

明 細 書

発明の名称：黒ショウガ油脂抽出物及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、黒ショウガから得られる油脂抽出物、及びその製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 黒ショウガ (*Kaempferia parviflora*) は、ショウガ科に属する植物の一種であり、日本では黒ウコンとも呼ばれている。黒ショウガは東南アジアを中心に自生しており、タイではクラチャイダム (*Kra chai dam*) と呼ばれる伝統的なハーブの一種である。

[0003] 黒ショウガに含まれる主な成分は、アントシアニンやメトキシフラボノイドを中心とするポリフェノール類であることがこれまでの研究で明らかにされており、ショウガに含まれるジンゲオールやショウガオール、ウコンに含まれるクルクミンは含まれていない。また、その効能としては抗肥満作用、抗ED作用、血流改善作用など、様々なものが知られており、黒ショウガは、わが国においてもサプリメントや飲料に広く利用されている。それらの効能をもたらす成分は、メトキシフラボンであると考えられている。従って、種々の効能を得るために、単離又は精製したメトキシフラボンを投与することも考えられる。しかしながら、そのようなメトキシフラボンは高価であり、実際には、それらを含む黒ショウガの抽出物を利用することが多い。

[0004] 特許文献1等に記載されている通り、これまで、メトキシフラボンを含む黒ショウガ抽出物は、主に熱水又は含水アルコール抽出によって製造されていた。しかしながら、この方法で得られる抽出物は苦味等の独特の香味を有し、そして黒紫色を呈する。特許文献1では、このような香味の問題を解決するため、糖、糖アルコール、可食生酸類、又は人工甘味料を利用している。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2013-192513号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 従来の黒ショウガ抽出物は、苦味等の独特の香味を有し、黒紫色を呈する。これらの特性は、当該抽出物を飲食品、医薬品、香粧品等に利用する場合に問題となり得る。

[0007] この点、抽出率を低下させれば、当該香味や色が目立たなくなる可能性はある。しかしながら、そのようにすると、有効成分であるメトキシフラボンの濃度も低下してしまう。

[0008] 本発明は、相当量のメトキシフラボンを含み、かつ苦味等の香味又は黒紫色の強度が低減された、黒ショウガ抽出物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、かかる課題について鋭意検討した結果、黒ショウガから得られる油脂抽出物において、従来の黒ショウガ抽出物に特有の黒紫色が目立たないか、又はその強度が低減されていることを見出した。また、当該油脂抽出物は、メトキシフラボンを十分に含んでいた。これらの知見に基づいて、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は以下のものに関するが、これらに限定されない。

1. 黒ショウガから得られる油脂抽出物であって、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上を含有し、当該抽出物から、当該11種のメトキシフラ

ボンの総含有量が5.0 mg/mlである溶液を調製し、当該溶液の波長660 nmにおける吸光度を測定すると、得られる吸光度が0.10以下である、前記抽出物。

2. 前記油脂が、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ジアシルグリセロール、ゴマサラダ油、オリーブ油、大豆油、ナタネ油、コーン油、米胚芽油、ヒマワリ種子油、シソ油、エゴマ油から選ばれる少なくとも一種である、1に記載の抽出物。

3. 1又は2に記載の抽出物を含む飲食品。

4. 1又は2に記載の抽出物を含む香粧品。

5. 黒ショウガから、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上のメトキシフラボンを含有する油脂抽出物を製造する方法であって、黒ショウガの植物体に油脂を接触させて当該1種以上のメトキシフラボンを抽出することを含む、前記方法。

6. 前記油脂が、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ジアシルグリセロール、ゴマサラダ油、オリーブ油、大豆油、ナタネ油、コーン油、米胚芽油、ヒマワリ種子油、シソ油、エゴマ油から選ばれる少なくとも一種である、5に記載の製造方法。

7. 前記抽出を50～180℃で行う、5又は6に記載の製造方法。

8. 黒ショウガから、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒ

ドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上のメトキシフラボンを含む油脂抽出物を製造する方法であって、

黒ショウガの植物体に水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を接触させて、当該1種以上のメトキシフラボンを抽出し、そして

当該抽出により得られた中間抽出物に油脂を接触させて当該メトキシフラボンを抽出することを含む、前記方法。

9. 当該中間抽出物に油脂を接触させる前に、及び／又はそれらが接触している間に、当該中間抽出物から水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を蒸発させることを更に含む、8に記載の製造方法。

10. 前記油脂が、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ジアシルグリセロール、ゴマサラダ油、オリーブ油、大豆油、ナタネ油、コーン油、米胚芽油、ヒマワリ種子油、シソ油、エゴマ油から選ばれる少なくとも一種である、8又は9に記載の製造方法。

11. 5～10のいずれか1項に記載の方法であって、さらに、

油脂との前記接触工程により得られた油脂含有抽出物に、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を接触させて、前記1種以上のメトキシフラボンを抽出し、そして

当該メトキシフラボンの抽出中に得られる2相混合物を液-液分離に付し、

当該液-液分離工程で分離された、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を含む抽出物を得ることを含む、前記方法。

12. 前記液-液分離工程を経て得られた抽出物から、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を除くことを更に含む、11に記載の方法。

13. 前記親水性溶媒がC₁₋₃アルコール及び／又はアセトンである、8～12のいずれか1項に記載の製造方法。

14. 5～13のいずれか1項に記載の製造方法によって得られる、前記1

1種のメトキシフラボンから選択される1種以上のメトキシフラボンを含む油脂抽出物。

発明の効果

[0011] 本発明の油脂抽出物においては、選択的に有効成分であるメトキシフラボンが抽出されているため、当該抽出物は、相当量のメトキシフラボンを含み、かつ従来の黒ショウガ抽出物にみられる好ましくない色の強度が低減されている。油脂で抽出され難い成分は黒ショウガの苦味の原因でもあると考えられるため、本発明の油脂抽出物では、必然的に苦味も低減されていると考えられる。また、当該抽出物が油脂を含んでいる場合には、それから油脂を除去すると、着色の少ないメトキシフラボン高含有の抽出物を（特に、粉末状態で）得ることも可能である。従って、本発明の油脂抽出物は、従来の黒ショウガ抽出物よりも、飲食品、医薬品、及び香粧品に利用しやすい。

[0012] さらに、本発明の、油脂抽出物の製造方法は、特殊な装置を使用しないため、当該油脂抽出物を容易かつ安価に、しかも多量に提供することができる。

[0013] 従って、本発明は、メトキシフラボンの利用に多大な貢献をもたらす。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、本発明の油脂抽出物と、含水アルコール抽出物の外観を表す写真である。

発明を実施するための形態

[0015] （油脂抽出物）

本発明の油脂抽出物は、黒ショウガから油脂抽出を経て得られる抽出物である。当該抽出物は、メトキシフラボンを含み、そして黒紫色の強度が低減されている。当該抽出物は、さらに油脂、特に抽出に用いられた油脂を含んでもよい。

[0016] 本発明の油脂抽出物は、黒ショウガから得られていないものや、黒ショウガを原料としていても油脂抽出を経て得られていないものとは、含有される成分の種類及び比率等の点で異なると考えられる。例えば、黒ショウガ以外

の植物から得られた抽出物もメトキシフラボンを含みうるが、その種類や比率は、本発明の抽出物と異なると考えられる。また、黒ショウガが原料であっても、そこから、油脂抽出以外の方法、例えば、含水アルコール抽出により得られた抽出物中のメトキシフラボンの比率は、本発明の油脂抽出物と異なる。この点は、後述する実施例を参照されたい。一方で、本発明においては、油脂抽出は、黒ショウガに対して直接行われてもよいし、間接的に、例えば、黒ショウガから油脂以外の溶媒、例えば水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を用いて得られた抽出液に対して行ってもよい。

[0017] (黒ショウガ)

黒ショウガ (*Kaempferia parviflora*) は、ショウガ科に属する植物の一種であり、東南アジアを中心に自生もしくは栽培されているため、容易に入手できる。

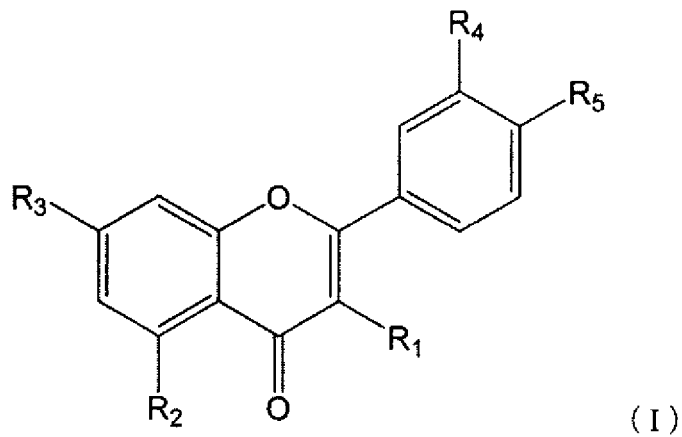
[0018] 抽出のためには、黒ショウガのどの部位を用いてもよい。例えば、葉部、花部、根茎部などが挙げられるが、これらの中でも、根茎部が好ましい。また、黒ショウガの植物体又はその部位をそのまま抽出に供してもよいが、好ましくは、当該植物体又はその部位を乾燥させてから抽出に供する。また、乾燥された植物体又はその部位は、そのまま又は粉碎してから、溶媒抽出に供することができる。当該乾燥は、天日で行ってもよいし、乾燥機を用いて行ってもよい。本発明においては、上記の種々の状態の黒ショウガの内の1つだけを用いてもよいし、2以上を組み合わせてもよい。

[0019] (メトキシフラボン)

本発明の油脂抽出物は、1種以上のメトキシフラボンを含有する。本明細書において、「メトキシフラボン」との用語は、1以上のメトキシ基を有するフラボンを意味する。メトキシフラボンは、典型的には、以下の式(1)に示す構造を有する化合物から選択される。

[0020]

[化1]



(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、及び R_5 は、各々独立して水素、ヒドロキシ、又はメトキシ基であり、 $R_1 \sim R_5$ の内の少なくとも1つはメトキシである。)

[0021] 好ましくは、式(I)の化合物は、以下の表1に記載の5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンから選択される。

[0022]

[表1]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	化合物名
1	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン
2	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン
3	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	5, 7-ジメトキシフラボン
4	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	5, 7, 4'-トリメトキシフラボン
5	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	3, 5, 7-トリメトキシフラボン
6	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン
7	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン
8	H	OH	OCH ₃	H	H	5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン
9	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン
10	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H	5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン
11	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃	5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボン

[0023] 本発明の油脂抽出物は、好ましくは、上記表1に示された化合物1～11の内の、少なくとも1種を含む。当該抽出物は、化合物1～11の内の、より好ましくは少なくとも2種、より好ましくは少なくとも3種、より好ましくは少なくとも4種、より好ましくは少なくとも5種、より好ましくは少なくとも6種、より好ましくは少なくとも7種、より好ましくは少なくとも8種、より好ましくは少なくとも9種、より好ましくは少なくとも10種、より好ましくは11種を含む。例えば、本発明の油脂抽出物は、化合物1～6を全て含むことが好ましい。

[0024] 本発明の油脂抽出物の好ましい態様において、前記少なくとも1種のメトキシフラボンは、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、及び5, 7, 4'-トリメトキシフラボンからなる群Aから選択される。当該抽出物は、群Aのメトキシフラボンだけでなく、他の化合物、例えば、黒ショウガ由来の、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンからなる群Bから選択される少なくとも1種のメトキシフラボンを含んでもよい。

群A及び群Bのメトキシフラボンの総含有量に対する、群Aのメトキシフラボンの総含有量の割合 ($A / (A + B)$) は、モル基準 (又は重量基準) で好ましくは0.65を超え、より好ましくは0.66以上、より好ましくは0.67以上、より好ましくは0.68以上、より好ましくは0.69以上、より好ましくは0.70以上、より好ましくは0.71以上である。当該割合に上限値はなく、当該割合は、例えば、1.00以下、0.90以下、又は0.80以下であってもよい。群Aのメトキシフラボンは、群Bのメトキシフラボンよりも高いNOX阻害作用を示すことを確認している。そして、本願の実施例9及び10は、当該割合 ($A / (A + B)$) が高い本願発明の油脂抽出物が、当該割合が低い親水性溶媒抽出物と比較して、高いNOX阻害作用を有することを示している。

[0025] 本発明の油脂抽出物が油脂を含有する場合には、当該抽出物中の前記11種のメトキシフラボンの総含有量の範囲の例は、10w/v%以下であり、好ましくは0.1~10w/v%であり、より好ましくは0.1~5w/v%であり、さらに好ましくは、0.1~2.5w/v%である。一方で、本発明の油脂抽出物が油脂を含有しない場合には、当該抽出物中の当該11種のメトキシフラボンの総含有量の範囲の例は、10~90w/v%であり、好ましくは20~70w/v%であり、より好ましくは30~50w/v%である。

[0026] (油脂)

本発明の油脂抽出物の製造に用いられ得る、そして当該抽出物に含まれ得る油脂は、メトキシフラボンを溶解できる限り特に限定されない。典型的には、当該油脂は、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ジアシルグリセロール、ゴマサラダ油、オリーブ油、大豆油、ナタネ油、コーン油、米胚芽油、ヒマワリ種子油、シソ油、エゴマ油から選ばれる少なくとも一種である。

[0027] 中鎖脂肪酸トリグリセリドに関して用いられる「中鎖脂肪酸」とは、炭素数8~12の脂肪酸を意味する。当該トリグリセリドを構成する脂肪酸部分の内の少なくとも一つ、好ましくは二つが、より好ましくは三つが、中鎖脂

脂肪酸である。

[0028] 油脂抽出物が油脂を含有する場合、当該抽出物中の油脂の量は、特に制限されないが、典型的には、50～100w/w%程度である。

[0029] (油脂抽出物の色)

本発明の油脂抽出物においては、黒紫色の強度が低減されている。このことを確認するために、当該抽出物の吸光度を測定することが有効である。

[0030] 具体的には、当該抽出物から、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンの総含有量が5.0mg/mlである溶液を調製し、当該溶液の、波長660nmにおける吸光度を測定する。このようにして測定される吸光度は、本発明においては、0.10以下である。当該吸光度は、好ましくは0.07以下、より好ましくは0.05以下である。ここで、確認のために記載するが、当該抽出物（及び当該溶液）は、当該11種のメトキシフラボンを全て含有する必要はない。例えば、当該油脂抽出物が当該11種の内の9種しか含まない場合には、その9種のメトキシフラボンの総含有量が、5.0mg/mlとなる溶液を調製して、その吸光度を測定すればよい。また、特に断りがない限り、本明細書における吸光度は、セル長（光路長）が10mmの場合の吸光度を意味する。測定に用いた装置のセル長が10mmでない場合には、得られた吸光度の値をセル長が10mmである場合の値に換算する。また、吸光度測定のためには、適切なブランクを使用する。

[0031] 本発明においては、油脂抽出によって得られた物質、特に、溶媒以外の物質の色の強度が重要である。このため、吸光度測定がされる溶液を調製する際には、溶媒の量だけを調節し、他の物質の量は変化させない。即ち、溶媒

以外の外因性の物質を添加してはならず、また、抽出された物質を除去してはならない。例えば、当該油脂抽出物が油脂を含まない場合には、当該抽出物を溶媒、例えば油脂に溶解させて、11種のメトキシフラボンの総含有量が 5.0 mg/ml である溶液を調製する。一方、当該抽出物が油脂を含む場合には、当該油脂を含めた溶媒の量を調節する。例えば、当該抽出物中の11種のメトキシフラボンの総含有量が 5.0 mg/ml を超えている場合には、油脂などの溶媒を追加する。当該抽出物が油脂を含有し、その11種のメトキシフラボンの総含有量が元々 5.0 mg/ml である場合には、溶媒量を調節する必要はなく、新たに溶液を調製する必要もない。しかしながら、このような抽出物を吸光度測定のための溶液として提供することも、便宜上、本発明の「11種の化合物の総含有量が 5.0 mg/ml である溶液を調製する」ことに含まれる。

[0032] 一般に、吸光度は不溶物が存在しない状態で測定する。本発明においても、当該抽出物の吸光度を溶液状態で測定する。従って、例えば、11種のメトキシフラボンの総含有量が 5.0 mg/ml で抽出物中の成分が析出してしまう場合には、その吸光度の直接的な測定は困難である。このような場合には、油脂等を用いて当該抽出物を希釈して溶液とし、希釈後に吸光度を測定し、その吸光度を、抽出物中の当該メトキシフラボン総含有量が 5.0 mg/ml である場合の値に換算すると、所望の値又はそれに近い値が得られる。希釈をせずとも抽出物中の当該メトキシフラボンの総含有量が 5.0 mg/ml を下回っている場合にも、その吸光度に基づいて上記のような換算をすれば、所望の値又はそれに近い値が得られる。

[0033] (他の成分)

本発明の油脂抽出物は、メトキシフラボンや油脂に加えて、他の成分を含有してもよい。例えば、ビタミンE等のビタミン類、ミネラル類、ホルモン、栄養成分などの生理活性成分のほか、製剤化において配合される安定化剤、抗酸化剤等を含有してもよい。

[0034] (製造方法)

本発明は、別の側面では、黒ショウガから油脂抽出物を製造する方法である。

[0035] 例えば、当該方法は、黒ショウガの植物体に油脂を接触させて、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上のメトキシフラボンを抽出することを含む。この方法の典型例を以下に記載する。

[0036] 先ず、黒ショウガの植物体を準備する。当該植物体又はその部位を、必要に応じて、乾燥し、粉碎する。次いで、当該植物体又はその部位を油脂と接触させて、抽出を行う。抽出条件は、メトキシフラボンを抽出できる限り特に限定されない。典型的な抽出温度は、50～180℃、70～170℃、70～150℃、100～150℃、又は120～150℃である。抽出時間は、典型的には、1分～1日、10分～10時間、又は15分～5時間である。また、使用される油脂の容量は、典型的には、黒ショウガの重量の0.1～30倍、又は0.5～15倍である。用いられる油脂の例は、上記した通りである。

[0037] 理論に拘束されないが、この抽出中に、メトキシフラボンが油脂に移行するが、黒ショウガの黒紫色を生じる成分は、黒ショウガの植物体中に留まると考えられる。また、黒ショウガに特有の香味を生じる成分も、油脂に移行せずに当該植物体中に留まると考えられる。

[0038] 次いで、抽出を行った後には、必要に応じて、当該抽出により得られた油脂含有抽出物から濾過又は遠心分離により不溶性固形物を除く。

[0039] 或いは、油脂抽出物の製造は、黒ショウガの植物体に水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を接触させて、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3,

5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上のメトキシフラボンを抽出し、そして当該抽出により得られた中間抽出物に油脂を接触させて当該メトキシフラボンを抽出することを含む。この方法の典型例を以下に記載する。

[0040] 先ず、上記と同様にして黒ショウガの植物体を準備する。次いで、当該植物体又はその部位に、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を接触させて、抽出を行う。抽出条件は、メトキシフラボンを抽出できる限り特に限定されない。典型的な抽出温度は、室温～還流温度、40℃～還流温度、50℃～還流温度、還流温度であるが、50℃～還流温度、又は還流温度が好ましい。抽出時間は、典型的には、1分～1日、10分～10時間、又は15分～5時間である。また、使用される水、親水性溶媒又はそれらの混合物の容量は、典型的には、黒ショウガの重量の0.1～30倍、又は0.5～15倍である。用いられる親水性溶媒は、好ましくはC₁₋₃アルコール及び／又はアセトンであり、より好ましくは、エタノールである。例えば、50～100 v/v%エタノールを用いて抽出を行う。この抽出工程で得られる中間抽出物を、油脂抽出工程に付す。

[0041] 油脂抽出工程では、当該中間抽出物と油脂とを接触させて抽出を行う。抽出条件は、メトキシフラボンを抽出できる限り特に限定されない。抽出温度は特に限定されず、例えば、5℃以上、10℃以上、20℃以上、30℃以上、40℃、又は50℃以上で行われる。抽出温度の上限値は特に制限されず、水、親水性溶媒又はそれらの混合物の還流温度以下であればよい。抽出時間は、典型的には、1分～1日、10分～10時間、又は15分～5時間である。また、使用される油脂の容量は、典型的には、黒ショウガの重量の

0.01～30倍、又は0.1～15倍である。用いられる油脂の例は、上記した通りである。

[0042] さらに、場合により、当該中間抽出物に油脂を接触させる前に、及び／又はそれらが接触している間に、当該中間抽出物から水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を蒸発させる。蒸発は、常圧下で行ってもよいし、減圧下で行ってもよい。このように積極的な蒸発を行う場合には、抽出時間はあまり重要でない。蒸発が進み、水、親水性溶媒又はそれらの混合物の量が低下すれば、メトキシフラボンが油脂中に、場合によって当該親水性溶媒等と共に、移行すると考えられる。

[0043] 理論に拘束されないが、油脂抽出中に、メトキシフラボンが油脂に移行するが、黒ショウガの黒紫色を生じる成分は、油脂に移行しないと考えられる。

[0044] 次に、抽出を行った後には、必要に応じて、当該抽出により得られた油脂含有抽出物から濾過又は遠心分離により不溶性固形物を除く。これは、中間抽出物についても同様である。

[0045] 前記の2つの方法によると、油脂含有抽出物を得ることができる。これは、さらなる精製をすることなく使用してもよいが、必要に応じて精製してもよい。例えば、当該油脂含有抽出物をさらなる抽出工程に付して、油脂を除去してもよい。具体的には、当該油脂含有抽出物に、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を接触させて、前記1種以上のメトキシフラボンを抽出する。この際、必要であれば、当該油脂含有抽出物に低極性の溶媒、例えば、*n*-ヘキサンのようなC₁₋₈の炭化水素を加えてもよい。

[0046] 用いる親水性溶媒や親水性溶媒と水との混合物の例は、上記した通りである。抽出温度は特に限定されず、例えば、5℃以上、10℃以上、20℃以上、30℃以上、40℃、又は50℃以上で行われる。抽出温度の上限値は特に制限されないが、水、親水性溶媒又はそれらの混合物の還流温度以下であればよい。抽出時間は、典型的には、1分～1日、10分～10時間、又は15分～5時間である。また、使用される水、親水性溶媒又はそれらの混

合物の容量は、典型的には、油脂抽出物の重量の0.01～30倍、又は0.1～15倍である。

[0047] さらに、メトキシフラボンの抽出中に、当該油脂含有抽出物由来の油脂相と、当該水、親水性溶媒、又はそれらの混合物由来の相との2相混合物が得られ、この混合物を液-液分離に付す。結果として、当該水、親水性溶媒、又はそれらの混合物の相（これは、メトキシフラボンと溶媒を含む抽出物である）を、油脂相から分離させることができる。液-液分離のためには、例えば、当該2相混合物を単に静置してもよいし、遠心分離に付してもよい。次いで、分離された抽出物を得る。

[0048] 分離された抽出物は、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される少なくとも1種のメトキシフラボンを含み、そして溶媒を含む液の形態にある。この液をそのまま利用してもよいし、溶媒（水、親水性溶媒、又はその混合物）を除去して、メトキシフラボンを含む粉末形態の抽出物を得てもよい。溶媒を除去する方法は特に限定されず、常圧又は減圧下での蒸留、凍結乾燥等が挙げられる。

[0049] このようにして油脂が除去された抽出物は、黒ショウガに特有のメトキシフラボンを比較的高い濃度で含有する。この抽出物も、必要に応じてさらに精製してもよい。

[0050] 上記の方法に従って得られた油脂抽出物（油脂含有抽出物、及び油脂が除去された抽出物を含む）には、必要に応じて、抗酸化剤等上記の他の成分を添加してもよい。

[0051] （適用）

本発明の油脂抽出物は、飲食品（機能性食品、健康補助食品、栄養機能食品、特別用途食品、特定保健用食品、栄養補助食品、食事療法用食品、健康食品、サプリメント等）、医薬品又は香粧品として、又はその原料として使用することができる。飲食品及び医薬品は、ペットの餌として加工したペットフードや動物飼料等、並びに動物用医薬品でもよい。

[0052] 飲食品、医薬品、及び香粧品は、抗酸化作用、抗肥満作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗ED作用、血流改善作用などの、メトキシフラボンが有効であると考えられる種々の生理作用を得るために使用することができる。

[0053] 飲食品、医薬品、香粧品に含まれるメトキシフラボンの総量は、その形態や用途によって異なるが、約0.0001～10重量%が好ましく、約0.05～5重量%が特に好ましい。

[0054] 本発明の油脂抽出物を含む飲食品の形態は、特に限定されないが、例えば、清涼飲料水（例えば、スポーツドリンク、炭酸飲料、果汁飲料）、菓子類（例えば、ケーキ、ビスケット、パン、飴）、麺類（例えば、うどん、そば、ラーメン、パスタ）、みそ、醤油、酢、サラダ油、ごま油、豆乳、牛乳である。或いは、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセルも含む）等の形態であってもよい。これらは、本発明に係る油脂抽出物と、賦形剤や希釈剤などの通常使用される他の材料を使用して、公知の方法により製造することができる。

[0055] 本発明の油脂抽出物を含む医薬品の形態は、特に限定されないが、例えば、外用剤（例えば、ローション、乳液剤、貼付剤、軟膏剤）、経口剤（錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセルも含む）、溶液剤、懸濁液剤）である。これらは、本発明に係る油脂抽出物と、賦形剤や希釈剤などの通常使用される他の材料を使用して、公知の方法により製造することができる。

[0056] 本発明の油脂抽出物を含む香粧品の形態は、特に限定されないが、例えば、化粧水、ジェル、ローション、クリーム、パック剤、乳液、ファンデーション

ョン、口紅、パウダー、洗顔料、ヘアートニックである。これらも、本発明に係る油脂抽出物と、賦形剤や希釈剤などの通常使用される他の材料を使用して、公知の方法により製造することができる。

[0057] また、本発明者は、本発明の油脂抽出物が、NADPHオキシダーゼ（NOX）阻害剤として有効であることも見出した。NOXは、好中球などに存在し、 O^{2-} を生成することが知られている酵素である。NOXの阻害は、NOXに起因する疾患の予防や治療につながる。従って、本発明の油脂抽出物は、NOXに起因する疾患の予防や治療のために使用することもできる。そのような疾患には、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎（花粉症）、アレルギー性結膜炎、アレルギー性胃腸炎、気管支喘息、小児喘息、食物アレルギー、薬物アレルギー、蕁麻疹などのアレルギー疾患、パーキンソン病、脳梗塞、白内障、てんかん、脊髄損傷、動脈硬化、未熟児網膜症、腎障害、消化性潰瘍、膵炎、潰瘍性大腸炎、心筋梗塞、成人呼吸窮迫症候群、肺気腫、慢性関節リウマチなどの膠原病、血管炎、浮腫、糖尿病合併症、紫外線障害、高山病、ポルフィリン血症、熱傷、凍傷、接触性皮膚炎、ショック、多臓器不全、DIC、癌、老化、疲労、サルコペニア（筋力低下）、ミトコンドリア機能障害、認知症、アルツハイマー病が含まれる。

[0058] （数値範囲）

明確化のために記載すると、本明細書において下限値と上限値によって表されている数値範囲、即ち「下限値～上限値」は、それら下限値及び上限値を含む。例えば、「1～2」により表される範囲は、1及び2を含む。

実施例

[0059] 【実施例1】

（メトキシフラボンの単離精製）

黒ショウガ150gに50%エタノール水溶液1500mlを加え、2時間加熱還流抽出を行った。冷後得られた抽出液をろ過し、減圧下にて濃縮し、凍結乾燥を行い、黒ショウガ抽出物25.7gを得た。得られた抽出物のうち9gをDia ion HP20（三菱化学株式会社製）を用いたカラムクロマトグ

ラフィーに付し、4つの画分（30%エタノール溶出部、50%エタノール溶出部、70%エタノール溶出部、100%エタノール溶出部）へ分画した。このうち50%エタノール溶出部を高速液体クロマトグラフィーに付して、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン（64 mg）、3, 5, 7, 3', 4'-ペントメトキシフラボン（464 mg）、5, 7-ジメトキシフラボン（145 mg）、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン（188 mg）、3, 5, 7-トリメトキシフラボン（35 mg）、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン（96 mg）を単離した。続いて100%エタノール溶出部についても同様に液体クロマトグラフィーによる分離精製を行い5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン（15 mg）、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン（84 mg）、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン（56 mg）、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン（100 mg）、5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボン（110 mg）を単離した。単離した化合物は、そのスペクトルデータを文献（大阪市立大学生活科学研究科 東鋭明氏博士論文「ショウガ科植物 *Kaempferia parviflora* に含まれる成分の構造と α -グルコシダーゼ阻害活性および抗変異原性」）に記載の各種スペクトルデータと比較の上、同定した。

[0060] [実施例2]

（油脂抽出物の製造）

3 g 及び 15 g の黒ショウガに、それぞれオリーブオイル 30 mL を加え、120℃で30分間抽出を行った後、冷却してからろ過し、2つの淡黄色の黒ショウガ油脂抽出物を得た。以下の分析条件で、得られた2つの油脂抽出物中のメトキシフラボン11種（表1に記載の化合物1～11）の総含有量を定量したところ、その値は、6.2 mg/mL（3 g の黒ショウガより）、22.4 mg/mL（15 g の黒ショウガより）であった。尚、これらの抽出物は、いずれも、表1に記載の化合物1～11を全て含んでいた。

[0061] （メトキシフラボンの分析定量）

黒ショウガ油脂抽出物 1.0 mL に n-ヘキサン 1.0 mL を加え希釈し

た後、2.0 mLの80%メタノール水溶液にて3回メトキシフラボンの抽出を行った。得られた80%メタノール抽出液をMega Bond Elute C18（アジレントテクノロジー社製）に通した後、Mega Bond Elute C18に吸着したメトキシフラボンを洗い出す目的で、80%メタノール2.0 mLを通した。得られた液をあわせた後、最終的に10 mLへメスアップし、HPLC用の分析試料とした。

[0062] (HPLC分析条件)

カラム：Develosil C30 UG5 (4.6 x 150 mm、5 μ m、野村化学株式会社製)

検出：280 nm (PDAは200~600 nm)

カラム温度：40℃

移動相A：0.05%トリフロロ酢酸水溶液

移動相B：90%アセトニトリル水溶液中のトリフロロ酢酸0.05%溶液

グラジェント：移動相B 50%—50%—70%—70% (0 min—7.5 min—20 min—25 min)

流速：1.0 mL/min

試料注入量：10 μ L

[0063] [実施例3]

黒ショウガ50 gに、エタノール500 mLを加えて、1時間加熱還流抽出を行った。得られた液を冷却後、吸引ろ過し、得られた抽出液に中鎖脂肪酸トリグリセリド15 mLを加え、減圧濃縮によりエタノールを留去したのち、不溶物を除く目的で再度吸引ろ過を行い黒ショウガ油脂抽出物を得た。また同様のエタノール抽出操作を行って新たに2つの抽出液を得て、それらに15 mLのオリーブ油、又は中鎖脂肪酸トリグリセリド（日清オイリオグループ株式会社製、日清MCTオイル）とオリーブ油との混合液（混合比率は1：1）を加えて、減圧濃縮によりエタノールを留去したのち、析出した不溶物を吸引ろ過にて除去し、2つの黒ショウガ油脂抽出物を得た。得られた3

つの黒ショウガ油脂抽出物について、実施例2に準じて11種のメトキシフラボンの総含有量を分析したところ、その値は、それぞれ34.7 mg/mL（中鎖脂肪酸トリグリセリド）、4.5 mg/mL（オリーブ油）、6.7 mg/mL（中鎖脂肪酸トリグリセリドとオリーブ油との混合液）であった。これらのことから、メトキシフラボンは中鎖脂肪酸トリグリセリドに溶解性が高く、中鎖脂肪酸トリグリセリドが溶剤に適していることが明らかになった。尚、これらの抽出物は、いずれも、表1に記載の化合物1～11を全て含んでいた。

[0064] 【実施例4】

黒ショウガ30gに中鎖脂肪酸トリグリセリドとオリーブ油との混合液（混合比率は1：1）30mLを加えて3つの懸濁液を得て、100℃、120℃、及び150℃でそれぞれ抽出を行った後（抽出時間：30分）、ろ過し、3つの油脂抽出物を得た。これらに含まれる11種のメトキシフラボンの総含有量を、実施例2と同様の方法で測定した。当該含有量は、6.8 mg/mL（100℃）、22.6 mg/mL（120℃）、24.4 mg/mL（150℃）であり、より高温での抽出が効率的であることが明らかになった。尚、これらの抽出物は、いずれも、表1に記載の化合物1～11を全て含んでいた。

[0065] 【実施例5】

黒ショウガのロットによる油脂抽出物の組成の違いを確認するため2つの黒ショウガ200gを用意し、それぞれについてエタノール1000mLを加えて、1時間加熱還流抽出を行った。得られた液を冷却後、吸引ろ過して、残渣と抽出液に分けた。再度残渣にエタノール1000mLを加えて、1時間加熱還流抽出を行い、ろ過し、先に得られた抽出液とあわせた。続いて抽出液に中鎖脂肪酸トリグリセリド100mLを加え、減圧濃縮によりエタノールを留去したのち、析出した不溶物を吸引ろ過にて除去し、2つの黒ショウガ油脂抽出物を得た。実施例2に準じてそれらの抽出物中のメトキシフラボンの含有量を分析したところ、メトキシフラボン総量は、90.4 mg

／mL（以下、この抽出物を「抽出物A」と呼ぶ）、54.9 mg/mL（以下、この抽出物を「抽出物B」と呼ぶ）であった。またこれら2つの抽出物中のメトキシフラボン総量を5 mg/mLにオリーブオイルにて調節して2つの溶液を得て、その溶液の660 nmにおける吸光度を測定したところ、それぞれ0.036（抽出物A）、0.030（抽出物B）であった（ブランクとしてメタノールを用いた）。尚、これらの抽出物は、いずれも、表1に記載の化合物1～11を全て含んでいた。

[0066] [比較例1]

黒ショウガ乾燥物200 gに50%エタノール水溶液1000 mLを加えて、1時間加熱還流抽出を行った。得られた液を冷却後、吸引ろ過して、残渣と抽出液に分けた。再度残渣に50%エタノール水溶液1000 mLを加えて、1時間加熱還流抽出を行い、ろ過し、先に得られた抽出液とあわせた。室温まで冷後、減圧濃縮したのち、凍結乾燥を行い黒ショウガエタノール抽出物-1を49 g（収率24.5%）得た。黒ショウガのロット間による差を確認する目的で、上述と同様の方法にて操作を行ったところ、黒ショウガエタノール抽出物-2を23 g（収率15.2%）得た。続いて、本抽出物中の11種のメトキシフラボン総含有量は実施例2の方法に準じて測定したところ、それぞれ264 mg/g、267 mg/gであった。黒ショウガエタノール抽出物-1中のメトキシフラボン総量を5 mg/mLにメタノールにて調節して溶液を得て、その溶液の660 nmにおける吸光度を測定したところ、0.95（ブランクはメタノール）であった。この値は、実施例5において本発明の抽出物から得られた値をはるかに上回っている。尚、これらの抽出物は、いずれも、表1に記載の化合物1～11を全て含んでいた。

[0067] [比較例2]

市販の黒ショウガ抽出物（商品名：ブラックジンジャー抽出物、丸善製薬株式会社製）中のメトキシフラボン総量を、5 mg/mLに50%メタノール水溶液にて調節して溶液を得て、その溶液の660 nmにおける吸光度を

測定したところ、1.960（ブランクはメタノール）であった。

[0068] 【実施例6】

実施例4に記載の方法（120℃、オリーブ油にて抽出したもの）に準じて黒ショウガから製造された油脂抽出物（A）と、比較例1に記載の方法に準じて黒ショウガから製造された含水アルコール抽出物（B）について、写真を撮影した。油脂抽出物（A）は、総メトキシフラボン量が5mg/mlになるようにオリーブ油により濃度を調節した。含水アルコール抽出物（B）も同様、総メトキシフラボン量が5mg/mlになるように50%エタノール水溶液にて濃度を調節した。結果を図1に示す。図1中の左が油脂抽出物Aであり、右が抽出物Bである。明らかに、本発明の油脂抽出物の方が着色程度が低かった。

[0069] 【実施例7】

実施例5で得られた2つの黒ショウガ油脂抽出物A及びBの各10gにn-ヘキサン10mLを加えた後、80%エタノール水溶液（20mL）に接触させ、メトキシフラボンをエタノール水溶液に転溶させた。ここで得られた混合物を静置して、エタノール水溶液の相を、油脂相から分離させた。当該エタノール水溶液相を取り出し、減圧下にて溶媒を留去して、メトキシフラボンを含む黄色粉末を抽出物Aから1.03g、抽出物Bから0.68g得た。尚、これらの粉末は、いずれも、表1に記載の化合物1～11を全て含んでいた。

[0070] 【実施例8】

（NOX阻害活性測定のためのサンプル調製）

黒ショウガ10g、20g、30g、40gに、10倍量のエタノールをそれぞれ加えて、1時間加熱還流抽出を行った。得られた液を冷却後、吸引ろ過し、その抽出液に中鎖脂肪酸トリグリセリド15mLを加え、減圧濃縮によりエタノールを留去したのち、不溶物を除く目的で再度吸引ろ過を行い、それぞれの黒ショウガ油脂抽出物を得た。得られた4つの黒ショウガ油脂抽出物について、実施例2に準じて11種のメトキシフラボンの総含有量を

分析したところ、その値は、それぞれ23.9 mg/mL、46.3 mg/mL、69.4 mg/mL、78.1 mg/mLであった。また、総メトキシフラボン量を46.3 mg/mL以上を含む油脂抽出物は、室温で放置するとメトキシフラボン類の析出が確認された。尚、これらの抽出物は、いずれも、表1に記載の化合物1～11を全て含んでいた。

[0071] 【実施例9】

黒ショウガ油脂抽出物のNOX阻害活性

分化させたHL-60細胞の調製：

ヒト骨髓性白血病細胞HL-60細胞は未分化状態で増殖を繰り返すが、DMSO (dimethyl sulfoxide) やレチノイン酸などを添加することにより成熟顆粒球に分化し、増殖能を失うとともに、分化の指標ともなっているNOX (NADPH oxidase) が細胞内に発現することが知られており、そのNOXは、NOX阻害活性を評価するための酵素源として利用することができる。

[0072] NOXを発現する顆粒球へと分化させるために、10% FBS含有RPMI 1640培地で培養した未分化HL-60細胞を、1%DMSOを含有する10% FBS含有RPMI 1640培地に 5×10^5 cells/mLとなるように懸濁させ、その懸濁液を内径10 cmのシャーレに15 mLずつ分注してCO₂インキュベータ (37℃) において3日間培養させた後、10 mLの1%DMSOを含有する10% FBS含有RPMI 1640培地を各シャーレに追加して、さらに3日間培養させることにより、NOXの発現した分化したHL-60細胞を得ることができた。以下に記すように、分化させたHL-60細胞の細胞破碎液あるいは生細胞をそのまま用いてNOX活性を測定した。

[0073] 細胞破碎液を用いたcell-free系によるNOX活性測定：

DMSO処理により分化させたHL-60細胞を遠心処理により集め、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で一回洗浄した後に、細胞破碎用の緩衝液 (131 mM NaCl および340 mM sucroseを含有する8 mM

リン酸緩衝液 pH 7.0) を用いて $1 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ となるように懸濁させた。氷冷させた後に、超音波破砕機 (Bioruptor UC D-250 HSA、Cosmo Bio 製) を用い、 4°C 以下の条件において「最大出力での破砕 20 秒 / インターバル冷却 30 秒」のプロセスを 3 回繰り返すことにより細胞破砕液を得た。破砕液を 1000 g 、4 分間の遠心処理することによって debris を除去して得られた上清に、9 倍容の反應用の緩衝液 (1 mM EGTA、 $10 \mu\text{M}$ FAD および 170 mM sucrose を含有する 65 mM リン酸緩衝液 pH 7.0) を加え、NOX 測定用の細胞破砕上清液 ($1 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ 相当) を調製した。

[0074] NOX の反応は、 96 well のマイクロプレートに well あたり $50 \mu\text{l}$ の上記細胞破砕液を注ぎ、さらに NOX 活性化剤である 0.5 mM SDS 溶液を $25 \mu\text{l}$ 、基質である 0.4 mM NADPH 溶液を $25 \mu\text{l}$ 添加して 25°C において 30 ~ 90 分間行った。NOX 活性は NADPH の消費速度を蛍光測定 ($\text{Ex} : 355 \text{ nm} / \text{Em} : 460 \text{ nm}$) することにより求めた。

[0075] 被験サンプルの NOX 阻害活性は、サンプルの DMSO 溶液 (試薬の場合は通常 10 mM) を調製し、DMSO によって 3 倍希釈系列の溶液を調製し、これを上記の反応液に各々 $1 \mu\text{l} / \text{well}$ ずつ添加して酵素反応を行い、得られた阻害活性を IC_{50} 値 (μM 、抽出物の場合は $\mu\text{g/ml}$) として示した。

[0076] 分化した HL-60 生細胞を用いた NOX 活性測定 :

DMSO 処理により分化させた HL-60 細胞を遠心処理により集め、FBS およびフェノールレッドを含まない D-MEM 培地に $5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ となるように懸濁させた。NOX の反応は、 96 well のマイクロプレートに well あたり $25 \mu\text{l}$ の上記細胞懸濁液を注ぎ、さらに上記の D-MEM を用いて調製した 0.8 mg/ml WST-1 溶液、所定濃度に調製した被験サンプル溶解液 (サンプルの DMSO 溶液 (試薬の場合は通常 10 mM) を調製し、ここから DMSO を用いて 3 倍希釈系列の溶液を調

製し、これを上記のD-MEMに1 v / v %以下になるように溶解させて、当該被験サンプル溶解液を調製した)をそれぞれ25 μ l ずつ添加し攪拌させた後に、25 μ l の4 μ M PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate、終濃度は1 μ M) D-MEM溶液を添加してNOXの活性化を行い、37℃、45分間の反応を行い、NOX酵素生成物であるスーパーオキシドと反応液中のWST-1が反応して生成する黄色フォルマザンを450 nmの吸光度として測定した。なお、このNOX活性測定系では、PMAを添加しない限りNOXは活性化しないことが確認されている。

[0077] 得られた阻害活性をIC₅₀値(μ M、抽出物の場合は μ g / m l)として示した。

[0078] 結果：

上記に従い、総メトキシフラボン量22.4 mg / m lの黒ショウガ油脂抽出物-1(実施例2で得られたもの)、総メトキシフラボン量69.4 mg / m lの黒ショウガ油脂抽出物-2(実施例8で得られたもの)、エタノール抽出物(比較例1で得られた黒ショウガエタノール抽出物-1および2)のNOX阻害活性(分化したHL-60生細胞を用いたNOX阻害活性測定)を測定した。黒ショウガのロット間の活性の強さの違いを見るために2種の黒ショウガについて検討した。また油脂抽出物は、そのままでは活性を測定できなかったため、脱脂処理を行った。具体的には油脂抽出物0.5 mLに同量のn-ヘキサン0.5 mLを加え希釈した後、0.5 mLの80%メタノール水溶液にて3回メトキシフラボンの抽出を行った。得られた抽出液をSep-Pak PLUS C8 125 Å Cartridges(ウォーターズ社製)に吸着させ、さらに80%メタノール3.0 mLを通して油分を除いた。その後、Sep-Pak PLUS C8 125 Å Cartridgesを溶媒で洗浄して得られた液を減圧濃縮、凍結乾燥し、評価試料を調製した。測定されたIC₅₀値を以下の表2に示す。

[0079] 以下に示すIC₅₀値は、総メトキシフラボン量に基づくNOX阻害活性を

示す。それらの値を比較したところ、いずれにおいても、エタノール抽出物より油脂抽出物の方が高い作用（低い IC_{50} ）を示した。このことから、本発明のように油脂で抽出することによって、NOXに対して阻害作用がより高いメトキシフラボンが効率的に抽出されていることが示唆された。

[0080] [表2]

抽出物	NOX IC_{50} ($\mu g/ml$)
	総メトキシフラボン量換算
黒ショウガエタノール抽出物-1	11.7
黒ショウガ油脂抽出物-1	9.2
黒ショウガエタノール抽出物-2	7.7
黒ショウガ油脂抽出物-2	3.1

[0081] [実施例 10]

（抽出方法と組成の関係）

実施例 9 の結果に鑑み、黒ショウガからの油脂抽出物と親水性溶媒抽出物の組成を比較した。具体的には、実施例 2～6 及び 8 に準じて、油脂抽出（油脂のみでの抽出、又はエタノール抽出とそれに続く油脂抽出）を行い、比較例 1 に準じてエタノール抽出を行った。油脂抽出においては、油脂として、オリーブオイル、又はオリーブオイルと中鎖脂肪酸グリセリド（本実施例では、中鎖脂肪酸トリグリセリドが用いられ、これを「MCT」とも示す）との混合物を用いた。得られた抽出物は、実施例 2 に記載の方法に基づいて HPLC で分析され、得られた HPLC 面積値を以下に示す。以下の表では、便宜上、油脂を単に「Oil」とも示す。また、メトキシフラボンの化合物番号は、表 1 に記載の化合物番号に対応する。

[0082]

[表3A]

メトキシフラボン	抽出方法									
	EtOH⇒Oil		EtOH		Oil					
1	38.2	6.5	11.2	28.9	19.1	23.7	11.8	10.2	7.4	7.2
2	207.2	36.2	57.8	134.2	95.4	119.5	72.3	62.9	48.1	46.7
3	633.8	129.1	69.2	145.0	103.1	127.5	137.1	119.7	67.7	65.7
4	391.8	71.9	82.5	187.6	132.0	164.0	108.6	94.4	68.4	66.3
5,6	289.1	56.7	49.5	109.7	81.3	106.2	82.0	71.6	46.6	45.1
7	16.9	3.4	6.6	13.9	9.0	10.4	7.3	6.4	4.6	4.3
8	42.9	8.5	14.3	35.0	15.9	17.2	14.8	13.1	8.4	7.9
9	22.9	4.2	8.4	20.8	10.6	12.1	9.9	8.7	6.1	5.8
10	48.3	9.9	19.1	47.0	17.3	19.7	18.7	16.0	10.0	9.4
11	41.9	8.2	19.7	45.6	19.3	22.1	21.2	17.6	12.2	11.5
A	1271.0	243.7	220.8	495.7	349.6	434.6	329.8	287.2	191.6	185.9
A+B	1732.9	334.5	338.5	767.6	503.0	622.3	483.7	420.5	279.4	269.8
A/(A+B)	0.73	0.73	0.65	0.65	0.69	0.70	0.68	0.68	0.69	0.69

[0083] [表3B]

メトキシフラボン	抽出方法								
	Oil(MCT含有)								
	33%	50%	67%	33%	50%	67%	33%	50%	67%
1	6.8	4.2	6.6	17.7	23.6	22.4	25.6	27.1	25.3
2	39.6	24.0	36.6	105.0	137.6	128.6	150.7	156.2	145.1
3	137.4	87.8	131.7	354.2	453.4	421.1	474.5	470.9	443.0
4	75.8	48.1	72.4	198.1	256.9	242.6	277.6	285.1	266.8
5,6	62.2	37.9	57.2	162.0	207.2	190.5	220.9	220.4	205.6
7	4.1	2.3	3.4	10.1	13.1	11.5	14.7	15.3	13.1
8	10.3	5.8	8.6	27.6	35.1	30.2	38.6	42.1	32.7
9	5.2	2.8	4.3	13.9	17.8	16.2	20.7	22.6	17.7
10	12.2	6.8	10.0	32.1	40.4	35.7	44.5	48.7	37.1
11	10.0	5.5	8.0	26.5	33.6	30.3	38.7	42.1	32.7
A	259.6	164.1	247.3	675.0	871.4	814.7	928.5	939.3	880.2
A+B	363.6	225.1	338.8	947.2	1218.7	1129.1	1306.5	1330.4	1219.1
A/(A+B)	0.71	0.73	0.73	0.71	0.72	0.72	0.71	0.71	0.72

*表中の％は、抽出油脂中に含まれるMCTの含有率を示す。

[0084] 表3A及び3Bに示されているように、油脂抽出物における、NO_x阻害活性の高いメトキシフラボン（群Aのメトキシフラボン）の割合、即ち、A／（A＋B）は、エタノール抽出物よりも高かった。このような組成の違い

は、NO_x阻害活性に影響し得る。

請求の範囲

- [請求項1] 黒ショウガから得られる油脂抽出物であって、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上を含有し、当該抽出物から、当該11種のメトキシフラボンの総含有量が5.0mg/mlである溶液を調製し、当該溶液の波長660nmにおける吸光度を測定すると、得られる吸光度が0.10以下である、前記抽出物。
- [請求項2] 前記油脂が、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ジアシルグリセロール、ゴマサラダ油、オリーブ油、大豆油、ナタネ油、コーン油、米胚芽油、ヒマワリ種子油、シソ油、エゴマ油から選ばれる少なくとも一種である、請求項1に記載の抽出物。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の抽出物を含む飲食品。
- [請求項4] 請求項1又は2に記載の抽出物を含む香粧品。
- [請求項5] 黒ショウガから、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上のメトキシフラボンを含有する油脂抽出物を製造する方法であって、黒ショウガの植物体に油

脂を接触させて当該1種以上のメトキシフラボンを抽出することを含む、前記方法。

[請求項6] 前記油脂が、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ジアシルグリセロール、ゴマサラダ油、オリーブ油、大豆油、ナタネ油、コーン油、米胚芽油、ヒマワリ種子油、シソ油、エゴマ油から選ばれる少なくとも一種である、請求項5に記載の製造方法。

[請求項7] 前記抽出を50～180℃で行う、請求項5又は6に記載の製造方法。

[請求項8] 黒ショウガから、5, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、3, 5, 7, 3', 4'-ペンタメトキシフラボン、5, 7-ジメトキシフラボン、5, 7, 4'-トリメトキシフラボン、3, 5, 7-トリメトキシフラボン、3, 5, 7, 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7, 3', 4'-テトラメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン、5-ヒドロキシ-7, 4'-ジメトキシフラボン、5-ヒドロキシ-3, 7-ジメトキシフラボン、及び5-ヒドロキシ-3, 7, 4'-トリメトキシフラボンの11種のメトキシフラボンから選択される1種以上のメトキシフラボンを含む油脂抽出物を製造する方法であって、

黒ショウガの植物体に水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を接触させて、当該1種以上のメトキシフラボンを抽出し、そして

当該抽出により得られた中間抽出物に油脂を接触させて当該メトキシフラボンを抽出することを含む、前記方法。

[請求項9] 当該中間抽出物に油脂を接触させる前に、及び／又はそれらが接触している間に、当該中間抽出物から水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を蒸発させることを更に含む、請求項8に記載の製造方法。

[請求項10] 前記油脂が、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ジアシルグリセロール、ゴマサラダ油、オリーブ油、大豆油、ナタネ油、コーン油、米胚芽油、ヒマワリ種子油、シソ油、エゴマ油から選ばれる少なくとも一種で

ある、請求項 8 又は 9 に記載の製造方法。

- [請求項11] 請求項 5 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法であって、さらに、
 油脂との前記接触工程により得られた油脂含有抽出物に、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を接触させて、前記 1 種以上のメトキシフラボンを抽出し、そして
 当該メトキシフラボンの抽出中に得られる 2 相混合物を液－液分離に付し、
 当該液－液分離工程で分離された、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を含む抽出物を得る
 ことを含む、前記方法。

- [請求項12] 前記液－液分離工程を経て得られた抽出物から、水、親水性溶媒、又はそれらの混合物を除くことを更に含む、請求項 1 1 に記載の方法。

- [請求項13] 前記親水性溶媒が C_{1-3} アルコール及び／又はアセトンである、請求項 8 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

- [請求項14] 請求項 5 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の製造方法によって得られる、前記 1 1 種のメトキシフラボンから選択される 1 種以上のメトキシフラボンを含有する油脂抽出物。