

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5831900号
(P5831900)

(45) 発行日 平成27年12月9日(2015. 12.9)

(24) 登録日 平成27年11月6日(2015.11.6)

(51) Int. Cl.	F 1	
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K 36/18	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	

請求項の数 3 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2011-253323 (P2011-253323)	(73) 特許権者	507075923
(22) 出願日	平成23年11月18日(2011.11.18)		学校法人永原学園
(65) 公開番号	特開2013-107843 (P2013-107843A)		佐賀県佐賀市神園3丁目18番15号
(43) 公開日	平成25年6月6日(2013.6.6)	(73) 特許権者	511104417
審査請求日	平成25年9月26日(2013.9.26)		神崎市
特許法第30条第1項適用	平成23年5月20日 (社)日本家政学会発行の「(社)日本家政学会 第63回大会 研究発表要旨集」に発表	(74) 代理人	100099634
特許法第30条第1項適用	平成23年9月16日 「平成23年度 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会 講演要旨集」に発表	(72) 発明者	安田 みどり
前置審査			佐賀県神崎市神崎町尾崎4490-9 学校法人永原学園西九州大学内
		(72) 発明者	日野 まど香
			佐賀県神崎市神崎町尾崎4490-9 学校法人永原学園西九州大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素活性阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

菱科植物の外皮の抽出物を有効成分として含有する酵素活性阻害剤であって、当該酵素が、リパーゼ、またはアンジオテンシンI変換酵素(ACE)であることを特徴とする酵素活性阻害剤。

【請求項2】

菱科植物が、ワビシ(*Trapa japonica*)、オニビシ(*Trapa nantans*)、トウビシ(*Trapa bicornis*)、またはヒメビシ(*Trapa incisa*)であることを特徴とする請求項1に記載の酵素活性阻害剤。

【請求項3】

請求項1または2に記載の酵素活性阻害剤の製造方法であって、菱科植物の外皮を熱水中で攪拌することによって熱水抽出することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生化学の技術分野に属し、特に、植物から抽出された新規な酵素活性阻害剤に関する。

【背景技術】

【0002】

現代社会では、食生活の欧米化や交通手段の発達により、高脂肪な食生活、運動不足等

の偏った生活習慣が慢性的に続きがちであり、脂質異常症、高血圧、糖尿病、肥満症等の生活習慣病の症状を訴える人々が増えてきており社会問題化している。

【0003】

生活習慣病を助長する作用のある酵素の活性を阻害することによって、生活習慣病を予防することや抑制することが期待されている。このような作用のある酵素としては、例えば、 α -アミラーゼ、リパーゼ、およびアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) がよく知られている。

【0004】

α -アミラーゼは、膵液や唾液に含まれ、デンプンやグリコーゲンの α -1, 4 結合を不規則に切断し、多糖ないしオリゴ糖を生み出す酵素 (消化酵素) である。また、リパーゼは、脂質を構成するエステル結合を加水分解する酵素である。また、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) は、血圧調節メカニズムの一つであるレニン-アンジオテンシン系において、アンジオテンシン I から昇圧作用を有するアンジオテンシン II を生成し、同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解するなど、血圧上昇に大きく関係している酵素である。

【0005】

このような酵素の活性を阻害する酵素活性阻害剤は、それぞれの酵素の関係する生活習慣病の予防に資することができる。例えば、生活習慣病の原因としては、体内への過剰なエネルギー摂取や高血圧症があり、 α -アミラーゼ阻害剤は、食物に含まれる糖類の分解を阻害して糖分吸収を抑制することによって、体内への過剰なエネルギー摂取を抑制する作用を有するものである。また、リパーゼ阻害剤は、脂肪吸収を抑制することによって、体内への過剰なエネルギー摂取を抑制する作用を有するものである。また、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害剤は、血圧上昇を抑制することによって、高血圧症を予防する作用を有するものである。

【0006】

生活習慣病に対して優れた予防・抑制作用をもつ酵素活性阻害剤は、これまで多くのものが提案されているが、とりわけ、天然物 (特に植物) を原料とするものは、石油を原料とする合成化合物よりも取扱い時の安全性が高いという利点があり、植物由来の酵素活性阻害剤が盛んに開発されている。

【0007】

植物由来の従来酵素活性阻害剤としては、例えば、ホップより得られるリパーゼ阻害剤 (例えば、特許文献 1 参照) や、小麦ふすま、大麦糠、米糠からのアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤 (例えば、特許文献 2 参照)、黒豆、薩摩芋、桜皮、山ザ子、草豆く、ナツメグ、オレガノ、和山椒、または紫花豆から選択される植物の少なくとも 1 種類を水とアルコールとの混合液で抽出することによって得ることができる α -アミラーゼ活性阻害剤 (例えば、特許文献 3 参照) などがある。

【0008】

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献 1】特許第 4 5 2 1 7 0 3 号公報

【特許文献 2】特許第 4 6 8 6 7 9 2 号公報

【特許文献 3】特許第 4 6 5 7 3 9 6 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

しかし、従来酵素活性阻害剤は、原料として、既に食用や観賞用等の他用途で利用されている植物や、大量には採取できない植物が使用されているために、原料コストが高くなりがちであり、さらに原料を安定的に入手できない場合もあることから、酵素活性阻害剤としての実用化が十分に進んでいないという課題がある。

【0011】

本発明の目的は、如上の課題を解決することができ、新規な植物材料を原料とすることにより高い安全性とともに低コストで製造できる新しいタイプの酵素活性阻害剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、鋭意研究の結果、菱科植物の外皮を利用することにより、上記の目的を達成できることを見出した。

【0013】

かくして、本発明に従えば、菱科植物の外皮の抽出物を有効成分として含有する酵素活性阻害剤であって、当該酵素が、 α -アミラーゼ、リパーゼ、またはアンジオテンシンI変換酵素(ACE)であることを特徴とする酵素活性阻害剤が提供される。菱科植物の外皮は、これまでのところ特段の用途が無く大量に廃棄されていることから、本発明に係る酵素活性阻害剤は、低コストで製造することができるとともに、廃棄資源の有効利用という観点からも有益である。

10

【0014】

本発明の酵素活性阻害剤は、特に生活習慣病に深い関連性がある α -アミラーゼ、リパーゼ、またはアンジオテンシンI変換酵素(ACE)の各酵素に対して、それら酵素の活性を有意に阻害することができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0015】

【図1】本発明に係るヒシ外皮の(a) α -アミラーゼ阻害活性、(b)ACE阻害活性、および(c)リパーゼ阻害活性に関する各々の実験結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明に係る酵素活性阻害剤は、菱科植物の外皮の抽出物を有効成分として含有することを特徴としている。本発明でいう菱科植物とは、菱科(Trapaaceae)に属する植物(通称ヒシ)であれば特に制限されず、例えば、ワビシ(Trapa japonica)、オニビシ(Trapa natans)、トウビシ(Trapa bicornis)、ヒメビシ(Trapa incisa)などが挙げられる。

30

【0017】

ヒシは、池、沼、およびクレークに自生する一年生水草であり、とげのある実が水底に固着して越冬し、春になると芽を出し、秋に果実をつける。ヒシの果実は、デンプン質が多く、茹でて中身を食用とすることや、民間薬やお茶として煎じて飲用され、さらには焼酎の原料としても利用されている。このようなヒシの果実を利用したリパーゼ阻害剤(特開2005-8572号公報参照)は提案されているが、ヒシの外皮については、今のところ利用価値がなく、大部分が廃棄処分されている。一部ではヒシの外皮をアルコール抽出することによって得られる α -グルコシダーゼ阻害剤(特開2009-49946号公報参照)が提案されてはいるものの、特に、生活習慣病の進行に影響を与える α -アミラーゼ、リパーゼ、およびアンジオテンシンI変換酵素(ACE)の各酵素を阻害するようなヒシの外皮由来の酵素阻害剤は知られていない。

40

【0018】

本発明に係る酵素阻害剤の別の特徴は、菱科植物の外皮を熱水中で攪拌することによって熱水抽出することで製造することにある。熱水とは60℃~100℃に加熱された水を指し、例えば90℃とすることができる。また、攪拌する際には、超音波振動を適用することもでき、これによって、抽出が効率的に行なわれる。このように熱水で抽出することによって、従来のアルコール抽出法で抽出された酵素阻害剤のように、残留するアルコールによって生じる人体への刺激(例えば、突き刺すような痛み)やアルコール独特の刺激臭が無く、取扱いが容易であり人体にも優しい酵素阻害剤が得られる。

【0019】

50

このようにして得られた本発明に係る酵素阻害剤は、生活習慣病に深い関連性がある α -アミラーゼ阻害作用、リパーゼ阻害作用、およびアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害作用を有することを特徴としている。本発明に係る酵素阻害剤は、 α -アミラーゼの活性を阻害することで、糖質の吸収を遅延させることができ、血糖値の上昇を抑えることができる。また、リパーゼの活性を阻害することで、脂肪の吸収を遅延させることができ、肥満を防止することができる。さらに、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の活性を阻害することで、血圧の上昇を抑えることができる。このように、本発明に係る酵素阻害剤は、 α -アミラーゼ阻害作用、リパーゼ阻害作用、およびアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害作用により症状が予防または改善されるような疾患 (例えば、糖尿病、肥満、高血圧症) の予防剤又は治療剤の有効成分として用いることができる。

10

【0020】

本発明の酵素阻害剤は、その利用形態は特に限定されず、医薬品、化粧品、食品等の任意の形態であってよい。さらに、本発明の酵素阻害剤は、製薬上許容され得る担体、希釈剤、活性剤、賦形剤、充填剤、浸透促進剤、増粘剤、香料、乳化剤、分散助剤または結合剤等と組み合わせられた医薬組成物として使用することもできる。さらに、本発明の酵素阻害剤は、薬剤という用途に限定されず、例えば、加工食品の原料 (添加剤) として利用することもでき、この場合には、得られた加工食品によって手軽に健康改善できるという利便性がある。

【0021】

以下に、本発明の特徴をさらに具体的に示すために実施例を記すが、本発明は以下の実施例によって制限されるものではない。

20

【0022】

(実施例1)

ヒシ試料および熱水抽出物の調製

原料のヒシとして、野生のワビシ (*Trapa japonica*)、オニビシ (*Trapanatans*) およびトウビシ (*Trapabicornis*) を採取して使用した。それぞれのヒシは水道水にて洗浄後、天日で2~3日間乾燥させ、果実と外皮とに分けた。マイクロ波常温乾燥機にて外皮を乾燥させ、粉碎機にて微粉末とした。比較例として、緑茶も同様に微粉末とした。

【0023】

30

各試料の微粉末10gに対して200mlの熱水(90℃)を加え、30分間攪拌子で攪拌しつつ抽出を行った。遠心分離により上清を回収後、不溶分に純水を加え、再度遠心分離を行い、上清を回収した。上清をガラスフィルター(11G)およびろ紙(No. 6、アドバンテック)にて濾過を行った。これを凍結乾燥し、熱水抽出物の粉末を得た。ワビシ外皮、オニビシ外皮、トウビシ外皮、緑茶の収率は、それぞれ10.0、15.3、14.5、32.3% (w/w) であった。

【0024】

(実施例2)

α -アミラーゼ阻害作用の検証

α -アミラーゼ阻害作用を以下の通り検証した。0.4%可溶性デンプンと5mM塩化カルシウム・2水和物を緩衝液(pH6)に溶かした基質溶液300 μ lにサンプル溶液50 μ lを加えた。酵素溶液として、 α -アミラーゼ(ブタ膵液由来アミラーゼ、シグマ製TypeVI-B)1.3mgを緩衝液(pH6)に20mlに溶解したもの150 μ lを加え、37℃で10分間反応させた。その後、沸騰水中で10分間、加熱することで酵素反応を停止させ、水冷し、2M水酸化ナトリウム水溶液100 μ lと0.5%ジニトロサリチル酸水溶液200 μ lを加え、沸騰水浴中で10分間加熱し、540nmの吸光度を測定した。

40

【0025】

以下の式を用いて α -アミラーゼ阻害活性を求めた。なお、緑茶を比較として用いた。異なる希釈濃度のデータをプロットし、50%の阻害活性を示す濃度(IC₅₀値)を求

50

めた。

【0026】

$$\alpha\text{-アミラーゼ阻害活性 (\%)} = 100 - 100 \times (D - C) / (B - A) \dots (\text{式} 1)$$

(上記式中、Aは対照(水)のブランク(酵素なし)の吸光度、Bは対照(水)の吸光度、Cはサンプルのブランク(酵素なし)の吸光度、Dはサンプルの吸光度を示す。)

【0027】

図1(a)に α -アミラーゼ阻害活性の結果を示す。横軸は濃度(mg/ml)であり、縦軸は阻害率(%)を示す。いずれの種類についても、ヒシの外皮の阻害活性は、緑茶と比較して高く、 α -アミラーゼによる糖質の急激な分解を妨げることができることを示唆している。その効果は、オニビシに比べてワビシやトウビシで高かった。 α -アミラーゼ阻害活性を50%阻害するサンプルの濃度(IC₅₀)およびサンプルの濃度が0.1 mg/mlのときの α -アミラーゼ阻害活性を表1に示す。ヒシの外皮は、糖質分解酵素阻害活性を示したことから、食後血糖値が急激に上昇することを防ぎ、糖尿病の予防や高血糖状態の緩和にもつながることが示された。

10

【0028】

【表1】

サンプル	IC ₅₀ (mg/ml)	阻害活性(%)
ワビシ外皮	0.121	45.1
オニビシ外皮	-	24.4
トウビシ外皮	0.124	44.4
緑茶	-	2.3

20

【0029】

(実施例3)

アンジオテンシンI変換酵素(ACE)の阻害活性の検証

30

アンジオテンシンI変換酵素(ACE)に関する検証は、同仁化学研究所のACE Kit-WSTを用いて行った。ACE Kit-WSTは3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly(3HB-GGG)から切り出されてくる3-Hydroxybutyric acid(3HB)を酵素法により検出するものである。

【0030】

マイクロプレートの各ウェルにサンプル溶液もしくは水を20 μ lずつ入れた。各ウェルに基質溶液を20 μ lずつ加えた。サンプル溶液を入れたウェルに酵素溶液を20 μ lずつ加えた。37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートし、各ウェルに発色剤を200 μ lずつ加えた。室温で10分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定した。

40

【0031】

ACE阻害活性値(阻害率%)を下記の計算式により求めた。なお、緑茶も比較として用いた。異なる希釈濃度のデータをプロットし、50%の阻害活性を示す濃度(IC₅₀値)を求めた。

【0032】

$$\text{ACE阻害活性 (\%)} = 100 - 100 \times (D - C) / (B - A) \dots (\text{式} 2)$$

(上記式中、Aは対照(水)のブランク(酵素なし)の吸光度、Bは対照(水)の吸光度、Cはサンプルのブランク(酵素なし)の吸光度、Dはサンプルの吸光度を示す。)

【0033】

ACEの阻害活性に関する結果を図1(b)に示す。横軸は濃度(mg/ml)であり

50

、縦軸は阻害率 (%) を示す。また、ACE 阻害活性を 50% 阻害するサンプルの濃度 (IC₅₀) およびサンプルの濃度が 0.4 mg/ml のときの ACE 阻害活性を表 2 に示す。ヒシの外皮は、緑茶に比べて高い ACE 阻害活性を示した。ACE 阻害活性に関しては、3 種類のヒシにあまり違いは見られなかった。このような結果から、ヒシの外皮は、血圧上昇を抑制し、高血圧を予防できる食品素材として有益であることが示された。

【0034】

【表 2】

サンプル	IC ₅₀ (mg/ml)	阻害率(%)
ワビシ外皮	0.106	91.9
オニビシ外皮	0.134	88.5
トウビシ外皮	0.119	85.9
緑茶	0.188	70.1

10

【0035】

(実施例 4)

リパーゼ阻害活性の検証

リパーゼ阻害活性は、リパーゼキット S (大日本住友製薬) を用いて確認した。その原理は次のとおりである。リパーゼは、基質である三酪酸ジメチルカプロール (BALB) を分解してジメチルカプロール (BAL) を生成させる。生成した BAL は DTNB と定量的に反応し、黄色の 5-チオ-2-ニトロ安息香酸 (TNB) アニオンを生成する。反応停止液を加えることにより、リパーゼの反応を停止すると同時に、反応混液を清澄にする。呈色の強さ (吸光度) は検体中のリパーゼ活性を反映するので、吸光度から直接リパーゼ活性を算出することができる。これを利用して、リパーゼ活性の阻害活性を調べた。

20

【0036】

マイクロチューブに、サンプル溶液または蒸留水 (コントロール) 100 μl を入れ、酵素液 {ブタ膵リパーゼ (シグマ、Type II) を 0.05 mg/ml となるよう、トリス塩酸 (pH 7.5) に溶解し、3000 rpm、4℃ で 10 分間遠心分離した上清} を 30 μl 加えた。リパーゼキット S (大日本住友製薬) の発色液を 400 μl 加え、30℃ で 5 分間インキュベートした。基質液として、リパーゼキット S (大日本住友製薬) の基質液 {6.69 mg/ml 三酪酸ジメチルカプロール (BALB) + 5.73 mg/ml ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)} を 40 μl 加え、さらに、遮光下、30℃ で 30 分間インキュベートした。リパーゼキット S (大日本住友製薬) の反応停止剤を 800 μl 加え、412 nm の吸光度を測定した。

30

【0037】

対照は、サンプルの代わりに水を用いて同様の操作をしたもので、サンプルまたは対照のブランクは、サンプルまたは水を入れて、酵素液、発色液を添加して 30 分反応させ、反応停止剤を入れて、最後に基質液を添加したものである。各希釈濃度のサンプル溶液のデータをプロットし、50% の阻害活性を示す濃度 (IC₅₀ 値) を求めた。なお、緑茶も比較例として用いた。リパーゼ阻害活性を下記の計算式により求めた。

40

【0038】

リパーゼ阻害率 (%) = 100 - 100 × (D - C) / (B - A) … (式 3)

(上記式中、A は対照 (水) のブランク (酵素なし) の吸光度、B は対照 (水) の吸光度、C はサンプルのブランク (酵素なし) の吸光度、D はサンプルの吸光度を示す。)

【0039】

ヒシの外皮のリパーゼの阻害活性を図 1 (c) に示す。横軸は濃度 (mg/ml) であ

50

り、縦軸は阻害率 (%) を示す。また、リパーゼ阻害活性を 50% 阻害するサンプルの濃度 (IC_{50}) およびサンプルの濃度が 0.2 mg/ml のときのリパーゼ阻害活性を表 3 に示す。ヒシの外皮のリパーゼ阻害活性は、緑茶よりも高くなった。ヒシの中でもトウビシのリパーゼ阻害活性が特に高い値を示した。このようにヒシの外皮から得られた抽出物はリパーゼを阻害することが判明したことから、脂肪の消化・吸収を抑制して血中脂質を低下させ、抗肥満作用が得られることが示された。

【0040】

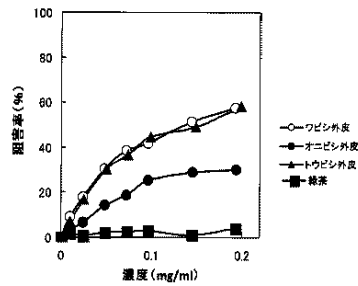
【表 3】

サンプル	$IC_{50}(\text{mg/ml})$	阻害活性(%)
ワビシ外皮	0.143	64.3
オニビシ外皮	0.163	58.7
トウビシ外皮	0.057	87.5
緑茶	0.214	47.2

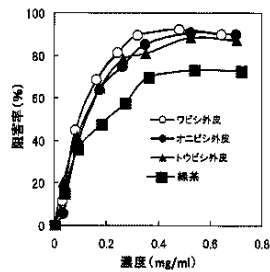
10

【図 1】

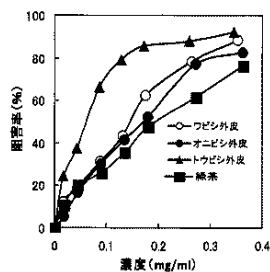
(a)



(b)



(c)



フロントページの続き

(72)発明者 宮山 瞳

佐賀県神崎市神崎町尾崎4490-9 学校法人永原学園西九州大学内

(72)発明者 武富 和美

佐賀県佐賀市神園3丁目18番15号 学校法人永原学園西九州大学内

(72)発明者 大城 あゆみ

佐賀県佐賀市神園3丁目18番15号 学校法人永原学園西九州大学内

審査官 鶴見 秀紀

(56)参考文献 特開2010-202580(JP, A)

安田みどり 他, ヒシ外皮ポリフェノールの糖質分解酵素阻害活性, 日本家政学会大会研究発表要旨集, 2013年 5月 1日, Vol.65th, Page.151

安田みどり 他, ヒシポリフェノールの化学的特性と生理機能, 日本家政学会九州支部大会研究発表要旨集, 2013年 9月, Vol.60th, Page.19

安田みどり 他, ヒシ外皮中のポリフェノールによる消化酵素阻害活性, 日本農芸化学会西日本支部大会およびシンポジウム講演要旨集, 2012年, Vol.2012, Page.70

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 36/00-36/9068

A61P 3/04

A61P 3/06

A61P 9/12

A61P 43/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)