪細胞形成抑制活性に係る新規用途に関する。唐辛子、パプリカ及びピーマンなどの天然物に含まれるカプサンチンが前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化及び分化された脂肪細胞の脂肪蓄積をそれぞれ抑制することができるということを確認し、これに基づき、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を脂肪細胞前駆体及び脂肪細胞と反応させて前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化及び脂肪細胞内の脂肪蓄積が抑制される性質を利用する方法、並びに遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含むことにより、肥満の予防または治療に効果がある機能性食品及び医薬組成物を提供する。

【選択図】図1



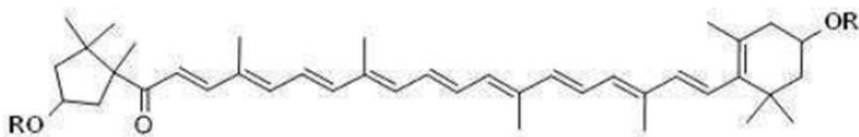
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化学式 1 で示される遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含む、肥満の予防または抑制用機能性食品組成物。

【化 1】

[化学式 1]



10

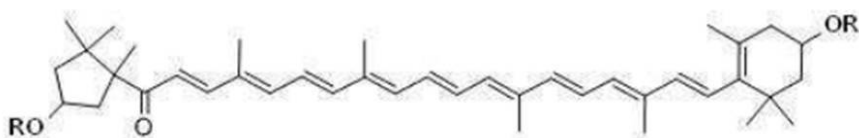
(式中、R は、水素、ラウロイル、リノレイル、ミリストイルまたはパルミトイルである。)

【請求項 2】

化学式 1 で示される遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含む、肥満の治療または予防用医薬組成物。

【化 2】

[化学式 1]



20

(式中、R は、水素、ラウロイル、リノレイル、ミリストイルまたはパルミトイルである。)

【請求項 3】

前記天然物は、唐辛子、パプリカ及びピーマンからなる群より選択される 1 種以上である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

30

【請求項 4】

前記天然物に含まれるカプサンチンはエステル型である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記食品は、飲料類、穀類、パン類、菓子類または麺類である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

速放性製剤または徐放性製剤である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記カプサンチンは、コチュジャンまたはキムチである発酵食品から分離されたものである、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

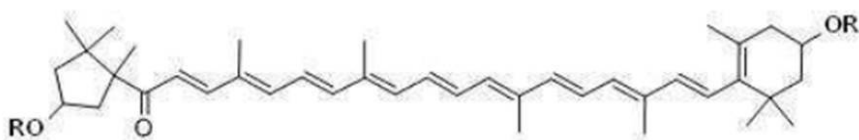
40

【請求項 8】

化学式 1 で示される遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含む肥満の予防または治療用組成物の使用。

【化 3】

【化学式 1】



(式中、R は、水素、ラウロイル、リノレイル、ミリストイルまたはパルミトイルである。)

10

【請求項 9】

前記天然物は、唐辛子、パプリカ及びピーマンからなる群より選択される 1 種以上である、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記天然物に含まれるカプサンチンはエステル型である、請求項 8 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチンが前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化及び分化された脂肪細胞への脂肪の蓄積をそれぞれ抑制することを確認し、これに基づくものである。

20

【背景技術】

【0002】

肥満は、単なる外観上の問題のみならず、糖尿病、高血圧、乳癌、大腸癌、心血管系疾患、脳血管系疾患などの代謝性疾患、即ち、種々の生活習慣病をもたらす健康異常に係る深刻な脂肪蓄積性の身体変化である。

【0003】

肥満者は普通の人比べて疾病発生の恐れが、糖尿病の場合は約 10 倍、高血圧の場合は約 4 倍高いといわれている。

【0004】

30

欧米の場合、総人口の 40 ~ 50 % が肥満であり、韓国の場合、食生活の欧米化により、大人のみならず小児の肥満発生率が急増しているため、肥満の予防及び改善対策を早急に樹立しなければならない。

【0005】

カプサイシン(capsaicin)は、イソデシレン酸(isodecylenic acid)及びバニリルアミン(vanillylamine)からなる酸アמידである。これは唐辛子などに少量含まれていて辛味を有し、3T3-L1細胞から誘導される脂肪細胞(adipocyte)に対して強い脂肪細胞形成抑制活性(anti-adipogenic activity)を発揮するものであることが知られている。

【0006】

一方、唐辛子、パプリカ、ピーマンなどに含まれる成分の一種であるカプサンチン(capsanthin)は抗酸化活性を有していることが知られているが、脂肪細胞形成抑制活性については知られていない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチンの投与により脂肪細胞への分化及び脂肪細胞内の脂肪蓄積が抑制される性質を抗肥満剤の開発に利用するものである。

【0008】

本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含む、肥満抑制用の機能性食品または肥満の治療若しくは予防するための医薬組成物を提

50

供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含む、肥満抑制用の機能性食品組成物を提供する。

【0010】

また、本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含む、肥満の治療若しくは予防するための医薬組成物を提供する。

【0011】

また、本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を、脂肪細胞前駆体と反応させることを含む、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化が抑制される性質を利用するものである。

【0012】

また、本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を、脂肪細胞と反応させることを含む、脂肪細胞内の脂肪蓄積が抑制される性質を利用するものである。

【0013】

また、本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を添加することを含む、抗肥満活性を有する食品または医薬成分の調製方法を提供する。

【発明の効果】

【0014】

本発明の食品及び医薬組成物は、肥満の予防、抑制、及び治療に効果がある。

【0015】

本発明の食品及び医薬組成物にカプサンチンが遊離型(free form)として含まれる場合には、その形態が変化することなく吸収されるため、脂肪細胞及びその前駆体と迅速に反応して脂肪細胞形成抑制活性を奏することができ、その活性はエステル型カプサンチンに比べて顕著に高いといった長所を有する。

【0016】

本発明の食品及び医薬組成物にカプサンチンがエステル型(ester form)として含まれる場合には、胃腸管でリパーゼまたはコレステロールエステラーゼなどの酵素によって遊離型へと加水分解された後に吸収されるため、その血中濃度が急激に変化することなく効果が持続されるといった長所を有する。また、エステル型カプサンチンは遊離型カプサンチンに比べて安定であるため、副生成物の生成が少ないといった長所も有する。

【0017】

カプサンチンは、唐辛子などの天然物中に安定したエステル型として存在するため、唐辛子などがキムチなどの発酵食品に含まれて発酵する場合にもその活性が維持される。参考までに、カプサイシンは、6ヶ月間の発酵過程において35%以上破壊されることが本発明者らの関連した研究で確認された。

【0018】

カプサンチンは、唐辛子の抗肥満活性成分として知られているカプサイシンに比べてIC₅₀値が極めて小さいので、カプサイシンと比較して脂肪細胞形成抑制活性に優れている。

【0019】

カプサンチンはカプサイシンとは異なり、高濃度であっても辛味を示さず、粘膜細胞に対する刺激もないため、製品開発における特別な阻害要因とはならない。

【0020】

遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物は、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化及び分化された脂肪細胞への脂肪蓄積をそれぞれ抑制することができる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】エステル型カプサンチンの H - N M R 結果を示す図である。

【図 2】遊離型カプサンチンの H - N M R 結果を示す図である。

【図 3】純粋分離したエステル型及び遊離型カプサンチンを H P L C で分析した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

本発明は、遊離型及びエステル型カプサンチンの脂肪細胞形成抑制活性に係る新規用途に関するものである。本発明は、唐辛子、パプリカ、ピーマンなどの天然物に含まれるカプサンチンが、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化及び分化された脂肪細胞への脂肪蓄積をそれぞれ抑制することができるということを確認し、これに基づき、遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を、脂肪細胞前駆体及び脂肪細胞と反応させて前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化及び脂肪細胞内の脂肪蓄積が抑制される性質を利用する方法、並びに遊離型及びエステル型カプサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を含むことにより、肥満の予防または治療に効果がある機能性食品及び医薬組成物を提供する。

10

【 0 0 2 3 】

以下、本発明をより詳しく説明する。

【 0 0 2 4 】

唐辛子は、従来から唐辛子そのものまたはコチュジャンなどとして広く食されてきた食品である。本発明者は、唐辛子に含まれるカプサンチンがコチュジャンの発酵過程において変化することなくそのまま含有されつつ、下記実施例のように前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化及び脂肪細胞内の脂肪蓄積を抑制するなど強い脂肪細胞形成抑制活性があることを確認し、これに基づき、本発明を完成するに至った。

20

【 0 0 2 5 】

また、本発明者は、従来から知られていることとは異なり、唐辛子またはコチュジャンの抗肥満活性がカプサイシンまたはその代謝産物によるものであるというよりは、赤色素成分であるカプサンチンによるものであるということを確認した。これは、唐辛子抽出物から発酵などによって辛味を出すカプサイシンが除去され、唐辛子抽出物の辛味が消失したときも、その唐辛子抽出物が依然として優れた抗肥満活性を示すことから確認された。

30

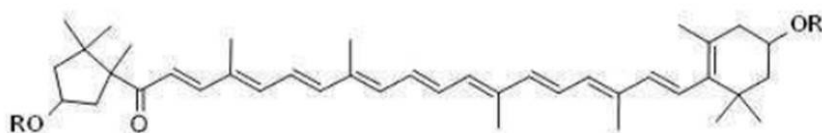
【 0 0 2 6 】

本発明の機能性食品及び医薬組成物は、有効成分として下記化学式 1 の遊離型及びエステル型カプサンチンを含む。

【 0 0 2 7 】

【化 1】

[化学式 1]



40

(式中、R は、水素、ラウロイル、リノレイル、ミリストイルまたはパルミトイルである。)

【 0 0 2 8 】

カプサンチンは化学的に合成されたものであってもよく、或いは、唐辛子、パプリカ、ピーマンなどのカプサンチンを含む天然物から分離されたものであってもよい。また、カプサンチンは、コチュジャン、キムチなどの発酵食品から得られるものであってもよい。

50

【 0 0 2 9 】

カプサンチンは、両末端の置換基 R が水素原子であるか、或いはパルミトイル基などの脂肪酸であるかによって、遊離型及びエステル型に分けられる。エステル型カプサンチンは遊離型カプサンチンより安定である。カプサンチンは、天然物中ではエステル型として存在する。成熟した唐辛子中に含まれるカプサンチンは、2つの水酸基とも各種脂肪酸及びエステルを形成している。カプサンチンエステルをけん化して得られる脂肪酸は、例えば、ラウリン酸 26.5%、ミリスチン酸 48.3%、パルミチン酸 17.6%、リノレン酸 7.5%の混合物であり得る(M. Isavel Minguez-Mosquera, Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of capsicum annum Cv. Bola, J. Agric. Food Chem., 1994, 42, 640-644)。天然物中に存在するエステル型カプサンチンは、動物に経口投与すると胃腸管内でリパーゼまたはコレステロールエステラーゼなどの酵素によって遊離型カプサンチンに加水分解された後に吸収される。

10

【 0 0 3 0 】

遊離型及びエステル型カプサンチンを合成、分離、精製、及び調製する方法は、特に限定されない。カプサンチンを天然物から分離する場合には、例えば、乾燥した天然物を細かく粉碎した後、粉碎物の重さの約 2 ~ 20 倍のアルコール水溶液またはエチルアセテートなどの有機溶媒を使用して冷浸抽出、超音波抽出、還流冷却抽出、薬湯器抽出、超臨界抽出などの抽出方法により溶媒抽出し、この溶媒抽出物を溶媒分画した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー処理方法により分離することができる。

20

【 0 0 3 1 】

本発明の機能性食品及び医薬組成物は、必要に応じて遊離型及びエステル型、及びこれと同一または類似の効能を有する有効成分とともに含まれ得る。例えば、機能性食品または医薬組成物がコチュジャン抽出物をその有効成分として含む場合には、コチュジャン抽出物にカプサンチン、ゲニステイン(genistein)、ダイドゼイン(daidzein)、及びカプサイシンなどが含まれるため、カプサンチン及びこれと同一または類似の効能を有する有効成分が機能性食品または医薬組成物とともに含まれ、強い抗肥満効果を奏する。

【 0 0 3 2 】

本発明の組成物は、投与のために、上述した有効成分以外にさらに薬剤学的に許容可能な担体を 1 種以上含んで調製することができる。薬剤学的に許容可能な担体は、食塩水、滅菌水、リンガー溶液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、エタノール、及びこれらの成分のうち 1 成分以上を混合して使用することができ、必要に応じて、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤などの他の通常の添加剤を添加することができる。また、希釈剤、分散剤、界面活性剤、結合剤、及び潤滑剤を付加的に添加して、水溶液、懸濁液、乳濁液などの液体製剤及び注射剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤または錠剤に製剤化することができる。

30

【 0 0 3 3 】

また、これに加え、Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)に開示されている方法を用いて、各種疾患または成分に応じて、好適に製剤化することができる。

【 0 0 3 4 】

本発明の組成物は、目的とする方法により、非経口投与(例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用)または経口投与とすることができ、投与量は患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与時間、投与方法、排泄率、及び疾患重症度などにより、その範囲が様々である。一日の投与量は、例えば、本発明に係る天然物抽出物の場合、10 ~ 1,000 mg / kg、好ましくは 10 ~ 1,000 mg / kg であり、カプサンチンの場合、0.01 ~ 10 mg / kg、好ましくは 0.01 ~ 1 mg / kg であり、一日に 1 回 ~ 数回、好ましくは 1 ~ 3 回に分けて投与することがより好ましい。

40

【 0 0 3 5 】

本発明の組成物は、肥満の抑制及び治療のために、単独で、または手術、放射線治療、ホルモン治療、化学治療、及び生物学的応答調節剤を用いる方法と併用して使用すること

50

ができる。

【0036】

本発明に係る遊離型及びエステル型カブサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物は、肥満の抑制及び予防を目的とする健康食品に添加することができる。カブサンチン及びこれを含む天然物の抽出物が食品添加物として使用される場合、他の食品または食品成分とともに使用してもよく、通常の方法で適切に使用してもよい。有効成分の混合量は、その使用目的(予防、抑制または治療的処置)に応じて適宜決定することができる。しかしながら、健康及び衛生を目的としたり、または健康調節を目的とする長期間の摂取の場合には、前記量は、前記範囲以下であってもよく、本発明のカブサンチン及びこれを含む天然物の抽出物は、生体における安全性の面において何ら問題がないため、有効成分は前記範囲以上の量でも使用することができる。

10

【0037】

食品の種類は特に限定されない。前記物質を添加可能な食品の例としては、肉類、ソーセージ類、パン類、チョコレート類、キャンディー類、スナック類、菓子類、ピザ、ラーメン類、その他麺類、ガム類、アイスクリーム類を含む酪農製品、各種スープ、飲料、茶、ドリンク剤、アルコール飲料、及びビタミン複合剤などがあり、通常の意味での機能性食品を全て含む。

【0038】

本発明の健康飲料の組成物は、通常の飲料のように種々の香味剤または天然炭水化物などを追加成分として含むことができる。

20

【0039】

上述した天然炭水化物は、ブドウ糖、果糖のようなモノサッカライド、マルトース、スクロースのようなジサッカライド、及びデキストリン、シクロデキストリンのようなポリサッカライド、キシリトール、ソルビトール、エリトリトールなどの糖アルコールである。甘味剤としては、タウマチン、ステビア抽出物のような天然甘味料、またはサッカリン、アスパルテムのような合成甘味料などを使用することができる。

【0040】

前記天然炭水化物の割合は、本発明の組成物100ml当り、一般的に約0.01~0.04g、好ましくは約0.02~0.03gである。

【0041】

前記のほかに、本発明の組成物は、種々の栄養剤、ビタミン、電解質、風味剤、着色剤、ペクチン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、有機酸、保護コロイド性増粘剤、pH調整剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に使用される炭酸化剤などを含むことができる。それ以外に本発明の組成物は、天然果汁ジュース、果汁飲料、及び野菜飲料の製造のための果肉を含むことができる。

30

【0042】

このような成分は、単独または混合して使用することができる。かかる添加剤の割合は、特に限定されないが、本発明の組成物100質量部当り0.01~0.1質量部の範囲内で選択することが一般的である。

【0043】

本発明は、前記化学式1で示される遊離型及びエステル型カブサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を、脂肪細胞前駆体と反応させることを含む、前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化が抑制される性質を利用する方法を提供する。また、本発明は、前記化学式1で示される遊離型及びエステル型カブサンチン、またはこれらを含む天然物の抽出物を脂肪細胞と反応させることを含む、脂肪細胞内の脂肪蓄積が抑制される性質を利用する方法を提供する。

40

【0044】

以下、本発明の好適な実施形態を実施例を参照して、より具体的に説明する。しかしながら、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0045】

50

[実施例]

実施例 1 : 唐辛子のエチルアセテート抽出物の調製

唐辛子粉 10 kg にエチルアセテート 50 L を加え、ウォーターバスにて還流させて、3 時間加熱抽出した。抽出工程を 3 回繰り返し実施して冷却した後、ろ過し、ろ液を減圧濃縮して、唐辛子のエチルアセテート抽出物 1.53 kg を得た。

【 0046 】

実施例 2 : パプリカのエチルアセテート抽出物の調製

乾燥させたパプリカ粉 10 kg にエチルアセテート 50 L を加え、ウォーターバスにて還流させて、3 時間加熱抽出した。抽出工程を 3 回繰り返し実施して冷却した後、ろ過し、ろ液を減圧濃縮して、パプリカのエチルアセテート抽出物 825.2 g を得た。

10

【 0047 】

実施例 3 : ピーマンのエチルアセテート抽出物の調製

乾燥させたピーマン粉 10 kg にエチルアセテート 50 L を加え、ウォーターバスにて還流させて、3 時間加熱抽出した。抽出工程を 3 回繰り返し実施して冷却した後、ろ過し、ろ液を減圧濃縮して、ピーマンのエチルアセテート抽出物 784.3 g を得た。

【 0048 】

実施例 4 : コチュジャンのエチルアセテート抽出物の調製

3 ヶ月間発酵させたコチュジャン 10 kg を凍結乾燥させて水分を除去して凍結乾燥物 7 kg を得た。ここにエチルアセテート 50 L を加え、還流させて 3 時間加熱抽出した。抽出工程を 3 回繰り返し実施して冷却した後に、ろ過し、ろ液を減圧濃縮して、コチュジャンのエチルアセテート抽出物 1.28 kg を得た。

20

【 0049 】

実施例 5 : 唐辛子のエチルアセテート抽出物からカプサイシンを除去したカプサンチン含有抽出物の調製

唐辛子のエチルアセテート抽出物 1.5 kg をヘキサン 7 L に溶解させ、0.1 N アルカリ水溶液 7 L を分液ロートに加えて混合振とうし、層分離後、アルカリ - 水溶液層を除去する工程を 5 回繰り返し行うことで、カプサイシンを完全に除去した。カプサイシン分子中のフェノール性水酸基が強アルカリ水溶液によりフェノレート塩に転換されて水に溶解する性質を利用した。

30

【 0050 】

上記のような工程により得られるヘキサン層を HPLC で分析した結果、カプサイシンは検出されなかった [HPLC 分析条件 : カラム : C8 - 逆相カラム (agilent Eclipse XD B-C8、150 × 4.6 mm、5 μm)、展開溶媒 : メタノール : 水 = 4 : 6、展開溶媒の流速 : 1 ml / 分、カプサイシンの保持時間 : 18.59 分、検出 : UV 吸収 230 nm]。

【 0051 】

また、ヘキサン層に残留し得るアルカリを除去するために、0.5 N 塩酸を加えて混合振とうした後、塩酸層を除去後、ヘキサン層を飽和重曹水溶液で洗浄し、無水芒硝で脱水及びろ過した後、減圧濃縮することで、カプサイシンを除去したエステル型カプサンチン含有抽出物 1.27 kg を得た。

40

【 0052 】

実施例 6 : パプリカのエチルアセテート抽出物からカプシエイト (capsiate) を除去したカプサンチン含有抽出物の調製

実施例 5 と同様、パプリカのエチルアセテート抽出物 800 g からカプシエイトを除去することで、カプサンチン含有抽出物 536.3 g を得た。

【 0053 】

実施例 7 : ピーマンのエチルアセテート抽出物からカプシエイトを除去したカプサンチン含有抽出物の調製

実施例 5 と同様、ピーマンのエチルアセテート抽出物 700 g からカプシエイトを除去することで、カプサンチン含有抽出物 487.7 g を得た。

50

【 0054 】

実施例 8 : コチュジャンのエチルアセテート抽出物からカプサイシンを除去したカプサンチン含有抽出物の調製

実施例 5 と同様、コチュジャンのエチルアセテート抽出物 1.2 kg からカプサイシンを除去することで、カプサンチン含有抽出物 753.4 g を得た。

【0055】

実施例 9 : カプサンチン含有抽出物からエステル型カプサンチンの分離

カプサンチン含有抽出物 1 kg に無水エタノール 30 L を加え、触媒量のナトリウムメトキシドを加え、室温で攪拌し、エステル交換反応(trans-esterification)に供した。この反応が完了した後、酢酸を加えて触媒を失活させ、これを減圧濃縮して、カプサンチン脂肪酸エステル、脂肪酸のエチルエステル及びグリセリンの混合物 1.03 kg を得た(このとき、トリグリセライドは脂肪酸のエチルエステルに変換されるが、エステル型カプサンチンは反応しない(T.Philip, W.W.Nawar and F.J.Francis, The nature of fatty acids and capsanthin esters in paprika, Journal of Food Science, 1971, 36, 98-100))。

10

【0056】

上記のような工程により得られる混合物 1 kg をヘキサン 10 L に溶解させ、シリカゲル 2 kg 及びヘキサンによるカラムを用いたクロマトグラフィーに供して脂肪酸のエチルエステル成分が残留しないまで溶出させて除去した後、展開溶媒をヘキサン : エチルアセテート = 20 : 1 に変えて溶出させてエステル型カプサンチン分画物 8.75 g を得た。

【0057】

20

この分画物 8.75 g をヘキサンに溶解させ、4 に放置して暗赤色の無定形粉末 1.54 g を得た。

【0058】

これを $CDCl_3$ に溶解させ、500 MHz 1H -NMR に供してエステル型カプサンチンであることを確認した(図 1)。

【0059】

実施例 10 : エステル型カプサンチンをけん化して遊離型カプサンチンの分離

エステル型カプサンチン 1 g をエタノール 5 ml に溶解させ、0.1 N NaOH / EtOH 溶液 20 ml を添加した後、窒素気流下において 1 時間 65 のウォーターバスにてけん化した。これを冷却した後、減圧濃縮してエタノールを除去した。脂肪酸塩及びアルカリを除去するために、エーテル 20 ml を加えて強く振とうした後、遠心分離(6,000 rpm、10 分)して上層液を採取する工程を 3 回繰り返した。エーテル層を蒸留水で洗浄し、脱水した後、濃縮することにより、濃赤色のけん化物 420 mg を得た。けん化物 420 mg をメチレンクロライドから再結晶を行い暗赤色の針状結晶 280 mg を得た。

30

【0060】

これを $CDCl_3$ に溶解させ、500 MHz 1H -NMR に供して遊離型カプサンチンであることを確認した(図 2)。

【0061】

これを HPLC に供して単一ピークとして検出されることを確認した(図 3)。

40

【0062】

- HPLC 分析条件 : カラム : ODS - 120 A (TOSOH, tsk-gel、150 × 4.6 mm、5 μ m)、展開溶媒 : アセトニトリル : 2 - プロパノール : エチルアセテート (8 : 1)、展開溶媒の流速 : 0.8 ml / 分、遊離型カプサンチンの保持時間 : 7.60 分、エステル型カプサンチンの保持時間 : 75.47 分、検出 : UV 吸収 480 nm。

【0063】

実施例 11 : 赤色色素成分であるカプサンチンの 3T3-L1 細胞を利用した脂肪細胞への分化抑制及び脂肪蓄積抑制活性の確認

3T3-L1 マウス胚芽前駆脂肪細胞を Singh の方法により培養した (Singh R, Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells : Nuclear transloca

50

tion of androgen receptor complex with β -catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical WNT signaling to down-regulate adipogenic transcription factors, Endocrinology, 2006, 147, 141-154)。

【 0 0 6 4 】

韓国細胞株バンクから入手した 3 T 3 - L 1 細胞を、10 % 子ウシ血清 (bovine calf serum) 及び 1 % ペニシリン - ストレプトマイシン混合物を含む D M E M を用いて培養した。コンフルエンス (Confluence) に到達したとき、さらに 2 ~ 3 日培養した後、10 % ウシ胎児血清 (fetal bovine serum)、1.7 μ M インスリン、0.5 mM I B M X、1 μ M デキサメタゾンを含む D M E M に交替して 8 日間培養した。脂肪細胞への分化抑制及び脂肪蓄積抑制の陽性対照群としてカブサイシン (sigma) 及びゲニステイン (sigma) を使用した。

10

【 0 0 6 5 】

カブサイシンは唐辛子に、ゲニステインは味噌麹に含まれる脂肪細胞形成抑制活性物質である。

【 0 0 6 6 】

(1) カブサンチンの脂肪細胞への分化抑制活性

3 T 3 - L 1 (マウス) 前駆脂肪細胞 (pre-adipocyt) は D M E M に 10 % 子ウシ血清 (B C S、Bovine calf serum) を混合した培地を用いて C O ₂ (C O ₂ 濃度 5 %、37) 培養器にて 12 - w e l l で培養した。前駆脂肪細胞がコンフルエンス状態に到達した時点で、さらに 2 日間培養し、カブサンチン (i n D M S O) 及び分化誘導用 (D M E M、10 % F B S、1.7 μ M インスリン、0.5 mM I B M X、1 μ M デキサメタゾン) 培地に交換してさらに 3 日間培養した。カブサンチンを溶解させるための D M S O の最終濃度は 0.1 % 以下とした。3 日後、ウェル (well) から培養液を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S、phosphate buffer saline) で洗浄した後、10 % ホルムアルデヒド 500 μ l を加えて 1 時間放置して固定させた。その後、ホルムアルデヒドを除去し、P B S を用いて洗浄した後、オイルレッド O (Oil Red O) 500 μ l をウェルに加えて 2 時間染色した。Oil Red O で染色した脂肪細胞を顕微鏡にて観察して分化した数を測定した。

20

【 0 0 6 7 】

各試料の脂肪細胞分化抑制活性 I C ₅₀ 値を測定した結果、遊離型カブサンチンは 4.49 μ M、エステル型カブサンチンは 75.43 μ M、カブサイシンは 3.97 μ M、ゲニステインは 28.21 μ M、フコキサンチンは 79.11 μ M を示した。

30

【 0 0 6 8 】

(2) 脂肪細胞におけるカブサンチンの脂肪蓄積抑制活性

脂肪細胞におけるカブサンチンの脂肪蓄積抑制活性を観察するために、Negal の方法 (Negrel R, Culture of adipose precursor cells and cells of clonal lines from animal white adipose tissue, In adipose tissue protocols. G. Ailhaud (ed). Humana press, inc., Totowa, NJ, 2001, 225-237) に従って Oil Red O 染色法を使用した。前駆脂肪細胞がコンフルエンス状態に到達した時点で、さらに 2 日間培養し、カブサンチン (i n D M S O) 及び分化誘導用培地に交換してさらに 8 日間培養した。カブサンチンを溶解させるための D M S O の最終濃度は 0.1 % 以下とした。脂肪細胞が培養されているプレートから培養液を除去し、P B S で洗浄した後、10 % ホルムアルデヒド 500 μ l を加えて 1 時間放置して固定させた。その後、残留したホルムアルデヒドは P B S を用いて除去した後、Oil Red O を 500 μ l 加えて 2 時間染色した。その後、残留した Oil Red O は P B S で十分洗浄して残留しないようにした。Oil Red O で染色した脂肪細胞にイソプロピルアルコール 1 m l 加えて 10 分間脂肪細胞内の Oil Red O を抽出した。Oil red O の含量は E L I S A リーダーを用いて 510 nm で吸光度を測定した。

40

【 0 0 6 9 】

各試料の脂肪蓄積抑制活性 I C ₅₀ 値を比較した結果、遊離型カブサンチンは 1.31 μ M、エステル型カブサンチンは 55.24 μ M、カブサイシンは 32.65 μ M、ゲニステインは 58.74 μ M、フコキサンチンは 54.81 μ M を示した。

【 0 0 7 0 】

50

実施例 12: 赤色素成分であるカプサンチンを投与したラット(SD系)のプラズマ中のカプサンチン含量の分析

試験動物は、(株)オリエントバイオから購入した雄ラット(SD)を使用した。本実験において飼料及び水は自由に摂取させ、動物の飼育温度は $25(\pm 1)$ 、湿度 $50(\pm 5)\%$ 、明暗は12時間おきに調節した。エステル型カプサンチン及び遊離型カプサンチンは、それぞれ異なる動物に、1日1回 15 mg/kg 経口投与した。単回または7日間投与した動物の血液から採取したプラズマ中のカプサンチン(含量及び形態)をHPLC分析した。動物から血液 4 ml をEDTAが塗布されている試験管に採取して血液が凝固するのを防止した後、遠心分離($3,000\text{ rpm}$ 、10分、4)を行い上層のプラズマ 1 ml をとった。ここに $1\% \text{ BHT/ EtOH } 1\text{ ml}$ を加えて1分間攪拌した後、ヘキサン 2 ml を加えてさらに1分間攪拌した後、遠心分離($2,000\text{ rpm}$ 、5分)を行いヘキサン層 1 ml をとってHPLCで分析した(M. A. Grashorn, Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis, Poultry science, 2003, 82, 395-401, Hideo E, Carotenoids in human blood plasma after ingesting paprika juice)。

【0071】

- HPLC分析条件: カラム: ODS-120A(TOSOH, tsk-gel、 $150 \times 4.6\text{ mm}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$)、展開溶媒: アセトニトリル: 2-プロパノール: エチルアセテート(8:1:1)、展開溶媒の流速: 0.8 ml/分 、遊離型カプサンチンの保持時間: 7.60 分 、エステル型カプサンチンの保持時間: 75.47 分 、検出: UV吸収 480 nm 。

【0072】

動物の血液を分析した結果、遊離型カプサンチンを投与した動物の血液中からも遊離型カプサンチンが検出され、エステル型カプサンチンを投与した動物の血液中からも遊離型カプサンチンのみが検出され、両実験群のいずれの動物の血液からエステル型カプサンチンは検出されなかった。これにより、遊離型カプサンチンは無変化状態で吸収され、エステル型カプサンチンは胃腸管で加水分解され、遊離型カプサンチンに変化された後、吸収されるということが分かった。

【0073】

このような理由から、エステル型カプサンチンを投与した動物よりも遊離型カプサンチンを投与した動物のほうがカプサンチンの血中濃度が高いことを観察することができ、エステル型カプサンチンを投与した動物から時間帯別に採取した血液中のカプサンチンの血中濃度は緩慢に上昇する一方、遊離型カプサンチンを投与した動物から時間帯別に採取した血液中のカプサンチンの血中濃度は急激に高くなることを観察することができた。

【0074】

本実施例において、遊離型及びエステル型カプサンチンを互いに異なる動物に単回投与後、所定の時間に血液を採取してカプサンチン含量をHPLCで分析した結果を表1に示し、遊離型及びエステル型カプサンチンを互いに異なる動物に7日間投与して最終投与後、時間帯別に血液を採取してカプサンチン含量をHPLCで分析した結果を表2に示す。表1及び2において、血液中のカプサンチンの含量は面積($\text{mV} \cdot \text{秒}$)で表記した。

【0075】

【表1】

単回投与後の採血時間	血液中のカプサンチンの含量($\text{mV} \cdot \text{秒}$)	
	遊離型カプサンチンの投与	エステル型カプサンチンの投与
1時間後	検出されず	4.18
2時間後	132.53	25.36

【0076】

【表 2】

7日間投与中 最終投与後の採血時間	血液中のカプサンチンの含量(mV・秒)	
	遊離型カプサンチンの投与	エステル型カプサンチンの投与
0時間後	検出されず	検出されず
0.5時間後	8.11	検出されず
1時間後	100.13	47.65
2時間後	147.24	67.75
4時間後	224.17	87.47

【0077】

10

実施例13：カプサンチンを含む飲料の製造

カプサンチンに水及び豆から抽出したレシチン及び調味料などの適当な添加物を少量添加した後、高速にホモジネーションして乳化剤を調製し、通常の飲料製造方法により製造して、茶色の瓶に1回分量ずつ分けて窒素充填した後、105℃で1時間加熱滅菌して飲料を製造した。

【0078】

実施例14：カプサンチンを含むカプセル剤の調製

カプサンチンをジャガイモでん粉などを用いて均一な希釈粉末を製造した後、通常の方法によりカプセル剤を調製した。

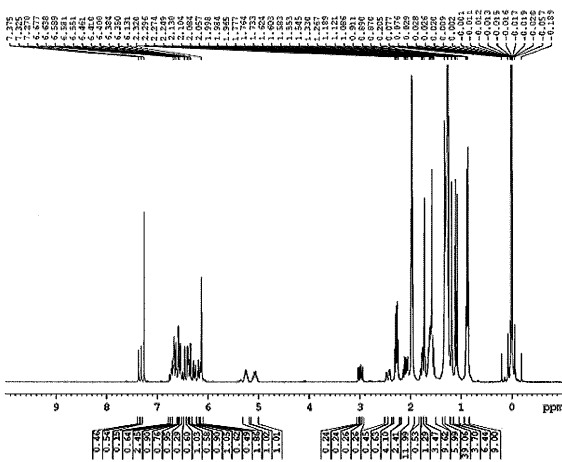
【0079】

20

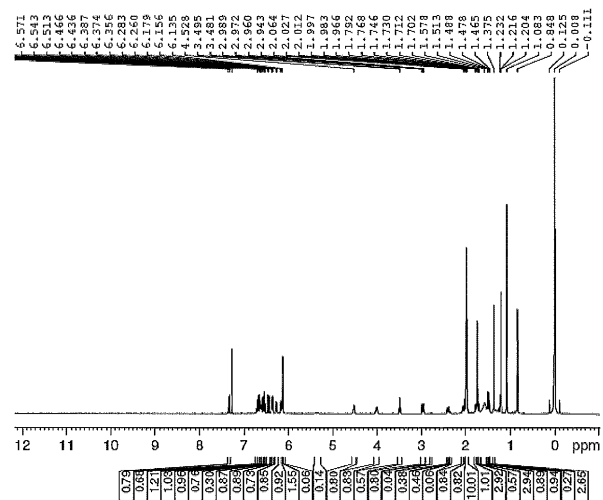
実施例15：カプサンチンを含む錠剤の調製

カプサンチンを適当な希釈剤及び錠剤の調製に必要な各種賦形剤の適当量を均質混合させた後、通常の錠剤調製方法により打錠して錠剤を調製した。

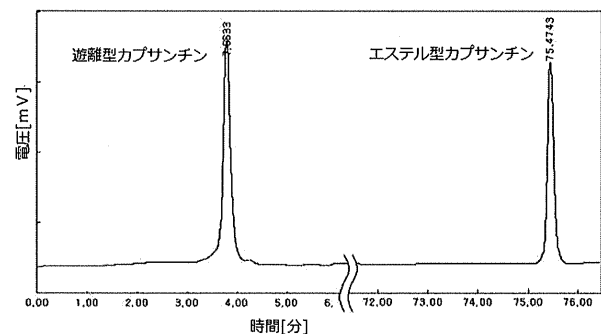
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	36/00 (2006.01)	A 6 1 K	35/78	Y
A 2 3 L	1/30 (2006.01)	A 2 3 L	1/30	B
A 2 3 L	2/52 (2006.01)	A 2 3 L	1/30	Z
		A 2 3 L	2/00	F

(74)代理人 100140338

弁理士 竹内 直樹

(72)発明者 ビョン フン ハン

大韓民国 チュンチョンナム - ド 3 3 1 - 7 3 8 チョンアン - シ ソブク - ド ブルダン - ド
ン ホバン リジェンシビル スイート アpartment 1 0 1 - 4 0 2

(72)発明者 ジョン ウォン キム

大韓民国 チュンチョンナム - ド 3 3 0 - 7 4 1 チョンアン - シ ドンナム - グ モクチョン
- ウップ サムソン - リ プヨン アpartment 2 0 2 - 3 0 3

(72)発明者 サン ジュン ジョ

大韓民国 チュンチョンブク - ド 3 6 3 - 9 1 1 チョンウォン - グン オクサン - ミョン ガ
ラク - リ ファイン テクノ ヴィラ アpartment 1 0 2 - 1 0 1 2

(72)発明者 ヘ オク チョイ

大韓民国 チュンチョンナム - ド 3 3 6 - 7 2 7 アサン - シ タンジョン - ミョン ミョン -
アム - リ トラパレス 2 0 1 - 1 0 0 1

(72)発明者 ジュン ファン キム

大韓民国 チュンチョンブク - ド 3 6 0 - 0 8 1 チョンジュ - シ サンダン - グ タップ - ド
ン 1 4 2 - 9

(72)発明者 ムー カン キム

大韓民国 テジョン 3 0 5 - 3 5 8 ユソン - グ ハギ - ドン 4 4 1

(72)発明者 イル クォン パク

大韓民国 テジョン 3 0 2 - 3 1 8 ソ - グ ダン - ドン スモクト アpartment 1 1 4
- 1 7 0 3

(72)発明者 スン ファン リ

大韓民国 チュンチョンナム - ド 3 2 0 - 0 3 0 ノンサン - シ ナエ - ドン 7 8 9 A - 1
0 5

F ターム(参考) 4B017 LC03 LG06 LG15 LL09 LP01

4B018 LB01 LB02 LB08 LB10 MD07 MD53 MD61 ME14 MF01

4C088 AB50 AC04 BA08 BA32 CA03 CA07 CA25 MA52 NA14 ZA70

4C206 AA01 AA02 CB13 DB06 DB09 DB51 DB56 KA01 MA01 MA04

MA72 NA14 ZA70