

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 4 月 7 日 (07.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/030233 A1

- (51) 国際特許分類: **A61K 35/78**, 31/352, 31/7048, A61P 1/16, 3/10, 9/10, 17/00, 17/16, 19/02, 31/00, 31/04, 31/12, 39/06, C07D 311/62, C07H 17/065
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 2 0 号 神谷町 MT ビル 1 9 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012951
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2004 年 9 月 6 日 (06.09.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-336062 2003 年 9 月 26 日 (26.09.2003) JP
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ニチレイ (NICHIREI CORPORATION) [JP/JP]; 〒1048402 東京都中央区築地 6 丁目 1 9 番 2 0 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 花村 高行 (HANAMURA, Takayuki) [JP/JP]; 〒2618545 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP). 萩原 俊彦 (HAGIWARA, Toshihiko) [JP/JP]; 〒2618545 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 研究開発部内 Chiba (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ACTIVE OXYGEN SCAVENGING AGENT AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 活性酸素消去剤及びその製造方法

(57) Abstract: An active oxygen scavenging agent; and a process for producing the same. In particular, an active oxygen scavenging agent comprising as an active ingredient a product of decomposition of anthocyanin pigment derived from acerola; and a process for producing the same. More particularly, an active oxygen scavenging agent comprising a product of decomposition of anthocyanin pigment, the decomposition performed with vitamin C and/or metal; and a process for producing the same.

(57) 要約: 活性酸素消去剤及びその製造方法を提供する。アセロラ由来のアントシアニン系色素分解物を有効成分として含有する活性酸素消去剤及びその製造方法、並びにビタミン C 及び／又は金属で分解したアントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤及びその製造方法。



WO 2005/030233 A1

明 細 書

活性酸素消去剤及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、アントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 活性酸素とは、反応性に富んだエネルギー状態にある酸素で、具体的には、 OH^- (ヒドロキシラジカル)、 O_2^- (スーパーオキシドアニオン) 及び H_2O_2 (過酸化水素) を指す。これらは生体内において種々の反応に関与し、疾病や老化の原因となり得ることが報告されている。

[0003] 例えば、生体内に細菌やウイルスが侵入すると、当該局所に食細胞である好中球、単球、マクロファージが遊走し、侵入した細菌やウイルスに対し食作用を開始し、引き続き O_2^- を生産して、この O_2^- が殺菌、殺ウイルス及び殺感染細胞作用を及ぼし、生体の自己防衛に当たる。しかし、 O_2^- が過剰に存在すると、正常な細胞や組織に対して障害を引き起こし、関節リウマチ、動脈硬化、糖尿病、肝炎、腎炎等の疾病、また、皮膚炎、シミ、シワ、湿疹、ソバカス等、美容上の障害となる諸症状が引き起こされる。

[0004] 近年、上記諸疾患の改善及び予防のために、活性酸素消去活性を有する物質を、薬学的、食品科学的又は化粧品科学的な見地から、天然物、醗酵物又は化成品からスクリーニングする作業が活発に行われ、その結果、かなりの数の活性酸素消去剤が知られるようになった。

[0005] 例えば、特許文献1では紅花の葉及び／又は茎由来の水溶性抗酸化剤が、特許文献2ではスモモ、セイヨウナツユキソウ、ベンガルカラタチ、ミラクルベリー、ヤーバサンタ、レモングラスから選ばれる1種以上の植物抽出物を含有する活性酸素消去剤及び化粧品組成物が、特許文献3では木棉及び／又は黄花倒水蓮からの抽出物を有効成分として含有する活性酸素消去剤が開示されている。

[0006] 一方、アントシアニン系色素は、植物等に多く存在する色素であり、その鮮やかな

色調を利用して着色料として用いられている。また、アントシアニン系色素は活性酸素消去活性を有することが知られており、サプリメント等の健康食品や飲料に多く利用されている。アントシアニン系色素は、一般的に不安定な色素であり、特にアルカリ条件下において、C環が開環し分解され、退色が起こる。また、温度や光等の影響によっても容易に分解され退色が起こるが、酸性下では比較的安定である。

- [0007] キントラノオ科ヒイラギトラノオ属の熱帯果実であるアセロラは、アントシアニン系色素を多く含む植物である。アセロラの果実中は酸性であるため、光や熱を与えなければ、アントシアニン系色素は安定なはずである。しかし、アセロラには、アントシアニン系色素の他にビタミンCが果実100g当たり約1,500mgと非常に多く含まれ、その影響で、光や熱を与えなくてもアントシアニン系色素が容易に分解し退色する。また、アセロラ中に少量含まれる鉄分によりさらに分解が促進されることがわかっている。アセロラ中で起こるビタミンC及び／又は金属によるアントシアニン系色素の分解・退色は、pH、温度、光等による分解・退色とはメカニズムが異なるが、そのメカニズムが詳細に調べられた例はほとんどなく、アントシアニン系色素の活性酸素消去活性が分解・退色後に保持されているのかどうかも知られていない。

特許文献1:特開2002-38151号公報

特許文献2:特開2003-183120号公報

特許文献3:特開2003-246747号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明の目的は、活性酸素消去剤及びその製造方法を提供することである。
- [0009] 本発明の目的は、アセロラ由来のアントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤及びその製造方法を提供することである。
- [0010] 本発明の目的はさらに、アントシアニン系色素をビタミンC及び／又は金属で分解したアントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤及びその製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0011] 本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討した結果、アセロラ由来のアン

トシアニン系色素分解物が活性酸素消去活性を有していることを見出した。

- [0012] 本発明者らはまた、アントシアニン系色素をビタミンC及び／又は金属で分解した分解物が活性酸素消去活性を有していることを見出した。
- [0013] 本発明者らはさらに、これらの分解物の分解が進むにつれ、活性酸素消去活性が上昇することを見出した。
- [0014] アントシアニン系色素の分解については、これまでにアルキルペルオキシラジカルをアントシアニン系色素に反応させることにより、アントシアニン系色素が分解してプロトカテキュ酸を生じさせる方法が知られている (Lipids, Vol.31, No.12 (1996), pp1259-1263)。プロトカテキュ酸は強い活性酸素消去剤であり、従ってこのような手段によりアントシアニン系色素を分解した場合は、その分解物も強い活性酸素消去活性を保持することが予想される。
- [0015] しかし、本発明では、アントシアニン系色素の分解の手段として、アントシアニン系色素にビタミンC及び／又は金属を作用させており、また本発明のアントシアニン系色素分解物について成分分析を行ったところ、プロトカテキュ酸は生成されていないことがわかった。このことから、上記の公知文献と本発明とでは、アントシアニン系色素分解のメカニズムが異なることが明らかである。さらに、アントシアニン系色素分解物の分解が進むにつれ活性酸素消去活性が上昇することは、これまでに見出されていないかった。
- [0016] 本発明は、以下の発明を包含する。
- [0017] (1)アセロラ由来のアントシアニン系色素分解物を有効成分として含有する活性酸素消去剤。
- [0018] (2)アセロラ由来のアントシアニン系色素を分解することを含む、活性酸素消去剤の製造方法。
- [0019] (3)アセロラ由来の果汁又はその抽出物もしくは処理物を30℃～90℃で処理して得られる処理物を有効成分として含有する活性酸素消去剤。
- [0020] (4)アントシアニン系色素をビタミンC及び／又は金属で分解したアントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤。
- [0021] (5)アントシアニン系色素をビタミンC及び／又は金属で分解することを含む活性酸

素消去剤の製造方法。

- [0022] 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2003-336062号の明細書及び／又は図面に記載された内容を包含する。

発明の効果

- [0023] 本発明の活性酸素消去剤は、活性酸素消去活性を有するアントシアニン系色素分解物を含有しており、活性酸素に関係する種々の疾病や老化を予防・治療するのに有効である。
- [0024] 本発明はまた、従来用いられていなかったアントシアニン系色素分解物の用途を提供するものである。
- [0025] 本発明で提供されるアセロラ由来の活性酸素消去剤は、天然成分由来のため、副作用の問題が少ない。

図面の簡単な説明

- [0026] [図1]図1は、アセロラ果汁の退色により生成されるアントシアニン系色素分解物の活性酸素消去活性の経時変化を示した図である。
- [図2]図2は、アセロラから精製したアントシアニン系色素をビタミンC及び鉄との共存下で退色させた時に生成されるアントシアニン系色素分解物の活性酸素消去活性の経時変化を示した図である。
- [図3]図3は、標品のシアニジンクロリドをビタミンC及び鉄との共存下で退色させた時に生成されるアントシアニン系色素分解物のDPPHラジカル消去活性の経時変化を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0027] アセロラ由来のアントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤及びその製造方法

本発明は、アセロラ由来のアントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤及びその製造方法に関する。

- [0028] 本発明で用いるアセロラの生産地や品種は特に制限されないが、生産地としては、例えば沖縄、ブラジルが挙げられる。
- [0029] 本発明の活性酸素消去剤として、アセロラ果実を搾汁して得られるアセロラ果汁を

そのまま用いることができるが、果実を破砕、粉碎等により粉末化処理したものを用いてもよい、その抽出物又は処理物として用いてもよい。

[0030] 抽出物又はその処理物として用いる場合、抽出に用いる有機溶媒は、親水性有機溶媒が好ましい。親水性有機溶媒として、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、グリセリン、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等のアルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、1,4-ジオキサン、ピリジン、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミド、酢酸等の公知の有機溶媒が挙げられる。特にメチルアルコールを用いて抽出することが好ましい。上記の親水性有機溶媒、特にメチルアルコール及びエチルアルコールは、水との混合物として用いることが好ましい。

[0031] 抽出条件は特に限定されないが、好ましい温度範囲は5℃～90℃、特に20℃～40℃である。抽出時間は1時間～10時間程度、特に1時間～2時間程度が好ましく、また抽出に使用する溶媒量は原料に対して質量比で1倍量～20倍量が好ましい。

[0032] 抽出後、ろ過あるいは遠心分離により抽出残渣を除き抽出液を得る。この抽出液は必要に応じて濃縮処理を行うこともできる。

[0033] このようにして得られたアセロラ果汁又はその抽出物もしくは処理物にはアントシアニン系色素、ビタミンC及び鉄が含まれており、ビタミンC及び／又は金属を添加しなくても、アントシアニン系色素をビタミンC及び／又は鉄により分解させて退色させることができる。しかし、アセロラ果汁又はその抽出物もしくは処理物に、ビタミンC及び／又は金属を添加してもよい。

[0034] 分解の条件は、限定されるわけではないが、例えば分解温度として30℃～90℃が好ましい。また分解時間は分解温度により適宜変更でき、例えば分解温度が30℃といった低温条件であれば10日～50日、分解温度が90℃といった高温条件であれば1時間～5時間程度が好ましい。特に好ましい分解条件は、30℃～50℃の低温度下で、10日～50日である。

[0035] アントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤及びその製造方法

本発明者らは、一般的なアントシアニン系色素をビタミンC及び／又は金属で分解して得られる分解物も活性酸素消去活性を有し、さらにこの分解物も、分解が進むにつれ、活性酸素消去活性が上昇することを見出した。

- [0036] アントシアニン系色素としては、シアニジン、マルビジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、ペラルゴニジンあるいはそれらをアグリコンとする配糖体が挙げられるが、特にシアニジンあるいはその配糖体が好ましい。
- [0037] ビタミンCとしては、通常入手できるものを用いればよい。
- [0038] 分解に用いる金属としては、アントシアニン系色素の分解を促進するものであればよく、特に限定されるわけではないが、例えば、鉄や銅等の金属塩が挙げられ、特に鉄が好ましい。
- [0039] アントシアニン系色素を、ビタミンC又は金属のいずれかで分解することもできるが、ビタミンC及び金属の両方を用いて分解することが好ましい。
- [0040] ビタミンCの添加量は、アントシアニン系色素の5倍～100倍、特に50倍～100倍の量であることが好ましい。金属の添加量は、アントシアニン系色素の1/10～1/2の範囲、特に1/10～1/4の範囲であることが好ましい。
- [0041] 分解の条件は、特に限定されるわけではないが、上述のアセロラ由来のアントシアニン系色素の分解と同様に行うことができる。
- [0042] 本発明のアントシアニン系色素分解物は、ビタミンCや金属との混合物のままで、活性酸素消去剤として使用できるが、製造後、残存するビタミンCや金属等を取り除く精製工程を行ってもよい。精製処理の方法として、順相又は逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられるが、特に逆相クロマトグラフィーの使用が好ましい。また、これらの方法を組み合わせて用いることもできる。
- [0043] 用途
- 本発明の活性酸素消去剤は、アセロラの果汁、抽出物や精製物、又はアントシアニン系色素分解物を、公知の医薬用担体と組み合わせて製剤化することができる。投与形態としては、特に制限はなく、必要に応じ適宜選択されるが、一般には錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、液剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤、エリキシル剤等の経口剤、又は注射剤、点滴剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、貼付剤、軟膏剤等の非経口剤として使用される。本発明の活性酸素消去剤の添加量は、添加対象物の種類、使用形態等の諸条件によって異なるが、通常、添加対象物全体に対し0.01質量%～10質量%の範囲で用いることが好ましい。

- [0044] 本発明の活性酸素消去剤の投与量は、患者の年令、体重、疾患の程度、投与経路により異なるが、経口投与では、アセロラの抽出物乾燥粉末として、通常1日10mg〜3000mgであり、投与回数は、通常、経口投与では1日1回〜3回である。
- [0045] 経口剤は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等の賦形剤を用いて常法に従って製造される。
- [0046] この種の製剤には、適宜前記賦形剤の他に、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を使用することができる。
- [0047] 結合剤の具体例としては、結晶セルロース、結晶セルロース・カルメロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルメロースナトリウム、エチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、デキストリン、アルファー化デンプン、部分アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、プルラン、ポリビニルピロリドン、アミノアルキルメタクリレートコポリマーE、アミノアルキルメタクリレートコポリマーRS、メタクリル酸コポリマーL、メタクリル酸コポリマー、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルアルコール、アラビアゴム、アラビアゴム末、寒天、ゼラチン、白色セラック、トラガント、精製白糖、マクロゴールが挙げられる。
- [0048] 崩壊剤の具体例としては、結晶セルロース、メチルセルロース、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロース、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、クロスカルメロースナトリウム、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、部分アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、トラガントが挙げられる。
- [0049] 界面活性剤の具体例としては、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシシル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール、セスキオレイン酸ソルビタン、トリオレイン酸ソルビタン、モノステアリン酸ソルビタン、モノパルミチン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、ポリソルベート、

モノステアリン酸グリセリン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウロマクロゴールが挙げられる。

[0050] 滑沢剤の具体例としては、コムギデンプン、コメデンプン、トウモロコシデンプン、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、含水二酸化ケイ素、軽質無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、乾燥水酸化アルミニウムゲル、タルク、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、リン酸水素カルシウム、無水リン酸水素カルシウム、シヨ糖脂肪酸エステル、ロウ類、水素添加植物油、ポリエチレングリコールが挙げられる。

[0051] 流動性促進剤の具体例としては、含水二酸化ケイ素、軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウムが挙げられる。

[0052] また、本発明の活性酸素消去剤は、液剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤、エリキシル剤として投与する場合には、矯味矯臭剤、着色剤を含有してもよい。

[0053] 本発明の活性酸素消去剤はまた、常法に従って、化粧水、乳液、クリーム、パック、洗浄料等のスキンケア化粧料、口紅、ファンデーション等のメークアップ化粧料、頭髮用化粧料等に添加することができる。

[0054] 本発明の活性酸素消去剤はさらに、常法に従って、食品、飴、トローチ、ジャム、チューインガム、飲料等に添加することができる。

[0055] また、本発明の活性酸素消去剤を抽出物乾燥粉末としてそのまま使用することもできる。さらに、いわゆる特定保健用食品（例えば、動脈硬化予防食品）等とすることもできる。

[0056] 本発明の活性酸素消去剤の製造に用いるアセロラ、アントシアニン系色素、ビタミンC及び鉄等の金属は現在までに化粧料、食品等に供されており、安全性は確立されている。

実施例

[0057] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0058] 実施例1

アセロラの果汁を貯蔵により退色させ、その色素分解物について活性酸素消去活性を評価した。

[0059] [試料の調製]

アセロラをガーゼで搾汁し、遠心ろ過後に得られた果汁に、2時間ペクチナーゼを作用させて粘性をなくした。得られた液をフィルター滅菌後、無菌的に40℃で約1ヶ月間インキュベートした。この処理により、アセロラ果汁の赤色は徐々に退色していき、5日後には完全に退色した。インキュベート0、1、3、7、14、21、35日後の退色果汁を、水溶性成分をC18カートリッジカラム(BAKERBOND spe(登録商標)C18 ディスポーザルカラム)に供し、蒸留水で十分に洗浄後、C18カラム吸着画分を0.2% TFA/メタノール溶液で溶出した。得られた溶出液をエバポレーターで濃縮後、カラムに供した退色果汁と同量の蒸留水で再溶解した。以上の操作により得られた試料、及びそれを2倍希釈、4倍希釈した試料について活性酸素消去活性を評価した。

[0060] [活性酸素消去活性の評価]

活性酸素消去活性は、キサントニン-キサントニンオキシダーゼ反応系によるスーパーオキシドアニオンラジカルの消去活性で評価し、ラジカルの検出はESRを用いた。

[0061] DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) 15 μ l、50mMリン酸緩衝液(pH7.4) 50 μ l、試料50 μ l、2mMヒポキサントニン/リン酸緩衝液溶液50 μ l、0.4unit/mlキサントニンオキシダーゼ (XOD) / リン酸緩衝液50 μ lを混合し、XOD添加後45秒後にESR測定を行った。

[0062] なお、ESR装置は日本電子社製 ESR (JES-FR30) を用い、ESRによるスペクトル解析は以下の条件で行った：

磁場掃引幅：335.9 \pm 5mT、磁場変調：0.1mT、増幅率：100、掃引時間2分、応答時間：0.1秒、測定温度：室温。

[0063] 測定結果は図1の通りである。図1より、果汁の分解が進むにつれて、活性酸素消去活性が高くなる傾向が見られた。

[0064] 実施例2

実施例1より、アセロラ果汁において、分解が進むにつれ活性酸素消去活性が高くなる傾向が見られたが、この系ではアントシアニン系色素以外の成分による影響も考えられるため、アセロラからアントシアニン系色素を精製し、色素精製物を用いた単純系で同様の実験を行った。

[0065] アセロラより精製したアントシアニン系色素、ビタミンC、塩化鉄の最終濃度を、アセロラ果実の含有量に従って、それぞれ0.2、10、0.02mg/mlとなるように0.1M 酢酸バッファー (pH3.0) で調製し、40℃で約1ヶ月間インキュベートした。その後、インキュベート0、7、14、21、28、35日後の調製液をC18カートリッジカラムに供し、蒸留水で十分に洗浄後、C18カラム吸着画分を0.2% TFA/メタノール溶液で溶出した。得られた溶出液をエバポレーターで濃縮後、カラムに供した調製液と同量の蒸留水で再溶解した。以上の操作により得られた試料、及びそれを2倍希釈、4倍希釈、8倍希釈、16倍希釈した試料について活性酸素消去活性を評価した。

[0066] 活性酸素消去活性の評価方法は実施例1と同様である。

[0067] 測定結果は図2の通りである。図2より、アセロラ果汁の場合と同様に、色素の分解が進むにつれて、活性酸素消去活性が高くなる傾向が見られた。この実験は単純系で行っており、C18カラムに吸着する成分はアントシアニン系色素分解物に限られる。実際にこの吸着成分についてビタミンC含量を調べたが、ビタミンCは全く検出されなかった。従って、アセロラにおけるアントシアニン系色素は、分解が進むにつれ活性酸素消去活性が高くなることが判った。

[0068] 実施例3

アセロラ果汁中におけるアントシアニン系色素において、分解が進むにつれ活性酸素消去活性が上昇することがわかったが、一般のアントシアニン系色素でも、同様の結果が得られるかどうか検討を行った。

[0069] 標品のシアニジンクロリドを0.075mg/mlの濃度になるように0.1M酢酸バッファー (pH3.0) に溶かし、ビタミンCを10mg/ml、塩化鉄を0.02mg/ml添加したものを40℃でインキュベートし退色させた。その後、C18カートリッジカラムによりビタミンCを除去し、エタノールでアントシアニン系色素分解物を溶出した。得られた溶出液をエバポレーターで濃縮後、濃度が0.25mg/mlの濃度になるように蒸留水で再溶解した。この試料の活性酸素消去活性を以下のようにDPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 法により評価した。

[0070] [活性酸素消去活性の評価]

DPPH法で評価を行った。試料0.5mlに0.1M リン酸緩衝液 (pH6.5) 2.5ml、99% エタ

ノール1.0ml、 5×10^{-4} M DPPH-エタノール溶液1.0mlを混合し室温に放置した。経時的に525nmの吸光度を測定し、ラジカル消去活性を評価した。

[0071] 測定結果は図3に示した通りである。図3より退色前と比較して退色後の方が活性が強いことが判った。

[0072] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

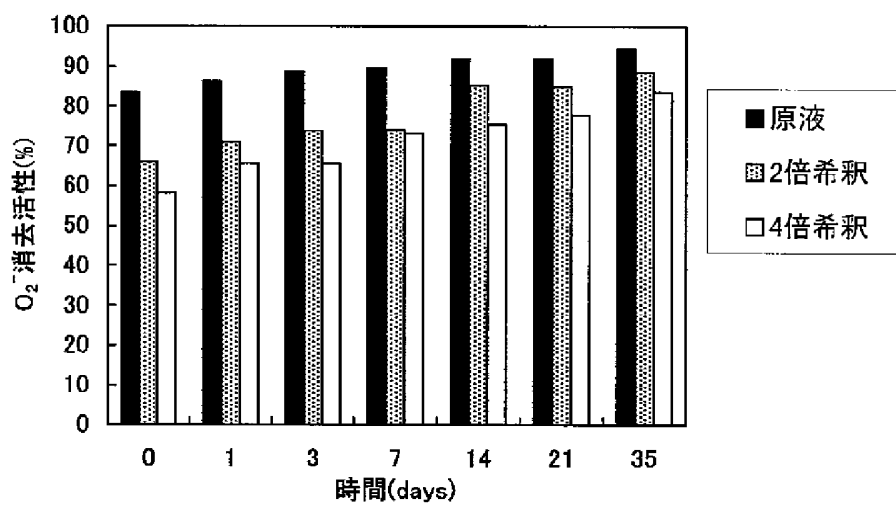
産業上の利用可能性

[0073] 本発明の活性酸素消去剤は、活性酸素に関係する種々の疾病や老化を予防・治療するのに有効である。

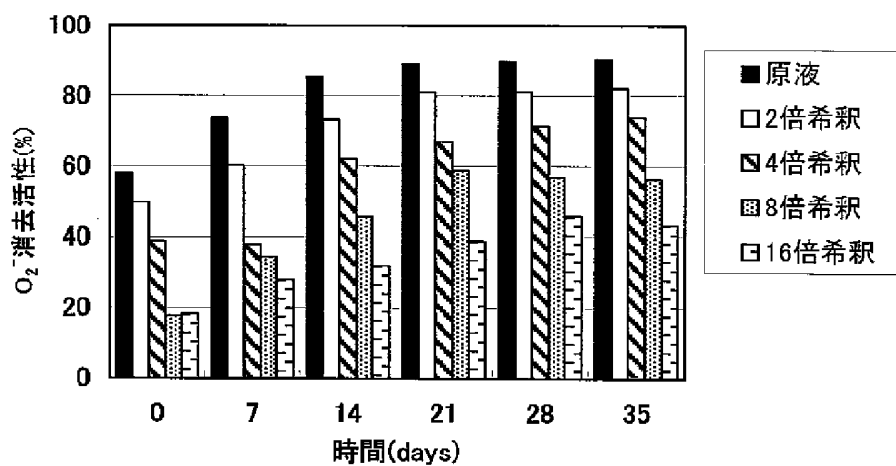
請求の範囲

- [1] アセロラ由来のアントシアニン系色素分解物を有効成分として含有する活性酸素消去剤。
- [2] アセロラ由来のアントシアニン系色素を分解することを含む、活性酸素消去剤の製造方法。
- [3] アセロラ由来の果汁又はその抽出物もしくは処理物を30℃～90℃で処理して得られる処理物を有効成分として含有する活性酸素消去剤。
- [4] アントシアニン系色素をビタミンC及び／又は金属で分解したアントシアニン系色素分解物を含有する活性酸素消去剤。
- [5] アントシアニン系色素をビタミンC及び／又は金属で分解することを含む活性酸素消去剤の製造方法。

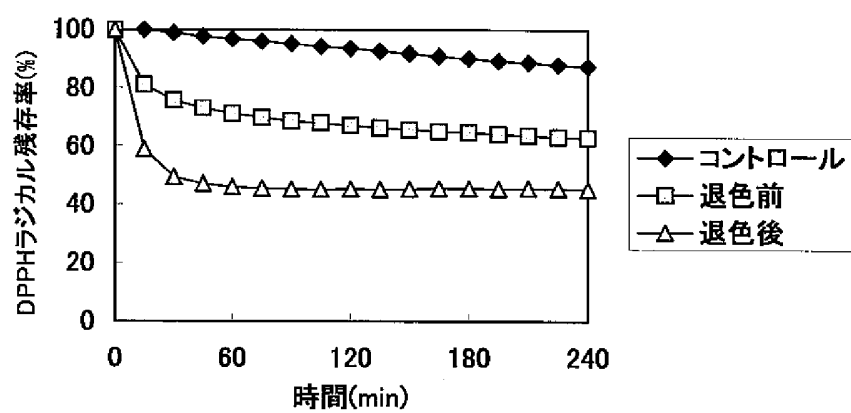
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/78, 31/352, 31/7048, A61P1/16, 3/10, 9/10, 17/00, 17/16,
19/02, 31/00, 31/04, 31/12, 39/06, C07D311/62, C07H17/065

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/78, 31/352, 31/7048, A61P1/16, 3/10, 9/10, 17/00, 17/16,
19/02, 31/00, 31/04, 31/12, 39/06, C07D311/62, C07H17/065

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-508415 A (MICHIGAN STATE UNIVERSITY), 04 March, 2003 (04.03.03), & WO 01/015553 A1 & AU 6801200 A & CN 1384713 T	1-3
Y	JP 9-241637 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 September, 1997 (16.09.97), (Family: none)	1-5
Y	Emanuele MACCARONE et al., Effects of Light on Anthocyanins. Kinetics and Photodegradation Products in Acidic Aqueous Solutions, Annali di Chimica, 1987, Vol.77, No.5, pages 499 to 508, Summary	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October, 2004 (14.10.04)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2004 (02.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012951

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	B. Piffaut et al., Comparative degradation pathway of malvin 3, 5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments, Food Chemisry, 1994, Vol.50, No.2, pages 115 to 120	1-5
Y	Paula Furtado et al., Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins, J.Photochem.Photobiol.A:Chem., 1993, Vol.75, No.2, pages 113 to 118	1-5
Y	JP 2000-176272 A (House Foods Corp.), 27 June, 2000 (27.06.00), Page 2, right column, lines 1 to 12 (Family: none)	4, 5
Y	JP 2001-329186 A (Tomoko SHIMIZU), 27 November, 2001 (27.11.01), Page 3, left column, lines 38 to 47 (Family: none)	4, 5
Y	Nuria Marti et al., Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice, J. the Science of Food and Agriculture, 2002, Vol.82, No.2, pages 217 to 221, Fig. 2	3-5
Y	Takanori TSUDA et al., Oxidation Products of Cyanidin 3-O- β -D-glucoside a Free Radival Initiator, Lipids, 1996, Vol.31, No.12, pages 1259 to 1263	1-5
Y	Yoshimasa NAKAMURA et al., Dihydrochalcones: Evalution as Novel Radical Scavenging Antioxi dants, J.Agric. Food Chemisry, 21 May, 2003 (21.05.03), Vol.51, No.11, pages 3309 to 3312	1-5
Y	Satoshi SOGAWA et al., Protective Effects of Hydroxychalcones on Free Radical-Induced Cell Damage, Biol.Pharm.Bull., 1994, Vol.17, No.2, pages 251 to 256	1-5
Y	JP 7-2640 A (Shadan Hojin Marino Forum 21), 06 January, 1995 (06.01.95), (Family: none)	1-5
Y	Jeoung-Hee Ha et al., 4-Hydroxybenzaldehyde from Gastrodia elata Bl. is avtive in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain, J. Ethnopharmacolgy, Vol. 73, No.1 to 2, pages 329 to 333	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012951

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-179578 A (Noevir Co., Ltd.), 26 June, 2002 (26.06.02), Par. No. [0007] (Family: none)	1-5
Y	JP 2001-504467 A (The Procter & Gamble Co.), 03 April, 2001 (03.04.01), Pages 23, 24 & EP 842606 A1 & WO 98/21307 A1 & DE 69807178 T	1-5
P,A	JP 2003-334023 A (Hiroka Hirosaki Chuo Seika Kabushiki Kaisha), 25 November, 2003 (25.11.03), (Family: none)	3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, 31/352, 31/7048, A61P1/16, 3/10, 9/10, 17/00, 17/16, 19/02, 31/00, 31/04, 31/12, 39/06, C07D311/62, C07H17/065

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/78, 31/352, 31/7048, A61P1/16, 3/10, 9/10, 17/00, 17/16, 19/02, 31/00, 31/04, 31/12, 39/06, C07D311/62, C07H17/065

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-508415 A(ミシガン ステイト ユニヴァーシティー) 2003.03.04&WO 01/015553 A1&AU 6801200 A&CN1384713 T	1-3
Y	JP 9-241637 A(中外製薬株式会社)1997.09.16(ファミリーなし)	1-5
Y	Emanuele MACCARONE et al, Effects of Light on Anthocyanins. Kinetics and Photodegradation Products in Acidic Aqueous Solutions, Annali di Chimica, 1987, Vol. 77, No. 5, pp. 499-508, Summary	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 10. 2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鶴見 秀紀

4 C

8 4 1 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	B. Piffaut et al, Comparative degradation pathway of malvin 3, 5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments, Food Chemisry, 1994, Vol. 50, No. 2, pp. 115-120	1-5
Y	Paula Furtado et al, Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins, J. Photochem. Photobiol. A:Chem., 1993, Vol. 75, No. 2, pp. 113-118	1-5
Y	JP 2000-176272 A(ハウス食品株式会社)2000. 06. 27, 第2頁右欄第1行～12行(ファミリーなし)	4, 5
Y	JP 2001-329186 A(清水智子)2001. 11. 27, 第3頁左欄第38～47行(ファミリーなし)	4, 5
Y	Nuria Marti et al, Influence of storage temperature and ascorbic acid addition on pomegranate juice, J. the Science of Food and Agriculture, 2002, Vol. 82, No. 2, pp. 217-221, Figre. 2	3-5
Y	Takanori Tsuda et al, Oxidation Products of Cyanidin 3-O- β -D-glucoside a Free Radival Initiator, Lipids, 1996, Vol. 31, No. 12, pp. 1259-1263	1-5
Y	Yoshimasa Nakamura et al, Dihydrochalcones: Evalution as Novel Radical Scavenging Antioxidants, J. Agric. Food Chemisry, (2003. May. 21), Vol. 51, No. 11, pp. 3309-3312	1-5
Y	Satoshi Sogawa et al, Protective Effets of Hydroxychalcones on Free Radical-Induced Cell Damage, Biol. Pharm. Bull., 1994, Vol. 17, No. 2, pp. 251-256	1-5
Y	JP 7-2640 A(社団法人マリノフォーラム二十一)1995. 01. 06 (ファミリーなし)	1-5
Y	Jeoung-Hee Ha et al, 4-Hydroxybenzaldehyde from Gastrodia elata Bl. is avtive in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain, J. Ethnopharmacolgy, Vol. 73, No. 1-2, pp. 329-333	1-5
Y	JP 2002-179578 A(株式会社ノエビア)2002. 06. 26, 【0007】(ファミリーなし)	1-5
Y	JP 2001-504467 A(サ、プロクター、エント、キャンブル、カンパニー)2001. 04. 03, p. 23, 24&EP 842606 A1&WO 98/21307 A1&DE 69807178 T	1-5
P A	JP 2003-334023 A(弘果弘前中央青果株式会社)2003. 11. 25(ファミリーなし)	3