

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6912763号  
(P6912763)

(45) 発行日 令和3年8月4日(2021.8.4)

(24) 登録日 令和3年7月13日(2021.7.13)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 36/82 (2006.01)	A 61 K 36/82
A 23 L 33/105 (2016.01)	A 23 L 33/105
A 61 K 31/353 (2006.01)	A 61 K 31/353
A 61 K 36/75 (2006.01)	A 61 K 36/75
A 61 P 3/04 (2006.01)	A 61 P 3/04

請求項の数 3 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-529649 (P2016-529649)	(73) 特許権者	504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市西区元岡744
(86) (22) 出願日	平成27年6月25日 (2015.6.25)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/068302	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(87) 国際公開番号	W02015/199169	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(87) 国際公開日	平成27年12月30日 (2015.12.30)	(72) 発明者	立花 宏文 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内
審査請求日	平成30年6月12日 (2018.6.12)		
審判番号	不服2020-4674 (P2020-4674/J1)		
審判請求日	令和2年4月6日 (2020.4.6)		
(31) 優先権主張番号	特願2014-132891 (P2014-132891)		
(32) 優先日	平成26年6月27日 (2014.6.27)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】カテキンの機能性増強法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体（第二成分）を含む、緑茶抽出物又はカテキン（第一成分）の抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、コレステロール低下作用、血栓予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用の増強用食品組成物であって、前記第二成分は、前記第一成分と組み合わせて使用され、前記第一成分が、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート及びメチル化カテキンからなる群から選ばれる少なくとも1種であり、前記第二成分が、エリオジクチオール、ナリンゲニン及びヘスペレチン、並びにこれらの配糖体からなる群から選ばれる少なくとも1種であって組成物中の含有量として90重量%～0.001重量%（但し0.001～1.0重量%を除く）を含む、前記組成物。

## 【請求項 2】

柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体（第二成分）を含む、緑茶抽出物又はカテキン（第一成分）の抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、コレステロール低下作用、血栓予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用の増強剤であって、前記第二成分は、前記第一成分と組み合わせて使用され、前記第一成分が、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート及びメチル化カテキンからなる群から選ばれる少なくとも1種であり、前記第二成分が、エリオジクチオール、ナリンゲニン及びヘスペレチン、並びにこれ

10

20

らの配糖体からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である、前記増強剤。

【請求項 3】

柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体（第二成分）を含む組成物を被検体に摂取させることを特徴とする、緑茶抽出物又はカテキン（第一成分）の、前記被検体における抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、コレステロール低下作用、血栓予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの作用を増強させる方法（ヒトに対する医療行為を除く）であって、前記第二成分は、前記第一成分と組み合わせて使用され、前記第一成分が、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート及びメチル化カテキンからなる群から選ばれる少なくとも 1 種であり、前記第二成分が、エリオジクチオール、ナリンゲニン及びヘスペレチン、並びにこれらの配糖体からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である、前記方法。10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、緑茶抽出物又はカテキン、及び柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体を含む機能性食品等に関する。

【背景技術】

【0002】

がんは現在、国民の三分の一の死因を占めており、適切な治療手段の確立が緊急の課題である。多発性骨髄腫において、レナリドマイドやプロテアソームに対する特異的阻害剤ボルテゾミブの導入により治療環境が改善しつつある。しかし一方で既存薬に対してがん細胞が抵抗性を獲得し、再発するケースが非常に多い。このことから従来とは異なった作用機作を持つ抗がん剤を開発することが必要とされている。さらに、用量規定毒性 (Dose limiting toxicity; DLT) が異なれば、既存の治療法と併用することが可能であり、より有効な治療戦略の立案が可能となる。20

【0003】

緑茶に含まれる主要なカテキンの一種であるEGCG（エピガロカテキンガレート；Epigallocatechin-3-gallate）は抗がん作用を有することが報告されており（非特許文献1）、血液がんの一種である慢性リンパ性白血病患者において第二相臨床試験が行われている（非特許文献2）。我々はこれまでにEGCGが細胞膜上の標的分子67-kDa Laminin Receptor (67LR) に結合することで抗がん作用を発揮することを明らかにした（非特許文献3-6）。この67LR は本来、基底膜構成成分であるラミニンと結合するタンパク質として発見された（非特許文献7）。最近の研究において、67LR はがん細胞において発現が異常に亢進しており（非特許文献8）、その発現と浸潤、転移の間に強い相関性が認められている（非特許文献9-15）。EGCG は67LR を介して選択的に白血病細胞や多発性骨髄腫細胞のみを死滅させることが報告され（非特許文献16-17）、EGCGが67LR陽性の白血病細胞や多発性骨髄腫細胞に対する分子標的剤となりうることが示された。しかしながら EGCG の白血病細胞や多発性骨髄腫細胞に対する致死作用は限定的であり（非特許文献2）、EGCGを抗がん剤として利用する上でその作用増強が強く望まれている。30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】 Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer. res.*, 2006; 66:2500-2505.

【非特許文献 2】 Shanafelt TD, Call TG, and Zent CS, et al. Phase I trial of daily oral Polyphenon E in patients with asymptomatic Rai stage 0 to II chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, 2009;27:3808-3814.

【非特許文献 3】 Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, et al. A receptor for green tea

10

20

30

40

50

- polyphenol EGCG. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004;11:380-381.
- 【非特許文献 4】 Umeda D, Tachibana H, Yamada K. Epigallocatechin-3-O-gallate disrupts stress fibers and the contractile ring by reducing myosin regulatory light chain phosphorylation mediated through the target molecule 67 kDa laminin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005;333:628-635.
- 【非特許文献 5】 Umeda D, Yano S, Yamada K, et al. Involvement of 67-kDa laminin receptor-mediated myosin phosphatase activation in antiproliferative effect of epigallocatechin-3-O-gallate at a physiological concentration on Caco-2 colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008;371:172-176.
- 【非特許文献 6】 Umeda D, Yano S, Yamada K, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J. Biol. Chem.*, 2008;283:3050-3058. 10
- 【非特許文献 7】 Nelson J, McFerran NV, Pivato G, et al. The 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in disease. *Biosci. Rep.*, 2008;28:33-48.
- 【非特許文献 8】 Cioce V, Castronovo V, and Shmookler BM, et al. Increased expression of the laminin receptor in human colon cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1991;83:29-36.
- 【非特許文献 9】 Menard S, Castronovo V, Tagliabue E, et al. New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. *J. Cell Biochem.*, 1997;67:155-1 20  
65.
- 【非特許文献 10】 Menard S, Tagliabue E, Colnaghi MI. The 67 kDa laminin receptor as a prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998;52:137-145.
- 【非特許文献 11】 Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Melanocyte tumor progression is associated with changes in angiogenesis and expression of the 67-kilodalton laminin receptor. *Cancer*, 1993;72:455-461.
- 【非特許文献 12】 Sanjuan X, Fernandez PL, Miquel, et al. Overexpression of the 67-kD laminin receptor correlates with tumour progression in human colorectal carcinoma. *J. Pathol.*, 1996;179:376-380.
- 【非特許文献 13】 Chen FX, Qian YR, Duan YH, et al. Down-regulation of 67LR reduces the migratory activity of human glioma cells in vitro. *Brain Res. Bull.*, 2009;79:402-408. 30
- 【非特許文献 14】 Fontanini G, Vignati S, Chine S, et al. 67-Kilodalton laminin receptor expression correlates with worse prognostic indicators in non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 1997;3:227-231.
- 【非特許文献 15】 Basolo F, Pollina L, Pacini F, et al. Expression of the Mr 67,000 laminin receptor is an adverse prognostic indicator in human thyroid cancer: an immunohistochemical study. *Clin. Cancer Res.*, 1996;2:1777-1780.
- 【非特許文献 16】 Britschgi A, Simon HU, Tobler A, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces cell death in acute myeloid leukaemia cells and supports all-trans retinoic acid-induced neutrophil differentiation via death-associated protein kinase 2. *Br. J. Haematol.*, 2010;149:55-64. 40
- 【非特許文献 17】 Shammas MA, Neri P, Koley H, et al. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: activity and therapeutic implications. *Blood*, 2006;108:2804-2810.
- 【非特許文献 18】 Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 2006;116(6):1494-1505.
- 【非特許文献 19】 Byun H, Fujimura Y, Yamada K, et al. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-k 50

Da laminin receptor, J. Immunol., 2010;185:33-45.

【非特許文献 20】Yan H, Lamm ME, Bjorling E, Huang YT. Multiple functions of immunoglobulin A in mucosal defense against viruses: an in vitro measles virus model. Virol. 2002;76(21):10972-10979.

【非特許文献 21】Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H, A lipid raft-associated 67kDa laminin receptor mediates suppressive effect of epigallocatechin-3-O-gallate on Fc epsilon RI expression, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005;336:674-681.

【非特許文献 22】Holy EW, Stampfli SF, Akhmedov A, et al. Laminin receptor activation inhibits endothelial tissue factor expression. J. Mol. Cell Cardiol. 2010;48:1138-45.

10

【非特許文献 23】Santilli G, Piotrowska I, Cantilena S, et al. Polyphenol Enhances the antitumor immune response in neuroblastoma by inactivating myeloid suppressor cells, Clin. Cancer. Res., 2013;19:1116-1125.

【非特許文献 24】Gundimeda U, McNeill T1, Fan TK, et al. Green tea catechins potentiate the neuritogenic action of brain-derived neurotrophic factor: Role of 67-kDa laminin receptor and hydrogen peroxide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014;28:218-224.

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

20

本発明は、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含む組成物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】

#### 【0006】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含む組成物が抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用などの各種作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含む、組成物である。

30

また本発明は、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはフラバノン配糖体とを含む、機能性食品である。

さらに、本発明は、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含む、抗がん剤、抗筋萎縮剤、抗肥満剤、抗炎症剤、コレステロール低下剤、血栓又は脳梗塞予防剤及び免疫増強剤からなる群から選ばれるいずれかの剤である。

さらに、本発明は、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体を含む、緑茶抽出物又はカテキンの抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、血栓又は脳梗塞予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用の増強剤である。

さらに、本発明は、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含む組成物を被検体に摂取させることを特徴とする、当該緑茶抽出物又はカテキンの、前記被検体における抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、血栓又は脳梗塞予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用を増強させる方法（ヒトに対する医療行為を除く）である。

#### 【0007】

40

本発明において、緑茶抽出物又はカテキンとしては、エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート及びメチル化カテキンからなる群から選ばれる少なくとも1種である。

本発明において、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体としては、エリオジクチオール、ナリンゲニン及びヘスペレチン、並びにこれらの配糖体からなる群から選ば

50

れる少なくとも 1 種である。

本発明の好ましい態様において、緑茶抽出物又はカテキンは、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート又はメチル化カテキンであり、柑橘類抽出物又はフラバノンは、エリオジクチオールである。

本発明の組成物、食品、剤及び増強剤は、抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、血栓又は脳梗塞予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの作用を有するものである。

#### 【発明の効果】

##### 【0008】

本発明により、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含む組成物が提供される。本発明の組成物は、抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用等を目的とした機能性食品等として有用である。10

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【0009】

【図 1】EGCG のがん細胞アポトーシス誘導作用に対するEriodictyolの併用効果を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を 96 well plate に播種 ( $5 \times 10^4$  cells/mL) し、EGCG 及び Eriodictyolを添加(5  $\mu$ M /L)した培地で96 時間培養した。細胞を回収後 Annexin V Alexa Fluor 488 で細胞を染色しフローサイトメーターにてアポトーシスが誘導された細胞を検出した。

【図 2】腫瘍移植マウスに対するEGCG とEriodictyol併用の抗がん作用を示す図。多発性骨髄腫細胞株MPC-11をBalb/cマウスの右背部に皮下注射し、EGCG (15 mg/kg) 及びEriodictyol (15 mg/kg)を2日に一度投与した。投与開始から腫瘍の体積及び生存期間を測定した。20

【図 3】腫瘍移植マウスに対するEGCG とEriodictyol 組み合わせによる肝毒性を示す図。多発性骨髄腫細胞株MPC-11をBalb/cマウスの右背部に皮下注射し、EGCG (15 mg/kg) 及びEriodictyol (15 mg/kg)を2日に一度投与した。肝毒性について、血清中Aspartate Aminotransferase (AST) 及び Alanine aminotransferase (ALT) 活性を測定した。

【図 4】廃用性筋萎縮に及ぼすEGCGとEriodictyol併用物の効果を示す図。C57BL/6J マウスにEGCG 又はEriodictyol を 1日に1回投与 (5 mg/kg) した。投与開始から7 日後に尾懸垂を開始した。尾懸垂開始から10 日後に屠殺し大腿四頭筋の重量を測定した。30

【図 5】高脂肪高ショ糖(HF/HS)食摂取マウスに対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果を示す図。C57BL/6J マウスに、緑茶抽出物(0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した餌を摂取させた。8週間の飼育後、体重、血清中の総コレステロール、LDL の各値を測定した。また、脂肪組織におけるMCP-1 のmRNA発現量をreal-time PCR法で測定した。

【図 6】高脂肪高ショ糖(HF/HS)食摂取マウスの肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子発現に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果を示す図。C57BL/6J マウスに、緑茶抽出物 (0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した餌を摂取させた。8週間の飼育後、肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子のmRNA発現量をreal-time PCR法で測定した。 HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) : コレステロール合成の律速酵素であり、ロバスタチンなどコレステロール低下薬の創薬ターゲット HMGCS (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase) : コレステロール合成に関する酵素 LDLR (low density lipoprotein receptor) : 肝臓におけるLDL 取り込み分子40

【図 7】抗血栓性因子産生に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果を示す図。C57BL/6J マウスに、緑茶抽出物 (0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した餌を摂取させた。8週間の飼育後、血清中のTFPI量をELISA法を用いて測定した。

【図 8】血清IgA量に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果を示す図。C57BL/6J マウスに、緑茶抽出物 (0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した餌を摂取させた。8週間の飼育後、血清中のIgA量をELISA法を用いて測定した。

【図 9】EGCG、EGCG3 " Me、緑茶抽出物のがん細胞致死誘導活性に対するEriodictyol、Er50

Eriodictyol関連物質(Naringenin, Hesperetin) 及びEriodictyol含有食品抽出物の組み合わせ効果を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を96 well plate に播種 ( $5 \times 10^4$  cells/mL) し、各成分を添加した培地で96 時間培養した。細胞を回収後トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

【図10】EriodictyolによるEGCG活性増強の67LR 依存性を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を96 well plate に播種 ( $5 \times 10^4$  cells/mL) し、抗67LR抗体 (20 μg/mL) で3時間処理した。その後、 $5 \mu\text{M}$  のEriodictyol 及び EGCG を終濃度  $5 \mu\text{M}$  となるように添加した培地で96時間培養し、生細胞数を計測した。

【図11】EGCG のAkt活性化能に対するEriodictyol の増強効果を示す図。多発性骨髄腫細胞株MPC-11をBalb/cマウスの右背部に皮下注射移植 ( $1 \times 10^6$  cells) し、EGCG (15 mg/kg) 及びEriodictyol (15 mg/kg)を投与し6時間後に腫瘍を摘出し、溶解バッファーにて回収後、Akt 活性を測定した。  
10

【図12】EGCG の67LR依存的がん細胞致死誘導経路の活性化 (酸性スフィンゴミエリナーゼ活性化)に対するEriodictyol の増強効果を示す図。多発性骨髄腫細胞株MPC-11をBalb/cマウスの右背部に皮下注射移植 ( $1 \times 10^6$  cells) し、EGCG (15 mg/kg) 及びEriodictyol (15 mg/kg)を投与し 6時間後に腫瘍を摘出し、溶解バッファーにて回収後、酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を測定した。

【図13】EGCG の 67LR 依存的がん細胞致死活性 (Caspase-3 活性)に対するEriodictyol の増強効果を示す図。多発性骨髄腫細胞株MPC-11をBalb/cマウスの右背部に皮下注射移植 ( $1 \times 10^6$  cells) し、EGCG (15 mg/kg) 及びEriodictyol (15 mg/kg)を投与し 6時間後に腫瘍を摘出した。腫瘍の組織切片を作成し、免疫組織染色にてCaspase-3 が活性化された細胞の割合を測定した。  
20

【図14】Eriodictyol が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 を、SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)及び1% FCSを含むRPMI 1640培地に、 $5 \times 10^4$  cells /mL にて 24 well plate に播種し、各成分を添加して96時間後にトリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

【図15】Naringenin が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 を、SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)及び1% FCSを含む RPMI 1640 培地に、 $5 \times 10^4$  cells /mL にて 24 well plate に播種し、各成分を添加して96時間後にトリパンブルー法にて生細胞数を測定した。  
30

【図16】Hesperetin が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 を、SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)及び1% FCSを含むRPMI 1640 培地に  $5 \times 10^4$  cells /mL にて 24 well plate に播種し、各成分を添加して 96時間後にトリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

【図17】Eriocitrinが EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 を、SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)及び1% FCSを含む RPMI 1640 培地に  $5 \times 10^4$  cells /mL にて 24 well plate に播種し、各成分を添加して96時間後にトリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

【図18】Naringinが EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 を、SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)及び1% FCSを含有するRPMI 1640 培地に  $5 \times 10^4$  cells /mL にて 24 well plate に播種し、各成分を添加して96時間後にトリパンブルー法にて生細胞数を測定した。  
40

【図19】Hesperidinが EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響を示す図。ヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 を、SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)及び1% FCSを含むRPMI 1640 培地に  $5 \times 10^4$  cells /mL にて 24 well plate に播種し、各成分を添加して96時間後にトリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者は、ポリフェノールの一一種Eriodictyol がEGCG の抗がん作用を増強すること

を明らかにした。さらに、Eriodictyol は EGCG のもつ抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、抗血栓性作用、免疫増強作用及び抗筋萎縮作用を増強することを明らかにした。またEriodictyol又はその構造類似体若しくはその配糖体、又はEriodictyolを含有する天然物が、EGCG若しくはその構造類似体の作用、又はEGCG を含有する天然物の作用を顕著に高めることを明らかにした。

#### 【0011】

茶の抽出物は、抗がん作用、抗インスリン抵抗作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、抗筋萎縮作用、動脈硬化予防作用、抗血栓性作用、又はアルツハイマー予防作用を有することについて報告がある。これまでの研究においては、緑茶ポリフェノールであるEGCG は、細胞表面タンパクである67LR に結合することで多彩な生理活性を発現することが示されている。一方で、その他の成分がその作用を増強させるか、あるいは減弱させるかは不明であった。

#### 【0012】

本発明者は、Eriodictyol が EGCG による67LR の活性化を増強することで、*in vivo* 及び *in vitro* にてEGCG の抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、抗血栓性作用及びコレステロール低下作用を促進することを明らかにした。またEriodictyol とEGCGとの併用によって緩和される肥満誘発性の MCP-1 の上昇は、インスリン抵抗性や高脂血症の原因となることから(非特許文献18)、この併用は、インスリン抵抗性や高脂血症に対する予防又は治療を意図する食品、医薬品又はサプリメントなどの開発に有用である。さらに本発明者は、Eriodictyol と EGCGとを併用することで、免疫において重要である血中 IgA 量を上昇させることを明らかにした。IgA は感染症予防において重要であることから (非特許文献19)、Eriodictyol とEGCGとの併用は、感染症を予防又は治療を意図する食品、医薬品又はサプリメントなどの開発に有用である。

#### 【0013】

EGCGは、67LR を活性化することで抗がん作用や抗筋萎縮作用のみならず抗炎症作用 (非特許文献20)、抗アレルギー作用(非特許文献21)、動脈硬化予防作用 (非特許文献22)、抗血栓性作用 (非特許文献22)、免疫増強作用(非特許文献23)、及び神経細胞保護作用(非特許文献24) を発揮することが知られている。

従って、(a1) Eriodictyol若しくはその構造類似体であるNaringenin若しくはHesperetin、(a2) 生体内でこれらのポリフェノールとして代謝されうるこれらポリフェノールの配糖体、又は(a3) これらを含有する食品と、(b1)EGCG、(b2)当該EGCGと同様に67LR アゴニストとしての作用を有するメチル化EGCG、又は(b3)これらを含有する食品との併用は、抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗インスリン抵抗作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、動脈硬化予防作用、抗血栓性作用、抗神経変性作用、抗炎症性作用を有する。従って、上記(a1)、(a2)又は(a3)と(b1)、(b2)又は(b3)との組み合わせは、上記作用に起因する疾患、例えば血栓性疾患 (例えば肺塞症、DIC、心筋梗塞又は脳梗塞等)、癌、筋萎縮、肥満、インスリン抵抗性疾患、炎症性疾患 (シューレン病や膠原病等)、アレルギー疾患、動脈硬化、神経変性疾患 (アルツハイマーや認知症等の脳疾患) の予防又は治療を意図する食品、医薬品又はサプリメントとして有用である。

#### 【0014】

##### (1) 緑茶抽出物

本発明における緑茶抽出物は、ツバキ科の常緑樹である茶の木より作製した抽出物である。本発明において使用される緑茶の木としては、カメリアタリエンシス、カメリアシネンシスなどの茶の木が挙げられる。例えばチャノキ (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) 、アッサムチャ (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze var. *assamica* (J.W.Mast.) Kitam.) 、カメリアシネンシスとカメリアタリエンシスの交配種、「やぶきた」、「べにふうき」、「べにふじ」、「べにほまれ」、「やえほ」、「するがわせ」、「ゆたかみどり」、「かなやみどり」、「おくむさし」、「青心大パン」、「青心烏龍」、「大葉烏龍」、「紅花」、「べにひかり」、「やまかい」、「やまみどり」、「からべに」、「香駿」、「そうふう」、「ふくみどり」、「みねかおり」、「べにひかり」、「みなみかおり」、「い

10

20

30

40

50

「すみ」、「ふうしゅん」、「たまみどり」、「やまかい」、「くりたわせ」、「しゅんめい」、「さやまみどり」、「あさぎり」、「ほくめい」、「ただにしき」、「あさひ」、「さやまかおり」、「めいりょく」、「やまとみどり」、「あさつゆ」、「とよか」、「なつみどり」、「うじひかり」、「おおいわせ」、「ごこう」、「印雑 131」、「まきのはらわせ」、「たかちほ」、「こまかげ」、「さみどり」、「こまかげ」、「はつもみじ」、「りょうふう」、「みなみさやか」、「さえみどり」、「おくゆたか」、「ふじみどり」、「サンルージュ」及び「おくみどり」などの茶品種が用いられ、「やぶきた」、「べにふうき」、「かなやみどり」、「おくむさし」、「そうふう」、「ふうしゅん」、「ただにしき」、「サンルージュ」がより好ましい。また、これらの茶の木からの茶葉の例としては煎茶、玉露、番茶、茎茶、芽茶、玄米茶、粉茶、抹茶、釜煎り茶、甜茶、包種茶、ウーロン茶、紅茶等が挙げられる。10

茶の木からの茶葉成分の抽出溶媒として、水若しくは有機溶剤、またはこれらの混合液が用いられる。

#### 【0015】

有機溶剤としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、tert-ブタノール等の炭素数1~4の低級アルコール、ジメチルケトン、メチルエチルケトン、アセトンおよびメチルイソブチルケトン等のケトン類などの極性有機溶剤、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、またはジエチルエーテル等の非極性有機溶剤が挙げられる。更にこれら極性有機溶剤と非極性有機溶剤を適宜組み合わせた混合物を使用することもできる。好ましくは、熱水、エタノール、含水エタノールである。含水アルコールのアルコール濃度は、30v/v%~90v/v%、好ましくは40v/v%~70v/v%である。熱水の場合の温度は40~100、好ましくは60~100である。20

#### 【0016】

抽出物を得るための抽出方法は、浸漬による抽出、加熱抽出、連続抽出、超臨界抽出等の公知の方法を挙げることができる。

抽出物は、その後、公知の方法で濃縮してもよい。

得られた抽出物または濃縮物等は、公知の方法で更に精製してもよい。精製方法としては、限外ろ過、吸着樹脂処理、分子クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、液-液抽出等が挙げられる。30

#### 【0017】

乾燥方法は噴霧乾燥、凍結乾燥などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

茶葉抽出物中には、ポリフェノールやカテキン類などが含まれている。茶抽出物は、カテキン、エピカテキン、エピガロカテキン、カテキンガレート、エピカテキンガレート、ガロカテキンガレート、エピガロカテキンガレート、メチル化カテキンなどが含まれていることが好ましく、エピガロカテキンガレートを含有していることが更に好ましい。

本発明におけるメチル化カテキンは主として、エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート(以下、EGCG3"Meという)、エピカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート(以下、ECG3"Meという)、エピカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート(以下、ECG4"Meという)、エピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート(以下、EGCG4"Meという)、ガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート(以下、GCG3"Meという)、カテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート(以下、CG3"Meという)、カテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート(以下、CG4"Meという)、又は、ガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート(以下、GCG4"Meという)及びこれらの異性化体を含むことが好ましい。40

#### 【0018】

緑茶抽出物の組成物における含有率は、組成物の剤型または投与形態によって異なるが、後述の柑橘類抽出物又はフラバノンとの含有率を考慮して適宜設定することができる。

また、本発明においては、茶抽出物に含まれるカテキンとは別のカテキンを組成物に含

有させることができる。例えば合成カテキンなどが挙げられる。合成カテキンは、公知方法により得ることができる (Chem. Asian J. 2010, 5, 2231-2248. DOI: 10.1002/asia.201000372)。

#### 【0019】

##### (2) 柑橘類抽出物

本発明における柑橘類抽出物は、柑橘類からの抽出処理物であり、フラバノン等を含有している。柑橘類としては、例えば以下のものが挙げられる。

ミカン属(カンキツ属) :

オレンジ、グレープフルーツ、ユズ、ダイダイ、カボス、スダチ、ユコウ、ゆうこう、シークヮーサー、レモン、ライム、ナツミカン、ハッサク、イヨカン、ブンタン、マンダリンオレンジ、ウンシュウミカン、ポンカン、タチバナ、紀州ミカン、バレンシアオレンジ、ネーブルオレンジ、ブラッドオレンジ、ジャッファ・オレンジ、ベルガモット、キノット等

また、上記ミカン属柑橘類のほかに、カラタチ類、キンカン類などを用いることができる。

#### 【0020】

柑橘類を抽出するために使用される抽出溶剤としては、前記と同様、水若しくは有機溶剤、またはこれらの混合液が用いられる。

有機溶剤としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、tert-ブタノール等の炭素数1~4の低級アルコール、ジメチルケトン、メチルエチルケトン、アセトンおよびメチルイソブチルケトン等のケトン類などの極性有機溶剤、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ブチル、またはジエチルエーテル等の非極性有機溶剤が挙げられる。好ましくは、水又はエタノールである。更にこれら極性有機溶剤と非極性有機溶剤を適宜組み合わせた混合物を使用することもできる。

抽出物を得るための抽出方法は、浸漬による抽出、加熱抽出、連続抽出、超臨界抽出等の公知の方法を挙げることができる。抽出物は、その後、公知の方法で濃縮してもよい。

得られた抽出物または濃縮物等は、公知の方法で更に精製してもよい。精製方法としては、限外ろ過、吸着樹脂処理、分子クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、液-液抽出等が挙げられる。

#### 【0021】

柑橘類抽出物中には、フラバノンが含まれている。柑橘類抽出物は、エリオジクチオール、ナリングニン及びヘスペレチン及びそれらの配糖体(エリオジクチオール配糖体、ナリングニン配糖体、ヘスペレチン配糖体)などが含まれていることが好ましく、エリオジクチオールを含有していることが更に好ましい。

また、本発明においては、柑橘類抽出物に含まれるフラバノンとは別のフラバノンを組成物に含有させることができる。例えば合成フラバノン、フラバノンに糖を結合させた糖転移化合物などが挙げられる。例えば、合成エリオジクチオール、合成ナリングニン及び合成ヘスペレチンなどが挙げられ、これらを1種又は複数種混合することができる。合成エリオジクチオール、合成ナリングニン及び合成ヘスペレチンなどは、公知手法により得ることができる (European J Org Chem., 2012(3): 449-462. doi:10.1002/ejoc.201101228)。

また、柑橘類抽出物の組成物中の含有率は、組成物の剤型または投与形態によって異なる。

本発明の組成物において、茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体との比(茶抽出物/柑橘類抽出物、質量比)は、それぞれの濃縮程度によつても異なるが、好ましくは100~0.01とすることができる。そして、茶抽出物又はカテキン、及び柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体の組成物中の含有量は、上記質量比の範囲で適宜設定することができる。例えば茶抽出物又はカテキンは90重量%~0.001重量%、好ましくは30重量%~0.01重量%であり、はフラバノン若しく

10

20

30

40

50

はその配糖体は90重量%～0.001重量%、好ましくは20重量%～0.01重量%である。

#### 【0022】

##### (3) 組成物

本発明の組成物は、上記の各成分以外に、食品用として許容可能な担体や公知または周知の他の添加剤を含んでいてもよい。

上記添加剤としては、一般に医薬又は食品に使用される、賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、香味矯臭剤、乳化剤、界面活性剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤、安定化剤、吸収促進剤等を挙げることができ、所望により、これらを適宜組み合わせて使用することもできる。

本発明の組成物は、液状、固形状、粉末、ゲル状のいずれの形態であってもよく、本発明の組成物の剤型は、経口用剤型、例えば錠剤、散剤、カプセル剤（ハードカプセル剤、ソフトカプセル剤）、顆粒剤、丸剤、液剤、シロップ、等の形態としてもよい。これらの製剤は常法に従って調製することができる。

組成物が溶液状の場合は、好ましく用いられる担体としては水等の水性媒体を挙げることができる。

#### 【0023】

また、組成物が固形状の場合は、添加成分としては、結晶セルロース、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム等の賦形剤、コーンスターク、アルギン酸等の膨化剤を用いることができる。

また、粉末、固形剤又は液剤に成型するのに必要な化合物として、エリスリトール、マルチトール、ヒドロキシプロピルセルロース、カオリン、タルクなどが挙げられる。

本発明の組成物は、抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、血栓又は脳梗塞予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用を有する。従って、上記組成物を、抗がん剤、抗筋萎縮剤、抗肥満剤、抗炎症剤、コレステロール低下剤、血栓若しくは脳梗塞予防剤、又は免疫増強剤として使用することができる。上記それぞれの剤における茶抽出物又はカテキン、及び柑橘類抽出物又はフラバノンの調製、これらの各成分の含有率等については、前記と同様である。

#### 【0024】

本発明の組成物を摂取させる対象は、特に限定されるものではないが、ヒトのほか、ヒトを除く哺乳動物、例えば実験動物（マウス、ラット、モルモット、ウサギ等）、家畜（ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ等）、愛玩動物（イヌ、ネコ等のペット類）などが挙げられる。本発明の組成物によれば、がん、筋萎縮（例えば筋萎縮性側索硬化症（ALS）等）、炎症性疾患、血栓又は脳梗塞高脂血症、感染症の予防又は治療、あるいは生活習慣病や肥満の改善を期待することができる。

#### 【0025】

##### (4) 食品

本発明の食品は、茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含むものであり、特に抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、血栓又は脳梗塞予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用を目的とした機能性食品、サプリメント等として使用される。

本発明の組成物を含有する食品（特に機能性食品）の形態としては、例えばサプリメント（散剤、顆粒剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠）が挙げられるが、その他にも、飲料（お茶、炭酸飲料、乳酸飲料、スポーツ飲料等）、菓子（ガム、チョコレート、クッキー、キャンディー等）、油、油脂食品（マヨネーズ、ドレッシング、バター等）、調味料（ケチャップ、ソース等）、流動食、乳製品（牛乳、ヨーグルト、チーズ等）、パン類、麺類（うどん、そば、ラーメン、パスタ、冷麦、ビーフン等）等が挙げられる。但し、これらの形態に限定されるものではない。

#### 【0026】

本発明の食品を摂取させる対象は、前記と同様であり、特に限定されるものではないが

10

20

30

40

50

、ヒトのほか、ヒトを除く哺乳動物、例えば実験動物（マウス、ラット、モルモット、ウサギ等）、家畜（ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ等）、愛玩動物（イヌ、ネコ等のペット類）などが挙げられる。

本発明の食品において、茶抽出物又はカテキン、及び柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体の含有量は、前記組成物の項で述べた内容と同様であり、上記質量比の範囲で適宜設定することができる。例えば茶抽出物又はカテキンは90重量%～0.001重量%、好ましくは30重量%～0.01重量%であり、フラバノン若しくはその配糖体は90重量%～0.001重量%、好ましくは20重量%～0.01重量%である。

#### 【0027】

##### (4) 増強剤

10

前記の通り、本発明者は、Eriodictyol が EGCG のもつ抗がん作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、抗血栓性作用、免疫増強作用及び抗筋萎縮作用を増強することを明らかにした。

そこで本発明は、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体を含む、緑茶抽出物又はカテキンの抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、血栓又は脳梗塞予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用の増強剤を提供する。また本発明は、緑茶抽出物又はカテキンと、柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体とを含む組成物を被検体に摂取させることを特徴とする、当該緑茶抽出物又はカテキンの、前記被検体における抗がん作用、抗筋萎縮作用、抗肥満作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、血栓又は脳梗塞予防作用及び免疫増強作用からなる群から選ばれる少なくとも1つの作用を増強させる方法を提供する（但し、ヒトに対する医療行為を除くことができる）。

20

柑橘類抽出物又はフラバノン若しくはその配糖体を増強剤又は増強方法として使用する場合も、前記組成物の項で述べた内容と同様に適用することができる。

本発明の増強剤及び増強方法の対象となる被検体は、前記と同様であり、特に限定されるものではないが、ヒトのほか、ヒトを除く哺乳動物、例えば実験動物（マウス、ラット、モルモット、ウサギ等）、家畜（ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ等）、愛玩動物（イヌ、ネコ等のペット類）などが挙げられる。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

30

#### 【実施例】

##### 【0028】

##### 実験方法

##### EGCG のがん細胞アポトーシス誘導作用に対する Eriodictyol の併用効果

ヒト多発性骨髄腫細胞株U266を、10% ウシ胎児血清 (FCS) 添加RPMI1640 培地にて37℃、水蒸気飽和した 5% CO<sub>2</sub>条件下で継代及び維持した。細胞は対数増殖期で培養維持した。培養に使用した RPMI 1640 培地は、超純水 1 L あたり RPMI 1640 培地 10.4 g、HEPES 2.38 g、注射用ペニシリソ G カリウム 10 万単位、硫酸ストレプトマイシン注射用 100 mg、NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g を懸濁した後、フィルター滅菌した。

その後、FCS を RPMI 1640 培地に添加し、細胞培養に使用した。ヒト多発性骨髄腫細胞株U266に対するEGCG とEriodictyolとの組み合わせによるアポトーシス誘導作用を検討するために、Annexin V 及びPI を用いた二重染色を実施した。Propidium Iodide (PI) 染色液は、PI (Sigma)を 50 μg/mL の濃度となるように PBS に懸濁したものを用いた。

40

##### 【0029】

超純水 1 L に対し、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g を溶解してPBSを調製し、オートクレーブ滅菌した。用いたAnnexin V Binding Buffer は10 mM HEPES, 140mM NaCl; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> (Wako); pH 7.4となるよう調整しフィルター滅菌に供した。用いたEriodictyolは 100% ジメチルスルホキシド(DMSO) にて 5 mM となるように調整し、-30 ℃ にて保存した。EGCG (Sigma社より購入)を、超純水にて 5 mM となるように調整し、-30 ℃ にて保存した。U266 を1% FCS及び SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/

50

mL)含有RPMI 1640 に  $5 \times 10^4$  cells/mL (U266)になるよう調整して 96 well plate に播種し、EGCG 及びEriodictyolが終濃度で 5 μM となるよう添加し96 時間培養した。

#### 【 0 0 3 0 】

その後、充分に懸濁した細胞培養液を 300 × g 5 minにて遠心し、上清を除去した後、 Annexin V Binding Buffer にて懸濁し、細胞数を血球計算盤により計測し再び 300 × g 5 分にて遠心し、Annexin V Binding Buffer にて懸濁した。この細胞懸濁液 100 μL に対しAnnexin V Alexa Fluor 488 Conjugate を 5 μL (Invitrogen) 添加し、さらにPI染色液2 μL を添加し、室温にて15 min放置した。その後、Annexin V Binding Buffer 400 μL を上から添加し、フローサイトメーターである FACS Caliber (Becton, Dickinson and Company)を用いて測定を行った。コンペンセーションをかけたのちAnnexin V Alexa Fluor 488 Conjugate を FL 1 にて測定し、陽性とみなされた細胞をアポトーシス細胞とした。  
10

#### 【 0 0 3 1 】

腫瘍移植マウスに対するEGCG と Eriodictyol併用の抗がん作用

5 週齢メスbalb/cマウスを2 週間予備飼育したのち、マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11 を $5 \times 10^6$  cells/mL となるようにRPMI培地に懸濁した細胞懸濁液を、イソフルラン (マイラン製薬, Tokyo, Japan) 麻酔下で各マウスの右背面部に200 μL皮下注射し、移植を行った。移植11 日後、EGCG (15 mg/kg i.p.)及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.) を2日に一度投与し、2 日おきに腫瘍体積をノギスで測定した。腫瘍体積は次の式にて算出した。  
20

$$<\text{腫瘍体積} (\text{mm}^3) = (\text{短径})^2 \times \text{長径} \times 0.5 >$$

倫理的観点より、腫瘍体積が 4000mm<sup>3</sup>を超えたものからイソフルラン (マイラン製薬, Tokyo, Japan) 麻酔下で、心臓採血により屠殺した。

#### 【 0 0 3 2 】

腫瘍移植マウスに対するEGCG と Eriodictyol 組み合わせによる肝毒性

5 週齢メスbalb/cマウスを2 週間予備飼育したのち、マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11 を $5 \times 10^6$  cells/mL となるようにRPMI培地に懸濁した細胞懸濁液を、イソフルラン (マイラン製薬, Tokyo, Japan) 麻酔下で各マウスの右背面部に200 μL皮下注射し、移植を行った。移植11 日後、EGCG (15 mg/kg i.p.)及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.) を2日に一度投与した。麻酔下で、心臓採血により屠殺を行った。採血した血液は、37 °Cで2 時間静置し凝固させた後、4 °C、2000 × gで15 分間遠心して血清を採取した。得られた血清について、肝毒性の指標である血清中 Aspartate Aminotransferase (AST) 及び Alanine aminotransferase (ALT) 活性を、キット(Wako)を用いて測定した。  
30

#### 【 0 0 3 3 】

廃用性筋萎縮に及ぼすEGCGとEriodictyol併用物の効果

12 週齢のオスC57BL/6Jマウスを平均体重が等しくなるよう 5 群に群わけし、それぞれ、GR (Ground) 群、TS (Tail suspension) 群、EGCG群、Eriodictyol群、EGCG + Eriodictyol群とした。GR 群および TS 群には群分け開始から生理食塩水を、EGCG群にはEGCGを、Eriodictyol群にはEriodictyolをそれぞれ胃内投与し(5 mg/kg)、EGCG + Eriodictyol群にはEGCGとEriodictyol (5 mg/kg) をゾンデにより胃内投与した。群分け開始から 7 日間は通常飼育し、その後TS群、EGCG群、Eriodictyol群、EGCG + Eriodictyol群の4群は尾懸垂試験を施した。尾懸垂試験10日後 (実験開始から17日後)、全マウスをイソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺し、大腿四頭筋を摘出し、重量を測定した。各サンプルは実験期間中毎日投与した。  
40

#### 【 0 0 3 4 】

高脂肪高ショ糖(HF/HS)食摂取マウスに対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果

12 週齢オス C57BL/6J マウスを1 週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるよう 5 群にわけ、Control (AIN-93G準拠食) 群、HF/HS (高脂肪高ショ糖食) 群、やぶきた (0.2% (HF/HS + やぶきた) 群、Eriodictyol (HF/HS + Eriodictyol) 群、やぶきた+Eriodictyol (HF/HS + やぶきた + Eriodictyol) 群とした。やぶきた(0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した飼料を摂食させた。飼料は4 g/day で与え、自由飲水で 8  
50

週間飼育した。マウスは、16時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。採血した血液は、37度で2時間静置し凝固させた後、4、2000×gで15分間遠心して血清を採取した。血清中の総コレステロール及びLDL値を測定した。脂肪組織をトライゾールにて処理し、cDNA合成後real-time PCRによってMCP-1のmRNA発現量を測定した。

#### 【0035】

高脂肪高ショ糖(HF/HS)食摂取マウスの肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子発現に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果

12 週齢オス C57BL/6J マウスを1週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるよう 10  
に5群にわけ、control (AIN-93G準拠食)群、HF/HS (高脂肪高ショ糖食)群、やぶきた (0.2% (HF/HS +やぶきた) 群、Eriodictyol (HF/HS + Eriodictyol) 群、やぶきた+ Eriodictyol (HF/HS + やぶきた + Eriodictyol) 群とした。やぶきた(0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した飼料を摂食させた。飼料は 4 g/day で与え、自由飲水で 8週間飼育した。マウスは、16時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。肝臓組織をトライゾールにて処理し、cDNA合成後real-time PCRによって3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR)、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMCGS)、及びlow density lipoprotein receptor (LDLR) のmRNA発現量を測定した。

#### 【0036】

抗血栓性因子産生に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果

12 週齢オス C57BL/6J マウスを1週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるよう 20  
に4群にわけ、HF/HS (高脂肪高ショ糖食)群、やぶきた(0.2% (HF/HS +やぶきた) 群、Eriodictyol (HF/HS + Eriodictyol) 群、やぶきた+ Eriodictyol (HF/HS + やぶきた + Eriodictyol) 群とした。やぶきた(0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した飼料を摂食させた。飼料は 4 g/day で与え、自由飲水で8週間飼育した。マウスは、16時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。採血した血液は、37度で2時間静置し凝固させた後、4、2000×gで15分間遠心して血清を採取した。血清中の抗血栓性因子である tissue factor pathway inhibitor (TFPI) 量をELISA法により測定した。

#### 【0037】

血清IgA量に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果

12 週齢オス C57BL/6J マウスを1週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるよう 30  
に4群にわけ、HF/HS (高脂肪高ショ糖食)群、やぶきた(0.2% (HF/HS +やぶきた) 群、Eriodictyol (HF/HS + Eriodictyol) 群、やぶきた+ Eriodictyol (HF/HS + やぶきた + Eriodictyol) 群とした。やぶきた(0.2%) 及びEriodictyol (0.45 g/kg diet) を添加した飼料を摂食させた。飼料は 4 g/day で与え、自由飲水で8週間飼育した。マウスは、16時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。採血した血液は、37度で2時間静置し凝固させた後、4、2000×gで15分間遠心して血清を採取した。血清中のIgA量を ELISA法により測定した。

#### 【0038】

EGCG、EGCG3"Me、緑茶抽出物のがん細胞致死誘導活性に対するEriodictyol、Eriodictyol関連物質(Naringenin, Hesperetin)及びEriodictyol含有食品抽出物の組み合わせ効果

ヒト多発性骨髄腫細胞株U266は、10% FCS 添加RPMI1640 培地にて37度、水蒸気飽和した 5% CO<sub>2</sub>条件下で継代、維持した。細胞は対数増殖期で培養維持した。培養に使用した RPMI 1640 培地は、超純水 1 L あたり RPMI 1640 培地 10.4 g、HEPES 2.38 g、注射用ペニシリン G カリウム 10 万単位、硫酸ストレプトマイシン注射用 100 mg、NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g を懸濁した後、フィルター滅菌した。

実験に用いたレモン皮抽出物はレモン6個からおろし金を用いて果皮 100 g を採取し 50  
100% EtOH 100 mL を加え、乳鉢にて破碎した。さらにガーゼにて繊維の除去を行い、1号の濾紙および漏斗を用い、自然ろ過にて沈殿物を除去した。その後12000×gにて遠心分

離を行い、上清を回収した。得られたレモンエタノール抽出液をエバポレーターを用いて溶媒を揮発させ、レモンエタノール抽出画分を得た。このレモンエタノール抽出画分をDM SO<sub>4</sub>に再溶解し、レモン抽出物とした。その後、U266 を1% FCS SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)含有 RPMI 1640 に  $5 \times 10^4$  cells/mL になるよう調整して 96 well plate に播種し、EGCG、EGCG3 "Me、緑茶抽出物のがん細胞致死誘導活性に対するEriodictyol、Eriodictyol関連物質(Naringenin, Hesperetin) 及びEriodictyol含有食品を添加し96 時間培養した。培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

#### 【 0 0 3 9 】

##### EriodictyolによるEGCG活性増強の67LR 依存性

ヒト多発性骨髄腫細胞株U266は、10% FCS 添加RPMI1640 培地にて 37<sup>°</sup>、水蒸気飽和した 5% CO<sub>2</sub>条件下で継代、維持した。細胞は対数増殖期で培養維持した。培養に使用した RPMI 1640 培地は、超純水 1 L あたり RPMI 1640 培地 10.4 g、HEPES 2.38 g、注射用ペニシリン G カリウム 10 万単位、硫酸ストレプトマイシン注射用 100 mg、NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g を懸濁した後、フィルター滅菌した。U266 を1% FCS SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)含有 RPMI 1640 に  $5 \times 10^4$  cells/mL になるよう調整して 96 well plate に播種し、直ちに、終濃度が 20 μg/mL となるように Anti-67LR Monoclonal Antibody であるMLuc 5 (abcam) を添加した。3 時間後、Eriodictyol及び EGCGを終濃度が 5 μM となるよう添加した。生細胞数はATPlite One Step (パーキンエルマー) にて測定した。

#### 【 0 0 4 0 】

##### EGCG のAkt活性化能に対するEriodictyol の増強効果

5 週齢メスbalb/cマウスを2 週間予備飼育したのち、マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11 を  $5 \times 10^6$  cells/mL となるようにRPMI 培地に懸濁した細胞懸濁液を、 200 μL 右背部に皮下注射移植した。移植11 日後、 EGCG (15 mg/kg i.p.) 及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.) を投与し、6時間後に屠殺を実施し、腫瘍を摘出した。移植11 日後、 EGCG (15 mg/kg i.p.) 及び Eriodictyol (15 mg/kg i.p.) を投与した。6 時間後屠殺した。腫瘍を摘出し、ライゼートにした後、回収したサンプル(1 mg/mL protein lyste 20 μL) に Kinase Assay buffer 20 μL、Biotinylated Akt Substrate WS 10 μL、dH<sub>2</sub>O 50 μL、AT P/MgCl<sub>2</sub>Mix 20 μL を順に添加し、37<sup>°</sup> にて 45分間インキュベートした後、Kinase Stop Solution を 10 μL 添加した。その後、Streptavidin-Coated 96-Well に 80 μL ずつ添加し、30<sup>°</sup> にて 60分間放置した。その後プレートを三度洗浄し、Phosphoserine Detection Antibody を 100 μL ずつ添加し、30<sup>°</sup> にて60分間放置した。その後プレートを三度洗浄し、HRP-Antibody Conjugateを 100 μL ずつ添加し、30<sup>°</sup> にて60分間放置した。その後プレートを三度洗浄した後、基質である TMB solution を 100 μL ずつ添加した。30<sup>°</sup> にて20分間放置後に停止液を100 μL ずつ添加した後、450 nm のプレートリーダーにて吸光度を測定した。

#### 【 0 0 4 1 】

##### EGCG の67LR依存的がん細胞致死誘導経路の活性化（酸性スフィンゴミエリナーゼ活性化）に対するEriodictyol の増強効果

5 週齢メスbalb/cマウスを2 週間予備飼育したのち、マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11 を  $5 \times 10^6$  cells/mL となるようにRPMI 培地に懸濁した細胞懸濁液を、 200 μL 右背部に皮下注射移植した。移植11 日後、 EGCG (15 mg/kg i.p.) 及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.) を投与し、6時間後に屠殺した。腫瘍を摘出し、ライゼートにした後、遠心した。上清を PBS にて 2 mg protein/ mL となるようにしたのち、エッペンドルフチューブに 20 μL 分注し、基質混合液 (BODIPY-C12-SM 2 μL、10%Triton 10 μL、1M sodium acetate pH 4.5 20 μL dH<sub>2</sub>O 78 μL) を 8 μL 添加し、タッピングにて混合したのちフラッシュし、37<sup>°</sup> にて8時間インキュベートした。さらに、停止液 (クロロホルム CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 2:1) を 60 μL 添加し、あらかじめ乾燥器にて活性化させた 薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートに 10 μLづつスポットし、展開溶媒(dH<sub>2</sub>O:MeOH:クロロホルム CHCl<sub>3</sub> = 8:35:60 ) にて展開した。TLC 法にて酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を測定した (n = 5 S.E.M.)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 2 】

EGCG の 67LR 依存的がん細胞致死活性 (Caspase-3 活性)に対するEriodictyol の増強効果

5 週齢メスbalb/cマウスを2 週間予備飼育したのち、マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11 を $5 \times 10^6$  cells/mL となるようにRPMI 培地に懸濁した細胞懸濁液を、 200  $\mu$ L 右背部に皮下注射移植した。移植11 日後、 EGCG (15 mg/kg i.p.) 及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.) を2日に一度投与し、 6 時間後に屠殺した。腫瘍を摘出し、組織切片を作成し、免疫組織染色にてCaspase-3 が活性化された細胞数を測定した。

## 【 0 0 4 3 】

統計

10

実験結果の統計処理には Tukey ' s test を用い、 0.05 未満を有意とした。

## 【 0 0 4 4 】

実施例1

EGCG のがん細胞アポトーシス誘導作用に対するEriodictyolの併用効果 (図 1 )

EGCGのがん細胞アポトーシス誘導作用に対するEriodictyol の効果を評価するため、ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を $5 \times 10^4$  cells/mL となるよう調整して 96 well plate に播種し、 EGCG 及びEriodictyolを終濃度が5  $\mu$ M となるよう添加し96 時間培養した。96時間培養後、 Annexin V Alexa Fluor 488 Conjugate を 5  $\mu$ L (Invitrogen) 添加した。 PI 染色液2  $\mu$ L を添加し、室温にて15分間放置した。その後、 Annexin V Binding Buffer 400  $\mu$ L を添加し、フローサイトメーターにてアポトーシスが誘導された細胞数を測定した。

その結果、 Eriodictyol は EGCG のアポトーシス誘導作用を増強させることができた。

## 【 0 0 4 5 】

実施例2

腫瘍移植マウスに対するEGCG と Eriodictyol併用の抗がん作用 (図 2 )

EGCG とEriodictyol 組み合わせによる抗がん作用を評価するため、 Balb/cマウスを2 週間予備飼育したのち、マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11を $5 \times 10^6$  cells/mL となるようRPMI 培地に懸濁した細胞懸濁液を右背部に皮下注射した。腫瘍生着を確認後、 EGCG (15 mg/kg i.p.) 及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.)を2日に一度投与し、腫瘍の体積を測定した。その結果、 Eriodictyol とEGCGの 併用は腫瘍成長を顕著に阻害するとともに生存期間を有意に延長させることを明らかにした。

30

## 【 0 0 4 6 】

実施例3

腫瘍移植マウスに対するEGCG と Eriodictyol 組み合わせによる肝毒性 (図 3 )

マウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11を移植したマウスにEGCG (15 mg/kg i.p.) 及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.)を2日に一度投与した。屠殺時のマウス血清中のAspartate Aminotransferase (AST) 及び Alanine aminotransferase (ALT) 活性を測定した。

その結果、 EGCG とEriodictyol の組み合わせは AST 及び ALT の上昇を誘導しなかつたことから、肝毒性を示さないことを明らかにした。

40

## 【 0 0 4 7 】

実施例4

廃用性筋萎縮に及ぼすEGCGとEriodictyol併用物の効果 (図 4 )

尾懸垂試験誘導性マウスの廃用性筋萎縮に及ぼすEGCGならびにEriodictyolの作用について検討した。C57BL/6J マウスに水又は各サンプルをゾンデにより1日に1回 胃内投与した。投与開始から7 日後、尾懸垂試験を開始し、尾懸垂試験開始から10 日後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血によりマウスを屠殺し、大腿四頭筋を摘出し重量を測定した。

その結果、 EGCG およびEriodictyolはそれぞれ単独では筋萎縮に対して効果を示さなかつたのに対し、 EGCGとEriodictyolを併用投与したマウスでは筋萎縮が抑制されていた。

50

以上の結果から、EGCGとEriodictyolの併用は筋萎縮抑制作用を示すことが明らかになった。

#### 【0048】

##### 実施例5

高脂肪高ショ糖(HF/HS)食摂取マウスに対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果(図5)

高脂肪高ショ糖食摂食肥満モデルマウスにおけるやぶきた及びEriodictyolの肥満に対する作用において検討を行った。12週齢オスC57BL/6Jマウスを1週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるように各群に分け、飼料を4g/dayで与え自由飲水で8週間飼育した。体重を測定後16時間絶食させ、その後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。採血により採取した血液は37℃で2時間静置し凝固させた後、4℃、2000×gで15分間遠心して血清を採取した。血清中の総コレステロール及びLDL値を測定した。脂肪組織をトライゾールにて処理し、cDNA合成後real-time PCRによってMCP-1のmRNA発現量を測定した。

その結果、高脂肪高ショ糖食摂取により上昇した体重、脂肪組織MCP-1発現量、LDL値、血清コレステロール値に対してやぶきた及びEriodictyol単独群では効果が見られなかつたが、やぶきたとEriodictyolの併用群ではこれら全ての値に対して上昇抑制効果が観察された。

#### 【0049】

##### 実施例6

高脂肪高ショ糖(HF/HS)食摂取マウスの肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子発現に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果(図6)

高脂肪高ショ糖食摂食肥満モデルマウスにおける、やぶきた及びEriodictyolの肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子発現に対する作用について検討した。C57BL/6Jマウスを1週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるように各群に分け、飼料を4g/dayで与え自由飲水で8週間飼育した。16時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。肝臓組織をトライゾールにて処理し、cDNA合成後real-time PCRによってHMGCR、HMCGS及びLDLRのmRNA発現量を測定した。

その結果、やぶきた及びEriodictyol単独群では効果が観察されなかつたのに対し、やぶきたとEriodictyolの併用群において肝臓におけるHMGCR及びHMCGSの発現量の低下が見られた。また、肝臓におけるLDLRの発現量が上昇していた。

#### 【0050】

##### 実施例7

抗血栓性因子産生に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果(図7)

マウスにおけるやぶきた及びEriodictyolの抗血栓性因子産生に対する作用について検討した。12週齢オスC57BL/6Jマウスを1週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるように各群に分け、飼料を4g/dayで与え自由飲水で8週間飼育した。16時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。採血により採取した血液は37℃で2時間静置し凝固させた後、4℃、2000×gで15分間遠心して血清を採取した。血清中の抗血栓性因子であるTFPI量をELISA法にて測定した。

その結果、やぶきた単独群では作用を与えたなかったのに対し、やぶきたとEriodictyolの併用群においてTFPI量の発現量の上昇が見られた。

#### 【0051】

##### 実施例8

血清IgA量に対する緑茶抽出物とEriodictyolの併用摂取効果(図8)

マウスにおけるやぶきた及びEriodictyolの血清IgA量に対する作用について検討した。12週齢オスC57BL/6Jマウスを1週間予備飼育したのち、平均体重が等しくなるように各群に分け、飼料を4g/dayで与え自由飲水で8週間飼育した。16時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。採血により採取した血液は37℃で2時間静置し凝固させた後、4℃、2000×gで15分間遠心して血清を採取した。血清中のIgA量を

10

20

30

40

50

ELISA法にて測定した。

その結果、やぶきた単独群では作用を与えなかったのに対し、やぶきたとEriodictyolの併用群においてIgA量の上昇が見られた。

#### 【0052】

実施例9

EGCG、EGCG3 " Me、緑茶抽出物のがん細胞致死誘導活性に対するEriodictyol、Eriodictyol関連物質(Naringenin, Hesperetin)ならびにEriodictyol含有食品抽出物の組み合わせ効果(図9)

EGCG若しくはその構造類似体、又はEGCGを含有する天然物とEriodictyol若しくはその構造類似体、又はEriodictyolを含有する天然物との併用効果を評価するため、ヒト多発性骨髄腫細胞株U266を $5 \times 10^4$ cells/mLとなるよう調整して96 well plateに播種し、EGCG及びEriodictyolを終濃度で5 μMとなるよう添加し、96時間培養した。96時間培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。10

その結果、Eriodictyol又はその構造類似体であるNaringenin若しくはHesperetin、及びEriodictyolを含有するレモン抽出物はEGCG、EGCG " Me、緑茶抽出物の抗がん作用を顕著に高めることを見出した。

#### 【0053】

実施例10

EriodictyolによるEGCG活性増強の67LR依存性(図10)

EriodictyolによるEGCG活性増強の67LR依存性を検討するためにU266細胞を $5 \times 10^4$ cells/mLになるよう調整して96 well plateに播種し、終濃度が20 μg/mLとなるよう抗67LR抗体を添加した。3時間後、Eriodictyol及びEGCGを終濃度が5 μMとなるよう培地に添加した。培養96時間後の生細胞数をATPlite One Step(パーキンエルマー)にて測定した。20

その結果、EGCGとEriodictyolとの併用による抗がん作用は抗67LR抗体の前処理により消失した。このことから、EGCGの生理活性に対するEriodictyolの増強作用は67LRに依存することが示された。

#### 【0054】

実施例11

EGCGのAkt活性化能に対するEriodictyolの増強効果(図11)

EGCGの67LR依存的がん細胞致死誘導活性を担うAktの活性化に対するEriodictyolの作用を検討するため、Balb/cマウスにマウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11を皮下注射移植した。移植11日後、EGCG(15 mg/kg i.p.)及びEriodictyol(15 mg/kg i.p.)を投与した6時間後に屠殺し、摘出した腫瘍におけるAkt活性を測定した。30

その結果、Eriodictyol及びEGCG併用はAkt活性を顕著に上昇させることを見出した。このことから、in vivoにおいてEriodictyolはEGCGによる67LRシグナリングの活性化を増強することが明らかとなった。

#### 【0055】

実施例12

EGCGの67LR依存的がん細胞致死誘導経路の活性化(酸性スフィンゴミエリナーゼ活性化)に対するEriodictyolの増強効果(図12)

EGCGの67LR依存的がん細胞致死誘導活性を担う酸性スフィンゴミエリナーゼの活性化に対するEriodictyolの作用を検討するため、Balb/cマウスにマウス多発性骨髄腫細胞株MPC-11を皮下注射移植した。移植11日後、EGCG(15 mg/kg i.p.)及びEriodictyol(15 mg/kg i.p.)を投与した6時間後に屠殺し、摘出した腫瘍における酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を測定した。40

その結果、Eriodictyol及びEGCGの併用は酸性スフィンゴミエリナーゼ活性を顕著に上昇させることを明らかにした。以上のことから、in vivoにおいてEriodictyolはEGCGによる67LRシグナリングの活性化を増強することが明らかとなった。

#### 【0056】

50

**実施例13**

EGCG の 67LR 依存的がん細胞致死活性 (Caspase-3 活性)に対するEriodictyol の増強効果(図13)

EGCG の 67LR 依存的がん細胞致死誘導機構活性の指標となるCaspase-3 活性化に対する Eriodictyol の作用を検討するため、5 週齢メスbalb/cマウスにマウス多発性骨髓腫細胞株MPC-11を皮下注射移植した。移植11 日後、EGCG (15 mg/kg i.p.)及びEriodictyol (15 mg/kg i.p.) を投与した6時間後に屠殺し、摘出した腫瘍の組織切片を作成し、Caspase-3 の活性化状態を評価した。

その結果、EriodictyolはEGCGのCaspase-3活性化能を顕著に増強することを明らかにした。  
10

**【0057】****実験方法(2)**

EGCG及びその類似体の抗がん作用に対するEriodictyol及びその類似体の併用効果

ヒト多発性骨髓腫細胞株U266は、10% ウシ胎児血清 (FCS) 添加RPMI1640 培地にて 37 、水蒸気飽和した 5% CO<sub>2</sub> 条件下で継代、維持した。細胞は対数増殖期で培養維持した。培養に使用した RPMI 1640 培地は、超純水 1 L あたり RPMI 1640 培地 10.4 g、HEPE S 2.38 g、注射用ペニシリソ G カリウム 10 万単位、硫酸ストレプトマイシン注射用 10 0 mg、NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g を懸濁した後、フィルター滅菌した。その後、FCS を RPMI 1640 培地に添加し、細胞培養に使用した。超純水 1 L に対し、NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub> 1.15 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g を溶解してPBSを調製し、オートクレーブ滅菌した。  
20

Eriodictyol及びその構造類似体であるNaringenin、Hesperetin、ならびにそれらの配糖体であるEriocitrin、Naringin、Hesperidinは、100% ジメチルスルホキシド (DMSO) にて 5 mM となるように調整し、-30 ℃ にて保存した。EGCG 及び (-)-Gallocatechin gallate (GCG) は超純水にて 5 mM となるように調整し、-30 ℃ にて保存した。EGCG3 " Me は10%DMSO dH<sub>2</sub>Oにて 5 mM となるように調整し、-30 ℃ にて保存した。

U266 を1% FCS及び SOD (5 U/mL)、Catalase (200 U/mL)含有RPMI 1640 に  $5 \times 10^4$  cells /mL になるよう調整して 24 well plate に播種し、EGCG 及び類似体又は Eriodictyol及びその類似体を、終濃度で 5 mM となるよう添加し96 時間培養した。培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

**【0058】****統計**

実験結果の統計処理には Student ' s testを用い、Vehicle 群の Control と比較してP 値が 0.05 未満を有意とした。

**【0059】****実施例14**

Eriodictyol が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響

EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に対するEriodictyol の効果を評価するため、ヒト多発性骨髓腫細胞株U266 を $5 \times 10^4$ cells/mL となるよう調整して 24 well plate に播種し、Eriodictyol及びその構造類似体を終濃度が 5 mM となるよう添加し96時間培養した。96 時間培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。  
40

その結果、EriodictyolはEGCG 及びその構造類似体であるEGCG 3 " Me, GCG (ガロカテキンガレート) の抗がん作用を顕著に高めることを見出した (図14)。

**【0060】****実施例15**

Naringenin が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響

EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に対するNaringenin の効果を評価するため、ヒト多発性骨髓腫細胞株U266 を $5 \times 10^4$ cells/mL となるよう調整して 24 well plate に播種し、Naringenin及びその構造類似体を終濃度が 5 mM となるよう添加し96時間培養した。96 時間培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

その結果、NaringeninはEGCG 及びその構造類似体であるEGCG 3 " Me, GCGの抗がん作用  
50

を顕著に高めることを見出した（図15）。

#### 【0061】

##### 実施例16

Hesperetinが EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響

EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に対するHesperetinの効果を評価するため、ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を $5 \times 10^4$ cells/mL となるよう調整して 24 well plate に播種し、Hesperetin及びその構造類似体を終濃度が 5 mM となるよう添加し96時間培養した。96 時間培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

その結果、HesperetinはEGCG 及びその構造類似体であるEGCG 3 " Me, GCGの抗がん作用を顕著に高めることを見出した（図16）。 10

#### 【0062】

##### 実施例17

Eriodictyol 配糖体であるEriocitrin が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響

EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に対するEriocitrin の効果を評価するため、ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を $5 \times 10^4$ cells/mL となるよう調整して 24 well plate に播種し、Eriocitrin及びその構造類似体を終濃度が 5 mM となるよう添加し96 時間培養した。96 時間培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

その結果、EriocitrinはEGCG 及びその構造類似体であるEGCG 3 " Me, GCGの抗がん作用を顕著に高めることを見出した（図17）。 20

#### 【0063】

##### 実施例18

Naringenin 配糖体であるNaringin が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響

EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に対するNaringin の効果を評価するため、ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を $5 \times 10^4$ cells/mL となるよう調整して 24 well plate に播種し、Naringin及びその構造類似体を終濃度が 5 mM となるよう添加し96 時間培養した。96 時間培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

その結果、NaringinはEGCG の抗がん作用を顕著に高めることを見出した（図18）。 30

#### 【0064】

##### 実施例19

Hesperetin配糖体であるHesperidin が EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に及ぼす影響

EGCG 及びその構造類似体の抗がん作用に対するHesperidin の効果を評価するため、ヒト多発性骨髄腫細胞株U266 を $5 \times 10^4$ cells/mL となるよう調整して 24 well plate に播種し、Hesperidin及びその構造類似体を終濃度が 5 mM となるよう添加し96時間培養した。96 時間培養後、トリパンブルー法にて生細胞数を測定した。

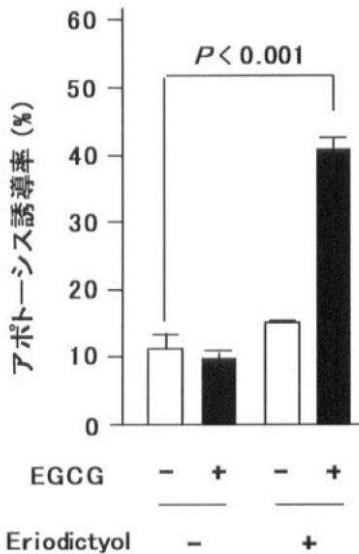
その結果、HesperidinはEGCG 及びその構造類似体であるEGCG 3 " Me, GCGの抗がん作用を顕著に高めることを見出した（図19）。 40

#### 【産業上の利用可能性】

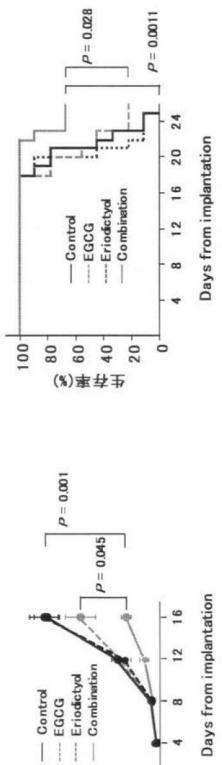
#### 【0065】

本発明の組成物は、抗癌作用、抗炎症作用等を有する機能性食品として有用である。

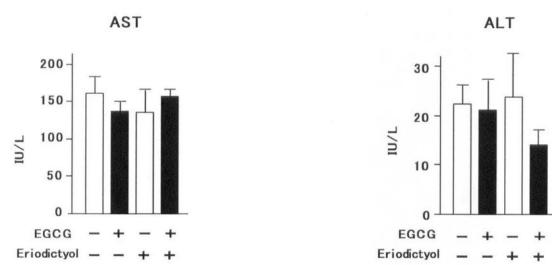
【図1】



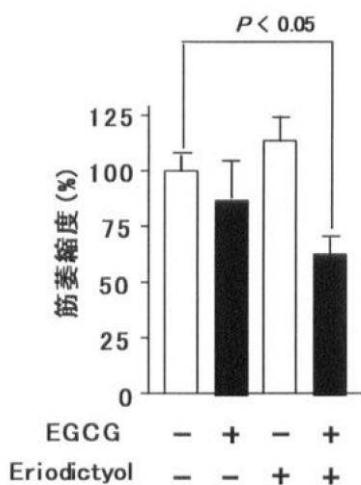
【図2】



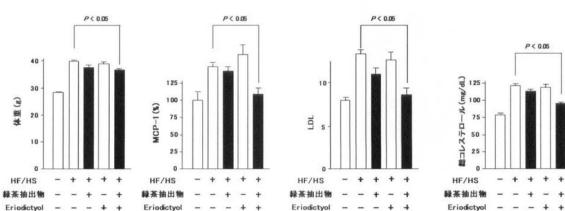
【図3】



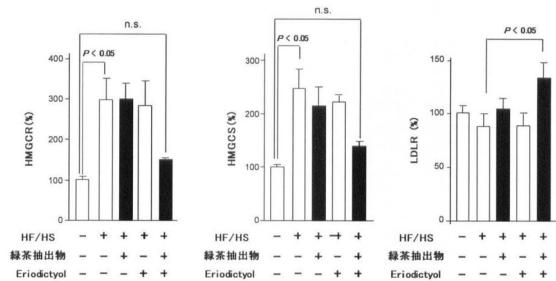
【図4】



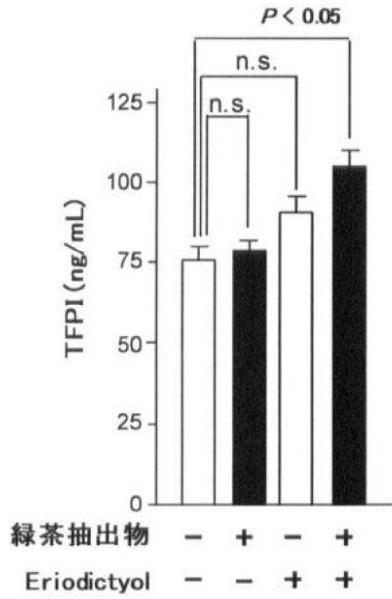
【図5】



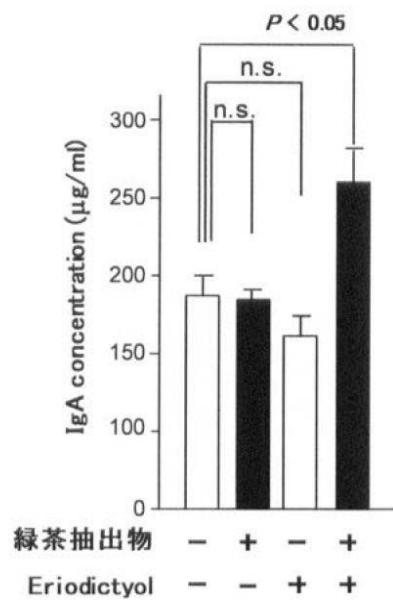
【図6】



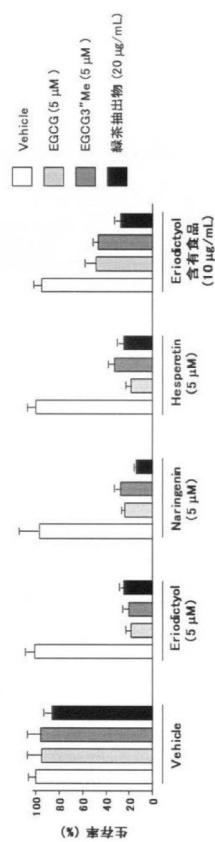
【図7】



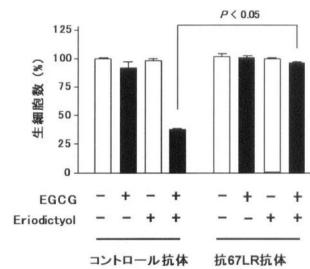
【図8】



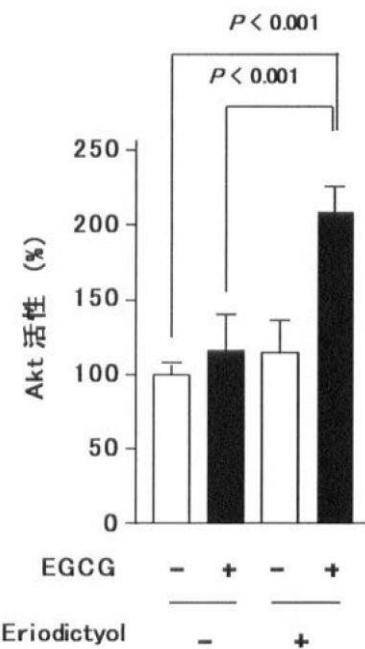
【図9】



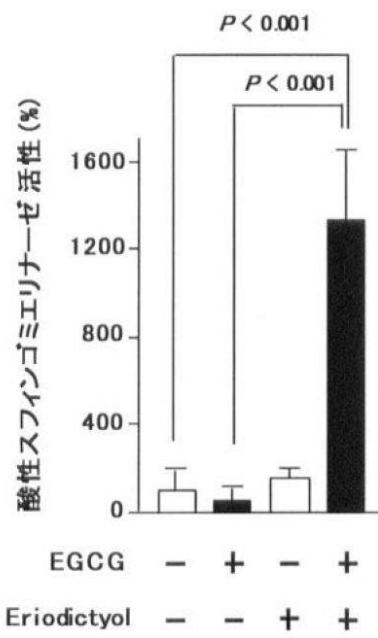
【図10】



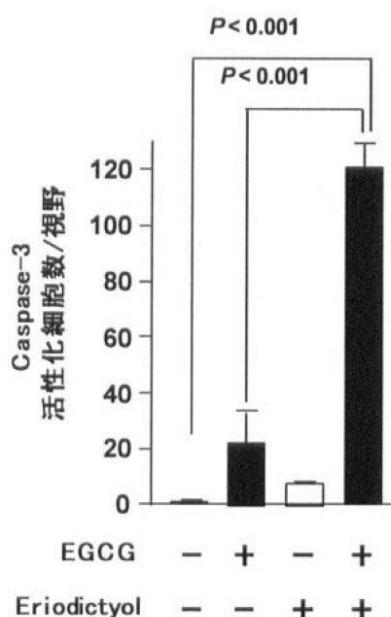
【図11】



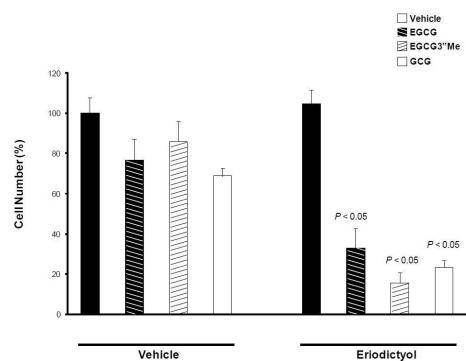
【図12】



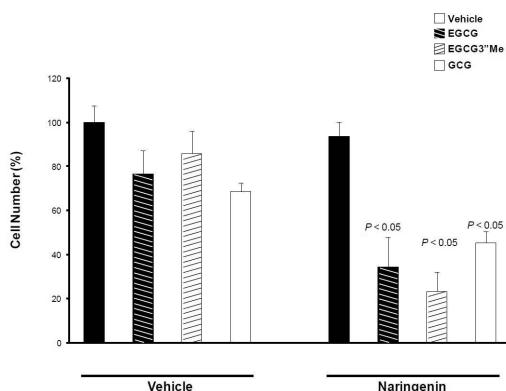
【図13】



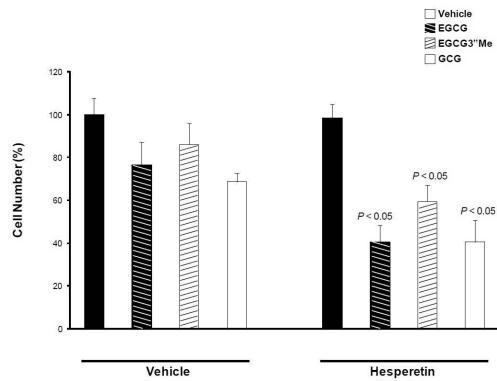
【図14】



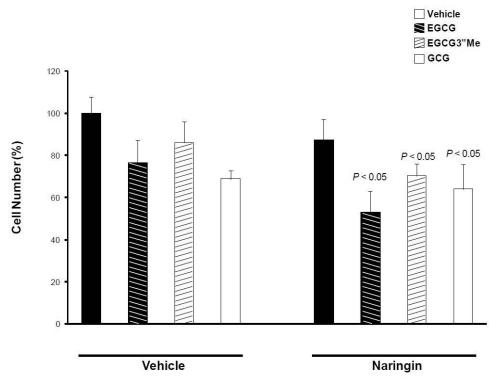
【図15】



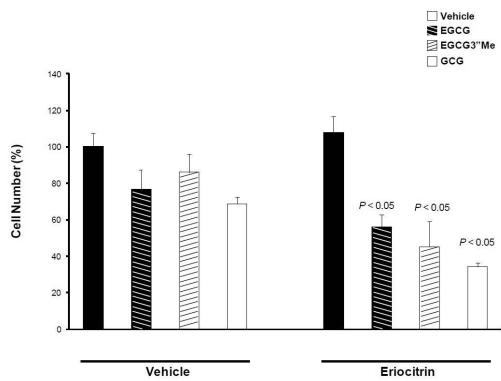
【図16】



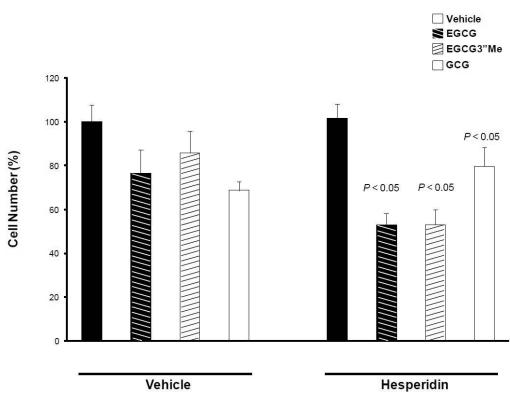
【図18】



【図17】



【図19】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	3/06	(2006.01)
A 6 1 P	7/02	(2006.01)
A 6 1 P	21/00	(2006.01)
A 6 1 P	29/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/04	(2006.01)
		A 6 1 P    3/06
		A 6 1 P    7/02
		A 6 1 P    21/00
		A 6 1 P    29/00
		A 6 1 P    35/00
		A 6 1 P    37/04

## 合議体

審判長 村上 騎見高

審判官 大熊 幸治

審判官 富永 保

## (56)参考文献 特開2009-55905(JP,A)

特開2004-75619(JP,A)

特開2005-75805(JP,A)

特表2003-507486(JP,A)

特開2003-160476(JP,A)

特開平8-283154(JP,A)

特開2020-121990(JP,A)

塩谷昭子他,日本臨牀,67(12),2009,2352-2356

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23L

JST580/JSTPlus/JMEDPlus(JDream3)