

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6190844号
(P6190844)

(45) 発行日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(24) 登録日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 8 B 37/00	(2006.01)	C 0 8 B	37/00 C
C 1 3 K 13/00	(2006.01)	C 1 3 K	13/00
C 1 2 P 19/04	(2006.01)	C 1 2 P	19/04 Z

請求項の数 6 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2015-79526 (P2015-79526)	(73) 特許権者	506141225 株式会社ユーグレナ 東京都港区芝五丁目33番1号
(22) 出願日	平成27年4月8日(2015.4.8)	(74) 代理人	100088580 弁理士 秋山 敦
(65) 公開番号	特開2016-199650 (P2016-199650A)	(74) 代理人	100111109 弁理士 城田 百合子
(43) 公開日	平成28年12月1日(2016.12.1)	(72) 発明者	岩田 修 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユーグレナ内
審査請求日	平成29年3月27日(2017.3.27)	(72) 発明者	中島 綾香 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユーグレナ内
早期審査対象出願			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膨潤パラミロン及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

パラミロンに水性の溶媒を加えた流体を、超高压で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる衝突工程を行うことにより、前記パラミロンが前記水性の溶媒と一体化して膨潤した粘性の膨潤パラミロンを製造することを特徴とする膨潤パラミロンの製造方法。

【請求項2】

前記衝突工程を、複数回繰り返すことを特徴とする請求項1記載の膨潤パラミロンの製造方法。

【請求項3】

前記衝突工程では、前記流体を、一定の形状を備えた物体に、該物体の面に対して角度を持って衝突させることを特徴とする請求項1記載の膨潤パラミロンの製造方法。

【請求項4】

前記衝突工程では、前記流体を第一の噴流として噴出させ、該第一の噴流を、前記パラミロンに水性の溶媒を加えた流体を他の細孔ノズルから超高压で噴出させた第二の噴流に、角度を持って衝突させることを特徴とする請求項1記載の膨潤パラミロンの製造方法。

【請求項5】

前記膨潤パラミロンは、
レーザ回折/散乱式粒度分布測定装置で粒度を測定したときのメジアン径が、前記パラミロンの5倍以上であって、
光学電子顕微鏡により、粒子が、隣接する粒子と付着していることが観察され、

10

20

前記パラミロンに対して4倍以上の水と結合して膨潤していることを特徴とする請求項1記載の膨潤パラミロンの製造方法。

【請求項6】

レーザ回折/散乱式粒度分布測定装置で粒度を測定したときのメジアン径が、パラミロンの5倍以上であって、

光学電子顕微鏡により、粒子が、隣接する粒子と付着していることが観察され、

前記パラミロンに対して4倍以上の水と結合して膨潤していることを特徴とする膨潤パラミロン(ただし、アモルファスパラミロンを除く)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、パラミロンを加工した新規な膨潤パラミロン及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

-グルカンは、-グルコースが(1-3)、(1-4)および(1-6)の結合で連なった一群の多糖類であり、植物や菌類、細菌、藻類など自然界に広く分布する。-グルカンの機能、作用は、その由来生物によって大きく異なるが、例えば、アガリクスやメシマコブ、霊芝などのキノコ由来の-グルカンは強い免疫賦活作用、制癌作用を持つ機能性物質として広く利用されている。キノコ以外の由来の-グルカンについても、生体に対する機能性を有することが期待できる。

20

-グルカンには、水に可溶性のものと不溶性、難溶性のものがあり、不溶性、難溶性の-グルカンは、生体内で吸収されにくいいため、生体内での機能については、未知のものが多い。

例えば、ユーグレナから抽出されたパラミロンは、種々の機能、作用を備えた有用物質として期待されている。パラミロンは、水に不溶であることによって、用途及び用法の制約を受け、加工して水溶性パラミロンとすることにより、免疫賦活用活性物質や抗ガン性組成物として構成されている(例えば特許文献1及び2)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

30

【特許文献1】特許第3156135号公報

【特許文献2】特許第2604196号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

特許文献1及び2の水溶性パラミロンでも、免疫賦活用活性物質や抗ガン性組成物としての効果は確認されているが、更に強い効果が望まれている。また、水に不溶の-グルカンには、免疫賦活用活性物質や抗ガン性組成物としての機能以外の機能があることが期待されており、特許文献1及び2のような化学的処理とは異なる加工を施すことにより、従来生体に対する機能が知られていなかった-グルカンが、新しい機能を発現する可能性もある。

40

【0005】

本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、新しい機能性を発揮し得る新規な膨潤パラミロン及びその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

流体を、超高压で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる装置は、分散・破碎・微粒化・乳化・表面改質等のために一般的に用いられている。本発明者らは、パラミロンが微粒化されることを期待して、パラミロンを、このような装置で処理したところ、驚くべきことに、パラミロンは微粒化されず、パラミロンが溶媒の水と一体化して膨潤して

50

、粘性を帯びることを見出して、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、前記課題は、本発明の膨潤パラミロンの製造方法によれば、パラミロンに水性の溶媒を加えた流体を、超高压で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる衝突工程を行うことにより、前記パラミロンが前記水性の溶媒と一体化して膨潤した粘性の膨潤パラミロンを製造することにより解決される。

衝突工程を、複数回繰り返してもよい。

衝突工程では、前記流体を、一定の形状を備えた物体に、該物体の面に対して角度を持って衝突させてもよい。

また、衝突工程では、前記流体を第一の噴流として噴出させ、該第一の噴流を、前記パラミロンに水性の溶媒を加えた流体を他の細孔ノズルから超高压で噴出させた第二の噴流に、角度を持って衝突させてもよい。

10

【0008】

本発明によれば、水不溶性又は難溶性のパラミロンであっても、簡単な処理で水との親和性を付与することができる。生体における機能性を潜在的に有しながら、水に不溶又は難溶であるためにその機能性を発揮できなかつたパラミロンであっても、生体における機能性を獲得可能となる。その結果、従来知られていなかった新規な機能性パラミロン、又は、公知のパラミロンの新規な機能の発見への途を開くことができる。

また、衝突工程という物理的方法を用いるため、従来の様に化学的反應を用いることなく、水不溶性のパラミロンを、水との親和性の高い膨潤パラミロンにすることが可能となる。従って、本発明では、人工的に官能基を付加する化学反応とは異なり、衝突工程で用いる水性の溶媒のみがパラミロンに付加されるに過ぎないため、ヒトに経口、経皮で投与等される素材に向いており、ヒト向けの医薬品、機能性食品の素材としての用途が広がる。

20

【0009】

また、前記課題は、本発明の膨潤パラミロンによれば、レーザ回折/散乱式粒度分布測定装置で粒度を測定したときのメジアン径が、パラミロンの5倍以上であって、光学電子顕微鏡により、粒子が、隣接する粒子と付着していることが観察され、前記パラミロンに対して4倍以上の水と結合して膨潤していることを特徴とする膨潤パラミロン(ただし、アモルファスパラミロンを除く)により解決される。

30

【0010】

本発明の膨潤パラミロンは、このように、水との親和性が高いため、医薬品素材、食品素材のほか、工業的素材としても加工性、作業性が高く、種々の素材として利用可能である。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、水不溶性又は難溶性のパラミロンであっても、簡単な処理で水との親和性を付与することができる。生体における機能性を潜在的に有しながら、水に不溶又は難溶であるためにその機能性を発揮できなかつたパラミロンであっても、生体における機能性を獲得可能となる。その結果、従来知られていなかった新規な機能性パラミロンの新規な機能の発見への途を開くことができる。

40

また、衝突工程という物理的方法を用いるため、従来の様に化学的反應を用いることなく、水不溶性のパラミロンを、水との親和性の高い膨潤パラミロンにすることが可能となる。従って、本発明では、人工的に官能基を付加する化学反応とは異なり、衝突工程で用いる水性の溶媒のみがパラミロンに付加されるに過ぎないため、ヒトに経口、経皮で投与等される素材に向いており、ヒト向けの医薬品、機能性食品の素材としての用途が広がる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明の一実施形態に係る加工パラミロンの製造装置の概略構成図である。

50

【図 2】本発明の他の実施形態に係る加工パラミロンの製造装置の概略構成図である。

【図 3】本発明の実施例 1 に係る加工パラミロンの静置観察における静置後の写真である。

【図 4】本発明の対比例 1 に係る加工アモルファスパラミロンの静置観察における静置後の写真である。

【図 5】本発明の実施例 1 に係る加工パラミロンの光学電子顕微鏡写真である。

【図 6】本発明の実施例 1 に係る加工パラミロン（超音波分散時間 0 分）の粒度分布を示すグラフである。

【図 7】本発明の実施例 1 に係る加工パラミロン（超音波分散時間 1 分）の粒度分布を示すグラフである。

【図 8】本発明の実施例 2 に係る加工パラミロンの関節炎スコアの測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明の膨潤パラミロンの一実施形態に係る加工 - グルカン及びその製造方法について、図 1 ~ 図 8 を参照しながら説明する。

本発明は、 - グルカンに水性の溶媒を加えた流体を、超高压で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させることにより製造される加工 - グルカン及びその製造方法に関する。

< - グルカン >

本明細書において、 - グルカンとは、 - グルコースが (1 3) , (1 4) および (1 6) の結合で連なった多糖類の一群をいい、セルロース、ラミナラン、リケナン、穀類の - グルカン、カロース、ザイモザン等の酵母細胞壁由来の - グルカン、クレスチン、レンチナン、ジゾフィラン、グリフォラン、パキマン、マンネンタケ・アガリクス・ヤマブシタケ・カバノアナタケ・カワリハラタケ・メシマコブ由来の - グルカン等のキノコ由来の - グルカン、カードラン、ユーグレナ由来のパラミロン等を含む。

これらの - グルカンのうち、水不溶性又は水難溶性の - グルカンが、本実施形態の加工 - グルカン及びその製造方法の素材として特に適している。

これらの - グルカンのうち、パラミロン(paramylon)とは、ユーグレナが含有する貯蔵多糖であり、ユーグレナ由来のものをいう。

【0014】

<ユーグレナ>

本明細書において、「ユーグレナ」とは、動物学や植物学の分類でユーグレナ属 (Euglena) に分類される微生物、その変種、その変異種のすべてを含む。

ここで、ユーグレナ属 (Euglena) の微生物とは、動物学では原生動物門 (Protozoa) の鞭毛虫綱 (Mastigophorea) 、植物鞭毛虫亜綱 (Phytomastigophorea) に属するミドリムシ目 (Euglenida) のユーグレノイディナ亜目 (Euglenoidina) に属する微生物である。一方、ユーグレナ属の微生物は、植物学ではミドリムシ植物門 (Euglenophyta) のミドリムシ藻類綱 (Euglenophyceae) に属するミドリムシ目 (Euglenales) に属している。

【0015】

ユーグレナ属の微生物としては、具体的には、Euglena acus、Euglena caudata、Euglena chadefaudii、Euglena deses、Euglena gracilis、Euglena granulata、Euglena intermedia、Euglena mutabilis、Euglena oxyuris、Euglena proxima、Euglena spirogyra、Euglena viridis、Euglena vermiformis、Euglena intermedia、Euglena pirideなどが挙げられる。

ユーグレナ細胞としては、ユーグレナ・グラシリス (E. gracilis) , 特に、ユーグレナ・グラシリス (E. gracilis) Z 株を用いることができるが、そのほか、ユーグレナ・グラシリス・クレプス、ユーグレナ・グラシリス・バルバチラス等の種や、ユーグレナ・グラシリス (E. gracilis) Z 株の変異株 S M - Z K 株 (葉緑体欠損株) や変種の var. bacillaris、これらの種の葉緑体の変異株等の遺伝子変異株由来の - 1 , 3 - グルカナー

10

20

30

40

50

ぜ、*Euglena intermedia*, *Euglena piride*、及びその他のユーグレナ類、例えば *Astasia longae* であってもよい。

【0016】

ユーグレナ属は、池や沼などの淡水中に広く分布しており、これらから分離して使用してもよく、また、すでに単離されている任意のユーグレナ属を使用してもよい。

本発明のユーグレナ属は、その全ての変異株を包含する。また、これらの変異株の中には、遺伝的方法、たとえば組換え、形質導入、形質転換等により得られたものも含有される。

【0017】

ユーグレナ細胞の培養において、培養液としては、例えば、窒素源、リン源、ミネラルなどの栄養塩類を添加した培養液、例えば、改変Cramer-Myers培地 ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.8 mg/L, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, チアミン塩酸塩(ビタミン B_1) 0.1 mg/L, シアノコバラミン(ビタミン B_{12})、(pH 3.5))を用いることができる。なお、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ や NH_3aq に変換することも可能である。また、そのほか、ユーグレナ 生理と生化学(北岡正三郎編、株式会社学会出版センター)の記載に基づき調製される公知のHutner培地、Koren-Hutner培地を用いてもよい。

10

20

【0018】

培養液のpHは好ましくは2以上、また、その上限は、好ましくは6以下、より好ましくは4.5以下である。pHを酸性側にするにより、光合成微生物は他の微生物よりも優勢に生育することができるため、コンタミネーションを抑制することができる。

ユーグレナ細胞の培養は、太陽光を直接利用するオープンポンド方式、集光装置で集光した太陽光を光ファイバー等で送り、培養槽で照射させ光合成に利用する集光方式等により行ってもよい。

また、ユーグレナ細胞の培養は、例えば供給バッチ法を用いて行われ得るが、フラスコ培養や発酵槽を用いた培養、回分培養法、半回分培養法(流加培養法)、連続培養法(灌流培養法)等、いずれの液体培養法により行ってもよい。

30

【0019】

培養は、オープンポンド型、レースウェイ型、チューブ型等の公知の培養装置や、坂口フラスコ、三角フラスコ、試薬ビンなどの実験用の培養容器を用いて行うことができる。ユーグレナは CO_2 を資化するため、独立栄養培地であるCramer-Myers培地を用いて培養する場合は1~5% CO_2 を含む空気を培地中に通過させることが好ましい。また、さらに、葉緑体を十分に発達させるために、培地1リットルあたり1~5g程度のリン酸アンモニウムを加えるとよい。培養温度は、通常20~34で、特に28~30が好適である。また、培養条件にもよるが、ユーグレナは通常、培養開始後2~3日で対数増殖期となり、4~5日程度で定常期に到達する。

40

ユーグレナは、光照射下で培養(明培養)されてもよく、無照射で培養(暗培養)されてもよい。

ユーグレナ細胞の分離は、例えば、培養液の遠心分離または単純な沈降によって行われ得る。

【0020】

<パラミロン>

本明細書において、パラミロン(paramylon)とは、約700個のグルコースが、 α -1,3-結合により重合した高分子体であり、ユーグレナが含有する貯蔵多糖である。

パラミロンは、ユーグレナを、グルコースを主体とした培地上で培養することにより、その細胞内に蓄積させることができる。ユーグレナ細胞中のパラミロンは、細胞内では直

50

径数 μm 程度の大きさの粒子状の形態をとり、細胞を破砕することにより簡単に取り出すことができると共に、アルコールやトルエン処理により精製することができる。

パラミロン(Paramylon)は、約700個のグルコースが α -1,3-結合により重合した高分子体 (α -1,3-グルカン)であり、ユーグレナ属が含有する貯蔵多糖である。パラミロン粒子は、扁平な回転楕円体粒子であり、 α -1,3-グルカン鎖がらせん状に絡まりあって形成されている。

【0021】

パラミロンは、すべての種、変種のユーグレナ細胞内に顆粒として存在し、その個数、形状、粒子の均一性は、種により特徴がある。

パラミロンは、グルコースのみからなり、*E. gracilis* Zの野生株と葉緑体欠損株SM-ZKから得られたパラミロンの平均重合度は、グルコース単位で約700である。

パラミロンは、水、熱水には不溶性であるが、希アルカリ、濃い酸、ジメチルスルホキシド、ホルムアルデヒド、ギ酸に溶ける。

パラミロンの平均密度は、*E. gracilis* Zでは、1.53、*E. gracilis* var. *bacillaris* SM-L1では、1.63である。

【0022】

パラミロンは、粉末図形法を用いたX線解析によれば、3本の直鎖状 α -グルカンが右巻きの縄のように捻じれあったゆるやかならせん構造をとっている。このグルカン分子がいくつか集まってパラミロン顆粒を形成する。パラミロン顆粒は、結晶構造部分が非常に多く約90%を占め、多糖類の中で最も結晶構造率の高い化合物である。また、パラミロンは、水を含みにくい(ユーグレナ 生理と生化学(北岡正三郎編、株式会社学会出版センター))。

なお、パラミロン(株式会社ユーグレナ製)の粒度分布は、レーザ回折/散乱式粒度分布測定装置で測定したときのメジアン径が、1.5~2.5 μm である。

【0023】

パラミロン粒子は、培養されたユーグレナ属から任意の適切な方法で単離および微粒子状に精製され、通常粉末体として提供されている。

例えば、パラミロン粒子は、(1)任意の適切な培地中でのユーグレナ細胞の培養；(2)当該培地からのユーグレナ細胞の分離；(3)分離されたユーグレナ細胞からのパラミロンの単離；(4)単離されたパラミロンの精製；および必要に応じて(5)冷却およびその後の凍結乾燥により得ることができる。

パラミロンの単離は、例えば、大部分が生物分解される種類の非イオン性または陰イオン性の界面活性剤を用いて行われ得る。パラミロンの精製は、実質的には単離と同時に進行され得る。

【0024】

なお、ユーグレナからのパラミロンの単離および精製は周知であり、例えば、*E. Ziegler*, "Die natürlichen und künstlichen Aromen" Heidelberg, Germany, 1982, Chapter 4.3 "Gefriertrocken", DE 43 28 329、または特表2003-529538号公報に記載されている。

【0025】

<加工 α -グルカンの製造方法>

本実施形態の加工 α -グルカンは、 α -グルカンに水を加えて得た流体を、超高压で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる処理により、得ることができる。

以下、本実施形態の加工 α -グルカンの製造装置及び製造方法について説明する。

本実施形態の加工 α -グルカンの製造装置Sの概略を、図1に示す。

加工 α -グルカンの製造装置Sは、供給される高压の流体に耐える圧力容器本体1と、圧力容器本体1内に高压流体を吐出させるヘッド部2と、ヘッド部2に高压流体を供給する不図示の原料タンク及び高压ポンプと、ヘッド部2から圧力容器本体1へ吐出された高压流体が衝突する被衝突体3と、を主要構成要素とする。

【0026】

10

20

30

40

50

ヘッド部 2 は、被衝突体 3 と対向する先端に、硬質で細径の細孔ノズルとしてのノズル 2 1 と、ノズル 2 1 へ連通する管状の流路 2 2 を備えている。

本実施形態の被衝突体 3 は、焼結ダイヤモンド、ダイヤモンド単結晶、サファイア、タングステンカーバイドや、その他のセラミック等の硬質部材からなり、図 1 に示すような球形や、円錐形のほか、板体からなってもよい。

ノズル 2 1 が、ノズル 2 1 の吐出方向において対向する被衝突体 3 の面は、ヘッド部 2 の吐出方向に対して垂直又は傾斜し、表面が滑面又は粗面に形成されていてもよい。

【 0 0 2 7 】

また、被衝突体 3 の代わりに、図 2 に示すように、ヘッド部 2 と同じ構成のヘッド部 2 ' を、相互のノズル 2 1 , 2 1 ' が対向するように配置し、相互のノズル 2 1 , 2 1 ' からそれぞれ噴出する一対の噴流同士を衝突させてもよい。一対の噴流が、請求項の第一、第二の噴流に該当する。

このとき、ノズル 2 1 , 2 1 ' の吐出方向 d , d' が、一直線上にのるように配置してもよいし、吐出方向 d , d' が、相互に角度を有するように配置してもよい。

吐出方向 d , d' が、一直線上に載るように配置した場合、ノズル 2 1 , 2 1 ' からそれぞれ吐出される流体は、正面衝突することとなり、吐出方向 d , d' が、相互に角度を有するように配置した場合、ノズル 2 1 , 2 1 ' からそれぞれ吐出される流体は、正面衝突することとなる。

【 0 0 2 8 】

次いで、加工 - グルカンの製造装置 S を用いた加工 - グルカンの製造方法について説明する。

まず、結晶 - グルカン粉末に、 - グルカン濃度が 1 ~ 1 0 w t % となるように水を加えて攪拌し、スラリー化した - グルカンスラリーを得て、不図示の原料タンクに供給する。

次いで、図 1 又は図 2 の加工 - グルカンの製造装置 S の回路内をイオン交換水に置換し、加圧してヘッド部 2 に供給する。その後、ヘッド部 2 への供給を、原料タンクの - グルカンスラリーに切り替え、ヘッド部 2 の所定圧力、例えば、1 0 0 ~ 3 0 0 M P a で、ノズル 2 1 又は、ノズル 2 1 , 2 1 ' から圧力容器本体 1 へ吐出させる。

これにより、図 1 の装置では、ノズル 2 1 から噴出した - グルカンスラリー噴流が被衝突体 3 に衝突し、また、図 2 の装置では、ノズル 2 1 , 2 1 ' からそれぞれ噴出した - グルカンスラリー噴流同士が衝突して、流出路 4 から回収される。流出路 4 から回収されたスラリー処理物は、自然冷却される。

この一連の過程を 1 パスとして、求められる物性に応じた回数、例えば、1 ~ 2 5 パスを繰り返すことにより、加工 - グルカンが調製される。以上で、加工 - グルカンの製造方法が完了する。

【 0 0 2 9 】

<加工 - グルカン>

本実施の形態に係る加工 - グルカンは、レーザ回折 / 散乱式粒度分布測定装置で粒度を測定したときのメジアン径が、原料の結晶 - グルカン粉末の 5 倍以上である。

また、加工 - グルカン粒子は、隣接する粒子と付着し、 - グルカンに対して 4 倍以上の水と結合して膨潤している。原料 - グルカンと水を混合したスラリーは、さらさらした流体であるが、加工 - グルカンは、粘度が増加して粘性を有し、触ったときに手に付着するような粘性性と、もちもちした弾力性を有し、糊のような触感を備えている。

加工 - グルカンは、乳化物に類似した物性を備えている。

【実施例】

【 0 0 3 0 】

以下、実施例により、本発明をより具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例に限定されるものではない。以下の実施例は、 - グルカンの一例であるパラミロンを用いた例であるが、本発明は、他の - グルカンにも適用可能であることは当然である。

(実験例 1)

10

20

30

40

50

本実験例では、結晶性のパラミロン粉末、アモルファスパラミロンを、上記実施形態の加工パラミロンの製造方法に沿って処理することにより、実施例1の加工パラミロン及び対比例1の加工アモルファスパラミロンを作製し、物性の確認を行った。

【0031】

まず、結晶性のパラミロン粉末（株式会社ユーグレナ製）に、パラミロン濃度が3wt%になるよう、水を加え、パラミロンスラリーを得た。

湿式微粒化装置（スターバーストミニ，2.2KW，株式会社スギノマシン製，ボール衝突チャンバ-）の装置回路内をイオン交換水に置換した。

本実験例で用いた湿式微粒化装置は、超高压に加圧した原料を、細孔ノズルから噴出させて被衝突物としてのセラミックボールに衝突させることにより、分散・粉碎・乳化・表面改質等を行う装置である。

装置のノズルを加圧して、パラミロンスラリーを回路内に供給し、初期吐出液を、回路内デッドボリュームとして廃棄した。その後、パラミロンスラリーの噴流を被衝突体としてのセラミックボールに衝突させ、流出路からスラリー処理物を回収して、1パスとした。このときの処理圧力は、245MPa，スラリー処理量は、240mL，ノズル径は、0.1mmとした。

この処理を20回繰り返して20パスの処理を行い、0，1，3，5，10パス処理後の処理物（実施例1）をそれぞれ16mLと、20パス処理後の処理物（実施例1）を32mLサンプリングして、静置観察及び光学電子顕微鏡観察、粒度分布の測定を行った。

【0032】

また、アモルファスパラミロン（株式会社ユーグレナ製）についても、アモルファスパラミロン濃度が1wt%になるように、1規定の水酸化ナトリウムを加え、アモルファスパラミロン水溶液を得たことを除いては、同様の処理を行い、0，1，3，5，10，20パス処理後の処理物（対比例1）をそれぞれ16mLサンプリングして、静置観察、粒度分布の測定を行った。

【0033】

静置観察

定量サンプリングした実施例1，対比例1の処理物（0，1，3，5，10，20パス）を、容器に入れて1週間静置した後、観察した。

実施例1の各パスの静置後の写真を、図3に示す。実施例1では、0，1，3パスのものは、パラミロン処理物と水とが分離して、パラミロン処理物が水中で沈殿したが、5，10，20パスのものは、パラミロン処理物と分離する水は観察されず、白色の処理物のみが観察された。

また、0パスの未処理のものは、サンプリング後1日の静置で沈殿したが、パス数が増えるに従い、湿式微粒化装置による処理の影響により、沈殿する傾向が見られなくなった。図3に示すように、1，3パスでは、若干沈殿したが、5パス以上では、沈殿しなかった。

サンプリング後1週間後に静置観察をした後、サンプリング後1か月が経過するまで、各サンプルを静置して放置したところ、1週間後の静置時点での状態と、変化がなかった。

対比例1の各パスの静置後の写真を、図4に示す。対比例1の各サンプルはすべて水に溶解しており、透明な液体であった。未処理のもの（0パス）は、無色透明であったが、パス数の増加に伴い黄色に着色していた。

【0034】

顕微鏡観察

光学電子顕微鏡の観察は、実施例1，対比例1について行ったが、対比例1では観察できなかった。

実施例1の光学電子顕微鏡の写真を、図5に示す。

実施例1の未処理のもの（0パス）は、独立した粒子状であった。各粒子は、表面が滑らかで、豆形を扁平にしたような形状からなっていた。各粒子の形状は、粒子間で差異が

10

20

30

40

50

なく、ほぼ均一な形状であった。また、各粒子は、相互に付着せず、独立していた。

1パスから3パスにパス数が増えるに従い、各粒子の表面には、突起や、突起で他の粒子と付着している様子が観察された。また、5パスでは、隣接する粒子同士で付着、連結している箇所が多く見られた。隣接する粒子同士での付着、連結は、5パスから20パスにパス数が増えるに従い、増加して、20パスでは、単独で孤立して存在している粒子が殆ど見られなくなった。また、1パス～20パスのいずれにおいても、パラミロン粒子の径が、未処理のパラミロン粒子よりも細粒化しているものは観察されず、パラミロン粒子の微細化は起こらなかった。

【0035】

水不溶物と水を混合した流体を、超高圧で細孔ノズルから高圧で噴出させて被衝突物に衝突させる処理は、通常、固体の粉碎、分散や、水と油の乳化、エマルジョンの微細化等に用いられているが、パラミロンにこの処理を施した場合には、驚くべきことに、微粒化や粉碎は起こらず、かえって、パラミロン粒子同士の付着、連結が起こっていた。

【0036】

粒度分布の測定

サンプリングした実施例1，対比例1の処理物（0，1，3，5，10，20パス）を、レーザ回折/散乱式粒度分布測定装置（堀場製作所，LA-960）にて、粒度分布を測定した。

実施例1の粒度分布の測定結果を、表1及び図6に示す。

【0037】

【表1】

	未処理: 0パス	1パス	3パス	5パス	10パス	20パス
メジアン径[μm] 超音波分散時間0分	1.93882	7.07754	12.53837	20.10480	22.71332	20.75758
メジアン径[μm] 超音波分散時間1分	1.53585	1.82104	1.50525	1.44620	1.37451	1.32802

但し、測定セル：ミニフロ，測定溶媒：イオン交換水，溶媒屈折率：1.33
溶質屈折率が不明のため、乳化物の屈折率1.4を使用した。

【0038】

図6に、超音波分散時間0分の場合の実施例1の各サンプルの粒度分布を示す。

未処理（0パス）では、2.599 μm にピーク（頻度7.554%）が一つ見られたが、1パスでは、3.010 μm （頻度3.010%）と11.565 μm （頻度6.743%）、3パスでは、0.877 μm （頻度2.131%）、19.904 μm （頻度6.574%）に、それぞれ二つのピークが検出された。

また、5パス以上になると、再びピークは一つになって、5パスでは、22.797 μm （頻度10.861%）、10パスでは、26.111 μm （頻度10.352%）、20パスでは、22.797 μm （頻度10.348%）であった。

このように、メジアン径及びピーク径共に、10パス，30パスの処理物は、未処理物の10倍程度になっていた。

【0039】

図7に、超音波分散時間1分の場合の実施例1の各サンプルの粒度分布を示す。

未処理（0パス）では、0.259 μm （頻度1.603%）と1.981 μm （頻度8.967%）、1パスでは、0.296 μm （頻度1.212%）と2.599 μm （頻度7.620%）のそれぞれ二つのピーク、3パスでは、1.981 μm （頻度5.856%）、5パスでは、1.981 μm （頻度5.763%）のそれぞれ一つのピーク、10パスでは、0.197 μm （頻度3.209%）と1.981 μm （頻度9.325%）、20パスでは、0.296 μm （頻度2.005%）と1.729 μm （頻度7.455%）のそれぞれ二つのピークが検出された。

このように、メジアン径及びピーク径共に、未処理（0パス）から30パスの処理物まで、粒子径に殆ど差がなかった。

超音波分散前の1～20パスの処理物のメジアン径が、7～23 μmまで大きくなっていたのに対し、その後1～20パスの処理物に超音波分散処理を1分施したものでは、メジアン径が1.3～1.9 μmまで小さくなっており、未処理の超音波分散前のものよりもメジアン径が小さくなっていった。

従って、本実験例より、実施例1の1～20パスの処理物は、パラミロンの構造自体が変化してパラミロン同士が化学結合等しているのではなく、個々のパラミロン粒子が、超音波分散によって分離される程度の弱い力で、凝集している又は表面同士が付着していることが分かった。

【0040】

実験例1の考察

パラミロン処理物は、パス回数が高くなるのに伴い、粘性が高くなっていった。

静置観察では、5パス以上のパス数のパラミロン処理物が、水中で沈殿せず、パラミロン処理物の単相からなっていた。パラミロンに水が結合し、パラミロンが水分子中に分散していることが観察された。

また、光学電子顕微鏡による観察では、パラミロン粒子の大きさ自体は、パス数が増加しても大きな変化はないが、パラミロン粒子表面が滑面から粗面に変化し、パラミロン粒子同士が相互に付着している様子が観察された。

粒子径の測定においては、10パス、30パスの粒子径のメジアン径及びピーク径が、未処理のもの10倍程度に大きくなっていったが、超音波分散処理を経たものでは、未処理から30パスに至るまで、メジアン径及びピーク径に大きな変化はなかった。

以上より、1パス以上のパラミロン処理物は、パラミロンに水が結合して、パラミロン粒子の表面が粘性になり、パラミロン粒子が相互に付着していた。パラミロン処理物は、粘性が向上し、糊のような状態になっていた。

1パス以上ではパラミロンを構成する糖鎖の一部が変化し、クモの巣状の構造を形成し、パラミロン粒子が相互に結合する様子が観察された。また、さらに加工処理を加える事でクモの巣状の構造は消失し、20パスでは、パラミロンの粒同士が結合した状態になった。

【0041】

(実験例2)

本実験例では、結晶性のパラミロン粉末の量を増量してスケールアップし、上記実施形態の加工パラミロンの製造方法に沿って処理することにより、実施例2の加工パラミロンを作製し、物性の確認を行った。

【0042】

まず、結晶性のパラミロン粉末(株式会社ユーグレナ製)2kgに、イオン交換水18kgを加え、パラミロン濃度が10wt%のパラミロンスラリーを得た。

湿式微粒化装置(スターバースト18KW中型機,株式会社スギノマシン製,斜向衝突チャンバ-)の装置回路内をイオン交換水に置換した。

本実験例で用いた湿式微粒化装置は、超高压に加圧した原料同士を、相互に角度を持って配置された細孔ノズルから噴出させて斜向衝突により噴流衝突させることにより、分散・粉碎・乳化・表面改質・劈開等を行う装置である。

装置のノズルを加圧して、パラミロンスラリーを回路内に供給し、初期吐出液を、回路内デッドボリュームとして廃棄した。その後、相互に角度を持って対向する一対のノズルからパラミロンスラリーの噴流をそれぞれ噴出させて、相互に衝突させる斜向衝突による噴流衝突を行った。流出路からスラリー処理物を回収して、1パスとした。このときの処理圧力は、245MPa,スラリー処理量は、240mL,ノズル径は、0.17mmとした。

この処理を40回繰り返して40パスの処理を行い、0,1,3,5,10,15,20,30,40パス処理後の処理物(実施例2)をそれぞれ50mLサンプリングして、粒度分布の測定を行った。

処理中、5パス処理後付近から原料の増粘傾向があり、原料タンクから処理用のパラミ

10

20

30

40

50

ロンスラリー原料が落ちてこなくなったため、ポンプを用いた循環処理にて処理を行った。その後7パス付近からは粘度は一定であった。

【0043】

粒度分布の測定

サンプリングした実施例2の処理物(0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40パス)を、レーザ回折/散乱式粒度分布測定装置(堀場製作所, LA-960)にて、粒度分布を測定した。

実施例2の粒度分布の測定結果を、表2に示す。

【0044】

【表2】

	未処理: 0パス	1パス	3パス	5パス	10パス
メジアン径[μm] 超音波分散時間0分	2.591	13.986	27.127	26.224	27.683
メジアン径[μm] 超音波分散時間1分	2.442	2.121	2.123	2.165	2.196

	15パス	20パス	30パス	40パス
メジアン径[μm] 超音波分散時間0分	16.624	12.231	9.477	9.550
メジアン径[μm] 超音波分散時間1分	2.285	2.257	2.266	2.748

但し、測定セル：フローセル，測定溶媒：イオン交換水，
溶質屈折率：1.400-0.000i，溶媒屈折率：1.333

【0045】

スケールアップして、噴流衝突により行った実施例2では、1パスのみでメジアン径が5倍以上に増加し、3パスでは10倍以上のメジアン径になっていた。

【0046】

(実験例3)

実施例2の加工パラミロンの機能性を確認するために、実施例2の加工パラミロンの関節リウマチに対する作用について、マウスのコラーゲン関節炎モデルを用いて評価を行った。

実験用の動物には、マウス(DBA/1J Jms Slc (SPF)，6週齢雄，日本エスエルシー株式会社)を使用した。

ニワトリII型コラーゲン(SIGMA)を0.01 M 酢酸水溶液に2mg/mLとなるように溶解し、これに等量のFreund's complete adjuvant (Difco)を加えて作製したエマルジョン(コラーゲン1 mg/mL)を、イソフルランによる吸入麻酔下で、マウスの尾根部に0.1 mL(コラーゲン量として0.1 mg)皮内投与し、コラーゲンに感作させた。また、3週間後、同様に投与を行い、ブーストとした。また、無処置動物には、感作及びブーストは行わなかった。

【0047】

マウスを、無処置動物群、対照群、加工パラミロン群に群分けした(各群n=5)。固型飼料CE-2(日本クレア株式会社)に実施例2の加工パラミロンを2%混餌し、加工パラミロン群のマウスに、ブースト5日後から毎日経口で自由摂取させた。

【0048】

コラーゲンに感作させた日(以下、「感作日」という。)より、四肢における関節炎の症状について、肉眼観察によりスコア付を行い、四肢のスコアの合計値を算出した。

スコア付は、垣本ら(新生化学実験講座12, 分子免疫学II, 東京化学同人: 360-372, 1

10

20

30

40

50

989.) のスコアに準じて、表 3 の関節炎スコアに従って、3 回/週 (月・水・金) の頻度で評価を行い、四肢のスコアの合計値を算出した。

【 0 0 4 9 】

【表 3】

関節炎スコア

スコア	症状
0	症状なし
1	指など小関節 1 本の軽度発赤腫脹
2	小関節が 2 本以上, あるいは大きな関節の発赤腫脹
3	1 肢の発赤腫脹
4	1 肢の全体が最大限に発赤腫脹

10

【 0 0 5 0 】

関節炎スコアの測定結果を図 8 に示す。

スコア測定最終日において、対照群と比較して加工パラミロン群は、有意に低値となり、加工パラミロンを継続摂取することによる関節炎症状の抑制が認められた。

20

以上より、本発明の一実施例である加工パラミロンに、関節炎症状の抑制という有用な機能があり、関節炎症状抑制剤、関節炎治療剤、関節リウマチ治療剤、関節リウマチ予防剤、関節リウマチ抑制剤として用いることができることが分かった。

【符号の説明】

【 0 0 5 1 】

d, d' 吐出方向

1 圧力容器本体

2 ヘッド部

3 被衝突体

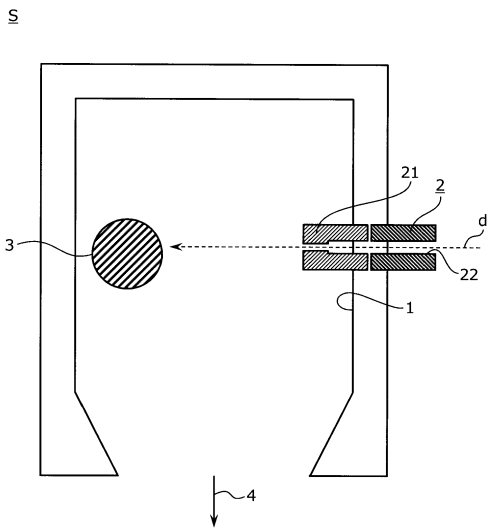
4 流出路

30

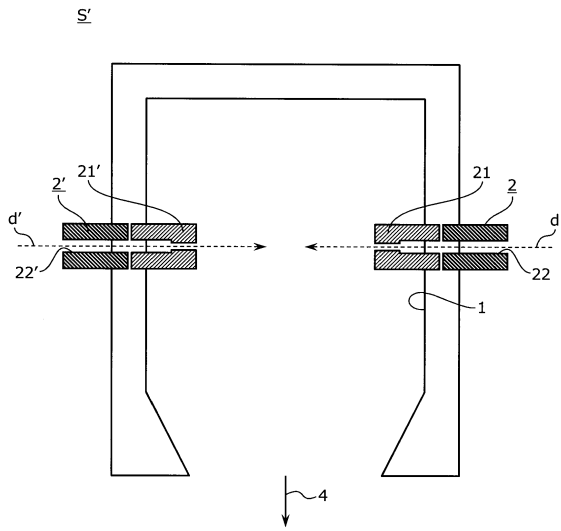
2 1, 2 1' ノズル

2 2, 2 2' 流路

【図1】



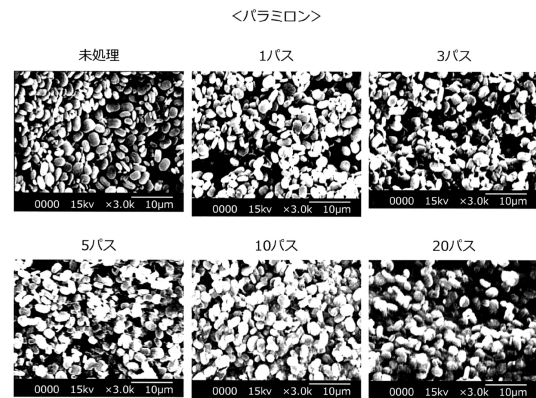
【図2】



【図3】



【図5】

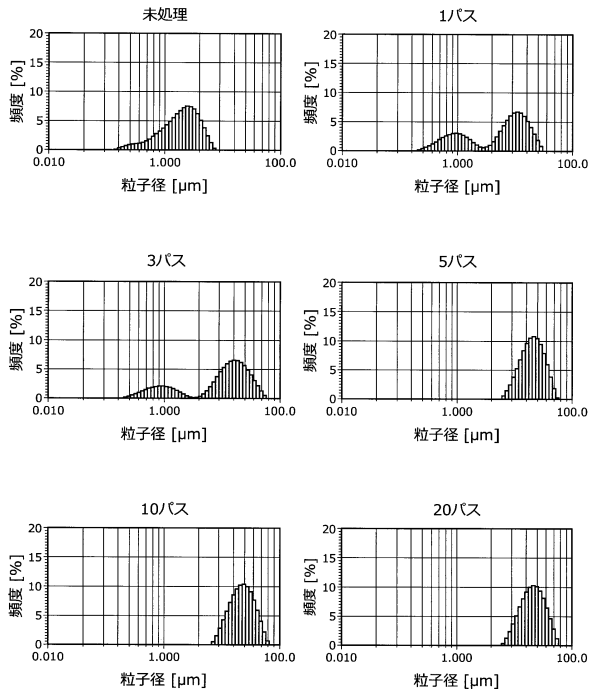


【図4】



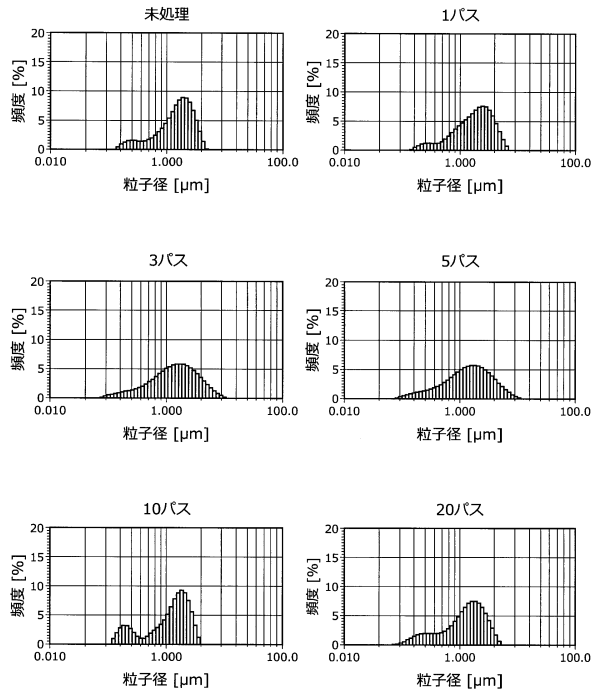
【 図 6 】

<パラミロン（超音波分散時間0）>

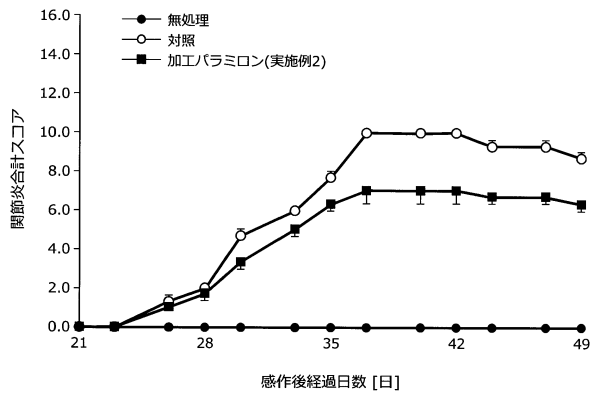


【 図 7 】

<パラミロン（超音波分散時間1分）>



【 図 8 】



*p<0.05、vs対照、Mann-WhitneyのU検定

フロントページの続き

(72)発明者 朝山 雄太
神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユ
ーグレナ内

(72)発明者 鈴木 健吾
神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユ
ーグレナ内

審査官 伊藤 幸司

(56)参考文献 特開2005-270891(JP,A)
特開2011-056456(JP,A)
特開2009-051797(JP,A)
特開2009-293167(JP,A)
特開2012-111849(JP,A)
特開2009-299043(JP,A)
特表2003-529538(JP,A)
特開2011-088108(JP,A)
特開平06-047264(JP,A)
特開2014-095159(JP,A)
特開2013-091716(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B

C13K

C12P

CAplus(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)