

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第6976014号
(P6976014)

(45) 発行日 令和3年12月1日(2021.12.1)

(24) 登録日 令和3年11月11日(2021.11.11)

(51) Int.Cl.

F 1

C 0 7 H	13/08	(2006.01)	C 0 7 H	13/08	C S P
A 6 1 K	31/7024	(2006.01)	A 6 1 K	31/7024	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	8/60	(2006.01)	A 6 1 K	8/60	

請求項の数 7 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2021-66340 (P2021-66340)

(22) 出願日 令和3年4月9日(2021.4.9)

審査請求日 令和3年5月13日(2021.5.13)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 390010124

株式会社ナボカルコスメティックス
東京都千代田区神田神保町3丁目10

(74) 代理人 100205914

弁理士 堀越 総明

(74) 代理人 100162189

弁理士 堀越 真弓

(72) 発明者 セン カ キョウ

中華人民共和国香港九龍清水灣香港科技大学
學術ビル5456室

(72) 発明者 矢代 卓也

東京都千代田区神田神保町3丁目10 株
式会社ナボカルコスメティックス内

最終頁に続く

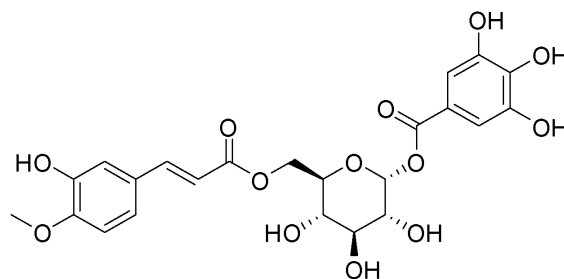
(54) 【発明の名称】 新規ポリフェノール化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物。

【化1】

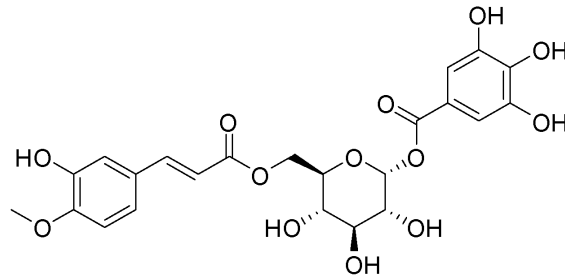


(I)

【請求項2】

下記式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物のみを含有するコーゲン産生促進剤。

【化2】



(I)

10

【請求項3】

前記式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物の濃度が0.0001 mM ~ 1 mMである請求項2に記載のコラーゲン産生促進剤。

【請求項4】

請求項2又は3に記載のコラーゲン産生促進剤を有効成分として含有するコラーゲン産生促進用皮膚外用剤(ただし、イナゴマメの莢果の含水アルコール抽出物を有効成分として含有するコラーゲン産生促進用皮膚外用剤を除く)。

【請求項5】

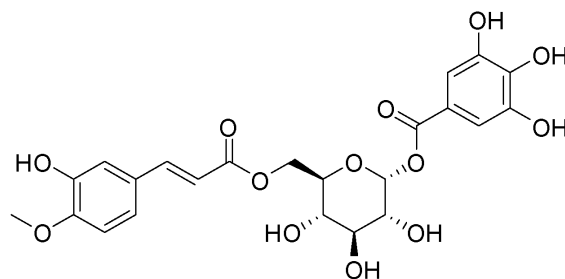
請求項2又は3に記載のコラーゲン産生促進剤を有効成分として含有するコラーゲン産生促進用化粧品(ただし、イナゴマメの莢果の含水アルコール抽出物を有効成分として含有するコラーゲン産生促進用化粧品を除く)。

20

【請求項6】

下記式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物を含有するコラーゲン産生促進用飲食品。

【化3】



(I)

30

【請求項7】

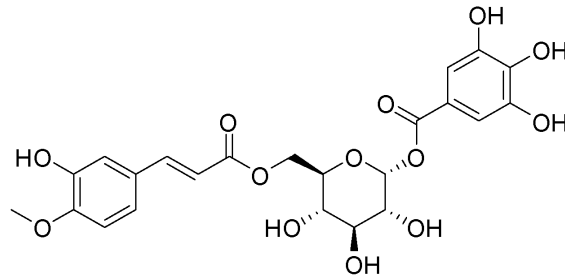
イナゴマメ(*Ceratonia siliqua*)の莢果の含水アルコール抽出物を得る工程、

前記含水アルコール抽出物を、石油エーテル、酢酸エチルの順に液液抽出を行い、酢酸エチル画分を回収する工程、及び、

40

前記酢酸エチル画分から式(I)で表される化合物を分離する工程、を有することを特徴とする該化合物の製造方法。

【化4】



(I)

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マメ科植物であるイナゴマメ (*Ceratonia siliqua* L.) から分離、精製して得られる新規なポリフェノール化合物及びその用途に関し、さらに、この化合物の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

イナゴマメ (*Ceratonia siliqua* L.) は、主に地中海地方を原産とするマメ科植物である。イナゴマメの莢果、すなわち、イナゴマメの莢及び果肉はキャロブ (carob) と呼ばれ、古くから食用又は食品原料として利用されてきた。成熟した莢果は長さ10～25cm程度で、甘味を呈する。イナゴマメの莢果には、多糖類、セルロース及びミネラル類が多く含まれ、タンパク質や非炭水化物系の低分子化合物等が少量含まれている。近年、イナゴマメの新たな機能に関する研究が進められており、イナゴマメの莢果 (pod) 抽出物が、潰瘍性大腸炎や胃潰瘍などの消化器疾患の予防及び治療効果を有することが報告されている (非特許文献1、2)。また、特許文献1には、イナゴマメの種子抽出物に α -グルコシダーゼ阻害活性があり、体重増加の抑制効果を有することが記載されている (特許文献1)。

20

【0003】

他方、コラーゲンは、生体の全タンパク質の約20%を占める重要なタンパク質である。コラーゲンは、主に結合組織に存在し、軟骨、骨、腱、靭帯、真皮及び白目の部分などの多くの組織に強度を与え、弾力性・伸展性を付与する役割を担っている。また、コラーゲンは細胞外マトリックスの主要な構成成分である。コラーゲンはその構造によって数十種類ものタイプがあるところ、皮膚の真皮にはI型コラーゲンが非常に多く含まれており、皮膚に強度と弾力性をもたらしている。このI型コラーゲンの発現及び産生にはCOL1A1遺伝子が重要な役割を果たしており、I型コラーゲンは、COL1A1遺伝子にコードされている2本の1鎖とCOL1A2遺伝子にコードされている1本の2鎖から構成されている。コラーゲンは皮膚の弾力性を保つ役割を有することから、加齢によってコラーゲンが減少することにより、皮膚のシワの原因となることが知られている。そこで、加齢により減少したコラーゲンを補うため、コラーゲン遺伝子の発現を促進させ、生体内でコラーゲンの産生を促進することが有効な手段と考えられている。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2005-119999号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Rtibi K, Jabri M A, Selmi S, et al., "Preventive effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in

50

rat ”, RSC Advances, 2016年, Vol. 6, p.19992-20000.

【非特許文献2】Rtibi K, Selmi S, Grami D, et al., “Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review”, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017年, Vol. 93, p.522-528.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上述した非特許文献1, 2及び特許文献1では、イナゴマメ抽出物について、潰瘍等の消化器疾患の治療効果や体重増加の抑制効果を有することが報告されているが、具体的な活性成分の特定にはまだ至っていない。

10

【0007】

また、イナゴマメをコラーゲン遺伝子の発現促進のために用いることについての検討はこれまでなされておらず、その有効性はまったく不明であった。

【0008】

したがって、本発明は上述した点に鑑みてなされたもので、その目的は、イナゴマメ由来の新規な活性成分及びその用途を提供することにある。

【0009】

また、本発明の他の目的は、コラーゲン遺伝子を発現促進することができる、新たなコラーゲン産生促進剤であって、イナゴマメ由来のものを提供することにある。さらに、このコラーゲン産生促進剤を含む皮膚外用剤、化粧品及びコラーゲン産生促進用飲食品を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、イナゴマメの莢果抽出物から新規なポリフェノール化合物を分離し、この新規化合物がコラーゲン遺伝子の発現量を増加させる作用を有することを見出した。この知見に基づき、本発明を完成するに至った。

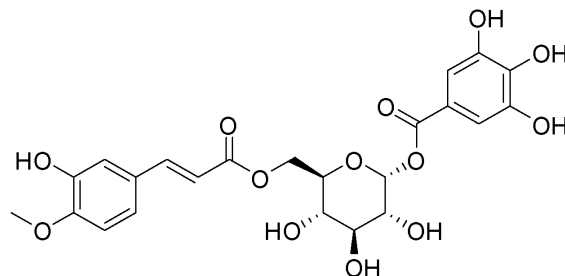
【0011】

上記課題を解決するため、本発明は、下記式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である。

30

【0012】

【化1】



(I)

40

【0013】

式(I)で表される化合物は、イナゴマメ(*Ceratonia siliqua*)の莢果抽出物から分離、精製された新規ポリフェノール化合物であり、優れたコラーゲン産生促進作用を有する。

【0014】

また、本発明のコラーゲン産生促進剤は、上述した式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物を含有する。式(I)で表される化合物を投与することにより、コラーゲン遺伝子の発現を促進させ、コラーゲン産生を促進することができる。

50

【0015】

また、本発明のコラーゲン産生促進剤は、上述した式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物の濃度が0.0001mM~1mMであることも好ましい。これにより、コラーゲンの産生促進効果に優れる活性成分濃度が選択される。

【0016】

また、本発明のコラーゲン産生促進剤は、皮膚外用剤又は化粧品であることも好ましい。これにより、皮膚におけるコラーゲンの産生を促進することができる皮膚外用剤又は化粧品が得られる。

【0017】

また、本発明のコラーゲン産生促進用飲食品は、上述した式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物を含有する。これにより、生体内におけるコラーゲンの産生を促進することができる飲食品が得られる。

10

【0018】

また、本発明の上述した式(I)で表される化合物の製造方法は、イナゴマメ(Ceratoniasiliqua)の莢果の含水アルコール抽出物を得る工程、この含水アルコール抽出物を石油エーテル、酢酸エチルの順に液液抽出を行い、酢酸エチル画分を回収する工程、及び、回収された酢酸エチル画分から式(I)で表される化合物を分離する工程、を有している。これにより、コラーゲンの産生促進作用を有する、新規なポリフェノール化合物が得られる。

【発明の効果】

20

【0019】

本発明によれば、以下のような優れた効果を有する新規ポリフェノール化合物、コラーゲン産生促進剤、皮膚外用剤、化粧品及び飲食品を提供することができる。

(1) コラーゲン遺伝子の発現量を増加させ、コラーゲンの産生を促進することができる。

(2) 古来から食用とされているイナゴマメの莢果由来の化合物を有効成分とするものであるため、人体に対する安全性が高い。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明の化合物の高分解能ESIマスペクトルを示す図である。

30

【図2】本発明の化合物の紫外吸収スペクトルを示す図である。

【図3】本発明の化合物の赤外吸収スペクトルを示す図である。

【図4】本発明の化合物の¹H-NMRスペクトル(CD₃OD、600MHz)を示す図である。

【図5】本発明の化合物の¹³C-NMRスペクトル(CD₃OD、150MHz)を示す図である。

【図6】本発明の化合物のHSQCスペクトルを示す図である。

【図7】本発明の化合物のHMBCスペクトルを示す図である。

【図8】本発明の化合物のNOESYスペクトルを示す図である。

【図9】本発明の化合物の¹H-NMRシグナル及び¹³C-NMRシグナルを一覧にまとめた図である。

40

【図10】本発明の化合物のHMBC相関及びNOESY相関を示す図である。

【図11】本発明の化合物によるコラーゲン遺伝子(COL1A1)のmRNA発現量を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、本発明の新規ポリフェノール化合物及びコラーゲン産生促進剤、これを含む皮膚外用剤、化粧品、コラーゲン産生促進用飲食品並びにこの化合物の製造方法について説明する。

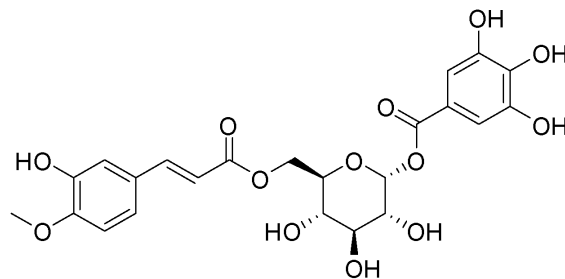
【0022】

50

本発明に係る下記式 (I) で表される新規ポリフェノール化合物は、イソフェルラ酸と没食子酸とがそれぞれグルコースにエステル結合した化合物である。

【 0 0 2 3 】

【 化 2 】



(I)

10

【 0 0 2 4 】

本発明に係る新規ポリフェノール化合物は塩であってもよく、薬理的に許容される塩であることが好ましい。この新規ポリフェノール化合物の薬理的に許容される塩としては、酸又は塩基と形成される塩であればよく、特に限定されない。また、この新規ポリフェノール化合物又はその塩は、溶媒和物であってもよく、特に限定されないが、例えば、水和物、エタノール等の有機溶媒和物が挙げられる。

20

【 0 0 2 5 】

本発明に係る新規ポリフェノール化合物はコラーゲン産生促進作用を有しており、コラーゲン産生促進剤として用いることができる。このうち、産生促進されるコラーゲンとしては、皮膚に多く含まれる I 型コラーゲン又は I I I 型コラーゲンが好ましく、I 型コラーゲンがより好ましい。

【 0 0 2 6 】

本発明において、コラーゲン産生促進とは、コラーゲン遺伝子の発現促進又はコラーゲン (タンパク質) の発現促進のことをいい、本発明の新規ポリフェノール化合物を添加又は投与されない状態のコントロールと比較して、コラーゲン遺伝子又はコラーゲンの発現が亢進していることを意味する。より具体的には、コラーゲン遺伝子の発現レベルがコントロールの 1 . 5 倍以上であることが好ましく、1 . 7 倍以上であることがより好ましく、2 倍以上であることが特に好ましい。コラーゲン遺伝子の発現レベルは、例えば、リアルタイム P C R (Q P C R) やマイクロアレイ等の公知の方法で測定でき、コラーゲンの発現レベルは、例えば、免疫染色、ウエスタンブロッティング等の公知の方法で測定される。

30

【 0 0 2 7 】

本発明の新規ポリフェノール化合物は、イナゴマメの莢果から分離、精製することにより得ることができる。本発明で用いられるイナゴマメとは、学名を *Ceratoniasiliqua* といい、マメ科ジャケツイバラ亜科イナゴマメ属の植物である。地中海沿岸地方を原産とする植物であるが、本発明においては、産地や栽培環境は特に限定されず、あらゆる産地及び栽培環境のイナゴマメを用いることができる。

40

【 0 0 2 8 】

本発明の新規ポリフェノール化合物の分離方法について説明する。まず、イナゴマメの莢果から含水アルコール抽出物を得る。本発明におけるイナゴマメ莢果の含水アルコール抽出物とは、イナゴマメの莢果に抽出溶媒として含水アルコールを加え、抽出処理を施すことによって得られた抽出物をいう。イナゴマメの莢果とは、イナゴマメの莢付果実の莢と果肉のことを意味し、莢又は果肉のいずれか一方を抽出材料として用いることも可能であるが、莢及び果肉を用いることがより好ましい。抽出処理は、採取された状態、すなわち、生の状態のイナゴマメ莢果、又は乾燥状態のイナゴマメ莢果に対して行われるが、抽出効率の向上を図るため、又は取り扱いを容易とするために種々の前処理が施されたイナ

50

ゴマメ莢果に対して抽出処理を施すことも可能である。前処理としては、特に限定されないが、乾燥処理、破砕処理又は粉碎処理等が挙げられ、これら前処理が施されたイナゴマメの莢果に抽出処理を施して抽出物を得てもよい。

【0029】

抽出溶媒として用いられる含水アルコールを構成するアルコールとしては、本発明のポリフェノール化合物を抽出できるものであれば特に限定されず、例えば、エタノール、メタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール又はイソブタノール等が挙げられる。このうち、人体への安全性及び抽出効率等の観点から、抽出溶媒としては、含水エタノールが好適に選択される。また、含水アルコールのアルコール濃度としては、50～99%が好ましく、60～97%がより好ましく、70～95%が特に好ましい。また、抽出溶媒には、本発明の化合物の抽出を妨げない範囲において、他の成分を含有させることも可能である。

10

【0030】

含水アルコールによる抽出方法としては、イナゴマメの莢果に抽出溶媒である含水アルコールを加えて浸漬させ、抽出を行う。例えば、イナゴマメ莢果を含水率10%未満の乾燥破砕物とした場合には、植物体1重量部に対し、抽出溶媒を5～10重量部用いることが好ましい。また、抽出方法としては、室温での抽出、加熱抽出、加圧加熱抽出又は亜臨界抽出等のいずれの方法でも行うことが可能であるが、抽出効率の観点から、還流操作による加熱抽出が好ましい。また、抽出効率を高めるため、抽出操作は複数回行うことが好ましく、抽出溶媒中のアルコール濃度を変えて複数回の抽出操作を行うことがさらに好ましい。特に限定されないが、具体的には、95%エタノールによる還流抽出を1～5回行い、引き続いて、70%エタノールによる還流抽出を1～5回行うといった抽出方法が挙げられる。抽出時間は、抽出方法、抽出材料の態様、抽出溶媒の種類又は抽出温度等に応じて種々設定されるが、例えば、70～95%のエタノールを用いて還流抽出を行う場合には、1回の抽出時間として1～3時間程度とすることが好ましく、1.5時間程度とすることが特に好ましい。上述した抽出処理後、残渣をデカンテーション、遠心分離又はろ過等により取り除くことによりイナゴマメの莢果の含水アルコール抽出物が得られる。得られた抽出物には減圧蒸留等の処理を施すことにより、濃縮液や固形物としたものも含まれる。

20

【0031】

上述のようにして得られたイナゴマメの莢果の含水アルコール抽出物については、イナゴマメの莢果に多量に含まれている糖類等が存在すると考えられるため、これら不要な成分を除去することを目的として、イオン交換樹脂による分離操作を行ってもよい。具体的には、イナゴマメの莢果の含水アルコール抽出物1重量部に対し、1～10重量部の水を加えて分散させ、マクロポラス吸着樹脂等のイオン交換樹脂を詰めたカラムに通し、本発明のポリフェノール化合物を吸着させて、糖類などの不要成分を流出除去させる。その後、95%エタノール等で溶出させることにより、本発明のポリフェノール化合物を含む画分が回収される。

30

【0032】

引き続いて、イナゴマメの莢果の含水アルコール抽出物又は上述したイオン交換樹脂により分離された回収画分のさらなる分離操作について説明する。含水アルコール抽出物又は回収画分を水系溶媒に分散させ、石油エーテル、酢酸エチルの順に溶媒抽出を行う。水系溶媒としては、本発明のポリフェノール化合物を分散できるものであれば特に限定されないが、50%含水メタノールが好適に用いられる。石油エーテル/水系溶媒での液液抽出を複数回行った後、酢酸エチル/水系溶媒での液液抽出を複数回行う。この溶媒抽出操作により回収された酢酸エチル画分に本発明の新規なポリフェノール化合物が含まれる。各溶媒系での液液抽出の回数は2～10回程度が好ましく、5回程度が特に好ましい。

40

【0033】

上述のようにして得られた酢酸メチル画分から常法に基づき精製することにより、本発明の新規ポリフェノール化合物が単離され得る。精製方法としては、順相クロマトグラフ

50

イー、逆相クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィー等を挙げることができ、これらのうちの1種又は複数を組み合わせて精製することが可能である。各種クロマトグラフィーに用いられる担体や溶出溶媒等は、各種クロマトグラフィーに対応して適宜選択することができる。

【0034】

なお、上述のようにしてイナゴマメの莢果から分離、精製された本発明のポリフェノール化合物は、純物質として単離されていなくてもよく、イナゴマメ原料由来の他の成分が含まれた混合物として用いられてもよい。

【0035】

本発明の新規ポリフェノール化合物は、コラーゲン遺伝子の発現を促進し、生体内でのコラーゲンの産生を促進させるコラーゲン産生促進剤として用いることができる。本発明の化合物により、コラーゲン産生が促進されることにより、対象細胞でのコラーゲンが増加する。

10

【0036】

本発明の新規ポリフェノール化合物を含有するコラーゲン産生促進剤は、皮膚細胞に含まれるコラーゲン量を増加させ、皮膚の老化を防止又は改善し、皮膚を安定した状態に保つための皮膚外用剤として用いることができる。また、本発明のコラーゲン産生促進剤は、皮膚細胞に含まれるコラーゲン量を増加させて、皮膚のシワやたるみを予防又は改善し、皮膚を健やかに保つ作用を有する化粧品として用いることができる。

【0037】

本発明のコラーゲン産生促進剤の投与量は、目標とするコラーゲン産生促進効果、予防又は治療効果、投与方法、年齢などによって変化するので一概には規定できないが、外用剤として用いた場合における、通常一日の経口的な投与量は、本発明のポリフェノール化合物として、 $0.02 \mu\text{g} \sim 30 \text{mg}$ とすることが好ましく、 $0.2 \mu\text{g} \sim 3 \text{mg}$ とすることがより好ましく、 $2 \mu\text{g} \sim 300 \mu\text{g}$ とすることがさらに好ましい。また、内用剤として用いた場合における、経口的な投与量としては、本発明のポリフェノール化合物として、通常一日 $0.2 \mu\text{g} \sim 1000 \text{mg}$ とすることが好ましく、 $2 \mu\text{g} \sim 200 \text{mg}$ とすることがより好ましい。

20

【0038】

本発明のコラーゲン産生促進剤、皮膚外用剤及び化粧料の剤形は、特に限定されず、例えば、低粘度液体、ローション等の液剤、乳液、ゲル、ペースト、クリーム、フォーム、パック、軟膏、粉剤、エアゾール又は貼付剤等、並びに錠剤、顆粒剤、カプセル剤又は内服用液剤等が挙げられる。なお、本発明に係るコラーゲン産生促進剤は、化粧品、医薬部外品又は医薬品のいずれにも適用することができる。具体的な製品としては、特に限定されないが、化粧水、化粧クリーム、化粧乳液、美容液、化粧パック、化粧洗剤、石鹸、ヘアケア剤、浴用剤又はメーキャップ化粧料等が挙げられる。

30

【0039】

本発明のコラーゲン産生促進剤、皮膚外用剤及び化粧料中において、本発明の新規ポリフェノール化合物の配合濃度は、好ましくは $0.0001 \text{mM} \sim 1 \text{mM}$ であり、より好ましくは $1 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$ であり、さらに好ましくは $5 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ である。新規ポリフェノール化合物の配合量をこの範囲内とすることにより、本化合物を安定に配合することができる。皮膚への安全性も高く、高いコラーゲン産生促進効果を発揮することができる。

40

【0040】

本発明のコラーゲン産生促進剤は、従来慣用されている方法により種々の形態に調製することができる。この場合、通常製剤用の担体や賦形剤など、医薬品の添加剤として許容されている添加剤を用いて製剤化することができる。また、本化合物のバイオアベイラビリティや安定性を向上させるために、マイクロカプセル、微粉末化、シクロデキストリン等を用いた包接化などの製剤技術を含むドラッグデリバリーシステムを用いることもできる。

50

【0041】

また、本発明のコラーゲン産生促進剤、皮膚外用剤及び化粧料には、皮膚外用剤及び化粧料に通常用いられる成分である水、油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、高級アルコール類、エステル類、植物抽出エキス類、ビタミン類、水溶性高分子、界面活性剤、金属石鹼、アルコール、多価アルコール、pH調整剤、防腐剤、香料、粉体、増粘剤、色素又はキレート剤等の成分を適宜配合することができる。さらに、本発明の作用効果を損なわない範囲において、通常用いられる各種の機能性成分、例えば、保湿剤、美白剤、抗炎症剤、細胞賦活剤、紫外線防御剤、血行促進剤及び抗酸化剤等から選ばれる機能性成分の一種または二種以上と併用することができる。

【0042】

さらに、本発明のコラーゲン産生促進用飲食品は、本発明の新規ポリフェノール化合物を活性成分として含有している。本発明のコラーゲン産生促進用飲食品は、錠剤やカプセル剤、顆粒剤、シロップ剤などのサプリメント形態、清涼飲料、果汁飲料、アルコール飲料などの飲料、アメやガム、クッキー、ビスケット、チョコレート等の菓子、パン、粥、シリアル、麺類、ゼリー、スープ、乳製品、調味料等のあらゆる形態とすることができる。このように飲食品として用いる際には、本発明の有効成分の効能に影響を与えない範囲において、他の有効成分や、ビタミン、ミネラル若しくはアミノ酸等の栄養素等を種々組み合わせることも可能である。本発明の飲食品には、サプリメント、健康食品、機能性食品、特定保健用食品等が含まれる。また、本発明の飲食品の1日あたりの摂取量は、本発明のポリフェノール化合物として、通常一日0.2 μg ~ 1000 mgとすることが好ましく、2 μg ~ 200 mgとすることがより好ましい。

【0043】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によってなんら限定されるものではない。

【実施例】

【0044】

[実施例1]

1. イナゴマメ莢果の含水アルコール抽出物の調製

採取後、乾燥処理されたイナゴマメ (*Ceratonia siliqua*) の莢付果実から種を取り除いた。このイナゴマメの莢果を粉砕機で粉砕して粒径2 mm以下の粉砕物を得た。20 kgの粉砕物に対し、140 kg (7倍量)の含水95%エタノールを加え、1.5時間還流抽出する操作を2回行った後、残渣をさらに140 kg (7倍量)の含水70%エタノールで1.5時間還流抽出した。得られた還流抽出液を合わせた後、溶媒を減圧留去してイナゴマメ莢果の含水エタノール抽出物12.4 kgを得た。

【0045】

[実施例2]

2. イナゴマメ莢果の含水アルコール抽出物の分離及び精製

実施例1で得られたイナゴマメ莢果の含水エタノール抽出物を1~10倍量の水に分散させ、イオン交換樹脂(マクロポラス吸着樹脂D101、Cangzhou Bon Adsorber Technology Co., Ltd.)に吸着させた。カラム容量の3倍量の蒸留水で溶出して糖類等の不純物を除去した後、カラム容量の3倍量の含水95%エタノールで溶出させ、溶媒を減圧留去し、462.7 gのエタノール溶出画分(非炭水化物系低分子化合物画分)を得た。次に、得られたエタノール溶出画分を1.0 Lの含水50%メタノールに分散させ、石油エーテル、酢酸エチルの順に、それぞれ5回ずつ液液抽出を行った。各溶媒を減圧留去して、石油エーテル画分28.4 g、酢酸エチル画分139.4 g及び水系画分290.2 gをそれぞれ得た。

【0046】

次に、135.0 gの酢酸エチル画分について、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(カラム充填材:200~300メッシュ、青島海洋化工場製品)に供し、石油エーテル(P)/酢酸エチル(E)及びジクロロメタン(C)/メタノール(M)の2つの展

10

20

30

40

50

開溶媒を用いて溶出させ、分画を行った。この結果、108個の溶出画分が得られた。得られた108個の溶出画分について、薄層クロマトグラフィーによる同定を行い、類似する画分を合わせて10個の溶出画分A~Jを得た。

【0047】

次に、溶出画分F(8.5g)と溶出画分G(9.6g)について、逆相ODSカラムクロマトグラフィー(カラム充填材:40~63 μ m、メルク社製品)に供し、メタノール:水=15:85 100:0の勾配溶出により分画を行った。得られた溶出画分について、薄層クロマトグラフィーによる同定を行い、類似する画分を合わせて6つの溶出画分F1~F6を得た。

【0048】

次に、溶出画分F4(4.2g)について、ゲルろ過クロマトグラフィー(カラム充填材:Sephadex LH-20)に供し、ジクロロメタン:メタノール=1:1で溶出させ、5つの溶出画分F4a~F4eを得た。

【0049】

次に、溶出画分F4c(1.1g)をセミ分取HPLC(カラムI:YMC-Pack ODS-A、250 \times 20mm、5 μ m)に供し、メタノール:水=40:60、検出波長217nmで分離し、3つの画分F4c1、F4c2及びF4c3を得た。このうち、画分F4c2をセミ分取HPLC(カラムII:YMC-Pack ODS-A、250 \times 10mm、5 μ m)に供し、メタノール:水=36:64、検出波長217nmで分離して、本発明の化合物(以下、「*Ceratonia siliqua* A」という。)23.8gを得た(保持時間 t_R =37.14分)。

【0050】

[実施例3]

3. 化合物(*Ceratonia siliqua* A)の構造解析

実施例2で得られた化合物、「*Ceratonia siliqua* A」の構造解析を行った。構造解析にあたり、高分解能質量分析(HR-ESI-MS;負イオンモード)、紫外吸収スペクトル分析、赤外吸収スペクトル分析、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMBC、HSQC及びNOESY分析を行った。これらの分析に用いた装置は次のとおりである。

・高分解能質量分析:エレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型質量分析装置(Bruker Daltonics社製品)

・紫外吸収スペクトル分析:紫外可視分光光度計(UV-2401PC、株式会社島津製作所製品)

・赤外吸収スペクトル分析:FT-IR(NEXUS470、Thermo Nicolet社製品)

・NMR分析:600MHz核磁気共鳴装置(AVANCE III 600、Bruker社製品)

【0051】

Ceratonia siliqua Aの物理的性質は以下のとおりである。高分解能質量分析(HR-ESI-MS)のスペクトルを図1に、紫外吸収スペクトル分析の結果を図2に、赤外吸収スペクトル分析の結果を図3にそれぞれ示す。

・性状:黄色粉末

・HR-ESI-MS(negative) m/z : 507.1180[M-H] $^-$

・紫外吸収スペクトル: $\max(\text{MeOH})\text{nm}(\log)$: 192.2(3.82), 218.0(4.26), 291.0(4.02), 322.4(3.95)

・赤外吸収スペクトル(KBr, cm^{-1}): \max : 3378.33, 1699.52, 1630.21, 1603.89, 1515.90, 1451.32, 1351.12, 1326.00, 1270.16, 1214.57, 1186.83, 1126.01, 1070.65, 1031.88, 816.60, 765.83, 624.09, 580.17, 537.28, 522.40

【0052】

10

20

30

40

50

高分解能質量分析(図1)の結果、準分子イオンピークが、 m/z 507.1180 [M-H]⁻であることから、組成式はC₂₃H₂₄O₁₃、不飽和度は12と推定された。また、赤外吸収スペクトル(図3)からは、分子内には、水酸基(3378.33 cm⁻¹)、ベンゼン環(1603.89 cm⁻¹、1515.90 cm⁻¹)及びエステル結合(1699.52 cm⁻¹、1214.57 cm⁻¹)を有することが推測された。

【0053】

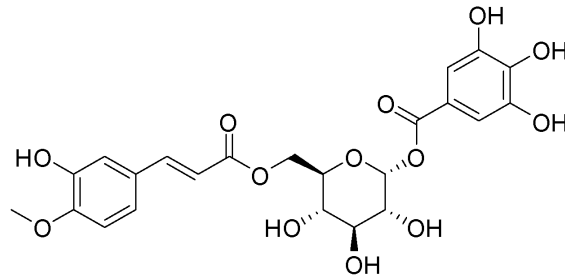
さらに、¹H-NMR分析(溶媒:CD₃OD、観測周波数:600MHz)により得られたスペクトル(図4)からは、一組のトランス-オレフィンプロトンシグナル[_H:7.62(1H, d, J=15.6 Hz, H-7), 6.39(1H, d, J=15.6 Hz, H-8)]、一組のベンゼン環ABX系シグナル[_H:7.18(1H, s, H-2), 7.06(1H, d, J=7.8 Hz, H-6), 6.80(1H, d, J=7.8 Hz, H-5)]、1,3,4,5-置換ベンゼン環の水素シグナル[_H:7.14(2H, s, H-2, H-6)], 1つのメトキシシグナル[_H:3.88(3H, s, OCH₃-3)]、一組のグルコース残基の水素シグナル[_H:5.68(1H, d, J=5.4 Hz, H-1), 4.52(1H, d, J=11.4 Hz, H-6), 4.31(1H, m, H-6), 3.70(1H, m, H-5), 3.51(2H, m, H-2, H-3), 3.46(1H, m, H-4)]が確認された(図9)。また、¹³C-NMR分析(溶媒:CD₃OD、観測周波数:150MHz)により得られたスペクトル(図5)からは、23の炭素シグナルが確認された(図9)。具体的には、エステルのカルボニル炭素シグナルが2つ(_C:169.1, 166.9)、14の芳香族又はオレフィンの炭素シグナル(_C:150.6, 149.3, 147.2, 146.5×2, 140.4, 127.7, 124.2, 120.6, 116.4, 115.2, 111.6, 110.6×2)、1つのメトキシ炭素シグナル(_C:56.4)及び一組のグルコース残基の炭素シグナル(_C:95.9, 78.0, 76.3, 74.1, 71.3, 64.4)であった。これらの分析結果より、本化合物は、1つのグルコース残基ユニット、1つのフェルラ酸ユニット及び1つの没食子酸ユニットから構成されていることが推測された。

【0054】

また、HMBC分析により得られたスペクトル(図7)からは、H-2とC-4/C-6、H-5とC-1/C-3、H-6とC-4、H-7とC-2/C-6/C-9、H-8とC-1及びOCH₃-3とC-3にロングレンジ相関シグナルが確認された。この結果より、本化合物の構造にフェルラ酸ユニットが存在することが示された。また、H-2、H-6及びC-4/C-3/C-5/C-7にロングレンジ相関シグナルが確認されたことから、本化合物の構造に没食子酸ユニットが存在することが示された。さらに、H-6とC-9とにロングレンジ相関シグナルが確認されたことから、フェルラ酸がグルコース残基のC-6にエステル結合を介して結合していることが示された。そして、H-1とC-7とのロングレンジ相関シグナルから、没食子酸がグルコース残基の末端の炭素にエステル結合を介して結合していることが示された。グルコースの末端のプロトンの結合定数は5.4 Hzであり、グルコースの末端の相対配置は型であることがわかった。これらの解析結果から本化合物、*Ceratoniasiliqua* Aの構造を以下式(I)のとおり決定した。図9に¹H-NMRの_H及び¹³C-NMRの_Cをまとめた帰属表を示す。また、図10に*Ceratoniasiliqua* AのNOESY及びHMBCの解析結果を示す。

【0055】

【化3】



(I)

10

【0056】

【実施例4】

4. *Ceratoniasiliqua* Aのコラーゲン遺伝子の発現促進作用の検討
 実施例2で得た*Ceratoniasiliqua* Aを用いて、ヒト表皮由来角化細胞株であるHaCaT細胞におけるコラーゲン遺伝子(COL1A1遺伝子)の発現促進効果を調べた。

【0057】

まず、HaCaT細胞を、DMEM培地(10%FBS及び100U/mLペニシリン、100µm/mLストレプトマイシンを含む)を用いて、37℃、5%CO₂及び飽和湿度条件下で培養した。次に、6ウェル細胞培養プレートの各ウェルに、5×10⁵cells/mLとなるように細胞濃度を調整したHaCaT細胞を播種し、CO₂インキュベーター(5%CO₂、37℃)で24時間培養した。その後、実施例2で単離した*Ceratoniasiliqua* Aを各ウェルに異なる最終濃度となるように添加した。具体的には、HaCaT細胞培養液中の*Ceratoniasiliqua* Aの最終濃度がそれぞれ、1µM、5µM、10µM、50µM及び100µMとなるようにした。また、*Ceratoniasiliqua* Aを添加しないウェルを対照(0µM)とした。添加後、24時間培養を行った。

20

【0058】

培養終了後、各ウェルからHaCaT細胞を回収し、RNA抽出試薬(RNAzol(登録商標)、モレキュラーリサーチセンター社製品)を用いて、total RNAを抽出した。超微量分光光度計(NanoDrop、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製品)を用い、抽出して得られたtotal RNAの濃度を確認した。このtotal RNAに、オリゴdTプライマー、dNTP Mix、5×1stストランドバッファー、RNase阻害剤、DTT及びM-MLV逆転写酵素を添加し、total RNAからcDNAを合成した。このcDNAを用い、リアルタイムPCR(QPCR)によりコラーゲン遺伝子の発現量を測定した。

30

【0059】

QPCRは、市販のQPCR試薬キットとQPCR測定装置(LightCycler(登録商標)480、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社製品)を用いて行い、検出には2本鎖DNA結合蛍光色素であるSYBR(登録商標)Greenを用いた。標的遺伝子は、I型コラーゲンの1鎖をコードするCOL1A1遺伝子を選択し、QPCR用プライマーは下記表1に示す配列番号1、2のプライマーを用いた。

40

【0060】

【表1】

フォワードプライマー	5'-TCTGCGACAACGGCAAGGTG-3'	配列番号1
リバースプライマー	5'-GACGCCGGTGGTTTCTTGGT-3'	配列番号2

50

【0061】

結果を図11に示す。コラーゲン遺伝子(COL1A1遺伝子)のmRNA発現量は、対照(コントロール)の発現量を100としたときの相対値として示している。図11に示すように、本発明の化合物、CeratoniasiliquaAを添加することにより、未添加の対照と比較して、コラーゲン遺伝子の発現量が大きく増加することが明らかとなった。CeratoniasiliquaAの濃度が1 μ Mでも、コラーゲン遺伝子の発現量は約2倍に増加しており、10 μ Mではコラーゲン遺伝子の発現量が3倍以上に増加し、発現促進作用が最も高くなることがわかった。

【0062】

本発明は、上記の実施形態又は実施例に限定されるものでなく、特許請求の範囲に記載された発明の要旨を逸脱しない範囲内での種々、設計変更した形態も技術的範囲に含むものである。

【産業上の利用可能性】

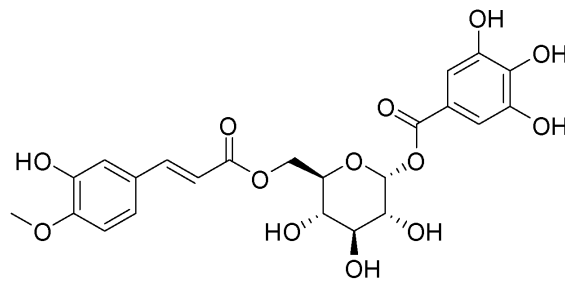
【0063】

本発明の新規ポリフェノール化合物は、コラーゲン産生促進剤、皮膚外用剤及び化粧品として使用され、医療や美容の分野において幅広く利用されるものである。

【要約】

【課題】イナゴマメ由来の新規な活性成分及びその用途を提供すること。

【解決手段】本発明は、下記式(I)で表される化合物若しくはその塩又はそれらの溶媒和物である。



(I)

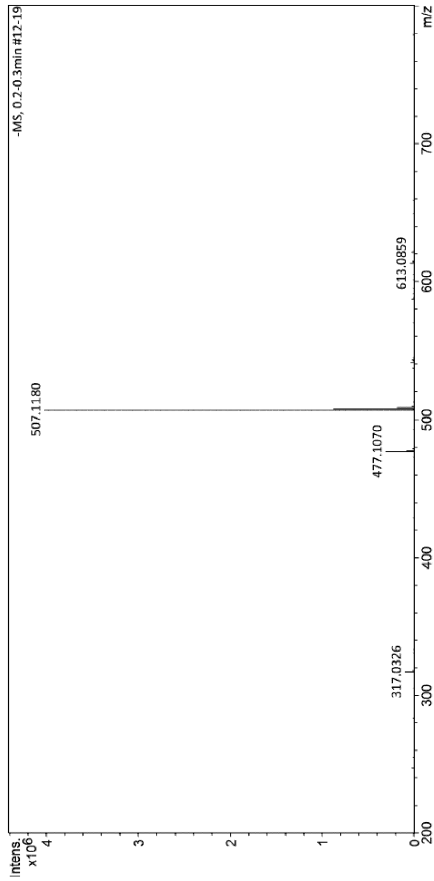
【選択図】なし

10

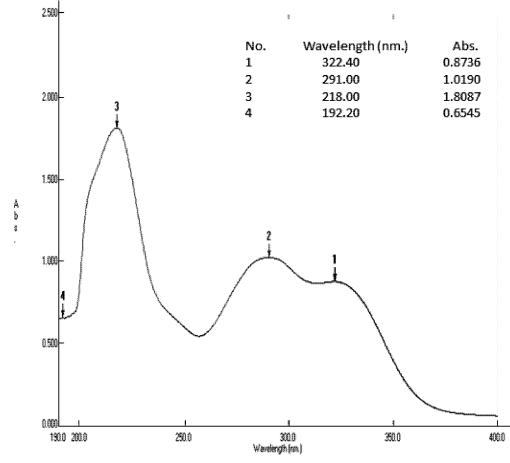
20

30

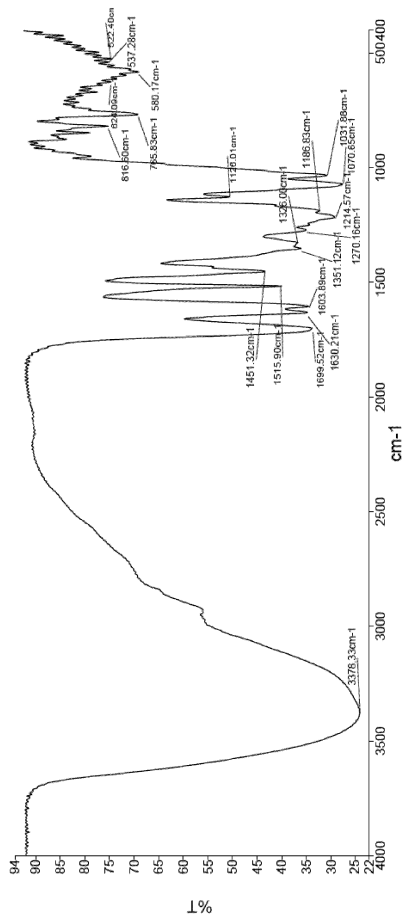
【 図 1 】



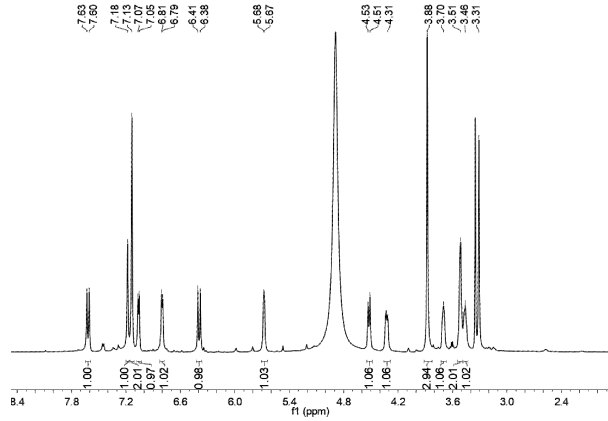
【 図 2 】



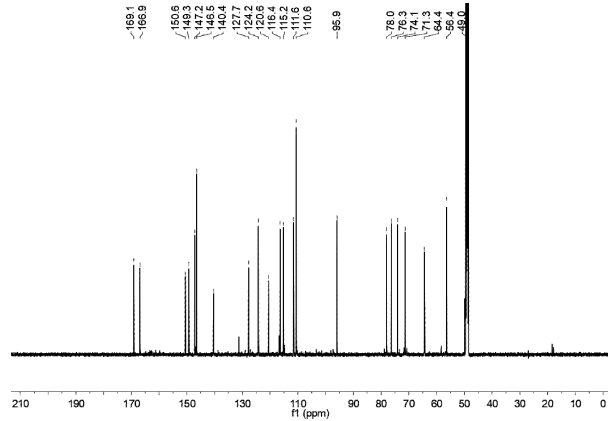
【 図 3 】



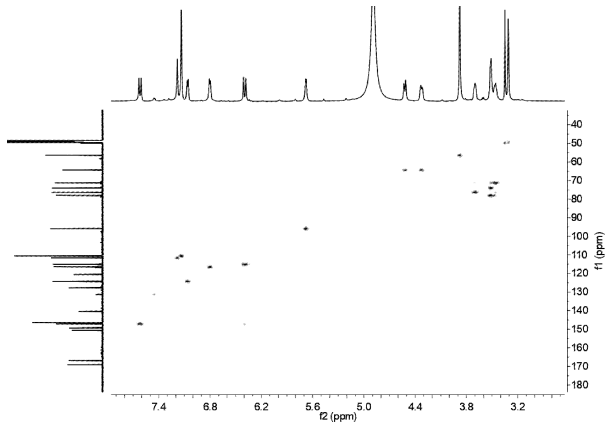
【 図 4 】



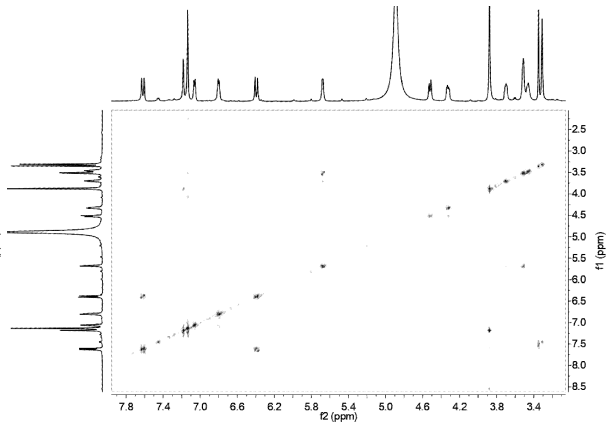
【 図 5 】



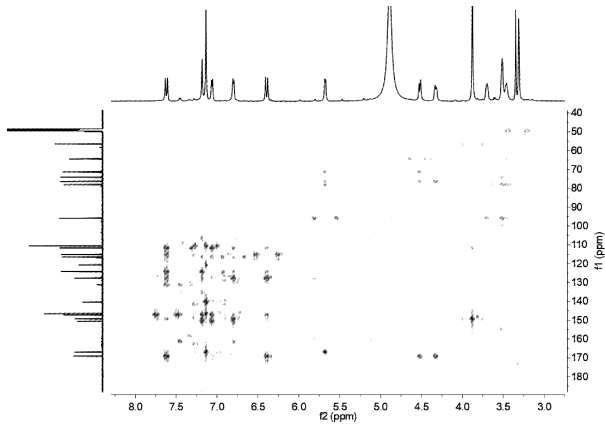
【 图 6 】



【 图 8 】



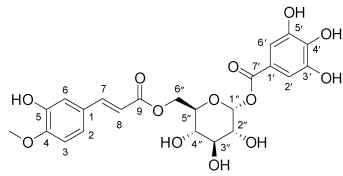
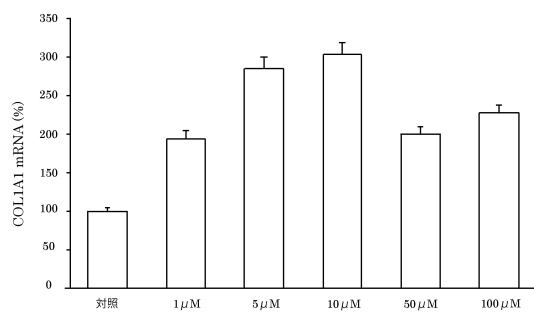
【 图 7 】



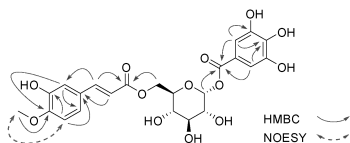
【 图 9 】

位置	δ_H	δ_C	位置	δ_H	δ_C
1	-	127.7	3',5'	-	146.5
2	7.18, s	111.6	4'	-	140.4
3	-	149.3	7'	-	166.9
4	-	150.6	1''	5.68, d ($J=5.4$ Hz)	95.9
5	6.80, d ($J=7.8$ Hz)	116.4	2''	3.51, m	74.1
6	7.06, d ($J=7.8$ Hz)	124.2	3''	3.51, m	78.0
7	7.62, d ($J=15.6$ Hz)	147.2	4''	3.46, m	71.3
8	6.39, d ($J=15.6$ Hz)	115.2	5''	3.70, m	76.3
9	-	169.1	6''	4.31, m	64.4
1'	-	120.6		4.52, d ($J=11.4$ Hz)	
2',6'	7.14, s	110.6	OCH ₃	3.88, s	56.4

【 图 1 1 】



【 图 1 0 】



【配列表】

0006976014000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	A 6 1 Q 19/00
A 2 3 L	33/105	(2016.01)	A 2 3 L 33/105 Z N A
A 6 1 K	36/48	(2006.01)	A 6 1 K 36/48
A 6 1 K	8/9789	(2017.01)	A 6 1 K 8/9789

- (72)発明者 トウ テイ カ
中華人民共和国香港九龍清水湾香港科技大学学术ビル6 2 4 4室
- (72)発明者 ホウ チ テン
中華人民共和国広東省深セン市南山区高新技术産業園南区粤興一道9号香港科大深セン産学研究ビル7 1 2室
- (72)発明者 オウ カイ ユウ
中華人民共和国広東省深セン市南山区高新技术産業園南区粤興一道9号香港科大深セン産学研究ビル7 1 2室
- (72)発明者 ジェームス ウエイ
東京都千代田区神田神保町3丁目10 株式会社ナボカルコスメティックス内

審査官 三上 晶子

- (56)参考文献 韓国公開特許第10-2006-0093164(KR,A)
特表2010-504299(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 H
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)