Miki WW, Hosoda K, Kondo K, Itakura H: Astaxanthin-containing drink. Patent application number 10155459. Japanese Patent Office. Publication date 16 June 1998.

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

EXAMPLE

[Example] Hereafter, although an example and the example of reference are explained in detail, this invention is not limited to these.
[0028]
[The example 1 of reference] The liquid synthetic medium which consists of astaxanthin [by incubation of red yeast Phaffia (Phaffia rhodozyma)] and 0.3% [of the manufacture yeast extracts of the ester rough extraction extractives], and poly-peptone 0.5% and glucose 1.0% was poured distributively to each Sakaguchi flask five [100ml], and it heat-sterilized with the autoclave for 120 degrees C and 20 minutes. Loopful-of-broth inoculation of the pure-culture object of a red yeast Phaffia (Phaffia rhodozyma) mirror stock (ATCC-24201 stock) was carried out at this, and it cultivated at 25 degrees C for 72 hours using the both-way formula shaker. Subsequently, 25l. of the liquid synthetic mediums which consist of 0.3% [of yeast extracts] and poly-peptone 0.5% and glucose 1.0% was put into the 50l. jar fermenter, and it heat-sterilized with the autoclave for 120 degrees C and 20 minutes. The 500ml of the above-mentioned preculture liquid was inoculated into this, and 12l. / min aeration **** incubation was carried out at 25 degrees C for 48 hours. Then, a minute of the glucose was added 1 more%, and incubation was performed to the pan for 48 hours. Centrifugal separation of the obtained culture medium was able to be carried out, and about 600g biomass was able to be obtained by wet weight. The acetone of an amount was added 5 times after freeze-drying the biomass obtained by such technique, and it extracted, performing a ultrasonication The residue was classified in the filtration process, and the 500ml acetone was added, it extracted similarly, and such operation was repeated 3 times. An astaxanthin and the rough extraction extractives of the ester were obtained by uniting and carrying out vacuum concentration of all the obtained red acetone-extraction liquid at 30 degrees C.
[0029] **** extraction extractives were melted in the little dichloromethane, the adsorption chromatography which makes silica gel support was carried out, it developed 10% using the ethyl-acetate inclusion dichloromethane, and the red-dyes fraction of a principal component was isolated preparatively. further -- this component -- the product made from ********** -- the high performance chromatography which makes 5CN-20 support was given, and, finally the astaxanthin was separated, using a hexane / dichloromethane / ethanol / N-ethyl diisopropylamine (80:20:0. 5:0.5) as a mobile phase Yield was about 6mg per 1g of Phaffia xeransis fine particles.
[0030]
[Example 1] It measured as follows how an astaxanthin would prevent the Homo-sapiens blood serum LDL oxidation reaction which the inhibitory action V-70 [2 and 2-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)] to the Homo-sapiens blood serum LDL oxidation reaction which V-70 [of an astaxanthin] (azo compound) of a LDL antioxidation activity (in vitro):astaxanthin triggers triggers.
[0031] First, super-centrifugal one was performed on 4-degree C conditions, and LDL fraction was isolated preparatively from the Homo-sapiens blood serum for 100,000rpm, 40 minutes. Subsequently, LDL fractionation was prepared so that the amount of proteins might become [ml] in 70microg /after measuring the amount of proteins using a phosphate buffer solution using the Micro BCA method. The astaxanthin was prepared so that it might become 12.5 and 25.0 or 50.0microg [/ml] concentration, it added to LDL fractionation, and the absorbance in 234nm was measured with time, V-70 keeping temperature at 37 degrees C after 400microM addition further. Time until a conjugated diene is generated by oxidization was defined as ragtime, an astaxanthin was not added, but what carried out the amount addition of the phosphate buffer solution of said instead was considered as control, and extension of the ragtime by astaxanthin addition was made into LDL antioxidation activity. In addition, the astaxanthin used by this experiment used what was extracted and refined by the technique of Yokoyama et al., Biosci, Biotech.Biochem., 58, and 1842 (1994) from the oceanic bacteria Agrobacterium aurantiacum biomass. A result is shown in Table 1 and the drawing 1 . The astaxanthin extended ragtime by 1.6 to 3.3 times in concentration dependence, and showed clear LDL antioxidation activity.
[0032]
[Table 1]
table 1 The Homo-sapiens LDL antioxidation activity of an astaxanthin Ragtime (part) Control 19.9 12.5microg/ml 31.5 25.0microg/ml 45.4 50.0microg/ml 65.0 [0033]
[Example 2] It measured as follows what effect ****** it was to the oxidation reaction which V-70 causes the effect astaxanthin to the blood serum LDL oxidation reaction which V-70 (azo compound) by Homo-sapiens medication of an astaxanthin of a LDL antioxidation activity (Homo-sapiens break-in examination):astaxanthin triggers to LDL which medicated healthy people with and was obtained from the obtained blood serum.
[0034] First, the fixed meal was made to take in for 13 healthy persons, and, respectively, it was enclosed with five persons in 3.6 or 7.2mg/day, and two weeks and the astaxanthin were enclosed with three persons in 14.4mg/day at the soft capsule, and carried out internal use. The blood serum before and behind medication was extracted, super-centrifugal one was performed on 4-degree C conditions. and LDL fraction was isolated preparatively for 100,000rpm, 40 minutes. Subsequently, LDL fractionation was prepared so that the amount of proteins might become [ml] in 70microg /after measuring the amount of proteins using a phosphate buffer solution using the Micro BCA method. The absorbance in 234nm was measured with time, V-70 keeping temperature at 37 degrees C after 400microM addition as a compulsive oxidizer. The ragtime before and behind astaxanthin medication was compared, and the effect of an astaxanthin was examined. In addition, in this experiment, ASTAX1700 (per kg astaxanthin diester 1.7mg inclusion) of ****** Freezing by which extraction refining was carried out from the krill was used as an astaxanthin. A result is shown in Table 2 and the drawing 2 . An astaxanthin extends ragtime intentionally and clear LDL antioxidation activity was accepted also in in vivo.
[0035]

[Table 2]
table 2 [ ] it is based on an astaxanthin load Effect over Homo sapiens's LDL oxidization Burden Ragtime (part)
(mg/day) Before a load After a load 3.6 (n= 5) 48.1**3.2 60.7**5.0 p< 0.05 7.2 (n= 5) 45.4**8.3 54.3**6.9 p< 0.05 14 4 (n= 3) 35.7**4.7 50.8**1.4 p< 0.05 [0036]
[The example 2 of reference] The anti-variation field effect of an astaxanthin was investigated by anti-mutagenicity-test ********, Salmonella test of an astaxanthin (the pre ink ********** method). The used strain is 102 stocks of Salmonella typhimurium (Salmonella typhimurium) TA, and a sensitivity is high to the variation field where **** generates free radicals, such as bleomycin and aldehydes. Mitomycin C (MMC) was used as a positive control. Moreover, dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a solvent contrast. It could be two kinds although MMC was added to astaxanthin independence and the astaxanthin as a sample. Each sample used concentration of an astaxanthin as a maximum of 5mg / plate, and examined it about the concentration of five phases.
[0037] first, DMSO solution of an astaxanthin is poured distributively in a sterilization smallness test tube (50micro100microl and except for it l), and the last amount becomes 0.5microl / plate in the sample except astaxanthin independent about MMC -- as -- 50microl. -- it added [Astaxanthin an independent sample] Subsequently, 0.1ml of the bacillus suspension which carried out the preculture of the 0.5ml (pH7.4) of the phosphate buffer solutions was added to each. The pre ******** bait was carried out, shaking these for 20 minutes at 37 degrees C using a shaking-culture thermostat, and 2.5ml of soft agars was added, and after mixture, it flowed into the minimum glucose agar medium, and extended on the plate uniformly so that foam might not arise. After carrying out the ******** bait during two days of this at 37 degrees C, the existence of growth prevention of test strain was investigated on the plate using the stereoscopic microscope. and the colony count (drawing 3) produced by return mutation was counted.
[0038] Consequently, mutagen nature was not accepted in the astaxanthin itself at all. On the other hand, the anti-mutation to MMC which is a positive control suppresses a mutation 34.5% at the time of the highest concentration of 5mg / plate, and the effect was checked.
[0039]
[The example 1 of a tablet] Letter tablet oil phase section of emulsification (weight %)
An astaxanthin 0.1 rapeseed oil 39.9 succinic-acid glyceride 2.0 aqueous-phase section L ascorbic acid 2.0 gallic acids 1.0 quercetins 1.0 locust bean gums 0.1 water After heating the water in which 53.9 locust bean gums were melted at 65 degrees C, a gallic acid, L ascorbic acid, and a quercetin are mixed. Beforehand, it let mixture and the after [****] homogenizer pass, the oil phase section mixed and melted was homogenized at 65 degrees C, it cooled to 10 degrees C, and the letter tablet of emulsification of the above-mentioned combination was obtained. About 1-20ml per time of this letter tablet of emulsification is drunk.
[0040]
[The example 2 of a tablet] Letter tablet oil phase section of emulsification (weight %)
An astaxanthin 0.1 rapeseed oil 38.9 citric-acid monoglyceride 2.0 aqueous-phase section L ascorbic acid 2.0 gallic acids 1.0 hesperidins 1.0 locust bean gums 0.05 water After heating the water in which 54.95 locust bean gums were melted at 65 degrees C, a gallic acid, L ascorbic acid, and a hesperidin are mixed. Beforehand, it let mixture and the after [****] homogenizer pass, the oil phase section mixed and melted was homogenized at 65 degrees C, it cooled to 10 degrees C, and the letter tablet of emulsification of the above-mentioned combination was obtained. About 1-20ml per time of this letter tablet of emulsification is drunk.
[0041]

	(重量%)
アスタキサンチン	5
乳　糖	80
重質酸化マグネシウム	15

[The example 3 of a tablet] Tablet

** -- it mixed uniformly and considered as the one grain 180mg tablet
[0042]

	(重量%)
アスタキサンチン	45
乳　糖	40
デンプン	15

[The example 4 of a tablet] Powder and a granule

** -- it mixed uniformly and considered as powder or the granule
[0043]
[The example 5 of a tablet] Capsule gelatin 70.0% glycerol 22.9% methyl parahydroxybenzoate 0.15% propylparaben 0.51% water An optimum-dose meter Into the soft capsule hide which consists of the above-mentioned component 100%, it was filled up with krill extracted-oil fat (ASTAX1700, astaxanthin diester 1.7% inclusion) by the conventional method, and the soft one grain 180mg capsule was obtained.
[0044]
[The example 6 of a tablet] A health drink Taste: DL-sodium tartrate 1g A succinic acid 0.09g Sweet-taste: Liquid sugar 8kg Acidity: A citric acid 120g Vitamin: Vitamin C 100g Astaxanthin ethyl ester 10g Vitamin E 300g cyclodextrin 50g Perfume 150ml Potassium chloride 10g The component of the magnesium sulfate 5g above was blended, water was added, and it could be 100l. This health drink drinks about 100ml per time.
[0045]
[The example 7 of a tablet] A nourishment sthenia strong energy agent Taste: DL-sodium tartrate 1g A succinic acid 0.09g Sweet-taste: Liquid sugar 8kg Acidity: A citric acid 120g Vitamin: Vitamin C 100g Vitamin B1 20g Vitamin B2 20g Vitamin B6 20g Vitamin B12 20g

Folic acid 10g 20g of nicotinic acids Vitamin E 300g Cyclodextrin 50g Astaxanthin 10g Perfume 150ml Potassium chloride 10g The component of the magnesium sulfate 5g above was blended, water was added, and it could be 100l. This nourishment sthenia strong energy agent drinks about 100ml per time.

[Translation done.]

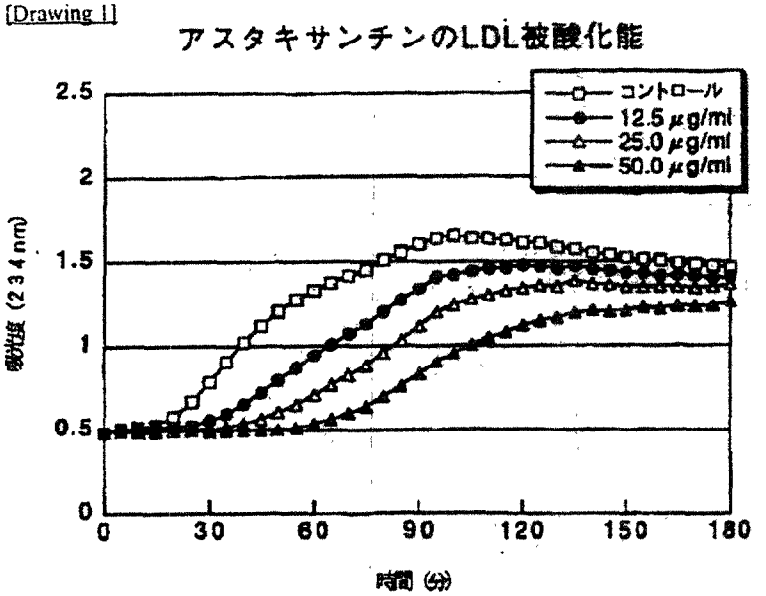
* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

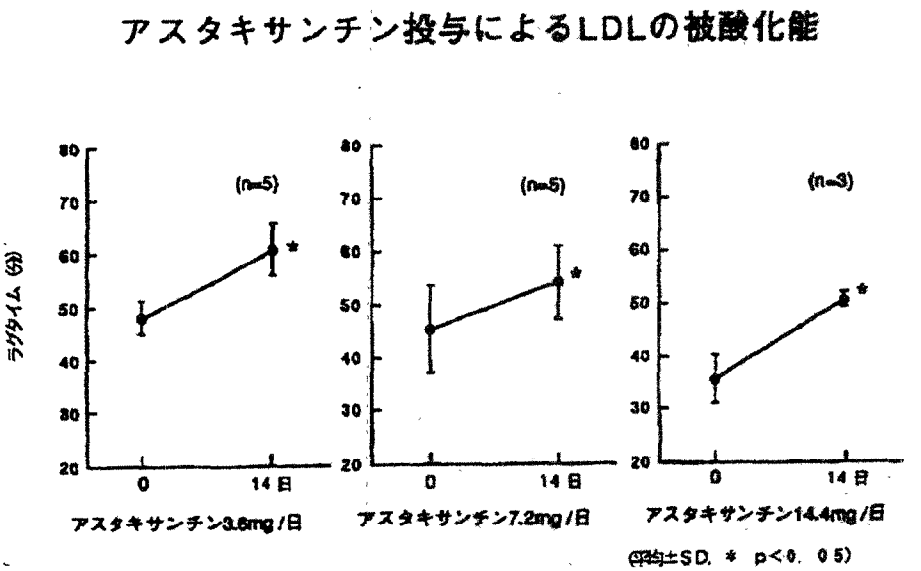
1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

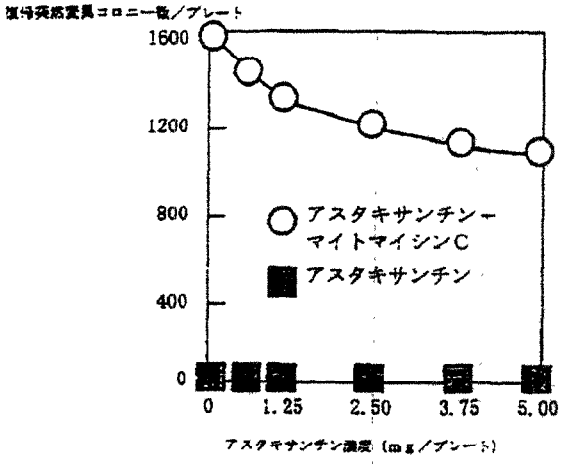
[Drawing 1]



[Drawing 2]



[Drawing 3]



[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2.**** shows the word which can not be translated.
3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]
[Drawing 1] Drawing 1 is the graph which showed the ability (in vitro) of an astaxanthin oxidized [LDL].
[Drawing 2] Drawing 2 is the graph which showed the ability (in vivo) by astaxanthin medication oxidized [LDL].
[Drawing 3] Drawing 3 is the graph which an astaxanthin did not show a mutation but showed a mode that the mutation in which an induction is rather carried out by mitomycin C was suppressed in the mutation test which used the salmonella.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) 公開特許公報（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開平10－155459

(43)公開日　平成10年(1998) 6月16日

(51)Int.Cl.[6]		識別記号	ＦＩ		
Ａ２３Ｌ	1/327		Ａ２３Ｌ	1/327	
	1/30			1/30	Ａ
	2/52		Ａ６１Ｋ	31/12	ＡＢＮ
Ａ６１Ｋ	31/12	ＡＢＮ			ＡＢＳ
		ＡＢＳ		31/215	ＡＢＸ

審査請求　未請求　請求項の数９　ＯＬ　（全 10 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8－316479

(22)出願日　平成８年(1996)11月27日

特許法第30条第１項適用申請有り　平成８年10月25日
日本動脈硬化学会発行の「動脈硬化　第24巻　第６号」
に発表

(71)出願人　000001904
サントリー株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜２丁目１番40号

(71)出願人　591265954
イタノ冷凍株式会社
徳島県鳴門市瀬戸町明神字式軒家33番地の２

(72)発明者　幹　渉
兵庫県神戸市兵庫区大開通５－１－15

(72)発明者　細田　和昭
東京都大田区大森東２－９－１－1002

(74)代理人　弁理士　社本　一夫　（外５名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アスタキサンチン含有飲食物

(57)【要約】
【課題】　血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）の酸化を防止して、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防または抑制するための飲食物及び医薬を提供する。
【解決手段】　安全な天然由来の物質であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルを含有する、血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）抗酸化作用を有する飲食物及びその使用、並びにアスタキサンチン及び／又はそのエステルを有効成分とする動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防又は抑制するための医薬品。

【特許請求の範囲】
【請求項1】　アスタキサンチン及び／又は食用に許容されるそのエステルを添加してなる、血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）の酸化を抑制または防止する作用を有する飲食物。
【請求項2】　アスタキサンチン及び／又はそのエステルが、天然物から得られたものである請求項1記載の飲食物。
【請求項3】　上記天然物から得られたものが、オキアミ抽出物である請求項2記載の飲食物。
【請求項4】　動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防又は抑制のための請求項1ないし3のいずれか1項記載の飲食物。
【請求項5】　アスタキサンチン及び／又はその食用に許容されるエステルからなる、血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）の酸化に対する抑制または防止を目的とする食品用の添加剤。
【請求項6】　アスタキサンチン及び／又はその薬学的に許容されるエステルを有効成分として含有してなる、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防又は抑制するための医薬品。
【請求項7】　血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）の酸化を抑制または阻止するための飲食物製造のためのアスタキサンチン及び／又は食用に許容されるそのエステルの使用。
【請求項8】　動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防または抑制のための飲食物製造のためのアスタキサンチン及び／又は食用に許容されるそのエステルの使用。
【請求項9】　動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防または抑制のための医薬品製造のためのアスタキサンチン及び／又はその薬学的に許容されるエステルの使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する分野】本発明は、アスタキサンチン及び／又はそのエステルからなる、血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）抗酸化作用を有する飲食物及びその使用、並びにアスタキサンチン及び／又はそのエステルを有効成分とする動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防又は抑制するための医薬品に関するものである。アスタキサンチン及び／又はそのエステルを天然有効成分として、その安全性やヒト血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）の酸化防止能力により、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の予防又は抑制のための機能性食品及び医薬品として利用することができる。
【０００２】
【従来の技術】従来、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害の抑制方法としては、食事療法、運動療法及び薬物療法が用いられてきた。使用される薬物はＨＭＧ-ＣｏＡ還元酵素阻害薬、プロブコール、陰イオン交換樹脂製剤、フィブラート系薬剤及びニコチン酸製剤の5つのグループに大別できる。これらを単独で使用するか、治療困難な場合は複数の薬剤の組み合わせで治療を行ってきた〔竹村ら、医学のあゆみ、173，452（1995）〕。しかし、各患者の病状が極めて多様であり、特に予防の観点で考慮できる方法に優れたものがあまりないのが現状である。
【０００３】一方、動脈硬化症の発症及び進行は、ヒト血清中の低比重リポタンパク（ＬＤＬ）の酸化変性と関連することが知られているが、最近、ＬＤＬの酸化変性の受けやすさを指標とする動脈硬化症診断法が開発され（近藤和雄ら、活性酸素と医食同源、共立出版、308頁、1996）、ＬＤＬ酸化変性度と動脈硬化との間に負の相関性があることが確認されている。このような方法を指標として血清ＬＤＬの酸化を効果的に防止できる化合物が得られれば、現在使用されている医薬品とは全く異なった機構で、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を抑制することができ、特に天然物からこのような化合物が得られれば、これらの疾患の予防の観点から利用価値は極めて高い。しかしながら、このような化合物は現在、得られていない。
【０００４】
【発明が解決しようとする課題】本発明は、血清ＬＤＬの酸化を効果的に防止し、しかも安全性が高い物質を探索し、食品添加物または医薬品の有効成分として提供することを目的とする。
【０００５】本発明の別の課題は、動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を、現在使用されている治療剤とは全く異なった機構で予防又は抑制するために、血清ＬＤＬの酸化を効果的に防止できしかも安全性の高い物質を添加した飲食物、およびそのような物質を有効成分とする医薬品を提供することである。
【０００６】
【課題を解決するための手段】本発明者らは自然界より、ＬＤＬの酸化を防止する活性（以下、ＬＤＬ抗酸化活性という）を示し、かつ安全性に優れた化合物を鋭意探索した結果、カロテノイドの一種として公知であるアスタキサンチン及びそのエステルが、非常に強力なＬＤＬ抗酸化活性を示すことを発見した。多数あるカロテノイドのうち、アスタキサンチン及びそのエステルが特に強力なＬＤＬ抗酸化活性を示したことは驚くべきことである。
【０００７】本発明者らはさらに、アスタキサンチンには突然変異原性が観察されず、安全性が高いことも確認した。本発明は、これらの新知見と、ＬＤＬの酸化変性が動脈硬化の重要な要因であるという知識に基づいて完成されたものである。
【０００８】従って本発明は、アスタキサンチン及び／又はそのエステルを添加してなる、血清中の低比重リポ

タンパク（ＬＤＬ）抗酸化作用を有する飲食物及びその使用、並びにアスタキサンチン及び／又はそのエステルを有効成分とする動脈硬化、虚血性心疾患又は虚血性脳障害を予防又は抑制するための医薬品を提供する。アスタキサンチンは、主として魚類への体色改善剤や家畜への色調改善添加剤として（例えば特開昭57-206342、特開昭60-54647又は特開平4-63552）利用されているが、血清ＬＤＬの酸化を防止する目的で、食品に添加しあるいは医薬品の有効成分として用いることは従来知られていない。

【０００９】本発明の飲食物及び医薬品の有効成分であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは、飲食物又は医薬品が体内に取り込まれたときアスタキサンチン及び／又はそのエステルが血清中のＬＤＬ抗酸化作用を示すための有効量、例えば、１日摂取量あたり１～１００mg、好ましくは１～２０mg含まれているが、その上限には特別な制限は存在しない。

【００１０】本発明の有効成分であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは、甲殻類の甲殻及び卵［Kuhnら、Angew. Chem., 51, 465 (1938)又はBer., 71, 1879 (1938)］、臓器［Kuhnら、Ber., 72, 1879 (1939)］、福寿草や金風花の花弁［Seyboldら、Nature, 184, 1714 (1959)］、種々の魚介類の皮(Matsuno、Carotenoids Chemistry and Biology, Plenum Press, 59 頁, 1989) 、卵［Mikiら、Comp.Biochem. Physiol., 71B, 7 (1982)］、ナンキョクオキアミ〔Yamaguchiら、Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 49, 1411 (1983)、緑藻ヘマトコッカス［Renstroem ら、Phytochemistry, 20, 2561 (1981)］、赤色酵母ファフィア［Andrewesら、Phytochemistry, 15, 1003 (1976)］、海洋性細菌Agrobacterium aurantiacum ［Yokoyamaら、Biosci, Biotech. Biochem., 58, 1842 (1994)］などより発見されているもので、その化学構造は決定され［Andrewesら、Acta Chem. Scand., B28, 730(1974)］、また有機合成法も確立しているところから［Widmerら、Helv.Chem. Acta, 64, 2405 (1981) およびMayerら、Helv. Chem. Acta, 64, 2405 (1981)］、化学合成品としても入手は容易である。

【００１１】したがって、その供給源には特に制限はなく、例えば、化学的に合成されたアスタキサンチンでも、またアスタキサンチン及び／又はそのエステルを含有する天然物から分離したものであってもよく、具体的には赤色酵母ファフィア、緑藻ヘマトコッカス、海洋性細菌等を適当な培地で培養し、その培養物から抽出したもの、あるいはナンキョクオキアミ等から抽出したもの等を挙げることができる。これらの抽出物は、有機溶媒、好ましくはエタノールやアセトンを用いて抽出された抽出エキスの状態であっても良く、またこの抽出エキスを必要に応じて適宜精製したものであってもよい。

【００１２】参考のため、以下に赤色酵母ファフィア（Phaffia rhodozyma）を適当な培地で培養し、その培養物から抽出エキスを得る方法、並びにアスタキサンチン又はそのエステルを精製する方法を例示する。

【００１３】赤色酵母ファフィア（Phaffia rhodozyma）を用いて、アスタキサンチン及びそのエステルを製造する際に使用される培地は、液体及び固体のいずれでもよいが、通常は液体培地による振とう培養または通気撹拌培養が有効である。培地は赤色酵母が生育して菌体内にアスタキサンチン及び／又はそのエステルを蓄積するものであればよい。すなわち、炭素源としては、例えばグルコース、ラクトースなどの糖類、グリセリン、デンプン、有機酸類などが、また窒素源としては、例えばペプトン、カザミノ酸などのタンパク質加水分解物、肉エキス、酵母エキス、大豆粕、アミノ酸類、アンモニウム塩、硝酸塩その他の各種窒素化合物が用いられる。無機塩としては各種リン酸塩、硫酸塩、塩化ナトリウムを添加しても良く、また、菌体の生育促進のため各種ビタミン類、ミネラル類、核酸関連化合物などの添加も可能である。

【００１４】培養にあたっては、直接本培養を行わず、予め小規模な前培養を行って得られる培養物を本培養用培地に接種するのが望ましい。培養時の温度、期間、液性などは本発明化合物の蓄積量が最大になるように適宜選択、調節されるが、多くの場合、好気条件下で１５℃－３０℃、３－７日の培養でよく、また培地の液性はｐＨ４．０－９．５に保つのがよい。

【００１５】かかる培養により、菌体内にアスタキサンチン及び／又はそのエステルが生産、蓄積される。したがって液体培地を用いた場合、培養物を一旦沪過あるいは遠心分離して菌体を回収後、数度水で洗浄する。この様にして得られた菌体を物理的手法を用いて破砕した後乾燥する。乾燥菌体より目的化合物の分離、精製はアスタキサンチン及び／又はそのエステルの化学的特性に基づいて種々の手法が選択可能である。すなわち、各種の高極性有機溶媒による抽出や溶解が選択されるが、好ましくはエタノール又はアセトンを用いた菌体抽出である。溶媒量は通常乾燥菌体に対して３－５倍量が好ましく、室温にて数時間の撹拌による抽出を２－３回繰り返せば充分である。次いでこの抽出液を合一し、４０℃以下で減圧濃縮するとアスタキサンチン及びそのエステルを含む油状の粗抽出エキスが得られる。本抽出エキスに含有されるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは用いる溶媒等の諸条件によって変動するが、通常１－１０％程度である。

【００１６】さらにこの粗抽出エキスからヘキサンなどの低極性有機溶媒を用いた不純物の除去、ゲル沪過、各種イオン交換体を用いたイオン交換クロマトグラフィー、シリカゲル、シアノプロピル、アルミナなどを担体とする吸着クロマトグラフィーなどを有効に用いて精製を行い、これらの手段の組み合わせにより本発明物質は単離される。ただし、これら以外の方法でも本発明物質

の特性を有効に利用できるものであれば適宜利用可能である。なかんづく、ダイヤイオンＨＰ－２０、コスモシルＣ１８－ＡＲ、コスモシル５ＣＮ－２０の組み合わせを好ましいものとして挙げることができる。

【００１７】またアスタキサンチン及び／又はそのエステルを含有するオキアミ抽出物を得る方法として、特開昭６０－４５５８号公報には、オキアミの生体またはそれらの乾燥体を、アセトン、ｎ－ヘキサン、酢酸エチル等の有機溶剤で浸漬し、色素を溶出した溶剤抽出液について、そのｐＨを中性にした後、リパーゼあるいはアルカリを添加して脂肪酸その他のきょう雑物を分解し、これを超臨界ガス抽出あるいは分子蒸留し、又は希アルカリを用いて洗浄することを特徴とする黄色～赤橙色素アスタキサンチンの製造方法が、また特開昭６１－２８１１５９号公報には、オキアミの乾燥体から、アセトン、ｎ－ヘキサン等の有機溶剤で抽出された粗色素液について、色素以外の不飽和脂質を触媒で選択的に水素添加した後、リパーゼを添加して脂質を加水分解し、遊離した脂肪酸を尿素付加及び又は分子蒸留で除去し、必要であればさらにカラムクロマトグラフィーにより濃縮、精製することを特徴とする橙色色素アスタキサンチンの製造方法が開示され、さらに、山下栄次：食品と開発 vol.27 No.3（通巻409号）p38～40（1992)には、オキアミの有機溶剤抽出物または超臨界抽出物について高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）を行うことによって、アスタキサンチンジエステル、モノエステル及び遊離のアスタキサンチンを分離することができること、特開平５－１５５７３６号公報には、ＨＰＬＣを行うことによってトリグリセリドや極性脂質などが除去でき、色素濃度を飛躍的に上げることができ、また海産物特有の臭いの元となる物質も除去されること、そしてカラムに充填する固定相となる吸着剤は例えばシリカゲル、ケイ酸、活性アルミナなどがあり、移動相となる低極性溶剤としては例えばｎ－ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテルなどがあり、極性溶剤としては例えばアセトン、酢酸エチル、メタノールなどがあり、色素の精製には、まずｎ－ヘキサンでトリグリセリドなどの低極性脂質を溶出させ、次にｎ－ヘキサン中のアセトンの含有を増す（アセトン含量は約０．１～２０％アセトン／ｎ－ヘキサンの範囲）ことにより色素を溶出回収することが記載されており、いずれの方法を用いてもよい。

【００１８】アスタキサンチンのエステルは、食用あるいは医薬用として許容される任意の脂肪酸とのエステルであり、例えばパルミチン酸、ステアリン酸等の飽和脂肪酸、あるいはオレイン酸、リノール酸、α－リノレン酸、γ－リノレン酸、ビスホモ－γ－リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等の不飽和脂肪酸のエステルが挙げられ、これらがアスタキサンチンに１つ結合したモノエステル及び２つ結合したジエステルのいずれも本発明に使用できる。

【００１９】本発明の有効成分を食品又は医薬品として利用する場合、上記の粗抽出エキスあるいは精製品のいずれを使用することもできる。これらを使用する場合、アスタキサンチンおよびそのエステルの性状は油状であるところから、常法にしたがって有効成分を浮剤化あるいはシナジストとなるような化合物を加えて浮剤化することができる。

【００２０】

【発明の実施の形態】次に、本発明の飲食物及び医薬品の組成及び製剤について説明する、本発明における有効成分であるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは化学的に合成されたものでも天然物由来のものでもよく、これらを単独であるいは適宜組み合わせて使用可能である。アスタキサンチンあるいは粗抽出エキスはエタノールに溶解し、そのまま水で希釈して使用することも可能であるが、必要に応じて乳液状製剤を調製することができる。乳液状製剤の調製にあたっては、水相部に没食子酸、Ｌ-アスコルビン酸（あるいはそのエステルまたは塩）、ガム質（例えばローカストビーンガム、アラビアガムまたはゼラチン等）、さらにビタミンＰ（例えばヘスペリジン、ルチン、ケルセチン、カテキン、チアニジン等のフラボノイド類またはポリフェノール類あるいはその混合物）等を、また油相部にはアスタキサンチンあるいはそのエステル、粗抽出エキス、またはその混合物を添加し、さらにグリセロール、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、デキストリンまたは油脂、例えばナタネ油、大豆油、コーン油等通常の液状油を加えて乳化することによって容易に調製できる。乳化に際しては、拘束撹拌機、ホモジナイザー等を用いて混合乳化が可能である。

【００２１】また、本発明の医薬として、錠剤及び粉末のような固形投薬形態、あるいはエリキシロール、シロップ及び懸濁液のような液体投薬形態で経口投与される。また非経口投与的に、例えば注射剤、座薬としても使用可能である。これらの医薬活性成分としてはアスタキサンチンは化学合成品でも天然物由来のアスタキサンチンあるいはそのエステル又は粗抽出エキスでもよく、これらを単独でもしくは適宜混合して用いられる。経口投与薬として使用する場合の補助剤としては、例えば固形粉末上の担体、ラクトース、サッカロースなどの糖、グリシンなどのアミノ酸、セルロース等が挙げられる。また潤滑剤として二酸化珪素。タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール等、結合剤としてデンプン、ゼラチン、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が例示できる。崩壊剤としてはデンプン、寒天等がある。

【００２２】本発明の医薬中に含まれるアスタキサンチンまたはそのエステル（有効成分）の量は、成人に対して１日あたり、普通１mg～１００mg、好ましくは１mg～２０mgの服用量で経口投与を行うか、あるいは非経口投

与を行うことができる量である。投与量は、投与される疾患の種類、患者の年齢、体重、症状の程度、投与形態によって異なることは明らかである。本発明の有効成分は、血清ＬＤＬ抗酸化作用を有するため、動脈硬化や、狭心症、心筋梗塞等の虚血性心疾患や脳梗塞等の虚血性脳障害等に対し有効である。

【００２３】また本発明の飲食物の形態としては、マーガリン、バター、バターソース、チーズ（ナチュラル、プロセス）、生クリーム、ショートニング、ラード、アイスクリーム、ヨーグルト、コーヒー用ミルク、乳製品、ソース、スープ、肉製品、魚製品、ポップコーン、フライドポテト、ポテトチップ、ふりかけ、だて巻き、和菓子類（せいべい等）、洋菓子類（プリン、ゼリー、グミキャンディー、キャンディー、ドロップ、キャラメル、チョコレート、チューインガム、ペストリー等）、焼き菓子類（カステラ、ケーキ、ドーナッツ、ビスケット、クッキー、クラッカー等）、マカロニ、パスタ、サラダ油、インスタントスープ、ドレッシング、卵、マヨネーズ、みそ、炭酸系飲料、非炭酸系飲料（果汁飲料、ネクター飲料等）、清涼飲料、スポーツ飲料、茶、コーヒー、ココアなどの非アルコール飲料、リキュール、薬用酒等のアルコール飲料等の一般食品の形態を挙げることができる。

【００２４】本発明の飲食物は、アスタキサンチン及び／又はそのエステル、もしくはこれらを含有する天然物から得られたものを、一般食品の原料とともに配合し、通常の方法により加工製造することができる。その配合濃度は剤形、食品の形態性状により異なるが、一般には０．００１～１０％が好ましいが特に限定されるものではない。ただし最終製品の１日摂取量あたり、本発明の有効成分が、アスタキサンチンとして血清中のＬＤＬ抗酸化作用を発揮するのに必要な量だけ含まれるように調製する。現在知られている限り成人１日摂取量あたり１～５０mg、好ましくは１～２０mgが好ましいが、そのような量は、当業者が適宜選択できる。

【００２５】本発明の飲食物を栄養補助食品あるいは機能性食品として用いる場合、その形態は、上記医薬製剤と同様の形態でもよいが、例えば蛋白質（蛋白質源としてはアミノ酸バランスのとれた栄養価の高い乳蛋白質、大豆蛋白質、卵アルブミン等の蛋白質が最も広く使用されるが、これらの分解物、卵白のオリゴペプチド、大豆加水分解物等の他、アミノ酸単体の混合物も使用される）、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料等が配合された自然流動食、半消化態栄養食および成分栄養食や、ドリンク剤、カプセル剤、経腸栄養剤等の加工形態であってもよい。スポーツドリンクあるいは栄養ドリンクとして提供する場合は、栄養バランスを整え、かつ摂取時の風味を一層よくするため、易消化性の含水炭素、アミノ酸、ビタミン類、ミネラル類等の栄養的添加物や甘味料、香辛料、香料、色素等を配合することもできる。

【００２６】本発明の栄養補助食品あるいは機能性食品の形態は、これらに限定されるものではなく、上記の一般食品の形態であってもよいが、できれば単位服用形態にあることが望ましい。

【００２７】

【実施例】以下、実施例及び参考例を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない

【００２８】

【参考例１】　赤色酵母ファフィア（Phaffia rhodozyma）の培養によるアスタキサンチン及びそのエステル粗抽出エキスの製造

酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.5%及びグルコース1.0%からなる液体合成培地を坂口フラスコに100mlづつ5本に分注し、120℃、20分間オートクレーブで加熱滅菌した。これに赤色酵母ファフィア（Phaffia rhodozyma）ミラー株(ATCC-24201株）の純粋培養物を一白金耳接種し、25℃で72時間往復式振とう器を用いて培養した。次いで酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.5%及びグルコース1.0%からなる液体合成培地25lを50lのジャーファーメンターに入れ、120℃、20分間オートクレーブで加熱滅菌した。これに上記の前培養液500mlを接種し、25℃で48時間、12l／min通気撹拌培養した。その後、さらに1%分のグルコースを追加し、さらに48時間培養を行った。得られた培養液を遠心分離し、湿重量で約600gの菌体を得ることができた。かかる方法で得られた菌体を凍結乾燥後、5倍量のアセトンを加え、超音波処理を行いつつ抽出した。沪過法にて残渣を分別し、500mlのアセトンを加えて同様に抽出を実施し、かかる操作を3回繰り返した。得られた赤色アセトン抽出液を全て合一し、30℃で減圧濃縮することによりアスタキサンチン及びそのエステルの粗抽出エキスを得た。

【００２９】本粗抽出エキスを、少量のジクロロメタンに溶解し、シリカゲルを担体とする吸着クロマトグラフィーを実施し、10%酢酸エチル含有ジクロロメタンを用いて展開して主成分の赤色色素画分を分取した。さらにこの成分をナカライテスク社製5CN-20を担体とする高速液体クロマトグラフィーに付し、ヘキサン／ジクロロメタン／エタノール／N-エチルジイソプロピルアミン（80:20:0.5:0.5）を移動相として用いてアスタキサンチンを最終的に分離した。収率はファフィア乾燥粉体1gあたり約6mgであった。

【００３０】

【実施例１】　アスタキサンチンのＬＤＬ抗酸化活性（in vitro）：アスタキサンチンのV-70（アゾ化合物）の引き起こすヒト血清ＬＤＬ酸化反応に対する阻害作用

V-70〔2,2-アゾビス（4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル）〕の引き起こすヒト血清ＬＤＬ酸化反応をアスタキサンチンがいかに防止するかを以下のようにして測定した。

【0031】まず、ヒト血清より100,000rpm、40分、4℃の条件で超遠心を行ってLDL画分を分取した。次いでMicro BCA法を用いてタンパク量を測定後、リン酸緩衝液を用いてタンパク量が70μg／mlになるようにLDL分画を調製した。アスタキサンチンを12.5、25.0、50.0μg／mlの濃度になるように調製してLDL分画に添加し、さらにV-70を400μM添加後、37℃に温度を保ちつつ234nmにおける吸光度を経時的に測定した。酸化により共役ジエンが生成されるまでの時間をラグタイムと定義し、アスタキサンチンを添加せず、代わりにリン酸緩衝液を同量添加したものをコントロールとしてアスタキサンチン添加によるラグタイムの延長をLDL抗酸化活性とした。なお本実験で用いたアスタキサンチンは、海洋性細菌Agrobacterium aurantiacum菌体より、Yokoyamaら、Biosci, Biotech. Biochem.,58, 1842 (1994)の方法で抽出、精製したものを使用した。結果を表1及び図1に示す。アスタキサンチンは、濃度依存的に1.6－3.3倍にラグタイムを延長し、明らかなLDL抗酸化活性を示した。

【0032】

【表1】

表1
アスタキサンチンのヒトLDL抗酸化活性

	ラグタイム（分）
コントロール	19.9
12.5μg／ml	31.5
25.0μg／ml	45.4
50.0μg／ml	65.0

【0033】

【実施例2】　アスタキサンチンのLDL抗酸化活性（ヒト介入試験）：アスタキサンチンのヒト投与によるV-70（アゾ化合物）の引き起こす血清LDL酸化反応に対する効果

アスタキサンチンを健常人に投与し、得られた血清より得たLDLに対し、V-70の引き起こす酸化反応にどのような効果及ぼすかを以下のようにして測定した。

【0034】まず、健常者13名を対象とし、一定の食事を摂取させ、2週間、アスタキサンチンをそれぞれ3.6、7.2mg／日を5名、14.4mg／日を3名にソフトカプセルに封入し、経口投与した。投与前後の血清を採取し、100,000rpm、40分、4℃の条件で超遠心を行ってLDL画分を分取した。次いでMicro BCA法を用いてタンパク量を測定後、リン酸緩衝液を用いてタンパク量が70μg／mlになるようにLDL分画を調製した。強制酸化剤としてV-70を400μM添加後、37℃に温度を保ちつつ234nmにおける吸光度を経時的に測定した。アスタキサンチン投与前後のラグタイムを比較し、アスタキサンチンの効果を検討した。なお本実験ではアスタキサンチンとして、オキアミから抽出精製されたイタノ冷凍（株）のASTAX 1700（1kgあたりアスタキサンチンジエステル1.7mg含有）を使用した。結果を表2及び図2に示す。アスタキサンチンは、有意にラグタイムを延長し、in vivoにおいても明らかなLDL抗酸化活性が認められた。

【0035】

【表2】

表2
アスタキサンチン負荷による
ヒトLDLの酸化に対する効果

負荷量（mg／日）		ラグタイム（分） 負荷前	負荷後	
3.6	(n=5)	48.1±3.2	60.7±5.0	p<;0.05
7.2	(n=5)	45.4±8.3	54.3±6.9	p<;0.05
14.4	(n=3)	35.7±4.7	50.8±1.4	p<;0.05

【0036】

【参考例2】　アスタキサンチンの抗変異原性試験

エイムス／サルモネラテスト（プレインクベーション法）にてアスタキサンチンの抗変異原効果を調べた。用いた菌株はサルモネラ・ティフィムリウム（Salmonella typhimurium）TA102株で、本株はブレオマイシンやアルデヒド類等のフリーラジカルを生成する変異原に対して感受性の高いものである。陽性対照としてはマイトマイシンC(MMC)を用いた。また、溶媒対照としてはジメチルスルホキシド(DMSO)を用いた。試料としてはアスタキサンチン単独、及びアスタキサンチンにMMCを加えたものの2種類とした。それぞれの試料はアスタキサン

チンの濃度を最高5mg／プレートとし5段階の濃度について検討した。

【0037】まず、アスタキサンチンのDMSO溶液を滅菌小試験管に分注し（アスタキサンチン単独の試料は100μl、それ以外は50μl）、アスタキサンチン単独以外の試料にはMMCを最終量が0.5μl／プレートになるように50μl加えた。次いでそれぞれにリン酸緩衝液（pH7.4）を0.5ml、前培養した菌懸濁液を0.1ml加えた。これらを振とう培養恒温槽を用い、37℃で20分間振とうしながらプレインキュベートし、軟寒天を2.5ml加え、泡が生じないように混合後、最少グルコース寒天培地に注ぎ一様にプレート上に広げた。これを37℃で2日間インキュベートした後、プレート上でテスト菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡を用いて調べ、復帰突然異変により生じたコロニー数（図3）を数えた。

【0038】その結果、アスタキサンチン自体には突然変異原性は全く認められなかった。一方、陽性対照であるMMCに対する抗変異原性は、最高濃度5mg／プレートのとき変異原性を34.5%抑制し、その効果が確認された。

【0039】

【製剤例1】　乳化状製剤

油相部	（重量%）
アスタキサンチン	0.1
ナタネ油	39.9
コハク酸グリセリド	2.0
水相部	
L-アスコルビン酸	2.0
没食子酸	1.0
ケルセチン	1.0
ローカストビーンガム	0.1
水	53.9

ローカストビーンガムを溶解させた水を65℃に加熱してから没食子酸とL-アスコルビン酸とケルセチンを混合し、予め65℃で混合、溶解しておいた油相部を混合、撹拌後ホモジナイザーを通し、均質化し10℃まで冷却して上記配合の乳化状製剤を得た。この乳化状製剤は、1回あたり約1～20ml飲用する。

【0040】

【製剤例2】　乳化状製剤

油相部	（重量%）
アスタキサンチン	0.1
ナタネ油	38.9
クエン酸モノグリセリド	2.0
水相部	
L-アスコルビン酸	2.0
没食子酸	1.0
ヘスペリジン	1.0
ローカストビーンガム	0.05
水	54.95

ローカストビーンガムを溶解させた水を65℃に加熱してから没食子酸とL-アスコルビン酸とヘスペリジンを混合し、予め65℃で混合、溶解しておいた油相部を混合、撹拌後ホモジナイザーを通し、均質化し10℃まで冷却して上記配合の乳化状製剤を得た。この乳化状製剤は、1回あたり約1～20ml飲用する。

【0041】

【製剤例3】　錠剤

	（重量%）
アスタキサンチン	5
乳　糖	80
重質酸化マグネシウム	15

を均一に混合し、1粒180mgの錠剤とした。

【0042】

【製剤例4】　散剤及び顆粒剤

	（重量%）
アスタキサンチン	45
乳　糖	40
デンプン	15

を均一に混合し、散剤又は顆粒剤とした。

【0043】

【製剤例5】　カプセル剤

ゼラチン	70.0%
グリセリン	22.9%
パラオキシ安息香酸メチル	0.15%
パラオキシ安息香酸プロピル	0.51%
水	適量
計	100%

上記成分からなるソフトカプセル剤皮の中に、オキアミ抽出油脂（ASTAX1700，アスタキサンチンジエステル1.7%含有）を常法により充填し、1粒180mgのソフトカプセルを得た。

【0044】

【製剤例6】　ドリンク剤

呈味：DL－酒石酸ナトリウム	1g
コハク酸	0.09g
甘味：液糖	8Kg
酸味：クエン酸	120g
ビタミン：ビタミンC	100g
アスタキサンチンエチルエステル	10g

ビタミンE	300g
シクロデキストリン	50g
香料	150ml
塩化カリウム	10g
硫酸マグネシウム	5g

上記の成分を配合し、水を加えて100リットルとした。このドリンク剤は、1回あたり約100mlを飲用する。

【0045】

【製剤例7】　滋養強壮強精剤

呈味：DL－酒石酸ナトリウム	1g
コハク酸	0.09g
甘味：液糖	8Kg
酸味：クエン酸	120g
ビタミン：ビタミンC	100g
ビタミンB1	20g
ビタミンB2	20g
ビタミンB6	20g
ビタミンB12	20g
葉酸	10g
ニコチン酸	20g
ビタミンE	300g
シクロデキストリン	50g
アスタキサンチン	10g
香料	150ml
塩化カリウム	10g
硫酸マグネシウム	5g

上記の成分を配合し、水を加えて100リットルとした。この滋養強壮強精剤は、1回あたり約100mlを飲用する。

【0046】

【発明の効果】本発明の飲食物および医薬に含まれるアスタキサンチン及び／又はそのエステルは、実施例で述べたようにヒト血清LDLの酸化を低濃度で押さえ、かつヒト介入試験においても効果が認められる。とくに、このような効果を基礎とする本発明の医薬は、動脈硬化症、虚血性心疾患又は虚血性脳障害などの予防、防止剤としては従来のものと比較して作用メカニズムが異なる。しかも、アスタキサンチンは元来天然に存在する物質であり食経験もあることから、低毒性で安全性も高いことが容易に考えられ、飲食物及び医薬品としての意義も大きく、新たな食品、機能性食品及び医薬品の素材としての応用が期待できる。

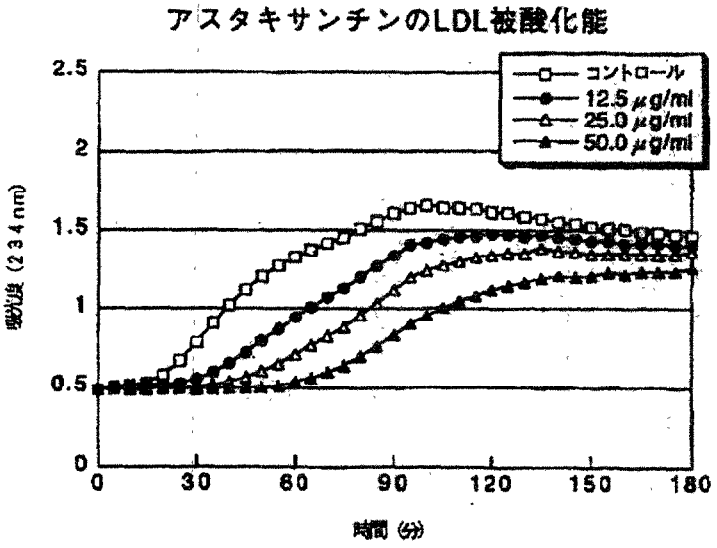
【図面の簡単な説明】

【図1】　図1はアスタキサンチンのLDL被酸化能（ in vitro ）を示したグラフである。

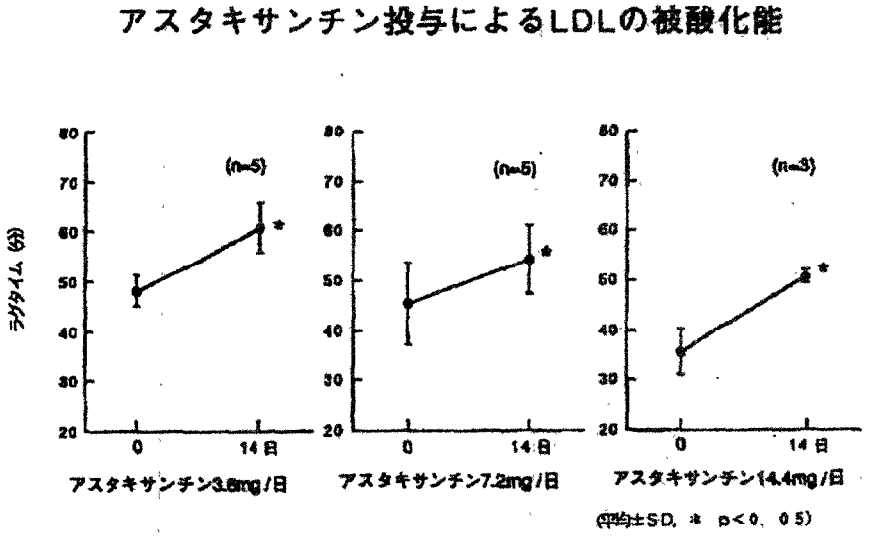
【図2】　図2はアスタキサンチン投与によるLDL被酸化能（ in vivo）を示したグラフである。

【図3】　図3はサルモネラ菌を用いた変異原性テストにおいて、アスタキサンチンが変異原性を示さず、むしろマイトマイシンCによって誘起される変異原性を抑制する様子を示したグラフである。

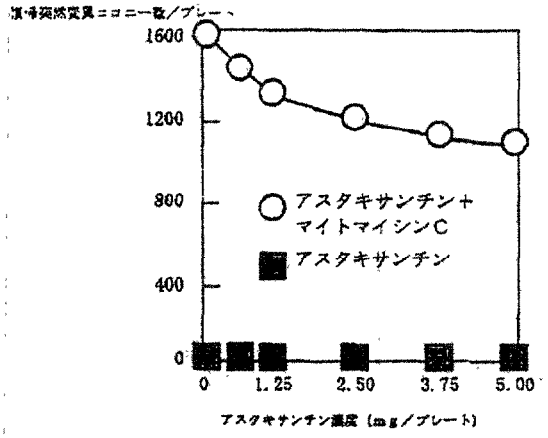
【図1】


アスタキサンチンのLDL被酸化能
コントロール
12.5 μg/ml
25.0 μg/ml
50.0 μg/ml
吸光度（234 nm）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
30
60
90
120
150
180
時間（分）

【図2】


アスタキサンチン投与によるLDLの被酸化能
ラグタイム（分）
80
70
60
50
40
30
20
(n=5)
(n=5)
(n=3)
0
14日
アスタキサンチン3.6mg/日
アスタキサンチン7.2mg/日
アスタキサンチン14.4mg/日
(平均±SD, * p<0.05)

【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶		識別記号	FI		
A61K	31/215	ABX	A61K	35/56	
	35/56			35/74	D
	35/74		C07C	403/02	
C07C	403/02		A23L	2/00	F

(72)発明者　近藤　和雄
東京都文京区湯島4－9－16

(72)発明者　板倉　弘重
東京都練馬区早宮2－6－36