明　細　書

発明の名称 ： 血糖代謝改善用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、血糖代謝改善用組成物に関する。より詳細には、本発明は、柿葉をエチルアルコールと水とを特定の割合で混合した溶液により抽出する工程を経て得られた柿葉抽出物を含む、血糖代謝改善用組成物に関する。

背景技術

[0002] 高カロリーの食事や飲料の摂取、日常的な運動量の低下や筋力低下に伴う基礎代謝量の低下などの要因により、生命活動に必要とされる以上の過剰なエネルギーを摂取する生活を送る人が増えるに伴い、中高年層だけでなく若年層においても糖尿病を発症する、又はインスリン抵抗性を示す人が増えている。また、脂肪細胞の老化がインスリン抵抗性を引き起こすことも知られており、基礎代謝量や運動量が低下する高齢者においても糖尿病発症のリスクが高い。

[0003] このように、日常生活の変化や高齢化社会への移行に伴い、糖尿病患者が年々爆発的に増加する傾向にあり、糖尿病予備軍である血糖代謝の異常を有する人も糖尿病患者の数倍以上存在すると考えられている。実際、国民健康・栄養調査や糖尿病実態調査でも同様な傾向が明らかにされており、わが国の糖尿病患者の増加は深刻といえる。この状況において、糖尿病は根本的な治癒ができない疾病であることから、「糖尿病患者においては病態を悪化させない」、また、「インスリン抵抗性を示す人に対しては糖尿病を発症させない」ための取組みが重要となっている。

[0004] このような取組みとして、「血糖値を正常範囲で推移させ、糖尿病の発症予防や治療を行う方法」がある。具体的には、食事療法、運動療法、及び薬物療法が存在しており、対象者の事情や状態にあわせて、これらの療法を単独又は組合せた方法が実際に行われている。しかしながら、摂取カロリーを制限する食事療法、及び一定時間以上実行することが必要な運動療法は、継

続的に実行できない場合が多く、特に老齢者においては、基礎代謝量が大幅に低下しているだけでなく、運動能力の大幅な低下に伴い運動量が大幅に減少していることから、上記の療法だけで対処することが難しい場合が増加している。一方、薬物療法も医療費増大防止の観点から満足できる対処方法とはいえず、また、糖尿病の発症予防としては採用しにくい方法である。

[0005] そこで、血糖の代謝に大きな影響を与えている骨格筋における糖代謝に着目し、従来処置される治療法や予防法と併用又は単独で、糖尿病発症予防効果や糖尿病病態改善効果を飛躍的に増強させる手段の開発が試みられている。

[0006] 血糖値を低下させる生理機能の一つとして、「血管（血液）から骨格筋へ血中の糖を取り込んで代謝する機能」が存在する。当該機能の機序の一つとして、「骨格筋の収縮が細胞内のＡＭＰキナーゼのリン酸化（活性化）を促進し、結果的に細胞質内のグルコーストランスポーター４が細胞膜中に移動することにより骨格筋の細胞内に血中の糖が取り込まれる」作用が知られている。さらに、この骨格筋の細胞内への糖の取り込みは、骨格筋の収縮を必須の要素とするものではなく、ＡＭＰキナーゼが活性化することで生じることが判っている。したがって、運動により骨格筋を収縮させることができない状況においても、運動した場合と同様に血中の糖を骨格筋に取り込ませる機能の発現を実現できる可能性がある。近年、この点に着目した「ＡＭＰキナーゼを活性化させる物質を経口摂取することで、血中の糖濃度を低減させる試み」が幾つか提案されている（特許文献１及び２）。

[0007] さらに、血管（血液）から骨格筋の細胞内に糖を取り込む別の機序として、「血中のインスリンが骨格筋間質を介して細胞膜表面にあるインスリン受容体に結合し、Ａｋｔのリン酸化による活性化などの情報伝達分子の活性化により、結果的には細胞質内のグルコーストランスポーター４が細胞膜中に移動し、骨格筋の細胞内へ血中の糖が取り込まれる」作用も知られている。この機序においては、インスリンが骨格筋に分布する毛細血管から骨格筋間質に移行するまでの経路も重要な役割を担っている。骨格筋毛細血管のｅ－

ＮＯＳ活性化等を介した拡張機能亢進や血管新生による毛細血管密度の増加により、毛細血管の表面積と血流量の増加が起こることで、細胞へのインスリン移行が亢進し、糖代謝が改善されることがわかっている（非特許文献１）。

[0008] ＡＭＰキナーゼを介した前者の機序及びインスリンを介した後者の機序は互いに独立して作用し、かつ両者共に、高い糖の取り込み効果を発現させることが期待できる。健常者では、これら２つの機序が共に正常に発現しているが、糖尿病患者やインスリン抵抗性を有する人においては、後者の機序が低下している又は失われていることから、これら２つの機序を合わせて発現させる、又はこれらの機能を亢進させることにより、より健常者に近い状態を実現させることができる可能性がある。しかしながら、未だこれら２つの機序を併せて発現させる方法は知られておらず、具体的な解決方法の提案が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開２０１０－３７３２３号公報

特許文献2：特開２０１１－３７７３２号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Ｃｅｌｌ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ，１３，２９４－３０７，２０１１

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の目的は、骨格筋における糖代謝機能を改善及び／又は向上させる血糖代謝改善用組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、かかる事情に鑑み鋭意検討を重ねた結果、柿葉をエチルアルコールと水とを特定の割合で混合した溶液により抽出する工程を経て得ら

れた柿葉抽出物が、ＡＭＰキナーゼを介した機序及びインスリンを介した機序の２つの機序から骨格筋における糖代謝機能を大きく改善及び／又は向上させ得ることを見出し、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は、代表的には、以下の項に記載の主題を包含する。

項１．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程を経て得られた柿葉抽出物を含む血糖代謝改善用組成物。

項２．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び

前記工程により得られた抽出物をオクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラムに吸着させ、５～１０％アセトニトリル－水混液により溶出する工程

を経て得られた柿葉抽出物を含む、上記項１に記載の血糖代謝改善用組成物。

項３．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び

前記工程により得られた抽出物を修飾デキストランを充填したカラムに吸着させ、７０～１００％メチルアルコール－水混液又は６０～８０％アセトン－水混液により溶出する工程

を経て得られた柿葉抽出物を含む、上記項１に記載の血糖代謝改善用組成物。

項４．

経口組成物である、上記項１～３のいずれかに記載の血糖代謝改善用組成物。

[0014] 項Ａ－１．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程を経て得られた柿葉抽出物を対象に投与する工程を含む、血糖代謝を改善及び／又は向上させる方法。

項Ａ－２．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び前記工程により得られた抽出物をオクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラムに吸着させ、５～１０％アセトニトリル－水混液により溶出する工程

を経て得られた柿葉抽出物を対象に投与する工程を含む、上記項Ａ－１に記載の方法。

項Ａ－３．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び前記工程により得られた抽出物を修飾デキストランを充填したカラムに吸着させ、７０～１００％メチルアルコール－水混液又は６０～８０％アセトン－水混液により溶出する工程

を経て得られた柿葉抽出物を対象に投与する工程を含む、上記項Ａ－１に記載の方法。

[0015] 項Ｂ－１．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程を経て得られた柿葉抽出物を対象に投与する工程を含む、糖尿病、高血糖、耐糖能異常、インスリン抵抗性、動脈硬化、肥満、体脂肪蓄積、脂質代謝異常、生活習慣病及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも１種の予防、改善及び／又は治療方法。

項Ｂ－２．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び前記工程により得られた抽出物をオクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラムに吸着させ、５～１０％アセトニトリル－水混液により溶出する工程

を経て得られた柿葉抽出物を対象に投与する工程を含む、上記項Ｂ－１に記載の方法。

項Ｂ－３．

柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び
前記工程により得られた抽出物を修飾デキストランを充填したカラムに吸着させ、７０～１００％メチルアルコール－水混液又は６０～８０％アセトン－水混液により溶出する工程
を経て得られた柿葉抽出物を対象に投与する工程を含む、上記項Ｂ－１に記載の方法。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、ＡＭＰキナーゼを活性化することができることから、運動による血糖値の低下作用を増強させるだけでなく、運動をせずとも運動をしたときと同等の血糖値の低下効果を得ることが可能である。さらに、本発明によれば、骨格筋毛細血管密度を高めることができることから、インスリン抵抗性の改善効果も得ることも可能である。

[0017] 以上のように、本発明の血糖代謝改善用組成物は、ＡＭＰキナーゼを介した機序及びインスリンを介した機序の両機序から骨格筋における糖代謝機能を改善及び／又は向上させることができる。したがって、糖尿病患者や糖尿病予備軍だけでなく、高齢者や寝たきりの人などの十分な運動量を確保できない人においても、血糖値を下げ、糖尿病の発症を予防したり、糖尿病の病態を改善することができる。

[0018] さらに、本発明の血糖代謝改善用組成物は、運動前・中・後に摂取することにより運動の効果を高める運動効果促進剤としても有用である。また、本発明の血糖代謝改善用組成物は、ＡＭＰキナーゼを活性化することができるため、抗老化効果が期待できる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]図１は、試験例１－１の結果を示すグラフである。具体的には、図１は、製造例１において得られた各柿葉抽出物のマウス骨格筋管細胞株を用いた総ＡＭＰＫ(ｔＡＭＰＫ)に対するリン酸化ＡＭＰＫ(ｐＡＭＰＫ)の発現比の測定結果を示している。

[図2]図２は、試験例１－２の結果を示すグラフである。具体的には、図２は

、製造例１において得られた柿葉抽出物Ａ及びＣのマウス骨格筋管細胞株を用いた糖取込み促進活性の測定結果を示している。

[図3]図３は、試験例２の結果を示すグラフである。具体的には、図３は、製造例２において得られた各分画物のマウス骨格筋管細胞株を用いた糖取込み促進活性の測定結果を示している。

[図4]図４は、試験例３の結果を示すグラフである。具体的には、図４は、抽出物Ｃ、及び柿葉に含まれる各種化合物のマウス骨格筋管細胞株を用いた糖取込み促進活性の測定結果を示す。

[図5]図５は、試験例４の結果を示すグラフである。具体的には、図５は、製造例３において得られた各分画物のマウス骨格筋管細胞株を用いた糖取込み促進活性の測定結果を示している。

[図6]図６は、参考試験例１の結果を示すグラフである。具体的には、図６は、参考製造例１において得られた各抽出物のマウス骨格筋管細胞株を用いた糖取込み促進活性の測定結果を示している

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明について詳細に説明する。

[0021] 本発明の血糖代謝改善用組成物は、柿葉をエチルアルコールと水とを特定の割合で混合した溶液により抽出する工程を経て得られた柿葉抽出物を含む。

[0022] 抽出に供する柿葉は特に限定されず、例えば、カキノキ科カキノキ属の落葉樹の葉を用いることができる。柿葉は落葉前又は落葉後のいずれの葉も用いることができるが、落葉前の葉を用いることが好ましい。また、抽出に供する柿葉は、常法に従って乾燥等の前処理を施したものであってもよい。柿葉の前処理方法としては、例えば、樹木から採取した柿葉を水洗し、必要に応じて適当な大きさ（例えば３ｍｍ幅程度）に切断し、蒸籠で蒸した後に乾燥する方法や、樹木から採取した柿葉を水洗し、必要に応じて適当な大きさに切断した後に乾燥する方法などが挙げられる。

[0023] 柿葉の抽出に用いる溶液は、エチルアルコールと水とを特定の割合で混合

した溶液（以下、「エチルアルコール－水混液」と記載する。）であり、当該エチルアルコール－水混液におけるエチルアルコールの含有量は４０～６０％（ｗｔ／ｗｔ）程度であり、４５～５５％（ｗｔ／ｗｔ）程度であることが好ましく、５０％（ｗｔ／ｗｔ）程度であることがより好ましい。なお、以下において、エチルアルコールの含有量がｘ％（ｗｔ／ｗｔ）であるエチルアルコール－水混液を、「ｘ％エチルアルコール－水混液」と記載する。

[0024] 柿葉の抽出方法は、上記したエチルアルコール－水混液を用いる方法であれば公知の方法により行うことができる。例えば、乾燥させた柿葉に、柿葉の約２０倍量の５０％エチルアルコール－水混液を用いて、マントルヒーターを用いた沸騰還流条件下で１時間抽出する方法が好ましい。

[0025] さらに、柿葉抽出物は、上記したエチルアルコール－水混液により抽出する工程を経た後、当該工程により得られた抽出物を濃縮する工程を経て得られるものであってもよい。濃縮方法は、特に限定されず、公知の方法を適宜選択して行うことができる。例えば、上記したエチルアルコール－水混液により抽出する工程を経た後、得られた抽出液から常法により固形分を除去し、ろ過処理により得られたろ液をエバポレーターを用いてエタノール分を除去した後に、凍結乾燥処理を行う方法が挙げられる。

[0026] また、柿葉抽出物は、上記したエチルアルコール－水混液により抽出する工程を経た後、必要に応じて、当該工程により得られた抽出物に対してさらなる抽出処理を施す工程を経て得られるものであってもよい。さらなる抽出処理の具体的な方法としては、例えば、上記したエチルアルコール－水混液により抽出する工程を経た後、得られた抽出物を約９倍量の精製水に溶解させ、超音波処理を行った後に、約１００００Ｇの遠心分離処理を行い、上澄を回収する方法が挙げられる。さらに、エチルアルコール－水混液により抽出する工程を経た後、上記した得られた抽出物を濃縮する工程を経て得られる抽出物を、さらなる抽出処理に供することもできる。

[0027] さらに、柿葉抽出物は、上記したエチルアルコール－水混液により抽出す

る工程を経た後、カラムを用いて分画する工程を経て得られるものであってもよい。

[0028] 分画に用いるカラムとしては、公知のカラムを用いることができるが、オクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラム（例えば、Purif-Pack Size200 ODSカラム）、修飾デキストランを充填したカラム（例えば、Sephadex LH-20カラム）などが好ましい。

[0029] 分画に用いる溶出液は、用いるカラムに応じて適宜選択して使用することができるが、オクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラムを用いる場合には、アセトニトリルと水とを混合した溶液（以下、「アセトニトリル－水混液」と記載する。）を使用することが好ましく、修飾デキストランを充填したカラムを用いる場合には、メチルアルコールと水とを混合した溶液（以下、「メチルアルコール－水混液」と記載する。）やアセトンと水とを混合した溶液（以下、「アセトン－水混液」と記載する。）を使用することが好ましい。なお、以下において、アセトニトリル含有量がｘ％のアセトニトリル－水混液を「ｘ％アセトニトリル－水混液」と、メチルアルコール含有量がｘ％のメチルアルコール－水混液を「ｘ％メチルアルコール－水混液」と、アセトン含有量がｘ％のアセトン－水混液を「ｘ％アセトン－水混液」と、それぞれ記載する。

[0030] また、分画の条件（例えば、流量など）は特に制限されず、用いるカラムや溶出液に応じて適宜設定すればよい。

[0031] 好ましい分画方法としては、オクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラムを用いて分画を行う場合には、上記したエチルアルコール－水混液により抽出する工程を経て得られた抽出物を、オクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラムに吸着させ、アセトニトリル－水混液におけるアセトニトリルの含有量を０％から１～１０％程度ずつ上昇させつつ溶出するステップワイズグラジエントにて分画する方法が挙げられる。当該方法において、１～１０％アセトニトリル－水混液により溶出した分画物は、糖代謝機能の改善及び／又は向上効果が高いため好ましく、５～１０％アセトニ

トリル－水混液により溶出した分画物は、糖代謝機能の改善及び／又は向上効果が特に高いためより好ましい。特に、０％アセトニトリル－水混液（即ち、水）、５％アセトニトリル－水混液、及び１０％アセトニトリル－水混液により順次溶出する工程を経て得られる、５％アセトニトリル－水混液により溶出した分画物及び１０％アセトニトリル－水混液により溶出した分画物は、糖代謝機能の改善及び／又は向上効果が非常に高いためさらに好ましく、中でも５％アセトニトリル－水混液により溶出した分画物は、糖代謝機能の改善及び／又は向上効果が極めて高いため特に好ましい。

[0032] また、修飾デキストランを充填したカラムを用いて分画を行う場合には、上記したエチルアルコール－水混液により抽出する工程を経て得られた抽出物を、修飾デキストランを充填したカラムに吸着させ、メチルアルコール－水混液におけるメチルアルコールの含有量を０％から１０～２０％程度ずつ上昇させつつ溶出するステップワイズグラジエントにて分画する方法が挙げられる。さらに、１００％メチルアルコール－水混液（即ち、メチルアルコール）による溶出が完了した後、６０～８０％程度のアセトン－水混液により溶出する方法も好ましい。当該方法において、４０～１００％程度のメチルアルコール－水混液及び６０～８０％程度のアセトン－水混液により溶出した分画物は、糖代謝機能の改善及び／又は向上効果が高いため好ましく、８０～１００％程度のメチルアルコール－水混液及び７０％程度のアセトン－水混液により溶出した分画物は、糖代謝機能の改善及び／又は向上効果が特に高いためより好ましい。特に、０％メチルアルコール－水混液（即ち、水）、２０％メチルアルコール－水混液、４０％メチルアルコール－水混液、６０％メチルアルコール－水混液、８０％メチルアルコール－水混液、１００％メチルアルコール－水混液（即ち、メチルアルコール）、及び７０％アセトン－水混液により順次溶出する工程を経て得られる、１００％メチルアルコール－水混液により溶出した分画物及び７０％アセトン－水混液により溶出した分画物は、糖代謝機能の改善及び／又は向上効果が非常に高いためさらに好ましい。

[0033] 本発明の血糖代謝改善用組成物は、上記した柿葉抽出物そのものであってもよいし、当該柿葉抽出物に加え、その他の成分を含んでいてもよい。その他の成分としては、薬学的又は食品衛生学的に許容され得る担体などが挙げられる。

[0034] また、本発明の血糖代謝改善用組成物は、経口組成物として利用することができる。経口組成物としては、医薬品、医薬部外品のほか、糖尿病、高血糖、耐糖能異常、インスリン抵抗性、動脈硬化、肥満、体脂肪蓄積、脂質代謝異常、生活習慣病、脂肪肝等の予防・改善や糖代謝亢進、抗老化の生理機能をコンセプトとした機能性飲食品、疾病者用食品、特定保健用食品、栄養機能食品、栄養補助食品、運動療法用食品、痩身用食品などとすることができる。

[0035] 本発明の血糖代謝改善用組成物の形態としては特に限定されないが、経口組成物として利用する場合には、例えば、ハードカプセル、ソフトカプセル、サプリメント、チュアブル錠、飲料、粉末飲料、顆粒、フィルムなどの形態とすることができる。また、飲食品として使用する場合には、例えば、茶系飲料、スポーツ飲料、美容飲料、果汁飲料、炭酸飲料、アルコール飲料、清涼飲料、ゼリー飲料、水や湯、炭酸水等で希釈する濃縮タイプの飲料等の飲料、水や湯等に溶解又は懸濁させて飲用する粉末や顆粒、タブレット等の乾燥固形物、タブレット菓子、ゼリー類、スナック類、焼き菓子、揚げ菓子、ケーキ類、チョコレート、ガム、飴、グミなどの菓子類、スープ類、めん類、米飯類、シリアル等などの食品形態にすることもできる。このうち通常の生活において利用する場合には、サプリメントタイプ、チュアブル錠、ワンショットドリンクタイプなどの形態が好ましく、運動効果を高める目的で摂取する場合には、スポーツ飲料などの飲料の形態が最も好ましい。さらに、これらの経口組成物は容器に充填された容器詰食品として消費者に提供することができる。容器は密封できるものであれば特に限定されない。

[0036] 錠剤、顆粒剤、カプセ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などの場合は、乾燥物換算で経口組成物全量に対して、血

糖代謝改善用組成物を０．０１　～９５質量％程度、好ましくは５～９０質量％程度、最も好ましくは１０～８０質量％程度配合すればよい。上記以外の経口組成物の場合は、血糖代謝改善用組成物を０．００１～５０質量％程度、好ましくは０．００５～３０質量％程度、最も好ましくは０．０１～１０質量％程度配合すればよい。

[0037] また、本発明は、本発明の血糖代謝改善用組成物を対象に投与する工程を含む、血糖代謝を改善及び／又は向上させる方法も提供する。

[0038] さらに、本発明は、本発明の血糖代謝改善用組成物を対象に投与する工程を含む、糖尿病、高血糖、耐糖能異常、インスリン抵抗性、動脈硬化、肥満、体脂肪蓄積、脂質代謝異常、生活習慣病、脂肪肝等の予防、改善及び／又は治療方法も提供する。

実施例

[0039] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は下記の例に限定されるものではない。なお、以下、特に断りのない限り「％」は「質量％」を示す。

[0040] 製造例１：エチルアルコール－水混液による柿葉抽出物の調製

乾燥し裁断した国産の柿葉約１０ｇを、２０倍質量の各種溶媒を用いて抽出した。抽出に用いた溶媒は、精製水、２５％（ｗｔ／ｗｔ）エチルアルコール－水混液、５０％（ｗｔ／ｗｔ）エチルアルコール－水混液、７５％（ｗｔ／ｗｔ）エチルアルコール－水混液、及びエチルアルコールの５種である。柿葉の抽出は還流抽出装置を用い、１時間、沸騰還流の条件で実施した。抽出処理後、１１０メッシュのナイロンを用いて大きな不溶物を取り除いた後、定性ろ紙Ｎｏ．１（アドバンテック社製）を用いてろ過処理した。得られたろ液は、エチルアルコールを含有する溶媒で抽出した場合は、エバポレーターを用いてエチルアルコール分を除去した後に凍結乾燥し、精製水で抽出した場合は、ろ過処理にて得られた抽出物をそのまま凍結乾燥した。

[0041] なお、以下において、各溶媒により得られた抽出物をそれぞれ、抽出物Ａ（精製水で得られた抽出物）、抽出物Ｂ（２５％（ｗｔ／ｗｔ）エチルアル

コール－水混液で得られた抽出物）、抽出物Ｃ（５０％（ｗｔ／ｗｔ）エチルアルコール－水混液で得られた抽出物）、抽出物Ｄ（７５％（ｗｔ／ｗｔ）エチルアルコール－水混液で得られた抽出物）及び抽出物Ｅ（エチルアルコールで得られた抽出物）と記載する。

[0042] 試験例１：各柿葉抽出物（抽出物Ａ～Ｅ）の糖代謝改善作用の評価

上記製造例１で得られた柿葉抽出物の糖代謝改善作用を評価した。糖代謝改善作用の評価としては、マウス骨格筋管細胞株（Ｃ２Ｃ１２細胞）におけるＡＭＰキナーゼのリン酸化活性の測定を行い、さらに、抽出物ＡとＣについて糖取込み促進活性の測定も行なった。

[0043] 試験例１－１：ＡＭＰキナーゼのリン酸化活性の測定

柿葉抽出物Ａ～Ｅ（粉末）をそれぞれ培地に対して最終濃度が０．０２％となるように加えて溶解したものを試料として用いた（実施例１－１～１－５）。また、ネガティブコントロールとして何も添加していない培地を用い（比較例１－１）、ポジティブコントロールとしてＡＩＣＡＲ（最終濃度２ｍＭ）を用いた（比較例１－２）。次いで、マウス骨格筋管細胞株（Ｃ２Ｃ１２細胞）を６穴細胞培養プレートに播種し、１０％ウシ胎児血清および１％抗菌剤を添加したＤＭＥＭ培地中で３７℃、５％二酸化炭素存在下で３日間培養した。

[0044] 細胞がコンフルエントになった状態で１％ウシ胎児血清を含むＤＭＥＭ培地に交換し、さらに培養して完全に分化させた。さらに、培地を新しいものに交換したうえで、実施例１－１～１－５及び比較例１－１～１－２の試料をそれぞれ添加し、３７℃、５％二酸化炭素存在下で培養した。ＰＢＳ（－）で二度細胞を洗浄後、フォスファターゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、及びＰＭＳＦを添加した細胞溶解バッファーを１５０μL加え、セルスクレイパーで細胞溶解液を回収した。

[0045] 細胞溶解液を超音波処理後、遠心分離にて上清を回収した。上清は測定に用いるまで－８０℃で保存した。上清のタンパク質濃度を測定し、サンプル間のタンパク濃度を一定に調整した。上清のタンパク濃度を調整後、サンプ

ルバッファ（サーモ）を加え、熱変性させたものを以下のウェスタンブロッティングに用いた。

[0046] ウエスタンブロッティングは、以下の方法により行った。まず、７．５％の泳動ゲルを用いてＳＤＳ－ＰＡＧＥ後、ｉｂｌｏｔにてニトロセルロース膜に転写し、1次抗体としてリン酸化ＡＭＰＫ抗体（ＣＳＴ）および総ＡＭＰＫ（ＣＳＴ）を５％ＢＳＡまたはスキムミルクを含むＴＢＳＴにて1000倍に希釈し、４℃に保ちつつシェイカー上でオーバーナイト反応させた。次いで、ニトロセルロース膜をよく洗浄した後、５％スキムミルクＴＢＳＴでＨＲＰラベルされた二次抗体（ＣＳＴ、1:5000またはサンタクルーズ、1:10000）を室温、１時間反応させた。さらに、ニトロセルロース膜をよく洗浄した後、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo) またはECL Plus Western Blotting Detection System(GE)で発光させ、CCDカメラ画像解析装置(ＧＥ)を用いて化学発光を検出した。なお、活性の度合いはネガティブコントロール試料を１とした相対値で示した。測定結果を表１及び図１に示す。

[0047] [表1]

試料	比較例1－1	比較例1－2	実施例1－1	実施例1－2	実施例1－3	実施例1－4	実施例1－5
	無添加	AICAR	抽出物A	抽出物B	抽出物C	抽出物D	抽出物E
pAMPK/tAMPK比	1.00	5.60	1.35	2.06	2.72	1.65	1.29

[0048] 表１及び図１から明らかなように、実施例１－３（抽出物Ｃ）がＡＭＰキナーゼのリン酸化活性が最も高く、次いで実施例１－２（抽出物Ｂ）が高いことがわかった。以上のことから、柿葉の抽出に用いるエチルアルコール－水混液におけるエチルアルコールの割合によって、得られる抽出物のＡＭＰキナーゼのリン酸化活性が異なることが示唆された。

[0049] 試験例１－２：骨格筋管細胞を用いた糖取込み促進活性の測定

上記試験例１で最も高いＡＭＰキナーゼのリン酸活性を示した抽出物Ｃ、及び低いＡＭＰキナーゼのリン酸活性を示した抽出物Ａについて、下記の方

法により、マウス骨格筋管細胞（Ｃ２Ｃ１２細胞）を用いて、糖取込み促進活性の測定を行った。

[0050] マウス骨格筋芽細胞（Ｃ２Ｃ１２細胞）を高グルコースＤＭＥＭ（5790)中で培養し、ブラックマイクロタイタープレート(Falcon)に、細胞を５０００cells / ２００μL / wellの濃度で播種し培養した後、筋管細胞に分化した細胞を実験に用いた。試料としては、上記製造例１において得られた抽出物Ａ及びＣの最終濃度をそれぞれ０．０２％及び０．０５％に調整したものを用い（実施例２－１～２－４）、また、ネガティブコントロールとして何も添加していない培地（比較例２－１）、ポジティブコントロールとしてインスリン（１０ｎＭ）（比較例２－２）をそれぞれ用いた。

[0051] 実験当日、培地を低グルコースＤＭＥＭ（6047）に交換し、スタベーションを行った後、実施例２－１～２－４及び比較例２－１～２－２の試料をそれぞれ溶解した培地に交換し、６０分間インキュベートした。処理後、培地を取り除き、１００μＭの光標識非加水分解性糖アナログ、6-(N-（7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl）amino)-6-Deoxyglucose（6-NBDG；invitrogen社製）を溶解した低グルコースＤＭＥＭ培地に交換し３０分間反応させた後に培地を除去した。ＰＢＳで洗浄した後に、蛍光プレートリーダーを用いて４４４ nm/５３８ nm emissionで測定した。測定結果を表２及び図２に示す。

[0052] [表2]

試料	比較例 2－1	比較例 2－2	実施例 2－1	実施例 2－2	実施例 2－3	実施例 2－4
	無添加	インスリン	抽出物A 0.02%	抽出物C 0.02%	抽出物A 0.05%	抽出物C 0.05%
相対蛍光強度	1.00	1.32	1.40	2.05	2.07	3.99

[0053] 表２及び図２から明らかなように、実施例２－４（抽出物Ｃ）が、極めて高い骨格筋管細胞の糖取込み促進活性を有することがわかった。また、実施例２－２及び２－４の結果から、糖取込み促進活性には濃度依存性があるこ

とが示唆された。

[0054] 以上の試験例１の結果から明らかなように、柿葉をエチルアルコールと水とを特定の割合で混合した溶液を用いて抽出した柿葉抽出物は、高いＡＭＰキナーゼのリン酸化活性及び糖取込み促進活性を有することがわかった。

[0055] 製造例２：抽出物ＣのＯＤＳカラムによる分画

上記製造例１により得られた抽出物Ｃ（凍結乾燥品）を９倍質量の蒸留水に分散させ、超音波処理の後に１００００Ｇの遠心分離を行い、上清を得た。得られた上清をPurif-Pack Size200 ＯＤＳカラムに吸着させた。溶出の移動相は、精製水、及びアセトニトリル－水混液を用い、流量は６０ml/minとした。溶出は、まず、精製水で１０分間溶出し、次いで５％アセトニトリル－水混液で１０分間溶出し、以後５％ずつアセトニトリル含有量をステップワイズさせたアセトニトリル－水混液で各１０分間溶出し、２０％アセトニトリル－水混液により１０分間溶出した時点で終了した。その後、各溶出液を、エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥して分画物を得た。

[0056] なお、以下において、各溶出液で溶出した分画物をそれぞれ、分画物Ａ（精製水で溶出した分画物）、分画物Ｂ（５％アセトニトリル－水混合液で溶出した分画物）、分画物Ｃ（１０％アセトニトリル－水混合液で溶出した分画物）、分画物Ｄ（１５％アセトニトリル－水混合液で溶出した分画物）、及び分画物Ｅ（２０％アセトニトリル－水混合液で溶出した分画物）と記載する。

[0057] 各分画物の収量は、アプライした抽出物Ｃの質量を１００％とした場合、分画物Ａは約５８％、分画物Ｂは約１７％、分画物Ｃは約１５％、分画物ＤとＥはほとんど回収できなかった。なお、遠心後の沈殿成分（不溶分）は約１９％であった。

[0058] 試験例２：骨格筋管細胞を用いた糖取込促進活性の測定

上記製造例１で得られた抽出物Ｃ（実施例３－１）、並びに上記製造例２で得られた分画物Ａ～Ｃ（実施例３－２～３－４）及び不溶分（実施例３－５）について試験例１－２と同様にして骨格筋管細胞の糖取込み促進活性を

測定した。さらに、試験例１－２と同様にして、ネガティブコントロールとして何も添加していない培地（比較例３－１）、ポジティブコントロールとしてインスリン（１０ｎＭ）（比較例３－２）をそれぞれ用いた。なお、実施例３－１～３－５の試料は最終濃度が０．０２質量％となるように調整した。測定結果を、表３及び図３に示す。

[0059] [表3]

試料	比較例3－1	比較例3－2	実施例3－1	実施例3－2	実施例3－3	実施例3－4	実施例3－5
	無添加	インスリン	抽出物C	分画物A	分画物B	分画物C	不溶分
相対蛍光強度	1.00	1.25	1.79	1.37	2.91	2.20	1.48

[0060] 表３及び図３から明らかなように、実施例３－３（分画物Ｂ）、及び実施例３－４（分画物Ｃ）は、実施例３－１（抽出物Ｃ）よりも高い糖取込み促進活性を有することが確認できた。特に、実施例３－３（分画物Ｂ）は、非常に高い糖取込み促進活性を有することが確認できた。

[0061] 試験例３：骨格筋管細胞を用いた糖取込み促進活性の測定

上記製造例１で得られた抽出物Ｃ（実施例４－１）、並びに柿葉に含まれることが知られている、ケンフェロール－３－Ｏ－グルコシド、ケルセチン－３－Ｏ－グルコシド、ケルセチン－３－Ｏ－ガラクトシド、（＋）－カテキン、エピガロカテキンガレート、ルチン、及び没食子酸の７化合物（実施例４－２～４－８）について、試験例１－２と同様にして骨格筋管細胞の糖取込み促進を測定した。さらに、試験例１－２と同様にして、ネガティブコントロールとして何も添加していない培地（比較例４－１）、ポジティブコントロールとしてインスリン（１０ｎＭ）（比較例４－２）をそれぞれ用いた。なお、実施例４－１～４－８の試料は、最終濃度が０．０１質量％となるように調整した。測定結果を表４及び図４に示す。

[0062]

[表4]

試料	比較例4－1	比較例4－2	実施例4－1	実施例4－2	実施例4－3	実施例4－4	実施例4－5	実施例4－6	実施例4－7	実施例4－8
	ｺﾝﾄﾛｰﾙ	ｲﾝｽﾘﾝ	抽出物C	ｹﾝﾌｪﾛｰﾙ-3-ｸﾞﾙｺｼﾄﾞ	ｹﾙｾﾁﾝ-3-ｸﾞﾙｺｼﾄﾞ	ｹﾙｾﾁﾝ-3-ｶﾞﾗｸﾄｼﾄﾞ	(+)-ｶﾃｷﾝ	ｴﾋﾟｶﾞﾛｶﾃｷﾝｶﾞﾚｰﾄ	ﾙﾁﾝ	没食子酸
相対蛍光強度	1.00	1.43	2.26	0.91	2.26	0.70	1.09	1.70	0.91	1.69

[0063] 表４及び図４から明らかなように、実施例４－３（ケルセチン－３－Ｏ－グルコシド）、実施例４－６（エピガロカテキンガレート）、及び実施例４－８（没食子酸）は、実施例４－１（抽出物Ｃ）と同様に高い糖取込み促進活性を示したものの、それ以外の化合物は、実施例４－１よりも低い活性を示した。

[0064] 表４及び図４において高い活性を示したケルセチン－３－Ｏ－グルコシド、エピガロカテキンガレート、及び没食子酸の３化合物は、抽出物Ｃにおける含有量が高くないため、抽出物Ｃの作用に対してある程度の寄与は存在するものと考えられるが、抽出物Ｃにおける主たる有効成分はこれらの化合物以外であることが示唆された。

[0065] 製造例３：抽出物ＣのSephadex LH-20カラムによる分画

上記製造例１により得られた抽出物Ｃ（凍結乾燥品）を９倍質量の蒸留水に分散させ、超音波処理の後に１００００Ｇの遠心分離を行い、上清を得た。得られた上清をSephadex LH-20カラム（ＧＥヘルスケアジャパン（株）社製）に吸着させた。溶出の移動相は、精製水、メチルアルコール－水混液、及びメチルアルコールを用い、流量は２０ml/minとした。溶出は、まず、精製水で１０分間溶出し、次いで２０％メチルアルコール－水混液で１０分間溶出し、以後２０％ずつメチルアルコール含有量をステップワイズさせたメチルアルコール－水混液で各１０分間溶出した。メチルアルコールによる１０分間の溶出が完了した時点で、移動相を７０％アセトン－水混液６００ｍＬでさらに溶出した。その後、各溶出液を、エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥して分画物を得た。

[0066] なお、以下において、各溶出液で溶出することにより得られた分画物をそれぞれ、分画物Ｆ（精製水で溶出した分画物）、分画物Ｇ（２０％メチルアルコール－水混液で溶出した分画物）、分画物Ｈ（４０％メチルアルコール－水混液で溶出した分画物）、分画物Ｉ（６０％メチルアルコール－水混液で溶出した分画物）、分画物Ｊ（８０％メチルアルコール－水混液で溶出した分画物）、分画物Ｋ（メチルアルコールで溶出した分画物）、及び分画物Ｌ（７０％アセトン－水混液で溶出した分画物）と記載する。

[0067] 各分画物の収量は、アプライした抽出物Ｃの質量を１００％とした場合、分画物Ｆは約６５％、分画物Ｇは約２％、分画物Ｈは約５％、分画物Ｉは約２％、分画物Ｊは約５％、分画物Ｋは約２％および分画物Ｌは約６％であった。なお、上記溶出では溶出しなかった成分（不溶分）は約１３％であった。

[0068] 試験例４：骨格筋管細胞を用いた糖取込み促進活性の測定

上記製造例１で得られた抽出物Ｃ（実施例５－１）、上記製造例２で得られた分画物Ｂ（実施例５－２）、上記製造例３で得られた分画物Ｆ～Ｌ（実施例５－３～５－９）について、試験例２と同様にして骨格筋管細胞の糖取込み促進効果を測定した。さらに、ネガティブコントロールとして何も添加していない培地（比較例５－１）、並びにポジティブコントロールとして、インスリン（１０ｎＭ）（比較例５－２）、インスリン（１００ｎＭ）（比較例５－３）、及びＡＩＣＡＲ（最終濃度３ｍＭ）（比較例５－４）をそれぞれ用いた。なお、実施例５－１～５－９の試料は、最終濃度が０．０２質量％となるように調整した。得られた結果を表５及び図５に示す。

[0069] [表5]

試料	比較例5-1	比較例5-2	比較例5-3	比較例5-4	実施例5-1	実施例5-2	実施例5-3	実施例5-4	実施例5-5	実施例5-6	実施例5-7	実施例5-8	実施例5-9
	コントロール	インスリン 10nM	インスリン 100nM	AICAR 3mM	抽出物C	分画物B	分画物F	分画物G	分画物H	分画物I	分画物J	分画物K	分画物L
相対蛍光強度	1.00	1.62	1.74	1.96	1.35	3.17	1.59	1.46	1.95	2.05	2.01	3.59	4.21

[0070] 表５及び図５から明らかなように、実施例５－８（分画物Ｋ）及び実施例

５－９（分画物Ｌ）は実施例５－２（分画物Ｂ）よりも高い糖取込み促進活性を有することが確認できた。

[0071] 参考製造例１：温度差二段階抽出法による柿葉抽出物の調製

エチルアルコール－水混液による抽出以外の方法として、以下の温度差二段階抽出法により、柿葉抽出物を調製した。

[0072] 乾燥し裁断した国産の柿葉約１０ｇを、２０倍質量の各設定温度の精製水と混合し、軽く攪拌した後、１時間静置した。次いで、１１０メッシュのナイロンを用いて残渣を回収した後、ろ液を凍結乾燥した。精製水の設定温度はそれぞれ、５℃、３０℃、６０℃、及び８０℃とした。

[0073] なお、以下において、各設定温度の精製水から得られた抽出物をそれぞれ、５Ｃ－１（５℃の精製水で得られた抽出物）、３０Ｃ－１（３０℃の精製水で得られた抽出物）、６０Ｃ－１（６０℃の精製水で得られた抽出物）、及び８０Ｃ－１（８０℃の精製水で得られた抽出物）と記載する。

[0074] さらに、上記で回収した残渣を、還流抽出装置を用い、１時間、沸騰還流の条件で抽出を行った。抽出処理後、１１０メッシュのナイロンを用いて大きな不溶物を取り除いた後、定性ろ紙Ｎｏ．１（アドバンテック社製）を用いてろ過処理し、ろ液を凍結乾燥した。

[0075] なお、以下において、各設定温度の精製水により得られた残渣から抽出した抽出物をそれぞれ、５Ｃ－２（５℃の精製水により得られた残渣から抽出した抽出物）、３０Ｃ－２（３０℃の精製水により得られた残渣から抽出した抽出物）、６０Ｃ－２（６０℃の精製水により得られた残渣から抽出した抽出物）、及び８０Ｃ－２（８０℃の精製水により得られた残渣から抽出した抽出物）と記載する。

[0076] また、乾燥し裁断した国産の柿葉約１０ｇを、２０倍質量の１００℃の精製水と混合し、還流抽出装置を用い、２時間、沸騰還流の条件で抽出を行った。抽出処理後、１１０メッシュのナイロンを用いて残渣を取り除いた後、定性ろ紙Ｎｏ．１（アドバンテック社製）を用いてろ過処理し、ろ液を凍結乾燥した。なお、以下において、当該操作により得られた抽出物を１００Ｃ

と記載する。

[0077] 参考試験例１：骨格筋管細胞を用いた糖取込み促進活性の測定

上記参考製造例１で得られた３０Ｃ－１～８０Ｃ－１（参考例３～６）、１００Ｃ（参考例７）、及び３０Ｃ－２～８０Ｃ－２（参考例８～１１）、並びに上記製造例２で得られた分画物Ｂ（参考例２）について、試験例１－２と同様にして骨格筋管細胞の糖取込み促進活性を測定した。さらに、試験例５と同様にして、ネガティブコントロールとして何も添加していない培地（参考例１）を用いた。なお、参考例３～１１の試料は、最終濃度が０．０２質量％となるように調整した。測定結果を、表６及び図６に示す。

[0078] [表6]

試料	参考例1	参考例2	参考例3	参考例4	参考例5	参考例6	参考例7	参考例8	参考例9	参考例10	参考例11
	無添加	分画物B	5C-1	30C-1	60C-1	80C-1	100C	5C-2	30C-2	60C-2	80C-2
相対蛍光強度	1.00	1.64	1.07	1.07	0.67	0.92	0.81	0.87	0.87	0.64	0.57

[0079] 表６及び図６から明らかなように、精製水を用いた温度差二段階抽出法により得られた柿葉抽出物（参考例３～１１）は、参考例２（分画物Ｂ）よりも低い糖取込み活性を示した。これらの結果から、柿葉をエチルアルコール－水混液を用いて抽出を行うことによって初めて、良好な糖取込み促進活性を示す柿葉抽出物が得られることが示唆された。

請求の範囲

[請求項1] 柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程を経て得られた柿葉抽出物を含む血糖代謝改善用組成物。

[請求項2] 柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び

前記工程により得られた抽出物をオクタデシルシリル基結合シリカゲルを充填したカラムに吸着させ、５～１０％アセトニトリル－水混液により溶出する工程

を経て得られた柿葉抽出物を含む、請求項１に記載の血糖代謝改善用組成物。

[請求項3] 柿葉を４０～６０％エチルアルコール－水混液により抽出する工程、及び

前記工程により得られた抽出物を修飾デキストランを充填したカラムに吸着させ、７０～１００％メチルアルコール－水混液又は６０～８０％アセトン－水混液により溶出する工程

を経て得られた柿葉抽出物を含む、請求項１に記載の血糖代謝改善用組成物。

[請求項4] 経口組成物である、請求項１～３のいずれかに記載の血糖代謝改善用組成物。