

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5311364号
(P5311364)

(45) 発行日 平成25年10月9日(2013.10.9)

(24) 登録日 平成25年7月12日(2013.7.12)

(51) Int.Cl.		F I		
A 6 1 K 36/18	(2006.01)	A 6 1 K 35/78		C
A 6 1 K 36/00	(2006.01)	A 6 1 K 35/78		Y
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00		

請求項の数 4 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2007-193383 (P2007-193383)	(73) 特許権者	504147243
(22) 出願日	平成19年7月25日(2007.7.25)		国立大学法人 岡山大学
(65) 公開番号	特開2009-29732 (P2009-29732A)		岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(43) 公開日	平成21年2月12日(2009.2.12)	(74) 代理人	100080791
審査請求日	平成22年5月21日(2010.5.21)		弁理士 高島 一
特許法第30条第1項適用	平成19年3月28日~30日 富山大学(富山県)において開催された、社団法人 日本薬学会主催の日本薬学会第127年会における発表番号30S-am01「ヤマブドウ成分による抗炎症、抗発がんプロモーション作用(平成19年2月1日、日本薬学会 年会 Webページ「http://nenkai.pharm.or.jp/127/pc/imulti_result.asp」に要旨を掲載)にて発表	(72) 発明者	小林 佐賀恵 岡山県岡山市津島中1-1-1 国立大学法人 岡山大学内
		審査官	金子 亜希

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗炎症用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

有効成分として、ヤマブドウ果実のヘキサン不溶物であって且つ酢酸エチル抽出物を含有する抗炎症用組成物。

【請求項2】

炎症が皮膚炎である請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

抗炎症用医薬品である請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

ヤマブドウ果汁からヘキサン抽出画分を除去する工程、および酢酸エチルで抽出する工程を含む抗炎症用組成物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヤマブドウ果汁、ヤマブドウ果汁の発酵産物、ヤマブドウのヘキサン不溶物またはヤマブドウの高極性有機溶媒抽出物を含有する抗炎症用組成物およびその製造方法に関する。また、本発明はヤマブドウのヘキサン不溶物またはヤマブドウの高極性有機溶媒抽出物を含有する抗変異原用組成物およびその製造法に関する。

【背景技術】

【0002】

健康上の問題で最も多い症状は、男性で腰痛（４１０万人）、次いで肩こり（２９０万人）、女性で肩こり（６１５万人）、次いで腰痛（５４０万人）、関節痛（３６４万人）（厚生省「平成１６年国民生活基礎調査」による）など、いずれも炎症症状である。また慢性の炎症は発がんの原因のひとつである。

一方、食用果実の抗炎症作用の研究は少なく、ヤマブドウについての抗炎症作用については知られていない。

ヤマブドウは、ブドウ科ブドウ属に属するものであり、一般にジュース・ソースなどの加工食品や染料などとして使用されてきた。

本発明者は、ヤマブドウのワインピネガーを開発し、それが発癌抑制作用を有することを開示した（特許文献１）。

【特許文献１】特開２００６－３２５４４９

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】

本発明の課題は、ヤマブドウ果汁、その由来物の新規用途を提供することである。

また、当該用途に対して特に有効な成分を豊富に含む抽出物を製造する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【０００４】

本発明者は、上記課題に鑑み、ヤマブドウ（特に蒜山ヤマブドウ）の果汁、その発酵産物、ヤマブドウ果実のヘキサン不溶物及びヤマブドウ果実の極性の高い有機溶媒抽出物の生理活性に注目して研究を重ねてきたところ、これらが抗炎症作用を有することを見出した。また、ヤマブドウ果実のヘキサン不溶物および極性の高い有機溶媒抽出物が優れた抗変異原性を有することを見出した。

本発明はかかる新知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【０００５】

即ち、本発明は下記の通りである。

（１）ヤマブドウ果汁、ヤマブドウ果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヤマブドウ果実のヘキサン不溶物を含有する、抗炎症用組成物。

（２）炎症が皮膚炎である（１）に記載の組成物。

（３）高極性有機溶媒抽出物が、酢酸エチル抽出物である（１）または（２）に記載の組成物。

（４）高極性有機溶媒抽出物が、ヘキサン不溶物であって、且つ酢酸エチル抽出物である（１）～（３）のいずれかに記載の組成物。

（５）医薬品である（１）～（４）のいずれかに記載の組成物。

（６）食品である（１）～（４）のいずれかに記載の組成物。

（７）食品が保健機能食品又はダイエタリーサプリメントである、（６）に記載の組成物。

（８）保健機能食品が特定保健用食品又は栄養機能食品である、（７）に記載の組成物。

（９）化粧品である（１）～（４）のいずれかに記載の組成物。

（１０）ヤマブドウ果汁を酢酸エチルで抽出する工程を含む抗炎症用組成物の製造方法。

（１１）ヤマブドウ果汁からヘキサン抽出画分を除去する工程、および酢酸エチルで抽出する工程を含む抗炎症用組成物の製造方法。

（１２）ヤマブドウ果汁、ヤマブドウ果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヤマブドウ果実のヘキサン不溶物を含有し、抗炎症作用を有するものであることを特徴とし、抗炎症のために用いられる旨の表示を付した食品。

（１３）ヤマブドウ果汁、ヤマブドウ果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヤマブドウ果実のヘキサン不溶物を含有し、抗炎症作用を有するものであることを特徴とし、抗炎症のために用いられる旨の表示を付した化粧品。

（１４）ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヘキサン不溶物を含有する、抗変異原用組成物。

10

20

30

40

50

- (15) 高極性有機溶媒抽出物が、酢酸エチル抽出物である(14)記載の組成物。
- (16) 高極性有機溶媒抽出物が、ヘキサン不溶物であって、且つ酢酸エチル抽出物である(14)または(15)記載の組成物。
- (17) 医薬品である(14)～(16)のいずれかに記載の組成物。
- (18) 食品である(14)～(16)のいずれかに記載の組成物。
- (19) 食品が保健機能食品又はダイエタリーサプリメントである、(18)記載の組成物。
- (20) 保健機能食品が特定保健用食品又は栄養機能食品である、(19)記載の組成物。
- (21) 化粧品である(14)～(16)のいずれかに記載の組成物。 10
- (22) ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヘキサン不溶物を含有し、抗変異原性を有するものであることを特徴とし、抗変異原のために用いられる旨の表示を付した食品。
- (23) ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヘキサン不溶物を含有し、抗変異原性を有するものであることを特徴とし、抗変異原のために用いられる旨の表示を付した化粧品。
- (24) ヤマブドウ果汁を酢酸エチルで抽出する工程を含む抗変異原用組成物の製造方法。
- (25) ヤマブドウ果汁からヘキサン抽出画分を除去する工程、および酢酸エチルで抽出する工程を含む抗変異原用組成物の製造方法。 20

【発明の効果】

【0006】

本発明の、ヤマブドウ由来成分を含む抗炎症用組成物および抗変異原用組成物は、それぞれ優れた作用を有する。さらに、本発明の組成物は、ヤマブドウ果実という天然物由来であるため副作用も殆どなく、安全に使用することができる。また、ヤマブドウ果実からの抽出物の製造方法も煩雑な工程を経る必要がなく、工業的にも有意である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】 30

本発明の抗炎症組成物は、ヤマブドウ果汁、該果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヘキサン不溶物を有効成分とするが、これらの有効成分を2種以上含有していてもよい。

【0009】

まず、本発明は抗炎症用組成物であり、ここに抗炎症とは、炎症の予防及び治療ないしは症状改善を意味する。

炎症とは、感染、物理的刺激、化学的刺激、アレルギー反応等の侵襲に対し、免疫系が応答する種々の反応の総称である。

一般に炎症は外来刺激などの外因性要因と生体側の異常、体質的要素などの内因性要因との相互作用によって発症する。また炎症を起こしている部位によって、例えば腰や肩の筋肉等または関節に炎症を起こしている場合には腰痛や肩こりまたは関節炎といった症状(疾患)となって顕れ、皮膚や粘膜に炎症を起こしている場合には皮膚炎や口内炎などの疾患として顕れる。 40

【0010】

本発明の組成物は抗炎症作用を有するので、具体的には皮膚炎、腰痛、肩こり、掻痒などに用いられ、好ましくは皮膚炎などの予防、治療、症状の改善に用いられる。皮膚炎の発症原因は、外来刺激としては、種々の化学物質、化粧品、金属、洗剤、薬物をはじめ植物、微生物、昆虫などの生物学的因子、日光、温熱、寒冷、乾燥などの物理学的因子などが挙げられる。生体側の因子としては、発汗、皮脂の分泌異常、角化異常など局所的異常の他に、アトピー性素因、感染病巣、消化管障害、腎障害、内分泌障害などの全身的異常 50

も関連する。皮膚炎は発生機序としては、アレルギー性接触皮膚炎などのアレルギーと一時刺激性接触皮膚炎などの非アレルギーに大別される。本発明の組成物はいずれにも適用できるが、非アレルギー性の皮膚炎に好ましく用いられる。

炎症の症状としては、通常、発赤、熱感、発痛、腫脹、機能障害（例：掻痒、疼痛）が挙げられる。

本発明の組成物はこれらの疾病・症状の予防、治療、症状の改善に用いることができる。

【0011】

本発明において、ヤマブドウとしてはブドウ科（ブドウ科Vitaceae，ブドウ属Vitis，種名 coignetiae）に属するものが用いられ、具体的には蒜山ヤマブドウ（学名：Vitis coignetiae）が好適なものとして挙げられる。

10

【0012】

本発明において、ヤマブドウ果汁としては、好ましくはヤマブドウ果実の果肉および果皮から得られるものが使用される。該果汁は、通常圧搾などの手段によって得ることができるがこれに限らない。また冷凍したヤマブドウから得られる果汁を使用してもよい。

【0013】

本発明において、ヤマブドウ果汁の発酵産物としては、ヤマブドウワイン、ヤマブドウワインビネガーが挙げられ、好ましくはヤマブドウワインビネガーが挙げられる。

【0014】

本発明において、例えばヤマブドウワインは下記製造法にて説明するアルコール濃度のものが好ましく、ヤマブドウワインビネガーは、例えば下記の酢酸濃度のものが好ましい。

20

基本的には、本発明の発酵産物は常法に基づいて製造することができる。好ましくは、ヤマブドウの果実を通常10～80、好ましくは20～60程度、より好ましくは30～50程度に加熱してから果汁を搾汁し、これに、例えばアルコール発酵酵母や酵素等を加えて醸造し、アルコール濃度が通常3～30%、好ましくは5～20%、より好ましくは約10%とすることによって、ヤマブドウワインが得られる。ヤマブドウワインに、例えば酢酸発酵酵母を加え、酢酸濃度が通常3～10%、好ましくは6%程度になるまで発酵させ、必要に応じて濾過を行いヤマブドウワインビネガーが製造される。

【0015】

本発明におけるヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物とは、極性の高い有機溶媒によるヤマブドウ果実の抽出画分をいう。高極性有機溶媒抽出物における有機溶媒としては、その極性が4～10、好ましくは4～6、より好ましくは4～5.5のものが挙げられる。具体的には酢酸エチル、メタノールなどが挙げられる。

30

【0016】

特に、好適な高極性有機溶媒抽出物としては、ヘキサン不溶物であって、且つ酢酸エチル抽出物が挙げられる。すなわち、ヤマブドウ果実を後述のヘキサン処理に付してヘキサン抽出画分を除去した後の酢酸エチル抽出物等が挙げられるが、抽出する順序はこれに限られない。具体的には、当該抽出物は、ヤマブドウ果実をそのまま、あるいは圧搾したものをヘキサン処理して、ヘキサン層と水層に分離させ、水層を酢酸エチル処理して得られた酢酸エチル抽出画分が挙げられる。当該酢酸エチル抽出画分を乾燥、例えば減圧乾燥するなど自体公知の方法により、水分及び揮発性成分を除いて、粉末状にしたものも高極性有機溶媒抽出物として使用することができる。

40

【0017】

本発明におけるヘキサン不溶物は、ヘキサン処理によるヘキサン不溶性画分をいう。ヘキサン処理においては、ヤマブドウ果汁100重量部に対して、通常ヘキサン200～400重量部、好ましくは300～400重量部で抽出する。抽出する回数は特に限定されないが、当該量のヘキサンによって、3～4回抽出することが好ましい。また抽出温度は4～30が挙げられ、4～20が好ましい。該ヘキサン処理により得られたヘキサン不溶性画分、すなわち水層からヘキサン不溶物が得られる。

50

【0018】

また、上記ヘキサン処理におけるヘキサン不溶性画分を高極性有機溶媒、例えば酢酸エチルで処理する。酢酸エチルなどの高極性有機溶媒処理においては、水層100重量部に対して酢酸エチル200～400重量部、好ましくは300～400重量部で抽出する。抽出する回数は特に限定されないが、当該量の酢酸エチルによって、3～4回抽出することが好ましい。また抽出温度は、通常4～30であり、4～20が好ましい。

【0019】

さらに本発明の抗変異原用組成物は、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒による抽出物またはヘキサン不溶物を有効成分として含有する。該抗変異原用組成物としては、ヤマブドウ果実をヘキサン処理してヘキサン層を除いたもの（すなわち、ヘキサン不溶性画分）で、且つ酢酸エチルで抽出した抽出物がより好ましい。

10

【0020】

変異原性とは、細胞に突然変異を起こさせる性質をいい、かかる突然変異を起こさせる物質のことを変異原性物質（変異原）という。変異原性物質は細胞に入りDNAと結合したり、DNAを切断したりしてDNAの塩基配列を変化させたりするものであり、ガンの発生の原因ともなりうる。

【0021】

ところで、現在の生活環境では変異原性物質は避けることは困難であり、常にガン発生原因の中で暮らしていかなければならない。しかし変異原性物質がヒトの体に入っても変異原性を抑制あるいは阻止できればガン発生の危険性も低いものとなる。

20

本発明の抗変異原用組成物は、変異原性物質に対して、その変異原性を抑制または阻止するものである。

【0022】

本発明における抗炎症用組成物および抗変異原用組成物の投与対象としては、例えば、ヒトをはじめウシ、ウマ、イヌ、マウス、ラット等の哺乳動物などが挙げられる。

【0023】

本発明における抗炎症用組成物、抗変異原用組成物は、ヤマブドウ果実由来の成分を、そのまま、もしくは乾燥させた粉末状で含有する。その投与方法は、例えば、経口投与、外用投与、経直腸投与（坐薬）、点眼等の非経口投与でも良く、経口投与、外用投与であることが好ましい。

30

【0024】

本発明の組成物を経口投与する場合の有効成分であるヤマブドウ果汁由来成分の投与量は、抗炎症用、抗変異原用のいずれもほぼ同量でよく、投与する患者の性別、症状、年齢、投与方法によって異なるが、通常、成人（体重60kg）1日あたりの投与量が全量で、乾燥重量として1g～250gであり、好ましくは1g～100gである。上記1日あたりの量を一度にもしくは数回に分けて投与することができる。食前、食後、食間を問わない。また投与期間は特に限定されない。

【0025】

なお該果汁の発酵産物の場合は通常、成人（体重60kg）1日あたりの投与量が全量で、乾燥重量として100mg～1000mgである。

40

ヤマブドウ果実の有機溶媒抽出物（乾燥重量として）の場合、上記ヤマブドウ果汁の投与量の1/100～1/10、好ましくは1/30～1/15程度を投与することができる。

ヘキサン不溶物（乾燥重量として）の場合、上記ヤマブドウ果汁の投与量の1/2～1/5程度を投与することができる。

さらに炎症の予防のために投与する場合は、乾燥重量として、上記ヤマブドウ果汁の量の1/2～1/5程度を長期間投与することも可能である。

【0026】

本発明の組成物の経口投与用の形態としては、顆粒剤、細粒剤、錠剤、散剤、カプセル剤、チュアブル剤、液剤、懸濁剤など、また注射用の形態としては静脈直接注入用、点滴

50

投与用などの自体既知のものを採用することができる。これらは、常法により製剤化することができ、製剤上の必要に応じて、例えば、乳糖、ブドウ糖、D-マンニトール、でんぷん、結晶セルロース、炭酸カルシウム、カオリン、ゼラチン等の担体や、溶剤、溶解補助剤、等張化剤等の通常の添加剤を適宜配合することができる。

【0027】

本発明の各々の組成物を外用として投与する場合、投与する対象の症状、目的、年齢、投与方法等によって異なるが、投与量は成人1日当たり、有効成分であるヤマブドウ果汁（乾燥重量として）を通常 $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 程度、好ましく $100\mu\text{g}/\text{kg} \sim 1\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ 程度である。適用する回数は特に制限されないが、通常1日1～5回、好ましくは3～5回である。

10

なお該果汁の発酵産物（乾燥重量として）の場合は、通常上記ヤマブドウ果汁とほぼ同じである。

ヤマブドウ果実の有機溶媒抽出物（乾燥重量として）の場合、上記ヤマブドウ果汁の投与量の $1/100 \sim 1/10$ 、好ましくは $1/30 \sim 1/15$ 程度を投与することができる。

ヘキサン不溶物（乾燥重量として）の場合、上記ヤマブドウ果汁の投与量の $1/2 \sim 1/5$ 程度を投与することができる。

さらに炎症の予防のために投与する場合は、乾燥重量として、上記ヤマブドウ果汁の量の $1/2 \sim 1/10$ 程度を長期間投与することも可能である。

【0028】

20

上記外用は、必要に応じて公知の添加剤などを混合して常法により、クリーム剤、液剤、ローション剤、乳剤、チンキ剤、軟膏剤、水性ゲル剤、油性ゲル剤、エアゾール剤、パウダー剤、シャンプー、石鹸などの外用製剤等とすることができる。これらの剤型は、医薬あるいは化粧品または医薬部外品等とすることができる。

【0029】

上記外用剤には、上記成分の他に水溶性成分、油性成分、粉末成分、界面活性剤、高分子成分、増粘剤、粘着性改良剤、被膜形成剤、pH調整剤、抗酸化剤、防腐剤、保存剤、賦形剤、保湿剤、皮膚保護剤、清涼化剤、香料、着色剤、キレート剤、潤沢剤、鎮痒剤、血行促進剤、収斂剤、組織修復促進剤、制汗剤、植物抽出成分、動物抽出成分、化粧品や医薬部外品等に必要な添加剤等を必要に応じて配合することができる。

30

【0030】

本発明の組成物中のヤマブドウ果汁（乾燥重量として）の含有量は、通常1～100重量%であり、好ましくは10～90重量%であり、さらに好ましくは20～80重量%、特に好ましくは20～50重量%である。該果汁の発酵産物（乾燥重量として）の場合は、前記ヤマブドウ果汁と同じである。なおヤマブドウ果実の有機溶媒抽出物（乾燥重量として）の場合、通常1～100重量%であり、好ましくは10～90重量%であり、さらに好ましくは20～50重量%である。また、ヘキサン不溶物（乾燥重量として）の場合、通常1～100重量%である。なお本発明の組成物においては、ヤマブドウ由来成分のみからなる組成物であってもかまわない。

【0031】

40

本発明においては、ヤマブドウ果汁、該果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物またはヘキサン不溶物を含有し、炎症の予防・治療または改善作用を有するものであることを特徴とし、炎症の予防・治療または改善のために用いられる旨の表示を付した食品を提供する。

また、本発明においてはヤマブドウ果実のヘキサン不溶物または高極性有機溶媒抽出物を含有し、抗変異原性を有するものであることを特徴とし、抗変異原のために用いられる旨の表示を付した食品を提供する。

【0032】

本発明における食品は、本発明のヤマブドウ果汁、該果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物、または該果汁のヘキサン不溶性画分を含む一般的な食品形態で

50

あれば如何なるものでも良い。例えば、それ自体、またはそれに適当な風味を加えてドリンク剤、例えば清涼飲料、粉末飲料とすることもできる。具体的には、ジュース、牛乳、菓子、ゼリー等に混ぜて飲食することができる。また、このような食品を保健機能食品として提供することも可能である。この保健機能食品には、炎症の予防および改善などの本発明の用途に用いるものであるという表示を付した飲食品、特に、特定保健用食品、栄養機能食品なども含まれる。

【0033】

さらに、本発明における食品を濃厚流動食や、食品補助剤として利用することも可能である。食品補助剤として使用する場合、例えば錠剤、カプセル、散剤、顆粒、懸濁剤、チュアブル剤、シロップ剤等の形態に調製することができる。本発明における食品補助剤とは、食品として摂取されるもの以外に栄養を補助する目的で摂取されるものをいい、栄養補助剤、サプリメントなどもこれに含まれる。

10

【0034】

本発明におけるヤマブドウ果汁、該果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒抽出物、またはヘキサン不溶物を食品として摂取する場合、成人(体重60kg)1日当たりのヤマブドウ果汁(乾燥重量として)の摂取量は、通常1g~250g程度、好ましくは1g~100g程度である。該果汁の発酵産物(乾燥重量として)の場合は、通常1g~250g程度、好ましくは1g~100g程度である。なおヤマブドウ果実の有機溶媒抽出物(乾燥重量として)の場合、上記ヤマブドウ果汁の摂取量の1/10~1/30程度を摂取することができる。また、ヘキサン不溶画分抽出物(乾燥重量として)の場合、上記ヤマブドウ果汁の摂取量の1/10~1/30程度を摂取することができる。

20

上記の量を1日1回から数回に分けて摂取することが好ましい。この場合、一日あたり摂取量、または1回あたりの摂取量を1単位包装とすることができる。

【0035】

本発明における食品中のヤマブドウ果汁(乾燥重量として)の含有量は、通常1~100重量%であり、好ましくは10~90重量%であり、さらに好ましくは20~80重量%である。該果汁の発酵産物(乾燥重量として)の場合は、前記ヤマブドウ果汁と同じである。なおヤマブドウ果実の有機溶媒抽出物(乾燥重量として)の場合、通常1~100重量%であり、好ましくは10~90重量%であり、さらに好ましくは20~50重量%である。また、ヘキサン不溶物(乾燥重量として)の場合、通常1~100重量%である。

30

なお本発明の食品においては、ヤマブドウ由来成分のみからなる食品であってもかまわない。

【0036】

ヤマブドウ果汁、該果汁の発酵産物、ヤマブドウ果実の高極性有機溶媒、またはヘキサン不溶物を含有し、抗炎症作用を有するものであることを特徴とし、抗炎症のために用いられる旨の表示を付した化粧品を提供する。化粧品中の有効成分としてのヤマブドウの含量等は、上記外用剤でのべたものと同様である。

本発明における化粧品は、日焼けなどの炎症に対して用いることができる。

また、本発明においてはヤマブドウ果汁のヘキサン不溶物またはその高極性有機溶媒抽出物を含有し、抗変異原性を有するものであることを特徴とし、抗変異原性のために用いられる旨の表示を付した化粧品を提供する。

40

【0037】

本発明においては、ヤマブドウ果汁を酢酸エチルで抽出する工程を含む抗炎症用組成物の製造方法を提供する。好ましくはさらにヘキサン抽出画分を除去する工程を含む。酢酸エチルで抽出することにより少量で有効性を発揮しうる成分をえることが出来るという効果が得られる。当該抽出・製造方法は組成物のところで説明した手法にて製造することができる。

より具体的には、ヤマブドウ果実をそのまま、または圧搾等により粉碎したものに、果実100重量部あたりヘキサン100~500重量部を加えて抽出し、ヘキサン層を除去し、水層をさらに酢酸エチルで抽出する工程を含む製造方法である。酢酸エチルの量は

50

残渣 1 重量部に対して 1 ~ 10 重量部、好ましくは 3 ~ 5 重量部を加えて抽出する。さらにこの操作を 3 ~ 5 回繰り返すことが好ましい。さらに抽出温度は 5 ~ 30、好ましくは 5 ~ 20 である。

なお酢酸エチルで抽出した後に、該抽出物をヘキサン抽出・ヘキサン層除去に供してもよい。

【0038】

本発明において、ヤマブドウ果汁を含有する組成物は抗発癌用組成物としても利用できる。癌の種類は限定されないが、皮膚腫瘍等に好適である。

【実施例】

【0039】

以下、実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、実施例は本発明の説明のために記載するものであり、本発明を限定するものではない。

【0040】

実施例 1

<ヤマブドウ果汁の調製>

ヤマブドウを樹から果実を収穫し、枝を取るために除梗破碎する。これを搾汁機（エアープレス）にて処理し、95 にてドラム缶に詰め、2 ~ 3 ヶ月間保存して、酒石酸結晶を析出させ、酒袋で絞ることによってヤマブドウ果汁を得る。

【0041】

実施例 2

<発酵産物の調製>

完熟した蒜山ヤマブドウの果実（果皮、果肉、種子）から搾汁した果汁 60 L を備前焼容器に仕込み、室温（約 20）でワイン酵母としてラルバン 71 B を 7.2 g 加えてアルコール発酵を行った。発酵液槽内部の温度は 25 ~ 28 に調整した。アルコールが 6% に達した段階で純粋培養した産幕酵母バストリアヌス 100 cm² を表面移植し、酵母菌膜の途中移植を行って、発酵を促進した。これらの操作によって、1 週間のアルコール発酵とそれに続く 2 ヶ月の酢酸発酵で、総酸含量が約 6%（酢酸含量は約 5.1%）の発酵産物を得た。この発酵産物を凍結させ、減圧乾燥機で水分および酢酸などの揮発成分を取り除き、凍結乾燥物 11 g を得た。

【0042】

実施例 3

<ヤマブドウ抽出物の調製>

ヤマブドウ抽出物は図 1 にしたがって得た。ヤマブドウ果実を搾汁機器にかけて絞り、圧搾搾汁 100 mL（100 mL を凍結乾燥させると乾燥重量 15.1 g の固形物が残る）を分液ロートに入れ、ヘキサン 300 mL を加えて振とう攪拌後、ヘキサン層と水層とに分離させた。これを 2 回繰り返し、ヘキサン層を除いた。残った水層に酢酸エチル 300 mL を加えて振とう攪拌を 3 回繰り返し、酢酸エチル層と水層とに分離させ、酢酸エチル層を別容器に分けた。この酢酸エチル画分から、減圧乾燥機を用いて水分及び揮発成分を除き、粉末状の乾燥物 0.8 g を得た。

【0043】

実験例 1

<外用によるヤマブドウ果汁の抗炎症効果の評価>

マウス（ICR マウス、メス 6 週齢、又は SENCAR マウス、オス 6 週齢）8 匹の片耳の前面及び後面ともに、炎症性物質 12-O-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート（12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate）（以下 TPA と省略）のアセトン溶液（85 μM）を耳の片面に 10 μL、もう片面に 10 μL を滴下塗布した。塗布の 6 時間後に耳重量を測定した。ここで耳重量とは、直径 6 mm のパンチで耳に穴を開け、その時取れる円形の部分の重量をいう（以下同様）。TPA を塗布したマウスの耳は、6 時間後に炎症が起こり、耳が腫れた。その時の耳重量は 15.8 ± 1 mg であった。コントロールとして、溶媒であるアセトンのみを塗布したところ、耳は腫れず、耳重量は 6.5 ± 0

10

20

30

40

50

． 3 m g であつた。 T P A を塗布することで耳重量は増加した。

実施例 1 で得られたヤマブドウ果汁の凍結乾燥粉末 1 . 8 g をアセトン水混液 (6 6 % のアセトンと蒸留水の混合溶液 ; アセトン : 蒸留水 = 2 : 1 (v / v)) 5 m L に溶解させた (0 . 3 6 g / m L) 。次にマウス (I C R マウス、メス 6 週齢、又は S E N C A R マウス、オス 6 週齢) 6 匹の片耳の前面及び後面ともに、上記を 1 0 μ L を塗布し、その 3 0 分後に T P A (8 5 μ M の溶液) を片耳の前面及び後面に 1 0 μ L 塗布した。その結果、 6 時間後に、マウスの耳は腫れて耳重量 (1 2 . 9 ± 1 . 9 m g) となつた。果汁を塗布しない場合と比べて、重量増加は有意に少なかった。

以上より、ヤマブドウ果汁の凍結乾燥粉末が、炎症反応を抑制すること、即ち抗炎症効果を有することが示された。

10

【 0 0 4 4 】

実験例 2

< 外用によるヤマブドウ発酵産物の抗炎症効果の評価 >

実験例 1 において、ヤマブドウ果汁の凍結乾燥粉末を用いる代わりに実施例 2 で得たヤマブドウ発酵産物の凍結乾燥粉末を用いる他は、実験例 1 と同じ条件で抗炎症効果の評価を行った。その結果、 T P A 塗布 6 時間後に、アセトンのみを塗布したマウスの耳は腫れて、耳重量は 1 5 . 8 ± 1 m g であつた、一方該発酵産物を塗布した場合の耳重量は 1 3 . 1 ± 2 . 3 m g であり、アセトンのみを塗布した場合に比べての重量増加は有意に少なかった。

以上より、ヤマブドウ発酵産物の凍結乾燥粉末が、抗炎症効果を有することが示された。

20

【 0 0 4 5 】

実験例 3

< 外用によるヤマブドウ抽出物の抗炎症効果の評価 >

実施例 3 で得られたヤマブドウ抽出物 (以下酢酸エチル抽出物ともいう) 0 . 8 g をアセトン水混液 5 m L または 1 0 m L に溶解した ((H) ; 0 . 1 6 g / m L 、 (L) ; 0 . 0 8 g / m L) 。

調製したヤマブドウ抽出物のアセトン水混液をマウス 6 匹の片耳の前面及び後面にそれぞれ 1 0 μ L 塗布した後、 3 0 分後に T P A を塗布した。塗布 6 時間後に耳重量を測定した。

30

さらにヘキサンで抽出したヘキサン層の成分を同様に減圧乾燥させて得られた粉末を 0 . 0 6 g / m L になるようにアセトン水混液に溶解し (以下ヘキサン抽出物ともいう) 、上記と同様の条件で実験した。

また比較として T P A の代わりにアセトンを塗布して実験を行った。表 1 に耳重量を示した。

【 0 0 4 6 】

【表 1】

Treatment	Ear no.	Weight (mg)/punch	Inhibition (%)
66% acetone + acetone	4	6.98±0.51	
66% acetone + TPA	8	15.95±0.67	
EtOAc fra. (L) + TPA	7	12.80±0.85*	35
EtOAc fra. (H) + TPA	6	10.60±1.35*	59.6
EtOAc fra. (H) + acetone	3	7.16±0.45	
Hexane fra. + TPA	5	13.47±0.65	27.6
Hexane fra. + acetone	5	7.74±0.36	

40

【 0 0 4 7 】

結果は図 2 に示した。 T P A を塗布したマウスの耳は腫れて耳重量は増加した。一方酢酸

50

エチル抽出物を塗布した場合には用量依存的に耳重量の増加を有意に抑制した。ヘキサン抽出物は有意な効果を示さなかった。

以上より、ヤマブドウの酢酸エチル抽出物が、抗炎症効果を有することが示された。

【0048】

実験例4

<飲用によるヤマブドウ抽出物の抗炎症効果の評価>

マウス（SENCARマウス、オス6週齢）6匹に、水を飲み水として与え、12時間飼育後、片耳の前面及び後面ともにTPAを塗布したところ、6時間後に炎症が起こり、耳が腫れ、耳重量が17.5mgとなった。一方、マウス（同上）6匹に、実施例2で得られたヤマブドウ果汁の酢酸エチル画分の乾燥物を水に溶解し（0.16g/mL（H）または0.08g/mL（L））飲み水として与え、12時間飼育後、同様に片耳の前面及び後面ともにTPAを塗布したところ、6時間後に、炎症が起こり、耳が腫れ、耳重量は10.0mg（H）または12.8mg（L）となった。飲み水として、水のみを与えた場合と比べて、耳重量の増加は有意に少なかった。

10

以上より、ヤマブドウ抽出物が、飲用によっても抗炎症作用を示すことが明らかとなった。

【0049】

実験例5

<ヤマブドウの変異原性試験に対する評価>

Trp-P-2 (3-Amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b]indole) に対するヤマブドウの凍結乾燥物の抗変異原性をサルモネラ菌を用いるエイムス試験で調べた。

20

実験条件：

- ・Trp-P-2 0.1 nmol の50 µL水溶液
- ・ヤマブドウ凍結乾燥物(i)~(iv)の蒸留水溶液と滅菌水の合計を100 µLとする溶液
- ・サルモネラ菌液 100 µL
- ・S9入り緩衝液 500 µL

を混ぜて、37 で20分振とうした。

なおヤマブドウ果実凍結乾燥物は、以下の群に分けた。

(i) Y-grape juice 群：実施例1で得られたヤマブドウ果汁（0.05 mL）の凍結乾燥物の蒸留水溶液（果汁0.05 mLから得られた成分を蒸留水溶液100 µLに溶かした試料。実際は果汁100 mLから得られたサンプルの0.05/100である。）

30

(ii) Hexane Fra. 群：実施例1で得られたヤマブドウ果汁0.03、0.1 mLのヘキサン抽出物の蒸留水溶液（果汁100 mLをヘキサン抽出し、ヘキサン留去後の残分の0.03/100あるいは0.1/100を滅菌水0.1 mLに溶かしたものの）

(iii) EtOAc Fra. 群：実施例1で得られたヤマブドウ果汁0.02、0.05、0.1 mLをヘキサン抽出・酢酸エチル抽出物の蒸留水溶液（果汁100 mLをヘキサン抽出したあとの果汁層を酢酸エチル抽出し、酢酸エチル留去後の残分の、0.02/100、0.05/100あるいは0.1/100を滅菌水0.1 mLに溶かしたものの）

40

(iv) residue 群（水層残存群）：実施例1で得られたヤマブドウ果汁0.03、0.1 mLのヘキサン抽出・酢酸エチル抽出後抽出されなかった果汁層（凍結乾燥）の蒸留水溶液（果汁100 mLをヘキサン抽出したあとの果汁層を酢酸エチル抽出し、酢酸エチルで抽出されなかった果汁層を凍結乾燥した時の固形物の、0.02/100、0.05/100あるいは0.1/100を滅菌水0.1 mLに溶かしたものの）

これを寒天培地にまいて、37 で48時間置いた後突然変異を起こしたサルモネラ菌数を数えた。

【0050】

結果は図3に示した。ヤマブドウ果汁凍結乾燥物及び酢酸エチル抽出物には抗変異原性

50

があることが判った。しかしながらヤマブドウ果汁をヘキサン処理したヘキサン層には抗変異原性は認められなかった。また、水層残存群の抗変異原性はEtOAc群より弱かった。

【0051】

実験例6

<外用によるヤマブドウ果汁の皮膚腫瘍に対する評価>

センター (Sen-car) マウス (メス6週) の背部の毛を剃り、背部皮膚に発癌物質DMBA (ジメチルベンゾ (a) アンスラセン) (390 nmol / アセトン 0.1 mL) を1回塗布し、その1週間後より発癌促進物質TPA (1.7 nmol / アセトン 0.1 mL) を週2回塗布した (TPA群、n = 8) (図4参照)。

次にDMBAを1回塗布し、その1週間後よりTPA塗布の30分前に、実施例1で得られたヤマブドウ果汁 (1 L) の凍結乾燥物 18.2 g をアセトン水混液 500 mL または 100 mL に溶かした溶液 0.15 mL を塗布した (上記の乾燥物を 500 mL に溶かしたものを 2 X 投与群 (n = 8) ; 100 mL に溶かしたものを 10 X 投与群 (n = 8) という)。なお実験中、餌及び水は自由に与えた。

【0052】

結果は図5および図6に示した。20週終了までに、TPA群は全てに皮膚の良性腫瘍ができた。一方、ヤマブドウ果汁 2 X 投与群は5匹、10 X 投与群は4匹に腫瘍ができた。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】図1は、ヤマブドウ果汁の抽出工程を示す。

【図2】図2は、外用によるヤマブドウ抽出物の抗炎症効果を示す。PCは陽性対照、NCは陰性対照を表わす。

【図3】図3は、ヤマブドウの抗変異原性を示す。

【図4】図4は、発癌動物試験の方法を示す。

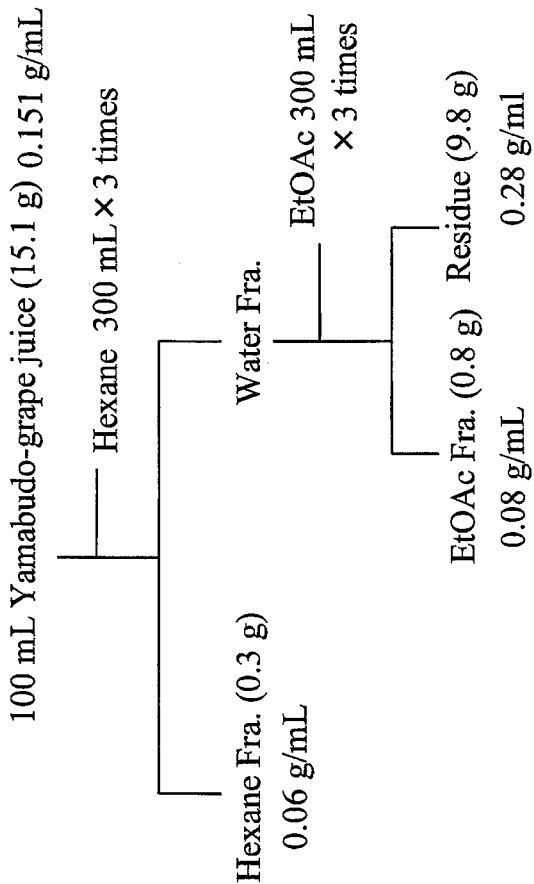
【図5】図5は、外用によるヤマブドウ果汁の皮膚腫瘍に対する効果を示す。

【図6】図6は、外用によるヤマブドウ果汁の皮膚腫瘍に対する効果を示す。

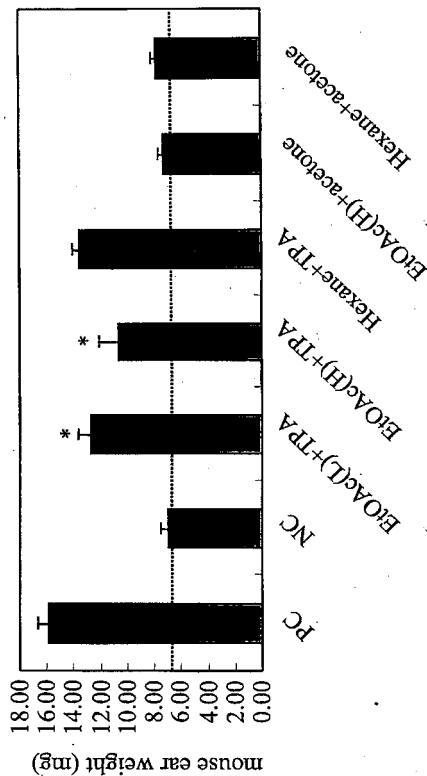
10

20

【 図 1 】

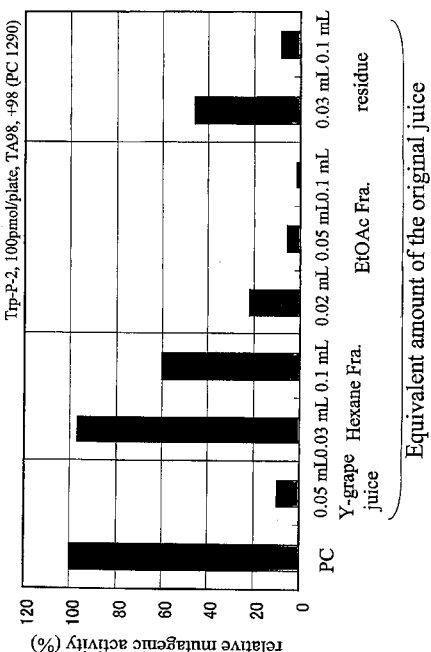


【 図 2 】



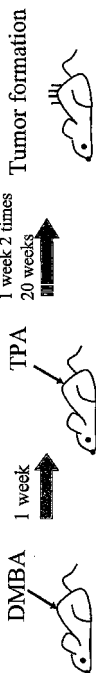
【 図 3 】

Anti-mutagenicity of each fractions in Ames test

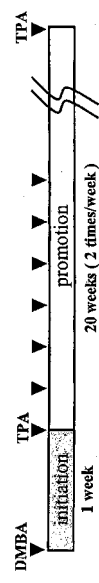


【 図 4 】

Two-stage mouse skin carcinogenesis assay.

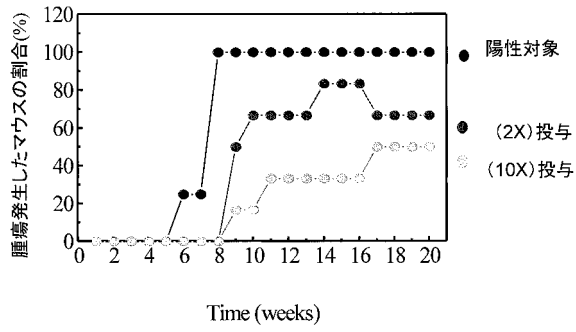


Mouse : SENCAR mouse 6 weeks old female
 Initiation : Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 390 nmol/mouse
 Promotor : 12-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 1.7 nmol/mouse
 Y-grape juice: Y-grape juice dissolved in 66% acetone

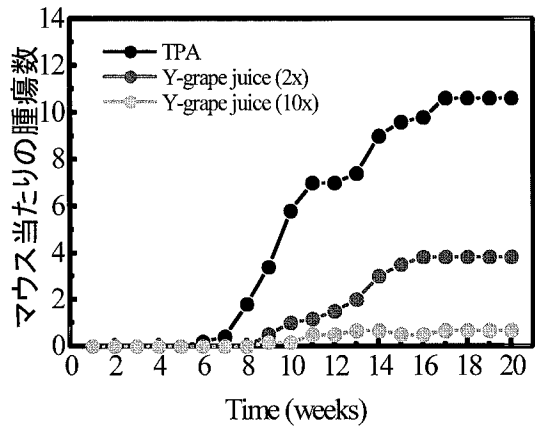


✧Modulation of cancer promotion was conducted by the application of Y-grape juice 30min prior to TPA

【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平01-290621(JP,A)
特開2001-292731(JP,A)
特開2006-325449(JP,A)
特開2000-344655(JP,A)
特開2001-278792(JP,A)
特開2002-047193(JP,A)
J.ASEV Jpn. , 2003年, Vol.13, No.3, p.135-136
天然有機化合物討論会講演要旨集, 1991年, 33rd, 393-400
日本癌学会学術総会記事, 2006年 8月28日, 460, 0-773欄
馬場直道 他, ブドウ葉抽出物の抗酸化作用, 日本農芸化学会誌, 2001年, Vol.75, p.42
日本内科学会雑誌, 2006年 9月10日, 95(9), 1870-1875

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 36/18
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)