

明 細 書

発明の名称：腸管バリア機能改善用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、腸管バリア機能改善用組成物に関する。本発明はまた、腸管バリア機能を改善する方法及び腸管バリア機能を改善するためのフラバン-3-オール重合体の使用に関する。

背景技術

[0002] 近年、腸の健康に関する意識が高まっており、腸関連の機能性食品も多数販売されている。腸の機能としては、栄養素の吸収機能と、有害物質の侵入（透過）を防ぐバリア機能（腸管バリア機能）とが主である。その中で、腸管バリア機能が加齢とともに増加する慢性炎症疾患と深い関わりがあることが明らかとなってきた。

[0003] 腸管上皮細胞の下には、マクロファージ、樹状細胞、T細胞、B細胞のような免疫系の細胞が多数存在している。通常、腸管上皮細胞はタイトジャンクションと呼ばれる構造によって互いに強固に接着されており、高分子量物質は細胞間隙を透過しないよう厳密に制御されている。また、腸管上皮細胞には疎水性の異物を細胞から排出するためのトランスポーターも存在する。これらのタイトジャンクション構造やトランスポーターなどが、異物の侵入を防ぐ腸管バリア機能を担っている。しかし、加齢、生活の不摂生、ストレス等の原因によって腸管バリアが傷害されて腸管透過性が上昇すると、腸管内に存在する腸内細菌やその菌体成分等の高分子物質が、細胞間隙を介して生体内へ移行し、免疫系細胞を刺激するなどして炎症性サイトカインの放出を促し、炎症を誘発する。その結果、腸では炎症性腸疾患、肝臓では非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、血管では動脈硬化に起因する症状、全身性では糖尿病、脂質代謝異常、自己免疫疾患など慢性炎症に起因する様々な病態が誘発されると考えられている。また、未消化な物質が腸管内から侵入することによりアレルギーを誘導することが想定されている。

[0004] 上記のように、腸管バリア機能の低下は様々な疾患等の原因となり得る。このような観点から、腸管バリア機能を改善できる素材の探索が試みられている。上皮細胞成長因子（E G F）は、腸管上皮細胞の成熟化を促進しバリア機能を高めることが知られている。しかし、サイトカインであるE G Fは生体内に微量しか存在しないため、腸管バリア機能を改善する素材として使用するには経済性や安全性の面で好ましくない。非特許文献1には、ケルセチン等のフラボノイドがタイトジャンクションなどの形成を促進し慢性炎症を予防すると記載されている。特許文献1には、リンデン、八角、マーニー、紅茶、黒茶、又はこれらの処理物から選ばれる1種又は2種以上を有効成分として含有する吸収抑制剤が記載されている。特許文献2には、特定の配列のヘキサペプチド及びトリプトファンがアレルギーの吸収抑制活性を有することが記載されている。特許文献3には、グルタミン、抗酸化活性を有する物質及び短鎖脂肪酸の組み合わせを含む、腸の腸バリアを維持または回復させるために腸内投与されるサプリメントが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2002-193819号公報

特許文献2：特開2002-257814号公報

特許文献3：特表2004-513912号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Suzuki T. et al, The Journal of Nutritional Biochemistry, 2011 May, Vol. 22 (5), p. 401-408

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、腸管バリア機能を改善することができる腸管バリア機能改善用組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、ヒト腸管細胞培養株 Caco-2 を用いた腸管透過モデルに炎症性サイトカインを添加して、ヒトで腸管バリア機能を破綻させ得る状態を作り出し、この状態を効果的に改善し得る物質を見出すことにより上記課題を解決することを試みた。その結果、重量平均分子量が特定の範囲のフラバン-3-オール重合体が、高い腸管バリア機能改善作用を示すことを見出した。

[0009] すなわち本発明は、以下の腸管バリア機能改善用組成物に関する。

(1) 重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体を有効成分として含む、腸管バリア機能改善用組成物。

(2) 上記フラバン-3-オール重合体は、重量平均分子量が4500～20000である上記(1)に記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(3) 上記フラバン-3-オール重合体は、重量平均分子量が9000～16000である上記(1)又は(2)に記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(4) 上記フラバン-3-オール重合体は、ブドウ果実、ブドウ種皮及びブドウ種子からなる群より選択される1以上のブドウ由来の原料に含まれるものである上記(1)～(3)のいずれかに記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(5) 経口用組成物である上記(1)～(4)のいずれかに記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(6) 上記経口用組成物が、飲食品、医薬品又は医薬部外品である上記(5)に記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(7) 腸管バリア機能を改善することにより、整腸のために使用される上記(1)～(6)のいずれかに記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(8) 腸管バリア機能を改善することにより、腹部不快感を予防又は改善するために使用される上記(1)～(7)のいずれかに記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(9) 整腸作用を有する旨の表示を付した、上記(1)～(8)のいずれかに記載の腸管バリア機能改善用組成物。

(10) 重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体を対象に投与する、腸管バリア機能改善方法。

(11) 重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体の、腸管バリア機能改善のための使用。

発明の効果

[0010] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物を用いると、腸管バリア機能を改善することができる。本発明は、腸管バリア機能を改善することにより、腸管バリア機能の異常が関連する状態又は疾患の予防又は改善にも寄与し得る。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、ブドウ種子エキスから、フラバン-3-オール重合体を精製した手順を示すフローチャートである。

[図2]図2は、インディアンデーツエキスから、フラバン-3-オール重合体を精製した手順を示すフローチャートである。

[図3]図3は、検量線である。

[図4]図4は、Caco-2細胞を用いた、フラバン-3-オール重合体の腸管バリア機能改善作用の評価結果を示すグラフである。

[図5]図5は、実施例3の試験のスケジュールを示す図である。

[図6]図6は、大腸の痛覚閾値、大腸の腸管透過性及びClaudin-2の発現に対するフラバン-3-オール重合体の影響を調べた結果を示すグラフである((a)痛覚閾値、(b)大腸の腸管透過性、(c)Claudin-2相対発現量)。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、重量平均分子量(Mw)が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体を有効成分として含む。本発明におけるフラバン-3-オール重合体は、フラバン-3-オールを構成単位とし、フラバン-3-オールが4-6位又は4-8位で縮合又は重合

により結合した、2量体以上の重合体である。フラバン-3-オール为例として、カテキン、エピカテキンが挙げられる。フラバン-3-オール重合体は、ポリフェノール一種であり、縮合型タンニンとも称されている化合物である。本発明で使用されるフラバン-3-オール重合体は、重合度が異なる2種以上の重合体の混合物であってよい。一態様において、フラバン-3-オール重合体は、ガロイル基を有していてもよい。

[0013] 重量平均分子量が4500～5000であるフラバン-3-オール重合体は、高い腸管バリア機能改善作用を有する。

腸管バリア機能改善作用の観点から、フラバン-3-オール重合体の重量平均分子量は、5000以上が好ましく、9000以上がより好ましく、9400以上がさらに好ましく、10000以上が特に好ましく、また、2000以下が好ましく、16000以下がより好ましく、15000以下がさらに好ましい。上限及び下限は、いずれの組み合わせによる範囲としてもよい。一態様において、腸管バリア機能改善作用の観点から、フラバン-3-オール重合体の重量平均分子量は、4500～20000が好ましく、4500～16000がより好ましく、5000～16000がさらに好ましく、9000～16000が特にさらに好ましく、9400～15000が特に好ましく、10000～15000が最も好ましい。重量平均分子量が10000～15000のフラバン-3-オール重合体は、腸管バリア機能改善作用が特に高い。また、フラバン-3-オール重合体は、数平均分子量(M_n)が、1900以上が好ましく、2400以上がより好ましく、2900以上がさらに好ましく、3000以上が特に好ましく、また、1000以下が好ましく、8000以下がより好ましく、6000以下がさらに好ましく、3200以下が特に好ましく、3100以下が最も好ましい。一態様において、フラバン-3-オール重合体は、数平均分子量(M_n)が、1900～10000が好ましく、2400～10000がより好ましく、2400～8000がさらに好ましく、2900～6000がさらに好ましく、3000～3200が特に好ましく、3000～3100が最も好ましく、

ましい。また別の一態様において、フラバン-3-オール重合体の数平均分子量は、1900~3200であることが好ましく、1900~3100であることがより好ましい。一態様において、フラバン-3-オール重合体は、例えば、重量平均分子量(Mw)が4500~50000、かつ、数平均分子量(Mn)が1900~10000が好ましく、Mwが4500~50000、かつ、Mnが2400~10000が好ましく、Mwが4500~20000、かつ、Mnが2400~8000がより好ましく、Mwが9000~16000、かつ、Mnが2900~6000がさらに好ましく、Mwが9400~15000、かつ、Mnが3000~3200がさらに好ましく、Mwが10000~15000、かつ、Mnが3000~3200が特に好ましい。別の一態様において、フラバン-3-オール重合体は、Mwが4500~16000、かつ、Mnが1900~6000であることも好ましく、Mwが5000~16000、かつ、Mnが1900~6000であることがより好ましい。腸管バリア機能改善作用が特に高い観点から、フラバン-3-オール重合体は、Mwが10000~15000、かつ、Mnが3000~3100が最も好ましい。

また、一態様において、上記フラバン-3-オール重合体は、数平均分子量に対する重量平均分子量の比で表される分子量分布(重量平均分子量/数平均分子量)が、1.0~5.0が好ましく、1.5~4.8がより好ましく、1.8~4.8がさらに好ましく、2.5~4.7が特に好ましい。腸管バリア機能改善作用の観点から、本発明におけるフラバン-3-オール重合体は、分子量分布(重量平均分子量/数平均分子量)が上記範囲であることが好ましい。

[0014] 本発明で使用されるフラバン-3-オール重合体は、その由来や製造方法によって特に限定されるものではない。例えば、植物から抽出した植物由来のものを用いてもよく、合成法によって得られたものを用いてもよい。フラバン-3-オール重合体は、例えば、ブドウ、インディアンデーツ等の植物から得ることができる。本発明の一態様において、フラバン-3-オール重合

体は、ブドウ由来のものが好ましく、ブドウ果実、ブドウ種皮及びブドウ種子からなる群より選択される1以上のブドウ由来の原料に含まれるもの（該原料由来のもの）がより好ましく、ブドウ種子由来（例えば、ブドウ種子抽出物由来）のものがさらに好ましい。

[0015] 本発明で使用されるフラバン-3-オール重合体は、ブドウ等の植物に含まれる成分であり、長期間摂取しても副作用が少なく安全性が高いものである。本発明によれば、長期間摂取しても副作用が少なく安全性が高い物質を有効成分として含む腸管バリア機能改善用組成物を提供することができる。

[0016] 例えば、ブドウ種子からフラバン-3-オール重合体の抽出及び精製する場合は、ブドウ種子を含水アルコールで抽出したのち、得られる抽出液を濾過、濃縮してアルコールを除去したのち、カラム精製を行うことで、フラバン-3-オール重合体を含むブドウ種子抽出物を得ることができる。また例えば、実施例に記載の方法等でブドウ種子抽出物等の植物抽出物を分画精製することにより、重量平均分子量が上記範囲のフラバン-3-オール重合体を得ることができる。

[0017] フラバン-3-オール重合体の重量平均分子量及び数平均分子量は、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定されるカテキン及びポリスチレン換算の値である。フラバン-3-オール重合体の重量平均分子量及び数平均分子量は、後述の実施例に記載の方法に従って測定することができる。得られた数平均分子量をカテキンの分子量（290）で除することにより、重合度を計算することができる。

[0018] 本発明において、腸管バリア機能とは、腸管上皮細胞外（腸管内）から体内への異物（例えば、エンドトキシン等の毒素、起炎物質、未消化物等）の侵入（透過）を防ぐ機能をいう。腸管には、大腸及び小腸が含まれる。正常な状態と比べて腸管上皮細胞外から体内への異物の侵入が促進されている状態を、腸管上皮細胞における異物の透過性が上昇（亢進）した状態と呼ぶ。腸管バリア機能改善とは、腸管上皮細胞における異物の透過性の上昇を抑制すること、及び、腸管上皮細胞における異物の透過性を低下させることのいずれ

れをも意味する。また、本発明において、腸管バリア機能改善は、腸管バリア機能の低下を抑制すること、低下した腸管バリア機能を高めることを含む意味でも用いられる。例えば、腸管上皮細胞を互いに接着するタイトジャンクションを正常化又は強化することによって、腸管バリア機能が改善される。一態様において、本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、腸管上皮細胞におけるタイトジャンクションを正常化又は強化することによって腸管バリア機能を改善するために使用され得る。

[0019] 腸管バリア機能改善効果は、例えば、腸管上皮細胞の電気抵抗値（経上皮膜抵抗値（*t r a n s e p i t h e l i a l e l e c t r i c r e s i s t a n c e* : T E E R））が上昇することによって、又は、T E E Rの低下を抑制することによって示される。上記T E E Rを上昇させる又はその低下を抑制する物質は、腸管上皮細胞におけるタイトジャンクションを正常化又は強化する作用を有する。また、腸管バリア機能改善効果は、腸管上皮細胞の腸管側から体内側へ透過する物質の量が減少することによっても示される。当業者は、目的に応じて腸管バリア機能改善効果の具体的な評価方法を選択することができる。例えば後述する実施例に示したように、ヒト腸管上皮細胞（C a c o - 2 細胞）を用いた腸管透過モデルを用いて、T E E Rを測定する方法を用いることができる。具体的には、C a c o - 2 単層培養細胞に炎症性サイトカイン（ $T N F \alpha$ 、 $I L - 1 \beta$ 、 $I F N \gamma$ 等）を添加してヒトで腸管バリア機能を破綻させ得る状態を作り出し、被験物質の添加により、該物質を添加しない場合と比べてT E E Rの低下が抑制されれば、その被験物質には腸管バリア機能改善効果があると評価することができる。実施例に示されるように、重量平均分子量が4 5 0 0 ~ 5 0 0 0 であるフラバン-3-オール重合体は、C a c o - 2 を用いた腸管透過モデルにおいて、炎症性サイトカインの添加によるT E E Rの低下を抑制する作用が高く、高い腸管バリア機能改善作用を有した。重量平均分子量が4 5 0 0 ~ 5 0 0 0 であるフラバン-3-オール重合体は、腸管上皮細胞におけるタイトジャンクションを正常化又は強化して、腸管バリア機能を改善することができる。

フラバン-3-オール重合体の中で、上記の特定の重量平均分子量のものが優れた腸管バリア機能改善効果を示すことは、驚くべき知見である。

[0020] また、実施例に示されるように、上記フラバン-3-オール重合体は、腸管バリア機能改善作用により、ストレスによる大腸痛覚過敏の症状を予防又は改善する作用を有した。大腸痛覚過敏の予防又は改善により、腹部不快感の予防又は改善効果が期待される。従って、重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体は、腸管バリア機能を改善することにより、例えば、腹部不快感を予防又は改善するために有用である。

[0021] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体を有効成分として含むことにより、優れた腸管バリア機能改善作用を有する。このため本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、腸管バリア機能の改善が有効な状態又は疾患、例えば腸管バリア機能の異常に関連する状態又は疾患の予防又は改善に有用である。腸管バリア機能の異常には、腸管バリア機能の低下が含まれる。腸管バリア機能の異常に関連する状態又は疾患としては、腸管バリア機能の異常に起因する状態若しくは疾患、又は、腸管バリア機能の異常を伴う状態若しくは疾患が挙げられる。このような腸管バリア機能の異常に関連する状態又は疾患として、例えば、炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、全身性自己免疫疾患（関節リウマチ、エリテマトーデス等）、アレルギー（食物アレルギー、花粉症等）、生活習慣病（肥満、1型又は2型糖尿病、高血圧、高脂血症、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、動脈硬化等）等が挙げられる（例えば、Camilleri et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 303: G775-G785, 2012; Mu et al., Front. Immunol., Vol. 8, Article 598, 2017; Bischoff et al., BMC Gastroenterology 2014 14:189）。

[0022] 腸管バリア機能の異常に関連する状態又は疾患のより具体的な症状の一例と

して、下痢、便秘、おなか（腹部）の不快感（膨満感、ごろごろ感、腹痛等）等の症状が挙げられる。本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、腸管バリア機能を改善することにより、腸の状態を改善する作用を有する。従って本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、腸管バリア機能改善により腸の調子を整えることができ、上記のような腸の症状の予防又は改善のために有用である。一態様において、本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、腸管バリア機能を改善することにより、整腸のため（例えば、下痢、便秘、腹部の不快感等を予防又は改善するため）に使用され得る。中でも、腹部の不快感を予防又は改善するために好ましく使用され、ストレスによる腹部の不快感の予防又は改善にも有用である。また、腸管バリア機能の異常は、生活習慣病等とも関連する（例えば上記の *Bischoff et al.*, *BM C Gastroenterology* 2014 14:189）。腸管バリア機能を改善することは、生活習慣病の予防又は改善にも有効である。生活習慣病の症状として、糖代謝異常、脂質代謝異常、体脂肪増加、内臓脂肪増加、腹囲脂肪増加、高めの血圧等が挙げられる。従って本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、腸管バリア機能を改善することにより、糖代謝の改善、脂質代謝の改善、体脂肪、内臓脂肪、腹囲脂肪等の脂肪の減少又は増加抑制、高めの血圧の改善等にも寄与し得る。

[0023] 本明細書で「状態又は疾患の予防」というときは、状態又は疾患に対する対象の抵抗性を高めること、状態又は疾患の発症を遅延させること又は防止することを指す。また、本明細書で「状態又は疾患の改善」というときは、対象を状態又は疾患から回復させること、状態又は疾患の症状を軽減すること、状態又は疾患の進行を遅延させること又は防止することを指す。

[0024] 本発明の組成物は、治療用途（医療用途）又は非治療用途（非医療用途）のいずれにも適用することができる。

本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、例えば、飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等の形態で提供することができるが、これらに限定されるものではない。本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、それ自体が飲食品、医薬

品、医薬部外品、飼料等であってもよく、これらに使用される添加剤等の製剤、素材であってもよい。本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、一例として、剤の形態で提供することができるが、本形態に限定されるものではない。当該剤をそのまま組成物として、又は、当該剤を含む組成物として提供することもできる。

一態様において、本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、好ましくは経口用組成物である。本発明によれば、優れた腸管バリア機能改善作用を有する経口用組成物を提供することができる。経口用組成物として、飲食品、医薬品、医薬部外品が挙げられ、好ましくは飲食品である。

- [0025] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、本発明の効果を損なわない限り、上述したフラバン-3-オール重合体以外の成分（他の成分）1又は2以上を含有していてもよい。一態様において、他の成分として、例えば、乳酸菌、ビフィズス菌、食物繊維、多糖類等を含有していてもよい。
- 乳酸菌及びビフィズス菌は、経口的に摂取することができる菌であることが好ましい。

- [0026] 上記食物繊維は、水に不溶性の食物繊維、水溶性の食物繊維のいずれであってもよい。水に不溶性の食物繊維としては、セルロース、リグニン、ヘミセルロース、小麦ふすま、アップルファイバー、さつまいもファイバー、キチンなどが例示される。水溶性食物繊維は、高粘性物と低粘性物とに大別され、高粘性物としては、ペクチン、コンニャクマンナン、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、グアーガム、寒天などが挙げられる。日本国内で一般に知られている食物繊維のうち、低粘性物の水溶性食物繊維とは、50重量%以上の食物繊維を含有し、常温水に溶解して低粘性の溶液、おおむね5重量%水溶液で20 mPa・s以下の粘度を示す溶液となる食物繊維素材を指称する。水溶性食物繊維の低粘性物としては、難消化性デキストリン、ポリデキストロース、グアーガム分解物、ライテス（ポリデキストロース）などが挙げられる。この他にも低粘性、水溶性の条件を満たす食物繊維素材は何れも包含される。食物繊維は1種用いてもよく、2種以上用いてもよい。

- [0027] 上記多糖類としては、ガラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖、マンノオリゴ糖、アガロオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラフィノース等のオリゴ糖が挙げられる。これらは1種用いてもよく、2種以上用いてもよい。
- [0028] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、上記以外にも、任意の添加剤、任意の成分を含有することができる。これらの添加剤及び成分は、腸管バリア機能改善用組成物の形態等に応じて選択することができ、一般的に飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等に使用可能なものが使用できる。例えば、経口投与剤として飲食品に又は薬学的に許容される各種の添加剤、例えば賦形剤、滑沢剤、安定剤、分散剤、結合剤、希釈剤、香味料、甘味料、風味剤、着色剤などを例示することができる。例えば、本発明の腸管バリア機能改善用組成物を経口用組成物とする場合は、本発明の効果を損なわない範囲で、上記の他にビタミン、ビタミン様物質、タンパク質、アミノ酸、油脂、有機酸、炭水化物、植物由来原料、動物由来原料、微生物、飲食品用添加物、医薬品用添加物等、経口摂取可能な成分を適宜含有させることができる。
- 上記以外にも、その用途に応じて、飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等に使用される素材等の成分を適宜配合することができる。
- [0029] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物の形態は、本発明の効果を有するものである限り特に制限されず、例えば、錠剤、丸剤、顆粒剤、細粒剤、咀嚼剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤、ハードカプセル剤を含む）、液剤、チュアブル剤、飲料等が挙げられる。その他の食品の形態であってもよい。これらの投与形態は、当該分野で通常知られた慣用的な方法を用いて調製することができる。
- [0030] 一態様において、本発明の腸管バリア機能改善用組成物を飲食品とする場合、上記フラバン-3-オール重合体に、飲食品に使用可能な成分（例えば、飲食品素材、必要に応じて使用される添加剤等）を配合して、種々の飲食品（飲食品組成物）とすることができる。飲食品は特に限定されず、例えば、一般的な飲食品、健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品、病者用食品

、食品添加剤、これらの原料等が挙げられる。飲食品の形態も特に限定されず、錠剤、被覆錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、丸剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤、ハードカプセル剤を含む）、ドライシロップ剤、チュアブル剤等の経口用固形製剤；内服液剤、シロップ剤等の経口用液体製剤の各種製剤形態とすることもできる。本発明の一態様において、飲食品は、上記の乳酸菌、ビフィズス菌、食物繊維、多糖類の1又は2以上を含んでいてもよい。

[0031] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物を医薬品又は医薬部外品とする場合、上記フラバン-3-オール重合体に、薬学的に許容される賦形剤等の添加剤を配合して、各種剤形の医薬品（医薬組成物）又は医薬部外品（医薬部外品組成物）とすることができる。医薬品又は医薬部外品の投与形態は、経口投与が好ましい。医薬品又は医薬部外品の剤形は、投与形態に適した剤形とすればよい。経口用医薬品又は医薬部外品の剤形として、例えば、錠剤、被覆錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、丸剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤、ハードカプセル剤を含む）、ドライシロップ剤、チュアブル剤等の経口用固形製剤；内服液剤、シロップ剤等の経口用液体製剤が挙げられる。

[0032] 錠剤、丸剤及び顆粒剤の場合、必要に応じて慣用的な剤皮を施した剤形、例えば糖衣錠、ゼラチン被包剤、腸溶被包剤、フィルムコーティング剤等とすることもでき、また錠剤は二重錠等の多層錠とすることもできる。

[0033] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物を、飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等とする場合、その製造方法は特に限定されず、上記フラバン-3-オール重合体を用いて、一般的な方法により製造することができる。本発明は、重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体の、腸管バリア機能改善用組成物を製造するための使用、も包含する。

[0034] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物には、包装、容器又は説明書等に用途、有効成分の種類、上述した効果、使用方法（例えば、摂取方法、投与方法）等の1又は2以上を表示してもよい。本発明の腸管バリア機能改善用組成物には、腸管バリア機能改善作用又は腸管バリア機能改善作用に基づく作用を有する旨の表示が付されていてもよい。このような表示として、例えば、

整腸作用を有する旨の表示が付されていてもよい。

整腸作用は、腸管バリア機能の改善に基づく整腸作用であればよく、特に限定されない。上記整腸作用を有する旨の表示の一例として、「便秘又は下痢気味な方に」、「おなかの調子が気になる方に」、「おなかの不快感を感じやすい方に」、「便通を改善」、「便の状態を改善」、「排便回数を改善」、「排便量を改善」、「おなかすっきり」、「おなかの調子を整える」、「腸の調子を整える」、「おなかの不快感を改善」、「ガスの発生を和らげる」、「おなかの張りを和らげる」、「おなかのごろごろ感を和らげる」等が挙げられる。本発明の腸管バリア機能改善用組成物には、このような表示1又は2以上が付されていてもよい。

[0035] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物中の重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体の含有量は、該組成物の形態等に応じて適宜設定することができる。一態様において、腸管バリア機能改善用組成物を、飲食品、医薬、医薬部外品等の経口用組成物とする場合、上記フラバン-3-オール重合体の含有量は、組成物中に0.0001重量%以上が好ましく、0.01重量%以上がより好ましく、また、80.0重量%以下が好ましく、20.0重量%以下がより好ましい。一態様において、上記フラバン-3-オール重合体の含有量は、腸管バリア機能改善用組成物中に0.0001～80.0重量%が好ましく、0.01～20.0重量%がより好ましい。

上記フラバン-3-オール重合体の含有量は、公知の方法に従って測定することができ、例えば、HPLC法等を用いることができる。

[0036] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、その形態に応じた適当な方法で摂取又は投与することができる。本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、好ましくは、経口投与又は経口摂取される。

本発明の腸管バリア機能改善用組成物の摂取量（投与量ということもできる）は特に限定されず、腸管バリア機能改善効果が得られるような量であればよく、投与形態、投与方法等に応じて適宜設定すればよい。一態様として、

ヒト（成人）（例えば、体重60kg）を対象に経口で投与する又は摂取させる場合、腸管バリア機能改善用組成物の摂取量は、重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体の摂取量として、1日あたり、1～2000mgが好ましく、10～1500mgがより好ましく、30～1000mgがさらに好ましく、100～1000mgが特に好ましい。上記量を、例えば1日1回で又は2～3回に分けて経口投与又は摂取させることが好ましい。ヒト（成人）を対象に腸管バリア機能改善効果を得ることを目的として腸管バリア機能改善用組成物を摂取させる場合は、上記フラバン-3-オール重合体の摂取量が上記範囲となるように、腸管バリア機能改善用組成物を対象に摂取させる又は投与することが好ましい。一態様において、本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、成人に、体重60kgあたり、1日当たり上記量の上記フラバン-3-オール重合体を摂取させる又は投与するための経口用組成物であってよい。

[0037] 一態様において、本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、その投与形態、投与方法等を考慮して、本発明の所望の効果が得られるような量、すなわち有効量の上記フラバン-3-オール重合体を含有することが好ましい。一態様として例えば、腸管バリア機能改善用組成物が飲食品、経口用医薬等の経口用組成物である場合、該組成物の成人（例えば、体重60kg）1人1日当たりの摂取量中に、上記フラバン-3-オール重合体の含有量が、1～2000mgが好ましく、10～1500mgがより好ましく、30～1000mgがさらに好ましく、100～1000mgが特に好ましい。

[0038] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物の有効成分である上記フラバン-3-オール重合体は、継続的に摂取（投与）されることによって、腸管バリア機能改善効果が高まることが期待される。好ましい態様において、本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、継続して摂取されるものである。本発明の一実施態様において、腸管バリア機能改善用組成物は、1週間以上継続して摂取されることが好ましい。

[0039] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物を投与又は摂取させる対象（以下、単

に投与対象ともいう)は、ヒト、ヒト以外の動物が好ましく、哺乳動物(ヒト及び非ヒト哺乳動物)がより好ましく、ヒトがさらに好ましい。また、本発明における投与対象として、腸管バリア機能改善を必要とする又は希望する対象が好ましい。例えば、腸管バリア機能が低下した対象、上述した腸管バリア機能の異常が関連する状態又は疾患の予防又は改善を希望する対象等が好適な対象として挙げられる。

[0040] 本発明は、以下の腸管バリア機能改善方法等も包含する。

重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体を対象に投与する、腸管バリア機能改善方法。

重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体の、腸管バリア機能改善のための使用。

上記方法及び使用は、治療的な方法及び使用であってもよく、非治療的な方法及び使用であってもよい。「非治療的」とは、医療行為、すなわち手術、治療又は診断を含まない概念である。

上記フラバン-3-オール重合体の投与量は、腸管バリア機能改善効果が得られる量、すなわち有効量であればよく、特に限定されず、例えば上述した量を投与することが好ましい。投与経路は、好ましくは経口投与である。上記フラバン-3-オール重合体は、そのまま投与してもよいし、上述したフラバン-3-オール重合体を含む組成物を投与してもよい。例えば、上述した本発明の腸管バリア機能改善用組成物を投与することができる。上記フラバン-3-オール重合体、対象(投与対象)、投与方法、投与量及びそれらの好ましい態様等は、上述した腸管バリア機能改善用組成物におけるものと同じである。一態様において、例えば、ヒト(成人)を対象に経口投与する場合、上記フラバン-3-オール重合体の1日あたりの投与量は、1～2000mgが好ましく、10～1500mgがより好ましく、30～1000mgがさらに好ましく、100～1000mgが特に好ましい。上記方法及び使用においては、上記フラバン-3-オール重合体を1週間以上継続して投与することが好ましい。

実施例

[0041] 以下、本発明をより具体的に説明する実施例を示す。なお、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

[0042] <実施例 1>

(フラバン-3オール重合体の精製)

ブドウ種子エキス（ブドウ種子抽出物）又はインディアンデーツエキス（インディアンデーツ抽出物）からフラバン-3オール重合体（以下、フラバン-3オール重合体を、OPCともいう）を精製した。

OPCの精製はBiosci. Biotechnol. Biochem., 73(6), 1274-1279(2009)に記載の方法に準じて行い、OPCを分画精製した。ブドウ種子エキスは市販のOPC量が81%以上のものを、インディアンデーツエキスはOPC量35%以上が規格されているものを出発物として用いた。

[0043] ブドウ種子エキスからOPCを精製した具体的な手順を以下に記載する。移行率は、「100×収量(g)／出発原料(g)」を意味する。

ブドウ種子エキス(10.2g)を水(100mL)に溶解させた後、酢酸エチル(100mL)で3回分配抽出した。酢酸エチル移行部を、濃縮及び乾固し、フラクション1(Fr. 1)を得た(移行率:26%)。水移行部を、濃縮及び乾固し、フラクション2(Fr. 2)を得た(移行率:72%)。フラクション2をメタノール(120mL)に溶解させ、これにクロロホルム(80mL)を添加し、得られた溶液を遠心分離し(3000rpm、5分)、沈殿(P1)と上清(S1)とに分けた。沈殿(P1)を濃縮及び乾固して、フラクション3(Fr. 3)を得た(移行率:17%)。

上清(S1)に、クロロホルム(40mL)を添加し、遠心分離し(3000rpm、5分)、沈殿(P2)と上清(S2)とに分けた。沈殿(P2)を濃縮及び乾固して、フラクション4(Fr. 4)を得た(移行率:10%)。

上澄み(S2)に、クロロホルム(60mL)を添加し、遠心分離し(30

00 rpm、5分)、沈殿 (P 3) と上清 (S 3) とに分けた。沈殿 (P 3) を濃縮及び乾固して、フラクション 5 (F r. 5) を得た (移行率: 13%)。

上清 (S 3) に、クロロホルム (100 mL) を添加し、遠心分離し (4000 rpm、5分)、沈殿 (P 4) と上清 (S 4) とに分けた。

沈殿 (P 4) を濃縮及び乾固して、フラクション 6 (F r. 6) を得た (移行率: 12%)。上清 (S 4) を濃縮及び乾固して、フラクション 7 (F r. 7) を得た (移行率: 18%)。

[0044] インディアンデーツエキスを OPC を精製した具体的な手順を以下に記載する。

上記インディアンデーツエキス (10.2 g) を水 (100 mL) に溶解させた後、酢酸エチル (100 mL) で3回分配抽出した。酢酸エチル移行部を、濃縮及び乾固し、フラクション 8 (F r. 8) を得た (移行率: 2%)。水移行部を、濃縮及び乾固し、フラクション 9 (F r. 9) を得た (移行率: 91%)。フラクション 9 をメタノール (160 mL) に溶解させ、これにクロロホルム (40 mL) を添加し、得られた溶液を遠心分離し (3000 rpm、5分)、沈殿 (ppt) と上清とに分けた。沈殿を濃縮及び乾固して、フラクション 10 (F r. 10) を (移行率: 59%)、上清を濃縮及び乾固して、フラクション 11 (F r. 11) を (移行率: 28%)、それぞれ得た。

図1は、ブドウ種子エキスから、各フラクションを精製した手順を示すフローチャートである。図2は、インディアンデーツエキスを精製した手順を示すフローチャートである。図1及び図2中、ppt. は沈殿を、sup. は上清を、それぞれ意味する。

[0045] (フラバン-3オール重合体の重量平均分子量及び数平均分子量の測定)

上記で調製された各フラクション (OPC画分) の OPC の重量平均分子量及び数平均分子量を、以下に示す高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析条件で測定した。重量平均分子量及び数平均分子量の算出には株式会社

島津製作所製の解析ソフトLC Solution GPCを使用した。また検量線はShodex社の標準試料（ポリスチレン）SL-105（Lot. 00301）の分子量780、2340、6180、20000及び（+）-カテキン水和物（Sigma株式会社：C1251）を用い、3次曲線にて作成した。

[0046] (HPLC分析条件)

検出器：UV (261nm)

カラム：Shodex OHpak SB-806MHQ (φ7.6×25mm)

Shodex OHpak SB-802.5HQ (φ7.6×250mm)

(Guard column: Shodex OHpak SB-G)

溶媒：20mM LiBr/ジメチルホルムアミド (DMF)

カラム温度：40℃

流速：0.6mL/min

評価サンプルは、50mg/mLになるよう20mM LiBr/DMFで溶解後、10μLインジェクトした。

[0047] 図3は、作成した検量線である。図3中、1は分子量20000（23.967分）、2は分子量6180（24.955分）、3は分子量2340（26.527分）、4は分子量780（28.409分）、5は分子量290（29.781分）である。図3に示す検量線から求めた3次式（回帰式）を以下に示す。

$$Y = aX^3 + bX^2 + cX + d$$

$$a = -0.01074954, b = 0.8799255, c = -24.22844, d = 227.5189$$

[0048] 原料に用いたブドウ種子エキス、インディアンデーツエキス及び精製で得られたフラクション1～11（Fr. 1～11）を本分析に供し、OPCの純度、重量平均分子量、数平均分子量を算出した。これらを表1に示す。

[0049] [表1]

	OPCの 重量平均分子量	平均重合度1	OPCの 数平均分子量	平均重合度2	OPCのピーク 純度(%)
ブドウ種子エキス	5633	20	2319	8	89.7
Fr. 1	2510	9	1264	4	65.5
Fr. 2	6682	24	2793	10	97.9
Fr. 3	14107	50	3029	11	100.0
Fr. 4	9422	33	3169	11	100.0
Fr. 5	7000	25	2883	10	100.0
Fr. 6	4611	16	2466	9	100.0
Fr. 7	2778	10	1603	6	95.5
インディアンデーツエキス	28973	102	7463	26	99.7
Fr. 8	2294	8	1316	5	86.9
Fr. 9	24380	86	7126	25	100.0
Fr. 10	52211	184	12468	44	100.0
Fr. 11	15798	56	5796	20	99.8

[0050] 表1中、平均重合度1は、OPCの重量平均分子量をカテキンの分子量290で除したものである。平均重合度2は、OPCの数平均分子量をカテキンの分子量290で除したものである。

OPCのピーク純度は、HPLC (UV261nm) クロマトグラム中の検出されたピークの総面積を100%とし、OPCのピークエリアを面積百分

率で示したものである。

[0051] 各フラクションのOPCの分子量分布（重量平均分子量／数平均分子量）は、Fr. 1が2.0、Fr. 2が2.4、Fr. 3が4.7、Fr. 4が3.0、Fr. 5が2.4、Fr. 6が1.9、Fr. 7が1.7、Fr. 8が1.7、Fr. 9が3.4、Fr. 10が4.2、Fr. 11が2.7であった。

[0052] <実施例2>

Caco-2細胞を用いた腸管バリア機能を改善する成分の評価

DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）を用いて、トランズウェル（Millipore社製）でCaco-2細胞を37℃で3週間培養した。培養したCaco-2細胞のプレートから培地を除去し、血清不含DMEMでウェルをそれぞれ3回洗浄し、その培地でウェルを満たした。その後、Millipore-ERS（ミリポア社製）によりCaco-2単層細胞の経上皮電気抵抗（TEER）を測定し、十分なタイトジャンクションが形成されていると判断される細胞（ $TEER \geq 1000 \Omega \cdot cm^2$ ）を選抜して、次のスクリーニングに用いた。次いで、粘膜側、基底膜側両方の試験液（培地）に被験サンプル（以下、単にサンプルという）とTNF α （40 ng/mL）、IL-1 β （20 ng/mL）及びIFN γ （10 ng/mL）とを添加し、48時間培養した。なお、サンプルは、ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解後、試験液に添加した。この際に、炎症性サイトカイン（TNF α 、IL-1 β 及びIFN γ ）及びサンプルを添加しないウェルをノーマルとして設けた。また、炎症性サイトカインを添加し、サンプルを添加しないウェルをコントロールとして設けた。培養後、再びTEERを測定し、炎症性サイトカインによるTEERの低下（減少）をサンプルが抑制するかを評価した。

[0053] サンプルを添加したウェル、ノーマル及びコントロールのTEER値から、下記式により、サンプルによるTEER低下抑制率（%）を求めた。

（TEER低下抑制率の計算式）

$$\text{TEER低下抑制率 (\%)} = 100 \times \left(\frac{(\text{サンプルを添加したウェルのTEER}) - (\text{コントロールのTEER})}{(\text{ノーマルのTEER}) - (\text{コントロールのTEER})} \right)$$

この評価系では、TEER低下抑制率 (%) が高いほど、腸管バリア改善作用が高い。

[0054] サンプルには、実施例1で調製したFr. 3～7及び10～11の各フラクションを使用した。サンプルは、試験液中のOPCの濃度が $0.1 \mu\text{g/mL}$ となるように試験液に添加した。サンプルの用量は重合度測定時に得られたOPCのピーク面積で濃度の補正を行った。結果を図4に示す。

[0055] 比較のため、タイトジャンクションバリア機能改善作用が報告されているケルセチン（非特許文献1）について、上記評価を行った。上記試験において、サンプルとしてケルセチン（フナコシ（株））を試験液中に $9 \mu\text{g/mL}$ 添加して、TEER低下抑制率を評価した。

[0056] 図4は、Caco-2細胞を用いた、フラバン-3-オール重合体の腸管バリア機能改善作用の評価結果を示すグラフである。図4中の「抑制率 (%)」は、TEER低下抑制率 (%) を意味する。

[0057] Fr. 3～6及び11のOPCは、本発明で使用される重量平均分子量が4500～50000であるフラバン-3-オール重合体である。Fr. 7及び10のOPCは、重量平均分子量が上記範囲になく、本発明の範囲外である。

Fr. 3～6及び11は、Fr. 7及び10と比較してTEER低下を抑制する作用が高く、腸管バリア機能改善作用が高かった。Fr. 3～6及び11は、ケルセチンよりも低濃度で、高い腸管バリア機能改善作用を示した。

[0058] <実施例3>

腸管透過性及びストレス性大腸痛覚過敏に対するフラバン-3-オール重合体（OPC）の影響

一連の動物実験は、動物愛護管理法他関連法令を遵守し、社内動物実験委員会の審査を経て機関の長が承認した計画に基づき実施した。

[0059] (方法)

フラバン-3-オール重合体 (OPC) の投与には、OPCを83%含有する市販のブドウ種子抽出物を使用した。このブドウ種子抽出物に含まれるフラバン-3-オール重合体の重量平均分子量及び数平均分子量を実施例1に記載の方法で分析した。OPCの数平均分子量は1971、重量平均分子量は5139、分子量分布 (重量平均分子量/数平均分子量) は2.6であった。

[0060] 体重が約300gの雄性Sprague-Dawleyラットを3群に群分けした。

群1: ストレス無+Vehicle (N=7)、群2: ストレス+Vehicle (N=6)、群3: ストレス+ブドウ種子抽出物 (N=6)

群3のラットには上記ブドウ種子抽出物を投与し、群1及び2のラットには、Vehicle (蒸留水) を投与した。

ストレスを与える1週間前からラットにVehicle又はブドウ種子抽出物を経口投与した (いずれも1日1回)。ブドウ種子抽出物は、蒸留水に溶解させた10mg/mLの溶液を投与した。ブドウ種子抽出物の投与量は、上記OPCに換算して、1日当たり体重あたり83mg/kg (10mL/kg) とした。群1及び2のラットには、蒸留水を体重あたり10mL/kg投与した。試験期間中、飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母株式会社) 及び水は自由摂取できる状況で飼育を行った。

[0061] Vehicle又はブドウ種子抽出物を上記のように1週間投与後、群2及び3のラットには水浸ストレス (Water avoidance stress (WAS)) 負荷を行った。

ストレスは、水槽の中央のプラットフォームにラットを1時間置くことで処置し、それを3日間 (1日1回) 行うことで大腸痛覚過敏を誘導した。ストレス処置期間 (3日) は、Vehicle又はブドウ種子抽出物はストレスを与える1.5時間前に投与した。

[0062] 大腸痛覚過敏評価は、以下の方法で実施した。麻酔下でラットにバルーンカ

テータテル（シリコーンカテーテル、2.0 mm、テルモ株式会社）を経肛門的に2 cm挿入し、電極（テフロン（登録商標）被覆ステンレス鋼、0.05 mm、MT技研（株））を左側外側斜位筋肉に2 mm挿入した。その後ボールマンケージに入れた状態で覚醒させた。処置の30分後に注水により段階的にカテーテルを拡張し、筋電図を用いて大腸痛覚によって誘発された腹部筋収縮を観察して痛覚閾値を測定した。痛覚閾値測定は、ストレス前と、ストレス後の2回行った。ストレス前の測定は、ストレス処置1日目に、ストレス処置の直前（ストレス前）に行った。ストレス後の測定は、最後のストレス処置（3日目のストレス処置）から24時間後に上記のようにラットにバルーンカテーテルと電極の挿入をし、その30分後に痛覚閾値を測定した。なお、ストレス後の痛覚閾値測定の1.5時間前に、Vehicle又はブドウ種子抽出物を経口投与した。

痛覚閾値の評価結果は、ストレス前の痛覚閾値を100%とし、ストレス後の痛覚閾値の変化（ $100 \times \text{ストレス後の痛覚閾値} / \text{ストレス前の痛覚閾値}$ ）（%）を算出した。

[0063] 図5に、実施例3の試験のスケジュールを示す。図5中、矢印（↓）は、ラットにバルーンカテーテルを挿入する手術、逆三角形（▼）は、痛覚閾値の測定、丸（●）は、WAS（Water avoidance stress）又はストレスなし（Sham stress）、三角形（△）は、上記ブドウ種子抽出物又はVehicle投与を示す。Treat. 1及びMeas. 1はストレス前のバルーンカテーテル挿入手術及び痛覚閾値測定をそれぞれ示し、Treat. 2及びMeas. 2は、ストレス後のバルーンカテーテル挿入手術及び痛覚閾値測定をそれぞれ示す。

[0064] 大腸痛覚過敏の評価後、大腸の腸管透過性及びタイトジャンクションタンパク質の発現量を、以下の方法で測定した。

ストレス後の大腸痛覚過敏を評価した後に、麻酔下で大腸の内容物を洗浄し、大腸の上部を2ヶ所結紮し4 cmのループを作製した。そこに1 mLの1.5%エバンスブルー溶液を注入し、15分間静置した。結紮部位を取り出

し、PBSとN-acetyl-cysteineで洗浄し、2 mL N, N-dimethylformamideで透過したエバンスブルーを抽出した。その後、吸光度を測定してエバンスブルー透過量を求めた。大腸の腸管透過性 (mg/g tissue) は、エバンスブルーの透過量 (mg) を大腸の結紮部位の重量 (g) で補正して算出した。

タイトジャンクションタンパク質Claudin-2の発現量は、proteinsimple社のWesシステムにより解析した。大腸の結紮部位の下から1 cm組織を採取し、組織溶解液 (1% SDS, 1% Triton, 1% sodium deoxycholate in PBS) を用いてサンプルを調製した。

[0065] (結果)

図6 (a) ~ (c) に、大腸の痛覚閾値、大腸の腸管透過性及びClaudin-2の発現に対する上記フラバン-3-オール重合体の影響を調べた結果を示す。図6 (a) は痛覚閾値の評価結果、図6 (b) は大腸の腸管透過性 (大腸透過性) の評価結果、図6 (c) はClaudin-2 相対発現量である。Claudin-2の相対発現量は、群1における発現量を100とした相対発現量である。各グラフは平均±標準誤差で示し、群間の統計学的有意差については、群2 (ストレス+Vehicle群) に対してDunnett testを実施した (* : $p < 0.05$)。

[0066] 痛覚閾値はストレス処置により低下した。上記OPCの投与により、痛覚閾値は増加した。腸管透過性に関して、ストレス処置により透過性が亢進し、上記OPCがそれを抑制又は改善した。タイトジャンクションタンパク質Claudin-2の発現量は、ストレス処置により増加し、上記OPCはそれを抑制又は改善した。Claudin-2は発現が増大すると腸管透過性が増大することが知られている。上記腸管透過性の亢進及びClaudin-2の発現量の増加から、ストレスにより腸管上皮細胞のタイトジャンクション機能が低下したことが示唆された。上記OPCは、腸管バリア機能を改善する作用を有した。

産業上の利用可能性

[0067] 本発明の腸管バリア機能改善用組成物は、飲食品分野、医薬分野等で有用である。