

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5783612号
(P5783612)

(45) 発行日 平成27年9月24日 (2015. 9. 24)

(24) 登録日 平成27年7月31日 (2015. 7. 31)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	31/327	(2006. 01)	A 6 1 K 31/327
A 6 1 P	3/10	(2006. 01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	17/16	(2006. 01)	A 6 1 P 17/16
A 2 3 L	1/30	(2006. 01)	A 2 3 L 1/30

B

請求項の数 8 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2012-501837 (P2012-501837)	(73) 特許権者	504173471
(86) (22) 出願日	平成23年2月24日 (2011. 2. 24)		国立大学法人北海道大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/054069		北海道札幌市北区北8条西5丁目
(87) 国際公開番号	W02011/105465	(74) 代理人	110001508
(87) 国際公開日	平成23年9月1日 (2011. 9. 1)		特許業務法人 津国
審査請求日	平成26年2月18日 (2014. 2. 18)	(74) 代理人	100078662
(31) 優先権主張番号	特願2010-38455 (P2010-38455)		弁理士 津国 肇
(32) 優先日	平成22年2月24日 (2010. 2. 24)	(74) 代理人	100131808
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 柳橋 泰雄
		(74) 代理人	100125793
			弁理士 川田 秀美
		(74) 代理人	100149412
			弁理士 安藤 雅俊
		(74) 代理人	100151828
			弁理士 杉本 将市

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メイラード反応抑制剤、 α -ジカルボニル化合物分解剤、およびメイラード反応抑制方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

d - リモネン、 - テルピネン、カレン、カンフェン、 - ビサボレン、テルピネン - 4 - オール、 - テルピネオール、 - テルピニルアセテート、トランス - カルベノール及びボルネオールからなる群より選択されるテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するメイラード反応抑制剤。

【請求項 2】

テルピネン - 4 - オールペルオキシドを有効成分として含有する、請求項 1 記載のメイラード反応抑制剤。

【請求項 3】

 - テルピニルアセテートのヒドロペルオキシドを有効成分として含有する、請求項 1 記載のメイラード反応抑制剤。

【請求項 4】

食品の褐色抑制剤である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のメイラード反応抑制剤。

【請求項 5】

糖尿病又は糖尿病合併症の治療剤又は予防剤である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のメイラード反応抑制剤。

【請求項 6】

皮膚のシワ及びノ又はシミ改善剤である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のメイラード反応抑制剤。

【請求項7】

d - リモネン、 - テルピネン、カレン、カンフェン、 - ビサボレン、テルピネン - 4 - オール、 - テルピネオール、 - テルピニルアセテート、トランス - カルベノール及びボルネオールからなる群より選択される少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有する - ジカルボニル化合物分解剤。

【請求項8】

d - リモネン、 - テルピネン、カレン、カンフェン、 - ビサボレン、テルピネン - 4 - オール、 - テルピネオール、 - テルピニルアセテート、トランス - カルベノール及びボルネオールからなる群より選択される少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドを使用することを特徴とする、食品におけるメイラード反応抑制方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、メイラード反応抑制剤、 - ジカルボニル化合物分解剤、およびメイラード反応抑制方法に関する。

【背景技術】

【0002】

メイラード反応は、古くから食品などの褐変化反応として知られており、アミノ酸、タンパク質、ペプチド等のアミノ基と、還元糖などのカルボニル基が非酵素的に結合する反応であって、この反応は初期段階と後期段階とに分けられている (Drug Discovery Today, 11, 646-654 (2006))。

20

【0003】

初期段階は、アミノ基とカルボニル基とが反応し Schiff 塩基を形成することから始まり、1, 2 - エナミノールを経てケトアミンなどのアマドリ化合物を形成する反応である。また、後期段階は、前記のアマドリ化合物が脱水、転位、縮合、酸化的解裂など非可逆的の反応を受け、非常に反応性に富みタンパク質の架橋形成を起こす 3 - デオキシグルコソンのような - ジカルボニル化合物を経て、最終的に褐色や蛍光などの物理化学的特徴を持つペントシジンなどの後期反応産物 (AGE: advanced glycation end products) に変化する反応である。

【0004】

30

これらの一連の反応により、食品の色、香り、物性などが劣化するため、メイラード反応を効果的に抑制することにより、食品の品質劣化を防止することができる。

【0005】

一方、メイラード反応は生体内でも起こっており、特に糖尿病患者においては高血糖による AGE の蓄積とタンパク質架橋形成物が生じ、神経障害、網膜症、アテローム性動脈硬化などの糖尿病合併症が引き起こされる (J. Neuropathol. Exp., 59, 1094-1105 (2000)、Diabetes, 24, 479-482 (2001)、Cardiovasc. Res., 63, 582-592 (2004)、及び Nature, 414, 813-820 (2001))。また老化に伴い、同様な反応が進行し、皮膚のハリや弾力性の低下などの老化症状の原因になっていると云われている (J. Clin. Invest., 91, 2463-2469 (1993)、及び Archives of Biochemistry and Biophysics, 419, 89-96 (2003))。

40

従って、メイラード反応の進行を阻害することは重要である。

【0006】

AGEs 形成経路の中間体として - ジカルボニル化合物が存在する。主に 3 - デオキシグルコソソ (3-DG)、メチルグリオキサール (MG) などが生体内で生成する。これらの - ジカルボニル化合物は、グルコースに比べ 1 万倍という高い反応性を有し、タンパク質のリシン、アルギニン、トリプトファン残基などを修飾して AGEs 形成に寄与しているため重要である。糖尿病患者の血漿中では、これらの - ジカルボニル化合物の存在量が増加しており、合併症発症に大きく関与していると考えられている。例えば、3-DG は細胞内外の酵素を修飾・失活あるいは酸化ストレスを介して機能障害を引き起こすことが考えられている。よって、AGEs 形成経路の中間体として存在する - ジカルボニル化合物の

50

炭素 - 炭素間の結合を解裂し、AGEの蓄積及びタンパク質間の架橋形成を阻害する物質を開発することは、糖尿病や合併症の予防や治療に有用であるだけでなく、老化の防止においても重要である。

【0007】

メイラード反応後期反応産物である -ジカルボニル化合物などの架橋形成物の分解除去を可能とする、AGE形成阻害剤としては、N-フェニルチアゾリウムブロミド(PTB)(Nature, 382, 275-278 (1996))、4,5-ジメチルチアゾリウム誘導体(ALT-711)(Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 4630-4634 (1998))などがある。推定されている反応機構によれば、いずれも生体内には存在しない断片がタンパク質に残ることになる。このタイプの薬は、一端認可されたものの、副作用が確認されたため現在使用されていない。

10

【0008】

柑橘類の揮発性油状物やテルペン類は、 -ジカルボニル化合物切断活性を有し、メイラード反応抑制剤として有用であることが知られている(特許文献1)。これらテルペン類は、天然物由来の物質であるので、安全性に優れている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2004-35424号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Drug Discovery Today, 11, 646-654 (2006)

【非特許文献2】J. Neuropathol. Exp., 59, 1094-1105 (2000)

【非特許文献3】Diabetes, 24, 479-482 (2001)

【非特許文献4】Cardiovasc. Res., 63, 582-592 (2004)

【非特許文献5】Nature, 414, 813-820 (2001)

【非特許文献6】J. Clin. Invest., 91, 2463-2469 (1993)

【非特許文献7】Archives of Biochemistry and Biophysics, 419, 89-96 (2003)

【非特許文献8】Nature, 382, 275-278 (1996)

【非特許文献9】Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 4630-4634 (1998)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、かかるテルペン類の活性は弱く、十分な効果を再現性よく得ることができなかった。そこで、優れたジカルボニル化合物切断活性を有し、優れたメイラード反応抑制効果を発揮する化合物を特定することを試みた。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、単なるモノテルペンがジケトンに弱いながらも切断することに興味を持ち、その解裂機構を明らかにすべく鋭意研究した結果、かかるテルペン類のペルオキシドが格別に顕著なジカルボニル化合物切断活性を有し、優れたメイラード反応抑制効果を発揮することを見出し、本発明を完成した。

40

【0013】

すなわち、本発明によれば、少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するメイラード反応抑制剤が提供される。かかるメイラード反応抑制剤によれば、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れた -ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを含有するので、メイラード反応を効果的にかつ再現性よく抑制することができ、優れたメイラード反応抑制効果が発揮される。また、出発物質が天然物由来であり副作用が生じにくいいため、有利に使用することができる。

【0014】

50

また、本発明によれば、少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有する - ジカルボニル化合物分解剤が提供される。かかる - ジカルボニル化合物分解剤によれば、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れた - ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを含有するので、剤全体としても優れた - ジカルボニル化合物分解効果が得られることになる。

【0015】

さらに、本発明によれば、少なくとも1つのテルペン類を使用するメイラード反応抑制方法において、該テルペン類をペルオキシド化することを特徴とする、メイラード反応抑制方法が提供される。かかるメイラード反応抑制方法によれば、テルペン類をペルオキシド化することにより、ペルオキシド化していないテルペン類と比較してより優れた - ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを得ることができ、当該得られたテルペン類のペルオキシドによって優れたメイラード反応抑制効果が得られることになる。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、優れたメイラード反応抑制効果を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

< 発明の経緯 >

これまで、テルペン類による - ジカルボニル化合物切断の作用機序は明らかではなかった。本発明者らは、テルペン類の酸素酸化が起これ、そのアリル位にペルオキシドが生成した後、そのペルオキシドがAGEs形成経路の中間体である - ジカルボニル化合物を攻撃し、Baeyer-Villigerタイプの反応、次いで加水分解という一連の反応が起これ、ジカルボニルが2つのカルボン酸へと分解するという作業仮説を立て、 - ジカルボニル化合物切断活性を有することが公知のテルペン類のペルオキシド化合物を合成し、ジカルボニルに対する切断反応をみたところ、驚くべきことに、極めて効率的に解裂反応が進行することを見出した。本発明によれば、テルペン類をペルオキシド化することにより、その - ジカルボニル化合物切断活性を容易に高めることができる。

【0018】

本発明のテルペン類のペルオキシドは、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れた - ジカルボニル化合物切断活性を有し、メイラード反応を効果的にかつ再現性よく抑制することができる。

【0019】

メイラード反応抑制剤として公知のPTBやALT-711またはそれらの誘導体は、効果的にジケトンを解裂できるが、その解裂により生体内にあり得ない官能基がタンパク質又は小分子として残ることになり、原理的に副作用が生じやすい。一方、本発明のメイラード反応抑制剤は、天然物由来の物質を有効成分とするため、ジカルボニル化合物の解裂によって生成するタンパク質又は小分子は、生体内に普通に存在するカルボン酸であり、はるかに副作用が生じにくい。

【0020】

< 用語の説明 >

本明細書及び請求の範囲において、各種用語の意味を以下のとおり定義する。

【0021】

(1)メイラード反応

「メイラード反応」とは、アミノ酸、タンパク質、ペプチド等のアミノ基と、還元糖などのカルボニル基が非酵素的に結合する反応である (Drug Discovery Today, 11, 646-654 (2006))。詳細には、この反応は初期段階と後期段階とを含み、初期段階は、アミノ基とカルボニル基とが反応しシッフ塩基を形成することから始まり、1, 2 - エナミノールを経てケトアミンなどのアマドリ化合物を形成する反応である。また、後期段階は、前記のアマドリ化合物が脱水、転位、縮合、酸化的解裂など非可逆的の反応を受け、非常に反応

10

20

30

40

50

性に富みタンパク質の架橋形成を起こす3-デオキシグルコソン(3-DG)のような-ジカルボニル化合物を経て、最終的に褐色や蛍光などの物理化学的特徴を持つペントシジンなどの後期反応産物(AGE: advanced glycation end products)に変化する反応である。

【0022】

(2) -ジカルボニル化合物

本明細書で使用される場合、「-ジカルボニル化合物」とは、その分子中に-ジカルボニル部分(1, 2-ジカルボニル基とも呼ぶ)を少なくとも1つ有する化合物をいう。特に、生体、環境、食品など自然界に広く存在する-ジカルボニル化合物をいい、かかる-ジカルボニル化合物の例としては、メイラード反応における中間生成物である3-デオキシグルコソン(3-DG)、メチルグリオキサール(MG)及びグリオキサール(GO)、ならびにメラニン合成における中間生成物であるドーパキノン(L-ドーパキノン)等が挙げられる。

10

【0023】

(3) -ジカルボニル化合物切断活性

本明細書で使用される場合、「-ジカルボニル化合物切断活性を有する」とは、-ジカルボニル化合物の炭素-炭素間の結合を解裂する活性を有することをいい、例えば、後述する実施例2の-ジカルボニル化合物解裂活性試験条件下で、1-フェニル-1, 2-プロパンジオンのジカルボニル基(-CO-CO-)に対する炭素間結合切断率が5%以上、好ましくは10%以上である場合をいう。「優れた-ジカルボニル化合物切断活性を有する」とは、例えば、1-フェニル-1, 2-プロパンジオンのオキサリル基(-CO-CO-)に対する炭素間結合切断率が30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上であることをいう。

20

【0024】

(4)テルペン類

本明細書で使用される場合、「テルペン類」とは、イソプレンを構成単位とする炭化水素であり、イソペン単位(C5)の数に応じて、それぞれモノテルペン(C10)、セスキテルペン(C15)、ジテルペン(C20)、セスタテルペン(C25)、トリテルペン(C30)、テトラテルペン(C40)と呼ぶ。本明細書中で使用される場合、テルペン類には、テルペンアルコール、テルペンエステル、及びこれらの塩が含まれる。

30

【0025】

(5)ペルオキシド

「ペルオキシド」とは、広義では過酸化物の総称であり、狭義ではペルオキシ基(-O-O-)を有し、一般構造式がR-O-O-Rと表される有機過酸化物をいう。酸素上に水素が置換したR-O-O-Hの形の化合物をヒドロペルオキシドと呼ぶ。

【0026】

以下、本発明の実施の形態について、詳細に説明する。なお、同様な内容については、繰り返しの煩雑を避けるために、適宜説明を省略する。

【0027】

[実施形態1:メイラード反応抑制剤]

本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有するメイラード反応抑制剤である。ここで、テルペン類のペルオキシドは、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れた-ジカルボニル化合物切断活性を有し、かつ、AGE形成阻害活性を有することが後述する実施例で実証されている。したがって、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、当該ペルオキシドを含有するので、剤全体としても優れたメイラード反応抑制効果が得られることになる。

40

【0028】

(テルペン類)

本発明のメイラード反応抑制剤の出発原料となるテルペン類としては、いずれのテルペ

50

ン類を使用することができるが、好ましくは、 α -ジカルボニル化合物切断活性を有するいずれのテルペン類を使用することができる。かかる α -ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類は、特開2004-35424号公報に記載されており、特開2004-35424号公報の内容は本明細書中に参照として援用される。

【0029】

かかるテルペン類は、柑橘類、ティーツリー、ジュニパー又はスイートマジヨラムを非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。柑橘類を使用する場合、本発明のテルペン類は、例えば柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。ティーツリーを使用する場合、本発明のテルペン類は、新鮮な葉もしくは小枝の先端部分又はその破砕物を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。ジュニパーを使用する場合、本発明のテルペン類は、果実又はその破砕物を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。スイートマジヨラムを使用する場合、本発明のテルペン類は、葉又はその破砕物を非極性有機溶媒抽出又は水蒸気蒸留することによって得ることができる。

10

【0030】

柑橘類としては、例えば、ユズ、ハッサク、ナツミカン、オレンジ、レモン、ミカンなどが挙げられ、ユズがより好ましい。

【0031】

非極性有機溶媒抽出の場合に用いる抽出溶媒としては、エチルエーテル、 n -ヘキサン、シクロヘキサン、 n -ペンタンなどの非極性有機溶媒の1種、又は2種以上の混合物が挙げられる。溶媒の使用量は特に制限はないが、一般に柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣100質量部に対して、1~1000質量部程度である。抽出条件は、室温程度で10~300分間程度であるが、これに限定されるものではない。柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣に所定量の非極性有機溶媒を加え、還流して抽出し、得られた抽出液から溶媒を留去することにより、非極性有機溶媒抽出による柑橘類のテルペン類が得られる。

20

【0032】

また、水蒸気蒸留による場合、公知の水蒸気蒸留装置を用いて原料植物を水蒸気蒸留し、得られた水蒸気蒸留液を遠心分離し、上層を回収することにより、水蒸気蒸留によるテルペン類が得られる。柑橘類の破砕物、搾汁液、搾汁残渣を水蒸気蒸留に供することができる。

30

【0033】

このようにして得られるテルペン類について、更に各種有機溶媒による分画や、シリカゲルによるクロマト分画などによって精製をした後に、溶媒を除去して用いることができる。また、かかるテルペン類は、必要に応じて化学合成物を利用することもできる。

【0034】

本発明のテルペン類としては、市販品のエッセンシャルオイル、アロマオイル、ユズ湯、レモンバックなどに含まれるものも挙げられる。

【0035】

かかるテルペン類は、好ましくは、モノテルペン類、セスキテルペン類、モノテルペンアルコール類及びモノテルペンエステル類(特に、モノテルペンアセテート類)からなる群より選択される1種以上を少なくとも含有する。

40

【0036】

モノテルペン類としては、様々なものがあるが、例えば、オシメン、 d -リモネン、 α -テルピネン、カレン、カンフェン、或いはこれらの2種以上の混合物が挙げられる。

【0037】

セスキテルペン類としては、様々なものがあるが、例えば、 α -ファルネセン、 β -ピサボレン、或いはこれらの混合物が挙げられる。

【0038】

モノテルペンアルコール類としては、様々なものがあるが、例えば、テルピネン-4-

50

オール、 α -テルピネオール、トランス-カルベノール、ボルネオール、或いはこれらの2種以上の混合物が挙げられる。そのペルオキシドが固体であり比較的安定である点から、テルピネン-4-オールが好ましい。

【0039】

また、必要に応じて、これらの化学合成物を利用することもできる。

【0040】

オシメン、d-リモネン、 β -テルピネン、カレン、カンフェン、 α -ファルネセン、 β -ピサボレン、テルピネン-4-オール、 α -テルピネオール、トランス-カルベノール、ボルネオールは、 α -ジカルボニル化合物切断活性を有することが、特開2004-35424号公報に記載されている。よって、これらテルペン類を使用することが好ましい。

10

【0041】

(テルペン類のペルオキシド)

本発明の少なくとも1つのテルペン類のペルオキシド(本明細書中において、単に「テルペン類のペルオキシド」とも呼ぶ)は、かかるテルペン類を当該分野で公知のペルオキシド化方法によりペルオキシド化することにより、容易に得ることができる。

【0042】

(ペルオキシド化)

ペルオキシド化方法としては、特に限定されないが、例えば、光増感法(あるいは化学的方法、マイクロ波放電など)による一重項酸素酸化; 光照射、熱、AIBNなどを用いたによるラジカル的酸素酸化; 塩基触媒を用いた炭素アニオンを経る酸素酸化; 塩基や金属塩や金属錯体などを用いた酸素酸化による方法; トシルヒドラジンに導いた後、ナトリウムペルオキシドの存在下過酸化水素水で処理する方法; グリニャール試薬や有機ホウ素化合物などの有機金属化合物に導いた後に酸素酸化を行う方法; 酵素酸化による方法などが挙げられる。

20

【0043】

本明細書で使用される場合、「光照射」とは、反応系に光を照射することをいう。光を照射することにより、酸素の存在下、光酸素酸化反応を行うことができる。光は、可視光線~紫外線であることが好ましく、可視光線であることが更に好ましい。具体的には、人工灯、高輝度放電ランプ、太陽光を利用することができる。照射時間は特に制限はないが、高輝度放電ランプを使用する場合、10分~72時間であることが好ましく、15分~48時間であることが更に好ましく、15分~10時間であることが特に好ましい。照射時間が上記の範囲内にあると、効率よくペルオキシドが製造される。照射温度は、通常0~50℃であり、好ましくは室温である。

30

【0044】

本明細書で使用される場合、「酸化」とは、対象化合物と酸素とを接触させて酸化すること、及び酸素の存在下で光を照射して光酸素酸化することをいう。酸素と接触させる反応は、光増感触媒下で行ってもよく、使用される触媒としては、チオニン/NaYゼオライトが挙げられるが、これらに限定されない。または、対象化合物を振盪又は攪拌して酸素と接触させる方法、パブリングすることにより酸素と接触させる方法、テルペン類を皮膚に外用する際に物理的刺激(摩擦、マッサージなど)を与えて酸素と接触させる方法などで酸化を行ってもよい。酸素とは、空気中の酸素を含む。接触時間としては特に制限はないが、通常、10分~72時間であることが好ましく、15分~48時間であることが更に好ましく、15分~10時間であることが特に好ましい。反応温度は、合成的には-78℃~100℃、通常0~50℃であり、好ましくは室温である。酸素の存在下で光を照射して光酸素酸化することとは、上記「光照射」と同義である。

40

【0045】

例えば、テルピネン-4-オールのヒドロペルオキシドは、Tetrahedron 56 (2000) 6927-6943並びにTetrahedron Letters 45 (2004) 5433-5436に記載の方法にしたがって調製することができる。

50

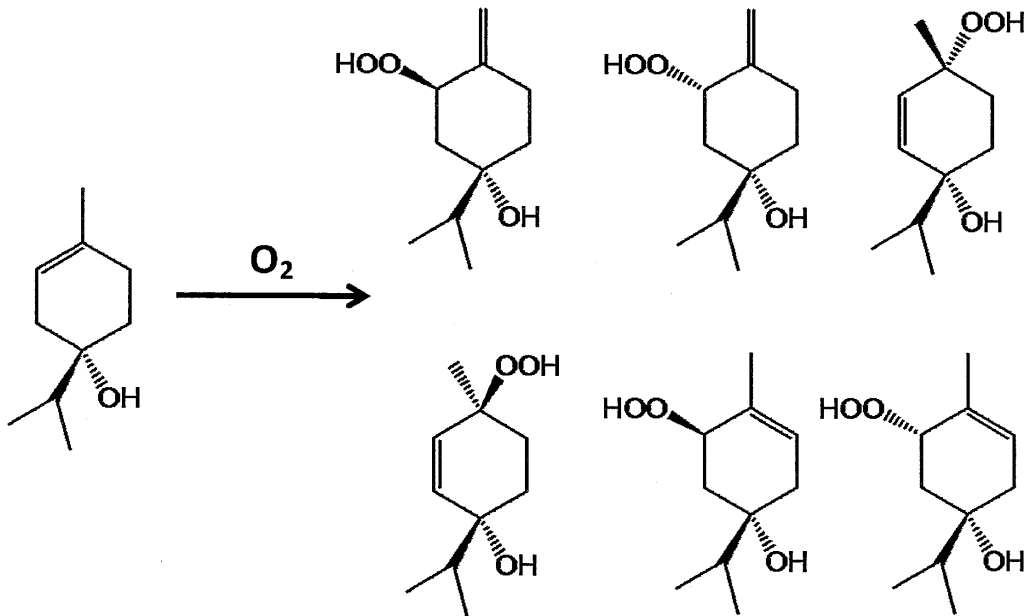
【0046】

テルペン類がアリル型不飽和化合物やベンジル型化合物である場合は、上記のような光増感法（又は化学的方法、マイクロ波放電など）を用いた一重項酸素酸化；光照射、熱、AIBNなどを用いたラジカル条件による酸素酸化；または塩基触媒を用いた炭素アニオンを経る酸素酸化により、そのペルオキシドを容易に得ることができるので好ましい。

【0047】

例えば、アリル型不飽和化合物であるテルピネン-4-オールをペルオキシド化することにより、以下の構造式のペルオキシドを得ることができる（Tetrahedron Letters 45 (2004) 5433-5436）。本発明において、テルピネン-4-オールのヒドロペルオキシドとは、下記ペルオキシド構造を包含する。

【化1】



【0048】

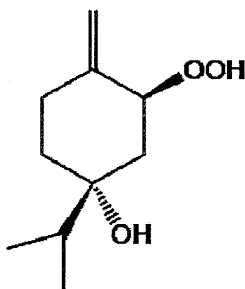
テルペン類がアリル型不飽和化合物やベンジル型化合物ではない場合であっても、塩基や金属塩や金属錯体などを用いた酸素酸化による方法、トシルヒドラジンに導いた後、ナトリウムペルオキシドの存在下過酸化水素水で処理する方法、グリニャール試薬や有機ホウ素化合物などの有機金属化合物に導いた後に酸素酸化を行う方法、酵素酸化による方法でペルオキシド化を行うことができるが、これらに限定されない。

【0049】

本発明におけるテルペン類のペルオキシドとしては、例えば、以下の式の化合物が挙げられる。

(1) 下記式：

【化2】



で表されるテルピネン-4-オールのヒドロペルオキシド。

【0050】

(2) 下記式：

10

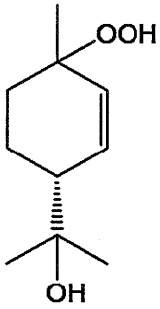
20

30

40

50

【化 3】



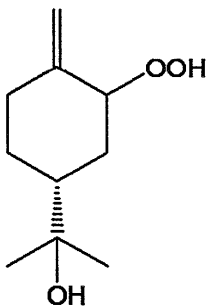
10

で表される、 α -テルピネオールのヒドロペルオキシド。

【0051】

(3) 下記式：

【化 4】



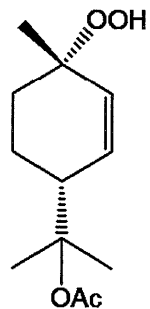
20

で表される、 β -テルピネオールのヒドロペルオキシド。

【0052】

(4) 下記式：

【化 5】



30

で表される、 β -テルピニルアセテートのヒドロペルオキシド。

【0053】

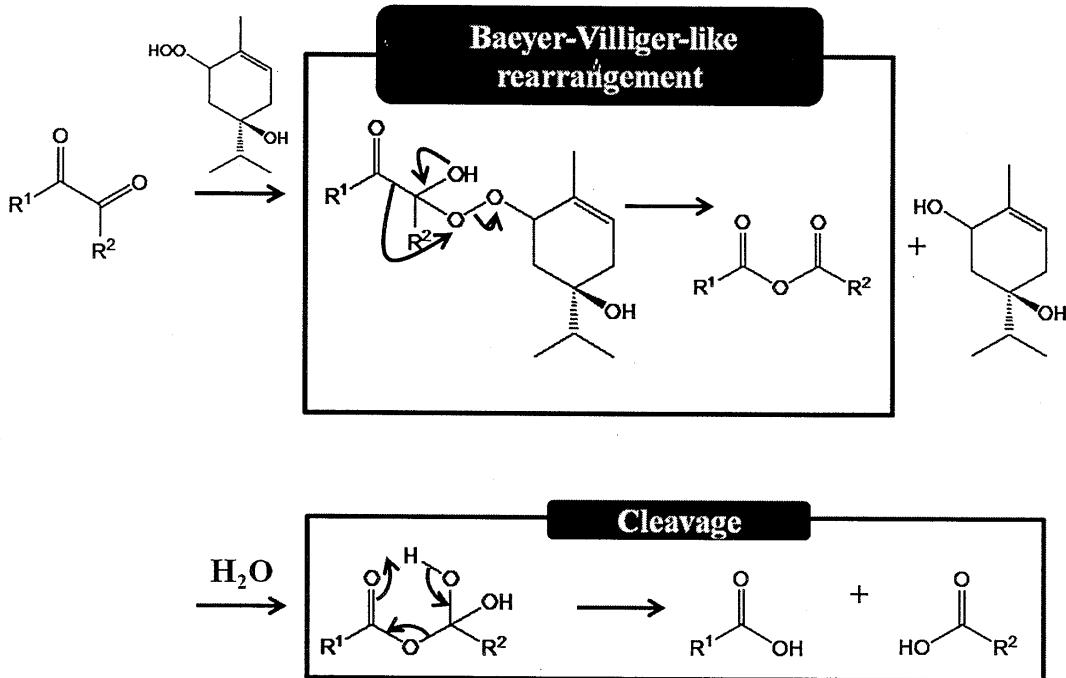
(ペルオキシドによる α -ジカルボニル化合物解裂の作用機序)

本発明のペルオキシドによる α -ジカルボニル化合物解裂の作用機序としては、以下が推測され、そして確認された。テルピネン-4-オールによる α -ジカルボニル化合物の解裂機構は、酸化反応で生成したテルピネン-4-オールのヒドロペルオキシドによる求核攻撃、Baeyer-Villiger-like rearrangement、酸無水物の加水分解を経て起こる。この作用機序によれば、ペルオキシド基が導入される位置に関係なく、解裂反応が効果的に進むと考えられる。

40

(スキーム1)

【化6】



10

20

【0054】

(メイラード反応抑制剤の使用の態様)

本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を食品等の製品に添加して、褐変などの品質劣化の抑制を目的として使用することができる。すなわち、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、食品の褐色抑制剤である。その場合のメイラード反応抑制剤の食品への添加量は、食品成分によって依存し、特に限定されない。一つの目安としては、例えば、ドレッシングで効果を発揮させるためには、有効成分であるテルペン類のペルオキシドの量を、一般に0.0001~5%の範囲、更に望ましくは0.001~0.1%の範囲となるように設計することが望ましい。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を食品に添加することを含む、メイラード反応抑制方法又は食品の品質劣化防止方法もまた、本発明の一実施形態である。

30

【0055】

また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を糖尿病又は糖尿病の合併症(例えば、神経障害、網膜症、アテローム性動脈硬化)の予防、治療を目的として使用することができる。すなわち、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、糖尿病又は糖尿病合併症の治療剤又は予防剤である。その場合、メイラード反応抑制剤の投与量は、年齢、症状程度などに依存して決定することができ、特に限定されない。なお、摂取形態としては、錠剤でも液剤でも、製剤として許容され得る形態で投与することができる。さらに、非経口的に皮下注射、経鼻投与などの形態で投与することでも効果が得られ、摂取、投与方法に限定はない。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の有効量を被検体に投与することを含む、糖尿病又は糖尿病合併症の治療又は予防方法も、本発明の一実施形態である。また、糖尿病又は糖尿病合併症の予防又は治療のための医薬の製造における、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の使用も、本発明の一実施形態である。また、糖尿病又は糖尿病合併症の予防又は治療のために使用される、少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドも、本発明の一実施形態である。

40

【0056】

本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を、皮膚のシワ及び/又はシミ改善を目的として用いることもできる。すなわち、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤は、皮膚のシワ及び/又はシミ改善剤である。その場合、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤を単独で用いることもできるし、皮膚化粧品、皮膚外用剤、乳剤、クリーム類、ローション類

50

、乳液類、クリ-ム類、パック類、入浴剤、医薬品又はロ-ション類、乳液類、クリ-ム類、パック類、入浴剤などに配合して用いることもできる。本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の配合量は、皮膚化粧品又は外用剤の総量を基準として、有効成分であるテルペン類のペルオキシドの量を、0.01~10.0質量%の範囲となるように設計することが好ましく、より好ましくは、0.05~5.0質量%である。なお、本発明の皮膚のシワ及びノ又はシミ改善剤には、色素、香料、防腐剤、界面活性剤、顔料等を本発明の目的を達成する範囲内で適宜配合することができる。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制剤の有効量を被検体に投与することを含む、皮膚老化防止のための方法も、本発明の一実施形態である。また、少なくとも1つのテルペン類を有効成分として含み、皮膚のシワ及びノ又はシミ改善のために光照射又は酸化しながら使用するための指示書をととも含む、商品包装物もまた、本発明の一実施形態である。これにより、使用中テルペン類をペルオキシド化することにより、より優れた-ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを得ることができ、当該得られたテルペン類のペルオキシドによって優れたメイラード反応抑制効果が得られることになるので好ましい。

10

【0057】

[実施形態2：-ジカルボニル化合物分解剤]

本実施形態に係る-ジカルボニル化合物分解剤は、少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドを有効成分として含有する-ジカルボニル化合物分解剤である。ここで、当該テルペン類のペルオキシドは、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れた-ジカルボニル化合物切断活性を有することが後述する実施例で実証されている。したがって、本実施形態に係る-ジカルボニル化合物分解剤は、テルペン類のペルオキシドを含有するので、剤全体としても優れた-ジカルボニル化合物分解効果が得られることになる。

20

【0058】

本実施形態に係る-ジカルボニル化合物分解剤に使用される少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドは、基本的には、実施形態1において具体的に説明された少なくとも1つのテルペン類のペルオキシドと同様の構成及び作用効果を有する。よって、実施形態1と同様の内容については、適宜説明を省略する。

【0059】

本実施形態に係る-ジカルボニル化合物分解剤は、生体、環境、食品など自然界に広く存在する-ジカルボニル化合物を分解することができるので、実施形態1で記載のとおり、メイラード反応における中間生成物である3-デオキシグルコソン(3-DG)、メチルグリオキサール(MG)及びグリオキサール(GO)を分解してメイラード反応を抑制することができる。また、メラニン合成における中間生成物であるドーパキノン(L-ドーパキノン)を分解して皮膚におけるメラニン合成を抑制することができる。

30

【0060】

[実施形態3：メイラード反応抑制方法]

本実施形態に係るメイラード反応抑制方法は、少なくとも1つのテルペン類を使用するメイラード反応抑制方法において、該テルペン類をペルオキシド化することを特徴とする、メイラード反応抑制方法である。かかる方法によれば、テルペン類をペルオキシド化することにより、ペルオキシド化していないテルペン類と比較して、顕著に優れた-ジカルボニル化合物切断活性を有するテルペン類のペルオキシドを得ることができ、当該得られたテルペン類のペルオキシドによって優れたメイラード反応抑制効果が得られることになる。

40

【0061】

本実施形態に係るメイラード反応抑制方法に使用される少なくとも1つのテルペン類、及び該テルペン類をペルオキシド化する方法は、基本的には、実施形態1において具体的に説明した少なくとも1つのテルペン類、及びペルオキシド化方法と同様の構成及び作用効果を有する。よって、実施形態1と同様の内容については、適宜説明を省略する。

【0062】

50

本実施形態に係るメイラード反応抑制方法では、該テルペン類をペルオキシド化する方法には、少なくとも1つのテルペン類を含有してなるメイラード反応抑制剤を、光照射療法と併用して使用することも含まれる。また、本実施形態に係るメイラード反応抑制方法では、該テルペン類をペルオキシド化する方法には、少なくとも1つのテルペン類を含有してなるメイラード反応抑制剤を、皮膚に外用する際に物理的的刺激（摩擦、マッサージなど）を与えながら使用することも含まれる。使用する量および使用条件は得られる治療効果に対して望ましくない副作用が起こらないか最小になるよう決定されるべきであることは言うまでもない。

【実施例】

【0063】

以下、本発明について実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0064】

[実施例1：テルペン類のヒドロペルオキシドの調製]

1. テルピネン - 4 - オールのヒドロペルオキシドの調製

Tetrahedron 56 (2000) 6927-6943並びにTetrahedron Letters 45 (2004) 5433-5436に記載の方法にしたがってテルピネン - 4 - オールのヒドロペルオキシドを調製した。以下、テルピネン - 4 - オールをT4と、テルピネン - 4 - オールのヒドロペルオキシドをT4-Hとも呼ぶ。

【0065】

(チオニン担持 Na-Y ゼオライトの調製)

2.5mgのチオニンアセテートを脱イオン水333mlに加えた。その溶液に5.0gのNa-Y ゼオライトを加え、3時間攪拌した。その後、桐山ロートでろ過し、チオニン担持 Na-Y ゼオライトをオープン乾燥した。使用する前に1~2時間、サンプルオープン(120)に入れ真空ポンプで乾燥した。

【0066】

(チオニン担持 Na-Y ゼオライトによる光酸化反応)

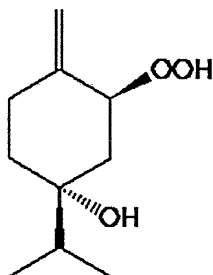
3.0gのチオニン担持 Na-Y ゼオライトを乾燥させた二口ナスフラスコに入れ、サンプルオープン(120)にて1時間半乾燥した。その後アルゴン置換し、セプタム、三方コックで密閉した。蒸留したヘキサンを30ml、ピリジンを30 μ l加え5時間半攪拌した。その後テルピネン-4-オールを30 μ l加え、0 にて酸素を導入しながら光を照射し(ウシオ高圧UVランプ 型式UM-102)、50分間反応させた。

【0067】

(ヒドロペルオキシドの単離・精製)

反応終了後、反応溶液にアセトニトリルを加え攪拌し、10~15時間抽出した。その後桐山ロートでろ過しゼオライトを除去し、ろ過溶液をエバポレーターにて濃縮した。濃縮後の液体をフラッシュクロマトグラフィー(クロロホルム：ジエチルエーテル=4：1)にて主ピークを示したR_f値0.2付近の化合物を単離した。収率43%にて下記構造式のヒドロペルオキシドを白色固体として得た(¹H及び¹³C NMR)。

【化7】



【0068】

2. -テルピネオールのヒドロペルオキシドの調製

10

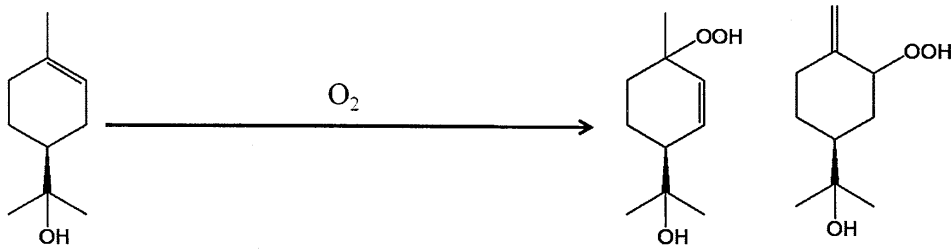
20

30

40

50

【化8】



【0069】

10

(チオニン担持Na-Yゼオライトによる光酸化反応)

チオニン担持 Na-Y ゼオライト 3.0 gを二口フラスコに入れ、120 のサンプルオープンにて1.5時間真空乾燥した。乾燥後アルゴン置換し、密栓した。蒸留したヘキサン30 ml、ピリジン30 μ lを加え、室温にて5時間撹拌した。 -テルピネオール36.7 mg (ヘキサン溶液)を加え、 O_2 を吹き込みながら光分解した(0 , 1時間)。

【0070】

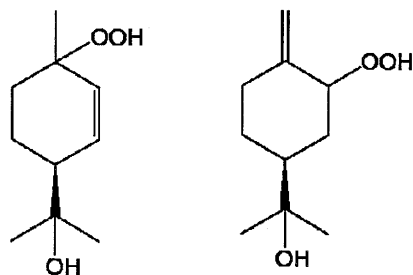
(ヒドロペルオキシドの単離・精製)

反応終了後、アセトニトリル50 mlを加え、12時間以上撹拌し抽出した。その後、セライト濾過し減圧濃縮後、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー(クロロホルム : ジエチルエーテル = 3 : 1)によって $R_f = 0.17$ の画分を回収、減圧濃縮し、 -テルピネオールヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物(17.3 mg、収率39%、a : b = 2.9 : 1)を白色固体として得た。以下、 -テルピネオールをT-olと、 -テルピネオールヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物をT-ol-Hとも呼ぶ。

20

【0071】

【化9】

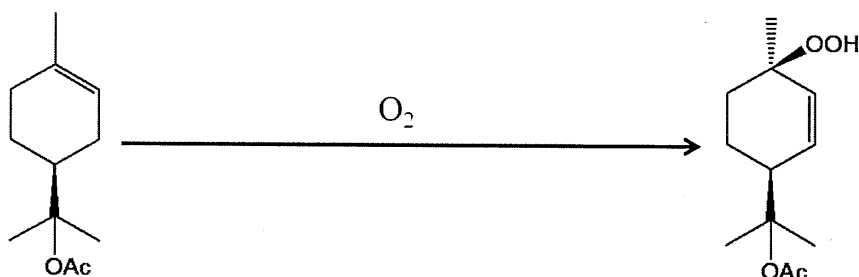


30

【0072】

3. -テルピニルアセテートのヒドロペルオキシドの調製

【化10】



40

【0073】

(チオニン担持Na-Yゼオライトによる光酸化反応)

チオニン担持 Na-Y ゼオライト 3.0 gを二口フラスコに入れ、120 のサンプルオープンにて1.5時間真空乾燥した。乾燥後アルゴン置換し、密栓した。蒸留したヘキサン30 ml、ピリジン30 mlを加え、室温にて5時間撹拌した。 -テルピニルアセテート30.7 mgを加え、 O_2 を吹き込みながら光分解した(0 , 1時間)。

50

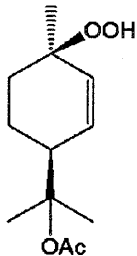
【 0 0 7 4 】

(ヒドロペルオキシドの単離・精製)

反応終了後、アセトニトリル50 mlを加え、12時間以上攪拌し抽出した。その後、セライト濾過し減圧濃縮後、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー(クロロホルム：ジエチルエーテル = 16：1)によって $R_f = 0.30$ の画分を回収、減圧濃縮し -テルピニルアセテートヒドロペルオキシド(17.1 mg、収率48%)を白色固体として得た。以下、 -テルピニルアセテートをT-aceと、 -テルピニルアセテートヒドロペルオキシドをT-ace-Hとも呼ぶ。

【 0 0 7 5 】

【化 1 1】



10

【 0 0 7 6 】

[実施例 2：ヒドロペルオキシドの -ジカルボニル化合物解裂活性試験]

ヒドロペルオキシドについて、AGEs形成経路の中間体である -ジカルボニル化合物の炭素-炭素間の結合を解裂する活性を測定した。

20

【 0 0 7 7 】

(実施例 2 - 1)

評価方法として、 -ジカルボニル化合物である 1 - フェニル - 1 , 2 - プロパンジオン (P P D) に、テルピネン - 4 - オール (T 4) もしくはテルピネン - 4 - オールのヒドロペルオキシド (T 4 - H) を加え、解裂して生成する安息香酸をHPLCで定量した。1 - フェニル - 1 , 2 - プロパンジオンは自動酸化により解裂するので、試料を加えないものをコントロールとした。反応溶液の組成を、以下の表 1 に示す。

【 0 0 7 8 】

【表 1】

試薬 (μl)	試料			最終濃度
	コントロール	T4	T4-H	
50%MeOH / 50 mM PB ^{*1} (pH 7.4)	180	175	174.2	
100 mM PB (pH 7.4)	-	-	2.91	
1-フェニル-1,2-プロパンジオン (PPD, コントロール)	20	20	20	10 mM
テルピネン-4-オール (T4)	-	4.96	-	150 mM
T4ヒドロペルオキシド (T4-H)	-	-	2.91	10 mM
合計	200.00	199.96	200.02	

*1 PB: リン酸緩衝液

40

【 0 0 7 9 】

1 - フェニル - 1 , 2 - プロパンジオンは50%MeOH / 50mM PB(pH 7.4)に溶かし、100mMに調製したものをを用いた。またテルピネン - 4 - オールのヒドロペルオキシドは100% MeOHに12.8mg溶かしたものをを用いた。1 - フェニル - 1 , 2 - プロパンジオン、テルピネン - 4 - オール、テルピネン - 4 - オールのヒドロペルオキシドの最終濃度はそれぞれ10 mM、150 mM、10 mMである。

【 0 0 8 0 】

上記の組成の反応溶液を300 μlのPCRチューブに調製した。37 °C、300rpm、サーモミキサーにて振とうした。反応終了後、2M HClを40 μl加えて酸性条件とした。その後、本溶

50

液を0.45 μmのフィルターで濾過しHPLC測定溶液とした。HPLC測定条件は以下の通りである。

【0081】

[HPLC測定条件]

- ・ポンプ : HITACHI L6200
- ・カラム : ODS Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μm) (関東化学社製)
- ・溶媒 : 20% MeOH / 0.1% TFA水溶液
- ・流速 : 1 ml / min
- ・温度 : 40
- ・検出波長 : 254nm
- ・試料注入量 : 20 μl

10

【0082】

以上の方法で実験した結果を表2に示す。切断率は全ての1-フェニル-1,2-プロパンジオンが切断された場合には、10mMの安息香酸が生成すると仮定できるので、以下の式に従って算出した。

$$\text{切断率(\%)} = (\text{各試料溶液から生成する安息香酸の濃度(mM)} / 10(\text{mM})) \times 100$$

【0083】

また、各試料溶液から生成する安息香酸の濃度は、標品のピーク面積から検量線を作成し、算出した。結果を、以下の表2に示す。

【0084】

20

【表2】

反応時間(時間)	切断率(%)		
	コントロール	テルピネン-4-オール(T4)	T4ヒドロペルオキシド(T4-H)
1	1	5	35
4	4	10	62
8	6	14	70
24	12	24	79

*データ: 平均 (n=2)

【0085】

30

以上の結果、テルピネン-4-オールが150 mMの濃度を用いても最大24%の切断率であったのに対し、テルピネン-4-オールヒドロペルオキシドは10mMの濃度にもかかわらず最大79%の切断率を示した。すなわち、テルピネン-4-オールヒドロペルオキシドは、テルピネン-4-オールと比較して、約50倍の解裂活性を示した。

【0086】

(実施例2-2)

評価方法として、ジカルボニル化合物である1-フェニル-1,2-プロパンジオン(PPD)に各試料溶液を加え、解裂して生成する安息香酸をHPLCで定量した。試料溶液として、テルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドを使用した。またポジティブコントロールとしてN-フェナシルチアゾリウムブロミド(PTB)を使用した。試料を加えないものをコントロールとした。なお、テルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドはメタノールに溶解したもの、PTB及びPPDはメタノール-リン酸緩衝液に溶解したものを使用した。表3の組成の反応溶液を300 μlのPCRチューブに調製し、24時間サーモミキサーにて振とうした(37 °C, 300 rpm)。

40

【0087】

【表 3】

試薬 (μl)	試料				最終濃度
	コントロール	PTB	T4	T4-H	
50% MeOH / 50 mM PB (pH 7.4)	180	160	160	140	
100 mM PB	-	-	10	20	
100 mM 1-フェニル-1,2-プロパンジオン (PPD, コントロール)	20	20	20	20	10 mM
100 mM PTB (ポジティブコントロール)	-	20	-	-	10 mM
200 mM テルピネン-4-オール (T4)	-	-	10	-	10 mM
100 mM T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	-	-	-	20	10 mM
合計	200	200	200	200	

試薬 (μl)	試料				最終濃度
	T-ol	T-ol-H	T-ace	T-ace-H	
50% MeOH / 50 mM PB (pH 7.4)	160	140	160	140	
100 mM PB	10	20	10	20	
100 mM 1-フェニル-1,2-プロパンジオン (PPD, コントロール)	20	20	20	20	10 mM
200 mM α-テルピネオール (T-ol)	10	-	-	-	10 mM
100 mM T-ol ヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物 (T-ol-H)	-	20	-	-	10 mM
200 mM α-テルピニルアセテート (T-ace)	-	-	10	-	10 mM
100 mM T-ace ヒドロペルオキシド (T-ace-H)	-	-	-	20	10 mM
合計	200	200	200	200	

10

【0088】

反応終了後、2 M HCl水溶液を40 μl加え酸性条件とした。その後本溶液をメタノール-リン酸緩衝液にて5倍希釈し、0.45 μmのフィルターで濾過しHPLC測定溶液とした。HPLC測定条件は以下の通りである。

【0089】

[HPLC測定条件]

ポンプ : HITACHI L-6200

カラム : 関東化学 ODS. Mightysil RP-18 250 x 4.6 mm (5 μm) lot. 8026375

溶離液 : 35% MeOH / 0.1% TFA水溶液

流速 : 1.0 ml / min

温度 : 40

検出波長 : 254 nm

注入量 : 20 μl

【0090】

以上の方法で実験した結果を表4に示す。切断率は全ての1-フェニル-1,2-プロパンジオンが切断された場合には10 mMの安息香酸が生成すると仮定できるので、以下の式に従って算出した。

切断率 (%) = 各試料溶液から生成する安息香酸の濃度 (mM) / 10 (mM) x 100

【0091】

【表 4】

試料	切断率 (%)
コントロール	13
PTB (ポジティブコントロール)	36
テルピネン-4-オール (T4)	6
T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	81
α-テルピネオール (T-ol)	6
T-ol ヒドロペルオキシドジアステレオマー混合物 (T-ol-H)	68
α-テルピニルアセテート (T-ace)	6
T-ace ヒドロペルオキシド (T-ace-H)	74

*データ: 平均 (n = 3)

40

50

【0092】

以上の結果、試料溶液の最終濃度が10 mMにおいて、テルペン類には解裂活性がみられなかったが、テルペン類ヒドロペルオキシドには68-81%と高い解裂活性が見られた。またテルペン類ヒドロペルオキシドはポジティブコントロールであるPTBの36%の解裂活性を上回った。

【0093】

[実施例3：AGE形成阻害活性試験]

AGEs形成経路の中間体である α -ジカルボニル化合物は、タンパク質のリシン、アルギニン、トリプトファン残基などを修飾してAGEs形成に寄与し、形成されたAGEが糖尿病及び糖尿病合併症を引き起こす。ヒドロペルオキシドについて、AGE形成の阻害活性を測定した。

10

【0094】

リボヌクレアーゼA (RNase A) は10個のリシン残基、4個のアルギニン残基を持つ酵素である。これらの残基部分が α -ジカルボニル化合物としてメチルグリオキサール (MG) によって修飾される、もしくはMGを介してRNase A分子間でAGEsを形成することで酵素活性が低下すると考えられる。またRNase Aの触媒残基はヒスチジン-12、ヒスチジン-119、リシン-41であるため、リシン-41がMGによって修飾されると酵素活性に大きく影響すると考えられる。

【0095】

(実施例3-1)

評価方法は以下のようにした。タンパク質としてウシのリボヌクレアーゼA (RNase A)、 α -ジカルボニル化合物としてメチルグリオキサール (MG) を混ぜた反応溶液に、試料として、アミノグアニジン (AG)、テルピネン-4-オール (T4)、テルピネン-4-オールのヒドロペルオキシド (T4-H) 又はN-フェナシルチアゾリウムブロミド (PTB) を加えて反応させた。その後RNase Aの酵素活性試験を行い、酵素活性を保持しているか評価した。なおテルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドはエタノールに溶解したもの、AGは水に溶解したものを使用した。RNase Aのみを反応させたものを標準コントロール (C-)、RNase AにMGを加え反応させたものをAGEsコントロール (C+)、MGのみを反応させたものをブランクとした。またポジティブコントロールとしてカルボニル捕捉作用を持つAGを用いた。また、比較として、 α -ジカルボニル化合物解裂活性を持つ公知のAGE形成阻害剤としてPTBを用いた。

20

表5の組成の反応溶液を300 μ lのPCRチューブに調製し、24時間インキュベートした (37 $^{\circ}$ C)。

30

【0096】

【表 5】

試薬 (μl)	ブランク	標準コントロール	AGEsコントロール	ポジティブコントロール	最終濃度
	(C-)	(C+)	(AG)	(AG)	
ビヒクル (EtOH)	2	2	2	2	1%
100 mM PB (pH7.2)	40	40	40	40	20 mM
5 mg /ml RNase A	-	40	40	40	1 mg /ml
6.49 M メチルグリオキサール (MG)	3.08	-	3.08	3.08	100 mM
H ₂ O	154.9	118	114.9	112.9	-
1M アミノグアニジン (AG)	-	-	-	2	10 mM
合計	199.98	200.00	199.98	199.98	

10

試薬 (μl)	試料			最終濃度
	T4	T4-H	PTB	
ビヒクル (EtOH)	2	-	-	1%
100 mM PB (pH7.2)	40	40	40	20 mM
5 mg /ml RNase A	40	40	40	1 mg /ml
6.49 M メチルグリオキサール (MG)	3.08	3.08	3.08	100 mM
H ₂ O	111.6	114.9	114.9	-
6.05M テルピネン-4-オール (T4)	3.31	-	-	100 mM
1M T4ヒドロペルオキシド (T4-H)	-	2	-	10 mM
1M PTB	-	-	2	10 mM
合計	199.99	199.98	199.98	

20

【 0 0 9 7 】

反応終了後の溶液を5%グリセロールにて200倍に希釈し、tRNAを基質として酵素実験を行った。下記の組成(表6)の反応溶液のうち、PBとtRNA溶液をエッペンチューブに加え、37℃、10分間、300rpm、サーモミキサーにてブレインキュベートした。その後希釈溶液を加え、37℃、20分間、300rpm、サーモミキサーにてインキュベートした。Perchloric acid / lanthanum solutionを250 μl加え、酵素反応を停止させた。反応溶液を冷蔵庫で静置後、4℃、10分間、13000rpmにて遠心した。この反応溶液を260nmにて吸光度を測定した。結果を以下の表7に示す。

30

【 0 0 9 8 】

【表 6】

試薬 (μl)	最終濃度
100 mM PB (pH 8.0)	150 60 mM
0.5 mg / ml tRNA	50 0.1 mg /ml
200倍希釈反応溶液	50 -
合計	250

40

【 0 0 9 9 】

【表 7】

試料	吸光度 (260 nm)
MG (ブランク)	0.423
RNase A (C-)	1.031
RNase A + MG (C+)	0.453
RNase A + MG + AG	0.935
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	0.844
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	1.002
RNase A + MG + PTB	0.689

*データ: 平均 (n=3)

10

【 0 1 0 0 】

tRNAがRNase Aによって分解されると吸光度が上昇する。またtRNA自身も吸収を持つ。表 7 の結果より、標準コントロール(C-)の酵素活性を100とした時の相対的な酵素活性を以下の式に従って求めた。

【 0 1 0 1 】

残存活性 (%) = (C-B) / (A-B) * 100

A: (C-の吸光度) - (ブランクの吸光度)

B: (C+の吸光度) - (ブランクの吸光度)

C: (RNase反応溶液と各試料溶液の吸光度) - (ブランクの吸光度)

20

【 0 1 0 2 】

RNase A相対活性試験の結果を、以下の表 8 に示す。

【 0 1 0 3 】

【表 8】

試料	残存活性 (%)
RNase A (C-)	100
RNase A + MG (C+)	0
RNase A + MG + AG	83
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	68
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	95
RNase A + MG + PTB	41

*データ: 平均 (n=3)

30

【 0 1 0 4 】

以上の結果、テルピネン - 4 - オールのヒドロペルオキシド(10mM)は、テルピネン - 4 - オール(100mM)と比較し、高い酵素活性を保持していた。またPTB(10mM)とは2倍以上、ポジティブコントロールであるAG(10mM)とは同程度以上の酵素活性を保持していた。なお、括弧内は最終濃度を示す。

【 0 1 0 5 】

(実施例 3 - 2)

40

評価方法は以下のようにした。タンパク質としてRNase A、 α -ジカルボニル化合物としてメチルグリオキサール(MG)を混ぜた反応溶液に、各試料溶液を加え反応させた。その後RNase Aの酵素活性試験を行い、各試料溶液によって酵素活性が保護されるか評価した。試料溶液として、テルペン類、テルペン類ヒドロペルオキシド、アミノグアニジン(AG、ポジティブコントロール)及び経口糖尿病治療薬であるメトホルミンを使用した。なおテルペン類及びテルペン類ヒドロペルオキシドはエタノールに溶解したもの、AG及びメトホルミンは水に溶解したものをを使用した。またRNase Aのみを反応させたものを標準コントロール(C-)、RNase AにMGを加え反応させたものをAGEsコントロール(C+)、MGのみを反応させたものをブランクとした。

表 9 の組成の反応溶液を300 μ lのPCRチューブに調製し、24時間インキュベートした(3

50

7)。

【 0 1 0 6 】

【表 9】

試薬 (μl)	ブランク	標準コントロール	AGEsコントロール	ポジティブコントロール	最終濃度
	(C-)	(C+)	(AG)	(AG)	
ビヒクル (EtOH)	2	2	2	2	1%
100 mM PB (pH7.2)	40	40	40	40	20 mM
5 mg/ml RNase A	-	40	40	40	1 mg/ml
1 M メチルグリオキサール (MG)	20	-	20	20	100 mM
H ₂ O	138	118	98	78	-
100 mM アミノグアニジン (AG)	-	-	-	20	10 mM
合計	200	200	200	200	

10

試薬 (μl)	試料								最終濃度
	メトホルミン	T4	T4-H	T-ol	T-ol-H	T-ace	T-ace-H		
ビヒクル (EtOH)	2	-	-	-	-	-	-	1%	
100 mM PB (pH7.2)	40	40	40	40	40	40	40	20 mM	
5 mg/ml RNase A	40	40	40	40	40	40	40	1 mg/ml	
1 M メチルグリオキサール (MG)	20	20	20	20	20	20	20	100 mM	
H ₂ O	78	98	98	98	98	98	98	-	
100 mM メトホルミン	20	-	-	-	-	-	-	10 mM	
1 M テルピネン-4-オール (T4)	-	2	-	-	-	-	-	10 mM	
1 M T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	-	-	2	-	-	-	-	10 mM	
1 M α-テルピネオール (T-ol)	-	-	-	2	-	-	-	10 mM	
1 M T-ol ジアステレオマー混合物 (T-ol-H)	-	-	-	-	2	-	-	10 mM	
1 M α-テルピニルアセテート (T-ace)	-	-	-	-	-	2	-	10 mM	
1 M α-テルピニルアセテートヒドロペルオキシド (T-ace-H)	-	-	-	-	-	-	2	10 mM	
合計	200	200	200	200	200	200	200		

20

【 0 1 0 7 】

反応終了後の溶液を5%グリセロール水溶液にて200倍希釈し、tRNAを基質とした酵素実験を行った。下記の組成(表 1 0)の反応溶液のうち、PBとtRNA溶液をマイクロチューブに調製し、サーモミキサーを使用して10分間ブレインキュベーションした(37℃, 300 rpm)。希釈反応溶液を加え、サーモミキサーを使用して20分間インキュベーションした(37℃, 300 rpm)。その後、perchloric acid / lanthanum 溶液を250 μl加え、酵素反応を停止させた。反応溶液を10分間遠心した(4℃, 13,000 rpm)。この反応溶液の吸光度をパーソナルスペクトルメーターGene Quant pro (GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社)で測定した(260 nm)。結果を表 1 1 に示す。

30

【 0 1 0 8 】

【表 1 0】

試薬 (μl)	最終濃度
100 mM PB (pH 8.0)	150 60 mM
0.5 mg/ml tRNA	50 0.1 mg/ml
200倍希釈反応溶液	50 -
合計	250

40

【 0 1 0 9 】

【表 1 1】

試料	吸光度 (260 nm)
MG (ブランク)	0.567
RNase A (C-)	1.183
RNase A + MG (C+)	0.661
RNase A + MG + AG	1.099
RNase A + MG + メトホルミン	0.696
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	0.611
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	1.127
RNase A + MG + α -テルピネオール (T-ol)	0.619
RNase A + MG + T-ol ヒドロペルオキシド (T-ol-H)	1.084
RNase A + MG + α -テルピニルアセテート (T-ace)	0.682
RNase A + MG + T-ace ヒドロペルオキシド (T-ace-H)	1.135

*データ: 平均 (n = 3)

10

【 0 1 1 0 】

表 1 1 の結果より、標準コントロール(C-)の酵素活性を100とした時の相対的な酵素活性を以下の式に従って求めた。

$$\text{残存活性 (\%)} = (C - B) / (A - B) \times 100$$

A : (C-の吸光度) - (ブランクの吸光度)

B : (C+の吸光度) - (ブランクの吸光度)

C : (RNase A 反応溶液+各試料溶液の吸光度) - (ブランクの吸光度)

20

【 0 1 1 1 】

RNase A 酵素活性保護試験の結果を表 1 2 に示す。

【 0 1 1 2 】

【表 1 2】

試料	残存活性 (%)
RNase A (C-)	100
RNase A + MG (C+)	0
RNase A + MG + AG	84
RNase A + MG + メトホルミン	7
RNase A + MG + テルピネン-4-オール (T4)	0
RNase A + MG + T4 ヒドロペルオキシド (T4-H)	89
RNase A + MG + α -テルピネオール (T-ol)	0
RNase A + MG + T-ol ヒドロペルオキシド (T-ol-H)	81
RNase A + MG + α -テルピニルアセテート (T-ace)	4
RNase A + MG + T-ace ヒドロペルオキシド (T-ace-H)	91

*データ: 平均 (n = 3)

30

【 0 1 1 3 】

以上の結果、テルペン類を添加した溶液では、RNase A が失活していた(0-4%)が、テルペン類ヒドロペルオキシドを添加した溶液では、酵素活性を保護していた(81-91%)。テルペン類ヒドロペルオキシドはポジティブコントロールであるAGと同程度以上の保護効果が見られた。

【産業上の利用可能性】

【 0 1 1 4 】

本発明によれば、優れたメイラード反応抑制効果を得ることができる。本発明のメイラード反応抑制剤を使用することにより、食品の品質劣化防止、糖尿病及び糖尿病合併症の予防又は治療、並びに皮膚老化防止(皮膚のシワ及び/又はシミの改善)が可能である。

40

フロントページの続き

- (74)代理人 100173772
弁理士 角野 ゆり子
- (74)代理人 100116919
弁理士 齋藤 房幸
- (72)発明者 生方 信
北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
- (72)発明者 永松 龍一郎
北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内
- (72)発明者 三橋 進也
北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内

審査官 石井 裕美子

- (56)参考文献 特開2001-163719(JP, A)
A Novel Melanin Inhibitor: Hydroperoxy Traxastane-Type Triterpene from Flowers of *Arnica montana*, Biol Pharm Bull, 2007年, Vol.30, No.5, Page.873-879

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00 - 33/00

A23L 1/27 - 1/308

A61K 8/00 - 8/99

A61P 3/10

A61P 17/16

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)