

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-41760

(P2019-41760A)

(43) 公開日 平成31年3月22日(2019.3.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 L 33/105 (2016.01)	A 2 3 L 33/105	4 B 0 1 6
A 6 1 K 36/8962 (2006.01)	A 6 1 K 36/8962	4 B 0 1 8
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 8
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 2 3 L 19/00 (2016.01)	A 6 1 P 43/00	

審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-152147 (P2018-152147)	(71) 出願人	507290744 株式会社スパン・ライフ 青森県八戸市大字長苗代字中坪105番地
(22) 出願日	平成30年8月11日(2018.8.11)	(71) 出願人	507088598 有限会社柏崎青果 青森県上北郡おいらせ町秋堂54番地の1
(31) 優先権主張番号	特願2017-170614 (P2017-170614)	(71) 出願人	513238914 協同組合青森県黒にんにく協会 青森県上北郡おいらせ町水崎158番地
(32) 優先日	平成29年9月5日(2017.9.5)	(74) 代理人	100119264 弁理士 富沢 知成
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	佐々木 健郎 宮城県仙台市青葉区小松島4丁目4-1 東北医科薬科大学内

最終頁に続く

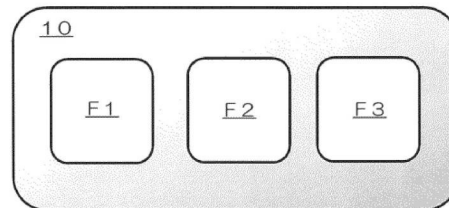
(54) 【発明の名称】 AGE s等阻害性ネギ属植物製組成物、その製造方法、飲食品、およびAGE s阻害用N o r m e c o n i n

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ニンニクなどのネギ属植物を原料とする組成物等において、特に加齢・老化の問題をターゲットとして、新規なる特性を備えた組成物、およびその製造方法の提供。

【解決手段】 AGE s ( a d v a n c e d g l y c a t i o n e n d - p r o d u c t s、終末糖化産物) の生成を阻害する作用 F 1、もしくはその中間体の生成を阻害する作用 F 2、またはAGE sのRAGE ( r e c e p t o r f o r A G E s、AGE s受容体) への接着を阻害する作用 F 3の少なくともいずれかを有することを特徴とする、AGE s等阻害性ネギ属植物製組成物 1 0。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

AGEs (advanced glycation end-products、終末糖化産物) もしくはその中間体の生成を阻害する作用、またはAGEsのRAGE (receptor for AGEs、AGEs受容体) への接着を阻害する作用(以下、まとめて「AGEs等阻害性」という。)の少なくともいずれかを有することを特徴とする、AGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 2】

前記AGEs等阻害性の少なくとも一つが、AGEs産生阻害作用に係ることを特徴とする、請求項1に記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

10

## 【請求項 3】

前記AGEs等阻害性の少なくとも一つが、3-DG(3-デオキシグルコソン)産生阻害作用に係ることを特徴とする、請求項1または2に記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 4】

前記AGEs等阻害性の少なくとも一つが、AGE-RAGE接着阻害作用に係ることを特徴とする、請求項1ないし3のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 5】

飲食品であることを特徴とする、請求項1ないし4のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

20

## 【請求項 6】

固体状または液体状のエキス(抽出物)であることを特徴とする、請求項1ないし5のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 7】

前記ネギ属植物は下記<A>のいずれかであることを特徴とする、請求項1ないし6のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

<A>タマネギ、エシャロット、ニンニク、ラッキョウ、ツリーオニオン、アサツキ、ネギ(ナガネギ、青ネギ)、ワケギ、チャイブ、ニラ、ヤグラネギ、白ネギ、リーキ、ノビル、ギョウジャニンニク

30

## 【請求項 8】

前記ネギ属植物は発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理済みネギ属植物であることを特徴とする、請求項1ないし7のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 9】

前記ネギ属植物は発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理済みニンニクであり、「黒」、「琥珀」、「発酵」または「熟成」の少なくともいずれかの語を「ニンニク」の語に付した表示が付されていることを特徴とする、請求項1ないし7のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 10】

固形分として原料ネギ属植物以外のものが含まれていないことを特徴とする、請求項1ないし9のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

40

## 【請求項 11】

有効成分として Normecconin が含有されていることを特徴とする、請求項1ないし10のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 12】

有効成分として 5-Hydroxymethyl furfural (5-HMF) が含有されていることを特徴とする、請求項1ないし11のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

## 【請求項 13】

50

A G E s 生成阻害用であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 2 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物。

【請求項 1 4】

A G E s の中間体の生成阻害用であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 3 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物。

【請求項 1 5】

A G E s の R A G E への接着阻害用であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 4 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物。

【請求項 1 6】

飲食品用組成物であることを特徴とする、請求項 1 ないし 1 5 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物。

10

【請求項 1 7】

請求項 1 ないし 1 6 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物、または請求項 1 1 ないし 1 3 のいずれかに記載の方法により得られる A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物であって、下記 < D 1 > ~ < D 4 > の少なくともいずれかの旨の表示が付されていることを特徴とする、A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物。

< D 1 > A G E s 生成阻害用である旨

< D 2 > A G E s の中間体の生成阻害用である旨

< D 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用である旨

< D 4 > 固形分として原料とするネギ属植物以外のものが含まれていない旨

20

【請求項 1 8】

請求項 1 ないし 1 7 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物を製造する方法であって、原料ネギ属植物を発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理をし、その後濃縮処理を行なうことを特徴とする、A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法。

【請求項 1 9】

前記濃縮処理後、乾燥処理を行なうことを特徴とする、請求項 1 8 に記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法。

【請求項 2 0】

前記乾燥処理は任意の乾燥方法（ただし、スプレードライを除く）により行なうことを特徴とする、請求項 1 9 に記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法。

30

【請求項 2 1】

請求項 1 ないし 1 7 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物、または請求項 1 8 ないし 2 0 のいずれかに記載の方法により得られる A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物を用いた、飲食品。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の飲食品であって、下記 < D 1 > ~ < D 4 > の少なくともいずれかの内容の表示が付されていることを特徴とする、飲食品。

< D 1 > A G E s 生成阻害用である旨

< D 2 > A G E s の中間体の生成阻害用である旨

< D 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用である旨

< D 4 > 固形分として原料とするネギ属植物以外のものが含まれていない旨

40

【請求項 2 3】

下記 < N 1 > ~ < N 3 > の少なくともいずれかに用いられることを特徴とする、A G E s 阻害用 Normeconin。

< N 1 > A G E s 生成阻害用

< N 2 > A G E s の中間体の生成阻害用

< N 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用

【請求項 2 4】

ネギ属植物由来であることを特徴とする、請求項 2 3 に記載の A G E s 阻害用 N o r m e

50

c o n i n .

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ニンニクなどのネギ属植物を原料とする組成物・飲食品における新たな機能および用途に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ニンニクを発酵処理やメイラード反応（アミノカルボキシル反応）処理して製造する黒ニンニク、琥珀ニンニク等（以下、単に「黒ニンニク」とも言う）については従来、さまざまな技術的提案もなされている。たとえば後掲特許文献1には、ニンニク原料の湿度管理等を要しない簡便な手段で高生理活性物質（S-アリルシステイン、シクロアリイン等）が保持された黒ニンニクエキスを製造する技術として、ニンニク原料（乾燥ニンニク、生ニンニク等）を水抽出して得られる抽出物を、90以上の温度で加熱熟成させる方法が開示されている。

10

【0003】

また特許文献2には、生ニンニクが本来有していないミネラル成分を含有した黒ニンニクを、食味を損うことなく製造する技術として、生ニンニクを60の温泉水に6時間以内、より好ましくは略3時間浸漬させて温泉水処理生ニンニクとし、これを発酵させて黒ニンニクを得る方法が開示されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2014-45693号公報「黒ニンニクエキスの製造およびその用途」

【特許文献2】特開2017-23003号公報「黒にんにくの製造方法」

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

さて、黒ニンニクには上述の通り高生理活性物質が含有されており、黒ニンニクは健康増進に効果のある食品として取り扱われている。しかし従来の研究のほとんどは、黒ニンニクにおける抗酸化性や抗炎症作用をターゲットとした研究に留まっており、それ以外のアプローチがなされていない現状である。たとえば、加齢・老化の問題をターゲットとした黒ニンニクの研究は未だなされていない。もし、かかる研究において一定の成果が得られた場合には、それは黒ニンニクのさらなる普及拡大に資するのみならず、広くニンニク以外のネギ属植物に敷衍できる可能性もある。

30

【0006】

そこで本発明が解決しようとする課題は、このような従来技術の状況を踏まえ、黒ニンニクを初めとする、ニンニクなどのネギ属植物を原料とする組成物等において、特に加齢・老化の問題をターゲットとして、従来未知の機能・作用が存在しないか否かを研究によって明らかにし、それに基づいて、何某かの新規なる特性を備えた組成物、およびその製造方法を提供することである。また、本発明の課題はさらに、かかる研究を通して、黒ニンニクを初めとするニンニクなどのネギ属植物を原料とする組成物等における新たな用途を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本願発明者は上記課題について検討した。具体的には、黒ニンニクからエキスを製造し、そのエキスにおけるAGES（advanced glycation end-products、終末糖化産物）産生阻害活性の有無等について研究を行ったのであるが、

50

その経緯について簡単に述べる。

【0008】

加齢・老化の原因としては、プログラム説、エラーカタストロフ説、さらに細胞機能低下、フリーラジカルによる体内酸化、ホルモンレベルの低下、免疫力の低下、遺伝子異常などさまざまに提唱されており、また、老化進展要因の一つとして近年、カルボニルストレスにおける糖化反応が注目されている。カルボニルストレスとは、生体が活性酸素種（ROS）などによる酸化ストレスにさらされた際に生成されるアルデヒド基やカルボニル基を有する物質の量が生体の消去能力を超えて増加した状態をいう。これは生体内タンパク糖化反応であり、広義のメイラード反応であると考えられている。

【0009】

AGEsは、タンパク質の糖化反応すなわちメイラード反応（アミノカルボキシル反応）によって生成される、数十種類におよぶ生成物の総称であり、種々の老化、加齢性疾患に關与する物質とされている。AGEsは、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、慢性腎不全、悪性腫瘍、NAFLD（非アルコール性脂肪肝炎）、高血圧症、歯周病、日光性弾性線維症（solar elastosis）、骨強度低下、加齢性筋肉減弱現象（サルコペニア）、認知症等の疾患に關連し、また糖尿病の血管系合併症の原因であり、活性酸素による細胞障害を加速して機能を変化させる。

【0010】

特に糖尿病合併症について述べると、糖尿病性細小血管症（腎症、神経症、網膜症）では、血流障害、内皮細胞障害、血管透過性亢進、成長因子・サイトカイン増加、血管新生といった各症状に關連する。また、糖尿病性大血管症（脳卒中、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症、収縮期高血圧）では、リポ蛋白変性、内皮細胞障害、マクロファージ泡沫化、血液凝固能亢進、成長因子・サイトカイン増加、血管平滑筋の増殖といった各症状に關連する。

【0011】

さて、黒ニンニクは、主としてメイラード反応によりニンニクから製造されるため、AGEsを大量に含有している。そうすると、黒ニンニクの摂取はむしろカルボニルストレスを誘発し、AGEs關連疾患への影響が懸念されるようにも思われる。

【0012】

しかし発明者は、外因性AGEsに富む黒ニンニクの摂取は体内AGEs量を増加させることになり、逆に、恒常性を維持するために生体内ではAGEsの産生機構を抑制させる可能性があることに想到した。それは、AGEs關連疾患は外因性のAGEsではなく内因性のAGEsにより誘発されると考えられること、および、異物を摂取すると体内のADME（吸収・分布・代謝・排泄）の恒常性を維持するための機能変化（活性化または抑制）が機能すると考えられることに基づく。黒ニンニク摂取がカルボニルストレスを抑制できれば、それはAGEs關連疾患の予防・治療にも繋がる。

【0013】

こうして立てた仮説に基づき、本研究を行なった。その結果、黒ニンニクエキスは、優れたAGEs生成阻害作用、AGEsの中間体の生成阻害作用、およびAGEsのRAGE（receptor for AGEs、AGEs受容体）への接着阻害作用を有することを明らかにすることができた。かかるAGEsの産生阻害作用等を黒ニンニクが有するという知見は画期的なものであった。さらなる研究の末、黒ニンニク含有成分の分画・精製の結果、複数の化合物の構造決定に至り、このうちNormeconinにおいてRAGE反応性AGEs阻害活性を確認する等の成果も得られ、これらを基に本願発明は完成された。すなわち、上記課題を解決するための手段として本願で特許請求される発明、もしくは少なくとも開示される発明は、以下の通りである。

【0014】

〔1〕 AGEs（advanced glycation end-products、終末糖化産物）もしくはその中間体の生成を阻害する作用、またはAGEsのRAGE（receptor for AGEs、AGEs受容体）への接着を阻害する作用（

10

20

30

40

50

以下、まとめて「AGEs等阻害性」という。)の少なくともいずれかを有することを特徴とする、AGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔2〕前記AGEs等阻害性の少なくとも一つが、AGEs産生阻害作用に係ることを特徴とする、〔1〕に記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔3〕前記AGEs等阻害性の少なくとも一つが、3-DG(3-デオキシグルコソソ)産生阻害作用に係ることを特徴とする、〔1〕または〔2〕に記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔4〕前記AGEs等阻害性の少なくとも一つが、AGE-RAGE接着阻害作用に係ることを特徴とする、〔1〕ないし〔3〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔5〕飲食品であることを特徴とする、〔1〕ないし〔4〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

【0015】

〔6〕固体状または液体状のエキス(抽出物)であることを特徴とする、〔1〕ないし〔5〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔7〕前記ネギ属植物は下記<A>のいずれかであることを特徴とする、〔1〕ないし〔6〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

<A>タマネギ、エシャロット、ニンニク、ラッキョウ、ツリーオニオン、アサツキ、ネギ(ナガネギ、青ネギ)、ワケギ、チャイブ、ニラ、ヤグラネギ、白ネギ、リーキ、ノビル、ギョウジャニンニク

〔8〕前記ネギ属植物は発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理済みネギ属植物であることを特徴とする、〔1〕ないし〔7〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔9〕前記ネギ属植物は発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理済みニンニクであり、「黒」、「琥珀」、「発酵」または「熟成」の少なくともいずれかの語を「ニンニク」の語に付した表示が付されていることを特徴とする、〔1〕ないし〔7〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔10〕固形分として原料ネギ属植物以外のものが含まれていないことを特徴とする、〔1〕ないし〔9〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

【0016】

〔11〕有効成分としてNormeconinが含有されていることを特徴とする、〔1〕ないし〔10〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔12〕有効成分として5-Hydroxymethyl furfural(5-HMF)が含有されていることを特徴とする、〔1〕ないし〔11〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔13〕AGEs生成阻害用であることを特徴とする、〔1〕ないし〔12〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔14〕AGEsの中間体の生成阻害用であることを特徴とする、〔1〕ないし〔13〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔15〕AGEsのRAGEへの接着阻害用であることを特徴とする、〔1〕ないし〔14〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

【0017】

〔16〕飲食品用組成物であることを特徴とする、〔1〕ないし〔15〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

〔17〕〔1〕ないし〔16〕のいずれかに記載のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物、または請求項11ないし13のいずれかに記載の方法により得られるAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物であって、下記<D1>~<D4>の少なくともいずれかの旨の表示が付されていることを特徴とする、AGEs等阻害性ネギ属植物製組成物。

<D1> AGEs生成阻害用である旨

<D2> AGEsの中間体の生成阻害用である旨

10

20

30

40

50

< D 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用である旨

< D 4 > 固形分として原料とするネギ属植物以外のものが含まれていない旨

〔 1 8 〕 〔 1 〕 ないし〔 1 7 〕 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物を製造する方法であって、原料ネギ属植物を発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理をし、その後濃縮処理を行なうことを特徴とする、A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法。

〔 1 9 〕 前記濃縮処理後、乾燥処理を行なうことを特徴とする、〔 1 8 〕 に記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法。

〔 2 0 〕 前記乾燥処理は任意の乾燥方法（ただし、スプレードライを除く）により行なうことを特徴とする、〔 1 9 〕 に記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法

10

。〔 2 1 〕 〔 1 〕 ないし〔 1 7 〕 のいずれかに記載の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物、または〔 1 8 〕 ないし〔 2 0 〕 のいずれかに記載の方法により得られる A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物を用いた、飲食品。

〔 2 2 〕 〔 2 1 〕 に記載の飲食品であって、下記< D 1 > ~ < D 4 > の少なくともいずれかの内容の表示が付されていることを特徴とする、飲食品。

< D 1 > A G E s 生成阻害用である旨

< D 2 > A G E s の中間体の生成阻害用である旨

< D 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用である旨

< D 4 > 固形分として原料とするネギ属植物以外のものが含まれていない旨

20

〔 2 3 〕 下記< N 1 > ~ < N 3 > の少なくともいずれかに用いられることを特徴とする、A G E s 阻害用 N o r m e c o n i n 。

< N 1 > A G E s 生成阻害用

< N 2 > A G E s の中間体の生成阻害用

< N 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用

〔 2 4 〕 ネギ属植物由来であることを特徴とする、〔 2 3 〕 に記載の A G E s 阻害用 N o r m e c o n i n 。

【発明の効果】

【 0 0 1 8 】

本発明の A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物、その製造方法、飲食品等は上述のように構成されるため、これらによれば、A G E s 生成阻害作用、A G E s の中間体の生成阻害作用、または A G E s の R A G E への接着阻害作用の少なくともいずれかを備えた高機能の黒ニンニクおよびその加工品、飲食品等を提供することができる。また本発明によれば、黒ニンニクおよびその加工品、飲食品等において、A G E s 生成阻害用、A G E s の中間体の生成阻害用、または A G E s の R A G E への接着阻害用といった新たな用途を提供することができる。

30

【 0 0 1 9 】

本発明により特に、黒ニンニクがカルボニルストレスを抑制できること、それにより A G E s 関連疾患の予防・治療に効果が期待できることが確認された。したがって本発明は、A G E s 関連疾患の効果的な予防・治療を実現できるとともに、黒ニンニクの付加価値向上、普及拡大に資することができる。また以上の効果は、広くニンニクなどのネギ属植物を原料とする組成物等に敷衍できると考えられ、ネギ属植物の付加価値向上、普及拡大に資することも期待される。さらに、黒ニンニク含有成分の構造決定を通して、N o r m e c o n i n における A G E 反応性 A G E s 阻害活性を初めて確認できたことは、かかる黒ニンニク等の付加価値や可能性のさらなる拡大、および普及拡大に大きな効果を及ぼすとともに、A G E s 阻害という N o r m e c o n i n の新たな用途を提供するものである。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】本発明 A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物の基本構成を示す概念図である。

50

【図2】3-DGを中間体とするAGEs産生メカニズムを示す説明図である。

【図3】本発明のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法の基本構成を示すフロー図である。

【図4】本発明のAGEs等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法の別の構成を示すフロー図である。以下は実施例に係る図である。

【図5】グルコースおよび牛血清アルブミンにおけるメイラード反応において産生するAGEsに対する黒ニンニクエキスの阻害作用検討結果を示すグラフである。

【図6】AGEs産生経路における中間体である3-DGに対する黒ニンニクエキスの阻害作用検討結果を示すグラフである。

【図7】黒ニンニクエキスのRAGE反応性AGEs阻害活性に対する阻害作用検討結果を示すグラフである。

10

【図8】分液ロートによる分画操作後の黒ニンニクエキス分画図である。

【図9】黒ニンニクエキスのエーテル層における分画・精製図である。

【図10】黒ニンニクエキスの酢酸エチル層における分画・精製図である。

【図11】黒ニンニクエキスのブタノール層および水層における分画・精製図である。

【図12】同定された5-hydroxymethyl furfuralの構造式である。

【図13】同定された5-HMFA(5-Hydroxymethyl-2-furan o i c a c i d)の構造式である。

【図14】同定されたNormeconin(6,7-Dihydroxy-4-me t h y l - 1 ( 3 H ) - i s o b e n z o f u r a n o n e)の構造式である。

20

【図15】5-HMFに関して<sup>1</sup>H-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである。

【図16】5-HMFAに関して<sup>1</sup>H-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである。

【図17】Normeconinに関して<sup>13</sup>C-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである。

【図18】Normeconinに関してEI-MSによる解析結果を示すグラフである。

【図19】図19は、Normeconinに関して<sup>1</sup>H-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである。

30

【図20】Normeconinに関してNOE-<sup>1</sup>H-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである。

【図21】NormeconinのRAGE反応性AGEs阻害活性に対する阻害作用を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、図面により本発明を詳細に説明する。

図1は、本発明AGEs等阻害性ネギ属植物製組成物の基本構成を示す概念図である。図示するように本発明AGEs等阻害性ネギ属植物製組成物10は、AGEsの生成(産生)を阻害する作用F1、AGEsの中間体の生成(産生)を阻害する作用F2、またはAGEsのRAGEへの接着を阻害する作用F3、といったAGEs等阻害性のうち、少なくともいずれかを有することを、主たる構成とする。備えるAGEs等阻害性は、AGEs産生阻害作用F1、AGEs中間体産生阻害作用F2、またはAGE-RAGE接着阻害作用F3のいずれであっても、またこれらの二つであっても、また全てであっても、本発明に該当する。

40

【0022】

本発明AGEs等阻害性ネギ属植物製組成物10において、AGEs中間体産生阻害作用F2は、3-DG(3-デオキシグルコソン)産生阻害作用とすることができる。なお、図2に、3-DGを中間体とするAGEs産生メカニズムを示す。本発明AGEs等阻

50



害性ネギ属植物製組成物 10 は上述のように構成されるため、これを摂取することにより、AGEs 産生阻害作用 F1、AGEs 中間体産生阻害作用 F2、または AGE-RAGE 接着阻害作用 F3 という AGEs 等阻害性による作用の少なくともいずれかが、あるいは二つが、または全てが、生体内でなされる。かかる作用により、AGEs 産生が阻害されたり、または AGEs の RAGE への接着が阻害され、生体内でのカルボニルストレスが抑制され、それにより AGEs 関連疾患の予防・治療の効果が得られる。

【0023】

本 AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物 10 の形態は、飲食品、または固体状もしくは液体状のエキス（抽出物）であるものとするができる。エキスは食品であるものを含む。ニンニクを原料とする場合、飲食品としては、黒ニンニク（これに、琥珀ニンニク等が含まれることは、背景技術記載の通りである）、飲料を含む黒ニンニクの二次加工品が広く含まれる。

10

【0024】

また、本発明に係るネギ属植物としては、下記 < A > に列挙したものがいずれも含まれる。後述する実施例はニンニクについての例だが、ネギ属植物全般に広く該当すると考えられるからである。

< A > タマネギ、エシャロット、ニンニク、ラッキョウ、ツリーオニオン、アサツキ、ネギ（ナガネギ、青ネギ）、ワケギ、チャイブ、ニラ、ヤグラネギ、白ネギ、リーキ、ノビル、ギョウジャニンニク、その他のネギ属植物

【0025】

また、本発明に係る原料ネギ属植物としては、発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理済みのものを用いることとする。ニンニクの場合、黒ニンニクがこれに該当する。上記各処理の少なくともいずれかがなされたネギ属植物を原料とすることにより、その中には外因性の AGEs が多く含有されることになり、したがって本発明の効果を十分に得られるからである。

20

【0026】

本発明の、エキス、飲食品またはその他の製品形態をとる AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物には、発酵処理またはメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理済みニンニク（すなわち、黒ニンニク）であって、「黒」、「琥珀」、「発酵」または「熟成」の少なくともいずれかの語を「ニンニク」の語に付した表示が付されているものも該当する。また本 AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物は、固形分として原料とするネギ属植物以外のものが含まれていない特徴を備えた構成とすることもできる。

30

【0027】

図 3 は、本発明の AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法の基本構成を示すフロー図である。図示するように本方法は、以上述べた AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物 310 を製造する方法であって、原料ネギ属植物 31 を発酵処理過程 P1 またはメイラード反応処理過程 P2 の少なくともいずれかの処理過程に供し、その後濃縮処理過程 P3 に供することを、主たる構成とする。

【0028】

かかる構成により本製法では、原料ネギ属植物 31 に発酵処理過程 P1 における発酵処理、またはメイラード反応処理過程 P2 におけるメイラード反応処理の少なくともいずれかの処理がなされ、その後濃縮処理過程 P3 に供されることによって濃縮され、最終的に AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物 310 が製造される。

40

【0029】

図 4 は、本発明の AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法の別の構成を示すフロー図である。図示するように本発明製造方法は、図 3 に示した構成に加え、濃縮処理過程 P3 の後に乾燥処理過程 P4 を設けたフローとすることができる。かかるフローによれば、原料ネギ属植物 41 は濃縮処理過程 P3 までの各過程による処理を経た後、乾燥処理過程 P4 にて乾燥処理され、最終的に AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物 410 が製造される。

50

## 【 0 0 3 0 】

乾燥処理過程 P 4 における乾燥処理としては、温風乾燥、熱風乾燥、フリーズドライ（凍結乾燥処理）など任意の乾燥方法を用いることができるが、スプレードライ（噴霧乾燥処理）は除外するものとするができる。スプレードライではシクロデキストリン等のホスト分子を用いてゲスト分子である A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物を包摂する必要があり、その分純度が低くなってしまふ。そこで、この乾燥法を用いないことで、純度の高い、あるいは固形分として原料ネギ属植物以外を含まない組成物 4 1 0 を得ることができる。

## 【 0 0 3 1 】

以上説明した通り、本発明によれば、

- ・ A G E s 生成阻害用 A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物
- ・ A G E s の中間体の生成阻害用 A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物
- ・ A G E s の R A G E への接着阻害用 A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物

の各飲食品用途発明に係る組成物を得ることができる。もちろん、これら各用途のうちの二つの用途、または全ての用途を持つ A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物であってもよい。また、これらの組成物を用いてなる飲食品もまた、本発明の範囲内である。

## 【 0 0 3 2 】

さらに、以上説明した A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物（上記製造方法によるものを含む）や、それを用いた飲食品であつて、下記 < D 1 > ~ < D 4 > のうち、少なくともいずれかの旨の表示が付されているものも、本発明の範囲内である。

- < D 1 > A G E s 生成阻害用である旨
- < D 2 > A G E s の中間体の生成阻害用である旨
- < D 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用である旨
- < D 4 > 固形分として原料とするネギ属植物以外のものが含まれていない旨

## 【 0 0 3 3 】

なお、以上説明した全ての A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物発明、A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物製造方法、および飲食品発明において、A G E s 等阻害性ネギ属植物製組成物中の有効成分として Normeconin、または 5 - Hydroxymethyl furfural ( 5 - HMF ) の一方、または双方が含有されているものも、本発明の範囲内である。また、

- < N 1 > A G E s 生成阻害用
- < N 2 > A G E s の中間体の生成阻害用
- < N 3 > A G E s の R A G E への接着阻害用

の少なくともいずれかに用いるための A G E s 阻害用 Normeconin も本発明の範囲内であり、この A G E s 阻害用 Normeconin は、黒ニンニク等のネギ属植物由来のものとすることができる。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 3 4 】

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明がかかる実施例に限定されるものではない。なお、本発明完成に至る研究過程の一部を説明することによって、実施例に替える。

研究テーマ：黒ニンニクに含まれる R A G E 阻害活性成分の検索

第 1 章 黒ニンニクエキスの A G E s 産生阻害活性の検討第 1 節 黒ニンニクエキスの A G E s 産生阻害活性の検討

## ( 1 ) 黒ニンニクエキスの抽出と結果

黒ニンニク 2 0 0 g にエタノール 5 0 0 m L を加え、黒ニンニクが浸る状態で 2 4 時間冷浸を行った後、ろ過および濃縮した。この操作を 3 回繰り返した後、ろ過、濃縮し乾燥させたものを黒ニンニクエキスとした。この時黒ニンニクエキスは 6 2 . 4 6 g 得られ、収率は  $6 2 . 4 6 \text{ g} / 2 0 0 \text{ g} \times 1 0 0 = 3 1 . 2 \%$  であつた。

## (2) 実験方法

D-グルコース (Glucose, 和光純薬株式会社) および牛血清アルブミン (BSA, Sigma-Aldrich Co., LTD.) を各々 10%、1% となるように 1 × PBS (リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.0) に溶解したものを BSA-Glucose 溶液とした。また、10% DMSO (ジメチルスルホキシド) 含有 1 × PBS にて 483 μg/μL、48.3 μg/μL、4.83 μg/μL、0.483 μg/μL に調製した黒ニンニクエキスを試料とした。無菌操作下において、BSA-Glucose 溶液 900 μL とサンプル溶液 100 μL を混合し、60℃、湿度 100% にて 4 週間インキュベーションした。

## 【0035】

産生された AGEs 量は蛍光強度法 (励起波長: 375 nm、吸収波長: 440 nm) にて、10 倍希釈した混合溶液を 1 週間ごとに測定し、下記の計算式により阻害率を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - (F_{\text{sample}} - F_{\text{sample Blank}}) / (F_{\text{control}} - F_{\text{normal}})] \times 100$$

F control: PBS

F sample: 試料溶液を加えた glucose - BSA 溶液

F sample Blank: 試料溶液 (インキュベーション無し)

F normal: Glucose - BSA 溶液 (インキュベーション無し)

## 【0036】

## (3) 結果・考察

グルコースおよび牛血清アルブミンにおけるメイラード反応において産生する AGEs に対する黒ニンニクエキスの阻害作用について検討した結果を図 5 に示す。これは、黒ニンニクエキスの AGEs 産生阻害活性の阻害率推移を吸光度により示したグラフである。図示するように、陽性対照薬として用いた 300 μM ケルセチンの抑制作用は、反応開始時から添加していた場合、1 週間後では 4.2%、2 週間後では 13.9%、3 週間後では 12.4%、4 週間後では 13.4% の阻害作用を認めた。一方、かかる対照群の AGEs 産生量に比較して、黒ニンニクエキス 483 μg/μL を反応開始時から添加していた場合には、反応開始の 1 週間後で 83%、2 週間後からは 100% の極めて強い AGEs 産生阻害作用が認められた。

## 【0037】

この阻害作用は用量依存的であり、48.3 μg/μL では反応開始 1 週間後で 37%、2 週間後からは 50% 程度の阻害作用を認めたが、4.83 μg/μL では反応開始 1 週間後では抑制は認められなかった。そして反応開始 2 週間後で 16% の阻害作用が認められたが、反応開始 3 週間後からは阻害作用はほとんど認められなかった。また、0.483 μg/μL ではいずれの測定時間においても阻害は認められなかった。以上の通り、黒ニンニクエキスは用量依存的に AGEs 産生に対する強い阻害活性があることが認められた。

## 【0038】

第 2 節 黒ニンニクエキスの 3-デオキシグルコソン産生阻害活性の検討 — HPLC による中間生成物 3-デオキシグルコソンの定量

## (1) 試料調製方法

上記第 1 節と同様の反応条件において、各濃度に調整した黒ニンニクエキス試料 100 μ および PBS 900 μL に内標準物質として 0.005% 2,3-butanedione (ジアセチル) 5 μL を加えた後、3-デオキシグルコソン (3-DG) を誘導体化するために、0.1% ジアミノナフタレン (DAN) 10 μL を加え、4 で 14 時間反応させた。これに酢酸エチル 4 mL を加えて、15 分間振とう、静置させて反応生成物を抽出、上清 3.5 mL を蒸発乾固した後、メタノール 150 μL にて再溶解したものを HPLC (高速液体クロマトグラフィー) サンプルとした。

## 【0039】

## (2) 装置および分析条件

検出器； SPD - 20AD (SHIMADZU)  
 送液ポンプ； LC - 20AD (SHIMADZU)  
 脱気ユニット； DGU - 20A3R (SHIMADZU)  
 カラム； COSUMOSIL 5PE - MS 4.6 x 250 mm (Nacal Tesque, Kyoto, Japan)  
 移動相； アセトニトリル：メタノール：50 mMリン酸水溶液 = 20：20：60  
 流速； 1.0 mL/min  
 検出波長； 268 nm

【0040】

(3) 結果・考察

10

グルコースおよび牛血清アルブミンにおけるメイラード反応において産生するAGEs産生経路における中間体である3-DGに対する黒ニンニクエキスの阻害作用について検討した結果を図6に示す。これは、3-DG産生阻害活性を、3-DG産生量の推移により示したグラフである。図示するように、黒ニンニクエキス無添加の対照群では反応開始1週間後に127 μMの3-DGの生成が認められたのに対し、黒ニンニクエキス483 μg/μLを反応開始時から添加していた場合には、反応開始の1週間後で0.08 μM、2週間後からは1.0 μM以下の極めて強いAGEs産生阻害作用が認められた。

【0041】

この阻害作用は用量依存的であり、48.3 μg/μLでは反応開始1週間後で26.5 μM、2週間後からは16 μM程度の阻害作用を認めた。また、4.83 μg/μLおよび0.483 μg/μLでは反応開始1週間後で約80 μM程度の産生量であった。しかし、反応開始4週間後には対照群での3-DG産生量は低下してきたため、用量依存的な阻害は認められなかった。これは、3-DGは反応開始1週間後をピークとし産生されるが、その後、反応中間体として消費されてAGEsに変換されたためと考えられる。本結果は、第1節で得られた阻害率の結果とも相関性が認められたため、黒ニンニクエキスには3-DGの産生を抑制することでAGEsの生成を阻害する作用があると結論付けられた。

20

【0042】

第3節 黒ニンニクエキスのRAGE反応性AGEs阻害活性 E L I S A法によるRAGE反応性AGEs阻害活性の検討

30

RAGE反応性AGEs阻害活性を測定するにあたり、コスモバイオ社(COSMO BIO Co., LTD.)製の「Aging/Glycation Assay Kit Series, RAGE Reactive AGEs Assay Kit, Glyceraldehyde」を使用した。

【0043】

(1) 実験方法

(i) 試料の調製

付属の検体希釈液を用いて試料を溶解し、0.45 μmメンブランフィルター(Nacal Tesque, Inc., Kyoto, Japan)を用いてろ過した後、検体希釈液で黒ニンニクエキスは483 μg/μL、48.3 μg/μL、4.83 μg/μL、0.483 μg/μLに、陽性対照薬であるアミノグアニジンは20 mMに調製した。

40

【0044】

(ii) 洗浄液の調製

付属の洗浄液を超純水にて10倍希釈して使用した。

(iii) 発色液の調製

発色用タブレット1個を発色液調製用緩衝液5 mLに入れ、完全に溶解させた。なお、この操作は発色液添加直前に調製を行った。

【0045】

(iv) RAGE反応性AGEsの測定

50

1) . 20 mM アミノグアニジン溶液、および試験試料液 ( control は検体希釈液 ) を 50  $\mu$  L / well 用いた。

2) . 100 mM グリセルアルデヒド ( GA ) 溶液を 50  $\mu$  L / well 添加し、BSA 固層化プレートにシールし密封した。

3) . 湿潤状態下の 37 インキュベーターにて 24 時間静置し固相化 BSA を糖化させた。

4) . 反応溶液を捨て、洗浄液 200  $\mu$  L / well で 3 回洗浄した。

5) . ブロッキング液 100  $\mu$  L / well を添加して室温にて 1 時間静置した。

6) . ブロッキング液を捨て、洗浄液 200  $\mu$  L / well で 3 回洗浄した。

【 0046 】

7) . Recombinant Receptor of AGEs Fc ( RAGE - FC ) 溶液 50  $\mu$  L / well を添加して室温にて 1 時間静置した。

8) . RAGE - FC 溶液を捨て、洗浄液 200  $\mu$  L / well で 3 回洗浄した。

9) . ALP 標識プロテイン A / G を 50  $\mu$  L / well を添加して室温にて 1 時間静置した。

10) . ALP 標識プロテイン A / G を捨て、洗浄液 200  $\mu$  L / well で 3 回洗浄した。

11) . 発色液を 100  $\mu$  L / well を添加して 30 分間室温にて静置後、波長 405 nm にて吸光度を測定 ( Immuno Mini NJ - 2300 , BIO TEK , LTD . ) した。

( v ) 統計処理

有意差の検定は、Sigma Stat statistical software ver . 2 . 03 ( SPSS Inc . , IL , U . S . A ) を用いて行った。測定値は平均値  $\pm$  標準誤差で示し、Kruskal - Wallis ANOVA Rank Test (  $p < 0 . 05$  ) により有意差を検討した。

【 0047 】

( 2 ) 結果・考察

黒ニンニクエキスの RAGE 反応性 AGEs 阻害活性に対する阻害作用について検討した結果を、図 7 に示す。これは、RAGE 反応性 AGEs 産生量を吸光度により示したグラフである ( \*  $P = 0 . 002$  ) 。図示するように、対照群での RAGE 反応性 AGEs 産生量は 0 . 554 であったが、陽性対照薬のアミノグアニジンではその産生量は 0 . 442 であり、約 20 % の阻害を認めた。一方、黒ニンニクエキス 483  $\mu$  g /  $\mu$  L では、その産生量は 0 . 335 であり、約 40 % の強い阻害が認められ、陽性対照薬のアミノグアニジンに比較して 2 倍もの強い阻害活性が認められた。

【 0048 】

この阻害作用は用量依存的であり、48 . 3  $\mu$  g /  $\mu$  L では RAGE 反応性 AGEs の産生量は 0 . 5095 であって阻害は約 10 % と減弱し、4 . 83  $\mu$  g /  $\mu$  L でも同様の結果であった。以上の結果より、黒ニンニクエキスは AGEs と RAGE の結合を阻害することを介して、もしくはグリセルアルデヒドがタンパク質中のアミノ酸残基との結合を阻害することを介して、AGEs 産生を抑制し、結合を抑制するという機序が考えられた。

【 0049 】

第 2 章 黒ニンニクエキスの分画と精製

( 1 ) 実験方法

第 1 章第 1 節で述べた黒ニンニクエキスの調製方法にて得られた黒ニンニクエキス 59 . 23 g を精製水 200 mL に溶解した。この溶液を分液ロートに入れ、ジエチルエーテル 200 mL を加えた後、15 分間振とうし、得られたエーテル溶液を黒ニンニクエーテル層分画 ( 収率 : 3 . 99 % ) とした。この操作を順番に酢酸エチル、ブタノールでも繰り返し行い、各々得られた分画を黒ニンニク酢酸エチル層分画 ( 収率 : 1 . 90 % ) 、黒ニンニクブタノール層分画 ( 収率 : 2 . 36 % ) とし、最終的に残った水溶液を黒ニンニ

10

20

30

40

50

ク水層分画（収率：91.73%）とした。図8に分液ポートによる分画操作後の黒ニンニクエキス分画図を示す。得られた各サンプルは、濃縮し乾燥させた。また、4層に分画したものを各移動相で順次HPLCを用いて分離・精製（パッドカラム5C18-AR-II：コスモシル株式会社，Mighty sil GP250-10：関東化学株式会社，C30-UG：野村化学株式会社，TOSOH-ODS120-T：東ソー株式会社）した。

【0050】

(2) 結果・考察

図9、10、11には、それぞれエーテル層、酢酸エチル層、ブタノール層および水層における、各分画・精製図を示す。これらに示す通り、AGES産生阻害活性成分の探索を目的として、黒ニンニク原末から193のフラクションを得た。

10

【0051】

第3章 黒ニンニク含有成分の同定

(1) 実験方法

各種分析方法、すなわち、 $^1\text{H}$ -NMR（プロトン各磁気共鳴）、 $^{13}\text{C}$ -NMR（炭素13各磁気共鳴）、EI-MS（電子イオン化質量分析）、NOE（オーバーハウザー効果差スペクトル）を用いて、各種サンプルの重さを測定後調製し、計測した（重メタノール、重クロロホルム等を使用した）。

【0052】

(2) 結果・考察

今回の分画により得た化合物群について、AGES産生阻害活性によりスクリーニングを行い、活性が認められた画分を単離・精製し、構造決定を行った。このうち、同定できた化合物は下記の3つであった。

20

5-HMF (5-Hydroxymethyl furfural) (図12)

5-HMFA (5-Hydroxymethyl-2-furanoic acid) (図13)

Normeconin (6,7-Dihydroxy-4-methyl-1(3H)-isobenzofuranone) (図14)

以下、順に構造決定方法について考察した。

【0053】

初めに、 $^1\text{H}$ -NMRデータを参考に比較することで、化学構造の基本構造について推定した。図15は、5-HMFに関して $^1\text{H}$ -NMRから得られたスペクトルを示すグラフである(270.05MHz, CD3OD)。図示するように、9.52ppmからアルデヒド基を同定、7.373から7.360ppm、および6.575から6.561ppmにかけて見られる1H分のsingle tシグナルが2つ観測されていることからフラン環を同定、4.598ppmからメチレン基を同定し、5-HMFに代表的な構造が同定された。これらの結果とマススペクトルによる分子量等の結果とを合わせて、下記2文献における文献値を比較し、5-HMFであると決定した。

30

文献：

• Liang T., Wei F., Lu Y., Kodani Y., Nakada M., Miyakawa T., Tanokura M., J. Agric. Food. Chem., 63, 683-691 (2015).

40

• Matsui T., Kudo A., Tokuda S., Matsumoto K., Hosoyama H., J. Agric. Food. Chem., 58, 10876-10879 (2010).

【0054】

次に、図16は、5-HMFA (5-Hydroxymethyl-2-furanoic acid) に関して $^1\text{H}$ -NMRから得られたスペクトルを示すグラフである(399.65MHz, CD3OD)。図示する構造と下記文献の文献値を比較し、これが5-HMFに類似の構造であり、図15に示したグラフと比較して9.52ppmのアルデヒド基特有のピークがなくなったことから、5-HMFが酸化されたことにより生成した5-HMFA (5-Hydroxymethyl-2-furanoic acid) で

50

あると決定した。

文献：

• Murai N., Yonaga M., Tanaka K., *Org. Lett.*, 14, 1278 1281 (2014).

【0055】

最後に、図17は、Normeconin (6, 7-Dihydroxy-4-methyl-1(3H)-isobenzofuranone) に関して<sup>13</sup>C-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである(67.80 MHz, CD3OD)。図示するように、NormeconinについてはMSスペクトルを用いて解析を行なった結果、ピークがm/z 166に観測された。このことから、推定した化合物の分子量は166であり、MSスペクトルの結果と合致した。

10

【0056】

また、図18は、Normeconinに関してEI-MSによる解析結果を示すグラフである(Low, MeOH)。図示するように、炭素数は8個であり、172.9 ppmのピークからエステル基、また、70.7 ppmのピークからメチレン基の構造があることがわかり、フタリド骨格を有する化合物であることが推定された。

【0057】

次に、図19は、Normeconinに関して<sup>1</sup>H-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである(270.05 MHz, CD3OD)。図示するように、芳香族領域に認められる7.142から7.113、6.837から6.808、の2H分のdoubletシグナルが8 Hzでカップリングしたことから、これらがオルト位の関係にあることがわかった。

20

【0058】

最後に、図20は、Normeconinに関してNOE-<sup>1</sup>H-NMRから得られたスペクトルを示すグラフである(270.05 MHz, CD3OD)。図示するように、5.2 ppm付近に照射して測定したところ、6位にプロトンが付くことがわかった。以上より、下記各文献の文献値と比較して、Normeconin (6, 7-Dihydroxy-4-methyl-1(3H)-isobenzofuranone) であると決定した。

文献：

• Andrew M., Norma T., Mark F., Scott C., David M., *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 6084 6094 (1997).

30

• Thomas P., Olof T., *Acta. Chem. Scand.*, B30, 397 402 (1976)

【0059】

#### 第4章 黒ニンニク含有成分のRAGE反応性AGEs阻害活性の検討

##### (1) 実験方法

同定された黒ニンニク含有成分について、第1章第3節(E L I S A法によるRAGE反応性AGEs阻害活性の検討)における「(i v) RAGE反応性AGEsの測定」に示した方法の通りに検討した。

【0060】

##### (2) 結果・考察

NormeconinのRAGE反応性AGEs阻害活性に対する阻害作用について検討した。図21は、NormeconinのRAGE反応性AGEs阻害活性に対する阻害作用を示すグラフである(\*P = 0.043)。同一濃度にて陽性対照薬の10 mM アミノグアニジンとNormeconinとを比較した。その結果、図示するように対照群での吸光度は0.39であった。それに対して陽性対照薬10 mM アミノグアニジンでは0.31となり、対照群よりも強い阻害作用、対照群と比較して20%の阻害作用が確認された。

40

【0061】

一方、10 mM Normeconinでは0.27であり、陽性対照薬の10 mM アミノグアニジンよりも強い阻害作用、対照群と比較して30%の阻害作用が認められた。

50

すなわち Normeconin の阻害作用は、10 mM アミノグアニジンの 1.5 倍であった。以上より、黒ニンニクエキスが RAGE 反応性 AGEs 阻害活性を示す活性本体の一つが、Normeconin であることが明らかとなった。

#### 【0062】

Normeconin の RAGE 反応性 AGEs 阻害活性を示した機序について考察する。本化合物は、フタリド骨格により非常に安定な構造であることに加え、分子内に窒素原子を含んでいないことから、グリセルアルデヒドとの直接的な求核反応等によりクロスリンカー的役割を果たし、それによって活性を示す、という機序は考えにくい。しかし、カテコール骨格を部分構造に含んでいることから、一般的にフェノール類よりも酵素やたんぱく質との吸着、結合性が強い傾向にある。このため、RAGE のリガンド結合部位やサブユニット中の疎水性ポケット等と相互作用することで、受容体のコンフォメーション変化を起こし、そのことが AGEs との結合を阻害する機序となっている可能性がある。また、タンパク質中のアミノ酸残基と Normeconin の構造に含まれるヒドロキシ基や酸素原子との相互作用により、グリセルアルデヒドとの結合が円滑に進行しない環境を作り出すことで、反応を抑制するという可能性も考えられる。

10

#### 【0063】

### 第5章 総括

蛍光強度法による AGEs 産生阻害活性、および 3-DG の定量の結果から、黒ニンニクエキスは、3-DG 産生を用量依存的に産生阻害することで AGEs 産生を抑制すると考えられた。加えて、ELISA 法による RAGE 反応性 AGEs 阻害活性の結果より、黒ニンニクエキスは用量依存的な阻害作用を示し、陽性対象薬のアミノグアニジンよりも強い阻害作用を示したことから、RAGE との結合を阻害できた、もしくは AGEs とグリセルアルデヒドのアミノ酸残基との結合を阻害した可能性もある。

20

#### 【0064】

また、黒ニンニク含有成分の分画・精製を行い、構造決定に至った 3 つの化合物のうち、Normeconin において RAGE 反応性 AGEs 阻害活性が認められた。このことから、本化合物は黒ニンニクエキスに含まれる RAGE 反応性 AGEs 阻害活性を示す活性本体の一つであることが分かった。その他、5-HMF については、PI3-Act 系 (PI3K / Akt Signaling、PI3K / Akt シグナル伝達系) の活性化による eNOS (内皮型一酸化窒素合成酵素) の産生に続く NO (一酸化窒素) 産生に起因する血管拡張作用も報告されている (下記文献) が、これは、黒ニンニクに期待される冷え、肩こり、疲労回復効果を示す活性物質の一つであると考えられる。

30

文献：

・ O'Donnell G., Poeschl R., Zimhony O., Gunaratnam M., Moreira JB., Neidle S., Evangelopoulos D., Bhakta S., Malkinson JP., Boshoff HI., Lenaerts A., Gibbons S.  
J. Nat. Prod., 72, 360-365 (2009).

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0065】

本発明の AGEs 等阻害性ネギ属植物製組成物、その製造方法、飲食品、および AGEs 阻害用 Normeconin によれば、特に、黒ニンニクがカルボニルストレスを抑制できること、それにより AGEs 関連疾患の予防・治療に効果が期待できる。したがって本発明は、AGEs 関連疾患の効果的な予防・治療を実現できるとともに、黒ニンニクの付加価値向上、普及拡大に資することができる。また以上の効果は、広くニンニクなどのネギ属植物を原料とする組成物等に敷衍できると考えられ、ネギ属植物の付加価値向上、普及拡大に資することも期待される。さらに、黒ニンニク含有成分の一つが Normeconin であることを明らかにし、その AGE 反応性 AGEs 阻害活性を初めて確認できたことにより、黒ニンニク等の付加価値等拡大のみならず、AGEs 阻害という Normeconin の新たな用途を提供するものでもある。したがって本発明は、農産加工分野、食品製造分野、健康産業分野、その他関連する全分野において、産業上利用性が高い発明である。

40

50



【符号の説明】

【0066】

10、310、410 AGEs等阻害性ネギ属植物製組成物

31、41 原料ネギ属植物

F1 AGEsの生成(産生)を阻害する作用(AGEs産生阻害作用)

F2 AGEsの中間体の生成(産生)を阻害する作用(AGEs中間体産生阻害作用)

F3 AGEsのRAGEへの接着を阻害する作用(AGE-RAGE接着阻害作用)

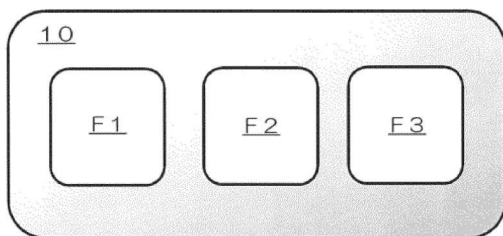
P1 発酵処理過程

P2 メイラード反応処理過程

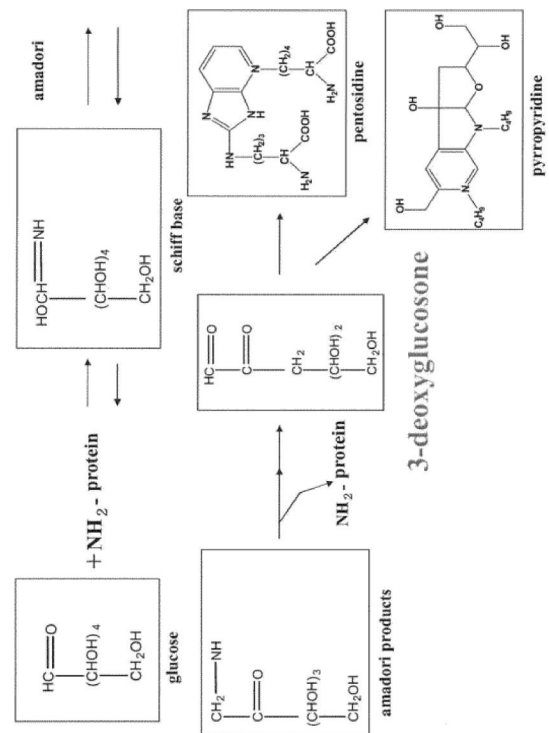
P3 濃縮処理過程

P4 乾燥処理過程

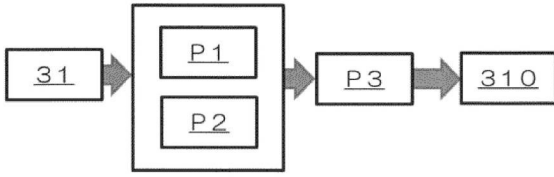
【図1】



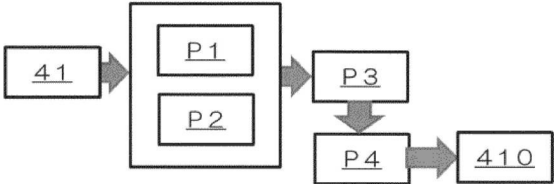
【図2】



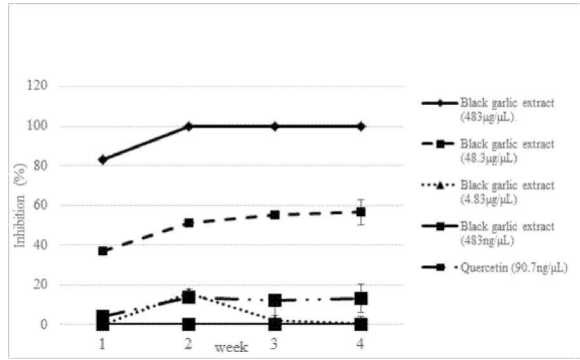
【 図 3 】



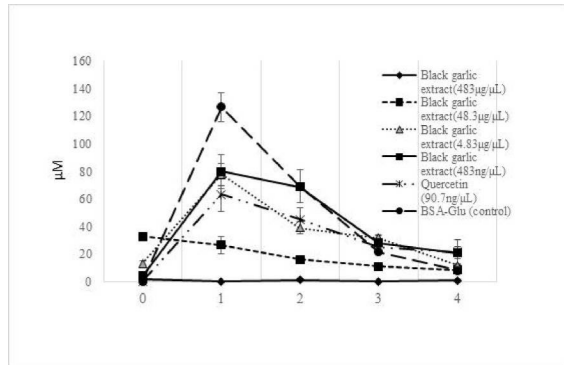
【 図 4 】



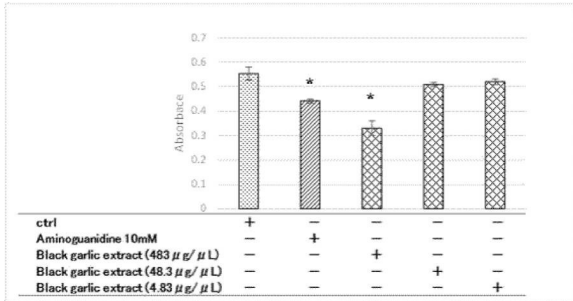
【 図 5 】



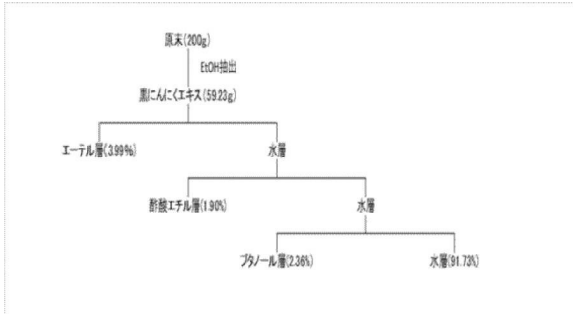
【 図 6 】



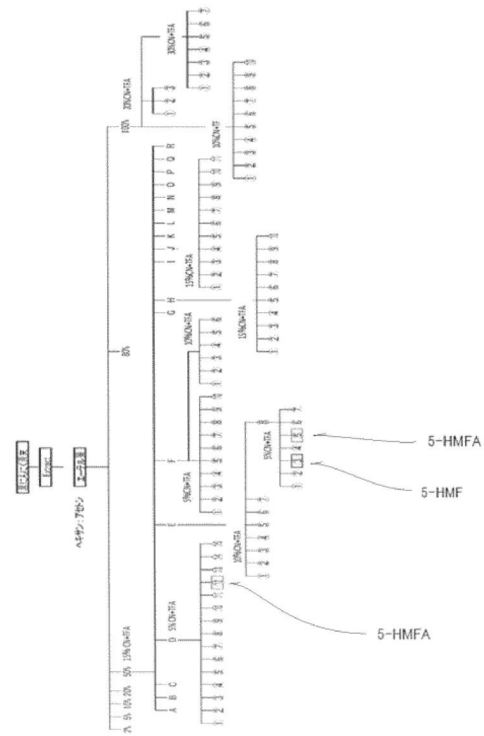
【 図 7 】



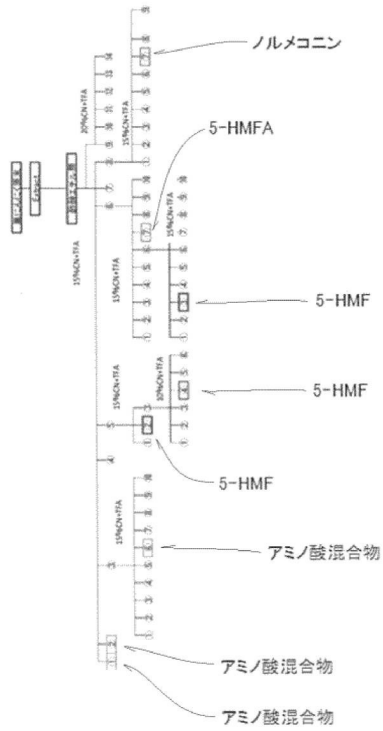
【 図 8 】



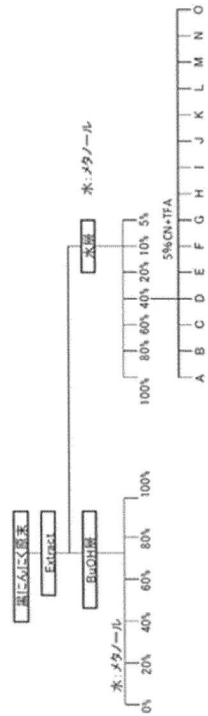
【 図 9 】



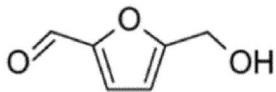
【図 10】



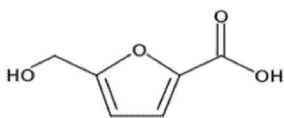
【図 11】



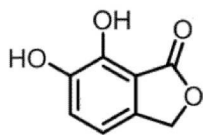
【図 12】



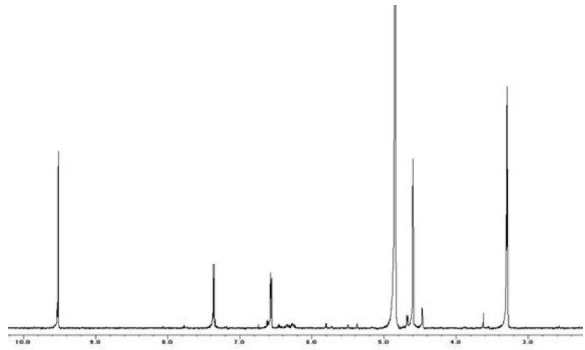
【図 13】



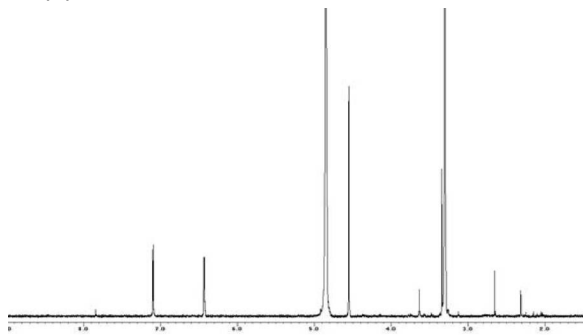
【図 14】



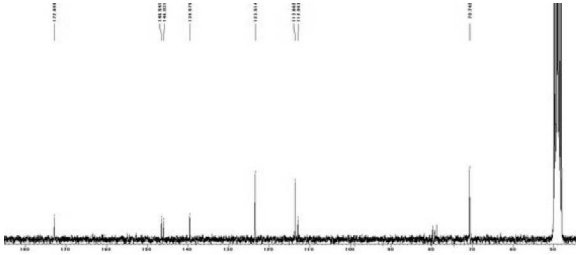
【図 15】



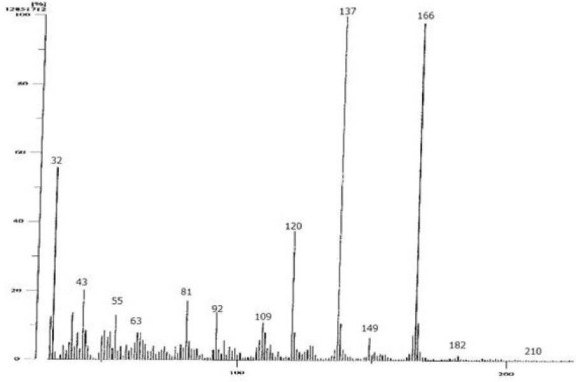
【図 16】



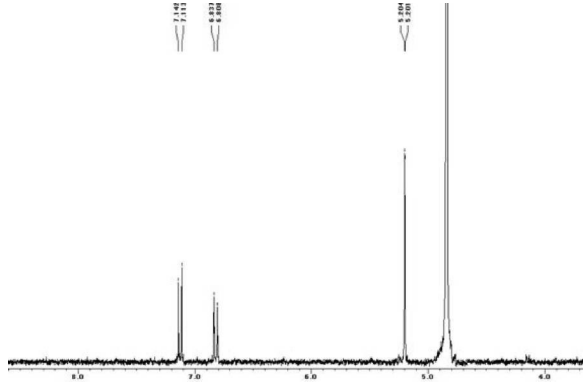
【 17 】



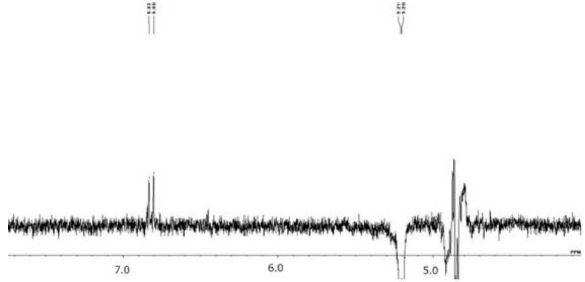
【 18 】



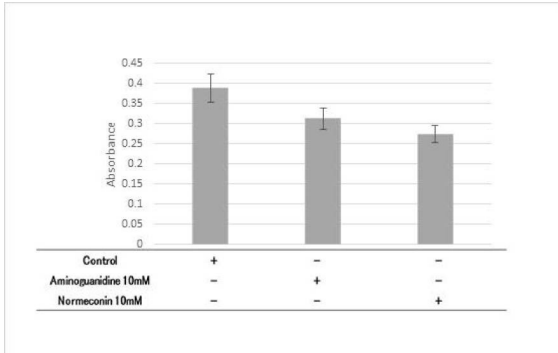
【 19 】



【 20 】



【 21 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
	A 2 3 L 19/00	C
	A 2 3 L 19/00	A

F ターム(参考) 4B016 LC07 LG05 LG09 LG10 LG16 LP02  
4B018 LB10 MD48 MD55 MD61 ME10 ME14 MF01 MF06 MF13  
4C088 AB87 AB88 BA10 CA06 MA16 MA34 MA52 NA14 ZC02 ZC35  
ZC52