

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6145353号
(P6145353)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 36/03 (2006.01)	A 6 1 K 36/03
A 6 1 K 35/747 (2015.01)	A 6 1 K 35/747
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 2 3 L 33/10 (2016.01)	A 2 3 L 33/10
A 2 3 K 20/00 (2016.01)	A 2 3 K 20/00

請求項の数 8 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2013-161787 (P2013-161787)	(73) 特許権者	504214626
(22) 出願日	平成25年7月17日 (2013.7.17)		濱田 奈保子
(65) 公開番号	特開2015-21002 (P2015-21002A)		東京都港区港南4-5-7 東京海洋大学 内
(43) 公開日	平成27年2月2日 (2015.2.2)	(73) 特許権者	597106806
審査請求日	平成28年1月21日 (2016.1.21)		日本・バイオ株式会社 東京都世田谷区梅丘3丁目14番14号
		(74) 代理人	100086689
			弁理士 松井 茂
		(74) 代理人	100157772
			弁理士 宮尾 武孝
		(72) 発明者	濱田 奈保子
			長野県北佐久郡軽井沢町軽井沢663-1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブの血圧上昇抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Lactobacillus 属を用いた発酵ヒダカコンブを有効成分として含有する血圧上昇抑制剤。

【請求項2】

Lactobacillus 属を用いた発酵ヒダカコンブを含有する組成物を有効成分として含有する血圧上昇抑制剤。

【請求項3】

請求項1又は請求項2に記載の血圧上昇抑制剤を含有する血圧上昇抑制用機能性食品。

【請求項4】

請求項1又は請求項2に記載の血圧上昇抑制剤を含有する血圧上昇抑制用食品素材。

【請求項5】

請求項1又は請求項2に記載の血圧上昇抑制剤を含有する血圧上昇抑制用ペットフード。

【請求項6】

請求項1又は請求項2に記載の血圧上昇抑制剤を含有する血圧上昇抑制用飼料。

【請求項7】

請求項1又は請求項2に記載の血圧上昇抑制剤を含有する血圧上昇抑制用飲食用組成物。

【請求項8】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の血圧上昇抑制剤を含有する 血圧上昇抑制用医薬用組成物

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は *Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブを有効成分として含有する血圧上昇抑制作用に関する。

本発明は、血圧上昇抑制機能性食品または食品素材、内服剤として、ヒト若しくはヒト以外の動物に与えられる医薬品（動物用治療薬も含む）用、飲食品用、および飼料用またはペットフードの組成物を意味する。

10

【背景技術】

【0002】

高血圧は生活習慣病の一つである。高血圧は原因が分かっている二次性高血圧と原因がわからない本態性高血圧の二つがあるが、日本における高血圧患者の約 90% が本態性高血圧である。血圧は、心拍出量と末梢血管抵抗その他さまざまな因子によって調節されており、なかでも、レニン・アンジオテンシン系は、血圧の制御に関して大きな役割を担っている。肝臓でアンジオテンシノーゲンが合成され、アンジオテンシノーゲンは腎臓で合成されるレニンによってアンジオテンシン I に変換される。さらにアンジオテンシン変換酵素（ACE）によってアンジオテンシン II へと変換される。アンジオテンシン II がアンジオテンシン II 受容体に結合することで、血管平滑筋が収縮し、結果として血圧が上昇する。高血圧は自覚症状がないため、放置してしまうことが多く、動脈硬化、心臓病、脳卒中を引き起こすことがある。

20

【0003】

前述の高血圧については、これを解消するための医療品が種々提案され、既に数多く市販されている。治療剤としては、腎臓でのナトリウムと水の再吸収を抑制し循環血液量を減少させて血圧を下げる利尿薬、交感神経の受容体の血管収縮作用を遮断し血管を拡張させ血圧を下げる遮断薬、交感神経の受容体の心臓収縮力強化や昇圧ホルモン産生などの作用を遮断して血圧を下げる遮断薬、カルシウムイオンの細胞内への取り込みを抑制し血管を拡張することで血圧を下げるカルシウム拮抗薬、強力な昇圧ホルモンであるアンジオテンシン II の生産を減少させ、血圧を下げるアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬、昇圧ホルモンであるアンジオテンシン II が作用する受容体の働きを阻害することで血圧を下げるアンジオテンシン II 受容体阻害薬（ARB）が用いられるが、これら医療用合成製剤は、処方箋を必要とするため、簡易には入手できないばかりか、製剤の投与又は服用により種々の副作用を伴うことがある。従って、高血圧の治療に使用される抗高血圧剤として、入手が容易でかつ副作用ができるだけ少ない天然物起源のものが求められている。

30

天然物起源の高血圧の改善剤としては、ACE 阻害を示すノリ、カツオ、ワカメなどのペプチド、副交感神経を刺激し血管平滑筋が弛緩され血圧が降下作用を示す杜中葉抽出物、ノルアドレナリンの分泌を抑制し血圧降下作用を示す - アミノ酪酸を配合特定保健用食品が知られており、これらは特定保健用食品としての承認を得ている。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の課題は、日常の食生活において容易に入手および摂取でき、血圧上昇を抑制することができる、副作用の少ない予防・改善用機能性食品又は食品素材や、飼料を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

50

本発明者は、上述の目的を達成するために、ヒダカコンブの機能性成分と *Lactobacillus* 属の機能性に着目し、鋭意研究を行った結果、*Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブ 80% EtOH 抽出物に血圧上昇抑制作用があることを見出すに至った。

【0006】

本発明は、このような知見に基づいて完成されたものである。すなわち、本発明の血圧上昇抑制作用は、いずれも発酵ヒダカコンブを有効成分することを特徴とするものである。

【0007】

Lactobacillus 属を用いた発酵ヒダカコンブに含まれる血圧上昇抑制作用を有する物質がいかなる化合物であるかについては、未だその詳細は不明であるが、発酵ヒダカコンブから 80% EtOH 抽出により溶出させた成分が血圧上昇抑制作用を発揮することは実験的に確かめられている。したがって、*Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブは、そのまま本発明の血圧上昇抑制作用の構成成分とすることで予防・改善が発現する。

10

【0008】

即ち本発明が提供するものは以下の通りである。

【0009】

[1] *Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブを有効成分として含有する。

【0010】

[2] *Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブを含有する組成物を有効成分として含有する血圧上昇抑制剤。

20

【0011】

[3] [1] または [2] に記載の血圧上昇抑制剤からなる機能性食品。

【0012】

[4] [1] または [2] に記載の血圧上昇抑制剤からなる食品素材。

【0013】

[5] [1] または [2] に記載の血圧上昇抑制剤からなるペットフード。

【0014】

[6] [1] または [2] に記載された血圧上昇抑制剤からなる飼料。

30

【0015】

[7] [1] ~ [4] に記載の血圧上昇抑制剤を含有する飲食用組成物。

【0016】

[8] [1] ~ [4] に記載の血圧上昇抑制剤を含有する医薬用組成物。

【発明の効果】

【0017】

本発明の血圧上昇抑制剤、またはこれを含有する組成物は、体内でアンジオテンシン I を、昇圧作用を持つアンジオテンシン II に変換する ACE の活性を抑制することから、血圧上昇抑制作用が期待できる。従って、血圧上昇抑制に有用である。さらに、食経験のある材料から本発明の剤または組成物を製造することが可能であるので、摂取しても安全である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本明細書の血圧上昇抑制剤は、*Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブを有効成分として含有する ACE 害作用を有する剤および組成物である。上記の化合物の含有量は限定されないが、血圧上昇抑制作用を発揮できる範囲で含まれていれば良い。

【0019】

本発明の飲食用組成物は、上記の血圧上昇抑制剤を含有する組成物であり、これらを一般的な食品に混合したものである。また、公知の食品として適当な担体や助剤などを使用してカプセル剤、錠剤、顆粒剤など服用しやすい形態にしたものでもよい。ここに言う飲食

50

用とは、例えば、一般食品、保健機能食品（特定保健用食品、栄養機能食品）、健康食品、栄養補助食品、ペットフードなどである。ここにいう一般食品とは、飲料、乳製品、発酵乳、乳酸菌飲料、加工乳、コーヒー飲料、ジュース、アイスクリーム、飴、ビスケット、ウェハース、ゼリー、スープ、麺類、を含むがそれに限定されるものではない。好ましくは飲料、乳製品、加工乳、発酵乳、乳酸菌飲料、ウェハース、ゼリーを含む。

【0020】

本発明の医薬用組成物は、上記の血圧上昇抑制剤を含有する組成物であり、上記剤そのものであってもよいし、所望により医薬的に許容される担体を含有する組成物であってもよい。その用途は限定されず、例えば一般用医薬品（OTC）など容易に入手可能な医薬品又は医薬部外品などが挙げられる。医薬用組成物の形態は限定されず、例えば、丸薬剤、液剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル錠剤、トローチ剤、シロップ剤、ドライシロップ剤などである。好ましくはカプセル剤、液剤、エリクシル、錠剤、カシェ、座薬などとするほうが良い。また医薬的に許容される担体とは、経口、経腸、経皮、および皮下投与のために好適である任意の材料であり、例えば水、ゼラチン、アラビアガム、ラクトース、微結晶性セルロース、スターチ、ナトリウムスターチグリコレート、燐酸水素カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、コロイド性二酸化ケイ素などが挙げられる。

10

【0021】

Lactobacillus 属を用いた発酵ヒダカコンブならびに該組成物は、血圧上昇抑制剤の有効成分として配合されるが、血圧上昇抑制剤として製剤化する場合、剤形としては、粉末状、顆粒状、錠剤状等、任意の剤形を採用することができる。その際、保存や取り扱いを容易にするために、デキストリン、シクロデキストリン等のキャリア、保存料、その他任意の助剤を必要に応じて配合することができる。またその形態は限定されず、飲食用組成物、医薬用組成物を含む。これらの含有量は限定されないが、血圧上昇抑制作用に対して効果が発揮できる範囲で含まれていれば良い。

20

【0022】

前記血圧上昇抑制剤は、ACEの活性を阻害してアンジオテンシンIIが生成されないようにする。

【0023】

Lactobacillus 属を用いた発酵ヒダカコンブを有効成分として含有する本発明の血圧上昇の予防・改善用機能性食品又は食品素材は、前記本発明の血圧上昇の予防・改善剤を飲食品原料の一部として用いたり、あるいは製造工程又は製造後に添加・配合することにより得ることができる。かかる機能性食品としては特に制限されるものではなく、調味類、ふりかけ類、菓子類、スナック類、麺類、魚肉練り製品、乳製品、飲料などを具体的に例示することができる。

30

【0024】

実施例1

以下に本発明をより詳細に説明する為に実施例を挙げるが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【0025】

サンプルは500 μ m程度に粉碎したヒダカコンブ粉末5gを100mlのpH5.0の1/30Mリン酸緩衝液に加え、pHを5.0に調整後、50mgのセルラーゼを加え45、120rpmで振とう処理を行った。1~2日間処理した後に、pH6.8に調整し加圧加熱滅菌を行った。海藻酵素処理液に*Lactobacillus* 属を1ml植菌し、37で静置培養した。4日間培養後凍結乾燥を行い、発酵ヒダカコンブ1gに100mlのエタノールを添加し、室温で3時間振とうしたものの上清をサンプルとした。

40

【0026】

Lactobacillus 属を用いた発酵ヒダカコンブのACE活性阻害作用に関する検討

Lactobacillus 属を用いた発酵ヒダカコンブのACE活性への影響について、試験管内での酵素反応系を用いて検討した。蒸留水で希釈した各濃度のサンプル溶液1

50

0 μ l を添加し全量を 130 μ l / 反応ウェルとした。

【0027】

本試験は(株)同仁化学研究所の ACE Kit - WST を使用した。本試験の反応に用いた溶液(A~C液)は、以下のとおり調製した。A液はキット付属の Substrate buffer である。B液はキット付属の Enzyme B を 2ml の蒸留水で溶解し、溶解した酵素液 1.5ml をキット付属品の Enzyme A に加え溶解した。C液はキット付属の Enzyme C を 3ml の蒸留水で溶解した。同じくキット付属の Coenzyme を 3ml の蒸留水で溶解した。溶解した Enzyme C と Coenzyme をそれぞれ 2.8ml ずつキット付属の Indicator solution に添加した。

10

【0028】

プレート内での ACE 反応は、各濃度に希釈したサンプル 10 μ l、A液 10 μ l と B液 10 μ l を混合し、37 で 1 時間プレインキュベーションした。次に C液 100 μ l を加えて室温で 10 分間インキュベーションすることで実施させた。その後、450nm の吸光度を測定することで ACE 活性阻害を評価した。コントロールは、サンプルの代わりに各サンプルと同等の 80% エタノールを添加した。各試験区には、B液の代わりに A液を添加したブランクを設定した。

阻害率は以下の計算式から求めた。阻害率 = $1 - (\text{サンプルの吸光度} - \text{サンプルのブランクの吸光度}) / (\text{コントロールの吸光度} - \text{コントロールのブランクの吸光度})$ 。コントロールを 100 として溶媒と濃度に関連して、相対的の ACE 阻害率を図 1 に示した。

20

【0029】

ACE 阻害率をもとに 50% 阻害濃度である IC₅₀ 値を算出した。その結果を表 1 に表す。

【0030】

【表 1】

菌株名	IC ₅₀ 値 (μ g/ml)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	177
<i>Lactobacillus brevis</i>	211
<i>Lactobacillus casei</i>	63

30

【0031】

表 1 から *Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブに ACE 活性阻害が認められた。なかでも最も ACE 活性阻害が高かったのは *Lactobacillus casei* (*L. casei*) を用いた発酵ヒダカコンブで、IC₅₀ は、63 μ g/ml であった。また発酵前のヒダカコンブ 80% エタノール抽出物における IC₅₀ は、690 μ g/ml であった。したがって、*Lactobacillus* 属を用いた発酵ヒダカコンブは ACE 活性の阻害に有効であることが実証された。

【図面の簡単な説明】

40

【図 1】*L. casei* を用いた発酵ヒダカコンブによる効果を示すグラフであり、コントロールを 100 とする相対的 ACE 阻害率を示した。

【図 2】アンジオテンシン I を負荷させたマウスに本発明の発酵ヒダカコンブ (2000 mg/kg) を投与したときの血圧上昇値を示す図である。

【図 3】アンジオテンシン I を負荷させたマウスに本発明の発酵ヒダカコンブ (1000、2000、4000 mg/kg) を投与したときの血圧上昇値を示す図である。

【図 4】SHR に本発明の発酵ヒダカコンブを投与したときの血圧変化を示す図である。

【0032】

実施例 2

マウスに発酵ヒダカコンブを単回投与したときの血圧上昇抑制効果

50

条件：6週齢のd d Yマウス（雄性）を用い、1群8匹で単回投与を実施した。試料は発酵ヒダカコンブを2000mg/kg体重となるように調製した。試料を経口投与し、投与30分後にアンジオテンシンI（150μg/kg；和光純薬工業）を腹腔内に投与した。

【0033】

試料の調製法は以下の通りである。L. caseiを用いて4日間発酵させた発酵ヒダカコンブを凍結乾燥し、その乾燥粉末を80%エタノールで振盪させながら3時間抽出した。その抽出液からエタノールを除去したものを蒸留水に溶解させ濃度を調整した。

【0034】

10
血压測定には、マウス・ラット用無加温型非観血式血压計（BLOOD PRESSURE MONITOR FOR MICE & RAT Model MK-2000）を使用し、マウスの尾動脈収縮期血压（SBP）を測定した。マウスの尾部をカフで締め付け、Tail-cuff法によりSBPを6回測定し、その平均値を求めた。アンジオテンシンI投与前後のSBPの差から、血压上昇値を求めた。

【0035】

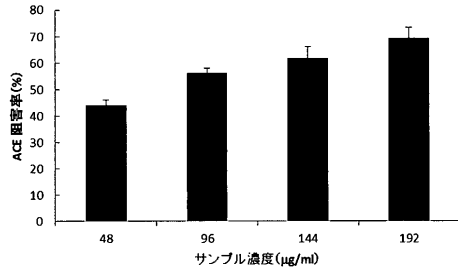
20
試料2000mg/kg投与時において、発酵ヒダカコンブ投与群は蒸留水投与のコントロール群に対して有意（ $p < 0.001$ ）にアンジオテンシンI負荷による血压上昇を抑制した（図2）。また試料を0、1000、2000、4000mg/kgに調製し、同様に収縮期血压上昇値を求めたところ、2000、4000mg/kgにおいて有意（ $p < 0.05$ ）に血压上昇を抑制し、濃度依存性もみられた（図3）。

【0036】

実施例3

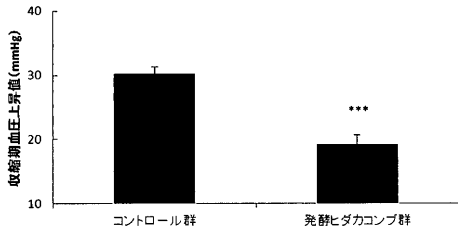
高血圧自然発症ラット（SHR）に発酵ヒダカコンブを連続投与したときの血压変化
条件：6週齢のSHR（雄性）を用い、1群6匹で連続投与を実施した。飼料に5%の発酵ヒダカコンブを混ぜて自由摂取させ、35日間飼育した。対照群、発酵ヒダカコンブ群とともに飼料には食塩を1%となるように添加した。今回調製した発酵ヒダカコンブを投与することにより、投与35日目には有意（ $p < 0.001$ ）に血压上昇を抑制していることがわかった（図4）。

【 ① 】



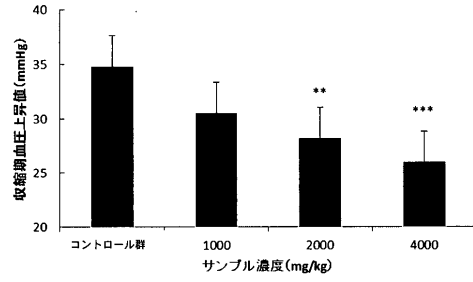
mean ± S.E.

【 ② 】



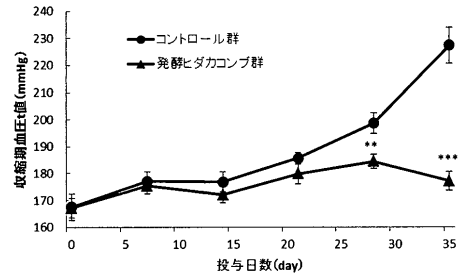
mean ± S.E., *** $p < 0.001$ vs コントロール群

【 ③ 】



mean ± S.E., ** $p < 0.01$ vs コントロール群, *** $p < 0.001$ vs コントロール群

【 ④ 】



mean ± S.E., ** $p < 0.01$ vs コントロール群, *** $p < 0.001$ vs コントロール群

フロントページの続き

- (72)発明者 二瓶 奈々子
東京都八王子市散田町1 - 2 - 16 島崎ビル203
- (72)発明者 矢澤 一良
神奈川県藤沢市鵠沼松が岡3 - 19 - 9
- (72)発明者 三沢 宏
東京都八王子市暁町2 - 23 - 18

審査官 鳥居 福代

- (56)参考文献 国際公開第2006/093267(WO, A1)
特開2013-039039(JP, A)
特開2006-320257(JP, A)
特開2010-252660(JP, A)
特表2007-529206(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 36/00 - 36/9068
A23L 33/10
A23K 20/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)