(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-531977
(P2018-531977A)
(43)公表日　平成30年11月1日(2018.11.1)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 31/716	***(2006.01)***	A61K	31/716	4B064
A61K 31/455	***(2006.01)***	A61K	31/455	4C084
A61K 31/366	***(2006.01)***	A61K	31/366	4C086
A61K 31/80	***(2006.01)***	A61K	31/80	4C087
A61K 45/00	***(2006.01)***	A61K	45/00	4C206

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 79 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-522054 (P2018-522054)
(86)(22)出願日　平成28年10月27日 (2016.10.27)
(85)翻訳文提出日　平成30年6月22日 (2018.6.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/059192
(87)国際公開番号　WO2017/075262
(87)国際公開日　平成29年5月4日 (2017.5.4)
(31)優先権主張番号　62/247,629
(32)優先日　平成27年10月28日 (2015.10.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/305,875
(32)優先日　平成28年3月9日 (2016.3.9)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500462328
ケミン、インダストリーズ、インコーポレーテッド
ＫＥＭＩＮ　ＩＮＤＵＳＴＲＩＥＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国アイオワ州５０３１７，デ・モイン，モーリー・ストリート　２１００
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前　徹

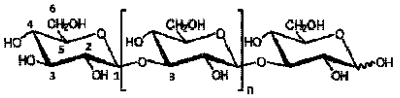
最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫機能を調節するため及び腸の炎症を治療するためのベーター１，３－グルカンの使用

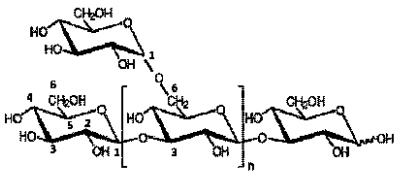
(57)【要約】
本出願は、ベーター１，３－グルカン及び人体の免疫を調節するためのその使用に関する。高コレステロール、糖尿病、及びアレルギーを治療及び／又は予防する方法も提供される。腸の炎症を治療及び／又は予防する方法も提供される。
【選択図】図１

FIGURE 1

1A



1B



【特許請求の範囲】
【請求項１】
高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患をもつヒトにおける前記疾患を治療する方法であって、前記ヒトに、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量を経口で投与することを含む方法。
【請求項２】
前記疾患が、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記疾患が高脂血症である請求項１～２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４】
前記組成物の投与が前記ヒトのコレステロールのレベルを減少させる請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記組成物の前記有効量が、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む請求項３～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記組成物の前記有効量が、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～５０ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む請求項３～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記組成物が、スタチン、ニコチン酸、胆汁酸樹脂、フィブリン酸誘導体、又はコレステロール吸収阻害剤と併用して投与される請求項３～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記疾患が、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記疾患が、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記疾患が大腸炎である請求項８～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記疾患が炎症性腸疾患である請求項８～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記疾患がクローン病である請求項８～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記疾患が結腸がんである請求項８に記載の方法。
【請求項１４】
前記組成物の前記有効量が、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む請求項８～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
前記組成物を投与することが、抗炎症性サイトカイン産生を増加させる請求項８～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記組成物が、抗炎症薬、免疫抑制薬、又は抗生物質と併用して投与される請求項８～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】

前記ユーグレナがユーグレナ・グラシリスである請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記ユーグレナが従属栄養的に増殖する請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記ベーター１，３－グルカンがパラミロンの形態で存在する請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記ベーター１，３－グルカンがベーター１，６－グリコシド結合を含まない請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記ベーター１，３－グルカンがユーグレナから精製される請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記組成物がユーグレナバイオマスを含み、前記ユーグレナバイオマスが前記ベーター１，３－グルカンを含む請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記ユーグレナバイオマスが４０％以下の含水率に乾燥されている請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記ユーグレナバイオマスが１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記組成物が毎日、単回投与として投与される請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記組成物が１日に複数回に分かれた投与として投与される請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記組成物が、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成分をさらに含む請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
前記追加成分が亜鉛である請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
前記組成物が金属をさらに含む請求項１～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
前記金属が、鉄、マグネシウム、リチウム、亜鉛、銅、クロム、ニッケル、コバルト、バナジウム、モリブデン、マンガン、セレン、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される構成要素を含む請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】

前記ベーター（１，３）－グルカンと前記金属が複合体を形成する請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記複合体が亜鉛ベーター（１，３）－グルカン複合体を含む請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記組成物が、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳からなる群より選択される追加成分をさらに含む請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記組成物が固体として投与される請求項１～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記組成物が懸濁液として投与される請求項１～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患の治療で用いるための、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物。
【請求項３７】
前記疾患が、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される請求項３６に記載の組成物。
【請求項３８】
高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患の治療用薬剤の製造のための、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の使用。
【請求項３９】
前記疾患が、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される請求項３８に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１５年１０月２８日に出願された米国仮特許出願第６２／２４７，６２９号及び２０１６年３月９日に出願された米国仮特許出願第６２／３０５，８７５号に基づく優先権を主張し、該仮出願の各々の内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
技術分野
本出願は、ベーター１，３－グルカン及び人体の免疫を調節するためのその使用に関する。さらに、高コレステロール、糖尿病、及びアレルギーを治療及び／又は予防する方法も提供される。本出願はまた、ベーター１，３－グルカン及び腸の炎症をもつヒトの免疫機能を増強するためのその使用に関する。さらに、腸の炎症を治療及び／又は予防する方法も提供される。
【背景技術】
【０００３】
ベータグルカンは、酵母、真菌類、細菌、藻類、エンバク、大麦、及びケルプを含む多様な生物によって作られるベーターグリコシド結合で結合したＤ－グルコースの多量体である。さまざまな生物が、相異なる分岐構造、平均分子量、溶解度、及び／又は三次構造をもつベータグルカンを生成する。例えば、酵母由来のベータグルカンは一般に不溶性であり、ベーター１，３－グリコシド結合と１，６－グリコシド結合の両方を有する（ベーター１，３－／１，６－グルカン）。他方では、エンバク由来のベータグルカンは典型的により可溶性であり、ベーター１，３－グリコシド結合と１，４－グリコシド結合の両方

を有する（ベーター１，３－／１，４－グルカン）。対照的にユーグレナ（Euglena）などの藻類由来のベータグルカンは、ほぼ独占的に１，３－グリコシド結合だけを有し、１，６－グリコシド結合をもたない。多様なベータグルカン形態の特有のグリコシド結合はそれらの分子の性質に影響を及ぼす。

【０００４】

いくつかベータグルカンは健康に利する特性をもつことが認められている。ベータグルカンは典型的に病原性微生物の表面と結合しているので、高等生物の免疫系はベータグルカンを認識し、免疫応答を増強するように進化してきた。例えば、酵母由来のベータグルカンは、マクロファージの補体受容体３又はデクチン－１に結合することによって免疫機能に影響を与えうることが示されている（Brown et al, Journal of Experimental Medicine, vol.196(3), pp.407-412 (2002)を参照されたい）。生理的レベルでは、ベータグルカンは、細胞表面受容体と相互作用して、食作用及びある特定のサイトカインの産生などを含む事象の一連の流れを始動させる。ある特定のベータグルカンを導入することによって、免疫系をプライミングでき、その結果、実際の疾患による攻撃に対する免疫系の応答がより強力になる。

【０００５】

疾患に対抗するために個体の免疫機能を調節することは従来の医薬品の投与に代わるものである。調節された免疫機能は、個体の疾患を効果的に治療しうる又は個体の疾患の発症を予防しうる。また、疾患に対抗するための個体の免疫機能の調節又は増強は、従来の医薬品の投与に代わるものを表す。調節又は増強された免疫機能は、個体の疾患を効果的に治療しうる又は個体の疾患の発症を予防しうる。多くの従来の医薬品は、患者に望ましくない副作用を引き起こす。さらに、細菌の抗生物質耐性菌株は健康リスクをより一層増加させる。したがって、仮にあったとしても副作用がより少ない代替的疾患治療が必要とされている。また、疾患の発症を予防するより自然な方法が必要とされている。

【０００６】

酵母やエンバクに由来するベータグルカンは広範に研究されてきたのに対して、ユーグレナなどの藻類由来のベーター１，３－グルカンから生じる健康上の利点はあまり注目されていない。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与することによって個体の免疫機能を調節する方法が本明細書に記載されている。ある特定の疾患は、個体の免疫機能を調節することによって治療及び／又は予防することができる。

【０００７】

現在の腸の炎症の治療としては、食事及び／又は生活習慣を変えること、投薬、手術が挙げられる。しかし、腸の炎症のより効果的な治療及び仮にあったとしても副作用がより少ない治療が必要とされている。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与することによって、腸の炎症をもつ個体の免疫機能を増強する方法が本明細書に記載される。

【発明の概要】

【０００８】

本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患をもつヒトの前記疾患を治療する方法を提供し、その方法はヒトに、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量を経口で投与することを含む。ある実施形態では、疾患は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される。

【０００９】

ある実施形態では、疾患は高脂血症である。ある実施形態では、組成物の投与はヒトのコレステロールのレベルを減少させる。ある実施形態では、前記組成物の前記有効量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む。ある実施形態では、前記組成物の前記有効量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～５０ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む。ある実施形態では、組成物は、スタチン、ニコチン酸、胆汁酸樹脂、フィブリン酸

誘導体、又はコレステロール吸収阻害剤と併用して投与される。

【００１０】

ある実施形態では、疾患は、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される。ある実施形態では、疾患は、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される。ある実施形態では、疾患は大腸炎である。ある実施形態では、疾患は炎症性腸疾患である。ある実施形態では、疾患はクローン病である。ある実施形態では、疾患は結腸がんである。ある実施形態では、前記組成物の前記有効量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む。ある実施形態では、前記組成物を投与することは、抗炎症性サイトカイン産生を増加させる。ある実施形態では、組成物は、抗炎症薬、免疫抑制薬、又は抗生物質と併用して投与される。

【００１１】

ある実施形態では、ユーグレナはユーグレナ・グラシリス（Euglena gracilis）である。ある実施形態では、ユーグレナは従属栄養的に増殖する。ある実施形態では、ベーター１，３－グルカンはパラミロンの形態で存在する。ある実施形態では、ベーター１，３－グルカンはベーター１，６－グリコシド結合を含まない。ある実施形態では、ベーター１，３－グルカンはユーグレナから精製される。ある実施形態では、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスはベーター１，３－グルカンを含む。ある実施形態では、ユーグレナバイオマスは４０％以下の含水率に乾燥されている。ある実施形態では、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている。

【００１２】

ある実施形態では、組成物は毎日、単回投与として投与される。ある実施形態では、組成物は１日に複数回に分かれた投与として投与される。

【００１３】

ある実施形態では、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成分をさらに含む。ある実施形態では、追加成分は亜鉛である。

【００１４】

ある実施形態では、組成物は金属をさらに含む。ある実施形態では、金属は、鉄、マグネシウム、リチウム、亜鉛、銅、クロム、ニッケル、コバルト、バナジウム、モリブデン、マンガン、セレン、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される構成要素を含む。ある実施形態では、ベーター（１，３）－グルカンと金属が複合体を形成する。ある実施形態では、複合体は亜鉛ベーター（１，３）－グルカン複合体を含む。

【００１５】

ある実施形態では、組成物は、ヘマトコッカス・プルビアリス（Haematococcus pluvialis）、アスタキサンチン、及び初乳からなる群より選択される追加成分をさらに含む。

【００１６】

ある実施形態では、組成物は固体として投与される。ある実施形態では、組成物は懸濁液として投与される。

【００１７】

本開示は、本明細書に開示の方法が、対応する使用にも適合されうることを提供する。
【００１８】
本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患の治療で用いる発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物を提供する。ある実施形態では、疾患は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される。
【００１９】
本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患の治療用薬剤の製造のための、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の使用を提供する。ある実施形態では、疾患は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される。
【００２０】
１つの態様では、本出願は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量を、それを必要としているヒトに経口で投与することを含む、該ヒトの免疫機能を調節する方法を開示する。
【００２１】
幾つかの実施形態では、組成物の有効１日量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～５０ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重である。
【００２２】
幾つかの実施形態では、組成物の投与は、自己免疫反応、血糖値、感染症、又は炎症を調節する。１つの実施形態では、炎症はアレルギーに関連する。別の実施形態では、自己免疫反応は糖尿病に関連する。別の実施形態では、感染症は、細菌感染症、真菌感染症、又はウイルス感染症である。
【００２３】
幾つかの実施形態では、ユーグレナは従属栄養的に増殖する。１つの実施形態では、ベーター１，３－グルカンはパラミロンを含む。別の実施形態では、ベーター１，３－グルカンはベーター１，６－グリコシド結合を含まない。さらなる実施形態では、ベーター１，３－グルカンはユーグレナから精製される。
【００２４】
幾つかの実施形態では、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスはベーター１，３－グルカンを含む。幾つかの実施形態では、ユーグレナバイオマスは乾燥されている。さらなる実施形態では、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている。
【００２５】
１つの実施形態では、組成物は毎日、単回投与として投与される。別の実施形態では、組成物は１日に複数回に分かれた投与として投与される。
【００２６】
幾つかの実施形態では、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成

分をさらに含む。１つの実施形態では、組成物は固体として投与される。別の実施形態では、組成物は懸濁液として投与される。

【００２７】

別の態様では、本出願は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量を、コレステロールが高いヒト又はコレステロールが高くなるリスクがあるヒトに経口で投与すること含む、該ヒトの免疫機能を調節する方法を提供する。いくつかの態様では、組成物の投与はヒトのコレステロールのレベルを減少させる。

【００２８】

１つの実施形態では、前記組成物の前記有効量は０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～５０ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重である。別の実施形態では、ユーグレナは従属栄養的に増殖する。さらなる実施形態では、ベーター１，３－グルカンはパラミロンを含む。さらに別の実施形態では、ベーター１，３－グルカンはベーター１，６－グリコシド結合を含まない。別の実施形態では、ベーター１，３－グルカンはユーグレナから精製される。

【００２９】

幾つかの実施形態では、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスはベーター１，３－グルカンを含む。さらなる実施形態では、ユーグレナバイオマスは乾燥されている。幾つかの実施形態では、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている。

【００３０】

１つの実施形態では、組成物は毎日、単回投与として投与される。別の実施形態では、組成物は１日に複数回に分かれた投与として投与される。

【００３１】

１つの実施形態では、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成分をさらに含む。その他の実施形態では、組成物は、スタチン、ニコチン酸、胆汁酸樹脂、フィブリン酸誘導体、又はコレステロール吸収阻害剤と併用して投与される。さらなる実施形態では、組成物は固体として投与される。別の実施形態では、組成物は懸濁液として投与される。

【００３２】

本開示は、本明細書に開示の方法が、対応する使用にも適合されうることを提供する。

【００３３】

本開示は、それを必要としているヒトの免疫機能を調節するのに用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物を提供する。幾つかの実施形態では、組成物は該ヒトに経口で投与される。本開示は、必要としているヒトの免疫機能を調節するための薬剤の製造に用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物の使用を提供する。幾つかの実施形態では、組成物は該ヒトに経口で投与される。

【００３４】

本開示は、コレステロールが高いヒト又はコレステロールが高くなるリスクがあるヒト

の免疫機能を調節するのに用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物を提供する。幾つかの実施形態では、組成物は該ヒトに経口で投与される。本開示は、コレステロールが高いヒト又はコレステロールが高くなるリスクがあるヒトの免疫機能を調節するための薬剤の製造に用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物の使用を提供する。幾つかの実施形態では、組成物は該ヒトに経口で投与される。

【００３５】

また、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与することによって腸の炎症をもつヒトの免疫機能を増強する方法も本明細書に記載されている。これらの方法は、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病などの疾患を治療するのに有用である。

【００３６】

１つの態様では、本出願は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量を、腸の炎症をもつヒトに経口で投与することを含む、該ヒトの免疫機能を増強する方法を開示する。

【００３７】

幾つかの実施形態では、組成物の有効１日量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重である。

【００３８】

幾つかの実施形態では、腸の炎症は炎症性腸疾患である。１つの実施形態では、腸の炎症は大腸炎である。別の実施形態では、腸の炎症はクローン病である。

【００３９】

幾つかの実施形態では、ユーグレナは従属栄養的に増殖する。１つの実施形態では、ベーター１，３－グルカンはパラミロンを含む。別の実施形態では、ベーター１，３－グルカンはベーター１，６－グリコシド結合を含まない。さらなる実施形態では、ベーター１，３－グルカンはユーグレナから精製される。

【００４０】

幾つかの実施形態では、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスはベーター１，３－グルカンを含む。幾つかの実施形態では、ユーグレナバイオマスは乾燥されている。さらなる実施形態では、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている。

【００４１】

１つの実施形態では、組成物は毎日、単回投与として投与される。別の実施形態では、組成物は１日に複数回に分かれた投与として投与される。

【００４２】

幾つかの実施形態では、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成分をさらに含む。１つの実施形態では、組成物は固体として投与される。別の実施形態では、組成物は懸濁液として投与される。

【００４３】

幾つかの実施形態では、組成物の投与は抗炎症性サイトカイン産生を増加させる。さらなる実施形態では、組成物は、抗炎症薬、免疫抑制薬、又は抗生物質と併用して投与され

る。
【００４４】
本開示は、本明細書に開示の方法が、対応する使用にも適合されうることを提供する。
【００４５】
本開示は、腸の炎症をもつヒトの免疫機能を増強するのに用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物を提供する。これらの使用は、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病などの疾患を治療するのに有用である。幾つかの実施形態では、組成物は該ヒトに経口で投与される。本開示は、腸の炎症をもつヒトの免疫機能を増強するための薬剤の製造に用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物の使用を提供する。これらの方法は、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病などの疾患を治療するのに有用である。幾つかの実施形態では、組成物は該ヒトに経口で投与される。
【図面の簡単な説明】
【００４６】
【図１】図１Ａは、ユーグレナに由来するものなどのベーター１，３－グルカン鎖の構造を示す。図１Ｂは、酵母に由来するものなどのベーター１，６－グルカン側鎖をもつベーター１，３－グルカン主鎖の構造を示す。
【図２】図２は、本発明の１つの実施形態による発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを形成するための概略図を示す。
【図３】図３は、本発明によるユーグレナを培養するための系の第１の実施形態を示す。
【図４】図４Ａは、反復回分法によって発酵を利用して増殖させたユーグレナの１つの実施形態の概略図を示す。図４Ｂは、本発明の１つの実施形態による反復回培養法から得られたユーグレナ濃度をグラフで示す。
【図５】図５は、本発明によるユーグレナを培養するための系の第２の実施形態を示す。
【図６】図６は、本発明によるユーグレナを培養するための系の第３の実施形態を示す。
【図７－１】図７Ａは、ベータグルカン治療の１４日目に末梢血から採取したマウス好中球の食作用指数をグラフで示す。陰性対照にはベータグルカンを与えず、応答は２９．８±０．３７％であった。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝３頭のマウス）。図７Ｂは、ベータグルカン治療の１４日目に採取したマウス脾細胞のナチュラルキラー細胞（ＮＫ）細胞活性をグラフで示す。陰性対照にはベータグルカンを与えず、応答は１１．６±０．２８％であった。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝３頭のマウス）。
【図７－２】図７Ｃは、マウスにオボアルブミン注射を施し、毎日のベータグルカン治療を２３日間施行した後の抗体形成をグラフで示す。陰性対照にはオボアルブミンは与えたがベータグルカンを与えず、応答は４９．１±４．６であった。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝３頭のマウス）。
【図８】図８は、０日目に大腸菌を注射した後のマウスの生存をグラフで示す。大腸菌注射（－２日目）の２日前から、乾燥藻類（すなわちユーグレナ）、精製藻類ベーター１，３－グルカン、及び酵母由来ベータグルカンを、日々の飼料の振り分けの０．０１％に相当する投与量で強制経口投与によって５日間経口で給餌した。ＰＢＳ対照群にはＰＢＳ強制経口投与のみを施行したのに対し、抗生物質治療群には１３ｍｇ／ｋｇのアンピシリンを０～４日目に経口で与えた。各治療群はｎ＝１０頭のマウスから構成された。薄い灰色の破線はアンピシリンを表し、グラフの右端（すなわち７～１０日目）を見て最も高い位置の線から最も低い位置の線はそれぞれ、精製藻類ベーター１，３－グルカン、乾燥藻類、酵母ベータグルカン、及びＰＢＳ対照を表す。
【図９－１】図９Ａは、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンで７日間治療した後のマウス樹状細胞によるサイトカイン産生に対するベータグルカンの効果をグラフで示す。図９Ｂは、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンで７日間治療した後のマウスマクロファージによるサイトカイン産生に対するベータグルカンの効果をグラフで示す。

【図９－２】図９Ｃは、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンで７日間治療した後のマウスＮＫ細胞によるサイトカイン発現に対するベータグルカンの効果をグラフで示す。図９Ａ～９Ｃにおいて、ベーター１，３－グルカンの投与量は、０ｍｇ／ｋｇ（Ａ）、５ｍｇ／ｋｇ（Ｂ）、２０ｍｇ／ｋｇ（Ｃ）、及び２００ｍｇ／ｋｇ（Ｄ）である。
【図１０】図１０は、ベータグルカンを含まない高コレステロール飼料を１４日間給餌した後、ベータグルカン生成物を含有する正常のコレステロールレベルの飼料（又は対照飼料）をさらに３０日間給餌したマウスの（Ａ）血清コレステロールレベル及び（Ｂ）血清トリグリセリドレベルをグラフで示す。ベータグルカンは２０ｍｇ／ｋｇの投与量で与えた。絶食の１２時間後に血清をマウスから採取した。点線はＰＢＳ対照を表し、実線はユーグレナ由来の精製ベータグルカンを表す。
【図１１】図１１は、ベータグルカンを含む高コレステロール飼料（又は対照飼料）を１４日間給餌した後、ベータグルカン生成物を含有する正常のコレステロールレベルの飼料（又は対照飼料）をさらに３０日間給餌したマウスの（Ａ）血清コレステロールレベル及び（Ｂ）血清トリグリセリドレベルをグラフで示す。ベータグルカンは２０ｍｇ／ｋｇの投与量で与えた。絶食の１２時間後に血清をマウスから採取した。点線はＰＢＳ対照を表し、実線はユーグレナ由来の精製ベータグルカンを表す。
【図１２】図１２Ａは、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスへのＰＢＳ投与（「なし」）の体重に対する効果をグラフで示す。図１２Ｂは、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスへの精製ベーター１，３－グルカン（＞９９重量％）の投与（「ＡＧ」）の体重に対する効果をグラフで示す。図１２Ｃは、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスへの約５０重量％のベーター１，３－グルカンを含有する乾燥ユーグレナ・グラシリスの投与（「Ａ５０」）の体重に対する効果をグラフで示す。図１２Ａ～１２Ｃにおいて、線は各々、個々のマウスについての結果を表す。
【図１３】図１３は、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスの体重に対するベーター１，３－グルカンの効果をグラフで示す。グラフは、時間の関数として初期体重の％割合に基づいた、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したマウスの結果をまとめたものを示す。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝１０頭のマウス）。
【図１４】図１４は、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスの体重に対するベーター１，３－グルカンの効果をグラフで示す。グラフは、時間の関数として初期体重の％割合に基づいた、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したマウスの結果をまとめたものを示す。体重減少スコアは、０（減少なし）、１（１～５％）、２（５～１０％）、３（１０～２０％）、及び４（＞２０％）のように計算した。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝１０頭のマウス）。
【図１５】図１５は、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスの便の硬さに対するベーター１，３－グルカンの効果をグラフで示す。グラフは、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したマウスの結果をまとめたものを示す。便の硬さは、０（正常な固体）、２（半固体／軟らかい）、３（ゆるい便）、及び４（水様／下痢）のようにスコアをつけた。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝１０頭のマウス）。
【図１６】図１６は、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスにおけるベーター１，３－グルカンの便血に対する効果をグラフで示す。グラフは、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したマウスの結果をまとめたものを示す。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝１０頭のマウス）。
【図１７】図１７は、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスにおけるベーター１，３－グルカンの結腸の長さに対する効果をグラフで示す。グラフは、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）でしたマウスの１０日目の結腸の長さを示す。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ

＝７頭のマウス）。
【図１８】図１８Ａは、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したマウスの１０日目の結腸の炎症の代表的な画像を示す。１０倍対物レンズを用いて光学顕微鏡下で画像を得た。図１８Ｂは、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスにおけるベーター１，３－グルカンの結腸の炎症の重症度に対する効果をグラフで示す。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝３頭のマウス）。
【図１９】図１９Ａは、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したマウスの１０日目Ｔヘルパー細胞頻度の代表的なＦＡＣＳ分析画像を示す。図１９Ｂは、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスへのＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）の投与のサイトカイン陽性細胞産生に対する効果をグラフで示す。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝３頭のマウス）。
【図２０】図２０は、ＤＳＳ誘発大腸炎をもつマウスにおけるベーター１，３－グルカンの結腸免疫細胞によるサイトカイン産生に対する効果をグラフで示す。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝３頭のマウス）。グラフは、ＰＢＳ（「なし」）、精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」）、又は乾燥ユーグレナ・グラシリス（「Ａ５０」）で治療したマウスのサイトカインプロファイルを示す。バーは平均±標準誤差を表す（治療群あたりｎ＝３頭のマウス）。
【図２１】図２１は、２５０ｍｇのユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを毎日摂取した後の個人における好塩基球の数の減少をグラフで示す。
【図２２】図２２は、２５０ｍｇのユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを毎日摂取した後の個人における緊急の排便又は下痢に対する効果をグラフで示す。
【図２３】図２３は、２５０ｍｇのユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを毎日摂取した後の個人における酵素スーパーオキシドディスムターゼ（ＳＯＤ）のレベルに対する効果をグラフで示す。
【図２４】図２４は、２５０ｍｇのユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを毎日摂取した後の個人におけるマロンジアルデヒドのレベルに対する効果をグラフで示す。
【図２５】図２５は、ベータグルカンと微量金属の複合体を調製するための発酵過程の実施形態の概略図である。
【図２６】図２６は、ベータグルカンと微量金属の複合体を調製するための発酵過程の別の実施形態の概略図である。
【発明を実施するための形態】
【００４７】
本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患をもつヒトにおける前記疾患を治療する方法を提供し、その方法は、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量をヒトに経口で投与することを含む。ある実施形態では、疾患は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される。ある実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物は、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせを含むことができる。組成物は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患をもつヒトにおける前記疾患を治療するために使用することができる。ある実施形態では、組成物は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される疾患をもつヒトにおける前記疾患を治療するために使用することができる。ある実施形態では、組成物は高脂血症を治療するために使用することができる。ある実施形態では、組成物はメタボリックシンドロームを治療するために使用することが

できる。ある実施形態では、組成物は炎症性腸疾患を治療するために使用することができる。ある実施形態では、組成物は大腸炎を治療するために使用することができる。ある実施形態では、組成物はクローン病を治療するために使用することができる。ある実施形態では、組成物は結腸がんを治療するために使用することができる。

【００４８】

本出願は、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン及びその使用を対象とする。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは個体の免疫機能を調節することができる。本出願はまた、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン及び腸の炎症をもつヒトの免疫機能を調節又は増強するためのその使用を対象とする。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、腸の炎症をもつ個体の免疫機能を調節又は増強することができる。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、ユーグレナバイオマス又はユーグレナから精製されたベーター１，３－グルカンのいずれかを含有する食用組成物として経口で投与することができる。また、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、経口又は静脈内投与されうる医薬製剤として投与することができる。

【００４９】

発明者らは、発酵を利用して増殖させたユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの投与が、ヒトを含む動物における免疫系の健康な状態を助長するために且つ疾患を治療及び／又は予防するために使用できることを発見した。例えば、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、自己免疫反応、血糖値、感染症、又は炎症を調節するために使用することができる。また、発酵によって増殖させたユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの投与は、ヒトを含む動物における血清コレステロールの低下又は血清トリグリセリドの低下をもたらす。

【００５０】

発明者らはまた、驚くべきことに、発酵を利用して増殖させたユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの投与が、ヒトを含む動物における免疫系の健康状態を助長するため且つ腸の炎症を治療及び／又は予防するために使用できることも示した。例えば、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、炎症性腸疾患、大腸炎、又はクローン病をもつヒトの免疫機能を調節又は増強するために使用することができる。また、発酵によって増殖させたユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの投与は、ヒトを含む動物の抗炎症性サイトカインのさらなる産生をもたらす。

【００５１】

ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを使用することにいくつかの利点がある。第１に、ベーター１，３－グルカンは、発酵を利用して増殖させたユーグレナによって効率的に作られる。本明細書に記載の発酵によって増殖させたユーグレナは、ベーター１，３－グルカンを総ユーグレナ細胞マスの約３０％～約７０％まで蓄積する。対照的に、例えば酵母由来ベータグルカンが占めるのは総酵母細胞マスの１５％未満である。第２に、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは容易に抽出及び精製することができる。これに対し、酵母に由来するベータグルカンは酵母細胞壁に結合しており、抽出を難しく且つコストが高いものにする。下で論ずるように、ベーター１，３－グルカンはユーグレナの顆粒に蓄積する。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、分離しにくい可能性がある細胞壁構成成分と結合していないので、その顆粒への蓄積は精製過程を容易にする。第３に、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、ユーグレナ細胞をほとんど又は全く加工することなく容易に生物学的に利用可能である。これにより、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンが、ユーグレナバイオマスとして、精製する必要なく、効果的に投与できるようになる。さらに、例えば、医薬製剤において、精製されたベーター１，３－グルカン望ましい場合には、本明細書に記載の安全で且つ費用対効果が高い方法を用いて容易に精製することができる。対照的に、エンバク又は酵母によって作られるベータグルカンは、細胞壁から抽出しなければならず、危険な化学薬品や高価な酵素の使用を必要とする。

【００５２】

ユーグレナは、免疫機能を調節する又は高脂血症を治療若しくは予防的に治療するのに特に有用である独自のベータグルカンを産生する。また、ユーグレナは、腸の炎症を治療又は予防的に治療するのに特に有用である独自のベータグルカンを産生する。ユーグレナによって作られるベーター１，３－グルカンのかなりの部分は、ベーター１，３－グルカンの水に不溶性の顆粒であるパラミロン体として生物のピレノイド又は細胞質に位置している。この独自のベータグルカンは一般にパラミロンと呼ばれる。他の多くの微生物、例えば、エンバク又は真菌類ベータグルカンと比較して、ユーグレナによって作られるベータグルカンは、実質的により直鎖状であり主にベーター１，３－結合を含有する。ベーター１，３－グルカン形態は、免疫機能を調節し、且つ血清コレステロール及びトリグリセリドレベルを低下させるのに特に効果的である。また、ベーター１，３－グルカン形態は、腸の炎症を治療又は予防するのに特に有効である。

【００５３】

定義

化合物又は組成物の使用の文脈において使用された場合に、「有効量」という用語は、その結果が、感染症又は疾患状態の予防又は治療に関係するにしても、そうでない場合は本明細書に記載の通りであるにしても、意図される結果を生み出す又は達成する化合物又は組成物の量を表す。

【００５４】

「調節する」、「調節すること」、「調節」、「増強する」、「増強すること」、及び「増強」という用語は、本明細書において同義語として使用され、いずれのヒト又は動物（限定されないが、イヌ、ネコ、げっ歯類、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、ロバ、ニワトリ、若しくはウサギを含む）の免疫応答を高める能力の向上を記述する。

【００５５】

ユーグレナという用語は、別段特に規定がない限り、ユーグレナ属のいずれかの種又は株を意味すると解される。好ましい実施形態では、ユーグレナはユーグレナ・グラシリスであるが、他のユーグレナ属の種も企図される。

【００５６】

「バイオマス」という用語はユーグレナ細胞材料を記述するために使用される。生成物は加工されてもよく、未加工であってもよい。例えば、ユーグレナバイオマスは乾燥されてもよく、湿った細胞マスとして提供されてもよい。

【００５７】

「由来する」という用語は、特定の供給源に由来する化合物又は材料を意味する。例えば、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、ベーター１，３－グルカンがユーグレナを供給源にもつことを示す。ベーター１，３－グルカンはユーグレナと結合していてもよく、精製されてそれゆえにユーグレナと分離していてもよい。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「医薬的に許容される」という用語は、化合物又は組成物が、疾患の重症度や治療の必要性に照らして過度に有害な副作用なしに、本明細書に記載の治療を達成するための、ヒト患者を含む対象への投与に適していることを意味する。

【００５９】

「被験者」、「患者」、及び「個体」という用語は、本明細書において同義語として使用され、任意のヒト又は動物（限定されないが、イヌ、ネコ、げっ歯類、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、ロバ、ニワトリ、若しくはウサギを含む）を記述する。幾つかの実施形態では、「被験体」、「患者」、及び「個体」という用語は、本明細書において同義語として使用され、任意のヒト又は動物（限定されないが、イヌ、ネコ、げっ歯類、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ヤギ、ロバ、ラマ、魚、ニワトリ、若しくはウサギを含む）を記述する。

【００６０】

「治療する」、「治療すること」、及び「治療」という用語は、本明細書において同義語として使用され、少なくとも１つの症状を軽減、阻害、抑制、若しくは排除すること、

疾患の進行を遅らせること、又は疾患を阻害することを含む、疾患状態若しくは疾患のリスクがある又は疾患状態若しくは疾患に罹患している患者に利するいずれかの行為を指す。

【００６１】

「予防的投与」又は「予防的治療」という用語は、疾患の発生の可能性を低下させるための疾患の発生前のいずれかの行為又は対象におけるその後の疾患の発生の可能性を減少させるいずれかの行為を指す。

【００６２】

「約」という用語は、値又はパラメーターそれ自体を包含及び表現する。例えば、「約ｘ」は「ｘ」それ自体を包含及び表現する。ある特定の実施形態では、測定に関連して使用される場合、又は値、単位、定数、若しくは値の範囲を変更するために使用される場合、「約」という用語は、±１～１０％の変動を指す。いくつかの実施形態では、「約」という用語は、測定に関連して使用される場合、又は値、単位、定数、若しくは値の範囲を変更するために使用される場合、±５％の変動を指す。いくつかの実施形態では、「約」という用語は、測定に関連して使用される場合、又は値、単位、定数、若しくは値の範囲を変更するために使用される場合、±１０％の変動を指す。

【００６３】

「及び／又は」という用語は、対象を選択的にも含み且つ対象を一緒にも含む。例えば、「ｘ及び／又はｙ」は、「ｘ又はｙ」及び「ｘ及びｙ」を含む。

【００６４】

本明細書に記載の本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「からなること」及び／又は「から本質的になること」を含むことが理解される。

【００６５】

本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」には、文脈から明らかにそうでないことが示されない限り、複数形への参照が含まれる。

【００６６】

ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの性質

ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、その炭水化物分岐構造、三次元構造、溶解度、及び生物学的利用能の点で、その他の微生物によって作られるベータグルカンと構造的に異なる。

【００６７】

炭水化物分岐構造

相異なる生物によって作られるベータグルカンは、ポリマーの炭水化物分岐構造が実質的に異なりうる。例えば、ユーグレナなどの藻類に由来するベータグルカンは、ほぼ独占的に１，３－グリコシド結合だけを有し、１，６－グリコシド結合をもたない（図１Ａ）。対照的に、酵母に由来するベータグルカンは、ベーター１，３－グリコシド結合とベーター１，６－グリコシド結合が混在し、一般には、１０～３０個のグルコース単量体ごとにベーター１，６－側鎖（２～３のグルコース単位の長さ）を含むベーター１，３－グルカン主鎖をもつ（図１Ｂ）。エンバクや大麦に由来するベータグルカンは、ベーター１，３－グリコシド結合とベーター１，４－グリコシド結合が混在する。ケルプ（例えば、コンブ属）に由来するベータグルカンは、ベーター１，３－グリコシド結合とベーター１，６－グリコシド結合が混在する。

【００６８】

ユーグレナによって作られるベータグルカンのかなりの部分は、藻類の細胞質中のパラミロン体として位置し、一般に「パラミロン」と呼ばれる。ユーグレナに由来するパラミロンは、ほぼ独占的にベーター１，３－グルカンだけを含みベーター１，６－側鎖分岐がない直鎖状構造をもつ。パラミロンの分岐がないという性質は、免疫をサポートする用途におけるその使用を考えたとき、他のベータグルカン供給源と比べて重要な違いである。

【００６９】

パラミロンの分岐構造の研究はその独自の構造を明らかにし、米国特許出願公開第２０

１３／０２１６５８６号に開示されている。全ユーグレナ細胞からパラミロンを単離した後に、連鎖解析を行って、グルコース単量体間の各結合型の相対的な量を決定した。結果を表１にまとめる。

【００７０】

【表１】

表１．Euglena gracilisから抽出された２つのパラミロン試料の連鎖解析

グリコシル残基	試料１ (%)	試料２ (%)
末端結合グルコピラノシル残基 (t-glc)	0.34	0.3
３－結合グルコピラノシル残基 (3-glc)	93.03	94.1
４－結合グルコピラノシル残基 (4-glc)	2.25	2.4
２，３－結合グルコピラノシル残基 (2,3 glc)	3.47	2.3
３，６－結合グルコピラノシル残基 (3,5-glc)	0.36	0.8
２，３，４－結合グルコピラノシル残基 (2,3,4-glc)	0.55	0.1
合計	100.0	100.0

この連鎖解析は、両パラミロン試料が３－結合グルコピラノシル残基から構成されることを示す。少量の４－結合及び２，３－結合グルコピラノシル残基にくわえて、無視できるほど少量の３，６－結合グルコピラノシル残基、末端グルコピラノシル残基、及び２，３，４－結合グルコピラノシル残基が見られる。これらのデータは、パラミロンが主として直鎖状の分岐していないベーター１，３－グルカンからなることを裏付ける。

【００７１】

ベーター１，３－グルカンは、デクチン－１（マクロファージ受容体）や補体受容体３などの免疫系細胞の表面の受容体に主に結合するベータグルカンの形態である。ベーター１，３－グルカンはまた、個体の腸内の細菌叢によって発酵でき、動物の健康に影響を与えうる短鎖脂肪酸のような有益な代謝産物の生成をもたらしうる。ベーター１，３－グルカンはまた、個体の腸内の細菌叢によって発酵でき、個体の健康に影響を与えうる短鎖脂肪酸などの有益な代謝産物の生成をもたらしうる。

【００７２】

本明細書に記載の方法に有用な、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、約８５％以上のベーター１，３－グリコシド結合、約８７％以上のベーター１，３－グリコシド結合、約９０％以上のベーター１，３－グリコシド結合、約９１％以上のベーター１，３－グリコシド結合、約９２％以上のベーター１，３－グリコシド結合、約９３％以上のベーター１，３－グリコシド結合、又は約９４％以上のベーター１，３－グリコシド結合を含有する。

【００７３】

三次元構造

ベーター１，３－グルカンの三次元構造及びフォールディングは、免疫刺激用途における生物学的利用能、表面積、及び全体的な有効性に影響を与える可能性がある。直鎖ベーター１，３－グルカン鎖において、その構造はグリコシド結合部分によって左右される。グルコピラノシルの椅子型環はかなり硬いので、グルカン鎖の柔軟性の大部分はグリコシド結合の周りの回転に起因する。Ｘ線結晶学及び分光法は、直鎖グルカンが固体状態で三重らせん骨格を有することを示す。ユーグレナによって作られるパラミロンは、グリコシル側鎖がほとんどない、構造的により単純なベータグルカンの１つと考えられている。こ

れは、ヘリカル構造の外側に向かって露出した１，４－結合側鎖又は１，６－結合側鎖を有するラミナラン、レンチナン、スクレログルカン、シゾフィラン、又は酵母由来ベータグルカンと全く対照的である。

【００７４】

三重らせん構造は、中性のｐＨで広い範囲の温度にわたって安定であり、水に不溶性のポリマーをもたらす。しかし、水素結合は、さまざまな手段によって不安定化されて、パラミロンポリマーのコンフォメーションを変化させることができる。例えば、パラミロンは、強力なカオトロピック剤（例えば、尿素）の存在下又は三重らせん融解温度（－１３５℃）を超える温度に昇温することによって、アルカリ溶液（例えば、０．２Ｍ以上のＮａＯＨ）、ＤＭＳＯのような非プロトン性極性溶媒に溶解することができる。さまざまな免疫学的効果を得ることができ、それらは、天然の状態のコンフォメーション、変性されたコンフォメーション、又は変性及び復元されたベーター１，３－グルカンコンホメーションに関連する。これら３つのコンフォメーションのいずれかのベーター１，３－グルカンは、その機能性を付加又は改善するさらなる反応の構成単位としての役割を果たすことができる。機能をもたせたベーター１，３－グルカンを産生するためのこれらのいくつかの改変及びそれらグルカンそれぞれの用途のいくつかが本明細書で論じられる。ベータグルカンのコンフォメーション及びその結果としての溶解度もまた、ベータグルカンがどのように送達されるかに影響を及ぼしうる。例えば、水溶性のベーター１，３－グルカンは静脈内に注射することができる。

【００７５】

粒径

粒径は、ベーター１，３－グルカン粒子の機能及び生物学的利用能に影響を及ぼす因子である。ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン粒子は、本明細書に記載の方法に有用である。一般に、ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン粒子は、平均直径が約７ミクロン以下、約６ミクロン以下、約５ミクロン以下、約４ミクロン以下、約３ミクロン以下、約２．５ミクロン以下、約２ミクロン以下、約１．５ミクロン以下、約１ミクロン以下、約０．５ミクロン以下、約０．４ミクロン以下、約０．３ミクロン以下、約０．２ミクロン以下、又は約０．１ミクロン以下である。

【００７６】

ベーター１，３－グルカンの純度レベル

ベータグルカン化合物の純度レベルが有効性に対して影響があることが判っており、恐らくベータグルカンと免疫細胞の間の相互作用を阻害する他の物質の存在が原因である。本明細書に記載の方法を使用して、ベーター１，３－グルカンはユーグレナ細胞の顆粒の形で容易に単離することができる。結果として、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの純度は、酵母及び他の生物由来のベータグルカンの一般的な調製物に比べて非常に高い。例えば、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、酵母及び他の生物由来のベータグルカンの場合のように細胞壁構成成分と結合していない。より正確に言えば、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは水に不溶性の顆粒の形態で主に抽出される。したがって、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの精製は、ベータグルカンと細胞壁構成成分との結合のせいで複雑になるものではない。本明細書に記載の方法を使用して、９５重量％を超える純度レベルが受け入れたままの状態で得ることができる。幾つかの実施形態では、９９重量％を超える純度レベルが受け入れたままの状態で得ることができる。これと比較して、最高級の酵母由来ベータグルカンはまれにしか９０％以上の純度を達成できず、ほとんどが約７０～８０％の純度である。そのうえ、ユーグレナが細胞壁を欠くことに起因して分離が容易であるという理由及びベーター１，３－グルカン顆粒の回収が容易であるという理由から、酵母由来グルカンを用いた場合と比べてユーグレナによって生産する場合のほうが、より高い費用効果で高純度のベーター１，３－グルカンを得ることができる。最後に、刺激が強い化学薬品（例えば、強酸及び塩基又は溶媒）がユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを回収するのに必要ではないので、ベーター１，３－グルカンはその化学組成及び構造を変えずにその天然の形で回収することができる

。一つには、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの生物学的利用能がより高いので、ユーグレナ由来の純粋で改変されていないベーター１，３－グルカンの使用は、抽出及び／又は精製過程の間に改変を受ける、他の生物から得られる可溶化改変ベータグルカンと比べて有利である。幾つかの実施形態では、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、純度が８５％を超える、純度が９０％を超える、純度が９２％を超える、純度が９４％を超える、純度が９５％を超える、純度が９６％を超える、純度が９７％を超える、純度が９８％を超える、又は純度が９９％を超える。

【００７７】

高脂血症を治療する方法

アウレオバシジウム・プルランス（Aureobasidiumpullulans）に由来するベータグルカンの経口投与は、マウスの高脂肪飼料（ＨＦＤ）誘発脂肪肝の発症を予防することが最近判明した（Aoki，S. et al. Scientific Reports 2015，5，10457）。アウレオバシジウム・プルランスに由来するベータグルカンは、ベーター１，３－グリコシド結合とベーター１，６－グリコシド結合の両方からなる。その研究では、コレステロール合成、ＨＭＧＲ、及びコレステロール分解、ＣＹＰ７Ａ１、のための律速酵素がマウスにおいて有意に上方制御されていた。その研究の著者は、脂肪肝、肝臓障害、及びコレステロールレベルの改善が見られたことについて考えられる分子基盤として、ＣＹＰ７Ａ１ ｍＲＮＡ発現の上方制御を具体的に指摘した。またＩＬ－６の誘発も、マウスにおけるＨＦＤ誘発脂肪肝の予防に関与していた。酵母由来のベータグルカンにかかわる別の研究では、マウスのコレステロール血漿レベルの低下がマクロファージによって媒介されることが提案された（Vetvicka，V. et al. J. of Immunotoxicology，2009，6，30-35）。明らかに、ベータグルカンが免疫系を調節し、そして次にコレステロールレベルを調節する正確な分子メカニズムは複雑であり、ベータグルカンの正確な構造に依存しうる。

【００７８】

高脂血症又は異常に高い血中コレステロール若しくはトリグリセリドのレベルは、心臓発作や心血管疾患のリスクを大きくする。高脂血症は、高脂肪又は高コレステロールの食事、肥満、又は定期的な運動の不足を含む、遺伝的要因又はある特定の健康若しくは生活習慣要因に起因しうる。高脂血症は、血中コレステロール（すなわち、高コレステロール血症）又は血中トリグリセリド（高トリグリセリド血症）レベルの上昇をもたらすいずれの疾患も含む。コレステロール及びトリグリセリドは、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）及び高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）を含むリポタンパク質と結合している。ＬＤＬは、しばしば「悪い」コレステロールと呼ばれ、血管の壁に集まり、プラークの成長及びアテローム性動脈硬化症を引き起こしうる。対照的に、ＨＤＬ（しばしば「良い」コレステロールと呼ばれる）は、血流を通して脂肪を、細胞、動脈壁、及び組織から移動させる。ＨＤＬ粒子の濃度が増加すると、動脈壁内のアテローム性動脈硬化症の蓄積が減少する。発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、高脂血症を治療するためにヒトを含む対象に投与することができる又は高脂血症のリスクがある対象に予防的に投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナ由来に由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、ＬＤＬを低下させるためにヒトを含む対象に投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナ由来に由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、ＨＤＬを増加させるためにヒトを含む対象に投与することができる。高脂血症のリスクがある人としては、以前に高脂血症と診断されたことがある人、食事が高脂肪若しくは高コレステロールである人、又は親の一方若しくは両親が高脂血症をもつ人が挙げられるが、それらに限定されない。

【００７９】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、非アルコール性脂肪性肝疾患（ＮＡＦＬＤ）を治療するためにヒトを含む対象に投与することができる又はＮＡＦＬＤのリスクがある対象に予防的に投与することができる。ＮＡＦＬＤは、肥満及び２型糖尿病と密接に関連し、心血管疾患の主要な危険因子であることが知られている。

【００８０】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、メタボリックシンドロームを治療するためにヒトを含む対象に投与することができる又はメタボリックシンドロームのリスクがある対象に予防的に投与することができる。メタボリックシンドロームは、血圧の上昇、高い血糖値、過剰な体脂肪、異常なコレステロールレベルを含む、同時に起こって心疾患、脳卒中、及び糖尿病のリスクを高める一連の状態を指す。

【００８１】

本明細書に記載の発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）の投与は、血中コレステロール及びトリグリセリドレベルを低下させることが示されている（実施例７を参照されたい）。そのような投与は、例えば、食用組成物若しくは経口医薬製剤を投与することによって経口であることもでき、又は例えば、静脈内医薬製剤を投与することによって静脈内注射であることもできる。吸入などの代替的な投与経路も企図される。経口食用組成物又は経口医薬製剤は、本明細書に記載の発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来する精製又は非精製ベーター１，３－グルカンのいずれかを含む。一般に、静脈内医薬製剤は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来する精製ベーター１，３－グルカンを含む。典型的には、吸入に適した医薬製剤は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来する精製ベーター１，３－グルカンを含み、例えば、鼻スプレーによって投与することができる。食用組成物又は医薬製剤は、高脂血症の治療を増強するために、スタチン、ニコチン酸、胆汁酸樹脂、フィブリン酸誘導体、又はコレステロール吸収阻害剤の１つ以上と併用して投与することができる。

【００８２】

高脂血症の治療のためのベーター１，３－グルカンを作るのに有用な発酵ユーグレナは一般に、増殖及びベーター１，３－グルカンの産生のための栄養素を提供する増殖培地に依存する。ユーグレナは完全又は部分的な光曝露で増殖しうることが企図されるが、発酵を利用して増殖させるユーグレナは従属栄養的に増殖させることが一般に好ましい。発酵の間に、増殖しているユーグレナはベーター１，３－グルカンを効率的に産生する。幾つかの実施形態では、ユーグレナ細胞は、約３０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約３０重量％～約４０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約５０重量％のベーター１，３－グルカン、約６０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカンでベーター１，３－グルカンを蓄積する。幾つかの実施形態では、ユーグレナ細胞は、約５０重量％～約６０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約５５重量％のベーター１，３－グルカンでベーター１，３－グルカンを蓄積する。

【００８３】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、高脂血症を治療するために精製された形又は未精製の形で対象に投与される。例えば、発酵を利用して増殖させたユーグレナバイオマスは、高脂血症を治療するために対象に経口で投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナは有効量のベーター１，３－グルカンを含有するので、ユーグレナバイオマスは、ベーター１，３－グルカンを精製しな

くても血中コレステロールレベル又は血中トリグリセリドレベルを低下させるのに有効である。これは、発酵によって増殖させたユーグレナによって作られるベーター１，３－グルカンの高い生物学的利用能に一部起因する。対照的に、酵母によって作られるベータグルカンは酵母の細胞壁と密に結合し、生物学的に利用可能なベータグルカンの量がより少ない。

【００８４】

例えば、ユーグレナバイオマスは、血中コレステロール値及び／又は血中トリグリセリドレベルを低下させるための経口で投与される食用組成物の形で提供される。食用組成物は、食品であってもよく、栄養補助食品であってもよい。摂取を助けるために、ユーグレナバイオマスは、シート、ペースト、クリーム、粉末、カプセル、錠剤、又は他の食用固体若しくは液体（懸濁液など）に加工され、単独でまた別の食品と組み合わせて摂取することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ユーグレナバイオマスは、栄養シェイクなどの飲料、栄養バー、焼き菓子、又はシリアルの形で投与される。

【００８５】

１つの例示的な実施形態では、ユーグレナバイオマスを乾燥させて、それを経口投与用に調製する。例えば、ユーグレナバイオマスは、バイオマスを凍結乾燥させること、オーブン、ダブルドラム乾燥機、若しくは同様の乾燥装置でバイオマスを加熱すること、又はバイオマスに真空を適用することによって、約４０％以下、約３０％以下、約２５％以下、約２０％以下、約１５％以下、約１０％以下、約５％以下、約４％以下、約３％以下、約２％以下、又は約１％以下の含水率に乾燥することができる。随意に、ユーグレナバイオマスを乾燥させる前又は乾燥させた後に、バイオマスは粉末に加工される。例えば、ユーグレナ細胞は溶液中に懸濁され、せん断ミキサーで粉砕され、乾燥されて粉末が作られる。幾つかの実施形態では、粉末ユーグレナバイオマスは、平均粒径が、約１０００ミクロン以下、約９００ミクロン以下、約８００ミクロン以下、約７００ミクロン以下、約６００ミクロン以下、約５００ミクロン以下、約４００ミクロン以下、約３００ミクロン以下、約２５０ミクロン以下、約２００ミクロン以下、約１００ミクロン以下、約５０ミクロン以下、約２５ミクロン以下、約１５ミクロン以下、約１０ミクロン以下、約５ミクロン以下、約３ミクロン以下、約２ミクロン以下、約１ミクロン以下、又は約０．５ミクロン以下に加工される。次いで、乾燥及び／又は粉末ユーグレナバイオマスを、対象の血中コレステロールレベル及び／又は血中トリグリセリドレベルを低下させるために、直接又は別の食用組成物と混合することによって対象に経口で投与することができる。

【００８６】

経口で投与されるユーグレナバイオマスは、ベーター１，３－グルカンにくわえて栄養補助剤をさらに含むことができる。栄養補助剤は、ユーグレナバイオマスに予め存在していてもよく、ユーグレナバイオマスに添加されてもよい。例示的な追加補助剤としては、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、並びにプテロスチルベンが挙げられる。これらの追加補助剤は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンとは独立して又は相乗的に機能して、血中コレステロールレベル及び／又は血中トリグリセリドレベルを低下させることができる。さらなる成分としては、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳のいずれかが挙げられる。

【００８７】

経口で投与されるユーグレナバイオマスは、医薬的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。医薬的に許容可能な賦形剤の例としては、充填剤、結合剤、コーティング剤、防腐剤、潤滑剤、香料、甘味料、着色剤、界面活性剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、又は安定剤が挙げられる。医薬的に許容される充填剤の例としては、セルロース、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、及びポテトデンプンが挙げられる。医薬的に許容される結合剤の例としては、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、及びセルロースが挙げられる。医薬的に許容されるコーティング剤の例としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、及びゼラチンが挙げられる。医薬的に許容される崩壊剤の例としては、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、及びデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられる。医薬的に許容される潤滑剤の例としては、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸が挙げられる。医薬的に許容される防腐剤の例としては、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、及びソルビン酸が挙げられる。医薬的に許容される甘味料の例としては、スクロース、サッカリン、アスパルテーム、又はソルビトールが挙げられる。医薬的に許容される緩衝剤の例としては、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、又は酒石酸塩が挙げられる。

【００８８】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、血中コレステロールレベル及び／又は血中トリグリセリドレベルを低下させるために精製した形態で対象に投与することもできる。幾つかの実施形態では、ベーター１，３－グルカンは、純度が８５％を超える、純度が９０％を超える、純度が９２％を超える、純度が９４％を超える、純度が９５％を超える、純度が９６％を超える、純度が９７％を超える、純度が９８％を超える、又は純度が９９％を超えるようにユーグレナから精製される。一般に、ベーター１，３－グルカンは、ユーグレナ細胞を溶解し、ベーター１，３－グルカンを単離することによって抽出される。ユーグレナ細胞は、超音波処理又は高圧ホモジナイゼーションを用いて溶解することができる。随意に、溶解を助けるために、溶解ステップの間に追加の化学薬品が含まれるが、そのような化学薬品は必ずしも必要ではない。溶解ステップの間に含まれる例示的な追加化学薬品としては、界面活性剤（ドデシル硫酸ナトリウムなど）、酵素、塩基（水酸化ナトリウムなど）、又は酸（酢酸若しくは塩酸など）が挙げられる。ベーター１，３－グルカンは、ろ過又は重力分離（重力沈降若しくは遠心分離など）を用いて、溶解したユーグレナ細胞から単離することができる。より高いレベルの純度を得るために、単離されたベーター１，３－グルカンは、例えば、水溶液又はエタノールで洗浄される。

【００８９】

さらに、精製ベーター１，３－グルカンは、血清コレステロールレベル又は血清トリグリセリドレベルを低下させるその効力を高めるように改変することもできる。例えば、ベーター１，３－グルカンは、硫酸化、ピリジニウム部分と結合させる、又はカチオン性部分（ジメチルエタノールアミン（ＤＭＡＥ）など）と結合させることができる。

【００９０】

ユーグレナバイオマスと同様に、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、血中コレステロール値及び／又は血中トリグリセリド値を低下させるための食品や栄養補助食品などの食用組成物の形で経口投与することができる。精製ベーター１，３－グルカンは、ペースト、粉末、カプセル、錠剤、又は液体（懸濁液など）として提供することができ、単独で投与されうる又は別の食品と混合されうる。例えば、精製ベーター１，３－グルカンは、栄養シェイクなどの飲料、栄養バー、焼き菓子、又はシリアルの形で経口投与される。

【００９１】

組成物中の経口で投与される精製ベーター１，３－グルカンは、１つ以上の追加補助剤、例えば、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、並びにプテロスチルベンをさらに含むことができる。さらなる成分としては、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳のいずれかが挙げられる。

【００９２】

また、精製ベーター１，３－グルカンは、血中コレステロールレベル及び／又は血中トリグリセリドレベルを低下させるためのヒトなどの対象に投与される医薬製剤の形でも用いることができる。医薬製剤は医薬的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。例示的医薬的に許容可能な賦形剤としては、充填剤、結合剤、コーティング剤、防腐剤、潤滑剤、香料、甘味料、着色剤、界面活性剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、又は安定剤が挙げられる。医薬的に許容される充填剤の例としては、セルロース、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、及びポテトデンプンが挙げられる。医薬的に許容される結合剤の例としては、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、及びセルロースが挙げられる。医薬的に許容されるコーティング剤の例としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、及びゼラチンが挙げられる。医薬的に許容される崩壊剤の例としては、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、及びデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられる。医薬的に許容される潤滑剤の例としては、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸が挙げられる。医薬的に許容される防腐剤の例としては、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、及びソルビン酸が挙げられる。医薬的に許容される甘味料の例としては、スクロース、サッカリン、アスパルテーム、又はソルビトールが挙げられる。医薬的に許容される緩衝剤の例としては、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、又は酒石酸塩が挙げられる。

【００９３】

医薬製剤は、血中コレステロールレベル及び／又は血中トリグリセリドレベルを低下させるために、対象に経口投与又は対象に静脈内投与することができる。経口で投与される医薬製剤は、錠剤、カプセル、又はシロップなどで固体又は液体として投与することができる。静脈内に投与される医薬製剤については、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、生理食塩水などの水溶液に懸濁又は溶解される。

【００９４】

発酵を利用して増殖させたユーグレナ由来に由来するベーター１，３－グルカンを含有する食用組成物又は医薬製剤の有効量の投与は、投与レジメンの経過後に血清コレステロールレベルを低下させることができる。例えば、血清コレステロールレベルの低下は、７日後、１４日後、２１日後、３０日後、又は６０日後に測定することができる。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの投与は、有効量の３０日後の血清コレステロールレベルの約５％以上の減少、有効量の３０日後の血清コレステロールレベルの約１０％以上の減少、有効量の３０日後の血清コレステロールレベルの約１５％以上の減少、有効量の３０日後の血清コレステロールレ

ベルの約２０％以上の減少、有効量の３０日後の血清コレステロールレベルの約２５％以上の減少、有効量の３０日後の血清コレステロールレベルの約３０％以上の減少、又は有効量の３０日後の血清コレステロールレベルの約３５％以上の減少をもたらす。

【００９５】

同様に、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する食用組成物又は医薬製剤の有効量の投与は、投与レジメンの経過後に血清トリグリセリドレベルを低下させることができる。幾つかの実施形態では、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの投与は、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約５％以上の減少、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約１０％以上の減少、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約１５％以上の減少、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約２０％以上の減少、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約２５％以上の減少、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約３０％以上の減少、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約３５％以上の減少、有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約４０％以上の減少、又は有効量の３０日後の血清トリグリセリドレベルの約４５％以上の減少をもたらす。

【００９６】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する経口投与される組成物、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する経口投与される医薬製剤、及び発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する静脈内投与される医薬製剤の各々は、血清コレステロールレベル及び／又は血清トリグリセリドレベルを低下させるのに有効な投与量で投与される。そのような投与レジメンは一般に、組成物又は医薬製剤のそれぞれに関する体重１ｋｇあたりのベーター１，３－グルカンの量として理解される。幾つかの実施形態では、組成物又は医薬製剤は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約２ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１０ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約２５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約５０ｍｇ以上のベーター１，３－グルカンの有効量で対象に投与される。幾つかの実施形態では、組成物又は医薬組成物の有効量は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカンである。本明細書において記載されているように、有効量の組成物又は医薬製剤は１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。

【００９７】

幾つかの実施形態では、組成物又は医薬組成物の有効量は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１００ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり

約７５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１００ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカンである。本明細書において記載されているように、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。

【００９８】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する組成物又は医薬製剤の有効量は、血清コレステロールレベル及び／又は血清トリグリセリドレベルを低下させるために１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む食用又は医薬組成物の有効量は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与される。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む食用又は医薬組成物の有効量は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与される。

【００９９】

免疫機能を調節する方法

ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、免疫機能を調節するためにヒトなどの対象に投与することができる。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの対象への投与は、サイトカイン産生、抗体価、並びに免疫系細胞の活性（例えば、食作用及びナチュラルキラー細胞の細胞傷害性の速度）の測定可能な増加をもたらし、免疫機能の調節を示す。また、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与された対象は感染症に対する反応の増強も示す。

【０１００】

免疫機能を調節するのに有用なユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、本明細書に記載の方法によってユーグレナを発酵させることによって増やされる。発酵ユーグレナは一般に、増殖及びベーター１，３－グルカンの産生のための栄養素を提供する増殖培地に依存する。ユーグレナは完全又は部分的な光曝露で増殖しうることが企図されるが、発酵を利用して増殖させるユーグレナは従属栄養的に増殖させることが一般に好ましい。発酵の間に、増殖しているユーグレナはベーター１，３－グルカンを効率的に産生する。幾つかの実施形態では、ユーグレナ細胞は、約３０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約３０重量％～約４０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重

量％～約５０重量％のベーター１，３－グルカン、約６０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカンでベーター１，３－グルカンを蓄積する。幾つかの実施形態では、ユーグレナ細胞は、約５０重量％～約６０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約５５重量％のベーター１，３－グルカンでベーター１，３－グルカンを蓄積する。

【０１０１】

ユーグレナに由来し、発酵を利用して増殖させたベーター１，３－グルカンは、免疫機能を調節するために精製された形又は未精製の形で対象に投与される。例えば、発酵を利用して増殖させたユーグレナバイオマスは、免疫機能を調節するために対象に経口で投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナは有効量のベーター１，３－グルカンを含有するので、ユーグレナバイオマスは、ベーター１，３－グルカンを精製しなくても有効である。これは、ユーグレナによって作られるベーター１，３－グルカンの高い生物学的利用能に一部起因する。対照的に、酵母によって作られるベータグルカンは酵母の細胞壁と密に結合し、容易に生物学的に利用できるベータグルカンの量がより少ない。

【０１０２】

ユーグレナバイオマスは、免疫機能を調節するために経口で投与される食用組成物の形で提供される。食用組成物は、食品であってもよく、栄養補助食品であってもよい。摂取を助けるために、ユーグレナバイオマスは、シート、ペースト、クリーム、粉末、カプセル、錠剤、又は他の食用固体若しくは液体（懸濁液など）に加工され、単独で又はいくつかの別の食品と組み合わせて摂取することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ユーグレナバイオマスは、栄養シェイクなどの飲料、栄養バー、焼き菓子、又はシリアルの形で投与される。

【０１０３】

１つの例示的な実施形態では、ユーグレナバイオマスは乾燥されて、それを経口投与用に調製する。例えば、ユーグレナバイオマスは、バイオマスを凍結乾燥させること、オーブン、バイオマスを加熱すること、又はバイオマスに真空を適用することによって、４０％以下、約３０％以下、約２５％以下、約２０％以下、約１５％以下、約１０％以下、約５％以下、約４％以下、約３％以下、約２％以下、又は約１％以下の含水率に乾燥することができる。随意に、ユーグレナバイオマスを乾燥させる前又は後に、バイオマスは粉末に加工することができる。例えば、ユーグレナ細胞は溶液中に懸濁され、せん断ミキサーで粉砕され、乾燥されて粉末を生じる。粉末ユーグレナバイオマスは、約１０００ミクロン以下、約９００ミクロン以下、約８００ミクロン以下、約７００ミクロン以下、約６００ミクロン以下、約５００ミクロン以下、約４００ミクロン以下、約３００ミクロン以下、約２５０ミクロン以下、約２００ミクロン以下、約１００ミクロン以下、約５０ミクロン以下、約２５ミクロン以下、約１５ミクロン以下、約１０ミクロン以下、約５ミクロン以下、約３ミクロン以下、約２ミクロン以下、約１ミクロン以下、又は約０．５ミクロン以下の平均粒径を有するように加工することができる。次いで、乾燥及び／又は粉末ユーグレナバイオマスは、対象の免疫機能を調節するために、直接又は別の食用組成物と混合することによって、対象に経口で投与することができる。

【０１０４】

経口で投与されるユーグレナバイオマスは、ベーター１，３－グルカンにくわえて栄養補助剤をさらに含むことができる。栄養補助剤は、ユーグレナバイオマスに予め存在していてもよく、ユーグレナバイオマスに添加されてもよい。例示的な追加補助剤としては、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィ

ドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、並びにプテロスチルベンが挙げられる。これらの追加補助剤は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンとは独立して又は相乗的に機能して、免疫機能を調節することができる。さらなる成分としては、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳のいずれかが挙げられる。

【０１０５】

経口で投与されるユーグレナバイオマスは、医薬的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。例示的医薬的に許容可能な賦形剤としては、充填剤、結合剤、コーティング剤、防腐剤、潤滑剤、香料、甘味料、着色剤、界面活性剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、又は安定剤が挙げられる。医薬的に許容される充填剤の例としては、セルロース、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、及びポテトデンプンが挙げられる。医薬的に許容される結合剤の例としては、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、及びセルロースが挙げられる。医薬的に許容されるコーティング剤の例としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、及びゼラチンが挙げられる。医薬的に許容される崩壊剤の例としては、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、及びデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられる。医薬的に許容される潤滑剤の例としては、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸が挙げられる。医薬的に許容される防腐剤の例としては、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、及びソルビン酸が挙げられる。医薬的に許容される甘味料の例としては、スクロース、サッカリン、アスパルテーム、又はソルビトールが挙げられる。医薬的に許容される緩衝剤の例としては、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、又は酒石酸塩が挙げられる。

【０１０６】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、機能を調節するために精製した形で対象に投与することもできる。幾つかの実施形態では、ベーター１，３－グルカンは、純度が８５％を超える、純度が９０％を超える、純度が９２％を超える、純度が９４％を超える、純度が９５％を超える、純度が９６％を超える、純度が９７％を超える、純度が９８％を超える、又は純度が９９％を超えるようにユーグレナから精製される。一般に、ベーター１，３－グルカンは、ユーグレナ細胞を溶解し、ベーター１，３－グルカンを単離することによって抽出される。ユーグレナ細胞は、超音波処理又は高圧ホモジナイゼーションを用いて溶解することができる。随意に、溶解を助けるために溶解ステップの間に追加の化学薬品が含まれるが、そのような化学薬品は必ずしも必要ではない。溶解ステップの間に含まれる例示的な追加化学薬品としては、界面活性剤（ドデシル硫酸ナトリウムなど）、酵素、塩基（水酸化ナトリウムなど）、又は酸（酢酸若しくは塩酸など）が挙げられる。ベーター１，３－グルカンは、ろ過又は重力分離（重力沈降若しくは遠心分離など）を用いて、溶解したユーグレナ細胞から単離することができる。より高いレベルの純度を得るために、単離されたベーター１，３－グルカンは、例えば、水溶液又はエタノールで洗浄される。

【０１０７】

さらに、精製ベーター１，３－グルカンは、免疫機能の調節因子としてのその効力を高めるように改変することもできる。例えば、ベーター１，３－グルカンは、硫酸化、ピリジニウム部分と結合、又はカチオン性部分（ジメチルエタノールアミン（ＤＭＡＥ）など）と結合させることができる。

【０１０８】
ユーグレナバイオマスと同様に、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、免疫機能を調節するために食品や栄養補助食品などの食用組成物の形で経口投与することができる。精製ベーター１，３－グルカンは、ペースト、粉末、カプセル、錠剤、又は液体（懸濁液など）として提供することができ、単独で投与されうる又は別の食品と混合されうる。例えば、精製ベーター１，３－グルカンは、栄養シェイクなどの飲料、栄養バー、焼き菓子、又はシリアルの形で経口投与することができる。

【０１０９】
組成物中の経口投与される精製ベーター１，３－グルカンは、１つ以上の追加補助剤、例えば、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、並びにプテロスチルベンをさらに含むことができる。さらなる成分としては、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳のいずれかが挙げられる。

【０１１０】
また、精製ベーター１，３－グルカンは、免疫機能を調節するためのヒトなどの対象に投与される医薬製剤の形でも用いることができる。医薬製剤は医薬的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。例示的医薬的に許容可能な賦形剤としては、充填剤、結合剤、コーティング剤、防腐剤、潤滑剤、香料、甘味料、着色剤、界面活性剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、又は安定剤が挙げられる。医薬的に許容される充填剤の例としては、セルロース、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、及びポテトデンプンが挙げられる。医薬的に許容される結合剤の例としては、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、及びセルロースが挙げられる。医薬的に許容されるコーティング剤の例としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、及びゼラチンが挙げられる。医薬的に許容される崩壊剤の例としては、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、及びデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられる。医薬的に許容される潤滑剤の例としては、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸が挙げられる。医薬的に許容される防腐剤の例としては、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、及びソルビン酸が挙げられる。医薬的に許容される甘味料の例としては、スクロース、サッカリン、アスパルテーム、又はソルビトールが挙げられる。医薬的に許容される緩衝剤の例としては、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、又は酒石酸塩が挙げられる。

【０１１１】
医薬製剤は、免疫機能を調節するために、対象に経口投与又は対象に静脈内投与することができる。吸入などの代替的な投与経路も企図される。経口で投与される医薬製剤は、錠剤、カプセル、又はシロップなどで固体又は液体として投与することができる。静脈内に投与される医薬製剤については、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、生理食塩水などの水溶液に懸濁又は溶解される。吸入に適した医薬製剤は、例えば、鼻スプレーによって投与することができる。食用組成物又は医薬製剤は、アレルギー、糖尿病、又は感染症の治療を増強するために、１つ以上の薬物と併用して投与することができる

。例えば、食用組成物又は医薬製剤は、抗ヒスタミン剤、インスリン、又は抗生物質と併用して投与することができる。

【０１１２】

有効量の発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを投与することによって、例えば、本明細書に記載の食用組成物又は医薬製剤を投与することによって、対象の免疫機能を調節することは、多くの健康上の利益をもたらす。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを含有する組成物及び製剤は、疾患の治療又は予防的治療のために免疫機能を調節するように投与することができる。例えば、組成物又は医薬製剤の投与は、対象の自己免疫反応を調節する、対象の血糖値を調節する、対象の感染症を調節する、又は対象の炎症を調節するのに用いることができる。

【０１１３】

ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）を含有する組成物又は医薬製剤は、糖尿病、クローン病、関節リウマチ、線維筋痛、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、硬皮症、又は多発性硬化症に関連する自己免疫反応を調節するためにヒトを含む対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、食用組成物又は医薬組成物は、糖尿病、クローン病、関節リウマチ、線維筋痛、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、硬皮症、又は多発性硬化症の進行を抑えるために予防的に投与される。

【０１１４】

また、本明細書に記載の発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）を含有する組成物又は医薬製剤は、対象の血糖値を調節するために対象に投与することができる。ベーター１，３－グルカンを含有する組成物又は医薬製剤の投与後、食後血糖はベーター１，３－グルカンの投与がない場合と比べて概して低い。血糖、特に食後血糖の調節は、１型及び２型糖尿病患者の両方における一般的な糖尿病治療及び管理にとって重要である。血糖値は、過去２～３ヶ月の平均血糖値を反映するＡ１Ｃ検査を用いて測定することができる。具体的には、Ａ１Ｃ検査は糖でコーティングされた（すなわち糖化された）ヘモグロビンの％割合を測定する。したがって、本明細書に記載のユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する組成物及び医薬組成物は、糖尿病患者の高血糖症を治療するのに有用である。幾つかの実施形態では、本明細書に記載のユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する食用組成物又は医薬製剤は、高血糖症を抑えるために対象に予防的に投与される。

【０１１５】

また、組成物又は医薬製剤中の発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、被験者における細菌感染症、真菌感染症、又はウイルス感染症などの感染症を調節するために対象に投与することができる。本明細書に記載のベーター１，３－グルカンを含有する組成物又は医薬製剤の投与は、自然免疫機能及び適応免疫機能の両方の活性の増加をもたらす。例えば、組成物又は医薬製剤の投与は、好中球の食作用、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害性、及び抗体産生の増加をもたらす。これらの調節された免疫機能のそれぞれが感染症に影響を及ぼす。発酵によって増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する組成物又は医薬製剤は、感染症を治療するために感染症をもつ対象に投与することができ、又は感染症のリスクを限定するために対象に予防的に投与することができる。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）を含む抗生物質耐性菌のリスクがあるので、感染症の治療又は予防的治療におけるこれらの進歩は細菌感染症にとって特に重要である。

【０１１６】

本明細書に記載の発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）を含む組成物又は医薬製剤の投与は、対象における炎症を調節するためにヒトを含む対象に投与することができる。投与されたベーター１，３－グルカンは、炎症性サイトカインの産生を抑制するように機能し、対象における炎症反応の調節をもたらす。幾つかの実施形態では、炎症はアレルギー又は喘息に関連する。本明細書に記載のユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物又は医薬製剤は、アレルギー又は喘息などの炎症を治療するために対象に投与することができる。くわえて、本明細書に記載のユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物又は医薬製剤は、アレルギー又は喘息などの炎症を抑えるために対象に予防的に投与することができる。

【０１１７】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する経口投与される組成物、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する経口投与される医薬製剤、及び発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する静脈内投与される医薬製剤の各々は、免疫機能を調節するのに有効な投与量で投与される。そのような投与レジメンは一般に、組成物又は医薬製剤のそれぞれに関する体重１ｋｇあたりのベーター１，３－グルカンの量として理解される。幾つかの実施形態では、組成物又は医薬製剤は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約２ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１０ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約２５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約５０ｍｇ以上のベーター１，３－グルカンの有効量で対象に投与される。その他の実施形態では、対象の免疫機能を調節するため、疾患を治療するため、予防的投与のために使用される組成物又は医薬組成物の有効量は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカンであることができる。本明細書において記載されているように、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。

【０１１８】

幾つかの実施形態では、組成物又は医薬組成物の有効量は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１００ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター－

１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１００ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカンである。本明細書において記載されているように、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。

【０１１９】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する組成物又は医薬製剤の有効量は、免疫機能を調節するために１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む食用又は医薬組成物の有効量は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与される。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む食用又は医薬組成物の有効量は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与される。

【０１２０】

腸の炎症を治療する方法

炎症はベーター１，３－グルカンによって調節される可能性がある。最近の研究では、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンであるパラミロンの経口投与が、マウスのアトピー性皮膚炎様皮膚病変の発症を抑制することが判明した（J. Vet. Med. Sci. 2010, 72(2), 755-763）。ヒトにおいて、アトピー性皮膚炎は皮膚の慢性及び再発性の炎症を特徴とする一般的な皮膚疾患であり、かゆみ、赤み、腫れ、皮膚のひび割れをもたらす。アトピー性皮膚炎の正確な原因は不明であるが、考えられる因子としては、遺伝、免疫系の機能不全、環境曝露が挙げられる。該マウス研究の著者らは、パラミロンの経口投与が血清中のＩＬ－４及びＩＦＮ－γレベルを低下させ、また皮膚病変におけるＩＬ－１８及びＩＬ－１２レベルを低下させることを見出した。これらの結果は、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンが、ある特定のサイトカイン経路の活性化によってマウスのアトピー性皮膚炎様皮膚病変を抑制しうることを示唆している。しかし、ベーター１，３－グルカンが炎症一般を調節する厳密なメカニズムは依然として解明されていない。くわえて、ベーター１，３－グルカンは、さまざまな経路によってさまざまな身体器官の炎症を調節しうる。

【０１２１】

腸の炎症は消化管の全部又は一部を冒す可能性がある。腸の炎症は、自己免疫疾患の一種であり、小腸、大腸、腸、又はそれらのいずれかの組み合わせの炎症を指す。腸の炎症症状としては、重度又は慢性の腹痛、下痢、突然の体重減少、食欲不振、及び直腸出血が挙げられる。くわえて、腸炎症を有する個人は、関節痛、皮膚発疹、眼の痛み、口の痛み、及び発熱などの消化管とは無関係の症状も有しうる。腸の炎症は、生命を脅かす合併症を引き起こしうるだけでなく、個人の結腸がんのリスクを増加させうる。腸の炎症の正確

な根本的な生理的原因は不明であるが、一般には、遺伝的及び環境的要因が個人の免疫応答をシフトさせ、異常な免疫応答が生じると考えられている。

【０１２２】

炎症性腸疾患は、大腸炎及びクローン病を含む大腸及び小腸の炎症疾患の群である。クローン病は腸壁の全厚に影響を与えるのに対して、大腸炎は結腸の上皮内層に限定される。大腸炎の具体例としては、潰瘍性大腸炎、巨視的大腸炎（macroscopic colitis）、リンパ球性大腸炎、膠原線維性大腸炎、空置大腸炎、化学性大腸炎（chemical colitis）、虚血性大腸炎、及び感染性大腸炎が挙げられる。本明細書で論じられるように、腸の炎症を治療するためのベーター１，３－グルカンの使用は、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病を治療するためのベーター１，３－グルカンの使用を同様に指す。また、本明細書で論じられるように、腸の炎症を治療するためのベーター１，３－グルカンの使用は、腸炎症を予防的に治療するためのベーター１，３－グルカンの使用を同様に指す。同様に、本明細書で論じられるように、腸の炎症を予防的に治療するためのベーター１，３－グルカンの使用は、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病を予防的に治療するためのベーター１，３－グルカンの使用を同様に指す。

【０１２３】

潰瘍性大腸炎は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）の主要な形態の１つである。これは、結腸の内層に炎症及び潰瘍を引き起こす慢性疾患である。他の主要な形態であるが、クローン病は小腸（回腸）の終わりの部分及び結腸の始まりの部分を冒すことが最も多く、潰瘍性大腸炎は典型的には結腸に限定される。潰瘍性大腸炎は、ほとんどの場合ゆっくりと進行し、時間とともに悪化する可能性がある。症状は軽度から重度でありうる。ほとんどの人には、数週間又は数年間続きうる寛解の期間がある。ヒト大腸炎を研究するための理想的な動物モデルはないが、化学的に誘発されたさまざまな大腸炎動物モデルの中で、デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）誘発大腸炎モデルは、その単純さと主にヒトの潰瘍性大腸炎との類似性のために最も広く使用されている（Comp. Clin. Pathol. 2010, 19, 235-239）。

【０１２４】

ＤＳＳは主に大腸、特に結腸の中間位及び遠位の３分の１に影響する。腸上皮バリアの破壊、それによる管腔内細菌又は細菌抗原の粘膜への進入及び免疫活性化がヒト大腸炎の主要な事象である。同様の現象がＤＳＳ大腸炎で起こるが、その場合、結腸上皮に直接的に有害な硫酸化多糖類は上皮細胞損傷を引き起こし、結果として生じる免疫応答は結腸上皮全体の粘膜バリア機能を変化させる。ＤＳＳを飲料水中でマウスに短時間投与すると、結腸に限定され、且つ潰瘍、陰窩の喪失、及び顆粒球の浸潤を特徴とする非常に再現性のある急性炎症が誘発される。ＤＳＳ大腸炎モデルは、長期にわたる潰瘍性大腸炎の患者に起こるような、結腸の炎症に関連して発症する結腸がんの研究にも広く使用されている。ＤＳＳ誘発大腸炎は、主に、上皮の破壊並びに獲得免疫の非存在下でのマクロファージ及び好中球の活性化によって引き起こされるが、Ｔ細胞応答は炎症反応を悪化させる可能性がある。実際、強力なＴ細胞応答がヒトの潰瘍性大腸炎に関与している。したがって、ＤＳＳモデルを用いてげっ歯類で試験された組成物又は医薬に関する良い方向の治療結果は、ヒト潰瘍性大腸炎の治療に対する治療上の価値を示唆しうる。重要なことに、薬剤が抗炎症性を有し、ＤＳＳ誘発性大腸炎からの保護をもたらす場合、その薬剤は他のＩＢＤにおいて治療上の価値がある可能性がある。

【０１２５】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカン（例えば、ユーグレナバイオマス、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン、又はユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカン、又はそれらの組み合わせ）は、腸の炎症を治療するためにヒトを含む対象に投与することができる、又は腸の炎症のリスクがある対象に予防的に投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、炎症性腸疾患を治療するためにヒトを含む対象に投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、大腸

炎を治療するためにヒトを含む対象に投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、クローン病を治療するためにヒトを含む対象に投与することができる。腸の炎症のリスクがある人としては、以前に腸の炎症と診断されたことがある人又は親の一方若しくは両親が腸の炎症をもつ人が挙げられるが、それらに限定されない。

【０１２６】

本明細書において記載されているように、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの投与は、化学的に誘発された大腸炎からの保護をもたらす（実施例１２～１９を参照されたい）。そのような投与は、例えば、食用組成物若しくは経口医薬製剤を投与することによって経口であることもでき、又は例えば、静脈内医薬製剤を投与することによって静脈内注射であることもできる。吸入などの代替的な投与経路も企図される。経口食用組成物又は経口医薬製剤は、本明細書に記載の発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来する精製又は非精製ベーター１，３－グルカンのいずれかを含む。静脈内医薬製剤は一般に、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来する精製ベーター１，３－グルカンを含む。典型的には、吸入に適した医薬製剤は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来する精製ベーター１，３－グルカンを含み、例えば、鼻スプレーによって投与することができる。食用組成物又は医薬製剤は、腸の炎症の治療を増強するために、抗炎症薬、免疫抑制薬、又は抗生物質の１つ以上と併用して投与することができる。適切な薬物の例としては、メサラジン、ブデソニド、シクロスポリン、及びインフリキシマブが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２７】

腸の炎症の治療のためのベーター１，３－グルカンを作るのに有用な発酵ユーグレナは一般に、増殖及びベーター１，３－グルカンの産生のための栄養素を提供する増殖培地に依存する。ユーグレナは完全又は部分的な光曝露で増殖しうることが企図されるが、発酵を利用して増殖させるユーグレナは従属栄養的に増殖させることが一般に好ましい。発酵の間に、増殖しているユーグレナはベーター１，３－グルカンを効率的に産生する。幾つかの実施形態では、ユーグレナ細胞は、約３０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約３０重量％～約４０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約５０重量％のベーター１，３－グルカン、約６０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカンでベーター１，３－グルカンを蓄積する。幾つかの実施形態では、ユーグレナ細胞は、約５０重量％～約６０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約５５重量％のベーター１，３－グルカンでベーター１，３－グルカンを蓄積する。

【０１２８】

ユーグレナに由来し、発酵を利用して増殖させたベーター１，３－グルカンは、腸の炎症を治療するために精製された形又は未精製の形で対象に投与される。例えば、発酵を利用して増殖させたユーグレナバイオマスは、腸の炎症を治療するために対象に経口で投与することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナは有効量のベーター１，３－グルカンを含有するので、ユーグレナバイオマスは、ベーター１，３－グルカンを精製しなくても腸の炎症を治療するのに有効である。これは、発酵によって増殖させたユーグレナによって作られるベーター１，３－グルカンの高い生物学的利用能に一部起因する。具体的には、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは水に不溶性の顆粒に蓄積し、細胞壁構成成分と結合していない。対照的に、酵母によって作られるベータグルカンは酵母の細胞壁と密に結合し、生物学的に利用可能なベータグルカンの量がより少ない。幾つかの実施形態では、精製ベーター１，３－グルカンと比べて、未精製ベーター１，３－グルカンを含有する乾燥ユーグレナバイオマスのほうが、本明細書に記載の方法を用いて対象の腸の炎症を治療するのに有効である。

【０１２９】

ユーグレナバイオマスは、腸の炎症を治療するために経口で投与される食用組成物の形

で提供される。食用組成物は、食品であってもよく、栄養補助食品であってもよい。摂取を助けるために、ユーグレナバイオマスは、シート、ペースト、クリーム、粉末、カプセル、錠剤、又は他の食用固体若しくは液体（懸濁液など）に加工され、単独で又はいくつかの別の食品と組み合わせて摂取することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ユーグレナバイオマスは、栄養シェイクなどの飲料、栄養バー、焼き菓子、又はシリアルの形で投与される。

【０１３０】

１つの例示的な実施形態では、ユーグレナバイオマスは乾燥されて、それを経口投与用に調製する。例えば、ユーグレナバイオマスは、バイオマスを凍結乾燥させること、オーブン、ダブルドラム乾燥機若しくは同様の乾燥装置でバイオマスを加熱すること、又はバイオマスに真空を適用することによって、４０％以下、約３０％以下、約２５％以下、約２０％以下、約１５％以下、約１０％以下、約５％以下、約４％以下、約３％以下、約２％以下、又は約１％以下の含水率に乾燥することができる。随意に、ユーグレナバイオマスを乾燥させる間又は後に、バイオマスは粉末に加工することができる。例えば、ユーグレナ細胞は乾燥され、次いでせん断ミキサー又はハンマーミルで粉砕されて粉末が作られる。幾つかの実施形態では、粉末ユーグレナバイオマスは、約１０００ミクロン以下、約９００ミクロン以下、約８００ミクロン以下、約７００ミクロン以下、約６００ミクロン以下、約５００ミクロン以下、約４００ミクロン以下、約３００ミクロン以下、約２５０ミクロン以下、約２００ミクロン以下、約１００ミクロン以下、約５０ミクロン以下、約２５ミクロン以下、約１５ミクロン以下、約１０ミクロン以下、約５ミクロン以下、約３ミクロン以下、約２ミクロン以下、約１ミクロン以下、又は約０．５ミクロン以下の平均粒径に加工される。幾つかの実施形態では、ユーグレナバイオマスを乾燥させる前にユーグレナ細胞は破壊又は溶解される。例えば、ユーグレナ細胞は、乾燥前に水溶液中に懸濁され、細胞を破壊する高剪断力に曝され、次いで乾燥させることができる。随意に、乾燥バイオマスは上記のようにさらに粉砕されて、約１０００ミクロン以下の平均粒径を達成することができる。次いで、乾燥及び／又は粉末ユーグレナバイオマスは、対象の腸の炎症を治療するために、直接又は別の食用組成物と混合することによって、対象に経口で投与することができる。

【０１３１】

経口で投与されるユーグレナバイオマスは、ベーター１，３－グルカンにくわえて栄養補助剤をさらに含むことができる。栄養補助剤は、ユーグレナバイオマスに予め存在していてもよく、ユーグレナバイオマスに添加されてもよい。例えば、追加補助剤としては、金属、アミノ酸、酵素、プロバイオティクス、脂肪酸、オリゴ糖、ビタミン、及び免疫刺激物質が挙げられうる。例示的な追加補助剤としては、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、並びにプテロスチルベンが挙げられる。これらの追加補助剤は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンとは独立して又は相乗的に機能して、腸の炎症を治療することができる。さらなる成分としては、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳のいずれかが挙げられる。

【０１３２】

経口で投与されるユーグレナバイオマスは、医薬的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。例示的医薬的に許容可能な賦形剤としては、充填剤、結合剤、コーティング剤、防腐

剤、潤滑剤、香料、甘味料、着色剤、界面活性剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、又は安定剤が挙げられる。医薬的に許容される充填剤の例としては、セルロース、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、及びポテトデンプンが挙げられる。医薬的に許容される結合剤の例としては、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、及びセルロースが挙げられる。医薬的に許容されるコーティング剤の例としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、及びゼラチンが挙げられる。医薬的に許容される崩壊剤の例としては、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、及びデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられる。医薬的に許容される潤滑剤の例としては、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸が挙げられる。医薬的に許容される防腐剤の例としては、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、及びソルビン酸が挙げられる。医薬的に許容される甘味料の例としては、スクロース、サッカリン、アスパルテーム、及びソルビトールが挙げられる。医薬的に許容される緩衝剤の例としては、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、及び酒石酸塩が挙げられる。

【０１３３】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、腸の炎症を治療するために精製した形態で対象に投与することもできる。幾つかの実施形態では、ベーター１，３－グルカンは、純度が８５％を超える、純度が９０％を超える、純度が９２％を超える、純度が９４％を超える、純度が９５％を超える、純度が９６％を超える、純度が９７％を超える、純度が９８％を超える、又は純度が９９％を超えるようにユーグレナから精製される。一般に、ベーター１，３－グルカンは、ユーグレナ細胞を溶解し、ベーター１，３－グルカンを単離することによって抽出される。ユーグレナ細胞は、超音波処理又は高圧ホモジナイゼーションを用いて溶解することができる。随意に、溶解を助けるために溶解ステップの間に追加の化学薬品が含まれるが、そのような化学薬品は必ずしも必要ではない。溶解ステップの間に含まれる例示的な追加化学薬品としては、界面活性剤（ドデシル硫酸ナトリウムなど）、酵素、塩基（水酸化ナトリウムなど）、又は酸（酢酸若しくは塩酸など）が挙げられる。ベーター１，３－グルカンは、ろ過又は重力分離（重力沈降若しくは遠心分離など）を用いて、溶解したユーグレナ細胞から単離することができる。より高いレベルの純度を得るために、単離されたベーター１，３－グルカンは、例えば、水溶液又はエタノールで洗浄される。

【０１３４】

さらに、精製ベーター１，３－グルカンは、腸の炎症の調節におけるその効力を高めるように改変することもできる。例えば、ベーター１，３－グルカンは、硫酸化、ピリジニウム部分と結合、又はカチオン性部分（ジメチルエタノールアミン（ＤＭＡＥ）など）と結合させることができる。

【０１３５】

ユーグレナバイオマスと同様に、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、腸の炎症を治療するために食品や栄養補助食品などの食用組成物の形で経口投与することができる。精製ベーター１，３－グルカンは、ペースト、ゲル剤、粉末、カプセル、錠剤、又は液体（懸濁液など）として提供することができ、単独で投与されうる又は別の食品と混合されうる。例えば、精製ベーター１，３－グルカンは、栄養シェイクなどの飲料、栄養バー、焼き菓子、又はシリアルの形で経口投与することができる。

【０１３６】

組成物中の経口投与される精製ベーター１，３－グルカンは、１つ以上の追加補助剤、例えば、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、

ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、並びにプテロスチルベンをさらに含むことができる。さらなる成分としては、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳のいずれかが挙げられる。

【０１３７】

また、精製ベーター１，３－グルカンは、腸の炎症を治療するためのヒトなどの対象に投与される医薬製剤の形でも用いることができる。医薬製剤は医薬的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。例示的医薬的に許容可能な賦形剤としては、充填剤、結合剤、コーティング剤、防腐剤、潤滑剤、香料、甘味料、着色剤、界面活性剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、又は安定剤が挙げられる。医薬的に許容される充填剤の例としては、セルロース、リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、微結晶性セルロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルチトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、及びポテトデンプンが挙げられる。医薬的に許容される結合剤の例としては、ポリビニルピロリドン、デンプン、ラクトース、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、スクロース、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、及びセルロースが挙げられる。医薬的に許容されるコーティング剤の例としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、及びゼラチンが挙げられる。医薬的に許容される崩壊剤の例としては、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、及びデンプングリコール酸ナトリウムが挙げられる。薬理学的に許容される潤滑剤の例としては、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸が挙げられる。医薬的に許容される防腐剤の例としては、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、及びソルビン酸が挙げられる。医薬的に許容される甘味料の例としては、スクロース、サッカリン、アスパルテーム、及びソルビトールが挙げられる。医薬的に許容される緩衝剤の例としては、炭酸塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、酢酸塩、リン酸塩、及び酒石酸塩が挙げられる。

【０１３８】

医薬製剤は、腸の炎症を治療するために、対象に経口投与又は対象に静脈内投与することができる。経口で投与される医薬製剤は、錠剤、カプセル、又はシロップなどで固体又は液体として投与することができる。静脈内に投与される医薬製剤については、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、生理食塩水などの水溶液に懸濁又は溶解される。

【０１３９】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する食用組成物又は医薬製剤の有効量の投与は、投与レジメンの経過後に腸の炎症を治療することができる。例えば、腸の炎症に伴う症状の減少は、７日後、１４日後、２１日後、３０日後、又は６０日後に測定することができる。腸の炎症に伴う症状の減少としては、腹痛の減少、下痢の減少、体重減少の減少、食欲不振の減少、及び直腸出血の減少が挙げられる。これらの症状は、体重、便の硬さ、便血、及び結腸の長さによって測定することができる。腸の炎症に伴う症状の減少はまた、病理によって決定される免疫細胞の浸潤及び結腸への損傷の減少によっても測定される。本明細書において記載されているように、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの投与は、有効量の３０日後の、腹痛の減少、下痢の減少、体重減少の減少、食欲不振の減少、及び／又は直腸出血の減少をもたらす。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの投与は、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約１０％以上の減少

、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約１５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約２０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約２５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約３０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約３５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約４０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約４５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約５０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約５５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約６０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約６５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約７０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約７５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約８０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約８５％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約９０％以上の減少、有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約９５％以上の減少、又は有効量の３０日後の腸の炎症に伴う症状の約９９％以上の減少をもたらす。

【０１４０】

くわえて、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する食用組成物又は医薬製剤の有効量の投与は、投与レジメンの経過後に抗炎症性サイトカイン産生を増加させることができる。例えば、ＩＬ－１０は、炎症反応を抑えて終わらせることに関与している（Asadullah, K. et al., Pharm. Rev. 2003, 55, 241-269）。さらなる抗炎症性サイトカインとしては、ＩＬ－１受容体拮抗剤、ＩＬ－４、ＩＬ－６、及びＩＬ－１１、及びＩＬ－１３が挙げられる。ＩＬ－１、腫瘍壊死因子－α、及びＩＬ－１８に特異的なサイトカイン受容体が炎症促進性サイトカイン阻害剤として機能しうる（Opal, S. M. et al. CHEST 2000, 117, 1162-1 172）。

【０１４１】

抗炎症性サイトカイン産生の増加は、例えば、７日後、１４日後、２１日後、３０日後、又は６０日後に測定することができる。個体における抗炎症性サイトカイン産生の増加は、例えば、個体から得られる血液又は組織試料の分析によって測定することができる。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの投与は、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約１０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約１５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約２０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約２５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約３０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約３５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約４０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約４５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約５０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約５５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約６０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約６５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約７０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約７５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約８０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約８５％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約９０％以上の増加、有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約９５％以上の増加、又は有効量の３０日後の抗炎症性サイトカイン産生の約１００％以上の増加をもたらす。

【０１４２】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する経口投与される組成物、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する経口投与される医薬製剤、及び発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する静脈内投与される医薬製剤は各々、腸

の炎症を治療するのに有効な投与量で投与される。そのような投与レジメンは一般に、組成物又は医薬製剤のそれぞれに関する体重１ｋｇあたりのベーター１，３－グルカンの量として理解される。幾つかの実施形態では、組成物又は医薬製剤は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約２ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１０ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約２５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５０ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約７５ｍｇ以上のベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約１００ｍｇ以上のベーター１，３－グルカンの有効量で対象に投与される。幾つかの実施形態では、組成物又は医薬組成物の有効量は、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１００ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．２ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１５ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約０．５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約１ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１０ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約１００ｍｇのベーター１，３－グルカン、体重１ｋｇあたり約５０ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカン、又は体重１ｋｇあたり約２５ｍｇのベーター１，３－グルカン～体重１ｋｇあたり約７５ｍｇのベーター１，３－グルカンである。本明細書において記載されているように、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、有効量の組成物又は医薬製剤は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与することができる。

【０１４３】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含有する組成物又は医薬製剤の有効量は、腸の炎症を治療するために１日１回対象に投与することができる。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む食用又は医薬組成物の有効量は、１日複数回の投与として、例えば、１日２回若しくはより頻回に、１日３回若しくはより頻回に、又は１日４回若しくはより頻回に、対象に投与される。幾つかの実施形態では、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む食用又は医薬組成物の有効量は、週に１回若しくはより頻回に、週に２回若しくはより頻回に、週に３回若しくはより頻回に、週に４回若しくはより頻回に、週に５回若しくはより頻回に、又は週に６回若しくはより頻回に、対象に投与される。

【０１４４】

微量金属との複合体

幾つかの実施形態では、ベータグルカンは、全体的な免疫系活性を増進しつつ微量金属生物学的利用能を上げるように同時に用いられる複合体を作り出すために、微量金属と複合体を形成することができる。微量金属としては、銅、亜鉛、鉄、コバルト、マグネシウ

ム、モリブデン、マンガン、リチウム、クロム、ニッケル、バナジウム、セレン、及びそれらの組み合わせが挙げられる。ベータグルカンと微量金属の複合体は、溶液中での可溶性無機微量金属塩とベータグルカンの複合体形成の結果でありうる。

【０１４５】

ベータグルカン多糖類は、乾燥若しくは湿全細胞藻類懸濁液中に存在するパラミロン顆粒又は乾燥若しくは湿潤全細胞酵母中に存在するベータグルカンなどの生物学的に利用可能な形態のベータグルカン、又は藻類、酵母若しくは他の生物のベータグルカンの抽出源のいずれかである。該多糖類は、１つ以上の滅菌バイオリアクターにおいて従属栄養的に増殖されたユーグレナ・グラシリスの懸濁液又はペーストで構成することができる。ユーグレナはまた、乾燥重量ベースで測定して、藻類生成物のベータグルカン部分が２０％を超える藻類バイオマスを構成するように、最適な方法で増殖させることができる。そのような生成物を増殖させて作り出すための過程の例が図５及び図６に示されている。

【０１４６】

図２５を参照すると、発酵過程の実施形態が示されている。藻類バイオマスは、無菌条件下において合成培地で発酵槽（１）で作られる。発酵槽（１）で所望の時間が経過した後、発酵槽発酵液を遠心分離機（２）に移し、発酵液を脱水して、約７５％の水分を含有する湿潤藻類食（wet algae meal）と使用済み培地の２つのプロセスの流れ（process stream）が生じる。湿潤藻類食は、全藻類細胞、藻類細胞断片、及び多糖類顆粒の混合物を含有する。湿潤藻類食は、乾燥重量で５０％を超えるベータグルカン、非消化性多糖類を含有する多糖溶液でありうる。湿潤藻類食は、混合タンク又は混合を可能にするいずれかの装置（例えば、リボンブレンダー）などのミキサー（３）に移される。随意に、多糖溶液のｐＨは、酸又は塩基（Ａ）の添加によって調整することができる。

【０１４７】

$ZnSO_4$－H_2Oなどの可溶性金属塩（Ｂ）の濃縮溶液をミキサー（３）に加え、多糖溶液と１～１２０分間激しく混ぜることができる。いずれの水溶性金属塩（Ｂ）を使用してもよい。例えば、最終の生成物が、銅多糖複合体、亜鉛多糖複合体、鉄多糖複合体、コバルト多糖複合体、マグネシウム多糖複合体、マンガン多糖複合体、及びそれらの組み合わせであるように、金属塩（Ｂ）はベータグルカンと混合することができる。可溶性金属塩（Ｂ）溶液の調製は、水中の金属塩（Ｂ）の混合物を混ぜながら加熱することを含みうる。随意に、このミキサー（３）を加熱又は冷却してもよい。随意に、材料を低温殺菌し、酵素活性を不活性化するのに必要な温度にミキサー（３）を加熱してもよい。多糖溶液と金属塩（Ｂ）溶液の混合中に、金属イオンと湿潤藻類食に存在する多糖類との間にいくらかの量の複合体形成が起こることになり、その結果最終生成物が金属多糖複合体と見なされうる。

【０１４８】

所望の量の混合後、混合物は、物質を乾燥できるいずれかの装置である脱水装置（４）に移される。例えば、脱水装置（４）は、トレイ乾燥機、ベルト乾燥機、回転ドラム乾燥機などでありうる。材料が含む水分が１０％未満になったら、ミル（５）に移し、そこでその粒径を５００μｍ未満に減らす。その粒径を２５０μｍ未満に減らすことがより好ましい。材料を粉砕したら、適切なサイズの容器に包装し（６）、ラベルを付ける。随意に、湿潤藻類食への金属塩（Ｂ）溶液の添加は省かれてもよく、結果として得られる生成物が藻類食であることになる。

【０１４９】

図２６を参照すると、発酵過程の別の実施形態が示されている。藻類バイオマスは、無菌条件下において合成培地で発酵槽（７）中で作られる。随意に、藻類バイオマスは、飼料等級の材料のみを含有し、有害物質（例えば、重金属、毒素、危険な化学薬品）を含まないいずれかの培地を用いて、無菌ではない条件下において培養タンク内で作られうる。発酵槽又は培養タンク（７）内で所望の時間が経過した後、発酵槽発酵液は、混合タンク又は混合を可能にするいずれかの装置（例えば、リボンブレンダー）などのミキサー（８）に移される。発酵槽発酵液は、全藻類細胞、藻類細胞断片、及び多糖類顆粒の混合物を

含有する。無菌ではない培養タンクの場合、低レベルの非藻類バイオマスも存在しうる。

【０１５０】

随意に、発酵槽発酵液のｐＨは、酸性又は塩基性の化学物質（Ｃ）をミキサー（８）に添加して調整されて細胞を溶解させ、それによって大部分の多糖顆粒を細胞内から放出される。これは、発酵槽発酵液に塩基（例えば、ＮａＯＨ）を加えることによって達成されうる。随意に、発酵液を高圧ホモジナイザー又は超音波細胞破砕機を通して機械的に処理して細胞を溶解させてもよい。随意に、発酵液をアルカリ性ｐＨに調整した後、遠心分離前に中和してもよい。すべてではないにしても大部分の細胞が溶解されるのに十分な時間が経過した後、結果として得られた混合物を遠心分離機（９）に移し、発酵液を脱水して、粗多糖溶液（Ｄ）他のバイオマス材料（Ｅ）の混合物の２つのプロセスの流れが生じる。

【０１５１】

粗多糖溶液（Ｄ）は、混合タンク又は混合を可能にするいずれかの装置（例えば、リボンブレンダー）などのミキサー（１０）に移される。随意に、粗多糖溶液（Ｄ）は、非多糖材料を除去するために、水又は適切なアルコール（エタノール、イソプロパノール）で洗浄してもよい。さらなる洗浄を、非多糖材料を除去するのに適したいずれかの化学薬品を用いて行ってもよい。粗多糖溶液（Ｄ）のｐＨは随意に酸又は塩基（Ｆ）で調整されうる。

【０１５２】

$ZnSO_4 \cdot H_2O$などの可溶性金属塩（Ｇ）の濃縮溶液を調製し、混合タンク（１０）に加え、多糖溶液と１～１２０分間激しく混ぜる。例えば、最終の生成物が、銅多糖複合体、亜鉛多糖複合体、鉄多糖複合体、コバルト多糖複合体、マグネシウム多糖複合体、又はマンガン多糖複合体であることができるようないずれの水溶性金属塩も使用することがでる。可溶性金属塩溶液の調製は、水中の金属塩の混合物を混ぜながら加熱することを含みうる。随意に、ミキサー（１０）を加熱又は冷却してもよい。随意に、材料を低温殺菌し、酵素活性を不活性化するのに必要な温度にミキサー（１０）を加熱してもよい。多糖溶液と金属塩溶液が混合されているとき、金属イオンと存在する多糖類との間にいくらかの量の複合体形成が起こることになり、その結果、最終生成物が金属多糖複合体と見なされうる。

【０１５３】

所望の量の混合後に、混合物は、物質を乾燥できるいずれかの装置である脱水装置（１１）に移される。例えば、脱水装置（１１）は、トレイ乾燥機、ベルト乾燥機、回転ドラム乾燥機などであってよい。材料が含む水分が１０％未満になったら、ミル（１２）に移し、そこでその粒径を５００μｍ未満に減らす。その粒径を２５０μｍ未満に減らすことがより好ましい。材料を粉砕したら、適切なサイズの袋に入れ（１３）、ラベルを付ける。

【０１５４】

非多糖材料（Ｅ）は部分的に加水分解されたタンパク質とアミノ酸を含み、混合タンクや混合を可能にするいずれかの装置（例えば、リボンブレンダー）などのミキサー１４に移される。非多糖物質（Ｅ）のｐＨは、随意に酸又は塩基（Ｈ）で調整することができる。$ZnSO_4 \cdot H_2O$などの可溶性金属塩（Ｉ）の濃縮溶液を調製し、ミキサー（１４）に加え、アミノ酸に富む材料と１～１２０分間激しく混ぜる。最終の生成物が、例えば、銅タンパク質化合物、亜鉛タンパク質化合物、鉄タンパク質化合物、コバルトタンパク質化合物、マグネシウムタンパク質化合物、マンガンタンパク質化合物、及びそれらの組み合わせでありうるように、いずれかの水溶性金属塩が使用されうる。可溶性金属塩溶液の調製は、水中の金属塩の混合物を混ぜながら加熱することを含みうる。随意に、ミキサー（１４）を加熱又は冷却してもよい。随意に、材料を低温殺菌し、酵素活性を不活性化するのに必要な温度にミキサー（１４）を加熱してもよい。非多糖溶液及び金属塩溶液が混合されているとき、金属イオンと、存在する部分的に加水分解されたタンパク質及びアミノ酸との間にいくらかの量の複合体形成が起こり、その結果、最終生成物が金属タンパク

質化合物とみなされうる。

【０１５５】

所望の量の混合後、混合物は、材料を乾燥できるいずれかの装置である脱水器（１５）に移される。例えば、脱水装置（１５）は、トレイ乾燥機、ベルト乾燥機、回転ドラム乾燥機、多重効用蒸発器などであってよい。材料が含む水分が１０％未満になったら、ミル（１６）に移され、そこでその粒径を５００μｍ未満に減らす。その粒径を２５０μｍ未満に減らすことがより好ましい。材料を粉砕したら、適切なサイズの袋に入れ（１７）、ラベルを付ける。随意に、プロセスの流れ（Ｄ、Ｅ）各々への金属塩溶液の添加を省いてもよく、結果として得られる生成物は、比較的純粋な多糖類及び部分的に加水分解されたタンパク質食であることになる。

【０１５６】

微量金属とベータグルカンの複合体形成の利点としては、免疫系を調製するベータグルカンの特徴とあいまって微量金属の生物学的利用能が増加することが挙げられる。ベータグルカンは腸内では難消化性であり、微量金属が作動薬に結合するのを、例えば腸内で放出されるまで防ぐことができる。

【０１５７】

さらに、最適な免疫系機能を得るためには、亜鉛などのいくつかの微量元素が飼料中に典型的に必要とされるので、ベータグルカンなどの免疫増強化合物との組み合わせは、同じ痕跡量の金属を、別の製品として提供できる他の供給源、例えばアミノ酸又はタンパク質と組み合わせることに比べて、動物用飼料又はビタミンプレミックス混合物に組み合わせることがより好ましい場合がありうる。本発明の方法は、ユーグレナ由来のベータグルカンが、十分に高い濃度の亜鉛及び他の微量金属に結合又は吸収して、動物飼料中で有意な濃度の微量金属を送達する能力を示す。

【０１５８】

金属ベータグルカン複合体の幾つかの実施形態は、銅ベータグルカン複合体、亜鉛ベータグルカン複合体、鉄ベータグルカン複合体、コバルトベータグルカン複合体、マグネシウムベータグルカン複合体、モリブデンベータグルカン複合体、マンガンベータグルカン複合体、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される構成要素を含む。

【０１５９】

いずれの微量金属含有無機塩を使用してもよく、塩のいくつかの例としては、すでに飼料成分として商業的に使われている商品であるものが挙げられる。そのような無機塩の例としては、金属硫酸塩、金属酸化物、金属塩化物、水和金属塩、金属酢酸塩、金属臭化物、金属ヨウ化物、金属リン酸塩、金属亜セレン酸塩、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。塩の部分としては、鉄、マグネシウム、リチウム、亜鉛、銅、クロム、ニッケル、コバルト、バナジウム、モリブデン、マンガン、セレン、タングステン、ヨウ素、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６０】

幾つかの実施形態では、結果として得られる金属多糖複合体は、３重量％～２５重量％の金属及び少なくとも２５重量％のベータグルカンを含む。ある特定の場合では、生成物の多糖部分は、少なくとも５０重量％のベータグルカンから構成することができる。ある特定の場合では、生成物の多糖部分は、約５０重量％～６０重量％のベータグルカンから構成することができる。亜鉛ベータグルカン複合体を作るための微量金属含有塩として硫酸亜鉛又は酸化亜鉛が使用でき、亜鉛ベータグルカン複合体は乾燥重量基準で少なくとも１重量％の亜鉛を含むことができ、動物飼料中の総含有物の３重量％未満で投与できる。

【０１６１】

ある特定の場合では、生成物の多糖部分は、約３０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約３０重量％～約４０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約５０重量％のベーター１，３－グルカン、約６０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカンから構成することができる。幾つか

の実施形態では、生成物の多糖部分は、約５０重量％～約６０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約５５重量％のベーター１，３－グルカンから構成することができる。

【０１６２】

ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物を作製する方法

ユーグレナは光合成状態で自然に増殖及び繁殖する緑藻類の属であり、したがって生存は日光に依存している。しかし、光合成を利用して増殖させたユーグレナの大規模な培養は困難であり、費用対効果に優れない。そのうえ、光合成を利用して増殖させたユーグレナは、生じるベータグルカンの量が少ない（すなわち、総ユーグレナ細胞マスの２０％未満）。したがって、本明細書に記載の方法及び組成物に有用なユーグレナは大きな発酵タンクでの発酵によって培養される。一般に、発酵ユーグレナ培養物は、ほとんど又は全く環境光なしに従属栄養的に増殖し、提供された栄養素に依存してベーター１，３－グルカン及び他の細胞成分を合成する。発酵を利用して増殖させたユーグレナは、自然発生又は光合成ユーグレナ培養物よりも高い細胞密度に培養することができ、それによってより多くの量のベーター１，３－グルカンを生産することができる。本明細書に記載の発酵ユーグレナは米国特許出願公開第２０１３／０３０３７５２号に記載の方法を用いて得ることができる。

【０１６３】

好ましくは、本明細書に開示の方法に有用なユーグレナは、ユーグレナがその環境において優占な微生物である状態を保つように制御される環境で培養される。多くの混入生物が同じ生物学的資源（例えば、栄養素、微量栄養素、ミネラル、及び／又は有機エネルギー）を競合できるので、どの生物の増殖も制御することは困難である。これらの微生物の多くは増殖速度が速く、ユーグレナに有利に働くいくつかの制御された増殖機構を欠くユーグレナとの競合に勝つことができる。これらの増殖過程には、ユーグレナに有利な増殖培地の採用、ユーグレナに有利な温度での操作、ユーグレナに有利なｐＨレベル、ユーグレナ以外の競合生物に有毒な化合物の添加、及びユーグレナの選択的なろ過又は分離などの方法の１つ以上を含むことができる。これらの方法は各々、増殖速度及びエネルギーをベーター１，３－グルカンに変換するユーグレナの能力に影響する。一般に、非制御環境で増殖されたユーグレナは、より制御された増殖環境で生産されるベーター１，３－グルカンが示すことになる、高いベーター１，３－グルカン濃度、速い増殖速度、及び効率的なユーグレナの増殖といった同様の有益な特性を示さないであろう。

【０１６４】

効率的にベーター１，３－グルカンを生産する、費用対効果が高い大規模なユーグレナ培養を実現するために、該生物は一般に大型の好気発酵タンクで培養される。増殖培地は、ユーグレナ増殖及びベーター１，３－グルカン産生のための炭素源、窒素源、及び他の成長栄養素を提供する。培養培地、収穫スケジュール、及び発酵条件は、最適なベーター１，３－グルカン生産を確実にするように注意深く制御される。幾つかの実施形態では、生産方法は、約３０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約３０重量％～約４０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約５０重量％のベーター１，３－グルカン、約５０重量％～約６０重量％のベーター１，３－グルカン、約６０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカンをもつユーグレナを大量に作り出す。

【０１６５】

発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの効率的な生産は、ベーター１，３－グルカン生産のコストをいくつかの点で削減する。第１に、ユーグレナによって作られるベーター１，３－グルカンは、生物の細胞壁に含有されておらず、ベータグルカンを作ることが知られている他の生物に必要であるような、精巧な且つ／又は高価な分画方法又は抽出過程を必要としない。第２に、ユーグレナ生物は比較的大きく、遠心分離機、フィルター、又は他の分離装置を使用することによって比較的迅速に

水から分離することができる。第３に、個々のユーグレナ細胞は、他の生物と比較して、より大きな割合のベーター１，３－グルカン（総細胞マスのパーセント割合として）から構成され、結果としてベーター１，３－グルカンの回収がより容易なものになる。幾つかの実施形態では、ユーグレナ増殖は光暴露によって補われる。

【０１６６】

ユーグレナの発酵増殖

本明細書に記載の組成物及び方法に有用なユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、発酵を利用してユーグレナを増殖させることによって作られる。一般に、培養培地は培養物が従属栄養的に増殖するようにユーグレナに与えられる。しかし、ユーグレナは少なくとも部分的に光を当てて培養できることが企図される。ユーグレナが光合成を利用して増殖するのではなく従属栄養的に発酵される場合、ベーター１，３－グルカンの大規模な生産は、藻類のための光合成増殖条件の大規模な設定及び発酵を利用した増殖中に得られる細胞密度に一部起因して、実質的に費用効果がより高い。

【０１６７】

発酵を利用してユーグレナを増殖させる例示的な方法は、本明細書及び米国特許公開第２０１３／０３０３７５２号に記載されている。これらの効率的で且つ費用効果が高い方法は、ユーグレナバイオマスとして投与又はさらに精製できるユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの生産を含む、本明細書に記載の方法及び組成物に有用なユーグレナの培養を可能にする。ユーグレナバイオマスは、例えば、食用組成物に用いることができる。ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンは、食用組成物として、又は経口投与若しくは静脈内投与できる医薬製剤として投与することができる。

【０１６８】

発酵を利用して増殖させるユーグレナは、増殖培地を用いて培養される。増殖培地は、炭素源、窒素源、及び他の微量栄養素を含む、増殖中のユーグレナ培養物に栄養素を供給する。増殖培地はまた、増殖培養物のｐＨを維持するための緩衝液を含む。望ましくない生物（細菌など）の増殖を防ぐために、増殖培地は発酵タンクに添加する前に滅菌される。増殖培地は、例えば、フィルター、蒸気、オートクレーブ、又はそれらの組み合わせを使用することによって滅菌することができる。随意に、培地の相異なる構成成分は、保管中の完全な増殖培地の形成及び増殖培地の異物混入を防止するために別々の保管場所に保持される。

【０１６９】

発酵ユーグレナは、増殖培地に存在する炭素源に依存する。炭素源の例としては、グルコース、デキストロース、若しくは他の糖類、酢酸塩、又はエタノールが挙げられる。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、約５０ｇ／Ｌ以下、約４０ｇ／Ｌ以下、約３０ｇ／Ｌ以下、約２５ｇ／Ｌ以下、約２０ｇ／Ｌ以下、約１５ｇ／Ｌ以下、約１０ｇ／Ｌ以下、約５ｇ／Ｌ以下、約４ｇ／Ｌ以下、約３ｇ／Ｌ以下、約２ｇ／Ｌ以下、約１ｇ／Ｌ以下、約０．５ｇ／Ｌ以下、又は約０．１ｇ／Ｌ以下で炭素源を含む増殖培地で培養される。随意に、増殖培地には増殖過程の間に追加の炭素源が補充される。例えば、炭素源は、ユーグレナ培養物の増殖過程の間に、増殖培地に２回以上、増殖培地に３回以上、又は増殖培地に４回以上添加することができる。炭素源は半連続的に添加することができる。炭素源はまた、増殖培地に連続的に添加することもできる。

【０１７０】

また、発酵によってユーグレナを増殖させるのに有用な増殖培地は、水酸化アンモニウム、アンモニアガス、硫酸アンモニウム、又はグルタミン酸などの窒素源も含む。幾つかの実施形態では、増殖培地は、約０．１ｇ／Ｌ～約３ｇ／Ｌの窒素源、約０．２ｇ／Ｌ～約２ｇ／Ｌの窒素源、又は約０．５ｇ／Ｌ～約１ｇ／Ｌの窒素源を含む。好ましくは、窒素源は水酸化アンモニウムである。

【０１７１】

増殖培地はユーグレナ培養物に必要な追加の栄養素をさらに含む。例えば、増殖培地は、リン酸カリウム（約０．２５ｇ／Ｌ～約５ｇ／Ｌのリン酸カリウム、約０．５ｇ／Ｌ～

約４ｇ／Ｌのリン酸カリウム、若しくは約１ｇ／Ｌ～約３ｇ／Ｌのリン酸カリウムなど）、硫酸マグネシウム（約０．２５ｇ／Ｌ～約５ｇ／Ｌの硫酸マグネシウム、約０．５ｇ／Ｌ～約４ｇ／Ｌの硫酸マグネシウム、若しくは約１ｇ／Ｌ～約３ｇ／Ｌの硫酸マグネシウムなど）、塩化カルシウム（約０．００５ｇ／Ｌ～約０．５ｇ／Ｌの塩化カルシウム、約０．０１ｇ／Ｌ～約０．４ｇ／Ｌの塩化カルシウム、若しくは０．１ｇ／Ｌ～約０．２５ｇ／Ｌの塩化カルシウムなど）、又は微量栄養素を含む微量金属ストック溶液を含むことができる。

【０１７２】

増殖培地のｐＨを維持することにより、効率的なベーター１，３－グルカン生産、ユーグレナ細胞増殖が可能になり、望ましくない細菌の増殖を制限する助けとなる。約３～約４のｐＨはユーグレナに好都合であるが、大部分の細菌にとって最適に及ばない増殖条件をもたらす。幾つかの実施形態では、増殖培地のｐＨは、約２～約７、約２～約６、約３～約５、約３～約４、又は約３～約３．５である。増殖培地のｐＨを所望の範囲に維持するために、緩衝液、例えばクエン酸塩及び／又はクエン酸を増殖培地に含めることができる。

【０１７３】

増殖培地の所望のｐＨはいくつかの方法で達成又は維持することができる。増殖培地のｐＨを手動でモニターし、酸又は塩基を定期的に手動で添加して、増殖培地の所望のｐＨを達成することができる。代替的又は付加的に、増殖培地のｐＨは自動制御システムに接続されたｐＨセンサーで測定することができ、自動制御システムは酸又は塩基を自動的に添加するポンプ、ホッパー又は他の装置を制御して、自動制御システムにプログラムされた増殖培地の所望のｐＨを達成する。幾つかの実施形態では、ユーグレナの代謝過程が増殖培地のｐＨを所望の範囲内に十分に調節する。

【０１７４】

発酵中にユーグレナに十分な酸素を供給するために、増殖培地は、例えば、約０．５ｍｇ／Ｌ～約４ｍｇ／Ｌの酸素、約１ｍｇ／Ｌ～約３ｍｇ／Ｌの酸素、又は約２ｍｇ／Ｌの酸素に、随意に酸素供給することができる。細胞培地は発酵タンク投入前に酸素供給を受けることができ、又は発酵ユーグレナ培養物は周囲の酸素を増殖培地に容易に溶解させるように混ぜることができる。

【０１７５】

ユーグレナを発酵させる系は１つ以上のバイオリアクターを含むことができる。ユーグレナ培養物は、特定の細胞密度又は特定の長さの時間までバイオリアクターで培養され、その後培養物は収穫される又はより大きなバイオリアクターに接種するために使用される。随意に、ユーグレナ培養物の一部をバイオリアクターに残して、バイオリアクターに添加された新鮮な増殖培地に接種することができる。発酵を利用して増殖させたユーグレナは、２つ以上、３つ以上、又は４つ以上のバイオリアクターを必要としうる多段階法で増殖させることができ、前にあるバイオリアクターの内容物は後ろのバイオリアクターに移されて、そこで希釈される。ユーグレナを発酵させる別の例では、ユーグレナ細胞培養物は流加法を用いて培養され、ユーグレナ培養物が増殖するにつれて、新鮮な増殖培地又は特定の培地成分がバイオリアクターに連続的に加えられる。また、反復回分法もユーグレナを発酵させるのに使用でき、ユーグレナ培養物は規則的な間隔で又は連続的に収穫され、新鮮な増殖培地と交換される。

【０１７６】

１つの例では、ユーグレナは単一のバイオリアクター又は発酵タンクで培養される。細胞増殖培地はバイオリアクターに加えられ、ユーグレナ培養物が接種される。ユーグレナ培養物は、例えば、異なるバイオリアクターからの培養物又は増殖プレートから選択されたユーグレナコロニーでありうる。幾つかの実施形態では、単一のバイオリアクターは、約１００リットル以上、約２００リットル以上、約３００リットル以上、約５００リットル以上、約７５０リットル以上、又は約１０００リットル以上である。幾つかの実施形態では、単一のバイオリアクターは、約１００リットル以上、約２００リットル以上、約３

００リットル以上、約５００リットル以上、約７５０リットル以上、約１，０００リットル以上、約５，０００リットル以上、約１０，０００リットル以上、約１５，０００リットル以上、又は約２０，０００リットル以上である。収穫前バイオリアクター内ユーグレナ発酵。

【０１７７】

また、ユーグレナ培養物は、複数のバイオリアクターが順番に使用される多段階発酵過程でも増殖することができる。多段階発酵過程では、各バイオリアクターは、先行するバイオリアクター内のバイオリアクターよりも大きなバイオリアクター容積を有する。ユーグレナ培養物は、まずある特定の細胞密度に達するように培養される。次いで、この培養物を使用して、次の後続のバイオリアクターに接種される。

【０１７８】

図２は、本明細書に開示の方法及び組成物に有用な多段階法で発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを形成する例示的な実施形態の概要を示す。図３は、多段階法で発酵を利用してユーグレナを増殖させるために使用することができる例示的なバイオリアクターを示す。２００において、増殖培地を第１のバイオリアクター段階に加え、ユーグレナ細胞が接種される。第１のバイオリアクター段階は、スターター培養に有用な任意の小さい容器、例えば、回転式又は旋回式シェーカーテーブル又はマグネチックスターラーバー上で表面拡散によって酸素供給される三角フラスコ又は斜面培地であることができる。図３は、第１のバイオリアクター段階の１つの実施形態を示しており、この図では「斜面培地」と表記されている。この第１のバイオリアクターは、加熱台（heated table）を用いて加熱することができる。第１のバイオリアクターは環境制御雰囲気を有することもできる。New Brunswick Scientific Innova 4000 Heated Desktop Incubatorなどの加熱シェーカー台は、加熱と、増殖培地の表面を激しく動かすのに十分な動きをもたらすことによってフラスコに酸素を送り込む能力とを兼ね備えた装置の一例である。増殖培地の接種後、ユーグレナ培養物は、所定の時点又は所定の細胞密度が得られるまで、第１のバイオリアクターで培養される。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、第１のバイオリアクター内で、約１２時間以上、約２４時間以上、約３６時間以上、約４８時間以上、約６０時間以上、約７２時間以上、約８４時間以上、約９６時間以上、約１０８時間以上、又は約１２０時間以上培養される。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、該バイオリアクター内で、１リットルあたり約２０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約３０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約４０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約７５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１００グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１２５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１７５グラム以上の乾燥重量、又は１リットルあたり約２００グラム以上の乾燥重量の細胞密度に達するまで増殖する。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、該バイオリアクター内で、１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約２００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約１５グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１５０グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量、又は１リットルあたり約４０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量の細胞密度に達するまで増殖する。必要又は所望の場合、ユーグレナが増殖している間に、第１のバイオリアクターには新鮮な増殖培地が補充される。

【０１７９】

ステップ２０５では、第１のバイオリアクターの内容物又は第１のバイオリアクターの内容物の一部が第２のバイオリアクターに移される。随意に、ステップ２１０では、第１のバイオリアクターの内容物又は第１のバイオリアクターの内容物の一部がさらなる工程のために収穫される。第１のバイオリアクターの内容物の一部は、異なる培養のための接種材料として保持することができる。随意に、２１０でユーグレナが第２段階に移される前に、第１のバイオリアクター段階の内容物は２００でろ過されるか、又はユーグレナは

その他の方法で濃縮される。

【０１８０】

第１のバイオリアクターからのユーグレナ培養物は、ユーグレナのさらなる培養を開始するために、第２のバイオリアクターの増殖培地に接種するのに使用される。一般に、第２のバイオリアクターは第１のバイオリアクターより大きい。図３は、第２のバイオリアクター段階の１つの例を示しており、この図では「フラスコ」と表記されている。第１のバイオリアクターの内容物は、希釈後の第２のバイオリアクター内のユーグレナの濃度が１リットルあたり約０．１グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量となるように第２のバイオリアクターで希釈される。第２のバイオリアクターは、第１のバイオリアクター段階より最高で約１０倍大きく、第１のバイオリアクター段階より最高で約２０倍大きく、第１のバイオリアクター段階より最高で約３０倍大きく、第１のバイオリアクター段階より最高で約５０倍大きく、第１のバイオリアクター段階より最高で約７５倍大きく、又は第１のバイオリアクター段階より最高で約１００倍大きくすることができる。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、第２のバイオリアクター内で、約１２時間以上、約２４時間以上、約３６時間以上、約４８時間以上、約６０時間以上、約７２時間以上、約８４時間以上、約９６時間以上、約１０８時間以上、又は約１２０時間以上発酵することによって増殖する。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、該バイオリアクター内で、１リットルあたり約２０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約３０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約４０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約７５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１００グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１２５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１７５グラム以上の乾燥重量、又は１リットルあたり約２００グラム以上の乾燥重量の細胞密度に達するまで発酵する。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、該バイオリアクター内で、１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約２００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約１５グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１５０グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量、又は１リットルあたり約４０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量の細胞密度に達するまで発酵する。必要又は所望の場合、ユーグレナが増殖している間に、第２のバイオリアクターには新鮮な増殖培地が補充される。

【０１８１】

図２にさらに図示されるように、第２のバイオリアクターの内容物又は内容物の一部はステップ２１５で第３のバイオリアクターに移される。図３は、第１のバイオリアクター段階の１つの実施形態を示しており、この図では「種発酵槽（Seed Fermenter）」と表記されている。随意に、第２のバイオリアクターの内容物又は一部はステップ２２０で第２のバイオリアクターから収穫される。一般に、第３のバイオリアクターは、第２のバイオリアクターの約１～約１００倍大きく、約１００リットル以上、約２５０リットル以上、約５００リットル以上、約１０００リットル以上、約２５００リットル以上、約５０００リットル以上、約７５００リットル以上、約１０，０００リットル以上、約１５，０００リットル以上、約２５，０００リットル以上、約５０，０００リットル以上、又は約１００，０００リットル以上であることができる。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、第３のバイオリアクター内で、約１２時間以上、約２４時間以上、約３６時間以上、約４８時間以上、約６０時間以上、約７２時間以上、約８４時間以上、約９６時間以上、約１０８時間以上、又は約１２０時間以上発酵することによって増殖して、１リットルあたり約２０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約３０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約４０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約７５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１００グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１２５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１７５グラム以上の乾燥重量、又は１リットル

あたり約２００グラム以上の乾燥重量の細胞密度に達する。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、第３のバイオリアクター内で、１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約２００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約１５グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１５０グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量、又は１リットルあたり約４０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量の細胞密度に達するまで発酵する。必要又は所望の場合、ユーグレナが増殖している間に、第３のバイオリアクターには新鮮な増殖培地が補充される。

【０１８２】

図２にさらに図示されるように、ステップ２２５で第３のバイオリアクターの内容物又は内容物の一部は第４のバイオリアクターに移される。図３は、第４のバイオリアクター段階の１つの実施形態を示しており、この図では、「生産発酵槽（Production Fermenter）」と表記されている。随意に、第３のバイオリアクターの内容物又は一部はステップ２３０で第３のバイオリアクターから収穫される。一般に、第４のバイオリアクターは、第３のバイオリアクター段階より約１～約１００倍大きい容積を有し、容積は、約１００リットル以上、約２５０リットル以上、約５００リットル以上、約１０００リットル以上、約２５００リットル以上、約５０００リットル以上、約７５００リットル以上、約１０，０００リットル以上、約１５，０００リットル以上、約２５，０００リットル以上、約５０，０００リットル以上、約１００，０００リットル以上、約２００，０００リットル以上、約４００，０００リットル以上、約６００，０００リットル以上、約８００，０００リットル以上、又は約１，０００，０００リットル以上である。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、第４のバイオリアクター内で、約１２時間以上、約２４時間以上、約３６時間以上、約４８時間以上、約６０時間以上、約７２時間以上、約８４時間以上、約９６時間以上、約１０８時間以上、又は約１２０時間以上発酵することによって増殖し、１リットルあたり約２０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約３０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約４０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約７５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１００グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１２５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１７５グラム以上の乾燥重量、又は１リットルあたり約２００グラム以上の乾燥重量の細胞密度に達する。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約２００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約１５グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１５０グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量、又は１リットルあたり約４０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量の細胞密度に達するまで発酵する。ユーグレナが増殖している間に、第４のバイオリアクターには新鮮な増殖培地を補充することができる。図２は、第４のバイオリアクターの内容物がステップ２４０で収穫されることを図示するが、後続のバイオリアクターが使用される可能性があることがさらに企図される。図３は遠心分離機を使用して収穫する１つの方法を図示する。

【０１８３】

反復バッチ法も発酵を利用してユーグレナを培養するために使用することができる。反復バッチ法では、バイオリアクター内で増殖したユーグレナの一部を収穫し且つ／又は異なるバイオリアクターに移し、ユーグレナの一部を、後のユーグレナ成長のための接種材料としてバイオリアクターに残す。次いで、接種材料は、新鮮な増殖培地をバイオリアクターに加えることによって希釈される。図４Ａは、反復回分法による発酵を利用して増殖させたユーグレナ１つの例示的な実施形態を図示する。ステップ４００では、増殖培地をバイオリアクターに加え、ユーグレナ細胞を接種する。ユーグレナは、発酵によってバイオリアクター内で、ユーグレナ細胞密度が、１リットルあたり約２０グラム以上の乾燥重

量、１リットルあたり約３０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約４０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約７５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１００グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１２５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１７５グラム以上の乾燥重量、又は１リットルあたり約２００グラム以上の乾燥重量所定の細胞密度に達するまで増殖させることができる。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、バイオリアクター内で、１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約２００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約１５グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１５０グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量、又は１リットルあたり約４０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量の細胞密度に達するまで発酵する。ユーグレナの増殖は、所望の細胞密度に達するのに、約１２時間以上、約２４時間以上、約３６時間以上、約４８時間以上、又は約６０時間以上続きうる。

【０１８４】

ステップ４１０では、バイオリアクターの内容物の第１の部分が収穫される。バイオリアクターの内容物の第２の部分はバイオリアクターに残り、次の培養物を接種する。したがって、バイオリアクターの内容物の第１の部分が収穫された後、細胞密度を薄めるために新鮮な培地が４２０でバイオリアクターに加えられる。所望の量のユーグレナ生産に達するまで、又は混入生物が最終的にバイオリアクターのかなりの部分を占め、バイオリアクターを空にして消毒する理由になるまで該過程を続けることができる。ユーグレナ成長対時間の反復バッチ収穫の一例を図４Ｂに示す。図４Ｂに見られるように、いったんユーグレナが所定の細胞密度まで発酵すると、内容物の一部を収穫し、残ったものを新鮮な培地で希釈して新しい培養物を接種する。

【０１８５】

定流量流加法などの流加法も、発酵を利用してユーグレナを培養するために使用することができる。流加法では、ユーグレナ培養物は、所望の細胞密度に達するまで接種増殖培地中で増殖させる。この初期増殖期は一般に「バッチ段階」と呼ばれる。バッチ段階は、約１２時間以上、約２４時間以上、約３６時間以上、約４８時間以上、又は約６０時間以上でありうる。その間にユーグレナ培養物は、１リットルあたり約２０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約３０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約４０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約７５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１００グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１２５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１７５グラム以上の乾燥重量、又は１リットルあたり約２００グラム以上の乾燥重量の細胞密度に達する。例えば、ユーグレナは、バッチ段階の間にバイオリアクター内で、１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約２００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約１５グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１５０グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量、又は１リットルあたり約４０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量の細胞密度に達するまで増殖することができる。バッチ段階が完了した後、ユーグレナ細胞は連続的に収穫され、新鮮な増殖培地と交換される。この収穫及び交換過程は連続段階と呼ばれる。連続段階の間、栄養素レベル、ｐＨ、溶存酸素、又は他のパラメーターは、例えば、１つ以上のセンサーを使用してモニターされる。

【０１８６】

１つの実施形態では、反復回分過程は最高で３０日間行われる。別の実施形態では、反復回分過程は最高で６０日間行われる。さらに別の実施形態では、反復回分過程は最高で９０日間行われる。さらに別の実施形態では、反復回分過程は最高で１２０日間行われる。

【０１８７】
（多段階過程における第１のバイオリアクター、第２のバイオリアクター、第３のバイオリアクター、第４のバイオリアクター、若しくは後続のバイオリアクターであっても、反復回分過程におけるバイオリアクターであっても、又は流加過程におけるバイオリアクターであっても）バイオリアクターのいずれか１つは、増殖中にユーグレナを入れるための金属製又はガラス製の発酵タンクであることができる。図５及び図６は、発酵によってユーグレナを増殖させるのに有用な例示的なバイオリアクターを図示する。
【０１８８】
一般に、バイオリアクターは、１つ以上の制御された通気口、通気用又は酸素供給用の１つ以上の投入口、又は追加の増殖培地を供給するための１つ以上の投入口を除いて、操作中は雰囲気に対して閉じられている。これにより、発酵状態をより良好に制御し、コンタミネーションを制限することができる。増殖培地を供給するための投入口は、望ましくない非ユーグレナ微生物がチャンバーに入るのを防ぐために、除菌フィルター、例えば孔径が０．２ミクロン未満のフィルターを含むことができる。コンタミネーションをさらに制限するために、バイオリアクターのいずれか１つをバッチ間で洗浄又は消毒することができる。バイオリアクターの洗浄又は消毒には、蒸気、熱、又はエタノール、漂白剤、又は他の化学薬品などの消毒剤が含むことができる。
【０１８９】
発酵中のユーグレナ増殖及びベーター１，３－グルカン産生を刺激するのを助けるために、増殖培地は酸素供給を受ける又は混合することができる。例えば、増殖培地を通気すること又は加圧酸素が液体に予め溶解されている追加の液体を受けることによって、さらなる酸素をユーグレナ培養物に供給することができる。増殖培地は、例えば、増殖中に増殖培地に酸素を豊富に含む空気を供給することによって、又は培養物を１つ以上の混合装置で混合して培養物を攪拌することによって通気することができる。
【０１９０】
ユーグレナを発酵させるために使用されるバイオリアクターの１つ以上は、ユーグレナを混合する又は増殖培地を通気するためのエアリフト又はバブルカラムシステムを含むことができる。図６は、エアリフトを用いた発酵を利用してユーグレナを増殖させるためのバイオリアクターの一例を示す。エアリフト反応器は、増殖中の細胞に対するより少ないせん断応力で、十分に混合及び通気することができる。
【０１９１】
１つ以上のバイオリアクターは、増殖中にユーグレナを混合又は通気するための混合ブレードを備えた機械的攪拌装置を含むことができる。図５は、機械的攪拌装置、例えば、マリンブレード（marine blade）又は固定角ブレードなどの低せん断混合ブレードを含む例示的なバイオリアクターを示す。低せん断混合ブレードは、増殖中のユーグレナ細胞の損傷を制限する。
【０１９２】
ユーグレナは、第１のバイオリアクター、第２のバイオリアクター、第３のバイオリアクター、第４のバイオリアクター、又は後続のバイオリアクターであるかどうかに関わらず、最後のバイオリアクターで増殖させた後に収穫又は移動される。幾つかの実施形態では、ユーグレナは、バイオリアクター内で、約１２時間以上、約２４時間以上、約３６時間以上、約４８時間以上、約６０時間以上、約７２時間以上、約８４時間以上、約９６時間以上、約１０８時間以上、又は約１２０時間以上発酵した後に、収穫される又は新しいバイオリアクターに移される。例えば、ユーグレナは、収穫される前又は新しいバイオリアクターに移される前に約１２～約１２０時間、例えば、収穫される前又は新しいバイオリアクターに移される前に約２４時間～約９６時間、約３６時間～約７２時間、又は約４８時間～約６０時間培養することができる。ユーグレナ細胞培養物の収穫において、最終バイオリアクターの全内容物を採取してもよく、細胞培養物の一部を取っておいてもよい。取っておいた細胞培養物は、異なるバイオリアクター又は同じバイオリアクターにおける接種材料として使用することができる。

【０１９３】
幾つかの実施形態では、発酵を利用してユーグレナを増殖させる方法は、ユーグレナを、１リットルあたり約２０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約３０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約４０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約７５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１００グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１２５グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１５０グラム以上の乾燥重量、１リットルあたり約１７５グラム以上の乾燥重量、又は１リットルあたり約２００グラム以上の乾燥重量の細胞密度で生産する。その他の実施形態では、ユーグレナを増殖させる方法は、ユーグレナを、１リットルあたり約１０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約２００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約１５グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１５０グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約１００グラムの乾燥重量、１リットルあたり約２０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量、又は１リットルあたり約４０グラムの乾燥重量～１リットルあたり約６０グラムの乾燥重量の細胞密度で生産する。さらに他の実施形態では、ユーグレナは、約３０重量％～約４０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約５０重量％のベーター１，３－グルカン、約５０重量％～約６０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約６０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、約４０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカン、又は約５０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカンなどの約３０重量％～約７０重量％のベーター１，３－グルカンを有する。

【０１９４】
ユーグレナがバイオリアクターから収穫された後、ユーグレナバイオマスは、例えば、遠心分離、タンジェンシャルフローろ過、フィルタープレス、ベルトプレス、又は他の固液分離装置によって増殖培地から分離される。一般に、ユーグレナバイオマスは、組成物が約２０重量％以上の固形分、約２５重量％以上の固形分、約３０重量％以上の固形分、約３５重量％以上の固形分、又は約４０重量％固形分以上に達するまで増殖培地から分離される。

【０１９５】
次いで、収穫されたユーグレナバイオマスはさらに加工される前に乾燥させることができる。ユーグレナバイオマスは、ベルト乾燥機、スプレードライヤー乾燥機、ドラム乾燥機、炉を使用して、又は広い表面積にバイオマスを広げて蒸発乾燥を利用することによって乾燥させることができる。熱又は真空を適用して乾燥過程を助けることができる。また、ユーグレナバイオマスは凍結乾燥されて、乾燥バイオマスを作ることもできる。ユーグレナバイオマスは、４０％以下、約３０％以下、約２５％以下、約２０％以下、約１５％以下、約１０％以下、約５％以下、約４％以下、約３％以下、約２％以下、又は約１％以下の含水率に達するまで乾燥させることができる。

【０１９６】
乾燥ユーグレナバイオマスは、血清コレステロールレベル若しくは血清トリグリセリドレベルを低下させるための食用組成物として投与することができ、又は対象の免疫機能を調節するために投与することができる。また、ユーグレナバイオマスはさらに加工されて、血清コレステロールレベル若しくは血清トリグリセリドレベルを低下させる又は対象の免疫機能を調節するために投与される医薬製剤の食用組成物で用いるユーグレナ由来ベーター１，３－グルカンを精製することもできる。

【０１９７】
乾燥ユーグレナバイオマスは、対象の腸の炎症を治療するための食用組成物として投与することができる。また、ユーグレナバイオマスはさらに加工されて、対象の腸の炎症を治療するために投与される医薬製剤の食用組成物で用いるユーグレナ由来ベーター１，３－グルカンを精製することもできる。

【０１９８】
発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンの精製

ベータグルカンは、ユーグレナから液／固分離、物理的分離法、又は別の方法によって抽出することができる。ユーグレナによって産生されるベーター１，３－グルカンのかなりの部分はパラミロンの形態である。パラミロンは一般に、約０．５～約２ミクロンの水に不溶性の顆粒の形でユーグレナに存在し、ユーグレナ細胞内に位置する。したがって、ベーター１，３－グルカンは一般に、ユーグレナ細胞を溶解し、ベーター１，３－グルカンを残留バイオマスから単離することによって精製される。随意に、ベーター１，３－グルカンはメタノールを用いて精製される。ベーター１，３－グルカンはクロロホルムを用いることなく精製するのが好ましい。

【０１９９】

ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンは、細胞を溶解し、ベーター１，３－グルカンを単離することによって抽出される。ユーグレナ細胞は、超音波処理又は高圧ホモジナイゼーションを用いて溶解することができる。随意に、溶解化学物質が溶解ステップ中に含まれる。しかし、溶解化学物質を加えずにユーグレナ細胞を溶解することが可能である。溶解ステップ中に含まれうる例示的な溶解化学物質としては、界面活性剤（ドデシル硫酸ナトリウムなど）、酵素、塩基（水酸化ナトリウムなど）、又は酸（酢酸若しくは塩酸など）が挙げられる。ユーグレナ細胞を溶解した後、ベーター１，３－グルカンは、ろ過又は重力分離（重力沈降若しくは遠心分離など）を用いて単離される。次いで、より高い純度を得るために、単離されたベーター１，３－グルカンは、例えば水溶液又はエタノールで洗浄することができる。

【０２００】

ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの精製後に、さらなる加工ステップが精製ベーター１，３－グルカンを改変することができる。改変ベーター１，３－グルカンは、ベータグルカン受容体として同定されているタンパク質であるデクチン－１などの免疫系受容体に対する結合親和性の増加を示す。例えば、硫酸化多糖類が抗ＨＩＶ活性を示すことが実証されている（例えば、米国特許第５，８６１，３８３号）。硫酸化ベーター１，３－グルカンを調製する１つの例示的な方法では、精製ベーター１，３－グルカンをジメチルスルホキシドに溶解し、乾燥ピリジンとクロロスルホン酸の混合物と混ぜる。次いで、混合物を加熱し、上清をデカンテーションで移す。続いて、ベーター１，３－グルカン硫酸ピリジニウムを沈殿させるために蒸留水又はメタノールを上清に加え、次に該塩をろ過によって集めることができる。代替的に、塩化ナトリウムを上清に加えて、ｐＨを９に上げて、ベーター１，３－グルカン硫酸ナトリウムをアセトン溶液中に沈殿させることができる（Sakagami et al, In vivo 3:243-248 (1989)を参照されたい）。

【０２０１】

また、ユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを改変してカチオン性にすることもできる。カチオン性ベータグルカンは、デクチン－１及び補体受容体３などのベータグルカン受容体との増加した結合親和性を有するので、免疫調節物質としてより生物学的に活性であることができる（Sakagami et al, Antiviral Research, 21:1-14 (1993)を参照されたい）。発酵によって増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンは、ジメチルエタノールアミン（ＤＭＡＥ）で改変して、カチオン性ベーター１，３－グルカンを作ることができる。ＤＭＡＥベーター１，３－グルカンを生成する１つの例示的な方法は、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを塩基溶液（ＮａＯＨを含む溶液など）に溶解させること及びＤＭＡＥ塩化物（溶液又は乾燥粉末として）を加えることを含む。結果として起こる反応はＤＭＡＥベーター１，３－グルカンを生成する。

【０２０２】

例示的な実施形態

実施形態Ｉ－１．本開示は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量を、それを必要としているヒトに経口で投与することを含むヒトの免疫機能を調節する方法を提供する。

【０２０３】

実施形態Ｉ－２．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物の有

効量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～５０ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重である。

【０２０４】

実施形態Ｉ－３．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物の投与は、自己免疫反応、血糖値、感染症、又は炎症を調節する。

【０２０５】

実施形態Ｉ－４．本開示は実施形態Ｉ－３の方法を提供し、そこにおいて、炎症はアレルギーに関連する。

【０２０６】

実施形態Ｉ－５．本開示は実施形態Ｉ－３の方法を提供し、そこにおいて、自己免疫反応は糖尿病に関連する。

【０２０７】

実施形態Ｉ－６．本開示は実施形態Ｉ－３の方法を提供し、そこにおいて、感染症は、細菌感染症、真菌感染症、又はウイルス感染症である。

【０２０８】

実施形態Ｉ－７．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナは従属栄養的に培養される。

【０２０９】

実施形態Ｉ－８．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、ベーター１，３－グルカンはパラミロンを含む。

【０２１０】

実施形態Ｉ－９．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、ベーター１，３－グルカンはベーター１，６－グリコシド結合を含まない。

【０２１１】

実施形態Ｉ－１０．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、ベーター１，３－グルカンはユーグレナから精製される。

【０２１２】

実施形態Ｉ－１１．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスは前記ベーター１，３－グルカンを含む。

【０２１３】

実施形態Ｉ－１２．本開示は実施形態Ｉ－１１の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは乾燥されている。

【０２１４】

実施形態Ｉ－１３．本開示は実施形態Ｉ－１２の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工される。

【０２１５】

実施形態Ｉ－１４．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は毎日、単回投与として投与される。

【０２１６】

実施形態Ｉ－１５．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は１日に複数回に分かれた投与として投与される。

【０２１７】

実施形態Ｉ－１６．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガ

ラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成分をさらに含む。

【０２１８】

実施形態Ｉ－１７．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は固体として投与される。

【０２１９】

実施形態Ｉ－１８．本開示は実施形態Ｉ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は懸濁液として投与される。

【０２２０】

実施形態Ｉ－１９．本開示は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベータ－１，３－グルカンを含む組成物の有効量をコレステロールが高いヒト又はコレステロールが高くなるリスクがあるヒトに経口で投与することを含む、該ヒトの免疫機能を調節する方法を提供する。

【０２２１】

実施形態Ｉ－２０．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物の投与はヒトのコレステロールのレベルを減少させる。

【０２２２】

実施形態Ｉ－２１．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物の有効量は、０．１ｍｇのベータ－１，３－グルカン／ｋｇ体重～５０ｍｇのベータ－１，３－グルカン／ｋｇ体重である。

【０２２３】

実施形態Ｉ－２２．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナは従属栄養的に増殖する。

【０２２４】

実施形態Ｉ－２３．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、ベータ－１，３－グルカンはパラミロンを含む。

【０２２５】

実施形態Ｉ－２４．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、ベータ－１，３－グルカンはベーター１，６－グリコシド結合を含まない。

【０２２６】

実施形態Ｉ－２５．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、ベータ－１，３－グルカンはユーグレナから精製される。

【０２２７】

実施形態Ｉ－２６．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスはベーター１，３－グルカンを含む。

【０２２８】

実施形態Ｉ－２７．本開示は実施形態Ｉ－２６の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは乾燥されている。

【０２２９】

実施形態Ｉ－２８．本開示は実施形態Ｉ－２７の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている。

【０２３０】

実施形態Ｉ－２９．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物は毎日、単回投与として投与される。

【０２３１】

実施形態Ｉ－３０．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物

は１日に複数回に分かれた投与として投与される。

【０２３２】

実施形態Ｉ－３１．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成分をさらに含む。

【０２３３】

実施形態Ｉ－３２．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物は、スタチン、ニコチン酸、胆汁酸樹脂、フィブリン酸誘導体、又はコレステロール吸収阻害剤と併用して投与される。

【０２３４】

実施形態Ｉ－３３．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物は固体として投与される。

【０２３５】

実施形態Ｉ－３４．本開示は実施形態Ｉ－１９の方法を提供し、そこにおいて、組成物は懸濁液として投与される。

【０２３６】

実施形態ＩＩ－１．本開示は、発酵を利用して増殖させたユーグレナに由来するベータ－１，３－グルカンを含む組成物の有効量を腸の炎症をもつヒトに経口で投与することを含む、該ヒトの免疫機能を増強する方法を提供する。

【０２３７】

実施形態ＩＩ－２．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物の有効量は、０．１ｍｇのベータ－１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベータ－１，３－グルカン／ｋｇ体重である。

【０２３８】

実施形態ＩＩ－３．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、腸の炎症は炎症性腸疾患である。

【０２３９】

実施形態ＩＩ－４．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、腸の炎症は大腸炎である。

【０２４０】

実施形態ＩＩ－５．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、腸の炎症はクローン病である。

【０２４１】

実施形態ＩＩ－６．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナは従属栄養的に増殖する。

【０２４２】

実施形態ＩＩ－７．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、ベータ－１，３－グルカンはパラミロンを含む。

【０２４３】

実施形態ＩＩ－８．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、ベータ－１，３－グルカンはベーター（１，６）－グリコシド結合を含まない。

【０２４４】
実施形態ＩＩ－９．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、ベーター１，３－グルカンはユーグレナから精製される。
【０２４５】
実施形態ＩＩ－１０．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスは前記ベーター１，３－グルカンを含む。
【０２４６】
実施形態ＩＩ－１１．本開示は実施形態ＩＩ－１０の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは乾燥されている。
【０２４７】
実施形態ＩＩ－１２．本開示は実施形態ＩＩ－１１の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている。
【０２４８】
実施形態ＩＩ－１３．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は毎日、単回投与として投与される。
【０２４９】
実施形態ＩＩ－１４．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は１日に複数回に分かれた投与として投与される。
【０２５０】
実施形態ＩＩ－１５．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追加成分をさらに含む。
【０２５１】
実施形態ＩＩ－１６．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は固体として投与される。
【０２５２】
実施形態ＩＩ－１７．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は懸濁液として投与される。
【０２５３】
実施形態ＩＩ－１８．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物を投与することは抗炎症性サイトカイン産生を増加させる。
【０２５４】
実施形態ＩＩ－１９．本開示は実施形態ＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、組成物は、抗炎症薬、免疫抑制薬、又は抗生物質と併用して投与される。
【０２５５】
実施形態ＩＩＩ－１．本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患をもつヒトにおける前記疾患を治療する方法を提供し、その方法は、ヒトに、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンふぇを含む組成物の有効量を経口で投与することを含む。

【０２５６】
実施形態ＩＩＩ－２．本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される疾患をもつヒトの前記疾患を治療する方法を提供し、その方法は、該ヒトに、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の有効量を経口で投与することを含む。
【０２５７】
実施形態ＩＩＩ－３．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、疾患は高脂血症である。
【０２５８】
実施形態ＩＩＩ－４．本開示は実施形態ＩＩＩ－３の方法を提供し、そこにおいて、組成物の投与はヒトのコレステロールのレベルを減少させる。
【０２５９】
実施形態ＩＩＩ－５．本開示は実施形態ＩＩＩ－３～ＩＩＩ－４のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物の有効量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む。
【０２６０】
実施形態ＩＩＩ－６．本開示は実施形態ＩＩＩ－３～ＩＩＩ－４のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物の有効量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～５０ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む。
【０２６１】
実施形態ＩＩＩ－７．本開示は実施形態ＩＩＩ－３～ＩＩＩ－６のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は、スタチン、ニコチン酸、胆汁酸樹脂、フィブリン酸誘導体、又はコレステロール吸収阻害剤と併用して投与される。
【０２６２】
実施形態ＩＩＩ－８．本開示は実施形態ＩＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、疾患は、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される。
【０２６３】
実施形態ＩＩＩ－９．本開示は実施形態ＩＩＩ－１の方法を提供し、そこにおいて、疾患は、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される。
【０２６４】
実施形態ＩＩＩ－１０．本開示は実施形態ＩＩＩ－８～ＩＩＩ－９のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、疾患は大腸炎である。
【０２６５】
実施形態ＩＩＩ－１１．本開示は実施形態ＩＩＩ－８～ＩＩＩ－９のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、疾患は炎症性腸疾患である。
【０２６６】
実施形態ＩＩＩ－１２．本開示は実施形態ＩＩＩ－８～ＩＩＩ－９のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、疾患はクローン病である。
【０２６７】
実施形態ＩＩＩ－１３．本開示は実施形態ＩＩＩ－８の方法を提供し、そこにおいて、疾患は結腸がんである。
【０２６８】
実施形態ＩＩＩ－１４．本開示は実施形態ＩＩＩ－８～ＩＩＩ－１３のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物の有効量は、０．１ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重～１００ｍｇのベーター１，３－グルカン／ｋｇ体重を含む。
【０２６９】
実施形態ＩＩＩ－１５．本開示は実施形態ＩＩＩ－８～ＩＩＩ－１４のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物を投与することは、抗炎症性サイトカイン産生を増加させる。
【０２７０】

実施形態ＩＩＩ－１６．本開示は実施形態ＩＩＩ－８～ＩＩＩ－１５のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は、抗炎症薬、免疫抑制薬、又は抗生物質と併用して投与される。

【０２７１】

実施形態ＩＩＩ－１７．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－１６のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナはユーグレナ・グラシリスである。

【０２７２】

実施形態ＩＩＩ－１８．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－１７のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナは従属栄養的に増殖する。

【０２７３】

実施形態ＩＩＩ－１９．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－１８のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、前記ベーター１，３－グルカンはパラミロンの形態で存在する。

【０２７４】

実施形態ＩＩＩ－２０．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－１９のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、ベーター１，３－グルカンはベーター１，６－グリコシド結合を含まない。

【０２７５】

実施形態ＩＩＩ－２１．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２０のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、ベーター１，３－グルカンはユーグレナから精製される。

【０２７６】

実施形態ＩＩＩ－２２．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２０のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物はユーグレナバイオマスを含み、ユーグレナバイオマスは前記ベーター１，３－グルカンを含む。

【０２７７】

実施形態ＩＩＩ－２３．本開示は実施形態ＩＩＩ－２２の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは４０％以下の含水率に乾燥されている。

【０２７８】

実施形態ＩＩＩ－２４．本開示は実施形態ＩＩＩ－２３の方法を提供し、そこにおいて、ユーグレナバイオマスは１０００ミクロン以下の平均粒径を有するように加工されている。

【０２７９】

実施形態ＩＩＩ－２５．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２４のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は毎日、単回投与として投与される。

【０２８０】

実施形態ＩＩＩ－２６．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２４のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は１日に複数回に分かれた投与として投与される。

【０２８１】

実施形態ＩＩＩ－２７．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２６のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は、アルファトコフェロール、コレカルシフェロール、亜鉛、クロム、セレン、アルギニン、アスコルビン酸、アルキルグリセロール、カフェイン、カヴァカヴァ、ウコン、スピルリナ、クロレラ、ステビア、カルシウムＤ－グルカレート、コエンザイムＱ１０、ペプチド、ジメチルグリシン、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、アルファ-リノレン酸、アスタキサンチン、ベータカロチン、ルテイン、乳酸菌プロバイオティクス、ビフィドバクテリウムプロバイオティクス、マンノオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、アストラガラス、エキナセア、エスベリトックス、ニンニク、グルタチオン、ケルプ、Ｌ－アルギニン、Ｌ－オルニチン、レシチン顆粒、マイタケ、レイシ、又はシイタケの抽出物、マンガン、ケルセチン、ブロメライン、オリーブ葉、ニワトコ、ウムカ、パントテン酸、ケルセチン、アルファリポ酸、精油、魚油、香辛料及びその誘導体、プテロスチルベン、並びにそれらの組み合わせからなる群より選択される追

加成分をさらに含む。
【０２８２】
実施形態ＩＩＩ－２８．本開示は実施形態ＩＩＩ－２７の方法を提供し、そこにおいて、追加成分は亜鉛である。
【０２８３】
実施形態ＩＩＩ－２９．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２７のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は金属をさらに含む。
【０２８４】
実施形態ＩＩＩ－３０．本開示は実施形態ＩＩＩ－２９の方法を提供し、そこにおいて、金属は、鉄、マグネシウム、リチウム、亜鉛、銅、クロム、ニッケル、コバルト、バナジウム、モリブデン、マンガン、セレン、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される構成要素を含む。
【０２８５】
実施形態ＩＩＩ－３１．本開示は実施形態ＩＩＩ－３０の方法を提供し、そこにおいて、ベーター（１，３）－グルカンと金属は複合体を形成する。
【０２８６】
実施形態ＩＩＩ－３２．本開示は実施形態ＩＩＩ－３１の方法を提供し、そこにおいて、複合体は亜鉛ベーター（１，３）－グルカン複合体を含む。
【０２８７】
実施形態ＩＩＩ－３３．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－２６のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は、ヘマトコッカス・プルビアリス、アスタキサンチン、及び初乳からなる群より選択される追加成分をさらに含む。
【０２８８】
実施形態ＩＩＩ－３４．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－３３のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は固体として投与される。
【０２８９】
実施形態ＩＩＩ－３５．本開示は実施形態ＩＩＩ－１～ＩＩＩ－３３のいずれか１つの方法を提供し、そこにおいて、組成物は懸濁液として投与される。
【０２９０】
実施形態ＩＩＩ－３６．本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患の治療で用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物を提供する。
【０２９１】
実施形態ＩＩＩ－３７．本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される疾患の治療で用いる、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物を提供する。
【０２９２】
実施形態ＩＩＩ－３８．本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、クローン病、及び結腸がんからなる群より選択される疾患の治療用薬剤の製造のための、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の使用を提供する。
【０２９３】
実施形態ＩＩＩ－３９．本開示は、高脂血症、メタボリックシンドローム、炎症性腸疾患、大腸炎、及びクローン病からなる群より選択される疾患の治療用薬剤の製造のための、発酵を利用して増殖させたユーグレナのベーター１，３－グルカンを含む組成物の使用を提供する。
【０２９４】
以下の例は本出願の実施形態をさらに説明する。これらの例は本出願の実施形態を例示することを意図するにすぎず、本出願を限定すると解釈されるべきではない。

【０２９５】
実施例
免疫応答／高脂血症
実施例１：ベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスの経口投与
反復回分法を用いてバイオリアクターで発酵を利用してユーグレナを培養する。最後のステップでは、ユーグレナを約４０グラムの乾燥重量／リットル～約８０グラムの乾燥重量／リットルの細胞密度まで培養し、収穫する。ユーグレナ細胞はベーター１，３－グルカン含有率が約７０重量％である。タンジェンシャルフローろ過を用いてユーグレナ細胞培養物をろ過し、使用済み増殖培地を廃棄し、細胞を水で洗浄する。結果として得られるユーグレナバイオマスを薄いシートに圧延し、含水率１０％未満に乾燥する。次いでユーグレナバイオマスをヒトに経口投与して免疫機能を調節する。
【０２９６】
実施例２：栄養補助食品としてのベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスの経口投与
反復回分法を用いてバイオリアクターで発酵を利用してユーグレナを培養する。最後のステップでは、ユーグレナを約４０グラムの乾燥重量／リットル～約８０グラムの乾燥重量／リットルの細胞密度まで培養し、収穫する。ユーグレナ細胞はベーター１，３－グルカン含有率が約７０重量％である。タンジェンシャルフローろ過を用いてユーグレナ細胞培養物をろ過し、使用済み増殖培地を廃棄し、細胞を水で洗浄する。次いで、ユーグレナバイオマスをドラム乾燥機で含水率５％未満に乾燥させる。ハンマーミルを使用して、乾燥フレークを平均粒径が２５０ミクロン未満の粉末に加工する。次いで、粉末を経口投与向けの錠剤に成形して、免疫機能を調節し、高脂血症を治療し、又は高脂血症を予防的に治療する。代替的に、粉末を食品と混合し、食品と共に経口投与して免疫機能を調節する。代替的に、粉末を経口投与用カプセルに入れ、免疫機能を調節し、高脂血症を治療し、又は高脂血症を予防的に治療する。
【０２９７】
実施例３：ユーグレナからのベーター１，３－グルカンの精製
１つの例示的な実施形態では、本明細書に記載の発酵によって増殖させたユーグレナを１％ドデシル硫酸ナトリウム溶液中で加熱し、その溶液を遠心分離し、ペレットを水及びエタノールで洗浄することによって、ユーグレナからベーター１，３－グルカンを精製する。約１部のユーグレナバイオマス（乾燥重量基準）を５部の１％（重量／体積）ドデシル硫酸ナトリウム溶液に懸濁する。この懸濁液を混ぜた後に約１００℃に約３０分間加熱する。次いで、溶液を冷却し、＞５００ＲＣＦで約５分間遠心分離する。上清を捨て、ペレットを１０部の水に再懸濁して洗浄し、激しく混ぜ、＞５００ＲＣＦで５分間遠心分離する。この洗浄過程を１０部の９５％エタノールでさらに２回繰り返して、純度が９５％のベータグルカンペレットに達することができる。ペレットをさらに乾燥させて白色粉末にすることができる。
【０２９８】
別の例示的な実施形態では、本明細書に記載の発酵によって増殖させたユーグレナを、高圧ホモジナイザーを通してポンプ輸送して細胞を溶解することによってベーター１，３－グルカンを精製する。次いで、溶解した混合物を遠心分離してベーター１，３－グルカンを回収する。上清を捨て、ペレットを水で再懸濁することによって洗浄し、激しく混ぜ、＞５００ＲＣＦで遠心分離する。洗浄過程を１０部の水でさらに２回繰り返して、９５％純度のベーター１，３－グルカンペレットに達することができる。ペレットをさらに乾燥させて白色粉末にすることができる。
【０２９９】
本明細書に記載の方法は、ベーター１，３－グルカンの抽出に関してこれまでに記述された幾つかの方法と比べて毒性が低く、食品グレード又は機能食品グレード製品の製造に必要な安全性認証や全天然産物認証を受けるという利点を付加しうる。次いで、結果として得られる精製ベーター１，３－グルカンを、経口投与用錠剤に成形する又は食品と混合

して経口投与する。代替的に、精製ベーター１，３－グルカンを医薬組成物としての水溶液と混合することができる。医薬組成物は薬理学的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。次いで、医薬組成物を静脈内投与することができる。

【０３００】

実施例４：ユーグレナ由来ベーター１，３－グルカンを投与したマウスの免疫応答

ベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスを、本明細書に記載の発酵過程を利用して増殖させた。全細胞生成物及び精製ベータグルカン抽出物をマウスの研究において試験した。有機炭素源としてグルコースを用いて増殖させたユーグレナ細胞から全細胞生成物を作製した。全細胞生成物は約５０重量％のベーター１，３－グルカンを含有し、遠心分離した後にさらに加工せずにそのまま乾燥させた。全細胞生成物を分画してベーター１，３－グルカンを単離し、次いでベータグルカン画分を繰り返し洗浄して非ベータグルカン細胞構成要素を除去して、ベーター１，３－グルカンの精製試料が得られた。精製試料はベーター１，３－グルカンを約９３重量％含んだ。市販の酵母由来ベータグルカンも比較した。

【０３０１】

全細胞ユーグレナバイオマス試料、精製ベーター１，３－グルカンサンプル試料、及び酵母由来ベータグルカン製品を乾燥させ、５００ミクロン未満の粒径に粉砕した。次いで、これらの乾燥粉末をＰＢＳバッファーと混合し、適切な濃度に希釈した後にＢＡＬＢ／ｃマウスに強制経口投与によって投与した。非特異的免疫系活性を測定するために各マウスから採血した。次のパラメーターを評価した：食作用活性（外来粒子を取り込むマクロファージの能力）、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）細胞活性（外来細胞又は感染細胞を破壊するＮＫ細胞の能力）、及び抗体価。

【０３０２】

食作用

食作用は、潜在的に有害な粒子（例えば細菌）を捕獲して破壊する免疫系による１つの応答である。食作用指数は、標識された粒子を能動的に捕捉して貪食した好中球のパーセント割合として測定される（図７Ａ）。９頭のＢＡＬＢ／ｃマウスを各治療群に割り当て、ベータグルカン生成物（２０ｍｇ／ｋｇマウス）を強制経口投与によって毎日給餌した。対照群はＰＢＳによる強制経口投与のみを受けた。１日目、７日目、及び１４日目に各治療群から３頭のマウスを犠牲にして分析用材料を採取した。食作用指数は、割り当てられた時間に標識された粒子を能動的に捕捉して貪食する好中球細胞のパーセント割合として測定される。ＰＢＳ対照のみを与えられたマウスは３０％の貪食指数を有した一方で、ユーグレナ由来の精製ベータグルカンの最高投与量を摂取したマウスは２倍近い食作用活性（５９％）を示した。精製された藻類ベータグルカン生成物を受けた群は各投与量レベルで最も良好に食作用を行った。全ユーグレナバイオマスと酵母由来のベータグルカンを与えたマウスは、２つの最低投与量レベルで同様の食作用活性を示したが、２つの最高投与量レベルで酵母由来のベータグルカンを与えたマウスはわずかに高い食作用活性を示した。

【０３０３】

ナチュラルキラー細胞の細胞傷害性

ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞活性（外来細胞又は感染細胞を破壊するＮＫ細胞の能力）を測定して、投与したベータグルカンに起因する免疫機能調節の度合いを決定した（図７Ｂ）。ＮＫ細胞の細胞傷害性は、潜在的に病原性がある生物を死滅させるためのＮＫ細胞による非特異的免疫応答の指標である。９頭のＢＡＬＢ／ｃマウスを各治療群に割り当て、ベータグルカン生成物（２０ｍｇ／ｋｇマウス）を強制経口投与によって毎日給餌した。対照群はＰＢＳによる強制経口投与のみを受けた。１日目、７日目、及び１４日目に、各治療群から３頭のマウスを犠牲にして分析用材料を採取した。ＰＢＳ対照を与えたマウスが１２％の細胞傷害性指数を示した一方で、全ユーグレナバイオマス又は精製ユーグレナベータグルカンのいずれかを１０ｍｇ／ｋｇの低投与量で与えられたマウスは、３倍以上の細胞傷害性指数（３６～５０％）を示した。２０ｍｇ／ｋｇ以上の投与量では、全

ユーグレナバイオマス治療及び精製ユーグレナベータグルカン治療の両方が、酵母由来ベータグルカン生成物よりも強い細胞傷害性応答を誘発した。

【０３０４】

抗体価

抗体形成は、ベータグルカンがワクチンのアジュバント（調節因子）として作用できることを示す。３頭のＢＡＬＢ／ｃマウスを各治療群に割り当て、０日目から開始して、４、１０、２０、及び４０ｍｇ／ｋｇに相当するベータグルカン生成物を毎日経口で投与した。３日目及び１６日目に腹腔内注射によって抗原（オボアルブミン）を与え、２３日目にＥＬＩＳＡアッセイを用いて抗体価を測定した。陰性対照としてＰＢＳ強制経口投与を用いた（図７Ｃ）。抗体価の有意な増加は、ベータグルカンのような生成物がワクチンのアジュバント（エンハンサー）として働く可能性を示している。ベータグルカン治療群のすべてが、陰性対照に比べて抗体産生の増加を誘発し、この効果はより高い投与量で増強された。精製藻類ベータグルカンでの治療は、治療レベルの各々で最も多くの抗体を産生し、僅差で全ユーグレナバイオマス治療群が続いた。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを適度な投与量（１０及び２０ｍｇ／ｋｇ）で投与したものと比較して、酵母ベータグルカン生成物を与えたマウスは、実質的に低い抗体価（１５～５０％低い）を示したが、最も高い投与量率（dosage rate）で全ユーグレナバイオマス生成物を与えたマウスと同様の力価を示した。

【０３０５】

まとめ

特異的免疫応答（すなわち、抗体産生）及び非特異的免疫応答（ＮＫ細胞の細胞傷害性及び食作用活性）はともに、ベータグルカン生成物のいずれかを与えられた治療群で有意に増加した。すべての免疫測定基準について、精製藻類ベーター１，３－グルカンは、全ての治療レベルで最も強い免疫応答を誘発した。全ユーグレナバイオマス全体及び精製藻類ベーター１，３－グルカンは、陰性対照で見られた力価よりも数倍高い非常に強い抗体反応を誘発した。これらのデータは、これらの生成物がアジュバントとして作用する可能性を示している。

【０３０６】

全ユーグレナバイオマスは、抗体産生とＮＫ細胞の細胞傷害性アッセイの両方において、ほぼすべての治療レベルで酵母由来のベータグルカン生成物と同程度かそれより良好に機能した。ほとんどの場合、酵母由来の生成物と比較して、全ユーグレナバイオマスは、投与量レベルのわずか４分の１から２分の１でほぼ同程度又はより良好な応答を誘導した。

【０３０７】

酵母由来ベータグルカン生成物は、精製藻類ベータグルカンよりも低い食作用反応を引き出したが、このカテゴリーの全ユーグレナバイオマス生成物と同程度又はより良好に機能した。一般的に、ＮＫ細胞の細胞傷害性及び抗体産生に比べて、食作用に対するすべてのベータグルカン生成物の全体的な影響は抑えられている。

【０３０８】

実施例５：ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与したマウスの大腸菌攻撃投与（challenge）

ユーグレナを本明細書に記載のように滅菌発酵槽で培養した。発酵槽内でユーグレナバイオマスが標的密度に達したら、細胞を遠心分離し、結果として得られたペーストを－２０℃で凍結保存した。凍結したペーストを解凍し、乾燥フレークが形成するまで６５℃で乾燥させた後、粒径２５０ミクロン未満に粉砕して、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスを含む組成物を作製した。ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンを、ユーグレナ細胞を溶解し、ベータグルカンを＞９０％含み、粒径が２５０ミクロン未満の抽出物を生じさせる方法を通してベーター１，３－グルカンを単離することによって作製した。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの試料と酵母由来の精製ベータグルカンの試料とを比較するために、各乾燥生成物をリン酸緩衝生

理食塩水（ＰＢＳ）と混合し、適切な濃度に希釈した後、所定の投薬レベルでマウスに強制経口投与によって与えた。

【０３０９】

１０頭のＢＡＬＢ／ｃマウスを各治療群に割り当て、名目致死量（3×10^{7}）の大腸菌を０日目に筋肉内注射によって投与した。ベータグルカン生成物（２０ｍｇ／ｋｇマウス）を、大腸菌注射の２日前（－２日目）から始めて注射の２日後（＋２日目）まで毎日マウスに強制経口投与によって経口投与した。対照群はＰＢＳ強制経口投与のみを受けたのに対して、抗生物質治療群は、０、１、２、３、及び４日目にアンピシリン（１３ｍｇ／ｋｇ）の経口投与を受けた。マウスを１０日目まで毎日評価した。

【０３１０】

図８は大腸菌チャレンジ実験の結果をまとめたものである。ＰＢＳのみを投与された対照群のマウスはすべて、大腸菌注射の７日以内に死亡した。対照的に、１０日目の死亡率はすべての治療群において少なくとも４０％減少した。注目すべきことに、ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンを受けたマウスの７０％が大腸菌注射の１０日後に生存した。この治療群とアンピシリンを受けた群は、時間とともに非常によく似た生存率を示し、藻類ベーター１，３－グルカン治療が、一般的な抗生物質アンピシリンと同様のマウスにおける細菌感染に対する防御をもたらしたことを示唆している。約５０％のベータグルカンを含むユーグレナバイオマス製品を受けたマウスも、対照群と比較して死亡率の有意な低下を示した。この治療群ではマウスの５０％が大腸菌注射の１０日後に生存した。これに対して酵母由来のベータグルカン抽出物を与えた群では４０％が生存した。

【０３１１】

実施例６：ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与したマウスにおけるサイトカイン発現

ベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスを本明細書に記載のように発酵法を用いて培養した。全細胞生成物を分画してベータグルカンを単離し、次いでベータグルカン画分を繰り返し洗浄して非ベーター１，３－グルカン細胞構成要素を除去した。精製した試料は約９３重量％のベーター１，３－グルカンを含んだ。精製ベータグルカン生成物を使用して、ベーター１，３－グルカンのサイトカイン発現に対する効果を評価した。サイトカインは、免疫系において重要な役割を果たし、感染症及び炎症に対する宿主反応に関与する。

【０３１２】

ＢＡＬＢ／ｃマウス（６頭／群）に、精製ベーター１，３－グルカン生成物を７日間、強制経口投与によって与えた。マウスへの投与量は、０ｍｇ／ｋｇ（Ａ）、５ｍｇ／ｋｇ（Ｂ）、２０ｍｇ／ｋｇ（Ｃ）、及び２００ｍｇ／ｋｇ（Ｄ）であった。８日目に、コラゲナーゼで消化した小腸から磁気選別によって樹状細胞（ＤＣ；ＣＤ１１ｃ＋細胞）を単離し、一晩培養した。上清をルミネックスマルチプレックスアッセイによってさまざまなサイトカイン及びケモカイン因子について試験した。図９Ａに示されるように、ベーター１，３－グルカンの量の増加が、ＩＬ－１ｂ、ＴＮＦ－ａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－１８、ＩＰ－１０、及びＭＣＰ－１の産生を増加させた。これらのケモカインのレベルは高く、５、２０、及び２００ｍｇ／ｋｇの投与量で投与されたベーター１，３－グルカンについては相対的に変化がなかったので、Ｒａｎｔｅｓ及びＭＩＰ－１ａの投与量効果はあまり顕著でなかった。ＩＦＮ－ｇ、ＩＬ－１２、ＩＬ－６、ＩＬ－９、ＩＬ－２、ＩＬ－２３、ＧＭＣＳＦ、ＩＬ－４、及びＩＬ－５の発現は検出できなかった。

【０３１３】

ＢＡＬＢ／ｃマウス（６頭／群）に精製ベーター１，３－グルカン生成物を７日間、強制経口投与によって与えた。マウスへの投与量は、０ｍｇ／ｋｇ（Ａ）、５ｍｇ／ｋｇ（Ｂ）、２０ｍｇ／ｋｇ（Ｃ）、及び２００ｍｇ／ｋｇ（Ｄ）であった。８日目に、コラゲナーゼで消化した小腸から磁気選別によってマクロファージ（Ｆ４／８０細胞）を単離し、一晩培養した。ルミネックスマルチプレックスアッセイによってさまざまなサイトカイン及びケモカイン因子について上清を分析した。図９Ｂは、ベーター１，３－グルカンの

量の増加が、ＩＬ－６、ＩＬ－１ｂ、ＴＮＦ－ａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－１８、Ｒａｎｔｅｓ、ＭＩＰ－１ａ、ＩＰ－１０、及びＭＣＰ－１を増加させたことを示す。ＩＦＮ－ｇ、ＩＬ－１７、ＩＬ－２２、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１８、ＩＬ－２、ＩＬ－２３、及びＧＭＣＳＦの発現は検出できなかった。

【０３１４】

ＢＡＬＢ／ｃマウス（６頭／群）に精製ベーター１，３－グルカン生成物を７日間、強制経口投与によって与えた。マウスに、０ｍｇ／ｋｇ（Ａ）、５ｍｇ／ｋｇ（Ｂ）、２０ｍｇ／ｋｇ（Ｃ）、及び２００ｍｇ／ｋｇ（Ｄ）の投与量を施した。８日目に、コラゲナーゼで消化した小腸から磁気選別によってＮＫ１．１＋細胞（ＮＫ細胞）を単離し、一晩培養した。ルミネックスマルチプレックスアッセイによってさまざまなサイトカイン及びケモカイン因子について上清を分析した。図９Ｃは、ベーター１，３－グルカンの量の増加が、ＩＦＮｇ、ＩＬ－１ｂ、ＴＮＦ－ａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－２２、Ｒａｎｔｅｓ、及びＩＬ－１７を増加させたことを示す。対照的に、ＭＩＰ－１ａ、ＩＰ－１０、及びＭＣＰ－１の発現に対するベーター１，３－グルカンの効果は、投与されたβグルカンの投与量とは比較的無関係なようである。ベーター１，３－グルカンの量が増加するにつれてＩＬ－２３の産生は減少した。ＩＬ－６、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－２、及びＧＭＣＳＦの発現は検出できなかった。

【０３１５】

実施例７：ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与することによるマウスにおける高脂血症の治療

ユーグレナを本明細書に記載のように滅菌発酵槽で増殖させた。発酵槽内でユーグレナバイオマスが標的密度に達したら、ユーグレナをろ過、溶解し、ベーター１，３－グルカンを精製した。ユーグレナ由来の精製ベーター１，３－グルカンを下記のマウス実験に用いた。リン酸緩衝生理食塩水を対照として投与した。

【０３１６】

第１の実験では、Ｂａｌｂ／ｃマウスにベータグルカンを含まない高コレステロール餌（毎日約１６ｍｇのコレステロール）を１４日間与えた。この期間の後、マウスに、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン又は対照を含有し、コレステロールのレベルが正常（約１１０ｍｇ／ｄＬ）の飼料をさらに３０日間与えた。絶食の１２時間後に血清を採取し、血中コレステロール及びトリグリセリドを測定した。図１０Ａに図示するように、マウスの血清コレステロールレベルは、高コレステロール給餌の間に平均が約１１５ｍｇ／ｄＬから約２６５ｍｇ／ｄＬに上昇した。正常量のコレステロールを含む飼料に戻した後にリン酸緩衝化生理食塩水を投与した対照マウスでは、コレステロールレベルは少なくとも３４日目まで上昇したままであり、４４日目には約１８１ｍｇ／ｄＬに減少した。対照的に、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを投与したマウスでは、血中コレステロールレベルの即時且つ着実な減少がみられた。トリグリセリドレベルについても同様の結果が得られた。図１０Ｂに見られるように、マウスが高コレステロール飼料を摂取した間に血清トリグリセリドレベルは約１０５ｍｇ／ｄＬから約１３８ｍｇ／ｄＬに上昇した。対照マウスは、正常コレステロール飼料での３０日後に血清トリグリセリドレベルがわずかに減少しただけであった。対照的に、ベータグルカンを投与したマウスでは、血清トリグリセリドレベルの即時且つ継続的な減少がみられ、４４日目には実験の開始時よりも低かった。

【０３１７】

第２の実験では、精製ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカン又は対照とともに、Ｂａｌｂ／ｃマウスに高コレステロール飼料（毎日約１６ｍｇのコレステロール）を１４日間給餌した。１４日後、マウスに正常コレステロール飼料（約１１０ｍｇ／ｄＬ）を与え、同じベータグルカン生成物又は対照をさらに３０日間投与した。絶食の１２時間後に血清を採取し、血中コレステロール及びトリグリセリドを測定した。図１１Ａに図示するように、対照のみを投与したマウスの血清コレステロールは、高コレステロール飼料を用いた１４日間に最も上昇し、約１１８ｍｇ／ｄＬから約２７５ｍｇ／ｄＬに上昇した。ユ

ーグレナ（ユーグレナ）由来の精製ベーター１，３－グルカンを投与したマウスは、約１１８ｍｇ／ｄＬから約２３０ｍｇ／ｄＬへの血清コレステロールの小さな増加を示した。トリグリセリドレベルについても同様の結果が得られた。図１１Ｂに見られるように、対照マウスの血清トリグリセリドレベルは、高コレステロール飼料を与えられた間に最も増加した（約１０５ｍｇ／ｄＬから約１４５ｍｇ／ｄＬ）。対照マウスは、正常コレステロール飼料での３０日間の後に血清トリグリセリドレベルのわずかな減少のみがみられた。対照的に、ベータグルカンを投与したマウスでは、正常コレステロール飼料に戻した後に血清トリグリセリドレベルの即時且つ継続的な減少が見られ、４４日目には実験の開始時よりも低かった。

【０３１８】

実施例８：ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを摂取することによる個人の代謝の健康状態への影響を評価するための臨床試験

治験を利用して、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを摂取することの、コレステロールレベル、血糖値、感染症、及び炎症に対する影響を評価する。（登録施設内審査委員会によって承認された）書面によるインフォームドコンセントと選考過程を予め整えた後に参加者を募集する。試験は４週間の期間であり、評価はベースライン、２及び４週間のベーター１，３－グルカン摂取時に行われる。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンをカプセルの形で投与して、各個人に２５０ｍｇの１日投与量を与える。

【０３１９】

代謝の健康状態に対するベータグルカンの影響は、グルコースや脂質代謝に関するマーカーの空腹時血中レベル、全身の健康状態やウエルネスの評価、及び血圧や血液化学の測定のうちの１つ以上を用いて測定される。血液化学の分析としては、タンパク質カルボニル含量（酸化ストレスのマーカー）、急性期炎症マーカー（Ｃ反応性タンパク質や、アルファ－１酸糖タンパク質、フィブリノゲン、血小板第４因子など）、代謝バイオマーカー（Ｃ－ペプチドや、コルチゾール、膵臓ポリペプチド、プロインスリン、ペプチドＹＹなど）、サイトカインパネル、及び抗体分析を挙げることができる。

【０３２０】

腸の炎症

実施例９：ベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスの経口投与

反復回分法を用いてバイオリアクターで発酵を利用してユーグレナを培養する。最後のステップでは、ユーグレナを約４０グラムの乾燥重量／リットル～約８０グラムの乾燥重量／リットルの細胞密度まで培養し、収穫する。ユーグレナ細胞はベーター１，３－グルカン含有率が約５０重量％である。タンジェンシャルフローろ過を用いてユーグレナ細胞培養物をろ過し、使用済み増殖培地を廃棄し、細胞を水で洗浄する。結果として得られるユーグレナバイオマスを薄いシートに圧延し、含水率１０％未満に乾燥させる。乾燥バイオマスを１０００ミクロン未満に微粉砕し、次いでユーグレナバイオマスをヒトに経口投与して腸の炎症を治療する。

【０３２１】

実施例１０：ベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスの栄養補助食品としての経口投与

反復回分法を用いてバイオリアクターで発酵を利用してユーグレナを培養する。最後のステップでは、ユーグレナを約４０グラムの乾燥重量／リットル～約８０グラムの乾燥重量／リットルの細胞密度まで培養し、収穫する。ユーグレナ細胞はベーター１，３－グルカン含有率が約５０重量％である。タンジェンシャルフローろ過を用いてユーグレナ細胞培養物をろ過し、使用済み増殖培地を廃棄し、細胞を水で洗浄する。次いで、ユーグレナバイオマスをドラム乾燥機で含水率５％未満に乾燥させる。乾燥フレークを、ハンマーミルを使用して平均粒径が２５０ミクロン未満の粉末に加工する。次いで、粉末を経口投与向けの錠剤に成形して、腸の炎症を治療する。代替的に、粉末を食品と混合し、食品と共に経口投与して腸の炎症を治療する。代替的に、粉末を経口投与用カプセルに入れ、腸の炎症を治療する。

【０３２２】
実施例１１：ユーグレナからのベーター１，３－グルカンの精製
１つの例示的な実施形態では、本明細書に記載のように発酵によって増殖させたユーグレナを１％ドデシル硫酸ナトリウム溶液中で加熱し、その溶液を遠心分離し、ペレットを水及びエタノールで洗浄することによって、ユーグレナからベーター１，３－グルカンを精製する。約１部のユーグレナバイオマス（乾燥重量基準）を５部の１％（重量／体積）ドデシル硫酸ナトリウム溶液に懸濁する。この懸濁液をかき混ぜ、次いで約１００℃に約３０分間加熱する。次いで、溶液を冷却し、＞５００ＲＣＦで約５分間遠心分離する。上清を捨て、ペレットを１０部の水に再懸濁して洗浄し、激しく混ぜ、＞５００ＲＣＦで５分間遠心分離する。この洗浄過程を１０部の９５％エタノールでさらに２回繰り返して、純度９５％のベータグルカンペレットに達することができる。ペレットをさらに乾燥させて白色粉末にすることができる。
【０３２３】
別の例示的な実施形態では、本明細書に記載の発酵によって増殖させたユーグレナを、高圧ホモジナイザーを通してポンプ輸送して細胞を溶解することによってベーター１，３－グルカンを精製する。次いで、溶解した混合物を遠心分離してベーター１，３－グルカンを回収する。上清を捨て、ペレットを水で再懸濁することによって洗浄し、激しく混ぜ、＞５００ＲＣＦで遠心分離する。洗浄過程を１０部の水でさらに２回繰り返して、純度９５％のベーター１，３－グルカンペレットに達することができる。ペレットをさらに乾燥させて白色粉末にすることができる。
【０３２４】
本明細書に記載の方法は、ベーター１，３－グルカンの抽出に関してこれまでに記述された幾つかの方法と比べて毒性が低く、食品グレード又は機能食品グレード製品の製造に必要な安全性認証や全天然産物認証を受けるという利点を付加しうる。次いで、結果として得られる精製ベーター１，３－グルカンを経口投与用錠剤に成形する又は食品と混合して経口投与する。代替的に、精製ベーター１，３－グルカンを医薬組成物としての水溶液と混合することができる。医薬組成物は、薬理学的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。次いで、医薬組成物を静脈内投与することができる。
【０３２５】
実施例１２：化学的に誘発された急性大腸炎に対するユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前処理の効果を決定するための生体内研究
ベーター１，３－グルカンを含むユーグレナバイオマスを、本明細書に記載のように発酵過程を用いて増殖させた。乾燥ユーグレナバイオマス及び精製ベータグルカン抽出物をマウスの研究においてテストした。有機炭素源としてグルコースを用いて増殖させたユーグレナ細胞から乾燥ユーグレナバイオマスを作製した。ユーグレナバイオマスは約５０重量％のベーター１，３－グルカンを含有し、遠心分離した後に、さらなる処理なしで乾燥させた。ユーグレナバイオマス生成物を分画してベーター１，３－グルカンを単離し、次いでベータグルカン画分を繰り返し洗浄して非ベータグルカン細胞構成要素を除去すると、ベーター１，３－グルカンの精製試料が得られた。精製試料はベーター１，３－グルカンを約９５重量％含んだ。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を陰性対照として投与した。
【０３２６】
乾燥ユーグレナバイオマス試料及び精製ベーター１，３－グルカン試料を乾燥させ、５００ミクロン未満の粒径に粉砕した。次いで、これらの乾燥粉末をＰＢＳバッファーと混合し、適切な濃度に希釈した後に、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスに強制経口投与によって与えた。試験の期間中（１５日間）、マウスを、１日１回、絶食の２時間後に、（ｉ）ＰＢＳ（「なし」）、（ｉｉ）乾燥ユーグレナバイオマス（「Ａ５０」；２５０μｇ／マウス／日）、又は（ｉｉｉ）精製ベーター１，３－グルカン（「ＡＧ」；１２５μｇ／マウス／日）のいずれかで治療した。この投薬により、乾燥ユーグレナバイオマスを投与されたマウスが、精製ベーター１，３－グルカンを投与されたマウスと同等の投与量のベーター１，３－グルカンを受けることを確実にした。１０頭のマウスを各治療群に用いた。５日後

（０日目）、マウスに急性大腸炎を誘発することが知られている化合物であるデキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）の飲料水中２．５％溶液を５日目まで投与し、その後通常の水に戻した。体重及び視覚的観察を毎日行った。１０日目にマウスを安楽死させた。結腸試料を処理し、免疫細胞をサイトカイン分析のために単離した。さまざまなパラメーターを用いて決定した、化学的に誘発された急性大腸炎に対するユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前治療の効果は実施例１３～１９に記載されている。

【０３２７】

実施例１３：化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスの体重に対するユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前治療の効果

マウスを実施例１２に記載のように治療した。各マウスの体重を実験中毎日記録した。体重の減少は大腸炎の兆候と考えられている。その後の時点の体重のパーセント割合を計算するために初期体重を１００％と見なした。初期体重のパーセント割合を、ＤＳＳ処理後の時間の関数として測定した（図１２Ａ～１２Ｃ）。このデータの統計的有意性を表２に示す。

【０３２８】

【表２】

表２．体重データ（初期体重の％割合）に関するｔ検定のｐ値

日目	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A50	0	0.1971	0.3156	0.9217	0.4897	0.0042	0.0017	0.0003	0.0002	0.0014	0.0004
AG	0	0.1246	0.5088	0.7166	0.6594	0.1861	0.8449	0.2767	0.2303	0.0058	0.0017

リン酸緩衝食塩水（図１２Ａ）又は精製ベーター１，３－グルカン（図１２Ｂ）のいずれかで治療したマウスは、ＤＳＳ処理後５日目までの間に体重の急激な減少を示した。１０日目までに、ＰＢＳで治療したマウスの体重は初期体重の約７５％に低下した。精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスは、５日目から８日目まで同様の体重減少を示し、初期体重の約８０％に低下した。しかし、９日目及び１０日目に、精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスの体重は、それぞれ約８３％及び８５％に増加した。このデータは、精製されたベーター１，３－グルカンを用いた治療が、特に他の因子（便の硬さ及び便血の存在など）と併せて考慮した場合に、ＤＳＳ誘発急性大腸炎からの早期回復に有効であることを示唆する。

【０３２９】

乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスは、ＤＳＳ処理後６日目までの間に体重の有意な減少を示さず、その時点で体重の漸減が観察された（図１２Ｃ）。９日目までに、乾燥ユーグレナバイオマスで処理したマウスの体重は初期体重の約９２％に減少した。しかし、乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスの体重は１０日目にわずかに増加し約９５％であった。このデータは、乾燥ユーグレナバイオマスを用いた治療が、マウスにおけるＤＳＳによって誘発された急性大腸炎の重症度を予防又は最小化するのに有効であることを示している。

【０３３０】

ＰＢＳ、精製ベーター１，３－グルカン、又は乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスをまとめた結果を図１３に示す。また、ＰＢＳ、精製ベーター１，３－グルカン、又は乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスを合わせた結果は、経時的な体重減少スコアの関数として表される（図１４）。体重減少スコアは、０（減少なし）、１（１～５％）、２（５～１０％）、３（１０～２０％）、及び４（＞２０％）のように計算した。このデータの統計的有意性を表３に示す。

【０３３１】

【表３】

表３．体重データ（体重減少スコア）に関するｔ検定のｐ値

日目	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A50					0.036878	0.005121	0.002798	0.000725	0.004405	0.000746	0.000746
AG					0.036787	0.343436	0.051003	0.343436	0.343436	0.193422	0.010708

実施例１４：化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスにおけるユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前処理の便の硬さに対する効果

化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスを実施例１２に記載のように治療した。各マウスの便の硬さを実験中毎日記録した。体重の減少は大腸炎の兆候と考えられている。便の硬さは、０（正常な固体）、２（半固体／柔らかい）、３（ゆるい便）、及び４（水様／下痢）のスコアをつけた。便の硬さはＤＳＳ処理後の時間の関数として決定した（図１５）。このデータの統計的有意性を表４に示す。

【０３３２】

【表４】

表４．便の硬さデータに関するｔ検定のｐ値

日目	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A50					0.002561	0.000108	0.0001	0.003241	0.011508	0.21258	0.089781
AG					0.002561	0.508646	1	0.014956	0.00311	0.21258	0.110765

ＰＢＳで治療したマウスは０～３日目に正常な便の硬さを示した。ＰＢＳで治療したマウスは４日目からゆるい便が発生するようになった。精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスは、０～４日目に正常な便の硬さを示し、５日目からゆるい便が発生するようになった。乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスは、５日目に半固体／軟便が生じ、それまで便の硬さは正常であった。このデータは、乾燥ユーグレナバイオマスを用いた治療が、マウスにおけるＤＳＳによって誘発された急性大腸炎の重症度を予防又は最少化するのに特に有効であることを示す。

【０３３３】

実施例１５：化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスにおけるユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前治療の便血に対する効果

化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスを実施例１２に記載のように治療した。各マウスの目に見える便血／直腸出血レベルの程度を実験中毎日記録した。０（血液なし）、１（糞便ペレット上の赤み）、２（糞便上のところどころの血液）、３（血で覆われた糞便／血の混じった糞便）、及び４（肉眼的な出血／肛門周囲の血液）のように便血を採点した。便血スコアはＤＳＳ処理後の時間の関数として記録した（図１６）。このデータの統計的有意性を表５に示す。

【０３３４】

【表５】

表５．便血データに関するｔ検定のｐ値

日目	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A50					0.000746	$5x10^{-5}$	$2.86x10^{-5}$	0.023856	1	1	
AG					0.000746	0.027655	0.036787	0.397385	0.239172	0.167851	

ＰＢＳで治療したマウスは０～３日目に便血を示さなかった。ＰＢＳで治療したマウスは、４日目から糞便中に血液が生じた。精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウス

は、０～４日目に便血を示さず、５日目に糞便中に血液を呈し始めた。精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスに生じた便血の量は、ＰＢＳで治療したマウスに生じた量よりも有意に少なかった。乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスは６日目まで便血を生じなかったが、その時点では明らかな少量の便血があった。乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスに生じた便血の量は、精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスに生じた量よりも少なかった。このデータは、乾燥ユーグレナ・グラシリス又は精製ベーター１，３－グルカンを用いた治療が、マウスにおけるＤＳＳによって誘発された急性大腸炎の重症度を予防又は最少化するのに有効であることを示す。

【０３３５】

実施例１６：化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスにおける結腸の長さに対するユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前治療の効果

化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスを実施例１２に記載のように治療した。１０日目にマウスを安楽死させ、続いて個々のマウスの結腸の長さを測定した（７頭のマウス／治療群）。データを図１７に示す。ＰＢＳ又は精製ベーター１，３－グルカンで処置したマウスの結腸の長さは誤差範囲内であるが、乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスの結腸の長さは有意に増加する。具体的には、ＰＢＳで治療したマウスの結腸の長さは約５．５ｃｍであるのに対し、乾燥ユーグレナ・グラシリスで治療したマウスの結腸の長さは約６．５である。このデータは、乾燥ユーグレナバイオマスを用いた治療が、マウスにおけるＤＳＳによって誘発された急性大腸炎を予防又は最少化するのに特に有効であることを示している。

【０３３６】

実施例１７：化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスにおけるユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前治療の結腸の炎症に対する効果

化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスを実施例１２に記載のように治療した。１０日目にマウスを安楽死させた後に結腸の炎症の程度を測定した（３頭のマウス／治療群）。遠位結腸片を瞬間凍結し、凍結切片化（６μｍ切片）して、ヘマトキシリン／エオシン染色に供した。各治療群の代表的な画像を図１８Ａに示す。また、個々のマウスにおける結腸の炎症の重症度は、免疫細胞の浸潤及び粘膜及び粘粘膜下層の全体的な構造に対する損傷に基づいて病理学者によって等級付け（０～４）された（図１８Ｂ）。３頭のマウスについて合計１５の切片（それぞれ５００μｍ間隔）を調べた。

【０３３７】

３つの治療群のうち、ＰＢＳで治療したマウスは最も高いレベルの結腸の炎症を示した（約３．４と等級付けされた）。精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスは、結腸の炎症レベルをわずかに減少させ（約２．８に等級付けされ）、乾燥ユーグレナ・グラシリスで治療したマウスは、最も低いレベルの結腸の炎症を示した（約１．８に等級付けされた）。このデータは、乾燥ユーグレナ・グラシリス又は精製ベーター１，３－グルカンを用いた治療が、マウスにおけるＤＳＳによって誘発された急性大腸炎の重症度を予防又は最少化するのに有効であることを示す。

【０３３８】

実施例１８：化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスにおけるユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前治療のＴヘルパー細胞応答に対する効果

化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスを実施例１２に記載のように治療した。Ｔヘルパー細胞機能に関連するサイトカインの頻度を、１０日目に個々のマウスにおいて分析した（３頭のマウス／治療群）。腸間膜リンパ節細胞を、ＰＭＡ／イオノマイシンを用いて活性化し、Ｔヘルパー細胞機能に関連するサイトカインの有無について染色し、ＦＡＣＳによって分析した（図１９Ａ）。サイトカイン陽性細胞のパーセント割合を図１９Ｂに示す。

【０３３９】

乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスは、ＰＢＳで治療したマウスに比べて、ＣＤ４＋Ｔ細胞を産生するＴｈ１（ＩＦＮ－γ）、Ｔｈ１７（ＩＬ－１７及びＩＬ－２２）

、並びにＴｈ９（ＩＬ－９）の頻度が有意に低かった。精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスは、ＰＢＳで治療したマウスに比べて、ＣＤ４＋Ｔ細胞を産生するＴｈ１（ＩＦＮ－γ）のレベルが相対的に低い。このデータの統計的有意性を表６に示す。

【０３４０】

【表６】

表６．サイトカイン陽性細胞データに関するｔ検定のｐ値

	IFN-γ	IL-17	IFN-γ/IL-17	IL-22	IL-10	IL-9	IL-4
A50	0.00317	0.012647	0.055607	0.028488	0.12169	0.059027	0.772352
AG	0.036243	0.462057	0.909833	0.167452	0.262387	0.213291	0.291673

実施例１９：化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスにおけるユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの前治療のＴヘルパー細胞サイトカインプロファイルに対する効果

化学的に誘発された急性大腸炎をもつマウスを実施例１２に記載のように治療した。１０日目に結腸免疫細胞によるサイトカイン産生を個々のマウスにおいて分析した（３頭のマウス／治療群）。磁気分離を用いて結腸組織から免疫細胞を単離し、各マウスから同数の細胞を２４時間培養した。自発的に放出された（Ｔヘルパー細胞特異的）サイトカインのレベルを、マルチプレックスアッセイを用いて３連で測定した（図２０）。

【０３４１】

データは、乾燥ユーグレナバイオマスで治療したマウスにおいてＴｈ１（ＩＦＮ－γ）及びＴｈ１７（ＩＬ－１７）サイトカインが抑制されたことを示す。精製ベーター１，３－グルカンで治療したマウスにおいて、炎症促進性（ＩＬ－２２、ＩＬ－９（Ｔｈ９））と抗炎症性（ＩＬ－１０、ＩＬ－４（Ｔｈ２））の両方のサイトカインがより高いレベルで結腸免疫細胞によって産生された。乾燥ユーグレナバイオマスを用いた治療による大腸炎からの特に顕著なマウスの保護は、サイトカインＩＬ－１０の産生の増加及び炎症性免疫細胞の動員の阻害によるものと思われる。

【０３４２】

実施例２０：個人における腸の炎症に対するユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを摂取することの効果を評価するための臨床研究

治験を利用して、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンを摂取することの腸の炎症の治療に対する効果を評価する。（登録施設内審査委員会によって承認された）書面によるインフォームドコンセントと選考過程を予め整えた後に参加者を募集する。試験は４週間の期間であり、評価はベースライン、２及び４週間のベーター１，３－グルカン摂取時に行われる。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンをカプセル形態で投与して、各個人に２５０ｍｇの１日投与量を与える。

【０３４３】

ベータグルカンの腸の炎症に対する効果は、腹痛の程度、下痢の発生、体重、食欲のレベル、直腸の出血の有無、全身の健康状態やウエルネスの評価、及び血圧や血液化学の測定のうちの１つ以上を用いて測定される。血液化学の分析としては、タンパク質カルボニル含量（酸化ストレスのマーカー）、急性期炎症マーカー（Ｃ反応性タンパク質や、アルファ－１酸糖タンパク質、フィブリノゲン、血小板第４因子など）、サイトカインパネル、及び抗体分析を挙げることができる。

【０３４４】

図２１に示すように、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの経口摂取は個人における炎症性好塩基球の数を減少させる。このデータは、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンが個人の免疫系機能を調節することを示す。

【０３４５】

図２２に示すように、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの経口摂取は個人における緊急の排便又は下痢の回数に影響する。このデータは、０～２週目の腸障害の統計

的に有意な減少（ｐ＜０．０５、＊）及び２～４週目の統計的傾向に達している腸障害の増加（ｐ＜０．１、（＊））を示す。このデータは、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンが個人の腸の健康状態に関与することを示す。

【０３４６】

また、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの経口摂取は、酸化ストレスに対する個人の応答を調節し、炎症に関与しうる。スーパーオキシドディスムターゼ（ＳＯＤ）は、反応性が高く且つダメージを与えるフリーラジカルであるスーパーオキシドイオンを中和するのに関与する酵素である。ＳＯＤは酸化的ストレスを減少させるのに非常に重要な役割を果たす。図２３に示すように、ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの経口摂取は個人のＳＯＤのレベルを増加させる。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの経口摂取の最初の２週間に平均ＳＯＤレベルの有意な増加が見られ、続いて次の２週間に軽度の減少が見られた。本試験の最後の２週間にわたって軽度の減少があったにもかかわらず、４週間にわたる全体的な改善はすべての参加者に関して有意性が非常に高かった（ｐ＜０．０１、＊＊）。

【０３４７】

体内のフリーラジカルストレスの別の尺度は脂質過酸化である。脂質過酸化は、酸化的ストレスによって誘発される細胞損傷の主要な機序の１つである。具体的には、マロンジアルデヒドが体内のフリーラジカルストレスのマーカーであり、血流中の脂質に対する酸化的損傷の尺度である。ユーグレナ由来のベーター１，３－グルカンの経口摂取の最初の２週間に脂質過酸化の有意な減少が見られ、続いて次の２週間に軽度の増加が見られた（図２４）。本試験の最後の２週間にわたって軽度の増加があったにもかかわらず、４週間にわたる全体的な改善は有意性が非常に高かった（ｐ＜０．０１、＊＊）。

【０３４８】

上記の記載はいくつかの数値範囲を本文や図に含む。本発明の実施形態は開示された数値範囲を通して実施することができるので、正確な範囲限界は明細書に逐語的に述べられてはいないが、数値範囲は開示数値範囲内の任意の範囲又は値を提供する。

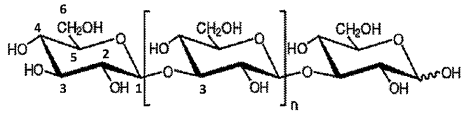
【０３４９】

上記の記載は、当業者が本発明を実施し、使用することを可能にするために提示され、特定の用途及びその要件に関連して提供される。好ましい実施形態に対するさまざまな変形は、当業者ならば容易に明らかであり、本明細書で定義される一般的な原則は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく他の実施形態及び用途に適用されうる。したがって本発明は、示された実施形態に限定されることを意図するものではなく、本明細書に開示の原則及び特徴と一致する最も広い範囲が与えられるべきである。本出願で言及された特許及び刊行物の全開示は、参照により本明細書に組み込まれる。最後に、本発明は特許請求の範囲及びその等価物に従って解釈することができる。

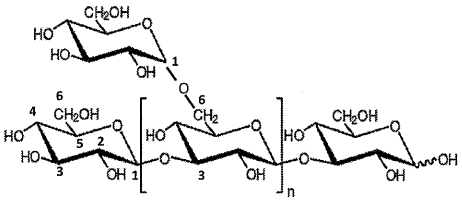
【図１】

図1

1A

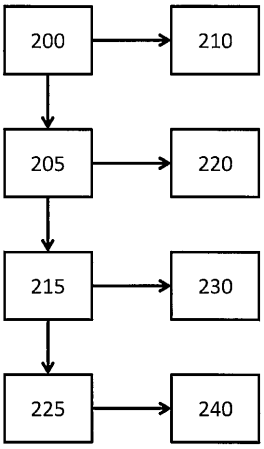


1B



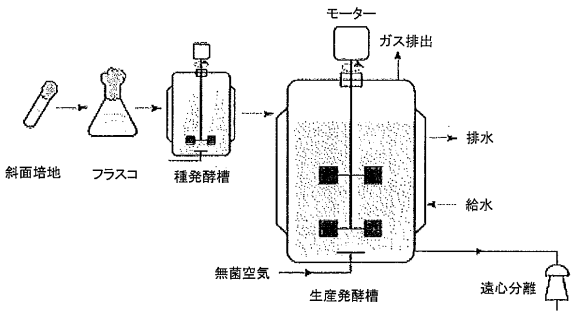
【図２】

図2



【図３】

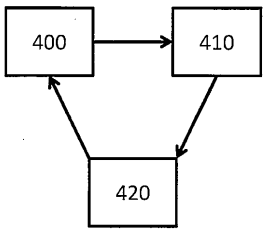
図3



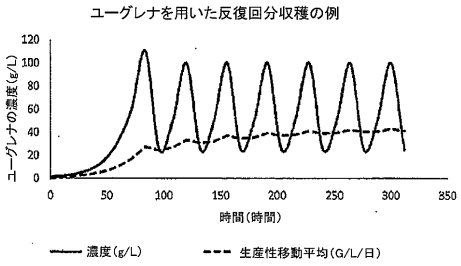
【図４】

図4

4A

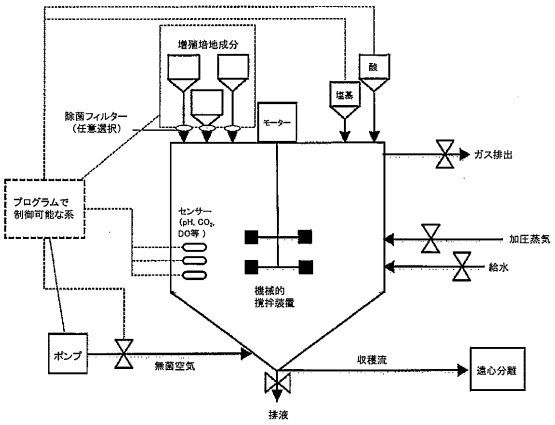


4B



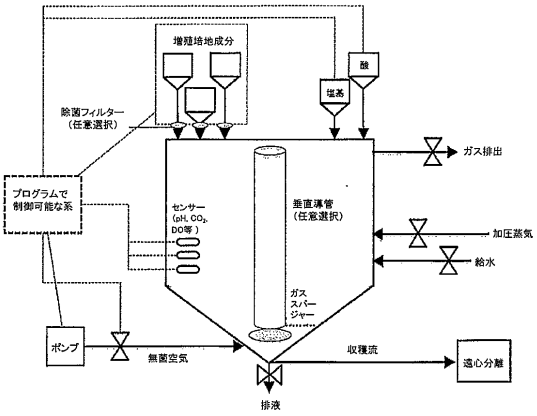
【図５】

図5

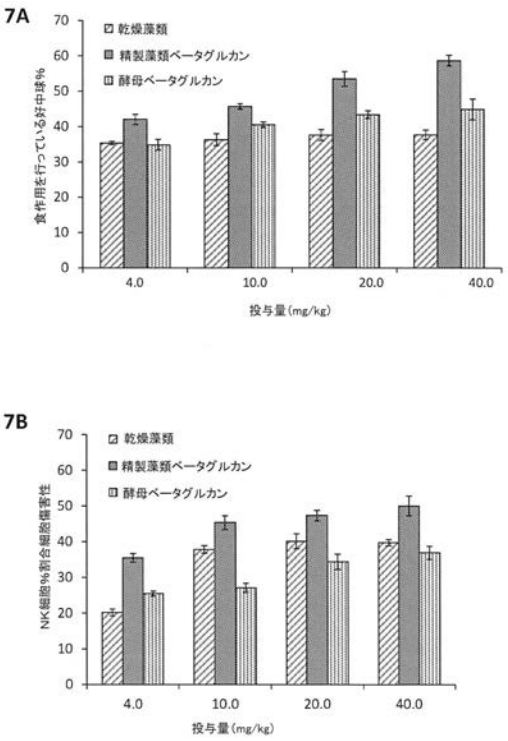


【図６】

図6

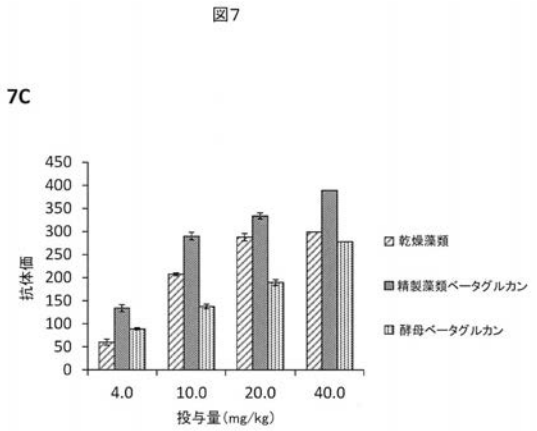


【図７－１】



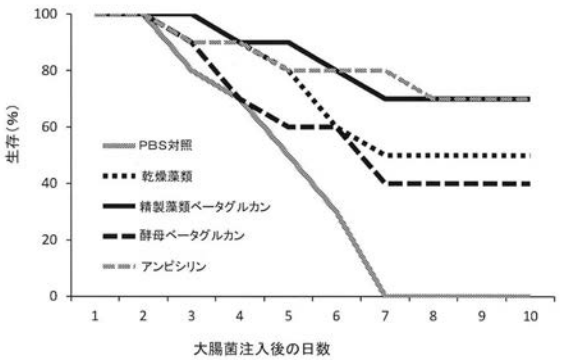
【図７－２】

図7



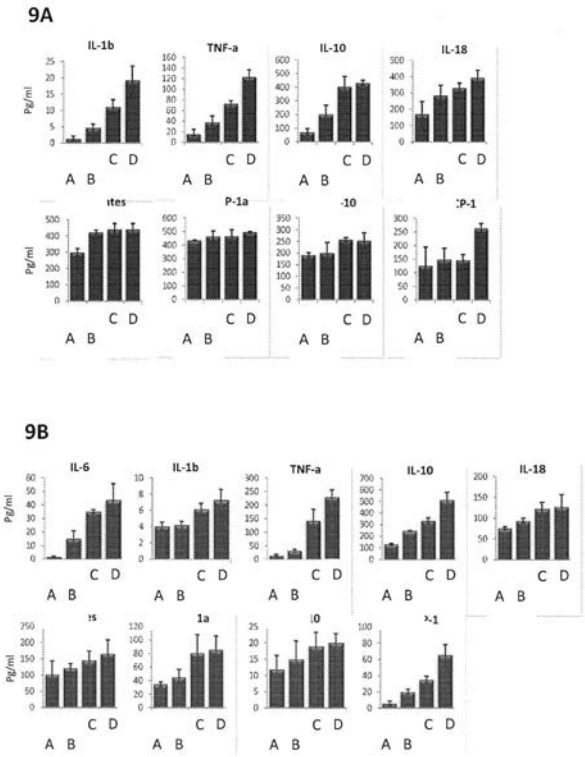
【図８】

図8

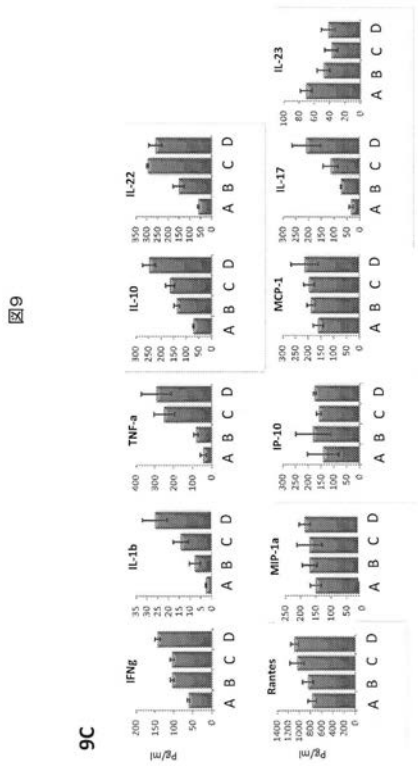


【図９－１】

図9

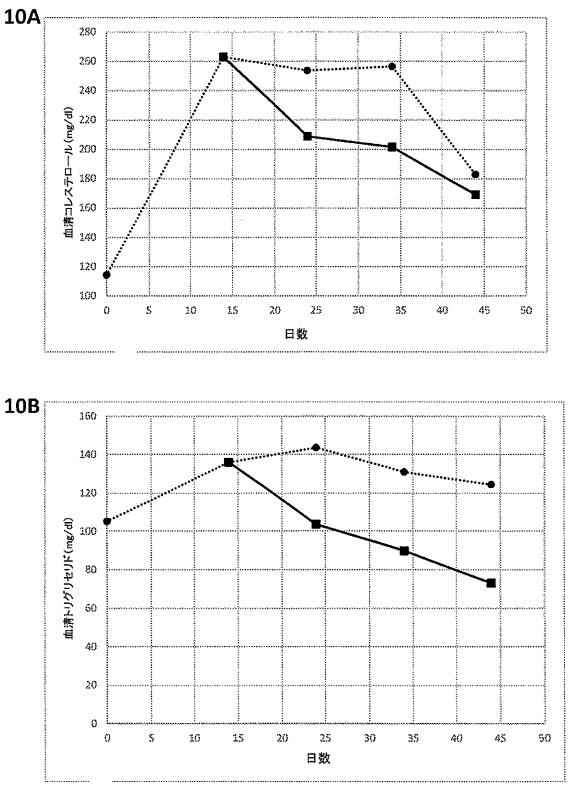


【図９－２】



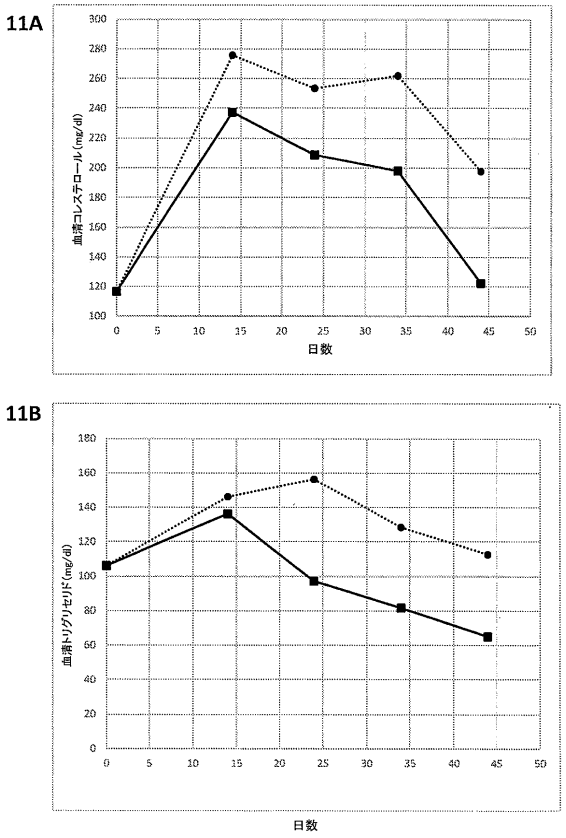
【図１０】

図10



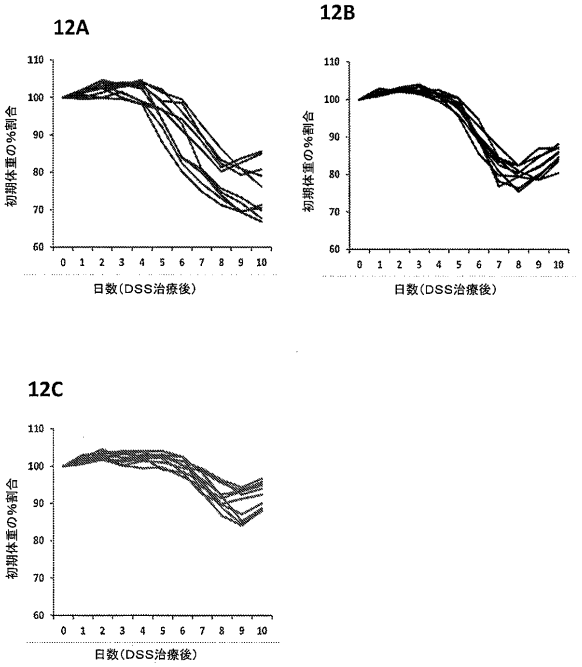
【図１１】

図11



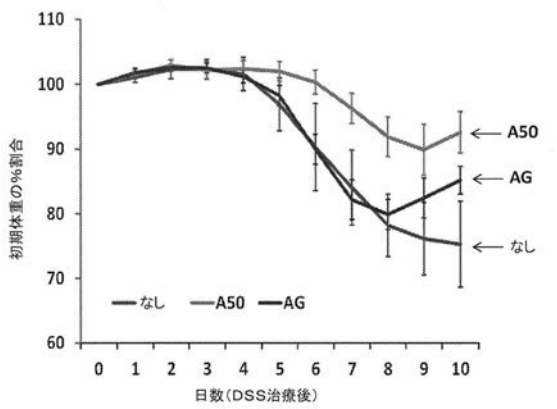
【図１２】

図12



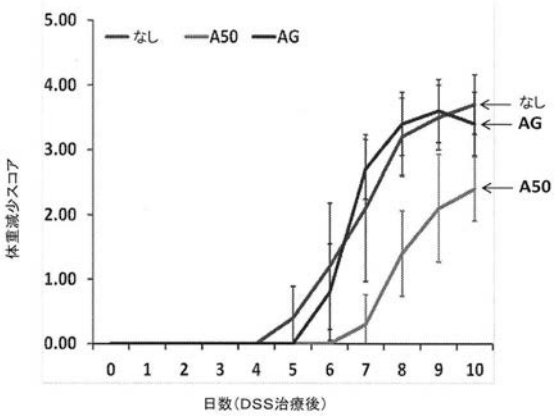
【図１３】

図13



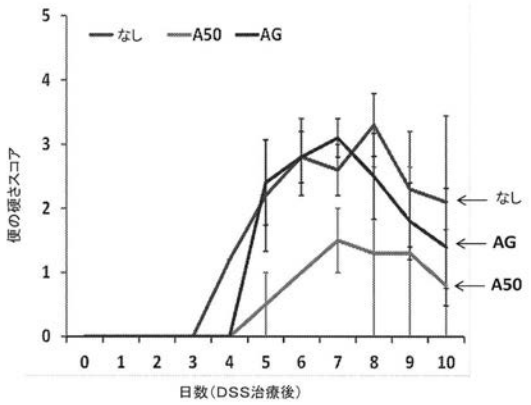
【図１４】

図14



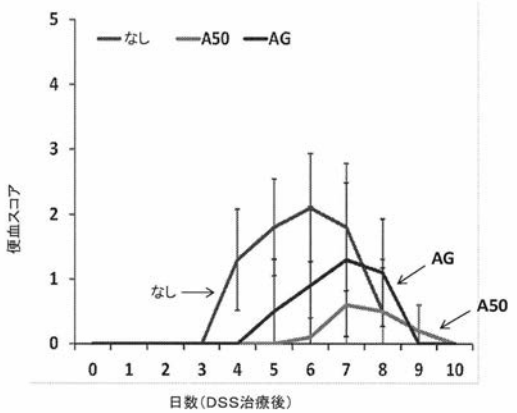
【図１５】

図15



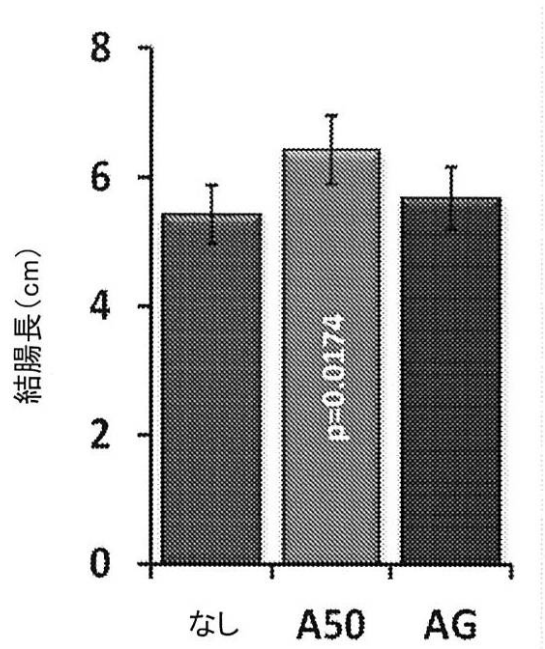
【図１６】

図16



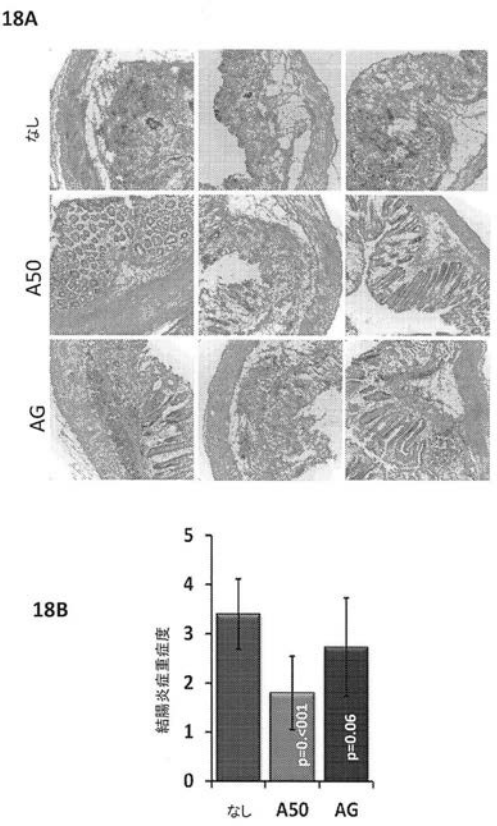
【図１７】

図17



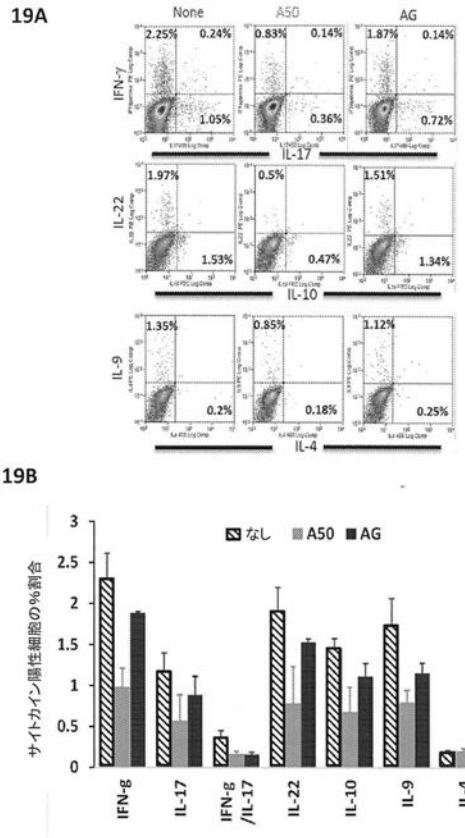
【図１８】

図18



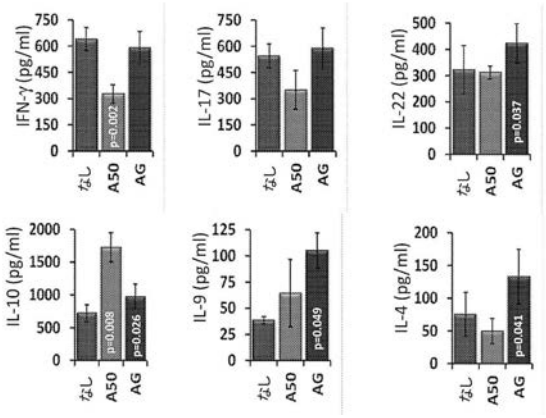
【図１９】

図19



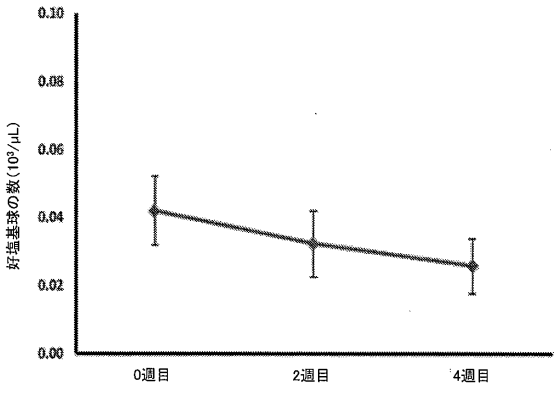
【図２０】

図20



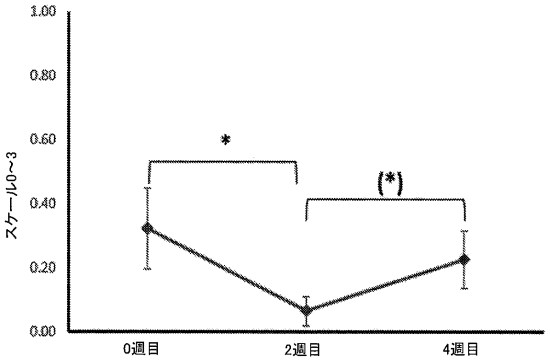
【図２１】

図21



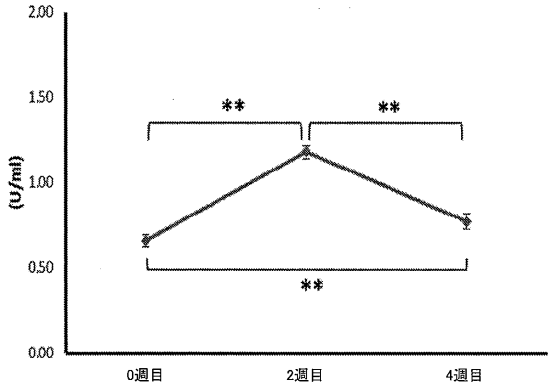
【図２２】

図22



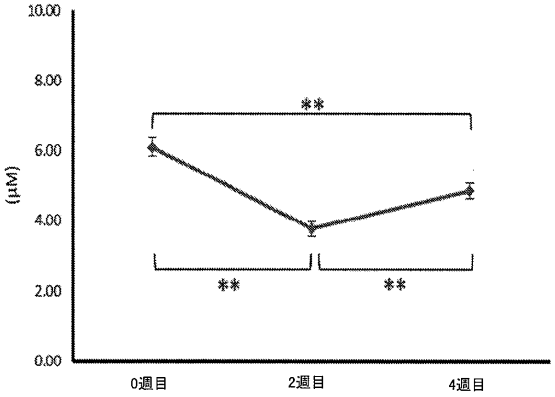
【図２３】

図23



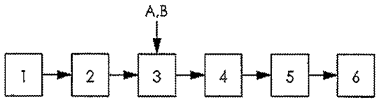
【図２４】

図24



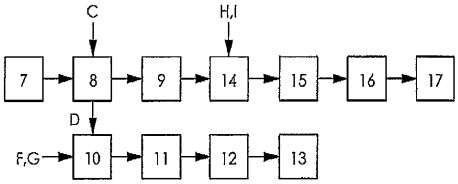
【図２５】

図25



【図２６】

図26



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/59192

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 31/715, 36/28 (2016.01)
CPC - A61K 31/716, 36/28
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): A61K 31/715, 36/28 (2016.01)
CPC: A61K 31/716, 36/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); EBSCO; PubMed; Google Scholar; beta-1,3-glucan, intestine, inflammation, bowel, colon, cancer, hyperlipidemia, colitis, crohn's, metabolic, fermentation, Euglena

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0008476 A1 (JOHANSEN, FE et al.) 13 January 2011; abstract; paragraphs [0004], [0016], [0062], [0065]-[0066], [0075]	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 8-9, 10/8-9, 11/8-9, 12/8-9, 13, 36-39
Y	US 2015/0181909 A1 (ALGAL SCIENTIFIC CORPORATION) 02 July 2015; paragraphs [0010], [0014], [0032]	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 8-9, 10/8-9, 11/8-9, 12/8-9, 13, 36-39
Y	US 2009/0181925 A1 (LIU, J et al.) 16 July 2009; abstract; paragraph [0010]	3/1-2, 4/3/1-2
Y	US 2005/0271613 A1 (SUZUKI, T et al.) 08 December 2005; abstract; paragraphs [0078], [0150]-[0153]	13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 December 2016 (01.12.2016)	03 JAN 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US16/59192

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5-7, 14-35
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*3/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/06	
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｋ	*33/30*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	33/30	
Ａ６１Ｋ	*33/26*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	33/26	
Ａ６１Ｋ	*33/24*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	33/24	
Ａ６１Ｋ	*33/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	33/06	
Ａ６１Ｋ	*33/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	33/00	
Ａ６１Ｋ	*31/355*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/355	
Ａ６１Ｋ	*31/375*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/375	
Ａ６１Ｋ	*31/122*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/122	
Ａ６１Ｋ	*31/015*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/015	
Ａ６１Ｋ	*35/68*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/68	
Ｃ１２Ｐ	*19/04*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	19/04	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA

(74)代理人 100120112
弁理士 中西 基晴
(74)代理人 100133765
弁理士 中田 尚志
(72)発明者 ホルスト，ジェフリー・ポール
アメリカ合衆国ミシガン州４８２３６，グロース・ポワント・ファームズ，ラドノール・サークル５１
(72)発明者 レヴィーン，ロバート・バーナード
アメリカ合衆国ミシガン州４８１０３，アナーバー，ポモーナ・ロード １１０９

Ｆターム(参考) 4B064 AF12 CA08 CC30 CE20 DA01
4C084 AA19 NA05 ZA68 ZB26 ZC33
4C086 AA01 AA02 BA09 BA17 BA18 BC19 EA20 FA03 HA02 HA03 HA04 HA08 HA11 MA01 MA02 MA03 MA04 NA14 ZA68 ZB26 ZC33
4C087 AA01 AA02 BB01 CA10 CA14 MA02 NA14 ZA68 ZB26 ZC33
4C206 AA01 AA02 BA04 CB27 MA02 MA03 MA04 NA14 ZA68 ZB26 ZC33