

(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2017-511380

(P2017-511380A)

(43) 公表日 平成29年4月20日(2017.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 31/047 (2006.01)	A61K 31/047	4B018
A61K 31/215 (2006.01)	A61K 31/215	4C076
A61K 31/12 (2006.01)	A61K 31/12	4C088
A61P 3/10 (2006.01)	A61P 3/10	4C206
A61P 27/02 (2006.01)	A61P 27/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-501531 (P2017-501531)  
 (86) (22) 出願日 平成27年3月26日 (2015. 3. 26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月28日 (2016. 11. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/052248  
 (87) 国際公開番号 WO2015/145389  
 (87) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015. 10. 1)  
 (31) 優先権主張番号 1128/MUM/2014  
 (32) 優先日 平成26年3月28日 (2014. 3. 28)  
 (33) 優先権主張国 インド (IN)

(71) 出願人 515202449  
 オムニアクティブ ヘルス テクノロジー  
 ズ リミテッド  
 インド マハーラーシュトラ州 ムンバイ  
 ロウアー パレル セナーパティ バパ  
 ット マーグ 462 フェニックス ミ  
 ルズ コンパウンド エイ ウィング フ  
 ェニックス ハウス フィフス フロア  
 ティー-8ビー  
 (74) 代理人 110000040  
 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナ  
 ズ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂溶性栄養素の糖尿病性眼疾患への効果

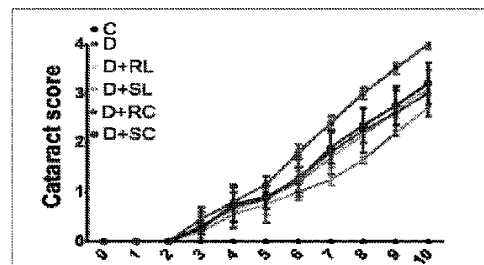
(57) 【要約】

【課題】

【解決手段】 脂溶性栄養素の分子分散を含む組成物と、その方法が、脂溶性栄養素を含む組成物を投与することにより糖尿病の眼関連合併症の進行と成熟を遅延させるために提供される。より詳細には、方法は、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ栄養摂取のための栄養補助食品と健康促進への貢献として特に有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された、ルテインおよびその異性体、ルテインエステル、ゼアキサントチン異性体、ウコン抽出物、クルクミンまたはクルクミノイドを含む組成物を投与することにより、糖尿病の眼関連合併症の進行と成熟を遅延させることに関する。

【選択図】 図2

Figure 2: Delay of diabetic cataract in rats by treatment.



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させる方法であり、  
前記方法は、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ栄養摂取のための栄養補助食品および健康促進への貢献として特に有用である脂溶性栄養素を含む組成物を投与する工程を含む方法。

## 【請求項 2】

前記糖尿病の眼関連合併症が、白内障および網膜症である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記脂溶性栄養素は、ルテインおよびその異性体、ルテインエステル、ゼアキサントニン異性体、ウコン抽出物、クルクミン、生姜等ならびにそれらの混合物を含む群から選択される先行する請求項のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記組成物は、血中グルコース値を調節するのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

前記組成物は、糖化ヘモグロビン ( H b A 1 c ) 値を調節するのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 6】

前記組成物は、糖尿病性網膜症における無軸索細胞機能障害を調節するのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記組成物は、糖尿病性網膜症における、レチナール層、ロドプシン値および N G F タンパク質レベルの損失を防ぐのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8】

前記組成物は、糖尿病性網膜症における、糖尿病誘発性 P D G F 過発現を阻害するのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 9】

前記組成物は、糖尿病性白内障における不溶性水晶体タンパク質の蓄積を防ぐのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記組成物は、糖尿病性白内障における水晶体におけるソルビトール値の蓄積を防ぐのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

前記組成物は、タンパク質凝集を減らし、かつ糖尿病性白内障における可溶性タンパク質全体のプロフィールを正規化するのに有効である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 12】

前記組成物は、脂溶性栄養素；安定剤；水溶性親水性担体および任意に界面活性剤を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 13】

前記組成物は、少なくとも 80 重量 % の全キサントフィルを含有し、  
そのうちトランス - ルテイン含有量は、80 ~ 95 % w / w であり；

( R , R ) - ゼアキサントニンは、14 ~ 20 % w / w であり；

( R , S ) - ゼアキサントニンは、0 . 01 ~ 1 % w / w であり；または、

トランス - ルテイン含有量は、80 ~ 95 % w / w であり；

( R , R ) - ゼアキサントニンは、14 ~ 20 % w / w であり、かつ、

キサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導された他のカロチノイドを微量；または、

5 ~ 95 % のクルクミノイドを含むクルクミンを含む、

50

先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記安定剤は、アスコルビン酸、BHA、BHT、パルミチン酸アスコルビル、ローズマリー抽出物、混合天然トコフェロール、アルファ酢酸トコフェロール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒマシ油誘導体、ラウリル硫酸ナトリウムおよびこれらの混合物から選択される先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

使用される前記担体は、ポリエチレングリコール200、ポリエチレングリコール400、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、グルコースシロップ、コーン浸出液、マンニトール、ポリエチレングリコール6000、ポリエチレングリコール10000、ポリエチレングリコール20000、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース、グルコース、塩化ナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、可溶性デンプン、加水分解デンプンおよびこれらの混合物から選択される

先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート80、レシチン、スクロース脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウムおよびこれらの混合物からなる群から選択される先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

脂溶性栄養素を含む前記組成物は、粉剤、錠剤、カプセル剤、小袋、ビーズ状剤、マイクロカプセル化粉剤、油懸濁液、分散液、ペレット剤、軟質ゲルカプセル剤、チュアブル錠または液体製剤の形態である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[分野]

本発明は、脂溶性栄養素を含む組成物を投与することにより、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させる方法に関する。より詳細には、本発明は、ヒトの食物摂取について安全であり、栄養摂取のための栄養補助食品および健康促進への貢献として特に有用である、キサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された、ルテインおよびその異性体、ルテインエステル、ゼアキサントニン異性体、ウコン抽出物、クルクミンまたはクルクミノイドを単独または組み合わせて含む組成物を投与することにより、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させる方法に関する。

【背景技術】

【0002】

[本発明の背景]

眼は、眼の骨性眼窩により守られている、ヒト身体における最も重要かつ複雑な器官である。眼は、角膜、虹彩、水晶体、毛様体および強膜の前方部分からなる全部に分けられている。後方部は水晶体により前方に結合しており、眼の後方に伸びている。網膜視神経頭は、また、後方部に含まれる。光は、前方部分（角膜、房水、結晶水晶体、瞳孔、硝子体液と呼ばれる）を通り抜けて眼の網膜に到達し、この進路は、眼の視軸と呼ばれる。水晶体は、光線を屈折させ、順応することにより物体の像を網膜(窩)上に焦点を合わせる助けをする。

【0003】

糖尿病および糖尿病合併症:

糖尿病は、最も発症する、非伝染性の、不均質な、代謝異常の一つであるインスリン生成欠如であり、インスリン作用への抵抗またはその両方から生じる高血糖症により特徴づ

10

20

30

40

50

けられ、2つの型の糖尿病、1型と2型がある。1型真性糖尿病は、膵臓細胞の自己免疫媒介破壊の結果、インスリン欠乏を引き起こす。

【0004】

2型真性糖尿病は、完全なインスリン欠乏よりむしろ、相対的なインスリン抵抗性により特徴づけられる。もっとも最新の世界保健機関(WHO)評価によれば、約366百万人の糖尿病の人々が世界中にあり、2030年までに552百万人に増加することが予想され、インドでは約62百万人の糖尿病の人がいる。慢性高血糖症に長くさらされると、血管合併症および非血管合併症を含む様々な合併症を引き起こしうる。血管合併症は、大血管の合併症および微細血管の合併症に更に分けられる。網膜、腎臓、末梢神経および水晶体のような組織は、糖尿病の長期の合併症により最も影響を受け、糖尿病性網膜症、腎症、神経障害および白内障の進行をそれぞれ生じる。

10

【0005】

糖尿病性白内障：

白内障は、世界中で、眼水晶体の不透明性により特徴づけられ、失明の原因を引き起こす。糖尿病において白内障の進行は、非糖尿病の人と比較した場合、2~5倍多い。さらに、真性糖尿病の患者は、白内障手術からの合併症割合が高い。糖尿病と白内障の両方は、特に糖尿病治療が不完全であり、白内障手術はしばしば手の届かないものである発展途上国において、膨大な健康負担および経済的負担をもたらす。多くの臨床的介入が、糖尿病性白内障を含む白内障に反撃することが報告されているが、臨床的診断において完全には成功していない。

20

【0006】

糖尿病性網膜症：

糖尿病性網膜症(DR)は、糖尿病の最も一般的な微小血管合併症の一つである。DRは、15年以上糖尿病である患者すべての70%に起こり、失明の一般的な原因である。DRは、網膜の疾患であり、視覚の喪失、黄斑浮腫、再発性の硝子体液の出血、けん引の、または2次の裂孔原性網膜剥離などになる。最近20年以来、DRの薬物療法の新たな分野において、著しい進行がある。30年前にレーザー光凝固術が出現し、ほとんどの場合に失明を制限するのに実に有用であり、DRの治療にとって、いまでも、代表的な治療であると考えられている。しかしながら、コルチコステロイドおよび抗VEGF剤は、新血管新生の予防に関して期待できる結果を示したが、短期間の効果のため、限定的なままであった。従って、DRの薬物療法は、いまでも、汎網膜の光凝固に付属している。

30

【0007】

近年、多くの注意が、カロチノイドの生物学的活動に集中している。カロチノイドは、植物における自然由来のキサントフィルであり、これらは、集光性反応と、一重項酸素誘導損傷に対する植物の保護器官に關与している。食物のカロチノイドは、組織において、抗酸化剤として機能し(Thurnham DL, 「カロチノイド:機能と虚偽」、Proc Nutr Soc 1994; 53: 77-87)、酸化損傷から身体を守る。

【0008】

哺乳類種は、カロチノイドを合成せず、従って、これらは、果実および野菜ならびに/または栄養補助食品のような食物源から得る必要がある。多数の疫学調査により、カロチノイド豊富な果実および野菜の消費と、変性疾患の発生率との間に、強力な逆の関係が支持される(Coleman H, Chew E., 「加齢に伴う黄斑変性症における栄養補給」、Curr Opin Ophthalmol 2007; 18(3): 220-223)。

40

【0009】

ルテインは、緑色葉物野菜および卵黄に存在する主なキサントフィルの一つである。ルテインおよびゼアキサントンは、ヒト網膜の黄斑に選択的に蓄積することが知られている。これらは、抗酸化剤および青色光フィルターとして機能し、喫煙および日光商社のような酸化的ストレス(加齢に伴う黄斑変性症および白内障を引き起こしうる)から眼を保護すると考えられている。

【0010】

50

キサントフィルは、光学異性体（R - および S - 立体異性体）と幾何異性体（トランス、E - およびシス、Z - ）の両方を示しうる。R - および S - 立体異性体の配座は、円偏光二色性（CD）スペクトラムおよびキラル・カラム高速液体クロマトグラフィー（HPLC）研究に基づき、一方、シス - およびトランス - 異性体の配座は、電子、赤外線、核磁気共鳴（NMR）、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析（HPLC - MS）およびオンライン分光学研究の高速液体クロマトグラフィー - 核磁気共鳴（HPLC - NMR）に基づく。有機分子が4つの異なる種類の原子に結合した炭素原子またはそれに結合した基を有する場合、炭素原子は、キラル炭素原子と呼ばれることがよく知られている。そのキラル炭素原子は、光学異性体の生成になる2つの異なる空間的配置の原因であり、一方、ポリエーテル鎖の二重結合の数とメチル基の存在と、立体障害の不在は、トランス - とシス - 異性体の数を決定する。トランス - ゼアキサントフィルの場合、2つの末端の環の3位および3'位の炭素原子は、両方ともキラル原子である。

10

20

30

40

50

#### 【0011】

従って、トランス - ゼアキサントフィルは、2つの不斉中心が結合している第2級ヒドロキシ基の位置に基づき、2つの不斉中心を炭素原子C3とC3'に有する。従って、トランス - ゼアキサントフィルの4つの可能性ある立体異性体、すなわち、(3R - 3'R) - 異性体、(3S - 3'S) - 異性体および(3R - 3'S) - または(3S - 3'R) - 異性体が存在する。これらの異性体の中で、(3R - 3'S) - と(3S - 3'R) - は同一である。従って、トランス - ゼアキサントフィルの3つのキラル異性体が存在する。右手方向に偏光の回転を生じる異性体は、R - 立体異性体と呼ばれ、左手方向に偏光の回転を生じる異性体は、S - 立体異性体と呼ばれ、二重の反対効果を有する第3の異性体（R, S; 光学的に不活性）は、メソ型ゼアキサントフィルと呼ばれる。

#### 【0012】

ルテインおよびゼアキサントフィルの共役二重結合は、各色素の独特の色に寄与し、一重項酸素をクエンチするこれらの能力にも影響する。余分な共役二重結合のため、ゼアキサントフィルは、ルテインと比較して、より強い抗酸化剤と考えられている。

#### 【0013】

細胞段階でのキサントフィルの位置に関して、これらは、キサントフィル結合性タンパク質（XBPF）と呼ばれている特定のタンパク質と結合すると報告されている。XBPFは、血流からのルテインおよびゼアキサントフィルの摂取と、網膜におけるそれらの安定化に参与すると示唆されている。フェムト秒過渡吸光分光法によるキサントフィルおよびXBPFの研究は、(3R, 3'R) - ゼアキサントフィルと比較して(3R, 3'S) - ゼアキサントフィル豊富なXBPFのよりよい安定性を示し、一方、キサントフィル：(3R, 3'R) - ゼアキサントフィルおよび(3R, 3'S, メソ) - ゼアキサントフィルの物理的特性は、通常、同一である。メソ - ゼアキサントフィルは、XBPFとよりよく適合し、タンパク質は、フリーラジカルによる分解からキサントフィルを守るであろう。従って、複合体は、遊離のキサントフィルより、よりよい抗酸化剤であり、眼球組織の酸化的損傷からの優れた保護を容易にする（Billstenら、「ヒト網膜からのカロチノイド・タンパク質におけるキサントフィルの光物理的特性」、Photochemistry and Photobiology, 78, 138-145, 2003）。

#### 【0014】

疫学調査により、ルテインおよびゼアキサントフィルのより高い食物の摂取量により、白内障および加齢に伴う黄斑変性症のリスクを減じることが示唆された。以前の研究により、インスリンおよびルテインの組み合わせで処理されたラットは、ルテインまたはインスリン単独で処理されたものより、白内障の進行と成熟を遅延させることを示した。DR患者における血清ルテインおよびゼアキサントフィルの濃度は、正常の人におけるものより著しく低いことが見出されており、これらの摂取量は、視力、コントラスト感度および黄斑浮腫を向上させることが証明されており、ルテインおよびゼアキサントフィルの補給は、DR治療における可能性ある治療薬として標的になるかもしれない。

#### 【0015】

クルクミンは、ターメリックの有効成分として同定されており、抗酸化、抗炎症性、抗

菌性、および抗発がん性活性を示すことが示されている。クルクミンは、スパイスのターメリックからの天然の抽出物である。ターメリックは、植物ウコン、生姜ファミリーのメンバーから誘導される。クルクミンは、多くの健康利益を本質的に有する抗酸化剤として知られている。クルクミンは、ヒト網膜の内皮細胞におけるアポトーシスを減じ、試験管内で培地中への VEGF 放出を減じ、また、ラットにおいて血清 VEGF レベルの糖尿病誘発性上昇を阻害することを示している。高いグルコースレベルと低酸素症により誘導された血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 発現は、網膜症において主な特徴である。いくつかの研究が、VEGF がまた、網膜症の最も初期の段階の進行において、役割を果たすかもしれないことも示している。

#### 【0016】

クルクミン、ルテイン、ゼアキサンチン等の栄養補助食品は、予備臨床的研究においていくらかの利益を生じるが、転移は非常に乏しく、臨床試験において用いられる用量は、実際に実現するには不可能である。クルクミンでの臨床的成功に欠ける主な理由の一つは、乏しいバイオアベイラビリティを生じる、大規模な腸管および肝臓の代謝の生体内変化に関連づけられる。近年、治療的有効性を向上させるという観点から、栄養補助食品のバイオアベイラビリティ問題に対処することに焦点がある。

#### 【0017】

クルクミン、ルテイン、ゼアキサンチン、生姜等の脂溶性栄養素は、現在用いられている形態である油懸濁液として、またはビーズ状剤 (beadlets) として投与される場合、吸収されにくい。乏しい吸収性の主な理由は、その水中での乏しい溶解性にある。それらの不溶性のため、これらのバイオアベイラビリティは非常に乏しい。脂溶性栄養素は、消化管において限定された溶解性のため、身体において吸収が限定される。通常、そのような栄養素のバイオアベイラビリティは、40%より低い。バイオアベイラビリティは、その粒径サイズを減じることにより工場させることができ得、そのかわち、ミセル形成の性能も向上する。栄養製品の分子レベルでの分散は、粒径を低下させる技術として、通常は考えられている。このような分子分散により、水中において栄養素のミセル形成にとってより高い効率を提供し、これにより、バイオアベイラビリティを増加させる。

#### 【0018】

ゆえに、溶解性脂溶性栄養素を含む組成物の糖尿病ラットにおける効果を、その効果を通常の脂溶性栄養素と比較して、栄養ゲノム情報科学アプローチによる網膜への有益な効果に関して、研究することは、興味深い。

#### 【0019】

栄養ゲノム情報科学は、栄養素と遺伝子との間の相互作用の科学である。遺伝子発現が、特定の栄養素に対する要求にどのように影響し、人生にわたって最適な健康を維持するようどのように助けるのか研究することである。栄養ゲノム情報科学は、どのように、栄養は、代謝経路およびホメオスタティック・コントロールにどのように影響を与えるのか、この制御が、食物関連疾患の初期のフェーズにおいてどのように分布しているのか、そのような疾患にココの感受性遺伝子タイプがどの程度貢献しているのかを更に理解することを、促進する。我々のゴールは、植物性栄養素が、どのようにして遺伝子発現に影響を与えるのか、さらに理解することである。

#### 【0020】

糖尿病性眼疾患の予防/治療のために用いられるカロチノイドを含む組成物を提供する多数の引例が、入手可能である。

#### 【0021】

Brownら (Am J Clin Nutr. 1999) において、カロチノイドを含む食物の抗酸化剤は、水晶体内のタンパク質または脂質の参加を防ぐことにより、加齢に伴う白内障のリスクを低下させると仮説をたてている。しかし、この現象に関する有望な疫学データは、限定的である。著者は、男性におけるカロチノイドとビタミンA摂取量と、白内障抽出の関連を予め研究した。1986年に45~75歳の米国男性健康専門家 (n=36644) を、この有望な同世代研究に含めた。他のものは、45歳になったと

10

20

30

40

50

きに、次いで、含めた。8年の経過観察の間、840ケースの老人性白内障抽出を記録した。かれらには、より高い摂取量のルテインおよびゼアキサントキサンチンで、男性における白内障抽出のリスクが多少低くなるのを観察されたが、年齢、喫煙を含む他のリスク因子の後に、他のカロチノイド（アルファ-カロテン、ベータカロテン、リコピンおよび-クリプトキサントキサンチン）またはビタミンAは、調整されなかった。ルテインおよびゼアキサントキサンチン摂取量の最も高い5番目の男性は、最も低い5番目の男性に比べて、白内障のリスクが19%低かった（相対的リスク：0.81；95%CI：0.65、1.01；動向P=0.03）。カロチノイドが多い特定の食物の中で、ブロッコリーとホウレンソウは、最も常に、白内障のより低いリスクと関連していた。ルテインおよびゼアキサントキサンチンは、抽出に必要なだけ十分に厳しい白内障のリスクを低減するかもしれないが、この関係は、強度において緩やかに見える。この研究は、米国男性人口について行われたコホート研究である。この研究は、栄養欠乏と、白内障の発生の間の関連を確立した。

10

20

30

40

50

#### 【0022】

EP2618832A2は、ルテインおよび少なくとも1つの立体異性体のゼアキサントキサンチンと関連して、活性酸素分解酵素（SOD）およびSOD模倣体等を含む群から選択された酵素を含む組成物に関する。また、そのような組成物を含む部分のキットも含む。そのキットは前記酵素を含む第1部と、ルテインおよび少なくとも1つのゼアキサントキサンチン異性体を含む第2部とを含む。この引例は、前記組成物または部分のキットは、機能性食品、栄養補給食品組成物、または食物補助食品もしくは栄養補助食品、薬剤、または医薬組成物、または獣医製品に含まれてもよい。薬剤または医薬組成物を必要とする患者に投与することにより、酸化ストレスに関連した眼の疾患、症状、および/または不調を治療し、予防し、および/または安定化させることにも関連する。しかし、この引例は、ゼアキサントキサンチン異性体の使用には関連しない。

#### 【0023】

WO2010032267Aは、糖尿病および関連する合併症の予防および治療のための、選択されたインドの薬草からの抽出物を含む薬草の製剤に関する。この引例は、糖尿病関連合併症のための関連する異なる製剤に関し、臨床的要件（例えば、腎臓の健康を向上させる、腎臓の疾患を予防する、糖尿病性網膜症を予防する、および/または心臓血管および/または血管への酸化損傷の予防および治療）において、個々に有用である。この製剤は用途が広く、抽出物/濃縮物へ加工されてもよく、さらに、錠剤またはカプセル剤または顆粒剤またはシロップ剤または薬草健康ドリンクまたは吸入可能な医薬製剤または眼球製剤または経皮吸収可能な製剤（例えば、軟膏剤/ゲル剤）または注射可能な薬剤へ医薬的に変更させてもよい。これは、ポリ薬草製剤であり、クレームをサポートする相乗効果的データは存在しない。

#### 【0024】

CN102178925Aは、視力を保護するためのルテイン眼科製剤に関する。この製剤は、以下の原料から製造される：5~13部の水溶性ルテイン（C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>2</sub>に基づく）、50~80部のタウリン、0.1~0.5部のセレン（Seに基づく）、10~25部の亜鉛（Znに基づく）、0.5~1.0部の水溶性ビタミンA、および0.8~2.0部のグルタチオン；希釈材、湿潤剤、等浸透圧調整剤、保存剤、抗酸化剤、および注入のための水からなる補助剤；剤形は、点眼剤、眼ローション剤等である；そのルテイン眼科製剤は、近視、遠視、白内障、緑内障、網膜の色素変性、黄斑変性症等の眼疾患に適する。様々な栄養因子が、合理的に相性がよく、ブランクのルテイン外部製剤が、満たされ、バイオアベイラビリティおよび健康管理効果が、明白に向上し；300,000人の人に実際に適用したところ、近視、白内障および糖尿病性眼疾患についての全有効率は、90%を超え、ルテイン眼科製剤は、有益な促進値を有する。この眼科製剤は、1つの黄斑カロチノイド、すなわち、ルテインのみを含有し、ゼアキサントキサンチン異性体の使用には言及していない。

#### 【0025】

佐々木らにおいて（IOVS, March 2009, Vol. 50, No. 3）、この研究の目的は、マウス

エンドトキシン誘導ブドウ膜炎 (E I U) モデルを使用して、炎症により生じたルテインの網膜の神経損傷に対する神経護的な効果を調べるものである。E I U は、リポ多糖類 (L P S) の腹腔内注射により誘導された。各動物は、ルテインまたは賦形剤を3回、皮下注入した: L P S 注入と同時に、L P S 注入の3時間前に、L P S 注入の後に。分析をE I U 誘導後24時間行った。ロドプシンタンパク質およびシグナル伝達物質および転写3 (S T A T 3) 活性化の活性剤のレベルを免疫プロット法により分析した。光受容体細胞の外側部の長さを測定した。暗順応させた全フィールド網膜電図を記録した。網膜における酸化ストレスを、ジヒドロエチジウムおよび蛍光プローブにより分析した。グリア細胞繊維性酸性タンパク質 (G F A P) の発現は、免疫組織化学的に示された。ロドプシン発現におけるE I U - 誘導減少、次いで、外側部の短縮、および波振幅における低減は、ルテイン治療により防止できた。S T A T 3 活性化、炎症サイトカインシグナルの顆粒、および反応性酸素種 (R O S) のレベルは、両方ともE I U の間に上部へ調節されるが、ルテインにより低減した。ミューラグリア細胞の病理学的変化は、G F A P 発現により表されるが、ルテインによっても予防される。現在のデータは、抗酸化剤ルテインが、E I U の間、神経保護的であり、炎症の間の網膜神経損傷を抑制する可能性あるアプローチを示唆することを示している。ルテインは、栄養的補助食品であり、どのような疾患の予防または治療のために日々の用量を摂取するように付してもよい。この研究において、ルテインは、注入により投与された。注入によるルテインの日々の補給は、患者に不快を生じて苦痛である。

10

20

【0026】

C A 2 7 6 0 9 3 2 A 1 は、様々な治療薬を運搬する眼科剤形に関し、長期にわたって患者に投与される、ラパマイシン (シロリムス)、その類似体 (r a p a l o g s) またはラパマイシンの他の哺乳動物標的 (m T O R) 阻害剤を含むが、これに限定されない。眼科剤形は、眼球内投与もしくは眼周囲の投与、または、患者において疾患の部位または治療されるべき症状の近くの場所を含むがこれに限定されず、患者の水性媒体中に配置される。方法は、患者における加齢に伴う黄斑変性症、黄斑浮腫、糖尿病性網膜症、ブドウ膜炎、ドライアイまたは過透過性疾患を治療または予防するのに、治療薬を投与するのに用いてもよい。

【先行技術文献】

【非特許文献】

30

【0027】

【非特許文献1】Thurnham DL. 「カロチノイド:機能と虚偽」、Proc Nutr Soc 1994; 53: 77-87

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0028】

[要約]

眼の特定領域への治療剤/予防薬を運搬する困難さを克服することは、大部分の眼疾患の治療への大きな課題を提起する。脂溶性栄養素の乏しいバイオアベイラビリティのため、多くの重要なかもしれない治療薬/予防薬を眼に運搬することが妨げられる。

40

【0029】

上記より、糖尿病性眼合併症のための治療薬/予防薬を、たとえ少ない用量レベルでさえも運搬することの困難さを克服しうる技術を提供することが望まれていることは明らかである。

【課題を解決するための手段】

【0030】

脂溶性栄養素の分子分散が提供され、これは、糖尿病の眼関連合併症の進行と成熟を遅延させるのに有用であり、これはヒトの食物摂取について安全であり、栄養摂取のための栄養補助食品および健康促進への貢献として、特に有用である。

【0031】

50

ある実施形態において、脂溶性栄養素（例えば、クルクミンまたはトランス - ルテインおよびゼアキサンチン異性体、すなわち（R，R） - ゼアキサンチンおよび（R，S） - ゼアキサンチンまたはトランス - ルテインおよび（R，R） - ゼアキサンチン）の固形または液状の親水性担体中の分子分散が提供され、キサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導され、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させるのに有用である。

【0032】

ある実施形態において、組成物の分子分散が提供され、それは、少なくとも80重量%の全キサントフィルを含み、そのうち、トランス - ルテイン含有量が80 ~ 95 % w / w ; ( R , R ) - ゼアキサンチンが14 ~ 20 % w / w ; ( R , S ) - ゼアキサンチンが0 . 01 ~ 1 % w / w またはトランス - ルテイン含有量が80 ~ 95 % w / w ; ( R , R ) - ゼアキサンチンが14 ~ 20 % w / w であり、キサントフィル / キサントフィルエステルまたは5 ~ 95 % のクルクミノイドを含むクルクミンを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導された、少量の他のカロチノイドを含む。

10

【0033】

ある実施形態において、固形のまたは液状の親水性担体中に、トランス - ルテインおよびゼアキサンチン異性体、すなわち、（R，R） - ゼアキサンチンおよび（R，S） - ゼアキサンチン、またはトランス - ルテインおよび（R，R） - ゼアキサンチンを含むキサントフィル組成物の分子分散が提供され、前記組成物は、遊離型キサントフィルよりさらに強く抗酸化作用を有し、糖尿病の眼関連合併の進行と成熟を遅延させるのに有用である。

20

【0034】

ある実施形態において、固形または液状の親水性担体中に含むクルクミン組成物の分子分散が提供され、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させるのに有用である。

【0035】

ある実施形態において、脂溶性栄養素の分子分散が提供され、脂溶性栄養素の組織中のレベルの増加を生じるバイオアベイラビリティを増強するミセル形成について非常に有効であり、その中でこれらの分子分散は、比較的低い濃度で有効であり、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させるのに有用である。

【0036】

ある実施形態において、脂溶性栄養素の固形または液状の親水性担体中での分子分散を提供し、それは、より高いバイオアベイラビリティを有する。

30

【0037】

ある実施形態において、安全な溶媒（GRAS）を用いて調製された脂溶性栄養素の分子分散は、ヒトの食物摂取に適し、溶媒残留が最小限である。

【0038】

ここにおいて前記組成物および / または方法の更なる利点は、次の明細書を考慮することにより、明らかになるであろう。

【0039】

ここに以下に説明する製品、組成物および / または方法の有用性は、実施例において説明され、どのような方法においても本発明の新しい考えの範囲を限定するのに解釈されるべきではない。

40

【0040】

この方法は、脂溶性栄養素を含む組成物を投与することによる、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させることに関する。より詳細には、この方法は、ルテインおよびその異性体、ルテインエステル、ゼアキサンチン異性体、ウコン抽出物、および / またはクルクミンもしくはクルクミノイドを含み、キサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導され、これらは、ヒトの食物摂取について安全であり、栄養摂取のための栄養補助食品および健康促進への貢献として特に有用である組成物を投与することにより、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させる

50

ことに関する。

【0041】

ここでの分子分散は、粉剤、錠剤、カプセル剤、小袋、ビーズ状剤、マイクロカプセル化粉剤、油懸濁液、分散液 (Liquid dispersions)、ペレット剤、軟質ゲルカプセル剤、チュアブル錠または液体製剤の形態である。

【0042】

ここでのトランス - ルテインおよびゼアキサントンの異性体、すなわち、( R , R ) - ゼアキサントンの異性体および ( R , S ) - ゼアキサントンの異性体、またはトランス - ルテインおよび ( R , R ) - ゼアキサントンの異性体、ならびにノルルテインまたはクルクミノイドを含むクルクミンの固形または液状の親水性担体中の分子分散は、向上した水溶解性とバイオアベイラビリティを有し、この分子を有効に運搬することを促進し、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延する可能性を示す。糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させるために向上したバイオアベイラビリティを有する高度に水溶性な形態で、より高い抗酸化可能性を有するカロチノイド、すなわち、トランス - ルテインおよびゼアキサントンの異性体の使用は、以前の文献には報告されていない。

10

【0043】

ある実施形態において、この組成物は、親水性の液体および固体の担体の分子分散である。ある実施形態において、この組成物を製造する方法は、それらを親水性の液体および固体の担体の分子分散に入れることを含み、これにより、その特徴は、飲料または柔ゼラチンカプセル剤またはリキャップ ( l i c a p s ) として、さらに製剤化されるのに有益である栄養素の水溶解性を向上させる。

20

【0044】

いくつかの実施形態におけるここでの組成物は、

( a ) 安定剤、

( b ) 水溶性親水性担体、および

( c ) 任意に界面活性剤

を含む脂溶性栄養素の水溶性、分子分散を含み、

油性栄養素を粉剤、錠剤、カプセル剤、軟膏剤、ペースト剤、ローション剤、塗布薬、口内洗浄液、小袋、うがい液へ変換するのに有用であり、かつ、飲料へ取り込ませるのに適する。

30

【0045】

ある実施形態において、この組成物は、脂溶性栄養素 (例えば、ルテイン、ゼアキサントンの異性体、ベータカロテンおよびリコピン) の水溶性の液体または固体の親水性担体中のさらさらな水溶性分子分散であり、これは、飲料もしくは柔ゼラチンカプセル剤として、またはリキャップとして、製剤化することができる。

【0046】

ある実施形態において、飲料もしくは柔ゼラチンカプセル剤として、またはリキャップとして、製剤化することができる、脂溶性栄養素 (例えば、ルテイン、ゼアキサントンの異性体、ベータカロテンおよびリコピン) の水溶性の液体または固体の親水性担体中のさらさらな水溶性分子分散の製造方法が提供される。

40

【0047】

ある実施形態において、極性または非極性の有機溶媒中の脂溶性栄養素の溶液は、特定の水性親水性の液体または固体の担体システム中に分散しうる。真空下で溶媒を除去し、生じた分散は、軟質ゲルカプセル剤へまたは、リキャップへ充填するのに適する均質の液体または固体分散として、維持される。そのような液体または固体の分散は、カプセル剤へ充填するのに、または、顆粒剤、錠剤を製造するのに、小袋へ充填するのに、または飲料を製造するのに適する。

【0048】

ある実施形態において、この組成物は、脂溶性栄養素 (例えば、ルテイン、ゼアキサントンの異性体、ベータカロテンおよびリコピン) の水溶性親水性の液体または固体の担体中のさ

50

らさらな水溶性分子分散であり、これらは、柔ゼラチンカプセル剤、リキャップ、軟膏剤、ペースト剤、ローション剤、塗布薬、口内洗浄液、うがい液等に変換するのに有用であり、飲料に取り込まれるのにも適している。

#### 【0049】

ある実施形態において、方法が、水溶性親水性の液体または 固体の担体中の脂溶性栄養素のさらさらの水溶性分子分散の製造のために提供される。これらは、柔ゼラチンカプセル剤、リキャップ、軟膏剤、ペースト剤、ローション剤、塗布薬、口内洗浄液、うがい液等に変換するのに有用であり、飲料に取り込まれるのにも適している。

前記方法は、以下を含む：

( i ) 脂溶性栄養素を非極性または極性の溶媒またはその混合物に溶解させて溶液を形成し；

( i i ) 前記生じた溶液をろ過して、不溶性不純物を除去し；

( i i i ) 別に、前記水溶性親水性の液体または固体の担体、安定剤および任意に界面活性剤を、極性溶媒中に溶解させ、透明溶液を形成し；

( i v ) 工程 ( i ) で得られた溶液を、工程 ( i i i ) で得られた溶液と混合させ；

( v ) 生じた混合物を 5 0 0 ~ 7 6 0 mm H g の範囲の圧力で 2 0 ~ 4 5 で加熱して溶媒を除去し；

( v i ) 生じた分子分散を室温まで冷却し；および

( v i i ) 工程 ( v i ) で得られた冷却された分子分散を、適切なメッシュサイズの篩に通して、凝集体または塊を除去して、脂溶性栄養素のさらさらな水溶性または固体分散を製造する。

#### 【0050】

用語「脂溶性」は、脂質様を指すが、通常、水溶性に乏しい化合物すべてをカバーする。従って、この用語の範囲には、水溶性に乏しいアミノ酸、タンパク質、無機物、ハーブ抽出物（例えばクルクミン）、炭化水素、アルカロイドフラボノイドおよび配糖体を含む。

#### 【0051】

用いられ得る脂溶性栄養素には、ルテイン、ルテインエステル、ゼアキサントチン異性体、リコピン、ベータカロテン、トコフェロール、アスタキサントチン、オメガ - 3 脂肪酸、ユビキノン、植物ステロール、レシチンおよびその混合物を含むが、これに限定されない。

#### 【0052】

分散溶液を形成するのに用いられる水溶性親水性の液体または 固体の担体には、ポリエチレングリコール 2 0 0、ポリエチレングリコール 4 0 0、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、グルコースシロップ、コーン浸出液、マンニトール、ポリエチレングリコール 6 0 0 0、ポリエチレングリコール 1 0 0 0 0、ポリエチレングリコール 2 0 0 0 0、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース、グルコース、塩化ナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、可溶性デンプン、加水分解デンプンおよびその混合物を含んでもよい。

#### 【0053】

ある実施形態において、脂溶性栄養素の溶液を製造するのに用いられる溶媒は、アセトン、ヘキサン、酢酸エチル、イソプロピルアルコール、エタノール、ジクロロメタン、メタノール等から選択されてもよく、より好ましくはアセトン、エタノール、ジクロロメタン、イソプロピルアルコールから選択され、より好ましくはジクロロメタンおよびイソプロピルアルコールである。

#### 【0054】

本方法において用いることができる安定剤は、アスコルビン酸、BHA、BHT、パルミチン酸アスコルビル、ローズマリー抽出物、混合天然トコフェロール、アルファ酢酸トコフェロール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒマシ油誘導体、ラウリル硫酸ナトリウムお

10

20

30

40

50

よびその混合物から選択してもよい。

【0055】

本方法において用いることができる界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート60、ポリソルベート80、ラウリル硫酸ナトリウムおよびその混合物から選択してもよい。

【0056】

栄養素分散中に存在する溶媒を蒸発させるための真空下での加熱工程は、35～45の範囲で行われるのが好ましい。

【0057】

ある実施形態において、前記脂溶性栄養素は、水溶性親水性の液体または固体の担体中に分子レベルで分散され、その結果、その溶解性と、その結果、そのバイオアベイラビリティは、数倍にも増強される。親水性の液体または固体の担体中の分散する親水性栄養素中で、前記栄養素の生じた分散は、著しく高い溶解性とバイオアベイラビリティを有する。さらに、前記脂溶性栄養素を親水性の液体または固体の担体中に分散させることにより、脂溶性栄養素を例えば硬ゼラチンカプセル剤および柔ゼラチンカプセル剤の形態に形成するのに役立つ。

10

【0058】

分子分散を達成するために、前記脂溶性栄養素は、極性または非極性の溶媒に溶解される必要がある。前記脂溶性栄養素の化学的性質に応じて、極性溶媒もしくは非極性溶媒または極性溶媒と非極性溶媒の混合物を用いてもよい。必要であれば、前記脂溶性栄養素と前記溶媒の混合物を、温めて、溶解の速度を増強させてもよい。非常にしばしば、前記脂溶性栄養素は、さらなる期間の間、溶解を完全にするために攪拌が必要とされる。完全に溶解させるために、生じた溶液をろ材に通して、ろ液のみを分子分散に用いる必要がある。もし溶液の粘度が高い場合、溶解に持ちこたえる溶媒でさらに希釈してもよい、その結果、ろ過工程をより速く行うことができる。

20

【0059】

前記親水性（水溶性）担体は、適切な極性溶媒（例えば、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトン、メタノール、プロピレングリコールおよび/または水）中に溶解させ、透明な溶液を形成する。分散に用いられる前記親水性水溶性担体は、安定剤と混合してもよく、任意に界面活性剤と混合してもよい。必要であれば、前記安定剤は、前記親水性担体と混合する前に、溶媒中に溶解させる必要がある。生じた混合物が、透明な溶液ではない場合、その溶液はろ過して、残渣を廃棄してもよい。

30

【0060】

前記脂溶性栄養素の分散は、その後、前記親水性の液体または固体の担体と混合して、均質の塊を得てもよい。この目的のため、単純な磁性攪拌機または電氣的に操作される攪拌機を用いてもよい。混合は、液体-液体のホモジナイザーまたは乳化剤を用いて行ってもよい。生じた混合物の粘度に応じて、均質塊を得るのに必要な時間は、15分から1時間の範囲であってもよい。大気酸化に敏感な栄養素については、混合工程は、不活性雰囲気下または、抗酸化安定剤の存在したに行ってもよい。

【0061】

消化管中でより速い溶解が要求される栄養素について、任意に食品等級の界面活性剤を取り込んで、前記脂溶性栄養素の溶解性と、そのバイオアベイラビリティを増強してもよい。

40

【0062】

前記のようにして得られた均質の塊は、その後、減圧したで加熱する工程に付される。大部分の前記脂溶性栄養素は、熱、光、酸素に敏感であるため、そのような低温での加熱、好ましくは45を超えない温度での加熱を行う必要があるかもしれない。窒素またはアルゴンのような不活性ガスを用いた不活性雰囲気中で加熱することも好ましい。加熱方法は、生じた分散が前記溶媒の25 ppmより少なくなるまで続けられる。

【0063】

50

25 ppm未満に溶媒残渣が減ったことを確認した後、生じた分子分散は、室温まで冷却し、その後、100メッシュ篩に通して、凝集体または塊を除去する。均質の物は、その後、ろ過して、適切な容器中に詰める。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】図1は、STZ-誘導糖尿病ラットにおける血漿グルコースを絶食することに対する治療効果のグラフを示す。

【図2】図2は、治療によるラットにおける糖尿病性白内障の遅延に関するグラフを示す。

【図3】図3は、水晶体タンパク質の可溶性画分のSDS-PAGEパターンを示す。

【図4】図4は、水晶体タンパク質可溶性画分のサイズ排除クロマトグラフィーに関するグラフを示す。

【図5】図5は、水晶体ソルビトールの蛍光分光(spectrofluorometry)測定に関するグラフを示す。

【図6】図6は、血漿ルテインレベルのHPLC測定に関するグラフを示す。

【図7】図7は、異なる群と全振幅からの律動様小波(OPs)の代表的な波形を示す。

【図8】図8は、網膜の代表的な組織構造を示す。

【図9】図9は、リアルタイムPCR(A)によるロドプシンの発現および免疫組織化学(B)を示す。

【図10】図10は、リアルタイムPCR(A)によるNGFの発現および免疫組織化学(B)を示す。

【図11】図11は、免疫プロット法によるVEGFの発現を示す。

【図12】図12は、免疫組織化学によるPDGFの発現を示す。

【図13】図13は、RP-HPLCにより測定された血清ルテインレベルを示す。

【図14】図14は、異なる群と全振幅の個々の動物からのOPsの代表的な波形を示す。

【図15】図15は、網膜の代表的な組織構造を示す。

【図16】図16は、リアルタイムPCR(A)によるロドプシンの発現および免疫組織化学(B)を示す。

【図17】図17は、リアルタイムPCR(A)によるNGFの発現および免疫組織化学(B)を示す。

【図18】図18は、免疫プロット法によるVEGFの発現を示す。

【図19】図19は、免疫組織化学(histochemistry)によるPDGFの発現を示す。

【発明を実施するための形態】

【0065】

[ 詳細な説明 ]

真性糖尿病は、さまざまな眼の問題を引き起こし、最も一般的なものは糖尿病性網膜症(DR)および糖尿病性白内障であり、これらは、失明の最も一般的な原因である。抗酸化剤化合物は、多くのヒトの病気(例えば、加齢に伴う黄斑変性症、白内障、糖尿病性眼合併症および様々な他の疾患)の予防において高い抗酸化能を有すると考えられる。

【0066】

ルテインは、ホウレンソウのような緑色葉野菜において見出された自然由来の抗酸化剤である。ルテインは、また、黄斑に主に存在し眼においても見られる。ルテインはカロチノイドであり、強力な抗酸化剤であることがよく知られている。それは、白内障および、加齢に伴う変性疾患である黄斑変性症を治療するのに用いられてきた。ルテインは、ヒトHe p G 2細胞株において、保護的な抗酸化活性も示している。

【0067】

ゼアキサンチンは、天然において最も一般的に見られるカロチノイドアルコールの一つである。ルテインおよびゼアキサンチンは、同一の化学式を有し、異性体であるが、これ

10

20

30

40

50

らは、立体異性体ではない。これらの唯一の相違は、末端の環の一つにおける二重結合の位置にある。この相違点により、ルテインには3つの不斉中心を生じるが、ゼアキサントンは2つしかない。対称性のため、(3R, 3'S)および(3S, 3'R)の立体異性体のゼアキサントンは同一である。従って、ゼアキサントンは3つのみの立体異性体を有する。(3R, 3'S)立体異性体は、meso-ゼアキサントンと呼ばれる。

**【0068】**

ルテインおよびゼアキサントンの共役二重結合は、各色素の独特の色に寄与し、一重項酸素をクエンチするこれらの能力にも影響がある。余分な共役二重結合のため、ゼアキサントンは、ルテインと比べてより強い抗酸化剤であると考えられている。ルテインとゼアキサントン異性体の複合体は、遊離のキサントフィルより良い抗酸化剤として作用し、酸化

10

**【0069】**

クルクミン、ウコンからの黄色色素は、ターメリックの主成分であり、スパイスおよび食品着色料として通常用いられる。これはまた、化粧品として、かつある医薬製品においても用いられる。クルクミンの所望な防止または推測の治療的特性も、その抗酸化特性および抗炎症性特性とも関連がある。クルクミンは、様々な慢性病理学的合併症(例えば、癌、アテローム性動脈硬化、および神経変性病)に対する極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

**【0070】**

脂溶性栄養素は、(現在用いられている形態である)油懸濁液またはビーズ状剤として投与された際、吸収されにくい。低吸収性の主な理由は、水中の低い溶解性である。これらの不溶性のため、これらのバイオアベイラビリティは非常に乏しい。分子レベルでの栄養製品の分散により、水中での栄養素のミセル形成により高い性能が得られ、そのため、バイオアベイラビリティが増加する。

20

**【0071】**

ここに脂溶性栄養素の組成物は、少なくとも80重量%の全キサントフィルを含み、そのうち、トランス-ルテイン含有量は、80~95%w/wであり;(R,R)-ゼアキサントンは、14~20%w/wであり;(R,S)-ゼアキサントンは、0.01~1%w/wであり、またはトランス-ルテイン含有量は、80~95%w/wであり;(R,R)-ゼアキサントンは、14~20%w/wであり、キサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された他のカロチノイドを微量; または高度に水溶性形態の5~95%のクルクミノイドを含むクルクミンを含み、糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させるのに向上したバイオアベイラビリティを有する。

30

**【0072】**

ここに組成物は、脂溶性栄養素;安定剤;水溶性親水性担体;および任意に界面活性剤を含む。

**【0073】**

ここに組成物は、少なくとも80重量%の全キサントフィルをふくみ、そのうち、トランス-ルテイン含有量は、80~95%w/wであり;(R,R)-ゼアキサントンは、14~20%w/wであり;(R,S)-ゼアキサントンは、0.01~1%w/wであり、または、トランス-ルテイン含有量は、80~95%w/wであり;(R,R)-ゼアキサントンは、14~20%w/wであり、キサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された他のカロチノイドを微量、または5~95%のクルクミノイドを含むクルクミンを含む。

40

**【0074】**

用いられる安定剤は、アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、パルミチン酸アスコルビル、ローズマリー抽出物、混合天然トコフェロール、アルファ酢酸トコフェロール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒマシ油誘導体、ラウリル硫酸ナトリウムおよびこれらの混合物から選択される。

50

## 【 0 0 7 5 】

用いられる担体は、ポリエチレングリコール 2 0 0、ポリエチレングリコール 4 0 0、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、グルコースシロップ、コーン浸出液、マンニトール、ポリエチレングリコール 6 0 0 0、ポリエチレングリコール 1 0 0 0 0、ポリエチレングリコール 2 0 0 0 0、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース、グルコース、塩化ナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、可溶性デンプン、加水分解デンプン、およびこれらの混合物から選択される。

## 【 0 0 7 6 】

界面活性剤は、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 6 0、ポリソルベート 8 0、レシチン、スクロース脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、およびこれらの混合物から選択される。

10

## 【 0 0 7 7 】

ラットでの研究を行って、糖尿病性眼合併症における脂溶性栄養素の活性を 4 つのサンプル、すなわち ( v i z )、トランス - ルテインおよびゼアキサントフィル ( U l t r a S o l L u t e m a x 2 0 2 0 ( 登録商標 ) の商標名で販売されている ) の水溶性組成物 ; トランス - ルテインおよびゼアキサントフィル ( L u t e m a x 2 0 2 0 ( 登録商標 ) の商標名で販売されている ) を含む濃縮物 ; およびクルクミン ( U l t r a S o l C u r c u W i n ( 登録商標 ) の商標名で販売されている ) およびクルクミン粉剤を含む水溶性組成物で試験した。

20

## 【 0 0 7 8 】

ある実施形態において、この前記組成物は、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導された ( R , R ) - ゼアキサントフィルおよび ( R , S ) - ゼアキサントフィルを含む、トランス - ルテインおよびゼアキサントフィルの黄斑色素を含むキサントフィル組成物を含む。

## 【 0 0 7 9 】

ある実施形態において、キサントフィル組成物は、少なくとも 8 0 重量 % の全キサントフィルを含み、そのうちトランス - ルテイン含有量は、少なくとも 8 0 重量 % であり、残りは、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導された ( R , R ) - ゼアキサントフィルおよび ( R , S ) - ゼアキサントフィルを含む、ゼアキサントフィル異性体である。

30

## 【 0 0 8 0 】

ある実施形態において、キサントフィル組成物は、少なくとも 8 5 重量 % の全キサントフィルを含み、そのうちトランス - ルテイン含有量は、少なくとも 8 5 重量 % であり、残りは、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導された ( R , R ) - ゼアキサントフィルおよび ( R , S ) - ゼアキサントフィルを含む、ゼアキサントフィル異性体である。

40

## 【 0 0 8 1 】

ある実施形態において、キサントフィル組成物は、少なくとも 8 5 重量 % の全キサントフィルをふくみ、そのうち少なくとも 8 0 重量 % は、トランス - ルテインであり、少なくとも 6 重量 % は、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導された ( R , R ) - ゼアキサントフィルであり、少なくとも 6 重量 % は、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル / キサントフィルエステルを含む植物の抽出物 / オレオレジンから誘導された ( R , S ) - ゼアキサントフィルである。

## 【 0 0 8 2 】

50

ある実施形態において、キサントフィル組成物は、少なくとも85重量%のトランス-ルテインと、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された少なくとも4重量%(R,R)-ゼアキササンチンと、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された少なくとも5重量%の(R,S)-ゼアキササンチンを含む。

【0083】

ある実施形態において、キサントフィル組成物は、少なくとも85重量%の全キサントフィルをふくみ、そのうち、少なくとも80重量%は、トランス-ルテインであり、残り15重量%は、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された(R,R)-ゼアキササンチンおよび(R,S)-ゼアキササンチンを含む、ゼアキササンチン異性体である。

10

【0084】

ある実施形態において、トランス-ルテイン、ゼアキササンチン異性体、すなわちヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された(R,R)-ゼアキササンチンおよび(R,S)-ゼアキササンチンからなる黄斑色素を含むキサントフィル組成物の製造方法であり、

20

その方法において、

a) 植物の抽出物/オレオレジン中に存在するキサントフィルエステルを、脱エステル化形態へ変換するケン化工程は、ルテインの限定された異性化と組み合わせ、より大量のトランス-ルテインを含み、残りはヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された(R,R)-ゼアキササンチンおよび(R,S)-ゼアキササンチンを含むゼアキササンチン異性体であるキサントフィル組成物を製造してもよい。

;

b) ケン化工程において、水酸化カリウムまたは水酸化ナトリウムは、水の添加無しで1-プロパノール中に溶解することができる;

30

c) 前記ケン化/異性化の温度は、70~100の間であり、好ましくは95付近であり、ケン化の長さは1~2時間であってもよい;および

d) この方法において用いる酢酸エチルは、回収され、必要ならば利用される。これにより、この方法は安価である。

【0085】

ある実施形態において、キサントフィル組成物は、トランス-ルテインの黄斑色素、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された(R,R)-ゼアキササンチンおよび(R,S)-ゼアキササンチンを含む、ゼアキササンチン異性体を含み、少なくとも80重量%は、全キサントフィルであり、そのトランス-ルテインおよびゼアキササンチン異性体の比は、4:1から6:1の範囲であり、ゼアキササンチンの異性体の比は、80:20から20:80の範囲である。ある実施形態において、トランス-ルテインおよびゼアキササンチン異性体の比は、約5:1である。

40

【0086】

ある実施形態において、キサントフィル組成物は、少なくとも85重量%の全キサントフィルを含み、そのうち、トランス-ルテイン含有量は、少なくとも85%であり、トランス-ルテインおよびゼアキササンチン異性体の比は、4:1から6:1の範囲であり、ゼアキササンチンの異性体の比は、80~20:20~80の範囲である。

【0087】

ある実施形態において、トランス-ルテインおよび、ヒトの食物摂取について安全であ

50

り、かつ、栄養摂取および健康管理のために有用なキサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された(R, R) - ゼアキサンチンおよび(R, S) - ゼアキサンチンを含む、ゼアキサンチン異性体の黄斑色素を含むキサントフィル組成物の製造方法は、以下の工程を含む：

(a) キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジン中に存在するキサントフィルエステルを、前記抽出物/オレオレジンを1 - プロパノールのアルカリ溶液(アルカリと1 - プロパノールの比は、1 : 0.5 ~ 1 : 1 重量/容量の範囲)と混合し、生じた物を70 ~ 100 の範囲の温度で、好ましくは95 で、1 ~ 5 時間の間、加熱し、ケン化/異性化された粗濃縮物を得ることにより、ケン化および同時に部分的に異性化する工程；

10

(b) 工程(a)で得られた生じたケン化/異性化された粗濃縮物を水と混合し(前記濃縮物と用いた水の比は、1 : 2 から 1 : 3 容量/容量の比)、希釈された油性混合物を形成する工程；

(c) 工程(b)で得られた前記希釈された油性混合物を酢酸エチルで抽出し(希釈された油性混合物と用いた酢酸エチルの比は、1 : 1.5 から 1 : 2 容量/容量の範囲)、キサントフィル 組成物を含む抽出物を得る工程；

(d) 工程(c)で得られた前記組成物を蒸発させて酢酸エチルを除去する工程；

(e) 工程(d)から生じた前記組成物を、まず非極性溶媒で、次いで極性溶媒で洗浄し、ろ過することにより精製する工程；

(f) 生じた組成物を40 から 45 の温度で48 ~ 72 時間の間、真空下で乾燥する工程；

20

(g) 所望であれば、工程(c)で用いた酢酸エチルを、通常の方法により回収し、必要であれば再利用する工程；および

(h) 所望であれば、生じた組成物を不活性雰囲気中で-20 で保管する工程。

【0088】

温度、時間、行程(a)におけるアルカリの量、工程(b)と(c)における比を調節することにより、所望の組成物を得ることができる。

【0089】

葉物野菜および青野菜、トウモロコシ、果実ならびに/またはマリーゴールドは、キサントフィルオレオレジンの供給源として用いてもよいことに注意すべきである。しかしながら、大部分の果実において大量のクロロフィルおよび他の望ましくないカロチノイドと関連して遊離型ゼアキサンチンと共に存在することを考慮すると、本発明によれば、葉物野菜および青野菜、トウモロコシ、果実の使用が可能であり、上記材料においてはルテインおよびゼアキサンチンの濃度が低いことを考慮し、経済的ではない複雑な精製工程が必要であるため、マリーゴールドは、本発明の前記組成物の製造について、出発原料として好ましい選択肢である。

30

【0090】

詳細には、ヘキサン 抽出により製造された市販の食品等級マリーゴールドオレオレジンは、トランス - ルテインおよびゼアキサンチン異性体を含むキサントフィル 組成物の製造について、出発物質として用いることができる、(Kumarら、キサントフィル結晶の製造方法、米国特許第6,743,953号、2004 ;Kumar 米国特許第6,737,535号、2004)。

40

【0091】

マリーゴールド花(*Tagetes erecta*、テーゲイテス・エレクタ)は、ルテインモノエステルおよびジエステルを主なカロチノイド構成成分として含むため、トランス - ルテインについて、最も可能な市販の入手源と考えられている。

【0092】

工程(a)において用いられるアルカリは、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムから選択されてもよい。

【0093】

工程(d)において用いられる非極性溶媒は、ペンタン、ヘキサンおよびヘプタン等か

50

ら選択されてもよく、ヘキサンが好ましい炭化水素溶媒であってもよい。工程(e)で用いられる極性溶媒は、低級脂肪族アルコールから選択されてもよい。

【0094】

生じた組成物を保管するのに用いられる不活性雰囲気は、窒素等の維持された不活性ガスであってもよい。

【0095】

ある実施形態において、キサントフィルエステルを含む抽出物は、すでにアルカリが溶解された1-プロパノールと混合される。アルカリの1-プロパノールおよび前記植物の抽出物への割合は、それぞれ0.5~1:0.5~1.0および1.0である。前記混合物を90の温度まで加熱し、攪拌しながら1~5時間維持する。前記反応混合物中の前記全キサントフィルは、分光光度分析(AOAC-16版方法970.64)により決定し、同じサンプルのHPLC分析によりトランス-ルテインおよびゼアキサントフィルの割合を決定した(Haddenら, J. Agric. Food. Chem., 47, 4189-494, 1999)。

10

【0096】

抽出物/オレオレジンのケン化により、脂肪酸のアルカリ塩と共に、遊離型のキサントフィルの遊離が生じる。異性化反応により、マリーゴールドからのルテインの一部は、(R,S)-ゼアキサントフィルへ変換される。ルテインのゼアキサントフィル異性体への異性化は、アルカリ:溶媒比、温度、期間のような方法パラメータを変えることにより、変化させることができる。反応混合物中のキサントフィルの前記組成物は、ヘキサン:アセトン:エタノール:トルエン(10:7:6:7 v/v)へ抽出し、ヘキサンおよび10%の硫酸ナトリウム溶液を次いで添加し、HPLCにより上層を分析することにより、分析する。

20

【0097】

所望の程度の異性化と、典型的には約85%のトランス-ルテイン含有量を有するキサントフィル組成物を得た後、その反応混合物を水で希釈し、室温でよく攪拌して脂肪酸、石鹸および不純物と関連して遊離型キサントフィルを含む黄色油性層を得る。

【0098】

この油性層を分液漏斗へ移し、酢酸エチルを添加して、キサントフィルを抽出する。酢酸エチル層を二度、等容量の脱イオン水で洗浄する。従って、脂肪酸と石鹸様材料を水へ除去し、これは廃棄する。酢酸エチル抽出物は、減圧下に前記溶媒を蒸発除去することにより濃縮して、粗キサントフィル濃縮物を得る。

30

【0099】

前記キサントフィル濃縮物組成物は、室温で1時間、ヘキサンを用いて激しく攪拌することにより精製に付し、次いでろ過する。このキサントフィル塊は、さらにエタノールで洗浄し、生じた橙色結晶を真空下室温で72時間乾燥する。

【0100】

ある実施形態において、前記組成物は、向上したバイオアベイラビリティを有する水溶性組成物であり、クルクミン、少なくとも抗酸化剤、親水性担体および脂質の相乗的な組み合わせを含む。

【0101】

ある実施形態において、前記クルクミン組成物の製造方法は、クルクミン、少なくとも1つの抗酸化剤、親水性担体および脂質を溶媒中に溶解させて均質のものを製造する工程;生じたものを25から60の範囲の温度で4~8時間温め、乾湿物を得る工程;蒸発により溶媒を除去し、乾燥物を形成し、前記乾燥物を粉碎して細粉剤を形成する工程を含む。

40

【0102】

ある実施形態において、水溶性組成物は、向上したバイオアベイラビリティを有し、経口的に投与可能なクルクミンを含む。

【0103】

ある実施形態において、水溶性組成物は、向上したバイオアベイラビリティを有し、著

50

しい副作用無にヒトの食物摂取により安全なクルクミンを含む。

【0104】

ある実施形態において、向上したバイオアベイラビリティを有する水溶性組成物の製造のため、方法を説明する。

【0105】

ある実施形態において、水溶性組成物は、向上したバイオアベイラビリティを有し、クルクミン、少なくとも抗酸化剤、親水性担体および脂質の相乗的な組み合わせを含む。

【0106】

ある実施形態において、向上したバイオアベイラビリティを有する新規水溶性組成物の製造方法は、

(i)クルクミン、少なくとも1つの抗酸化剤、親水性担体および脂質を溶媒中に溶解させ、均質のものを形成する工程；

(ii)生じたものを25 から60 の範囲の温度で4時間から8時間の間、温め、乾湿物を得る工程；

(iii)前記溶媒を蒸発により除去して乾燥物を形成する工程、および

(iv)前記乾燥物を粉碎して細粉剤を形成する工程を含む。

【0107】

工程(i)で用いるクルクミンは、85～96%の範囲の分析を有する市販のものであってもよい。クルクミンにおけるターメリック豊富な抽出物であってもよい。添加するクルクミンの量は、1～55%のクルクミンの分析を有する水溶性クルクミンを製造するのに十分な量であってもよい。

【0108】

工程(i)で用いる抗酸化剤は、天然のトコフェロール、パルミチン酸アスコルビル、ローズマリー抽出物、エピガロカテキン没食子酸塩、カテキン、アスコルビン酸およびこれらの混合物から選択してもよい。用いられる抗酸化剤の量は、1～10%の範囲であってもよい。

【0109】

工程(i)で用いられる親水性担体は、可溶性デンプン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール200-20000、グリセロール、ソルビトール、マンニトール、グルコース、糖およびこれらの混合物から選択してもよい。添加する親水性担体の量は、10～90%の範囲であってもよい。

【0110】

工程(i)で用いられる脂質は、ミルク脂質、中鎖脂肪酸トリグリセリド、長鎖脂肪酸トリグリセリド、硬化植物油およびこれらの混合物から選択してもよい。用いる脂質の量は、1～25%の範囲であってもよい。

【0111】

工程(i)において用いられる溶媒は、イソプロピルアルコール、アセトン、メタノール、アルコールおよびこれらの混合物から選択してもよい。均質のものを得るために維持された温度は、室温から70 の範囲、好ましくは25 から60 の範囲であってもよい。

【0112】

工程(ii)における溶媒の除去は、真空蒸留もしくは蒸発技術において、または噴霧乾燥法によって行われてもよい。生じた乾燥物は、臼と杵、ミキサー-グラインダー、マルチ-ミル、ボールミル、ジェット・ミル等を用いて粉碎される。

【0113】

クルクミンの有益な効果は、よく知られている。しかしながら、経口形態で投与される場合、クルクミンのバイオアベイラビリティに関連する多くの問題が存在する。摂取されたクルクミンの大部分は、糞便により排泄され、非代謝され、吸収された少量の部分は、他の代謝産物に変換され、排泄される。クルクミンは、消化管に容易には浸透せず、肝臓

10

20

30

40

50

および他の腸管の酵素に付される。これらの酵素のため、身体内のクルクミンは、すばやく代謝され、従って身体におけるバイオアベイラビリティを減じる。血流に入った少量のクルクミンは、肝臓および腎臓により迅速に代謝される。したがって、クルクミンは非常に脂溶性であるものの(そして、非常に容易に血液脳関門を超える)、経口投与されたクルクミンの非常に少量のみが、血清中および脳組織中に検知される。

【0114】

チトクローム P450は、発癌現象を引き起こすDNA付加物を誘導する複素環アミンのような、代謝毒性化学物質に対して必要な、フェーズI代謝アイソザイムである。身体中に摂取されたクルクミンは、消化管へ入り、チトクロームP450を阻害することが知られている。上記に述べたように、ピペリンと共に用いられたとき、クルクミンのバイオアベイラビリティが増加するよう、研究が行われている。ピペリンは、チトクロームP450を阻害するバイオエンハンサー(bioenhancer)であり、これにより、身体中のクルクミンの代謝を阻害する。この組成物は、更なるバイオエンハンサーの存在無しにバイオアベイラビリティを向上されているようである。

10

【0115】

クルクミンの水溶性組成物は、抗酸化剤、親水性担体および脂質を含む。クルクミンと共に前記抗酸化剤は、チトクロームP450を阻害する。一方、前記組成物上を被覆する脂質の存在により、前記組成物が肝臓ミクロソームまたは他の腸管酵素から攻撃されるのを防ぐ。というのも、これらの酵素は、水性化合物のみを攻撃するからである。従って、前記抗酸化剤および前記脂質は、クルクミンのバイオアベイラビリティを向上させるのにおいて、極めて重要な役割を果たしている。

20

【0116】

初期の研究は、Lutemax2020(登録商標)が、食物において1%でラットにおける糖尿病性白内障を遅延させ、0.1%では遅延させなかったことを示した。さらに、Lutemax2020(登録商標)(1%)は、遅延させたが、糖尿病性白内障を完全には阻害せず、ゆえに、トランス-ルテインおよびゼアキサンチン異性体の水溶性組成物(UltraSol Lutemax2020(登録商標))が、糖尿病性眼合併症(例えば、糖尿病性白内障および糖尿病性網膜症)の予防/治療において、前記組成物の効果をさらに試験するのに用いられた。

【0117】

以下の実施例は、本発明を説明するために示すものであり、したがって、本発明の範囲を限定するのに用いられるべきものではない。

30

【0118】

糖尿病性白内障および糖尿病性網膜症を予防または遅延させるのにおいて、トランス-ルテインおよびゼアキサンチン異性体を含む水溶性組成物と、クルクミンを含む水溶性組成物の効果を、トランス-ルテインおよびゼアキサンチン異性体を含む通常の組成物ならびに、クルクミンを含む通常の組成物と比較して決定するために、ラットは、ストレプトゾトシン(STZ)を用いて糖尿病をさせた。

【0119】

[実施例1]

UltraSol Lutemax2020(登録商標)およびUltraSol CurcuWin(登録商標)の糖尿病性白内障における効果

40

<実験計画>

実験動物科学の国立センター、国立栄養研究所、ハイデラーバード、インド(NCLAS, NIN)から入手したオスのウイスター系(WNIN)ラット(2か月齢; 213 ± 14gの平均BW)。動物は、NCLAS, NINにおいて維持し、順応のため2週間、実験室で保管した。糖尿病を、0.1Mクエン酸塩緩衝液、pH4.5中のSTZ(30mg/kg)の1回の腹腔内注射により、一晚絶食動物に誘導させた。賦形剤のみを投与され、コントロールとして用いられる一群のラット(群I; n=12)。絶食血中グルコース値は、STZ注射後、72時間で測定した。>150mg/dLの血中グルコース値を有する動物は、糖尿病と考え、これらを5つの群に分割した(群II~VI)。コント

50

ロールのラット (n = 6) の群には、0.01%の溶解性クルクミン (群VII) および溶解性0.5%ルテインのみ (群VIII) を供給した。

【0120】

すべての動物は、12週間、それぞれの食物が保たれた個々のケージ内で飼育され、飲料水は研究機関の間、自由裁量で供給された。

【0121】

【表1】

表1:実験グループと食物

	群	数	食物
I	コントロール	12	米国栄養研究所 (AIN) 93
II	糖尿病	14	AIN 93
III	糖尿病 +SC	12	AIN 93および可溶性クルクミン(SC)0.01%
IV	糖尿病 +RC	12	AIN 93および通常のクルクミン(RC) 0.01%
V	糖尿病 +SL	12	AIN 93および可溶性ルテイン(SL) 0.5%
VI	糖尿病 +RL	12	AIN 93および通常のルテイン(RL) 0.5%
VII	コントロール +SC	6	AIN 93および可溶性クルクミン (SC) 0.01%
VIII	コントロール +SL	6	AIN 93および可溶性ルテイン (SL) 0.5%

10

20

30

【0122】

動物の世話:動物の世話および使用のための組織および国立のガイドラインに従って、生きている動物に關与する全ての実験手順は、国立栄養研究所のIAEC (institutional animal ethical committee)により承認された。

【0123】

動物は、12時間の明/暗サイクルで温度(22)および湿度コントロールされた部屋における個々のケージに収容された。すべての動物は、水へのアクセスは自由にした。

40

【0124】

食物摂取量(1日の)および体重(週の)をモニターした。

【0125】

細隙灯検査および白内障等級付け:横に広がった瞳孔に対して細隙灯生物顕微鏡を用いて毎週、目を検査した。水晶体不透明性の開始および向上は、5つのカテゴリー(0~4)に分かれた。

【0126】

死亡率:

研究の間、群IIにおいて3頭の動物が、群III~VIのそれぞれについて2頭の動

50

物が、予想したように高血糖症になり死亡した。

【0127】

血液/水晶体の採取および処理：グルコースおよびインスリンの評価のため、後眼窩の網状組織から毎週1回血液を引き抜いた。12週が終わった後、動物をCO<sub>2</sub>窒息状態により犠牲にし、水晶体を後方アプローチにより切断し、-70℃でさらなる分析まで保管した。10%ホモジネートを50mMリン酸緩衝液、pH7.4中に3~5の溜まった水晶体から調製した。水晶体マロンジアルデヒド(MDA)を除くすべての生化学的パラメータを、水晶体ホモジネートの可溶性画分(4℃で15,000×g)中で分析し、全ホモジネート中で決定した。

【0128】

生化学的評価：

チオバルビツール酸反応物質(TBARS)として、水晶体MDA、タンパク質カルボニル含有量を、Suryanarayana Pらにより研究論文「ラットにおけるクルクミンおよびターメリックの遅延ストレプトゾトシン-誘導糖尿病性白内障」Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46(6):2092-9において説明されたタンパク質カルボニル含有量を評価する方法に従い、測定した。全ての溶解性および不溶性のタンパク質を、ウシ血清アルブミン(BSA)をスタンダードとして用いるローリー(Lowry)法により、分析した。

【0129】

血漿ルテインレベル：

血漿ルテインレベルを、Dionex UltiMate3000迅速分離液体クロマトグラフィー(RS-LC)に接続した4.6×150mm、5μm、spherisorbウォーターズC18カラムを用いてHPLCで測定した。このカラムは、アセトニトリル：ジクロロエタン：メタノールの70：20：10(v/v)比の等張溶媒混合物で、25℃で0.5ml/分の流速で移動相で平衡化された。2μlの血漿サンプル(ヘキサンで抽出された)をこのカラムに載せ、ルテインを300~600nmで検出した。

【0130】

水晶体タンパク質のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびサイズ排除クロマトグラフィー：可溶性タンパク質のサブユニット・プロフィールおよび架橋を、還元性条件下でドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在下で10%ポリアクリルアミド上で分析した。可溶性タンパク質画分における結晶配分を、600×7.5mmのTSK-G4000 SWカラム(TOSOHO Co., Japan)上でHPLCシステムを用いてサイズ排除クロマトグラフィーにより行った。このカラムを、0.1Mの塩化ナトリウムを含む0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.7で、1ml/分の流速で平衡化させた。

【0131】

統計的分析：一元配置分散分析(ANOVA)を、データ群間の統計的有意性を試験するために用い、個々の対の相違は、Duncanの多重範囲検定を用いて試験した。分散の不均一性は、p<0.05は有意と考えられる非母数のMann-Whitney検定を用いて試験した。

【0132】

<結果>

絶食血中グルコース：

図1は、処理期間にわたって異なる群の動物における絶食血漿グルコースの結果をようやくした。糖尿病コントロール・ラットの血漿グルコース濃度は、実験を通して、非糖尿病コントロール・ラットのものより著しく高かった。SCおよびSLで処理された群において観察された、より低い平均絶食血漿グルコース・レベルが存在するものの、糖尿病ラットにおいて血漿グルコースに対する治療の著しい効果は観察されなかった。

【0133】

図1：

STZ-誘導糖尿病ラットにおける絶食血漿グルコースに対する治療の効果(図1は、明細書に添付した図面に示す)。データは、平均±測定の標準誤差(SEM)として表示

10

20

30

40

50

た。コントロール（非糖尿病コントロール）； D（糖尿病コントロール）； D + R L（糖尿病 + 通常のルテイン）； D + S L（糖尿病 + 通常のルテイン）； D + R C（糖尿病 + 通常のクルクミン）； D + S C（糖尿病 + 溶解性クルクミン） \* \* \* =  $p < 0.001$ 。

#### 【0134】

白内障進行および向上：

白内障の発病および向上を、以下に説明するように、細隙灯生物顕微鏡試験によりモニターした。眼は、細隙灯生物顕微鏡（興和 S L 1 5、ポータブル、日本）を用いて横に広がった瞳孔について毎週検査した。水晶体混濁の開始および向上は、以下のように5つのカテゴリーに格付けした：「透明」、透明な水晶体 e で、液胞が存在しない；「ステージ 1」、液胞が前極の表面の約半分をカバーし、囊下白内障を形成する；「ステージ 2」、幾つかの液胞が消失し、皮質が霞んだ不透明性を示す；「ステージ 3」、霞んだ皮質のままであり、濃い核の不透明性が存在する；「ステージ 4」、成熟した白内障が、皮質と核の両方において、濃い不透明性として観察される（図 2）。

10

#### 【0135】

図 2：

治療によるラットにおける糖尿病性白内障の遅延（図 2 は、明細書に添付した図面に示す）。データは、平均 ± S E M として表した。コントロール（非糖尿病コントロール）； D（糖尿病コントロール）； D + R L（糖尿病 + 通常のルテイン）； D + S L（糖尿病 + 溶解性ルテイン）； D + R C（糖尿病 + 通常のクルクミン）； D + S C（糖尿病 + 溶解性クルクミン）。

20

#### 【0136】

高血糖症による白内障の発症は、S T Z 注入の 3 週間後に糖尿病どうぶつにおいて観察された。白内障の平均発生率を計算し、図 2 に示した。発症において遅延は存在しないものの、群 D と比較した際、すべての治療群において白内障の向上と成熟において、明白な遅延が存在した。群 D 動物は、10 週が終わるまでに、水晶体混濁（ステージ I V）を示したが、治療群は、ステージ略 2.5 ~ 3 を示した。このデータは、白内障介入群の向上と成熟において、群 D と比較した際、6 週以降に著しい遅延が存在することを明確に示している。10 週の終わりに、白内障の重症度は、群 D + R L（ステージ 3.1）、群 D + S L（ステージ 2.7）、群 D + R C（ステージ 3.0）および群 D + S C（ステージ 3.2）において、群 D（ステージ 4）においてより、著しく低い。このことは、遅い向上のため、糖尿病性白内障の成熟を、どのような剤をもって介入しても遅延させることを示す。さらに、S L は、R L よりより有効なようであるが、S C は、白内障の向上において、R C に対する有効性において、優位性を示さなかった。実験期間全体にわたって群 C における全ての水晶体は、正常、透明および混濁性が無いように見える。

30

#### 【0137】

水晶体生化学的分析：

個々の水晶体の重量を量り、プールのため 4 つの水晶体へ溜め、このような 4 ~ 5 のプールを群ごとに形成した。10% ホモジネートを、組織ホモジナイザーを用いて過剰な熱の発生を避けるために断続的な時間間隔において、50 mM のリン酸ナトリウム緩衝液、p H 7.4, 中に調製した。全ホモジネート（T H）の別々のアリコートで T B A R S 分析のために 250 μ l、ソルビトール評価のために 150 μ l、タンパク質評価のために 20 μ l に調製した。残りのホモジネートを、10,000 R P M で 30 分間 4 で遠心分離機にかけた。上澄み液を可溶性タンパク質全体（T S P）として、ラベルを付けたバイアルに分けた。

40

#### 【0138】

水晶体ホモジネート中のタンパク質の溶解性割合の決定：タンパク質評価は、水晶体ホモジネートおよび可溶性画分中でローリーの方法により行った。水晶体のグラム重量あたりに存在するタンパク質の量を計算した。可溶性タンパク質の割合は、可溶性タンパク質の画分を 100 と掛けることにより、計算した。

#### 【0139】

50

全ての実験群の水晶体における全タンパク質含有量と可溶性タンパク質含有量を分析した。コントロール群と比較して、群Dにおいて、全タンパク質含有量と可溶性タンパク質含有量の両方における著しい減少が存在した。これは、房水へのタンパク質の部分的漏れ、またはタンパク質の凝集および不溶化に起因するであろう。治療群の中で、SLおよびRCは、群Dと比較して、可溶性タンパク質の損失は著しく防止された一方、SLのみは、可溶性タンパク質の割合において、群Dに対して著しい相違を示した。SCおよびRLは、水晶体タンパク質の不溶化を防止するのに部分的に有益な効果を示したが、それは、統計的に比較的著しくなかった。

【0140】

表2:

水晶体ホモジネートの全画分および可溶性画分におけるタンパク質含有量。このデータは、平均±SEMとして表した。n=6; コントロール(非糖尿病コントロール); D(糖尿病コントロール); D+RL(糖尿病+通常のルテイン); D+SL(糖尿病+溶解性ルテイン); D+RC(糖尿病+通常のクルクミン); D+SC(糖尿病+溶解性クルクミン); \*\*\*=p<0.001、\*\*=P<0.01および\*=P<0.05 Vs C; ##= P<0.01 and #= P<0.05 Vs D

【0141】

【表2】

表: 2

群	全タンパク質 (mg/gm 水晶体)	可溶性タンパク質 (mg/gm 水晶体)	溶解性タンパク質の割合
コントロール(C)	516.54±9.3	388.77±8.2	75.19±2.2
D	281.34±31.0***	128.87±11.0***	46.87±2.5***
D+RL	311.79±7.8	156.55±4.7	50.35±1.9
D+SL	376.53±20.9	218.78±14.3##	58.04±1.8#
D+RC	368.50±19.2	202.63±21.6#	54.43±3.8
D+SC	351.83±41.5	178.99±25.9	50.16±1.3

【0142】

SDS-PAGEタンパク質プロファイリング: タンパク質分布パターンにおける相違が、水晶体タンパク質サンプルを12%ポリアクリルアミドゲル上で展開することにより観察された。30μgのタンパク質をSDS-PAGE用の分子量マーカー(広範囲のSDS-PAGEマーカー、BioRad)と共にウェルごとにロードした。可溶性タンパク質画分のSDS-電気泳動パターンは、群Cに関して群Dにおける50kDaの位置に凝集したタンパク質に対応するバンドを、治療群RL、SL、RCおよびSCにおいて、減じたバンドを示した。図3は、明細書に添付する図面中に示すように、水晶体タンパク質の可溶性画分のSDS-PAGEパターンを示す。

【0143】

#### サイズ排除高速液体クロマトグラフィー：

T S K - 3 0 0 0 H P L Cカラムでのサイズ排除クロマトグラフィーにより、結晶水晶体タンパク質の分解を生じた。H P L Cプロフィールは、群C（黒線）と比べて、群D（赤線）T S Pにおいて、低分子量領域において、減じたピークエリアを示し、高分子量タンパク質領域においては増加したピークエリアを示した。このことは、糖尿病症状においてタンパク質凝集の減少が存在することを示唆している。R Lを除くすべて、すなわち、S L、R CおよびS Cでの介入は、T S Pのプロフィールを正規化した。R Lを除いて、すべての他の組成物、S L、R CおよびS Cは、T S Pと共に介入し、プロフィールを正規化させ、一方、R Lは、T S Pレベルに影響を全く示さず、糖尿病症状のような非正常のままであった。

10

#### 【0144】

図4は、明細書に添付する図面に示すように、水晶体タンパク質可溶性画分のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。

#### 【0145】

##### ソルビトール値：

すべての実験動物の水晶体におけるソルビトールの蓄積を評価し、そのデータを図8に示した。群Dは、群C（ $0.301 \pm 0.04$   $\mu$ モル/g mソルビトールの水晶体）と比較した場合、著しく向上したソルビトールのレベル（ $5.877 \pm 0.27$ ）を示した。s cを除く介入群のうち、残りの治療は、群Dと比較して、ソルビトール蓄積を低下させなかった。群S Cは、群Fと比較して、ソルビトール値を著しく低下させ、群Cと比較して、ソルビトール値を著しく高くさせた。これは、アルドース・レダクターゼ阻害剤としてのクルクミンの更なる薬理的な作用のためかもしれない。

20

#### 【0146】

##### 図5：

水晶体ソルビトールの蛍光分光測定（図5は、明細書に添付した図に示すとおり）。このデータは、平均 $\pm$ S E Mで表した。n = 6；コントロール（非糖尿病コントロール）；D（糖尿病コントロール）；D + R L（糖尿病+通常のルテイン）；D + S L（糖尿病+溶解性ルテイン）；D + R C（糖尿病+通常のクルクミン）；D + S C（糖尿病+溶解性クルクミン）；\* = P < 0.05 Vs C；# = P < 0.05 Vs D。

血漿ルテインレベル：血漿ルテインレベルをH P L Cにより測定した。齧歯動物が食べる食物は、カロチノイドを含まないため、ルテインはコントロールおよび糖尿病ラットにおいて検出されなかった。しかし、ルテインは、ルテインを補完した群において検出される。糖尿病ラットに通常のルテインを食べさせることにより、 $0.01$ マイクロモル/Lの血漿ルテインが生じた（図6）。溶解性ルテインを食べさせることにより、血漿ルテイン $0.07$ マイクロモルにおいて7倍に増加させ（図6）、溶解性ルテインは、ルテインのバイオアベイラビリティを著しく増加させ、このことは、通常のルテインに比べて、溶解性ルテインでより有益な効果が得られる理由かもしれないことを示唆している。

30

#### 【0147】

##### 図6：

血漿ルテインレベルのh p l c測定（図6は、明細書に添付した図面中に示す）。このデータは、平均 $\pm$ s e mとして表す。N = 6；コントロール（非糖尿病コントロール）；d（糖尿病コントロール）；d + r l（糖尿病+通常のルテイン）；d + s l（糖尿病+溶解性ルテイン）。

40

#### 【0148】

##### < 結論 >

クルクミンの補給により、P 2 3 Hロドプシン変異を有する遺伝子組み換えラットにおいて、光受容体変性を救出した。食事の抗酸化剤クルクミンを食べさせることは、主にその抗酸化剤特性によりラットにおけるストレプトゾトシン（S T Z）誘導性糖尿病性白内障を遅延させるのに有効であった。さらに、クルクミンは、ラットの網膜および水晶体アルドース・レダクターゼ（A R）において、血管内皮細胞増殖因子（V E G F）の糖尿病

50

誘発性発現を阻害した。

【0149】

溶解性ルテインは、白内障起源に関連する分子分析において反映された食物における0.5%の用量の通常ルテインと比較して、糖尿病性白内障を遅延させるのにより有効である。溶解性ルテインの向上したバイオアベイラビリティは、通常ルテインと比較して、溶解性ルテインの観察された生物学的効果を説明するかもしれない。溶解性クルクミンの有効性は、通常クルクミンとほとんど匹敵した。

【0150】

[実施例2]

栄養ゲノム情報科学アプローチによる糖尿病性網膜症におけるUltraSol Lutemax2020 (登録商標)の効果

溶解性ルテイン(UltraSol Lutemax2020 (登録商標))の効果を、栄養ゲノム情報科学アプローチにより網膜に対するその有益な効果に関し、糖尿病ラットにおいて調べ、その効果を通常ルテイン(Lutemax2020 (登録商標))と比較した。

【0151】

<方法論>

動物モデル:

糖尿病のストレプトゾトシン(STZ)ラットモデルは、糖尿病に関してヒトの疾患の最も一般的に用いられるモデルの一つである。これは、ヒト糖尿病において観察される多くの急性合併症および幾つかの慢性合併症を模倣することが知られている。このモデルは、高度に再生可能であるという利点を有し、開発させるべき様々な合併症についての予定表は、よく知られており、再生可能である。ヒト疾患の構造的、機能的、および生化学的な異常な事態のいくつかの確立した類似性を前提として、糖尿病のメカニズムを評価し、可能性ある治療を評価するのに適切なモデルであると考えられる。

【0152】

実験計画:

120gmsの平均体重を有するオスのウィスター-NINラットを、実験動物科学についての国立センター、ハイデラーバードから入手した(NCLAS, NIN)。動物はNCLAS、NINにおいて維持し、2週間の間、実験室において順応のため保持した。糖尿病を、0.1Mクエン酸塩緩衝液、pH4.5中のSTZ(30mg/kg)の1回の腹腔内注射により、絶食動物に一晚で誘導させた。賦形剤のみを投与された別のセットのラットをコントロールとして用いた(群C; n=6)。絶食血中グルコース値をSTZ注入から72時間で測定した。血中グルコース値>150mg/dLを有する動物を、糖尿病と考え、すべての動物を以下の表3に示すように4つの群に分けた。

【0153】

10

20

30

【表 3】

表 3

	群	動物の数	食物
I	コントロール	6	AIN 93
II	糖尿病	9	AIN 93
III	糖尿病 + 溶解性ルテイン (SL)	8	溶解性ルテイン 0.5%と AIN 93
IV	糖尿病 + 通常のルテイン (RL)	6	通常のルテイン 0.5%と AIN 93

10

## 【0154】

すべての動物は、12週間、それぞれの食物が保たれた個々のケージ内で飼育され、飲料水は研究機関の間、自由裁量で供給された。日々の食物摂取量および毎週の体重、絶食グルコース・レベルを記録した。犠牲にする前に、網膜電図を行い、グリコシル化ヘモグロビン (HbA1C) を見積もった。12週の後、ラットを安楽死させ、網膜を組織学的分析および分子解析 (遺伝子およびタンパク質の発現) のため、採取した。

20

## 【0155】

網膜電図 (ERG) 分析:

糖尿病網膜症 (retinopathy) は、網膜機能における擾乱により特徴づけた。その網膜機能は、網膜電図により評価することができる。糖尿病により、異なる網膜細胞層における局所貧血およびアポトーシスを生じ、これにより、網膜の機能における変化を生じた。律動様小波 (OPs、OPが波を表す場合、振動波と呼ばれ、これはERGの主な成分である) が、a - または b - 波より糖尿病においてより影響されることをよく報告している。OPs は、内側のレチナル層、神経節細胞層と内側網状層の機能的観点を表す。

30

## 【0156】

動物を一晩、暗順応させ、ERG手順のため、ぼんやりとした赤色照明したで、準備させた。ラットの瞳孔は、アトロピン目薬により、横に広がらせた。接地電極は尾における皮下注射針であり、参照電極は、耳クリップ電極であった。活性なコンタクト水晶体電極を、角膜上に配置した。記録を、UTAS 視覚診断システムにより行った。応答は、交流電流結合UBA-4204増幅器を用いて、1,000のゲインに別個に増幅させた。-2から8dBの閃光刺激を、BigShot (登録商標) Ganzfeld システム (LKCテクノロジー; ゲイサーズバーグ、MD、米国) により届けた。律動様小波を波形から抽出し、すべてのOPsの合計を計算した。

40

## 【0157】

量のリアルタイムPCR:

全RNAを、Tri試薬を用いてラットの網膜から抽出した。分離したRNAは、RNeasy Mini キット (Qiagen) により更に精製し、ND1000分光光度計 (NanoDropテクノロジー、デラウェア、米国) により260nmと280nmにおける吸光度を測定することにより、定量した。RNA調製品の質を、変性アガロースゲル上で電気泳動することにより、評価した。2µgの全RNAを、大容量cDNA逆転写キットを用いて逆転写させた。逆転写反応は、サーモサイクラー (thermocycler (ABI 9700)) を用いて行った。リアルタイムのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (ABI-7500) を、遺伝子特異的なプライマーを有するSYBR緑マスターミックスを用いて、25ngのcDNAテンプレートと3セットで行った。データの正規化および検証を、

50

- アクチンを内部コントロールとして用いて行い、データは、比較閾値サイクル ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) 方法に従い、サンプル間を比較した。

【0158】

SDS-PAGEおよび免疫ブロット法：網膜を、1 mMのジチオスレイトール (DTT)、1 mMのフェニルメチルスルホニルフルオライド (PMSF)、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアプロチニン、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチン、および $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプスタチンを含む、20 mMトリス、100 mMのNaCl、1 mMのエチレンジアミン4酢酸 (EDTA) (TNE緩衝液; pH 7.5) を含む緩衝液中で均質化した。ホモジネートを、12,000 x gで20分間遠心分離した。その上澄み液を集め、免疫ブロット法分析のために用いた。前記上澄み液からの等量のタンパク質を、12% SDS-PAGEに付し、タンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜上に移した。非特異的結合は、トウイン (PBST) を含むリン酸緩衝液塩水中で5%のBLOT-QuickBlocker試薬 (WB57, Calbiochem) によりブロックされ、リン酸緩衝液塩水 (PBS) 中に希釈された一次抗体と共に一晩4℃でインキュベートされた。PBSTで洗浄したのち、その膜を西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と結合した抗ウサギIgG (1:3500) 二次抗体と共にインキュベートした。免疫ブロット法は、改良化学発光検出試薬 (RPN2232, GE 健康管理、バッキンガムシャー、UK) により改良され、デジタル画像は、画像分析機 (Syngene, G-box) により記録された。バンド強度の定量化は、イメージJソフトウェアにより行った。

10

【0159】

組織病理学：

選んだ動物からの眼球を、別々にラベルを付けたバイアル中の固定剤4%パラホルムアルデヒド溶液中に収集した。組織にはいくつかの切り傷を付け、深組織へ固定剤が浸透するのを助けるようにした。これらは室温で24~48時間保管し、次いで、その固定剤を20mMのリン酸ナトリウム緩衝液と置き換えた。緩衝液を病理組織学の処理まで毎週一回、新鮮な緩衝液で置き換えるように予定をたてた。組織をパラフィンに埋め込み、切片をマイクロトーム中にとった。コートされたスライドを免疫組織化学および免疫蛍光のために用い、一方、コートされていないスライドをヘマトキシリン (hemotoxylin) およびエオシン (H & E) 染色のために用いた。

20

【0160】

統計的分析：

データは、平均  $\pm$  SEMとして表した。n = 6 ; C (非糖尿病コントロール) ; D (糖尿病コントロール) ; D + RL (糖尿病 + 通常のルテイン) ; D + SL (糖尿病 + 溶解性ルテイン) ; \*\*\* = p < 0.001, \*\* = p < 0.01 および \* = p < 0.05 Vs C ; ## = p < 0.01 および # = p < 0.05 Vs D.

30

結果は、一方向ANOVAにより、次いでDunnett's多重比較試験により、すべての群をコントロール群と比較するため、統計的有意性を分析した。群間有意性は両側対t-試験によりチェックした。

【0161】

< 結果 >

網膜電位図：

糖尿病ラット (D) において、Opsの振幅は、正常コントロール (C) 動物 ( $498.4 \mu\text{V}$ ) と比較して、低下した ( $334.2 \mu\text{V}$ )。Opsについての陰的時間は、群Dにおいて増加したことも着目される。抗酸化剤ルテインの摂取により、OP振幅において低下が低くなり、このことは、OPsの合計により示唆された；RL ( $442.6$ ) およびSL ( $561.9$ )。群SLは、群Dと比較して、OPsの合計において著しい相違を示した。実際、正常コントロールラットより良かった。

40

【0162】

図7：

代表的な波形のOpsは、異なる群と全振幅から示される (図7は、明細書に添付した

50

図面中に示す)。 C、非糖尿病コントロール；D、糖尿病コントロール；D + R L、糖尿病 + 通常のルテイン；D + S L、糖尿病 + 溶解性ルテイン。

【 0 1 6 3 】

網膜の形態学：

コントロールラットCにおいて、網膜のすべての層は、無傷であり、網膜の最大厚みを有し、また、濃いINLに着目され、INLおよびONL間に識別可能な分離（OPL）であった。対照的に、糖尿病網膜（D）は、全網膜厚みの著しい減少を示し、また、濃さが低いONLにより印をつけられ、INLおよびONLsをほとんど混合した。ルテインを用いた治療は、糖尿病網膜において著しい程度に粗雑な形態学的変化を防いだ。ルテインの溶解性剤形は、通常のルテインより良いことを示しており、これは、濃いONLsにより示された（図8）。図8は、明細書に添付した図面に示すように、網膜の組織構造を表している。

10

【 0 1 6 4 】

【表4】

表4:異なる群の網膜の層の厚み(μ)

レチナール層	全網膜厚み	GCL+IPL	INL	OPL	ONL	PRL
C	121.74	46.813	10.767	5.024	25.697	19.426
D	58.848	12.508	9.257	0.791	23.052	12.184
RL	89.409	31.518	12.117	1.41	23.181	12.600
SL	112.714	40.877	16.074	4.718	31.196	23.072

20

【 0 1 6 5 】

Leica適用スーツ、Leica、スイスの使用により測定されたレチナール層厚み(μm)の代表的な表。C、非糖尿病コントロール；D、糖尿病コントロール；D + R L、糖尿病 + 通常のルテイン；D + S L、糖尿病 + 溶解性ルテイン；GCL、神経節細胞層；IPL、内部網状層；INL、内部核層；OPL、外部網状層；ONL、外部核層；PRL、光受容体層。

30

【 0 1 6 6 】

リアルタイムPCR、免疫組織化学および免疫プロット法による網膜マーカー（遺伝子）の発現：

ロドプシン（Rho）：

ロドプシン（Rho）は、網膜の光受容体細胞における生物学的色素であり、光の知覚において、最初の出来事に重要である。リアルタイムPCRにより定量化されたRho遺伝子のmRNAレベルは、糖尿病動物の網膜において低下レベルを示した。RLおよびSLによる治療は、その減少を防ぎ、しかしながら、SLの供給は、RCと比較して著しい効果を示し、通常のラットより良いものであった（図9A、明細書に添付の図面に示すように）。さらに、免疫蛍光によりRhoのタンパク質レベルも定量化した。これは、mRNAレベルと合致する。Rhoタンパク質の免疫蛍光イメージングは、通常のコントロール・ラット網膜と比較して、糖尿病ラット網膜において低下した発現を示した。RLおよびSLによる治療は、糖尿病網膜におけるRhoタンパク質発現の損失を防いだ。これは、非常に強いRhoプラスの蛍光により示される。さらに、SLは、糖尿病動物におけるラット網膜中でのRhoタンパク質発現の損失を防ぐのに、RLより明瞭により効果的であることがそれぞれ見出された（図9B、明細書に添付の図面に示すように）。

40

【 0 1 6 7 】

神経成長因子（NGF）：

NGFは、最も特徴づけられたニューロトロフィンであり、生存かつ末梢神経系および

50



ラットへのルテイン投与により、網膜における糖尿病誘発性異常事態を防いだ。ルテインは、ERGによりチェックされたように、糖尿病ラットにおいて失われた、ラットの網膜の機能性を保持していた。また、これは、H & E 染色により行われたように、網膜の形態学的研究により、明らかである。ルテインは、網膜の健康を維持するのに極めて重要な役割を有する、ロドプシンおよび神経成長因子 (NGF) の発現における減少を防いだ。ルテインは、ストレスおよび血管形成に關与するVEGFおよびPDGFの過発現を防いだ。興味深いことに、溶解性ルテインで処理したラットは、通常のルテインと比較した際に完全な利益を示し、増加したバイオアベイラビリティは、増加した血漿レベルにより示された。さらに、ルテインの抗酸化剤能力および抗炎症性能力は、その有益な効果について寄与しているかもしれない。ゆえに、溶解性ルテインは、糖尿病性網膜症を治療するか、または予防するのに、用いることができる。

10

## 【0173】

## [実施例3]

栄養ゲノム情報科学アプローチによる糖尿病性網膜症におけるUltraSol CurcuWin (登録商標) の効果

溶解性クルクミン(UltraSol CurcuWin (登録商標)) の効果を、栄養ゲノム情報科学アプローチにより網膜に対する有益な効果について、糖尿病ラットにおいて調べ、その効果を通常のクルクミンと比較した。

## 【0174】

## &lt;方法論&gt;

20

実施例2において説明したのと同じである。すべての動物を以下に示すように4つの群に分けた。

## 【0175】

## 【表5】

表5

	群	動物の 数s	食物
I	コントロール	6	AIN 93
II	糖尿病	9	AIN 93
III	糖尿病 + 溶解性ルテイン (SC)	8	溶解性クルクミン 0.01 %と AIN 93
IV	糖尿病 + 通常のルテイン (RC)	6	通常のクルクミン 0.01 %と AIN 93

30

40

## 【0176】

## 網膜電位図：

糖尿病ラット (D) において、OPsの振幅は、正常コントロール動物 (C) と比較して、低下した (334.2 μV)。OPsについての陰的時間は、群Dにおいて増加したことも着目される。抗酸化剤クルクミンの摂取により、振幅において低下が低くなり、このことは、OPsの合計により示唆された；RC (445.7)、SC (455.3)。SCは、OPsの合計において低下が低くなったのみならず、陰的時間を正規化した。

## 【0177】

図14は、明細書に添付した図面中に示すように、異なる群と全振幅の個々の動物から

50

の O P s の波形を示す。C、非糖尿病コントロール；D、糖尿病コントロール；D + R C、糖尿病 + 通常のクルクミン；D + S C、糖尿病 + 溶解性クルクミン。

【 0 1 7 8 】

網膜の形態学：

コントロールラット C において、網膜のすべての層は無傷であり、網膜の最大厚みを有し、また、濃い I N L に着目され、I N L および O N L 間に識別可能な分離 ( O P L ) であった。対照的に、糖尿病ラット網膜 ( D ) は、全網膜厚みの著しい減少を示し、また、濃さが低い O N L により印をつけられ、I N L および O N L s をほとんど混合した。クルクミンを用いた治療は、糖尿病網膜において著しい程度に粗雑な形態学的変化を防いだ。この有効成分の溶解性剤形は、通常の有効成分より良いことを示しており、これは、濃い O N L s により示された。

10

【 0 1 7 9 】

図15は、明細書に添付した図面に示すように、網膜の代表的な組織構造を表している。

【 0 1 8 0 】

【表 6】

表 6:異なる群の網膜の層の厚み ( μ )

レチナール層	全網膜厚み	GCL+IPL	INL	OPL	ONL	PRL
C	121.74	46.813	10.767	5.024	25.697	19.426
D	58.848	12.508	9.257	0.791	23.052	12.184
RC	106.014	35.692	13.648	5.685	30.108	19.520
SC	124.430	54.004	14.926	6.597	29.320	21.857

20

【 0 1 8 1 】

L i e c a 適用スーツ、L e i c a、スイスの使用により測定されたレチナール層厚さ ( μ m で ) の代表的な表。C、非糖尿病コントロール；D、糖尿病コントロール；D + R C、糖尿病 + 通常のクルクミン；D + S C、糖尿病 + 溶解性クルクミン。G C L、神経節細胞層；I P L、内部網状層；I N L、内部核層；O P L、外部網状層；O N L、外部核層；P R L、光受容体層。

30

【 0 1 8 2 】

リアルタイム P C R、免疫組織化学および免疫プロット法による網膜のマーカー ( 遺伝子 ) の発現：

ロドプシン ( Rho ) :

ロドプシンは、網膜の光受容体細胞における生物学的色素であり、光の知覚において、最初の出来事に重要である。リアルタイム P C R により定量化された R h o 遺伝子の m R N A レベルは、糖尿病動物の網膜において低下レベルを示した。R C および S C による治療は、その減少を防ぎ、しかしながら、S C 治療は、R C と比較して著しい効果を示し、通常のラットより良いものであった ( 図 1 6 A、明細書に添付の図面に示すように )。免疫蛍光により R h o のタンパク質レベルを定量化した。これは、m R N A レベルと合致する。R h o タンパク質の免疫蛍光イメージングは、通常のコントロール・ラット網膜と比較して、糖尿病ラット網膜において低下した発現を示した。R C および S C による治療は、糖尿病網膜における R h o タンパク質発現の損失を防いだ。これは、非常に強い R h o プラスの蛍光により示される。さらに、S C は、糖尿病動物におけるラット網膜中での R h o タンパク質発現の損失を防ぐのに、R C より明瞭により効果的であることがそれぞれ見出された ( 図 1 6 B、明細書に添付の図面に示すように )。

40

【 0 1 8 3 】

神経成長因子 ( N G F ) :

N G F は、最も特徴づけられたニューロトロフィンであり、生存かつ末梢神経系および

50

中枢神経系において、ニューロンを選択する分化において重要な役割を果たすことが知られている。1950年代に発見されて以来、NGFは、進行性の神経変性疾患の治療において、有望さを示していた。動物において、NGFは、神経末端派生物を促進し、虚血性傷害、外傷および毒性傷害後の神経単位回復を促進することが知られていた。リアルタイムPCRによりNGF遺伝子発現の状態をチェックし、糖尿病動物の網膜における規則を見出した。通常のクルクミンおよび溶解性クルクミンの両方を用いた治療では、糖尿病下のNGF遺伝子の下方調整を防ぐのに同じくらいに有利な効果を示した(図17A、明細書に添付した図面に示すとおり)。免疫蛍光により見積もられたNGFのタンパク質レベルは、同様の結果であった。NGFタンパク質の免疫蛍光イメージは、通常のコントロール・ラット網膜に比べて、糖尿病ラット網膜において低下した発現を示した(図17B、明細書に添付した図に示したとおり)。RCおよびSCを用いた治療により、糖尿病網膜におけるNGFタンパク質の損失を防いだ。これは、非常に強いNGFプラスの蛍光により示される。

10

20

30

40

50

#### 【0184】

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)：

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は、脈管形成および血管形成を刺激する細胞により産生されるシグナル・タンパク質である。これは、血液循環が不十分なとき、組織への酸素供給を回復させるシステムの一部である。VEGFが過剰に発現されたとき、これは疾患に寄与する。VEGFは、幅広い網膜の血管拡張を生じ、血液-網膜のバリアの破壊を生じ、眼球新血管形成に關与する。VEGFについてウエスタンブロット法は、糖尿病網膜におけるVEGF発現の上昇調整を示した(図18、明細書に添付の図面に示すように)。RLおよびSLを用いた治療は、糖尿病誘発性VEGFの過発現を阻害した。

#### 【0185】

血小板由来増殖因子(PDGF)：

PDGFは、細胞成長と細胞分裂を調節する成長因子である。特に、PDGFは、血液管形成(血管形成)、既に存在する血管組織からの血管の成長において、著しく重要な役割を果たす。幾つかの研究が、糖尿病性網膜症を有する患者からの硝子体液サンプル中に、高いPDGF集中を示す。VEGFのように、PDGFは、血管新生促進の成長因子であり、糖尿病性網膜症において、異常な新血管形成を促進するかもしれない。さらに、PDGFは、糖尿病性網膜症を有する患者における網膜上膜の形成とけん引を刺激し、けん引の網膜の分離を引き起こすかもしれない。実際、阻害剤の開発は、病理学網膜の新血管形成におけるPDGFシグナルに拮抗し、依然として眼科薬物開発の活性化領域である。PDGFについての免疫組織化学は、糖尿病網膜におけるタンパク質の上昇調整を示している(図19、明細書に添付した図面中に示すとおり)。RCおよびSCの両方を用いた治療は、糖尿病誘発性PDGFの過発現を阻害する。溶解性クルクミンは、通常のクルクミンよりより有効であった(図19、明細書に添付する図面に示すように)。

#### 【0186】

<結論>

ラットへのクルクミン投与により、網膜における糖尿病誘発性異常事態を防いだ。クルクミンは、ERGによりチェックされたように、糖尿病ラットにおいて失われた、ラットの網膜の機能性を保持していた。また、これは、網膜の様々な層の厚みが測定されたH&E染色により行われたように、網膜の形態学的研究により、明らかである。クルクミンは、極めて重要な役割を有するロドプシンおよび神経成長因子の発現における低下を防いだ。クルクミンは、ストレスおよび血管形成に關与するVEGFおよびPDGFの過発現を防いだ。興味深いことに、溶解性クルクミンで処理したラットは、通常のクルクミンと比較した際に完全な利益を示し、これは、増加したバイオアベイラビリティのためかもしれない。ゆえに、溶解性クルクミンは、糖尿病性網膜症を治療するか、または予防するのに用いることができる。

#### 【0187】

<利点>

1. 脂溶性栄養素の乾燥したさらさらの、水溶性 / 混和性形態を提供する。

【0188】

2. 貧弱な水溶性、油性、脂溶性の栄養素を、顆粒剤、粉剤、錠剤、軟膏剤、ペースト剤、口内洗浄液、うがい液、小袋、カプセル剤の形態で、または飲料に含めて、運搬する適切な方法を提供する。

【0189】

3. 貧弱な水溶性、油性、脂溶性の高いバイオアベイラビリティを有する栄養素の剤形を提供する。

【0190】

4. ここの前記組成物は、血中グルコース値を調節するのに有効である。

10

【0191】

5. 脂溶性栄養素を含むここの前記組成物および方法は、糖尿病性網膜症における無軸索細胞機能障害を調節するのに有効である。

【0192】

6. ここの前記組成物は、糖尿病性網膜症におけるレチナール層、ロドプシン値およびNGFタンパク質レベルの損失を防ぐのに有効である。

【0193】

7. ここの前記組成物は、糖尿病性網膜症における糖尿病誘発性PDGFの過発現を阻害するのに有効である。

【0194】

20

8. ここの前記組成物は、糖尿病性白内障における不溶性水晶体タンパク質の蓄積を防ぐのに有効である。

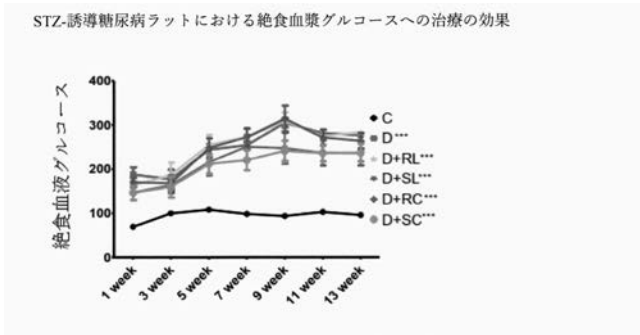
【0195】

9. ここの前記組成物は、糖尿病性白内障における水晶体におけるソルビトール値の蓄積を防ぐのに有効である。

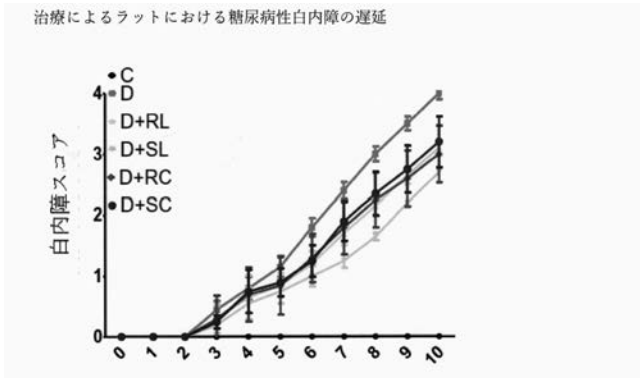
【0196】

10. ここの前記組成物は、糖尿病性白内障におけるタンパク質凝集を減じ、かつ可溶性タンパク質全体のプロフィールを正規化するのに有効である。

【 図 1 】

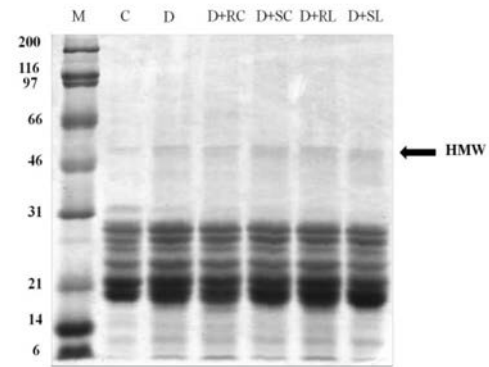


【 図 2 】



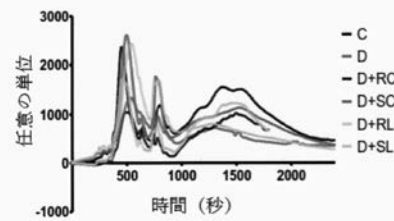
【 図 3 】

水晶体タンパク質の可溶性画分のSDS-PAGEパターン



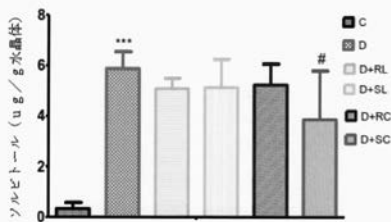
【 図 4 】

水晶体タンパク質可溶性画分のサイズ排除クロマトグラフィー



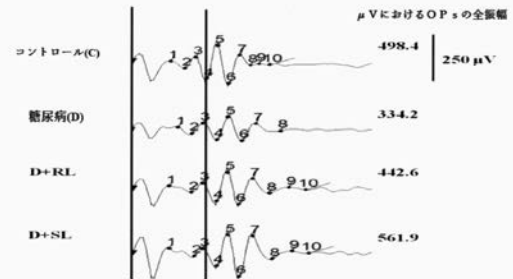
【 図 5 】

水晶体ソルビトールの蛍光分光測定



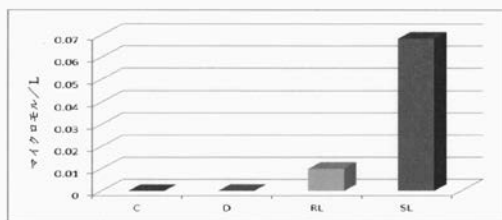
【 図 7 】

異なる群と全振幅からのOPsの代表的な波形



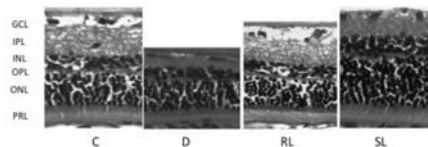
【 図 6 】

血漿ルテインレベルのHPLC測定



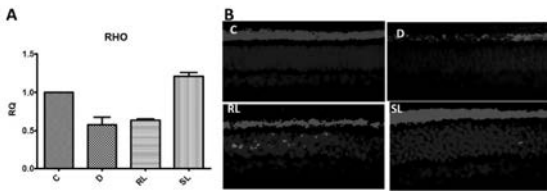
【 図 8 】

網膜の代表的な組織構造



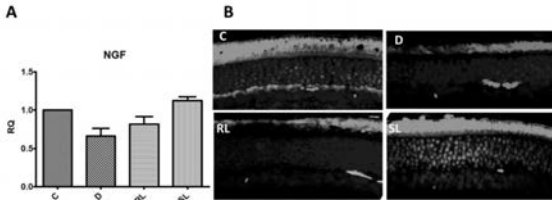
【 図 9 】

リアルタイムPCR (A) および免疫組織化学(B)によるロドプシンの発現



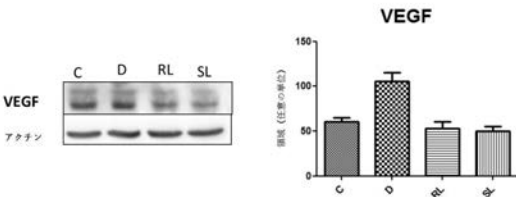
【 図 10 】

リアルタイムPCR(A)および免疫組織化学(B)によるNGFの発現



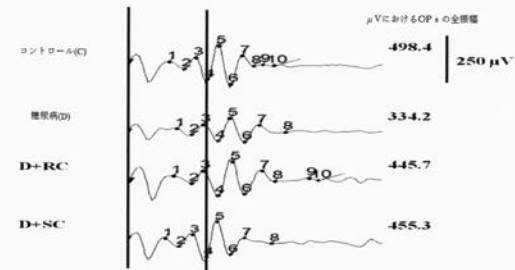
【 図 11 】

免疫プロット法によるVEGFの発現



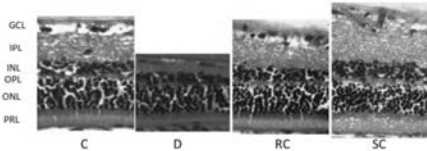
【 図 14 】

異なる群と全振幅の個々の動物のOPsの代表的な波形



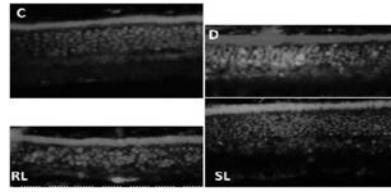
【 図 15 】

網膜の代表的な組織構造



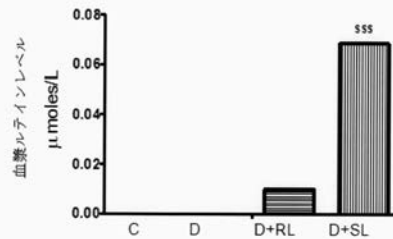
【 図 12 】

免疫組織化学によるPDGFの発現



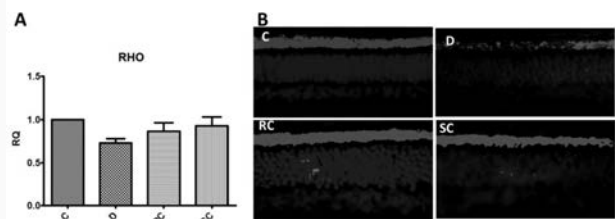
【 図 13 】

RP-HPLCにより測定された血清ルテインレベル



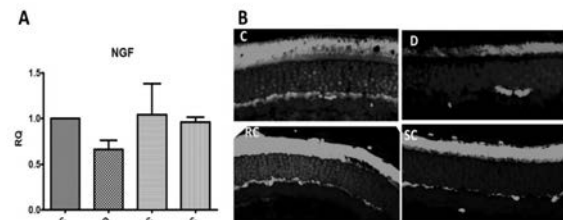
【 図 16 】

リアルタイムPCR (A)および免疫組織化学(B)によるロドプシンの発現



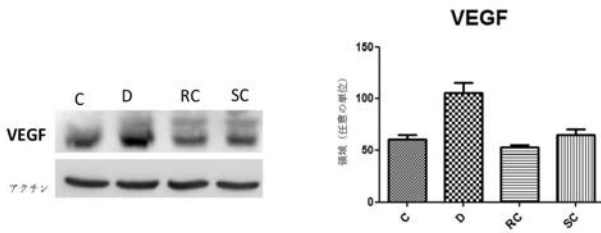
【 図 17 】

リアルタイムPCR (A)および免疫組織化学(B)によるNGFの発現



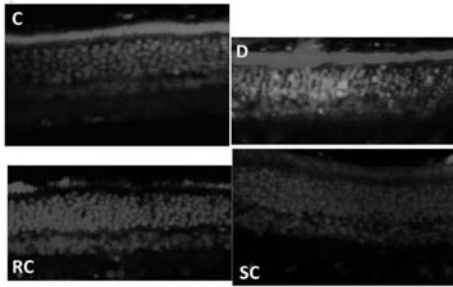
## 【図 18】

免疫ブロット法によるVEGFの発現



## 【図 19】

免疫組織化学によるPDGFの発現



## 【手続補正書】

【提出日】平成28年6月13日(2016.6.13)

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖尿病の眼関連合併症の進行および成熟を遅延させる方法であり、  
前記方法は、組成物を動物へ投与する工程を含み、  
前記組成物は、ヒトの食物摂取について安全であり、かつ栄養摂取のための栄養補助食品および健康促進への貢献として有用であり、

前記組成物は、脂溶性栄養素、安定剤および水溶性親水性担体を含む分子分散であり、  
前記組成物は、糖尿病の眼関連合併症を遅延させるのに有効な量で投与される方法。

【請求項 2】

前記糖尿病の眼関連合併症が、白内障および網膜症である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記脂溶性栄養素は、ルテイン、ルテイン異性体、ルテインエステル、ゼアキサンチン異性体、ウコン抽出物、クルクミン、生姜ならびにそれらの混合物を含む群から選択される先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 4】

前記投与する工程は、血中グルコース値を調節するのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記投与する工程は、糖化ヘモグロビン（HbA1c）値を調節するのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記投与する工程は、糖尿病性網膜症における無軸索細胞機能障害を調節するのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

前記投与する工程は、糖尿病性網膜症における、レチナール層、ロドプシン値およびNGFタンパク質レベルの損失を防ぐのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項8】

前記投与する工程は、糖尿病性網膜症における、糖尿病誘発性PDGF過発現を阻害するのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

前記投与する工程は、糖尿病性白内障における不溶性水晶体タンパク質の蓄積を防ぐのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

前記投与する工程は、糖尿病性白内障における水晶体におけるソルビトール値の蓄積を防ぐのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

前記投与する工程は、タンパク質凝集を減らし、かつ糖尿病性白内障における可溶性タンパク質全体のプロファイルを正規化するのに有効な量で前記組成物を投与する工程を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

前記組成物は、界面活性剤を含む先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記組成物は、少なくとも80重量%の全キサントフィルを含有し、そのうちトランス-ルテイン含有量は、80~95%w/wであり；  
（R,R）-ゼアキサントンは、14~20%w/wであり；  
（R,S）-ゼアキサントンは、0.01~1%w/wであり；または、トランス-ルテイン含有量は、80~95%w/wであり；  
（R,R）-ゼアキサントンは、14~20%w/wであり、かつ、キサントフィル/キサントフィルエステルを含む植物の抽出物/オレオレジンから誘導された他のカロチノイドを微量；または、5~95%のクルクミノイドを含むクルクミンを含む、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記安定剤は、アスコルビン酸、BHA、BHT、パルミチン酸アスコルビル、ローズマリー抽出物、混合天然トコフェロール、アルファ酢酸トコフェロール、アスコルビン酸ナトリウム、ヒマシ油誘導体、ラウリル硫酸ナトリウムおよびこれらの混合物から選択される先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

使用される前記水溶性親水性担体は、ポリエチレングリコール200、ポリエチレングリコール400、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロール、ソルビトール、グルコースシロップ、コーン浸出液、マンニトール、ポリエチレングリコール6000、ポリエチレングリコール10000、ポリエチレングリコール20000、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、スクロース、グルコース、塩化ナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、可溶性デンプン、加水分解デンプンおよびこれらの混合物から選択される

先行する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記界面活性剤は、ポリソルベート 20、ポリソルベート 60、ポリソルベート 80、レシチン、スクロース脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウムおよびこれらの混合物からなる群から選択される請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

前記組成物は、粉剤、錠剤、カプセル剤、小袋、ビーズ状剤、マイクロカプセル化粉剤、油懸濁液、分散液、ペレット剤、軟質ゲルカプセル剤、チュアブル錠または液体製剤の形態である先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2015/052248
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	A61K31/047	A61K36/9066
	A61P27/12	A61P27/02
		A23L1/30
ADD.	A61K36/9068	A61K47/00
		A61K31/09
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K A61P A23L		
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)		
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	P. SURYANARAYANA: "Curcumin and Turmeric Delay Streptozotocin-Induced Diabetic Cataract in Rats", INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE, vol. 46, no. 6, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 2092-2099, XP055052633, ISSN: 0146-0404, DOI: 10.1167/iovs.04-1304 the whole document in particular abstract Results Discussion  ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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
14 July 2015		25/09/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hornich-Paraf, E

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/052248

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BROWN, L. ET AL: "A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men", AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, vol. 70, no. 4, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 517-524, XP002742194, the whole document in particular abstract Results Discussion	1-17
Y	----- RALF JÄGER ET AL: "Comparative absorption of curcumin formulations", NUTRITION JOURNAL, vol. 13, no. 1, 24 January 2014 (2014-01-24), page 11, XP021175910, BIOMED CENTRAL, GB ISSN: 1475-2891, DOI: 10.1186/1475-2891-13-11 the whole document in particular abstract Results Discussion Conclusion	1-17
Y	----- Anonymous: "CurcuWIN(TM) Officially Launched at Engredea 2014 - OmniActive", 25 February 2014 (2014-02-25), XP055199513, Retrieved from the Internet: URL:http://www.omniactives.com/news/press-releases/curcuwin-officially-launched-at-engredea-2014 [retrieved on 2015-07-01] the whole document	1-17
Y	----- Stephen Daniells: "OmniActive's curcumin shows 46-fold bioavailability increase compared to standard curcumin: Study", Nutraingredients-Usa.Com 3 February 2014 (2014-02-03), XP055199515, Retrieved from the Internet: URL:http://www.nutraingredients-usa.com/Research/OmniActive-s-curcumin-shows-46-fold-bioavailability-increase-compared-to-standard-curcumin-Study [retrieved on 2015-07-01] the whole document ----- -/--	1-17

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/052248

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI            Week 201401            Thomson Scientific, London, GB;            AN 2013-U63219            XP002742195,            &amp; CN 103 238 902 A (YUNNAN RAINBOW BIO            TECH CO LTD) 14 August 2013 (2013-08-14)</p>	1-17
Y	<p>abstract</p>	1-17
Y	<p>-----            US 3 998 753 A (ANTOSHKIW THOMAS WILLIAM            ET AL) 21 December 1976 (1976-12-21)            in particular            Summary of the Invention            column 2, paragraphs 1, 4, 5, 6            column 4, line 25 - line 32            Examples            Claims</p>	1-17
Y	<p>-----            DATABASE WPI            Week 201224            Thomson Scientific, London, GB;            AN 2011-P56923            XP002742196,            &amp; CN 102 225 087 A (LEI A)            26 October 2011 (2011-10-26)            the whole document</p>	1-17
X,P	<p>-----            Shankaranarayanan J. et al: "Soluble            Curcumin (Curcuwin™) in the prevention of            diabetic retinopathy via modulation of            anti-oxidant activity and genetic pathways            -- in vivo model",            55th Annual Conference. Translational            Nutrition: --Turning Research into            Practice in Partnership with Scripps            Health            15 October 2014 (2014-10-15), 18 October            2014 (2014-10-18), XP002742197,            Retrieved from the Internet:            URL: <a href="http://www.researchgate.net/publication/267156372_SOLUBLE_CURCUMIN_%28CURCUWIN%29_IN_THE_PREVENTION_OF_DIABETIC_RETINOPATHY_VIA_MODULATION_OF_ANTI-OXIDANT_ACTIVITY_AND_GENETIC_PATHWAYS_IN_VIVO_MODEL">http://www.researchgate.net/publication/267156372_SOLUBLE_CURCUMIN_%28CURCUWIN%29_IN_THE_PREVENTION_OF_DIABETIC_RETINOPATHY_VIA_MODULATION_OF_ANTI-OXIDANT_ACTIVITY_AND_GENETIC_PATHWAYS_IN_VIVO_MODEL</a>            [retrieved on 2015-07-14]            the whole document</p>	1-17
	<p>-----            -/--</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2015/052248
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	N J Morristown: "OMNIACTIVE PRESENTS STUDY ON LUTEIN'S ROLE IN VISUAL FUNCTION AND RETINALDAMAGE IN DIABETES MODELS", UtahSoluble Lutein, 28 July 2014 (2014-07-28), XP055200195, Retrieved from the Internet: URL:http://www.omniactives.com/news-pdfs/17-PR_140728_OAHT_Presents_Study_on_Lutein_Role_in_Visual_Function_FINAL.pdf [retrieved on 2015-07-06] the whole document	1-17
Y,P	----- WO 2014/155189 A1 (OMNIACTIVE HEALTH TECHNOLOGIES LTD [IN]) 2 October 2014 (2014-10-02) page 1 - page 17 Claims -----	1-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/052248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 103238902	A	14-08-2013	NONE
-----			
US 3998753	A	21-12-1976	AT 351912 B 27-08-1979
			BE 832331 A1 12-02-1976
			DE 2534091 A1 26-02-1976
			FR 2281961 A1 12-03-1976
			GB 1502895 A 08-03-1978
			IT 1050722 B 20-03-1981
			JP S5141732 A 08-04-1976
			NL 7509586 A 17-02-1976
			US 3998753 A 21-12-1976
-----			
CN 102225087	A	26-10-2011	NONE
-----			
WO 2014155189	A1	02-10-2014	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	27/12 (2006.01)	A 6 1 P	27/12	
A 6 1 K	36/9066 (2006.01)	A 6 1 K	36/9066	
A 6 1 K	36/9068 (2006.01)	A 6 1 K	36/9068	
A 6 1 K	9/10 (2006.01)	A 6 1 K	9/10	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	9/06 (2006.01)	A 6 1 K	9/06	
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14	
A 6 1 K	9/20 (2006.01)	A 6 1 K	9/20	
A 6 1 K	9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/48	
A 6 1 K	9/50 (2006.01)	A 6 1 K	9/50	
A 6 1 K	9/16 (2006.01)	A 6 1 K	9/16	
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/10 (2006.01)	A 6 1 K	47/10	
A 6 1 K	47/46 (2006.01)	A 6 1 K	47/46	
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	47/02 (2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/26 (2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K	47/32 (2006.01)	A 6 1 K	47/32	
A 6 1 K	47/38 (2006.01)	A 6 1 K	47/38	
A 6 1 K	47/36 (2006.01)	A 6 1 K	47/36	
A 2 3 L	33/10 (2016.01)	A 2 3 L	33/10	

(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, T J, 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, R O, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, UG, US

(72)発明者 デシュパンデ、ジャヤント

カナダ、シー 1 エー 3 エイチ 5 プリンスエドワード アイランド、シャーロットタウン、 ク  
レストウッド ドライブ、 6 2、 オムニアクティブ ヘルス テクノロジーズ(カナダ)リミ  
テッド

(72)発明者 シャンカラナラヤナン、ジェヤコディ

インド、マハーラーシュトラ 4 0 0 6 0 4、ターナー(ダブリュ)、ワグル インダストリアル  
エステート、ロード ナンバー 1、プロット ナンバー エー - 1 0、ニュー テクノロジ  
センター、オムニアクティブ ヘルス テクノロジーズ リミテッド

F ターム(参考) 4B018 LE01 LE02 LE03 LE06 MD07 MD08 MD61 ME03 ME14 MF01  
4C076 AA09 AA11 AA16 AA29 AA31 AA36 AA53 AA61 BB01 CC10  
CC21 CC40 DD23 DD37Q DD38 DD39Q DD41Q DD55Q DD59Q DD67  
EE06 EE16 EE23 EE32 EE38 EE58 EE58Q FF02 FF11 FF36  
FF63  
4C088 AB81 AC10 BA11 BA23 BA32 MA16 MA21 MA23 MA28 MA35  
MA36 MA37 MA38 MA41 MA43 MA63 NA14 ZA33 ZC35  
4C206 AA01 AA02 CA13 CB14 DB01 DB56 KA01 KA17 KA18 MA03  
MA05 MA36 MA41 MA43 MA48 MA55 MA56 MA57 MA58 MA61

MA63 MA72 NA14 ZA33 ZC35