

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6042537号
(P6042537)

(45) 発行日 平成28年12月14日 (2016. 12. 14)

(24) 登録日 平成28年11月18日 (2016. 11. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 19/04 (2006. 01)
A 2 3 L 33/10 (2016. 01)
A 6 1 K 36/064 (2006. 01)
A 6 1 P 3/06 (2006. 01)
A 6 1 P 3/04 (2006. 01)

C 1 2 P 19/04 A
A 2 3 L 33/10
A 6 1 K 36/064
A 6 1 P 3/06
A 6 1 P 3/04

請求項の数 17 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-519255 (P2015-519255)
(86) (22) 出願日 平成25年6月21日 (2013. 6. 21)
(65) 公表番号 特表2015-528696 (P2015-528696A)
(43) 公表日 平成27年10月1日 (2015. 10. 1)
(86) 国際出願番号 PCT/ES2013/070408
(87) 国際公開番号 W02014/001589
(87) 国際公開日 平成26年1月3日 (2014. 1. 3)
審査請求日 平成28年6月8日 (2016. 6. 8)
(31) 優先権主張番号 12382250. 4
(32) 優先日 平成24年6月25日 (2012. 6. 25)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 61/683, 085
(32) 優先日 平成24年8月14日 (2012. 8. 14)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 514328481
エセ・アー・ダム
スペイン・E-O8025・バルセロナ・
カリエ・ロセリョ・515
(74) 代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人 100064908
弁理士 志賀 正武
(74) 代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆
(74) 代理人 100110364
弁理士 実広 信哉

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 醸造プロセスのバイオマスから得られる脂肪バインダー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程：

- i) 50～95℃の温度で、攪拌した0.25～3Mの濃度のNaOH溶液を含む反応器を準備する工程；
- ii) 醸造プロセスで生じたバイオマスを前記溶液に加える工程；
- iii) 前記溶液の条件を少なくとも1時間維持する工程；
- iv) 前記溶液を室温まで冷却する工程；
- v) 酸性溶液又は水の少なくとも1つの追加により、pH7に達するまで前記溶液を中和する工程であって、2以上の追加を行う場合、追加の間に前記溶液から固体生成物を分離するステップを行う工程；
- vi) 工程(v)で得られた固体生成物を前記溶液から分離する工程；
- vii) 工程(v)の中和が前記酸性溶液の追加により行われた場合、前記固体生成物を少なくとも1回の水での洗浄に供し、得られた該固体生成物を分離する工程；及び
- viii) 前記固体生成物が一定質量になるまで乾燥させ、微粉化する工程、を含む、醸造プロセスで生じた副生成物バイオマスからのサッカロマイセス・セレビスエの細胞壁から抽出される、β-グルカン、キチン、及びキトサンを含む組成物を得る方法。

【請求項 2】

工程(i)の温度が65～85℃である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (i) の温度が 80℃である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 NaOH 溶液が 0.25～1.5 M の濃度である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

醸造プロセスで生じた前記バイオマス、前記反応器に 1:2～1:5 の量で加える、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (v) の中和の前に、工程 (iv) の前記溶液から前記固体生成物を分離する工程をさらに含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 7】

工程 (viii) が、溶媒含有量が 5 質量%未満になるまで前記生成物をスプレードライすることにより行われる、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記バイオマス、前記 NaOH 溶液に加える前に、前記醸造プロセスで生じた該バイオマスの前処理をさらに含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記前処理が以下の工程：

(a) 前記バイオマス、篩にかけて、醸造プロセスの不純物から前記サッカロマイセス・セレビシエのバイオマス、分離する工程； 20

(b) 工程 (a) で得られた前記サッカロマイセス・セレビシエのバイオマス、乾燥させる工程；及び、

(c) 工程 (b) で得られた前記サッカロマイセス・セレビシエの生成物、製粉する工程；

を含む、方法。

【請求項 9】

キトサン、キチン、及びβ-グルカン、を 1:10:80～1:20:150 の比率で含む、醸造プロセスで生じた副生成物バイオマスからのサッカロマイセス・セレビシエの細胞壁からの抽出組成物。

【請求項 10】

蒸留水中、pH 3.5 での溶解度が 650～800 mg/L である、請求項 9 に記載の組成物。 30

【請求項 11】

炭素、水素、及び窒素の原子質量の割合が、それぞれ、炭素が 36～44%、水素が 5.5～7%、及び窒素が 0.2～0.8% である、請求項 9 又は 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

予防薬及び／又は治療薬として使用するための、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

腸の脂肪結合剤として使用するための、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の組成物。 40

【請求項 14】

太り過ぎ、肥満、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、高血圧、及び心血管障害から成る群から選択される障害を予防及び／又は治療するのに使用するための、請求項 9～11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

有効量の請求項 9～11 のいずれか一項に記載の組成物と、適量の薬学的又は獣医学的に許容される賦形剤とを含む、医薬及び／又は獣医薬品。

【請求項 16】

有効量の請求項 9～11 のいずれか一項に記載の組成物と、適量の他の食用成分を含む 50

、食用製品。

【請求項 17】

健康補助食品である、請求項 1 6 に記載の食用製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬と栄養学の分野に関し、特に、体重を調整し、心循環系に悪影響を与える脂肪の低減に使用するための健康補助食品に関する。

【背景技術】

【0002】

私たちの社会の質の悪い食習慣及びライフスタイルは、公衆衛生上の問題になりつつある。毎日の食物摂取の推奨される金字塔に関する現在の崩壊のうち、最も重大な点は飽和脂肪酸及びコレステロールの過剰消費である。エネルギー摂取に対して、7%の飽和脂肪酸及び250mg/日未満のコレステロールが推奨されているが、現実には、それぞれ15%及び350mg/日の値に達している。エネルギー摂取の過剰は、主に飽和脂肪の過剰消費に起因し、一方、コレステロールの過剰摂取は、動物性製品の過剰消費に起因する。

【0003】

すべての疫学的な研究は、身体活動によるエネルギー消費の減少をともなう脂肪を多く含む食物の過度な消費が、多くの一般的な健康問題、太り過ぎ/肥満、及び最も深刻なものの1つに数えられる高コレステロール血症を引き起こすことに同意している。生活の質の欠陥に加えて、太り過ぎ及び肥満は、心血管疾患、2型糖尿病、筋肉-骨格の異常、及びがんを含む深刻で有害な健康状態の原因となる要素に関連している。一方、高コレステロール血症は、アテローム性動脈硬化症の原因になるため、先進国における死亡の主要な原因である冠状動脈性心臓病の主なリスク要因と考えられている。

【0004】

上記に鑑みて、体重の低下及びコレステロールの減少を助けることができる非処方薬である脂質低下剤が、ますます求められている。結果として、それらの異なる有効性及び常に完全に立証されていない有効性にもかかわらず、多数の市販薬である脂質低下作用を有する健康補助食品が市販されている。これらのうち、カプセル又はタブレットの形態で入手可能なキトサンは、コレステロールの低下でき、且つ、迅速な体重減量をもたらすことができると宣伝されている。

【0005】

キトサンは、キチンに由来するポリアミノ糖 (polyaminosaccharide、含窒素多糖) である。最も豊富にある天然の再生可能な有機資源の1つであり、甲殻類の外骨格に主に存在するキチンは、化学的に、 β -(1-4)-グリコシド結合で結合したN-アセチル-D-グルコサミン単位とD-グルコサミン単位とで構成される直鎖ポリマーであって、ここで、ポリマー鎖中においてN-アセチル-D-グルコサミン単位が主要な構成である。キチンの脱アセチル化形態は、キトサンとして示される。キチンは、通常、40%を超えるアセチル化度（すなわち、40%を超えるN-アセチル-D-グルコサミン数及び60%未満のD-グルコサミン数）を有し、希酸に対して不溶性であるコポリマー（共重合体）として示される。キトサンの名称は、40%未満のDA（すなわち、60%を超えるDD（脱アセチル化度）、40%未満のN-アセチル-D-グルコサミン数、及び60%を超えるD-グルコサミン数）を有し、多くの場合、希酸中に可溶であるコポリマーに用いられる。キチン及びキトサンは、化学的に、2位の炭素のヒドロキシルが、それぞれアセトアミド及びアミノ基で置換された、セルロースの類似体としてみなされ得る。キトサンは、その分子中に存在する複数のアミノ基に起因する、特徴的な化学的及び生物的特性を有する。これは、医療方法を含む様々な方法において有効であり、これらの方法は、キトサンの優れた生体適合性及び生理学的不活性により可能性を有する。

【0006】

キチン及びキトサンは、多くの水生生物における支持材（エビ及びカニの殻及びヤリイ

10

20

30

40

50

カ及びコウイカ等のイカの骨プレート)、多くの昆虫、陸生甲殻類(オカダンゴムシ(*Armadillidium vulgare*)、ワラジムシ(*Porcellio scaber*))、線虫、キノコ類、及びいくつかの微生物類(酵母、真菌類、及び藻類)における支持材として見いだされる。水生生物の殻は、乾燥ベースで、約30~40%のタンパク質、約30~50%の炭酸カルシウム、及び約20~30%のキチンを含む。これらの割合は、甲殻類の種類と季節に応じて変化する。従来は、カニ又はエビの殻の脱カルシウム又は脱タンパク質により製造され、これらはそれぞれ、酸溶液での炭酸カルシウムの溶解、及び、アルカリ媒体中の又は酵素を用いたタンパク質の除去を含む。その後、キトサンは、高温のアルカリ溶液でキチンを脱アセチル化する工程、及び脱色化する工程により得られる。このキトサンの製造方法は、多くの好ましくない特徴を有する。例えば、この方法は費用の掛かる熱エネルギー、及び潜在的に健康に有害である苛性アルカリを必要とする。この方法はまた、非常に多くの廃棄物を生じさせ、これにより、かなりの廃棄コストが必要となる。さらに、エビ又はカニの殻の供給は、季節及び環境の要因に大きく依存しており、予測できない製造能力の制限をもたらす。また、医薬及び農業用途に使用される最終製品における一貫性のない物理-化学的特性をもたらす。さらに、エビ類の殻からのキトサン中には、消費者に対してアレルギーを引き起こし得る、最終製品中の抗原が存在し得る。そのため、キトサンが臨床的に良好な忍容性を有していても、甲殻類に対してアレルギーを有する人には推奨できない。これらの問題は、種々の資源からキトサンを抽出することにより回避できる。

【0007】

今日において、真菌類の細胞壁成分から純粋なキトサンを抽出することに研究の焦点が当てられている。この目的のために、N. Nweらは、真菌細胞壁におけるキトサンとグルカンの間の結合を研究し、真菌の*Gongroella butleri*から高収率で高純度のキトサンを製造するための酵素的方法を開発した(非特許文献1)。

【0008】

特許文献1には、キチン鎖の分解又は変換を引き起こさずに、制御された方法で、 β -グルカン類からキチンを分離することができる方法が記載されている。この方法は、クロコウジカビ(*Aspergillus niger*)の真菌細胞に塩基性溶液を接触させて、次いで、アルカリ不溶性画分を酸性溶液に接触させ、これにより細胞壁誘導体を含む酸性化したアルカリ不溶性画分の懸濁液を得て、最後にこれを β -グルカナナーゼ酵素と接触させてキチン生成物を得るか、又はこれをキチン脱アセチル化酵素と接触させてキトサン生成物を得ることに基づいている。

【0009】

キトサンの1つの用途は、抗高脂血の健康補助食品であり、ここで、ヒトの消化酵素による限られた加水分解により、キトサンは大腸まで実質的に消化されずに消化系を進み、食物繊維と同様に効果的に作用する。キトサンは、脂肪酸及び胆汁酸のアニオン性カルボキシル基と結合することにより、消化管から脂肪の吸収を減少させ、中性脂質(すなわち、コレステロール、他のステロール類)の乳化を、これらと疎水結合により結合することにより妨げると考えられている。キトサンの抗高脂血症の可能性は、*in vivo*及び*in vitro*の両方で研究されてきた。*in vivo*の研究は、動物及びヒトの両方で行われる試験を含み、また、主に体重、血清脂質レベル、糞便中の脂質濃度の様々な測定からなる。珍しいことに、報告されたデータは矛盾している。動物試験は多くの場合、キトサンの体重及びコレステロールレベルの減少効果を示した(非特許文献2)が、ヒトの試験ではこれらの効果は確認できなかった(非特許文献3及び4)。

【0010】

キトサンの健康補助食品の処方は、同様であるが同じではない。キトサンそれ自体は、キチン原料の化学的脱アセチル化の生成物であり、生成物中の脱アセチル化度は、反応条件に応じて変化する。処理中のいくつかの要因、例えば脱アセチル化度及び分子の分子量、キチン/キトサン比、溶解度、イオン強度、pH、粒径、及び温度が、キトサンの製造及びその特性に影響を与える。キトサンの効能がこれらの物理化学的特性に依存するとも考えられる。しかしながら、結合能力とキトサンの測定された物理化学的特性との間の相

関性は確立されていない。これは中でも、11個の選択されたキトサン調製物の胆汁酸－結合能力、脂肪－結合能力、膨潤キャパシティー、脱アセチル化度、及び溶液粘度を報告した一の研究に示されている（非特許文献5）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】EP 1483299

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】N. Nweら、2010, “Production of fungal chitosan by enzymatic method and applications in plant tissue culture and tissue engineering: eleven years of our progress, present situation and future prospects” Biopolymers, Magdy Elnashar編, 2010年9月28日発行, chapter 7 pp. 135-162 10

【非特許文献2】H. Yaoら、 “Effect of chitosan on plasma lipids, hepatic lipids, and fecal bile acid in hamsters human trials failed to show these effects” J. Food Drug Anal. 2006, vol. 14, pp. 183~189

【非特許文献3】M.D. Gadesら、 “chitosan supplementation and fat absorption in men and women” J. Am. Diet. Assoc. 2005, vol. 105, pp. 72~77

【非特許文献4】C.N. Mhurchuら、 “Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: a systematic review of randomized controlled trials” Obesity Rev. 2005, vol. 6, pp. 35~42 20

【非特許文献5】K. Zhouら、 “In vitro binding of bile acids and triglycerides by selected キトサン preparations and their physico-chemical properties” Food Science and Technology 2006, vol. 39, pp. 1087~1092

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

キトサンベースの健康補助食品は、「オイル捕捉剤 (oil trappers)」及び「オイルマグネット (oil magnets)」として市販されている。これらの健康補助食品のいくつかの宣伝文句は、消費者に非現実的な期待を与え得る。コレステロールを下げ、急速な体重減量の両方が可能であることを広告している一方、これらは同時に、ヒトの健康に有益な脂質ベースの分子、例えば、脂溶性ビタミンA、D、E、K、HDL、コレステロール、植物性ステロール、並びにオメガ3及び6脂肪酸等の多価不飽和脂肪酸をも捕捉してしまう能力により、反栄養的な効果も引き起こし得る。 30

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、醸造プロセスで生じた副生成物バイオマスからのサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞壁から抽出される、 β -グルカン、キチン、及びキトサンを含む多糖に富む組成物、これを得るための方法、及びこの使用を提供する。本発明の組成物は多糖類 (キチン、キトサン、及び β -グルカン) に富んでおり、この組成物として、本明細書では「多糖に富む組成物 (ポリサッカリドリッチ組成物)」と称する。「本組成物」、「本生成物」、「本製品」、及び「本発明の組成物」もまた、それぞれ本発明の組成物を示すために用いられる。 40

【0015】

したがって、本発明の第一の態様は、醸造プロセスで生じた副生成物バイオマスからのサッカロマイセス・セレビシエの細胞壁から抽出される、 β -グルカン、キチン、及びキトサンを含む多糖に富む組成物を得る方法に関し、この方法は、以下の工程：

i) 攪拌して、50~95℃の温度で、0.25~3Mの濃度のNaOH溶液を含む反応器 (リアクター) を準備する工程；

ii) 醸造プロセスで生じたバイオマスを前記した溶液に加える工程； 50

- i i i) 少なくとも1時間、前記した溶液の条件を維持する工程；
- i v) 前記した溶液を室温まで冷却する工程；
- v) 酸性溶液又は水の少なくとも1つの追加により、pH 7に達するまで前記した溶液を中和する工程であって、1より多い追加が行われる場合、追加の間に前記した溶液から固体生成物を分離するステップが行われる工程；
- v i) 工程(v)で得られた固体生成物を溶液から分離する工程；
- v i i) 工程(v)の中和が酸性溶液の追加により行われた場合、前記した固体生成物を少なくとも1回の水での洗浄に供し、得られた固体生成物を分離する工程；及び
- v i i i) 前記した固体生成物が一定質量になるまで乾燥させ、微粉化する工程。

【0016】

10

本発明の別の態様は、上記で定義した方法により得られる組成物の提供である。

【0017】

人体におけるいくつかの有益な効果の発揮において、本発明の組成物は、治療又は予防薬として有用である。そのため、本発明の別の態様は、予防及び／又は治療薬としての使用のための本発明の組成物に関する。特に、本組成物は、ヒトを含む動物における、太り過ぎ、肥満、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、高血圧、及び心血管障害から成る群から選択される障害の予防及び／又は治療において有用である。本発明は、上述した障害の予防及び／又は治療のための薬剤の製造のための本組成物の使用も提供する。これは代わりに、ヒトを含む動物において、投与を必要としている該動物に本発明の組成物の有効量を投与することを含む、太り過ぎ、肥満、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、高血圧、及び心血管障害から成る群から選択される障害の予防及び／又は治療方法としても表現され得る。

20

【0018】

本発明の別の態様は、消化管の脂肪結合剤としての使用のための組成物に関する。

【0019】

別の態様において、本発明の組成物は解毒剤として有用である。

【0020】

別の態様において、本発明の組成物は免疫賦活剤として有用である。

【0021】

本発明の別の態様は、適当な量の薬学又は獣医的に許容される賦形剤と共に、有効量の上述した本組成物を含む、医薬及び／又は獣医的製品に関する。本明細書で用いられる用語「有効量」は、医学的な判断の範囲内で、所望の利益をもたらすのに十分多く、深刻な副作用を避けるのに十分少ない活性剤の量を意味する。

30

【0022】

本発明のさらなる態様は、適切な量の他の食用成分と共に、有効量の本発明の組成物を含む食用製品に関する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、前もって実験室スケールで得られた製品(C60、上図)と比較したDAMM製品(下図)の¹H-NMR分析の結果を示す図である。

40

【図2A】図2Aは、DAMM生成物のX線回折図を示す図である。

【図2B】図2Bは、純粋なキチン(カニの殻由来のキチン、Sigma, C3641)のX線回折図を示す図である。

【図3】図3は、明茶色の微粉末形態の最終生成物を示す図である。

【図4】図4は、バッチ4(上図)、バッチ3(中図)、及びバッチ2(下図)の生成物の¹H-NMR分析の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

サッカロマイセス・セレビシエの細胞壁は、細胞の乾燥質量の20～30%を占め得る。これは、主にマンノプロテイン及びβ-グルカン並びに少量のキチン及び脂質で構成さ

50

れる。これらの成分の割合は、菌株及び培養条件に応じて変化し得る。上記したとおり、先行技術文献において、真菌の細胞壁成分からキトサンを抽出する方法が開示されている。一方、この文献はまた、酵母、特にサッカロマイセス・セレビシエから β -グルカンを得る方法も開示している。WO 91/03495は、水溶性グルカンを生成して血小板産生を刺激する方法を開示している。こうした方法の一つは、US 4810646 (Jamasら) の手順による乾燥パン (Baker's) 酵母から前もって調製したグルカン粒子全体を出発原料とし、不溶性のグルカン粒子を溶解する追加の工程を含む。この特許出願の実施例2に記載された別の方法は、S. セレビシエの選択された種に由来する可溶性グルカンを生成するための一連の処理に関する。

【0025】

そのため、たとえ先行文献が、一方でキチン／キトサンを、他方で β -グルカンを酵母から得る方法が記載されているとしても、真菌の菌糸体からの最終抽出生成物の量及び品質は、その真菌源、これらの成長条件 (発酵媒体組成物、炭素源及び濃度、窒素源及び濃度、並びに金属イオン及びその濃度、並びに発酵条件、接種サイズ、培養時間、発酵温度)、及び抽出プロセスの工程に応じて変化する。

【0026】

本発明は、多糖に富む組成物を得るための工業的方法を提供する。この方法は、前記で説明した工程を含む。反応器は、50～95℃の温度で、攪拌した0.25～3Mの濃度のNaOH溶液を用いて準備される。本発明の具体的な実施形態において、NaOH濃度は、0.25、0.50、0.75、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、及び3Mから選択される。特に、NaOHは0.25～1.5Mの濃度である。より具体的には、NaOHの濃度は0.25Mである。別の具体的な実施形態において、NaOHの濃度は1Mである。

【0027】

本発明の別の実施形態において、反応器中でのNaOH溶液による処理は、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、及び95℃から選択される温度で行われる。特に、温度は65～85℃の範囲内であり、より具体的には80℃である。

【0028】

本発明の一実施形態において、溶液を冷却した後 (工程 (iv))、酸性溶液の追加によりpHが7に達するまで中和し、この溶液から固体を分離する。特に、この酸性溶液はリン酸溶液、HCl溶液、又は酢酸溶液である。次いで、固体生成物を少なくとも1つの水による洗浄工程に供する。洗浄の間、溶液から固体生成物を分離する。

【0029】

本発明の別の実施形態において、中和工程は、少なくとも1つの水の追加、特に蒸留水の追加によりなされる。2以上の追加が行われる場合、溶液から固体生成物を分離する工程は複数の追加の間に行われる。水の追加により中和が行われる場合、中和後にその固体を洗浄する必要はないが、より純度の高い固体生成物が望まれる場合、洗浄を行うこともできる。

【0030】

本発明の具体的な実施形態において、この方法は、中和の前に、一度冷却した溶液から固体生成物を分離することからなる工程を含む。分離は、例えば遠心分離により行われる。工業的なスケールアップにおいて、例えばバッチ2がこの工程を追加してなされた。

【0031】

本発明の具体的な実施形態において、醸造プロセスから得られるバイオマスが1:2～1:5の量で反応器に対して加えられる。特に、この量は1:3である。これは、ウェット (湿潤) バイオマス: NaOH溶液を表している。実施例から分かるとおり、バッチ2～4は、1:3 (バッチ2及び3) 及び1:2 (バッチ4) のバイオマス量を追加する方法で調製された。乾燥生成物で表されると、上述した実施例中の使用された量は、そ

10

20

30

40

50

れぞれ1：39及び1：23となる。

【0032】

したがって、醸造プロセスに由来する副生成物のバイオマスは、この醸造プロセスから直接もたらされて、NaOH溶液を含む反応器に加えられる。そのため、このバイオマスは、醸造プロセスの混入物（不純物）を含むので、湿潤状態（ウェット）である（本明細書において「湿潤バイオマス」とも言う）。

【0033】

醸造プロセスから得られる副生成物のバイオマスはまた、乾燥させて反応器に加えることもできる。したがって、別の実施形態において、この方法は、バイオマスをNaOH溶液に加える前に醸造プロセスから得られるバイオマスの前処理をさらに含む。この前処理は、以下の工程を含む：（a）バイオマスを篩って、醸造プロセスの混入物からサッカロマイセス・セレビシエのバイオマスを分離する工程；（b）工程（a）で得られたS. セレビシエバイオマスを乾燥させる工程；及び（c）工程（b）で得られたS. セレビシエバイオマス生成物を製粉する工程。この場合、乾燥したS. セレビシエ生成物の反応器への追加は、1：20～1：40（質量／容量）の量である。特に、この量は1：30（w／v）である。実施例から分かるとおり、バッチ1は、1：30のバイオマスを加えるこの方法で行われた。

10

【0034】

反応器中の条件は、少なくとも1時間の間保持される。特に、条件は5～20時間保持され、好ましくは16時間保持される。別の実施形態において、反応は10時間行われる（例えば、バッチ4を参照）。

20

【0035】

最終生成物は、乾燥され、最後に微粉化される。好ましくは、この生成物をガラストレイに置いて、一定の質量になるまで真空下（減圧下）、60℃以上で乾燥し、次いで微粉化する。乾燥は、処理時間を短縮するために真空下で行われ得る。具体的な実施形態において、乾燥は、生成物の溶剤含有量が5質量％未満になるまで、生成物をスプレードライすることにより行われる。

【0036】

本発明は、本明細書で記載する具体的な条件のすべての可能性のある組み合わせを包含する。以下の実施例（バッチ1～4）は、特定の反応条件及び方法の工程が、生成物の特性の大きな変化を伴わずに変更できることを示している（実施例の項目「9. 4」を参照）。

30

【0037】

この方法の結果として、S. セレビシエの細胞壁の、β-グルカン、キチン、及びキトサンを含む組成物が得られる。本発明の一実施形態において、組成物中のキトサン、キチン、及びβ-グルカンの比は、1：10：80～1：20：150である。本発明の別の実施形態において、本組成物の蒸留水中のpH3.5での溶解度は650～800mg／Lである。本発明の別の実施形態において、組成物の炭素、水素、及び窒素の原子質量の割合は、それぞれ、炭素が36～44％、水素が5.5～7％、及び窒素が0.2～0.8％である。

40

【0038】

本発明の具体的な一実施形態において、本組成物を得るための方法は、80℃、0.25MのNaOH濃度、乾燥させたS. セレビシエ生成物の反応器中の1：30（w／v）の量、及び16時間の反応時間で行われる。こうした条件で得られた組成物の化学的特性は、以下の実施例の項目2に記載する。特に、組成物中のキトサン、キチン、及びβ-グルカンの比は、1：14：116であり、この組成物の溶解度は、pH3.5の蒸留水中で710mg／Lであり、この組成物の炭素、水素、及び窒素の原子質量の割合は、それぞれ40.32、6.35、及び0.24％である。

【0039】

本発明の具体的な実施形態において、本組成物を得るための方法は、80℃、0.25

50

MのNaOH濃度、S. セレビシエの湿潤バイオマスの反応器中の1：3の量、及び16時間の反応時間で行われる。中和工程の前に、一度冷却して溶液から生成物を分離する。この具体的な実施形態において得られる生成物は、項目9. 4のバッチ2に記載した特性を有する。

【0040】

本発明の具体的な実施形態において、本組成物を得るための方法は、80℃、0.25MのNaOH濃度、反応器中の1：3のS. セレビシエの湿潤生成物量、及び16時間の反応時間で行われる。加水分解後、混合物に酸性溶液を追加して直接中和する（反応混合物の第一の遠心分離を行わずに）。中和後、この混合物を遠心分離し、次いで洗浄する。この特定の実施形態において得られる生成物はバッチ3の項目9. 4に記載した特性を有する。

10

【0041】

本発明の特定の実施形態において、本組成物を得るための方法は、80℃、0.32MのNaOH濃度、S. セレビシエの湿潤バイオマスの反応器中の1：2の量、及び10時間の反応時間で行われる。加水分解後、混合物に酸性溶液を追加して直接中和する（反応混合物の第一の遠心分離を行わずに）。中和後、この混合物を遠心分離し、次いで洗浄する。特定の実施形態において得られる生成物は、項目9. 4のバッチ4に記載した特性を有する。

【0042】

β-グルカンは、その免疫系を活性化する能力により、生物学的応答調整剤 (biological response modifiers) として知られている。さらに、欧州食品安全機関 (EFSA) は、最近の科学的意見において、β-グルカンの消費と血中コレステロール濃度の減少との間に、因果関係が存在し得ると結論づけた。この研究の対象となった食品組成は、可溶性の食物繊維であるβ-グルカンであった。体重のコントロールに関して、EFSAに対して、体重に対するβ-グルカンの効果を扱った参照が提出されなかったので、委員会は、β-グルカンの消費と標準的な体重の達成又は維持との因果関係は確立されなかったと結論付けた（ベータグルカンと通常の血中コレステロール濃度の維持との関係の健康促進効能表示の具体的実証 (ID 754, 755, 757, 801, 1465, 2934) 及び通常の体重の維持又は達成 (ID 820, 823) 第13(1)に準ずる、Regulation (EC) No 1924/2006 EFSA Journal 2009; vol. 7(9) pp. 1254 [18 pp.] についての科学的意見）。

20

30

【0043】

驚くべきことに、醸造プロセスに由来するサッカロマイセス・セレビシエのバイオマスからのβ-グルカン及びキチン／キトサンの混合物に基づく本発明の組成物は、ヒトの臨床試験において、脂質の特異的な低下効果、体重減量効果、及び胴囲の減少効果を示した。

【0044】

以下の有効な実施例は、本発明の組成物が、接種する脂質プロファイルを向上する能力の大幅な改善を含んでいたことを実証する。本発明の具体的な実施形態において、本組成物は、i) 2時間、37℃で、一定の攪拌をしながら、綿実油を酸性溶液中で成物に接触させる工程、ii) この溶液を遠心分離して上澄み中に存在する非結合の綿実油から組成物に結合した綿実油を分離する工程、iii) 上澄みをヘキサンと混合し、この混合物を遠心分離する工程、及びiv) 遠心分離した混合物の上清を回収し、ヘキサンを揮発させ、非結合の綿実油を計量する工程からなるアッセイにより測定される、それ自体の質量の少なくとも10倍の脂肪結合能力（吸着能力）を有する。このアッセイはまた、実施例の項目3で詳細に説明する。

40

【0045】

以下の有効な実施例はまた、本発明の生成物を与えられた動物が、コントロールグループとして用いられた市販の同様の脂肪結合製品と比べて、より少ない体重の増加を示したことを実証する。エネルギー効率（摂取された飼料のkcalあたりに増加した体重 (g)）は、吸収を減少させる生成物の有効性を明らかに示す値である。この場合、本発明の

50

製品は、コントロールに比べて、全飼料効率として測定された、全脂肪吸収を低下させた。本発明の製品の消費は、動物における糞便排泄量の有意な増加を示唆しなかった。同じことは、市販製品（キトサンS）のグループにはあてはまらない。キトサンS製品は、排泄量及び乾燥物の、非常に高い値を示した。この事実は、本発明の製品で起こったこととは異なり、キトサンS製品の場合では非選択的な効果が生じており、これは脂肪に特異的に結合するのではなく、さらに多くの栄養素にも結合することを示している。そのため、本発明の製品は、実施例で示したとおり、他の市販の脂肪バインダー製品によって示された反栄養的な効果を有さないという有利な点を有する。選択的な脂肪結合は、DAMM製品の消費の後で、飽和脂肪酸の排泄量が大幅に増加したため、興味深い。実施例1に記載した方法から得られた製品はまた、以降及び本明細書の全体において、「DAMM製品」又は「パッチ1」とも称される。結果は統計的に有意ではなかったが、一価不飽和脂肪酸の排泄量は増加し、一方、多価不飽和脂肪酸の排泄量は増加しなかった。

10

【0046】

本発明の製品の脂肪結合効果は、人体における *in vivo* でも実証された。人体における有効な臨床試験の結果は、3ヶ月の処理の後、0.7kgの体重減少及び胴囲の2cmの低下を示した。全体脂肪の0.82%の減少が、本製品を摂取した後に確認された。腹部での蓄積を低減させる体脂肪の再分配が確認された。これは、心臓血管のリスク要因、高血圧、及び糖尿病を低下させる点で潜在的な利益に関連する。これらの結果からすると、本製品は、プラセボグループが3ヶ月の処置の後、全体として1.4kgの増加を示したことを考慮すると、2.1kgの全体の体重の減量及び2cmの腹囲の低下を伴う、体重減少を促進することが想定できる。これらの結果は、体重及び腹囲の減少が、特有の制限的な食生活を用いずに、短い処理時間（3ヶ月）で得られたため、臨床的に関連している。

20

【0047】

食物の脂肪の吸収を選択的に低減する効果に加えて、本発明の組成物はまた、グルコースの代謝における生体機能性（biofunctionality、生物学的機能性ともいう）も示した。動物モデルにおける経口ブドウ糖負荷試験において、特に食後直後の時間における血中グルコースピークは、ネガティブコントロールに比べて減少を示し、ポジティブな市販のコントロールと同じオーダーを示した。

【0048】

本発明の製品はまた、種々の関連した有毒物質；アフラトキシンB1マイコトキシン、水銀、ポリ塩化ビフェニル類（PCB209）、及びフランを捕捉するので、解毒剤としても使用できることが示された。

30

【0049】

本組成物を得るための方法の別の反復は、同様の上述した生体機能性を維持した同質の製品をもたらした。そのため、本発明の方法及び製品の有利な点は、最終生成物の特性及び実用性が、甲殻類からの抽出されたキチン／キトサンで起こるような、原材料による影響を受けないことである。追加の及び関連した有利な点は本発明の方法により、一年を通して同じ材料が得られ、且つ、抽出された組成物が、甲殻類から抽出された組成物中には存在するニッケル、銅等の重金属の成分を含まないことである。

40

【0050】

別の実施形態において、多糖に富む組成物を得るための方法は、キチンの脱アセチル化度を調整するために、第二の熱アルカリ処理（thermoalkaline treatment）を含む。そのため、中和して第一の反応から得られた固体生成物を分離した後、この生成物は、40～80℃の温度、30～240分の反応時間で、25～50%の濃度のNaOHによる第二の処理に供される。特に、NaOHは、25%、37.5%、及び50%から選択される濃度である。反応温度は、40、60、及び80℃の範囲内であり、時間は30、120、135、及び240分の間から選択される。以下の有効な実施例（項目7）に示すとおり、この処理から得られる生成物は、これらが種々の関連した有毒物質；アフラトキシンB1マイコトキシン、水銀、ポリ塩化ビフェニル類（PCB209）、及びフランを捕捉するので

50

、解毒剤として有用である。

【0051】

別の実施形態において、この第2の熱アルカリ処理から得られる画分は、以下の有効な実施例（項目7）に示すとおり、免疫賦活剤として有用である。具体的には、*in vivo*での試験において添加した動物は、酸化活性を有する活性化した細胞の割合の増加により、細菌の感染に対してより高い保護能力を示した。免疫賦活剤として有用な具体的な組成物は、実施例の項目1で説明した方法により得られるとおり、30分間、25%のNaOH、及び40℃での出発生成分の加水分解により得られるものが挙げられる。

【0052】

本発明はまた、適切な量の薬学的又は獣医学的に許容される賦形剤と、有効量の本発明の組成物とを含む、医薬的及び／又は獣医的製品も提供する。この点において、医薬的製品は、タブレット、錠剤（丸薬、ピル）、カプセル、マイクロカプセル、顆粒、懸濁液、シロップ、乾燥粉末、液体製剤等の、経口投与される形態で調製され得る。本組成物の具体的な目的の観点からの賦形剤の選択及び処方のための最も適した方法は、製薬技術における当業者の範囲内である。経口投与が好適である。

【0053】

本明細書で用いられる用語「薬学的に許容できる」は、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、又は合理的なリスク／利益比に見合った他の問題若しくは合併症を起こさずに、医学的判断の範囲内で、対象（例えば、ヒト）の組織に接触させて使用するのに好適な化合物、材料、組成物、及び／又は剤形に関する。それぞれの担体、賦形剤等は、処方の他の成分と適合するという観点から、「許容される」必要もある。好適な担体、賦形剤等は、標準的な医薬品のテキストから見出され得る。同様に、用語「獣医学的に許容できる」は、非ヒト科の動物の組織に接触して使用するのに好適であることを意味する。

【0054】

本発明の組成物は、様々な食用製品、例えばミルク製品、ヨーグルト、凝乳（カード）、チーズ（例えば、クワルク、クリーム、プロセス、ソフト、及びハード）、発酵乳、粉乳、ミルクベースの発酵製品、アイスクリーム、発酵穀類ベースの製品、ミルクベースの粉末、飲料、ドレッシング、及びペットフード中にも含まれ得る。用語「食用製品」は、本明細書中で、その最も広い意味で用いられ、あらゆるタイプの製品、あらゆる存在形態を含み、これは動物により摂取され得るが、医薬的及び獣医学的製品は除かれる。他の食用製品の例としては、肉製品（例えば、レバーペースト、フランクフルトソーセージ及びサラミソーセージ、又はミートスプレッド）、チョコレートスプレッド、フィリング（fillings、例えば、トリュフ、クリーム）、及びフロスティング、チョコレート、菓子類（例えば、キャラメル、フォンダン、又はトフィー）、焼き菓子（ケーキ、ペストリー）、ソース及びスープ、フルーツジュース及びコーヒーホワイトナーが挙げられる。特に、好適な食用製品は、健康補助食品及び乳児用調整乳である。本発明の趣旨において、健康補助食品（サプリメントともいう）は、人体の健康に医薬的な効果を有する食物の抽出物として知られている、栄養補助食品も含む。動物の食物としての飼料も本発明の範囲内に含まれる。本発明の組成物は、他の食品製品の成分としても使用され得る。そのため、本発明の別の態様において、適量の食用成分と、本発明の組成物とを含む食用製品が提供される。好ましくは、本発明の組成物は健康補助食品（食用サプリメント）であり、これはどのように摂取されるか、又は好適な飲用液体、例えば水、ヨーグルト、牛乳、又はフルーツジュースと混ぜて摂取されるか、又は固体又は液体の食物と混ぜて摂取され得る。この場合、健康補助食品は、タブレット、錠剤（丸薬）、カプセル、粉末、粉体、懸濁液、小袋、トローチ、菓子（スイーツ）、バー（棒状の食品）、及びシロップの形態、並びに投与に対応した形態にすることができ、通常、単位服用量の形態にされ得る。好ましくは、本発明の組成物は、医薬製品を調製する通常の方法で製造される、カプセル中の粉体の形態、又は錠剤を形成する粉体の形態で投与される。別の好ましい実施形態において、本組成物は、飲用液体中に容易に溶解するボトルキャップ内に粉体の形態で存在する。本発明の組成物の好適な投与計画は、当業者によって確立され得る。本発明の組成物は、1日に

10

20

30

40

50

1度、1週間に1度、1週間に数日、又は1日に数回投与され得る。

【0055】

本発明の組成物は、食用、医薬、又は獣医製品として処方されることができ、これらにおいて、本組成物は唯一の活性成分であるか若しくは1以上の他の活性成分と混合され、及び／又は医薬的又は獣医学的に許容できる賦形剤（医薬又は獣医製品である場合）若しくは適切な添加剤（食用製品の場合）と混合される。

【0056】

したがって、投与形態がどのようなものであっても（すなわち、食用、医薬、又は獣医製品）、対象は本発明の製品の機能から利益を受けることができることが理解される。生物学的機能性は、本明細書で説明しており、脂肪結合効果、並びに、その結果、太り過ぎ、肥満、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、高血圧、及び心血管障害等の障害の予防及び／又は治療におけるこれらの使用を含む。生体機能性は、グルコース結合効果、解毒効果、及び免疫賦活効果でもある。

【0057】

以下の項目は、本発明の組成物を得る方法を詳細に説明し、同様に、この組成物の *in vitro*、及び動物及びヒトの *in vivo* アッセイによる脂肪結合効果等の特性も詳細に説明する。以下の実施例及び図面は、例示的な手段で提供され、本発明を限定する意図はない。得られた結果は、本発明の組成物が、他の市販の脂肪バインダー製品と比べて向上した特性を有することを実証している。

【0058】

他の定義がない限り、本明細書で用いられるすべての技術的及び科学的用語は、本発明の技術分野に属する当業者が通常理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載した方法及び材料又はこれらと同等のものは、本発明の実施に用いることができる。本明細書及び特許請求の範囲において、用語「含む」及びこの変形（活用形）は、他の技術的な特徴、添加剤、成分、又は工程を排除する意図を有さない。本発明の追加の目的、有利な点及び特徴は、実施例の記載に基づいて当業者にとって明らかになるか、または、本発明の実施により理解されるだろう。さらに、本発明は、本明細書に記載した具体的な且つ好ましい実施形態のすべての可能性のある組み合わせをカバーする。

【実施例】

【0059】

実施例1：多糖類に豊む組成物（「DAMM製品」又は「DAMM生成物」を得る方法）

出発原料として使用するサッカロマイセス・セレビスエ資源は、醸造プロセスにおいて8回の繰り返し使用のものに由来した。醸造プロセスの副生成物は、1mmの篩を用いて篩いかけ、醸造プロセスの混入物からS.セレビスエバイオマスを分離した。得られたS.セレビスエバイオマスをヒーター中で乾燥させ、製粉して粉体を得た。

【0060】

この酵母バイオマスの湿分を、湿分計測機IR Sartorius MA30で測定した。反応媒体を、反応器に蒸留水を投入し、150rpmでの攪拌を適応し、1MのNaOH水溶液を得るのに必要な量のNaOHを追加して調製し、次いで、この反応媒体を80℃まで加熱した。1/30の乾燥酵母バイオマス／反応媒体容量の比になるように、酵母バイオマスを計量した。酵母バイオマスを加熱した反応媒体に加え、反応を16時間持続させた。反応時間が経過したら、生成物を室温まで冷却させた。続いて、この反応性生物を不活性の容器に移した。連続的な遠心分離の処理条件を、120秒のスピン時間、及び2秒の排出時間になるように調整した。遠心分離を、遠心分離機（Centrifuge GEA Westfalia CTC 1（WhisperFuge（登録商標）））に容器から反応媒体を室温でプラスチックポンプ（流速3L／分）を用いてフィーディングして行った。この最初の遠心分離の後、得られた固体を容器中に回収し、蒸留水で中和した。最後に、混合物を攪拌し、且つ、そのpHを調整しながら、蒸留水を連続的に加えた。混合物の最終容量は、反応容量の約50％であり、pHは9～10であった。得られた中和した混合物を再度遠心分離し、上述した中和一遠

心分離工程をpHが7に達するまで繰り返した。5回の遠心分離／中和サイクルは、pHが7に達成するのに十分であった。pH7の最終生成物を、固形物が完全に分散するまで攪拌しながら蒸留水で洗浄した。この溶液の最終容量は、反応容量の約25％であった。得られた反応物を再度、上述した室温及び3L／分の流速で遠心分離した。上記の工程で得られた生成物を、Eppendorf centrifuge 5804Rを用いる非連続性の遠心分離により濃縮した。最後に、得られた生成物を以下の処理条件及びスプレードライヤー仕様によりスプレードライした：噴霧用チャンバーのサイズ＝φ1200 x 745 mm；生成物と接触する材料＝ステンレス鋼AIS 316、表地：AISI 304；サイクロン＝φ300；回転速度＝24400 rpm；ロータリーパワー＝3.5 kWロータリー；最大風量（取込み）＝990 m³/h；流入空気の高温度＝250℃；空気流入バッテリーの最大電源＝27kw；液体流入のためのぜん動ポンプ：自動／手動速度。

10

【0061】

この実施例において上述した方法から得られた生成物は、以下の実施例において、「DAMM生成物」、「DAMM製品」、又は「バッチ1」とも示される。

【0062】

この方法を、NaOH濃度を1Mから0.25Mに変更して、パイロットスケールに拡大した。In vitro（インビトロ）脂肪結合試験を行い、拡大したスケールにおいて、本生成物の生体機能性の維持を評価し、良好な結果を得た。

【0063】

実施例2：生成物の特性評価

20

図1において、¹H-NMR分析は、パイロットスケールで得られたDAMM製品（下図）が実験スケールで前もって得られた生成物（上図、この生成物は、この図では「C60」と示される）と比べて、同じ官能基を表すことを示した。図2は、DAMM製品（図2A）及び純粋なキトサン（図2B）の回折図（X線）を示している。図3は、DAMM製品の外観を示している。

【0064】

化学的分析は、DAMM製品が、1：14：116のキトサン、キチン、及びβ-グルカンの比を有し、また、それぞれ40.32％、6.35％、及び0.24％の、炭素、水素、及び窒素の原子量の割合を有することを示した。この製品のpH3.5の蒸留水中での可溶性は、710mg／Lであった。

30

【0065】

実施例3：脂肪結合効果；in vitro選択性分析

脂肪への結合（「吸着」ともいう）及び脂肪の捕捉における選択性のGLC-MSによるアッセイを、以下の脂質を用いて行った：

- ・ オリーブ油 + コレステロール (25 mg コレステロール / 1 mL オリーブ油)
- ・ 綿実油
- ・ 魚油 + エライジン酸 (2.5 mg エライジン酸 / 1 ml 魚油)

【0066】

これらの脂肪を用い、他のものを用いない理由は、

- これらは脂質の複合的な混合物なので、多かれ少なかれ、異なるタイプの脂肪酸に対する親和力の情報が得られる。さらに、この状況は実際の摂取状況に近い。
- 魚油の使用は、ドコサヘキサエン酸（DHA）及びエイコサペンタエン酸（EPA）に対する親和度を試験する目的で、非常に興味深い。これらは、その重大な健康上の利益により、その固定化をさけることが望ましい。
- オリーブ油を用いるアッセイにおけるコレステロールの導入は、動物資源からの最も有害な脂肪の1つの結合能の情報を提供する、
- これらの製品を用いて、心血管の健康のために多かれ少なかれ、有利か又は有害である、全16種の脂肪酸の捕捉親和度を評価する。

40

【0067】

試験した「脂肪バインダー」製品は、DAMM製品、82％の脱アセチル化度を有する

50

Primex社製（「Chitoclear」、アイスランド）（「Qs Primex」）の市販のキトサン、及びLaminaria社製の市販のグルカン（Laminaria digitata Sigma、L9634）であった。

【0068】

用いた手順は以下であった。それぞれの試験される脂肪バインダー製品において、pH 2の12 mL溶液（w/v）を、0.5 MのHClを用いて調製した。3 gの脂質をこの溶液に加え、37℃、300 rpmで3時間攪拌した。その後、この溶液のpHを0.1 MのNaOHを用いて最初にpH 6.2まで上げ、次いで最大のpH 6.5まで上げて、37℃でかき混ぜながら2.5時間保持した。次いで、この溶液を37℃で、2000 gで遠心分離し、製品に結合（「吸着」ともいう）していない脂肪を分離した。結合していない脂肪を、水相を吸引しないように気をつけながらピペットを用いて除いた。この溶液を0.5 MのHClを用いて酸性化し、脂肪バインダー製品を可溶化し、できるだけ多くの脂肪を遊離させた。水性相を5 mLのヘキサンで3回抽出し、3つの有機抽出物を最後に合わせて、計量した容器中で40℃で蒸発させた。乾燥させた脂肪を最後に計量し、脂肪バインダーが結合できた脂肪の量を計量した。結果を表1に示す。

【0069】

【表1】

表1

オリーブ油 + コレステロール	結合した脂肪 %	結合した脂肪 mg / 100 mg
Qs Primex	29.4 ± 6.1	2015.8 ± 398.8
グルカン (Laminaria)	17.0 ± 5.7	1129.5 ± 374.8
DAMM 製品	24.1 ± 4.9	1615.6 ± 328.0
綿実油	結合した脂肪 %	結合した脂肪 mg / 100 mg
Qs Primex	11.3 ± 1.2	746.8 ± 82.7
グルカン (Laminaria)	13.8 ± 5.3	944.2 ± 359.5
DAMM 製品	17.3 ± 7.3	1161.2 ± 490.9
魚油 + エライジン酸	結合した脂肪 %	結合した脂肪 mg / 100 mg
Qs Primex	78.7 ± 8.4	5364.4 ± 613.5
グルカン (Laminaria)	12.9 ± 3.9	894.1 ± 268.5
DAMM 製品	14.9 ± 6.0	998.2 ± 409.0

【0070】

DAMM製品は、魚油+エライジン酸の場合、Qs Primexに比べて非常に低い脂肪結合能力を示す。この結果は、健康に有益な魚油の成分（DHA及びEPA）の固定化を防ぐことは有益であるため、非常に好適である。

【0071】

選択的な脂肪結合の試験において、最終的な改善値（%）が得られた。この値は、各脂肪酸の%を未処理のコントロールにより示される%で減ずることにより得られる。結果を表2、3、及び4に示す。符号は、各脂肪の健康又は毒性に応じて正又は負である。以下の表中、「tr」は微量（トレース）、unsat=不飽和；sat=飽和；monounsat = 一価不飽和；polyunsat=多価不飽和を示す。

【0072】

【表 2】

表 2

オリーブ油 + コレステ ロール	ミリスチン酸 (sat)	パルミチン酸 (sat)	パルミトレイン酸 (monounsat)	ステアリン酸(sat)	オレイン酸 (monounsat)	エライジン酸 (unsat トランス)	リノール酸 (Polyunsat 必須)	リノレン酸 (polyunsat)	エイコサン酸 (sat)	コレステロール	改善 (%)
処理なしのコントロール	tr	14	1.4	4.5	74.3	-	2.6	0.2	-	3.5	
Qs Primex	tr	12.3	0.9	4.4	77.4	-	1.7	0.3	-	2.8	2.1
DAMM 製品	tr	9.5	1.2	2.2	81.9	-	2.4	-	-	3.1	14.2

10

【0073】

【表 3】

表 3

綿実油	ミリスチン酸	パルミトレイン酸	パルミチン酸	リノレン酸のファ ミリー (Fam Linolenic)	リノール酸 (polyunsat)	オレイン酸	ステアリン酸	改善 (%)
処理なしのコントロール	0.7	0.5	22	0.2	49.8	23.5	3.3	
Qs Primex	0.3	2.4	25.5	0.6	47.9	21.0	2.2	-4.1
DAMM 製品	0.7	0.6	20.5	tr	55.0	21.7	3.4	4.3

20

【0074】

【表 4】

表 4

魚油 + エライ ジン酸	ミリスチン酸	パルミトレイン酸	パルミチン酸	リノール酸	エライジン酸	オレイン酸	ステアリン酸	リノレン酸 (polyunsat)	オクタデカテトラエン酸 (polyunsat)	エイコサペンタエン酸 (polyunsat)	アラキドン酸 (polyunsat)	ドコサヘキサエン酸 (polyunsat)	DHA ファミリー (Fam DHA) (polyunsat)	改善 (%)
処理なしのコントロール	8.2	13.7	17.1	0.2	4.2	9.7	4.9	1.0	4.1	14.1	1.9	18.4	2.4	
Qs Primex	11	16.5	21.7	0.2	3.6	10.1	5.1	0.5	4.1	13.7	0.9	7.8	4.9	-3.2
DAMM 製品	9.4	14.9	19.2	0.1	2.6	9.2	2.3	0.8	4.1	15.9	1.9	17.1	2.4	1.8

30

40

【0075】

摂取の（及びそのため食習慣の）脂質プロファイルに関するより実質的な改善を伴う製

50

品は、D A M M製品である。

【0076】

実施例4：脂肪吸着効果；in vivo 動物アッセイ

4.1 In vivo 動物アッセイ

動物試験を行い、選択的脂肪結合能を評価した。動物モデルは、メスのDunkin Hartley モルモットから選択した。これは、この動物モデルが、特にHDL、LDL、及びVLDL コレステロールの場合に、ヒトのプロファイルと非常によく似た脂質代謝プロファイル を有するためである。モルモットは、5～6週齢で、300～400gの体重であった。動物をそれぞれn=8で異なるグループに分けた：

- セルロース（脂肪結合能を有さない製品）を用いるネガティブコントロールのグループ
- ；
- オーツブランSantiveri（登録商標、「Crusca di Avena」、可溶性繊維；脂肪吸収を減らす能力が想定される）を含むポジティブグループ；
- キトサンS製品（低分子量、50-1,000 kDa、低粘度、最少DG70%、Primex、アイスランド）を用いるグループ；
- キトサンL製品（高分子量、500-5,000 kDa、最少DG 70%、Primex、アイスランド）を用いるグループ。

【0077】

アッセイを、7日間の順化及び28日の試験を含む35日間で行った。動物を個々のオープンケージに入れ、水及び飼料を自由に摂取できる条件で、12時間の明／暗サイクルに供した。観察の差異を最大化するために、特注の高カロリー食を、単糖及び脂肪に富む飼料に加えた（4.7 kcal対3.8 kcal）。試験されるそれぞれの製品（セルロース／Santiveri（登録商標）／DAMM製品／キトサンS／キトサンL）の12%の追加のために、基本飼料を用い、それぞれの試験製品の可能性のある効果を最大化した。結果を表5に示す。

【0078】

【表5】

表5

	セルロース		Santiveri®		キトサン S		キトサン L		DAMM 製品	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
初期重量 (g)	401.4	19.8	407.3	23.3	406.8	15.0	400.3	16.0	397.2	18.4
最終重量 (g)	557.7	29.9 BC	570.8	47.0 C	510.2	55.7 B	430.9	42.8 A	515.0	40.7 B
重量増加 (g)	156.3	24.9 C	163.5	29.6 C	103.4	45.1 B	30.6	39.8 A	117.9	32.3 B
効率 (g/100 g)	21.5	2.6 CD	23.1	3.3 D	14.4	5.3 B	4.6	5.4 A	17.1	4.2 BC
効率 (g/100 kcal)	5.2	0.6 C	5.3	0.7 C	3.5	1.3 B	1.1	1.3 A	4.2	1 BC

【0079】

飼料効率(g/100g)は、摂取された飼料100g当たりの動物の重量（体重）増加（g）である。飼料効率（g/100 kcal）は、摂取された100kcal当たりの動物の体重増加（g）である。結果の比較を、グループの横断的解析を通して行った。用いた統計検定は、ダンカンの多重比較($p \leq 0.05$)であった。異なる文字で示される例は、統計的に有意な差を示す。

【0080】

表5から確認されたとおり、キトサンL製品の重量増加及び効率（下線の結果）は、非常に高く、有毒性に近い。キトサンLは、動物に関連する腸の問題及び下痢を引き起こした。そのため、キトサンLは、反栄養的で望ましくない効果をもたらすことができる。この事実は、解析におけるこのグループの存在が結果をマスクすることを示す。したがって、キトサンLグループを統計的解析から除くことを決定した。

【0081】

表5にまとめられた結果は、DAMM製品を与えられた動物が、コントロールグループであるSantiveri（登録商標）及びセルロースと比べてより少ない重量増加を示したことを示す。エネルギー効率（摂取された飼料のkcal当たりの増量(g)）は、吸収の減少における製品の有効性を明確に示す値である。kcal単位の値は、これらの組成が原因で、飼料間の可能性のある違いを無視してしまう恐れがある。そのため、DAMM製品は、セルロース及びポジティブコントロールと比較して、総飼料効率（摂取kcal当たりの増加した体重(g)）として測定された総脂肪吸収を低下させた。キトサンSは、DAMMよりも大きい減少を示すが、DAMM製品は数値においてもっとも小さい偏差を示す。Santiveri（登録商標）及びネガティブコントロールも同様の性能が確認され得る。

【0082】

4.2. 糞便の解析

続いて、本製品の脂肪吸収を低下させる能力として認められる、糞便の解析を行い、1又は別の脂肪に優先的に結合する能力を明らかにする。試験される値は以下である：

- 糞便の生産：作用機構を及び消費者の潜在的な不満点を推測するのに有益である
- 見かけの吸収：消費された100gの乾燥飼料当たりの吸収された乾燥物のグラム（g）として計算される
- 総排泄量：消費された100gの乾燥飼料当たりの排泄された乾燥物のグラム（g）として計算される
- 糞便中の脂肪酸の解析：脂肪酸の濃度及び試験の違う週の間には排出された量として計算される。

【0083】

結果の比較を、グループの横断的解析を通して行った。用いた統計検定は、ダンカンの多重比較($p \leq 0.05$)であった。排泄量の場合、1匹のモルモット及び1日(n=8)当たりの排泄された新鮮な糞便のグラム（g）として結果を表し、乾燥物の場合、1匹のモルモット及び1日(n=8)当たりの糞便の乾燥質量のグラム（g）として結果を表す。結果を表6に示す。

【0084】

【表6】

表6：異なる文字で示されるサンプルは、統計的に有意な差を示す。

		排泄量			% 湿分			乾燥物		
週	製品	平均	SD		平均	SD		平均	SD	
0	セルロース	26.8	6.2		60.2	8.1		10.3	1.5	
	Santiveri®	26.1	9.2		59.5	10.2		9.9	2.2	
	キトサン S	28.2	9.9		58.5	11.2		10.9	2.0	
	DAMM 製品	26.0	8.3		57.3	16.6		10.3	2.4	
1	セルロース	7.2	2.7	AB	56.4	6.4		3.0	0.9	AB
	Santiveri®	6.1	1.8	A	59.9	15.6		2.3	0.7	A
	キトサン S	14.2	4.4	B	59.0	5.8		5.9	2.1	C
	DAMM 製品	8.2	2.0	AB	58.1	12.8		3.3	0.6	AB
4	セルロース	7.6	3.1	A	70.4	3.8	A	2.2	0.9	A
	Santiveri®	5.8	2.2	A	73.1	4.8	A	1.5	0.4	A
	キトサン S	17.5	3.9	B	53.3	5.3	C	8.1	1.6	B
	DAMM 製品	10.4	2.3	A	74.0	6.1	A	2.7	0.7	A

【0085】

DAMM製品の消費は、動物の糞便排泄量に大幅な増加を示さなかった。この結果から仮に人体の消費を推定すると、この点において不満点は存在しないことを意味する。排泄物が良好な外観を有した点も特筆される。キトサンSグループ（表6）においては、同じことは言えない。

【0086】

週では、どのケースであっても統計的有意差は見られなかった。第1週目で、「排泄量」において、DAMM製品は他のいずれのグループとも差がなかった。DAMM製品は、キトサンSグループに対して、乾燥物の値において差を示さなかった。第4週目で、DAMMグループ、セルロースグループ、及びSantiveri（登録商標）グループは、キトサングループと著しく異なった。そのため、DAMM製品を含む飼料の消費は、僅かに排泄物量が増加するが、キトサンS製品と異なり、これは統計的に有意な差ではなかった。キトサンS製品の場合と異なり、糞便の排泄量が常に標準のパラメーターの範囲内で生じている場合、糞便の排泄量の増加が欠点ではないため、これは非常に興味深い。

10

【0087】

キトサンS製品は、排泄量及び乾燥物の非常に高い値に達する。この事実は、DAMM製品で生じたことと異なり、物理的な方法による作用ではない非選択的な効果があることを示している：キトサンS製品は脂肪に特異的に結合せずに、より多くの栄養に吸着する。結果として、排泄量が増加し、重量増加が低下する。キトサングループにより得られる乾燥物の高い値を考慮すると、その生体機能性は、食塊の粘度の増加に起因する。これは、脂肪の除去の向上及び吸収の可能性の低下を含む物理的方法である。結果として、キトサンSは、反栄養的效果をもたらし得る、特異的な脂肪結合能力を有さない製品である。

20

【0088】

ネガティブコントロール（セルロース）、市販のグループ（Santiveri（登録商標））、及びDAMMグループの乾燥物の値が同様（有意な差異ではない）であり、且つ一方、示されたとおり、重量増加の値が異なることから、脂肪の排泄量が、DAMM製品において本当により高いことが推測され得る。キトサンSグループの値は、物理的方法の排泄量の非選択的な結果であることがもう一度確認される。

【0089】

4.3. 糞便の脂質組成

最後に、動物の糞便の脂質組成を解析し、特定の脂質の排泄量の程度に関する違いがあるかどうかを評価した。統計検定は、ダンカンの多重比較($p \leq 0.05$)を用いた。

30

【0090】

0週目で、グループ間に値が無かったので、すべての状態及びいずれのグループで、同じ基準（ベースライン）であった。4週目での脂肪酸解析を表7（結果を糞便のg当たりの脂肪酸のmgで表す）及び表8（結果を動物及び1日当たりの排泄された脂肪酸のmgとして表す）に示す。

【0091】

【表 7】

表 7：糞便の g 当たりの脂肪酸の mg で表された結果

	セルロース			Santiveri ®			キトサン S			DAMM 製品		
	平均	SD		平均	SD		平均	SD		平均	SD	
C12:0	7.91	2.35	A	10.18	2.22	A	30.04	5.58	B	10.72	2.29	A
C14:0	9.95	1.57	A	14.23	3.03	B	19.34	2.00	C	14.90	2.42	B
C16:0	57.71	8.42	A	86.38	23.87	A	48.48	2.59	A	85.46	17.84	B
C18:0	108.40	20.65	B	137.76	13.79	C	44.88	3.19	A	152.30	23.32	C
C20:0	2.82	0.33	B	3.23	0.16	C	1.54	0.12	A	3.13	0.33	C
C22:0	1.70	0.20	B	1.89	0.09	B	1.05	0.29	A	1.64	0.63	B
C24:0	1.16	0.19	B	1.34	0.09	C	0.59	0.05	A	1.37	0.20	C
TSFA	189.66	25.49	B	255.02	32.73	C	145.92	9.69	A	269.53	36.47	C
C16:1n7	0.16	0.06	A	0.21	0.04	AB	1.11	0.21	C	0.35	0.05	B
C18:1n9	10.18	3.10	A	13.59	2.14	A	53.35	8.27	B	12.68	2.23	A
C18:1n7	1.11	0.45	A	1.32	0.22	A	3.51	0.43	B	1.45	0.37	A
C20:1n9	0.39	0.10	A	0.55	0.09	C	0.68	0.06	D	0.48	0.05	B
MUFA	11.68	3.62	A	15.46	2.41	A	57.64	8.75	B	14.61	2.62	A
C18:2n6	10.65	3.97	A	12.08	2.14	A	71.83	13.30	B	10.64	3.33	A
C18:3n3	0.26	0.05	A	0.29	0.04	A	0.92	0.14	B	0.27	0.04	A
PUFA	10.91	4.02	A	12.37	2.18	A	72.75	13.44	B	10.90	3.37	A
TUFA	22.59	7.63	A	27.83	4.57	A	130.39	21.84	B	25.51	5.82	A
合計	212.25	28.24	A	282.85	34.61	B	276.31	30.02	B	295.04	35.34	BC
TUFA/TSFA	0.12	0.04	A	0.11	0.02	A	0.89	0.11	B	0.10	0.03	A
n6/n3	40.45	7.97	A	41.58	3.15	A	77.95	3.11	B	39.37	8.18	A

C18:1 トランス(トランス異性体の合計)

TSFA: 飽和脂肪酸の合計 (saturated fatty acids)

MUFA: 一価不飽和脂肪酸の合計 (monounsaturated fatty acids)(トランスを含まない)

PUFA: 多価不飽和脂肪酸の合計 (polyunsaturated fatty acids) (トランスを含まない)

TUFA: 不飽和脂肪酸の合計 (unsaturated fatty acids)

【0092】

ネガティブコントロール（セルロース）と比較して、DAMM製品は、健康に潜在的に悪影響を有する脂肪酸（飽和）のより高い値を示した。対照的に、多くの一価不飽和及び多価不飽和脂肪酸は、有意な違いを示さなかった。

【0093】

10

20

30

40

【表 8】

表 8：動物及び1日当たりの排泄された脂肪酸のmgとして表された結果

	セルロース			Santiveri®			キトサン S			DAMM 製品		
	平均	SD		平均	SD		平均	SD		平均	SD	
C12:0	17.80	8.46	A	15.40	5.61	A	245.82	67.91	B	27.94	7.17	A
C14:0	22.20	9.24	A	21.40	7.33	A	157.52	38.08	B	39.31	10.56	A
C16:0	128.40	56.72	A	127.78	42.73	A	391.61	79.13	C	225.05	58.67	B
C18:0	231.92	80.81	A	208.71	75.87	A	359.89	62.10	B	411.63	145.92	B
			A									
C20:0	6.13	2.13	B	4.80	1.31	A	12.38	2.45	C	8.25	1.79	B
C22:0	3.68	1.28	A	2.80	0.68	A	8.49	2.98	B	4.20	1.71	A
C24:0	2.50	0.83	A	1.98	0.46	A	4.74	0.83	C	3.62	0.87	B
TSFA	390.43	143.02	A	361.47	115.72	A	1022.93	209.17	C	680.69	199.30	B
C16:1n7	0.37	0.19	A	0.31	0.11	A	9.07	2.56	B	0.92	0.14	A
C18:1n9	22.82	10.90	A	20.40	6.76	A	435.13	113.54	B	33.12	7.58	A
C18:1n7	2.43	1.19	A	2.02	0.76	A	28.52	6.75	B	3.76	0.91	A
C20:1n9	0.84	0.31	A	0.82	0.25	A	5.54	1.21	B	1.28	0.37	A
MUFA	26.08	12.35	A	23.24	7.75	A	469.94	121.64	B	38.16	8.79	A
C18:2n6	23.74	12.24	A	18.19	6.31	A	589.90	168.87	B	27.90	10.62	A
C18:3n3	0.56	0.21	A	0.43	0.13	A	7.52	2.05	B	0.70	0.18	A
PUFA	24.31	12.44	A	18.62	6.44	A	597.41	170.91	B	28.60	10.76	A
TUFA	50.39	24.74	A	41.86	14.18	A	1067.36	291.36	B	66.76	19.17	A
合計	440.82	161.82	A	403.33	128.21	A	2090.28	496.10	B	747.45	209.40	A
TUFA/TSF												
A	0.12	0.04	A	0.11	0.02	A	0.89	0.11	B	0.10	0.03	A
n6/n3	40.45	7.97	A	41.58	3.15	A	77.95	3.11	B	39.37	8.18	A

【0094】

飽和脂肪酸の排泄量は、DAMM製品の消費の後で大幅に増加した。結果は統計的に有意ではなかったが、一価不飽和脂肪酸の排泄量は増加し、一方、多価不飽和脂肪酸の排泄量は増加しなかった。

【0095】

この結果から、DAMM製品は飽和脂肪酸（C14:0 / C16:0 / C18:0 / C20:0 / C22:0、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸）のより高い排泄量を示す。これは、飽和脂肪酸の吸収の低下は、食生活の栄養的プロファイルの改善を示すので、有利である。この低下の結果として、飽和脂肪酸の合計(TSFA)の吸収において、統計的に有意な低下が確認される。

【0096】

リノール酸(C18:2n6)及びα-リノレン酸(C18:3n3)について、DAMMグループにおいて統計的に有意な増加は確認されなかった。これは、リノール酸及びリノレン酸が必須の脂肪酸であり、健康のために重要であるので、選択的な脂肪結合製品としての別の興味深い生体機能性を示している。確認された値を強調するために、多価不飽和及び不飽和脂肪酸の

合計において、排泄量が増加していないことをこの結果は示している。結果として、脂肪酸の全吸収の正味の低下が起こっており、そのため、DAMM製品は脂肪酸吸収を低下させるが、健康のために有益な脂肪酸の排泄量を増加させない製品である。

【0097】

Santiveri（登録商標）製品は、糞便1g当たりの脂肪酸（mg）として表される値の統計的な結果から分るとおり、選択性に関して、DAMM製品と同様に良好な性能を有する。しかしながら、毎日の排泄量の程度において、この挙動は望まれるものではない：これらの排泄量の値は低く、これは飼料効率及び重量増加の値において確認される効果がないことを意味する。キトサンS製品は、脂肪酸解析において、Santiveri（登録商標）製品において示されたものと反対の結果を示している：脂肪結合能力は非選択的であり、これは、その高い糞便製造により、大量の排泄される脂肪を引き起こす。

10

【0098】

実施例5. 脂肪結合効果：人体における機能性の臨床試験

この試験は、並列グループを用いて行う、臨床的、無作為化、二重盲検、プラセボ対照試験であり、重量コントロールにおける健康補充食品としてのDAMM製品の効能及び安全性を調べた。サンプルサイズとして、60の患者を2つの30の患者の並列試験グループに分け、1つのグループには水に溶解させた活性物質（DAMM製品）を与え、一方、残りのグループには水に溶解させたプラセボを与えた。患者は、肥満度指数が太り過ぎと肥満の間（25-34.99 Kg/m²）を示し、摂食障害がなく、さらに、前3カ月に低カロリー食に従っていない、または従っていなかった成人であった。こうした要求のため、患者の募集を簡単ではなかったが、患者は最初の診察としてきた者でなくてはならず、もしそうでないと、その者はきつと食事又はいくつかのタイプの食事の発明を処方されなかったであろう。募集の難しさは、多施設試験という結果になった。臨床プロトコルは、バルセロナの病院クリニックの倫理委員会、マドリッドの臨床診断センター、及びマドリッドの肥満のヨーロッパ医学研究所によって承認された。

20

【0099】

目的は、DAMM製品の消費が人々の体重（究極的にはBMI）の改善を実証することであった。患者の進展の適切な追跡調査を行うために、試験を12週間（84日）にわたって行い、42日目に中間評価を行った。この試験は60人の患者（11人の男性及び49人の女性、平均年齢は48歳（22～65歳））を採用した。彼らの44人が試験を完結した。試験を放棄した患者のうち、彼らの多くは個人的な理由であった。健康的な地中海式食生活（eucaloric diet）としての、一般的に推奨される食事が患者に提供され、彼らは試験フェーズが始まる前の1月間この食生活に従った。この食生活中で引き起こされる変化は何もなかった。ANOVA解析により、患者の人口学特性又は臨床基礎特性に統計学的に有意な差は見られなかった。そのため、この試験の最後に得られる結果は、患者分布の影響を受けていない製品の効果の結果である。

30

【0100】

DAMM製品は、液体ボトルに適用可能なスクリュウキャップ中に存在した。試験に供された製品（スクリュウキャップ当たりの組成）は、以下であった。

- 試験製品：1gのDAMM製品+35mgの「caramelina」着色剤（E-102/124/132 16%）
- コントロール：プラセボ：1gの微結晶セルロース + 17.5 mgの着色剤（E-102/124/132 16%）

40

【0101】

各被験者（対象）は、500mLの水のボトル中に2カップを溶かして昼食と共に摂取し、また、500mLの水のボトル中に1カップを溶解させて夕食と共に摂取した。この手順を毎日、12週間の間繰り返した。各患者は、試験フェーズ中に、試験センターに3回訪問した：0時間（訪問0又はベースライン、基準）、中間訪問、及び試験の終了時の訪問。それぞれの訪問において、体重測定、身長測定、身体計測（胴囲及び腰囲）、体脂肪率（二重エネルギーX線吸収測定により測定）及び血液検査の種々のパラメーターを検査した。

50

【0102】

【表9】

表9. 体重の結果(kg)。SD = 標準偏差; MSE = 標準誤差

試験グループ				
	平均	N	SD	MSE
ベースライン	78.6737	19	15.15724	3.47731
終了時	78.0105	19	14.83925	3.40436
	平均	SD	MSE	p
ベースライン - 終了時	0.66316	1.20149	0.27564	0.027
プラセボ				
	平均	N	SD	MSE
ベースライン	76.1909	22	8.61847	1.83746
終了時	77.5955	22	8.84746	1.88629
	平均	SD	MSE	p
ベースライン - 終了時	-1.40455	1.51986	0.32404	0.000

10

20

【0103】

グループ内の比較：DAMM製品を3カ月間摂取した後で、0.7kgの体重の低下を示した。ベースラインと終了時の値の間の差異は、 $p=0.027$ で統計的に有意であった。プラセボグループ内において、統計的に有意な差異は存在したが、体重増加であり、 $p=0.000$ であった。

【0104】

グループ間の比較：DAMM製品を摂取した患者とプラセボを摂取した患者との間の体重の比較により、これらの差異が $p=0.000$ で統計的に有意であることが確認された。

30

【0105】

【表 10】

表 10. 胴囲の結果 (cm)。SD =標準偏差; MSE =標準誤差

試験グループ				
	平均	N	SD	MSE
ベースライン	96.8684	19	10.07037	2.31030
終了時	94.8000	19	11.30555	2.59367
	平均	SD	MSE	p
ベースライン - 終了時	2.06842	3.27703	0.75180	0.013
プラセボ				
	平均	N	SD	MSE
ベースライン	99.7000	20	7.77208	1.73789
終了時	99.9750	20	7.77221	1.73792
	平均	SD	MSE	p
ベースライン - 終了時	-0.27500	2.39228	0.53493	0.613

10

20

【0106】

グループ内比較：DAMM製品を摂取した後で、胴囲の減少を確認した。ベースライン及び終了時の値の間の胴囲における2cmの減少の差異は、 $p=0.013$ で統計的に有意であった。プラセボグループにおいて、胴囲の統計的に有意な差は認められなかった。

【0107】

グループ間の比較：DAMM製品と摂取した患者とプラセボを摂取した患者との間の胴囲における差異の比較により、これらの差異は、 $p=0.015$ で統計的に有意であることが確認された。

30

【0108】

【表 1 1】

表 11. 体脂肪 (%)の結果. SD =標準偏差; MSE =標準誤差

試験グループ				
	平均	N	SD	MSE
ベースライン	42.5105	19	7.46636	1.71290
終了時	41.6947	19	7.91345	1.81547
	平均	SD	MSE	p
ベースライン - 終了時	0.81579	1.82521	0.41873	0.067
プラセボ				
	平均	N	SD	MSE
ベースライン	40.9773	22	7.15960	1.52643
終了時	40.9727	22	7.06050	1.50530
	平均	SD	MSE	p
ベースライン - 終了時	0.0045	1.31529	0.28042	0.987

【0109】

総体脂肪の0.82%の減少が、DAMM製品を摂取した後で確認された。この減少は、 $p=0.067$ で統計的に有意な傾向を有した。プラセボグループにおいて、体脂肪の統計的に有意な差は認められなかった。

【0110】

DAMM製品のグループにおいて、アンドロイド（android、上半身）の脂肪の1%の減少が確認されたが、この差異は、 $p=0.101$ で統計的に有意ではなかった。この製品はまた、体脂肪率を減少させ、すなわち、0.8%の体脂肪の減少及び約1%の上半身の脂肪の減少をもたらした。これらの結果は、サンプルサイズがグループ間の差異を検出するには十分に大きくなかったため、統計的に有意ではなかったが、臨床学的には重要である。体脂肪及び上半身の脂肪の割合の減少は、体脂肪の再分配に相当し、腹部領域での蓄積を低下させる。これは、心血管障害、高血圧及び糖尿病のリスク要因を減少させる潜在的な利益に関連する。おそらく、多いN数であれば、統計的に有意な差が確認されたであろう。DAMM製品又はプラセボの摂取後で、腰の周囲長及びガイノイド（gynoid、下半身）の脂肪に統計学的に有意な差異は確認されなかった。これらの結果により、DAMM製品が、3カ月の処置で、約2.1kgの重量の低下及び2cmの胴囲の低下を伴う、体重の低下を促進することが考察される。これらの結果は、体重及び胴囲の減少の結果が特定の食事制限無しで、短期間の処置（3月）で得られたため、臨床学的に適切である。患者の処方された本製品についての調査において、彼らは本製品の味及び良い香りに満足していた。

【0111】

実施例6. グルコース結合効果：動物モデルにおける経口ブドウ糖負荷試験

「経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）」の試験は、ブドウ糖摂取に応答する所定の化合物の効果の解析を可能にする。「経口」の用語にもかかわらず、この試験は、本件の場合のように、胃内投与でも行うことができる。プロトコルは以下であった。250～300gの24匹の雄のSprague-Dawleyラットを1晩（14～16時間）絶食させた。食物を除去し、動物を清潔なケージの中に再配置して、排泄物の摂取を防いだ。すべての試験中、水は自由に供給された。絶食させた後の試験の日、動物の体重を測定した。試験に供される化合物を、最終的な胃に1mLの処置／動物200g（すなわち、2gのブドウ糖／動物1

kg)を投与するように選択されたブドウ糖の投与量を、所定の用量で混合した。グァーガムを、ブドウ糖バインダー (glucobinder) として認められているため、ポジティブコントロールとして用いた。試験グループは以下であった：

- ポジティブコントロール：グァーガム (6 mg/ml) + グルコース (400 mg/mL、動物200g当たり1mL)；n = 8
- ネガティブコントロール：グルコース (400 mg/ml、動物200g当たり1mL)；n = 8
- DAMMグループ：DAMM製品 (6 mg/ml) + グルコース (400 mg/mL、動物200g当たり1mL)；n = 8

【0112】

一度溶液が調製されると、すべての動物の基礎血糖値 (時間0に相当する) は、Glucometer (登録商標) Eliteを用いて測定した。動物の各グループに対する胃内投与により種々の処置 (トリートメント) を投与した。各グループの最初の動物に対する投与の後で、タイマーを開始した。グルコースレベルを、15、30、60、及び120分の時間で測定した。血糖の最後の測定の後で、倫理委員会の手順に従って、動物への給餌を再開した。

【0113】

【表12】

表 12. mg/dl $\pm$ S.D.単位の媒体として表される結果；AUC は曲線化の増分面積；異なる文字と同じ行の結果は、ダンカンの多重比較(p<0.05)検定に基づく有意な差を示している。

	ネガティブコントロール	ポジティブコントロール (グァーガム)	DAMM 製品
動物重量 (g)	370.8 $\pm$ 24.6	363.2 $\pm$ 19.8	366.1 $\pm$ 20.7
時間 (分)			
0	92.89 $\pm$ 9.21	89.2 $\pm$ 11.57	87.9 $\pm$ 7.67
15	132.11 $\pm$ 16.12 A	115.2 $\pm$ 8.53 B	120.3 $\pm$ 13.34 AB
30	136.89 $\pm$ 29.67	122 $\pm$ 13.3	126.6 $\pm$ 15.69
60	137.22 $\pm$ 21.76	128 $\pm$ 10.9	132.2 $\pm$ 6.54
120	128.22 $\pm$ 15.52	119.5 $\pm$ 10.48	116 $\pm$ 21.15
15 分の増加	39.22 $\pm$ 19.61	26 $\pm$ 16.76	32.4 $\pm$ 12.71
30 分の増加	44 $\pm$ 30.83	32.8 $\pm$ 22.72	38.7 $\pm$ 16.28
60 分の増加	44.33 $\pm$ 24.28	38.8 $\pm$ 15.08	44.3 $\pm$ 13.28
120 分の増加	35.33 $\pm$ 15.58	30.3 $\pm$ 16.68	28.1 $\pm$ 24.32
30 分の AUC	918 $\pm$ 471	636 $\pm$ 415	776 $\pm$ 296
60 分の AUC	2243 $\pm$ 1245	1710 $\pm$ 931	2021 $\pm$ 632
120 分の AUC	4633 $\pm$ 2135	3783 $\pm$ 1804	4229 $\pm$ 1358

【0114】

最初の時点でのキネティック値において確認された値の差異は、統計的な有意性を示す：これは、前の点 (ベースライン) に対して糖濃度の増加がより際立っているピークであり、グループ間の差異を検出する点よりも興味深い点である。この点において、食後の時間は、グルコースピークがより大きい増加を示すときであり、そのため健康の主要なリスクを表す。統計的な有意性を達成せずに、90分及び120分で、ポジティブコントロール及びDAMM製品のカーブの関連する位置において逆転が存在するのがはっきりと確認できる。

【0115】

DAMM製品は、グァーガムを含むポジティブコントロールに対してブドウ糖の減少におけ

るより大きい効果を示さないが、DAMM製品がブドウ糖レベルを制御できるので、満足のいく結果である。グァーガムが溶液の粘度を非常に顕著に増加させ、グルコースが苦しむ「機械的捕捉」が血液ピークの低下をもたらすので、DAMM製品はグァーガムに対して関連する優位性を有する。一方、DAMM製品は溶液の粘度を変化させず、食品技術において非常に意味のある事実を示している。この製品は、グルコースピークを低くするので糖尿病患者のために適しており、ピークをより長い時間位わたって維持するので、スポーツのために適している。

【0116】

実施例7. 解毒効果

種々の有毒物質に対するDAMM製品の封鎖力（隔離力）を分析した。DAMM製品を用いて開始する第2の熱アルカリ処理から得られた異なる分画を、これらの解毒能力のために試験した。各分画の名称は、前述した第2の熱アルカリ処理の具体的な処理条件を示している。すべての場合において、封鎖（隔離）された化合物の％は、以下の計算を用いて求めた：封鎖された化合物の％ = $100 (1 - X_{Fx} / X_{ref}) \times 100$ 。

【0117】

X_{Fx} は各フラクションxにおける試験化合物濃度であり、 X_{ref} は理論化合物濃度である。DAMM製品画分のmg当たりの封鎖化合物の量は、以下の式により計算された： $(X_{ref} - X_{Fx}) \times V_x / M_r = X \text{ ng (封鎖化合物) } / \text{ mg (DAMM製品画分)}$ 。

【0118】

V_x は画分の容積であり、 M_r は試験された化合物の分子量である。

【0119】

7.1. アンフラトキシンB1の分析

アンフラトキシンB1 (AFB1)は、アスペルギルス・フラバス及びアスペルギルス・パラジカス(*Aspergillus parasiticus*)等のアスペルギルス属の種により生産されるマイコトキシンのサブタイプである。これは、いくつかの食物の混入物であってもよい。AFB1の代謝は、最も強力な発がん物質の1つをもたらす。分析のために、各DAMM製品の画分のそれぞれを、蒸留水中に1 mg/mLの濃度で（それぞれ独立した試験として）試験管に分注した。0.9 mLのAFB1の標準溶液（0.9mgのAFB1）を加え、最終容を17.9mLとした。試験懸濁液中のAFB1の理論的な最終濃度は50.3 µg/mL (50.3 ppm)であった。コントロールとして、DAMM製品分画を加えていない3つの同一の試験管を準備した。混合物を、37℃で、300 rpmで攪拌しながら、3時間インキュベートした。その後、この製品を0.45 µmの孔径のシリンジを通して濾過した。封鎖されたAFB1を最後にHPLC - FDにより測定した。

【0120】

7.2. 水銀(Hg)の分析

画分のそれぞれを、蒸留水中に1 mg/mLの濃度（各画分に20mg、19mLの蒸留水を含む）で試験管に分注（2つの複製）した。次いで、1mLの水銀塩化物溶液(Hg 0.560 mg)を加え、試験溶液の最終容量を20mLにした。試験溶液のHgの理論的な最終濃度は28.00 µg/mL (28.00 ppm)であった。コントロールとして、DAMM製品分画を加えていない3つの同一の試験管を準備した。混合物を、37℃で、300 rpmで攪拌しながら、3時間インキュベートした。その後、この製品を0.45 µmの孔径のシリンジを通して濾過した。封鎖されたHgを最後に測定した。Hgの封鎖値は、表13に示すとおり、非常に良かった。

【0121】

7.3. ポリ塩化ビフェニル

化合物PCB 209（デカクロロビフェニル）を、環境中に見いだされるポリ塩化ビフェニル(PCB)のモデルとして用いた。これは最も豊富で、有害なものの1つである。画分のそれぞれを、ジクロロメタン中に1 mg/mLの濃度（各画分に10mg、10mLのジクロロメタンを含む）で試験管（2つの複製、n=2）に分注した。0.1mLのPCB209ストック溶液（55 µg PCB 209）を前述した溶液に加えた。試験溶液のPCB 209の理論的な最終濃度は5.5 µg/mLであった。コントロールとして、DAMM製品分画を加えていない3つの同一の試験管を準備した。

備した。混合物を、30℃で、300rpmで攪拌しながら、3時間インキュベートした。その後、この製品を0.45μmの孔径のシリンジを通して濾過した。封鎖されたPCB 209を最後に測定した。

【0122】

7.4. フラン

画分のそれぞれを、独立した実験として、ジクロロメタン中に1mg/mLの濃度（各画分に10mg、10mLのジクロロメタンを含む）で試験管に分注した。0.1mLのフランのストック溶液（55 μg フラン）を前述した溶液に加えた。試験溶液のフランの理論的な最終濃度は5.5 μg/mLであった。コントロールとして、DAMM製品分画を加えていない3つの同一の試験管を準備した。混合物を、30℃で、300rpmで攪拌しながら、3時間インキュベートした。その後、この製品を0.45μmの孔径のシリンジを通して濾過した。封鎖されたフランを最後に測定した。すべての有毒物質の結果を表13に示す。

10

【0123】

【表 1 3】

表 1 3

画分	% AFB1 の捕 捉	% Hg の捕 捉	% PCB 209 の捕捉	% フランの 捕捉	平均 (%)
DAMM 製品	12.4	55.4	16	25	19.3
画分 2 (30 分 80°C NaOH 50%)	17.7	30.3	0	14	10.3
画分 3 (120 分 80°C NaOH 50%)	20.9	50.3	17	5	16.3
画分 4 (240 分 80°C NaOH 50%)	18.1	18.1			
画分 5 (30 分 80°C NaOH 25%)	16	50.3	2	8	13.0 5
画分 6 (120 分 80°C NaOH 25%)	8.5	18.5			
画分 7 (240 分 80°C NaOH 25%)	22.9	29.1	9	10	12.5
画分 8 (30 分 40°C NaOH 50%)	13.8	33.8			
画分 9 (120 分 40°C NaOH 50%)	27.1	66.7	13	6	18.8
画分 10 (240 分 40°C NaOH 50%)	9.5	35.4			
画分 11 (30 分 40°C NaOH 25%)	15.3	32.2	22	11	15.4 2
画分 12 (120 分 40°C NaOH 25%)	0	38.0	20	6	13.1 0
画分 13 (240 分 40°C NaOH 25%)	0	28.3			
画分 14 (30 分 60°C NaOH 37.5%)	0	42.4			
画分 15 (135 分 60°C NaOH 37.5%)	6.7	31.1			
画分 16 (240 分 60°C NaOH 37.5%)	0.3	24.8			
画分 17 (135 分 80°C NaOH 37.5%)	0	22.8			
画分 18 (135 分 40°C NaOH 37.5%)	0	38.9			
画分 19 (135 分 60°C NaOH 50%)	2.1	26			
画分 20 (135 分 60°C NaOH 25%)	3.5	25.2			

【0 1 2 4】

表 1 3 に示すとおり、すべての有毒物質に対してすべての画分を試験したわけではない。この事実にもかかわらず、これらは特定の有毒物質に対して活性であり、有益であり得るので無視できない。例えば、画分 4 は AFB1 及び Hg に対して非常に良好であり、画分 8、10、15、19、及び 20 は AFB1 に対して活性であり、Hg に対して非常に良好であり、画分 12、13、14、17、及び 18 は AFB1 の捕捉は示さないが Hg の捕捉には非常に良好である。

【0 1 2 5】

7.6. 画分の生体利用効率

解毒効果に加えて、次なる点は、所望の使用：すなわち食物中に存在する有毒物質の吸収の阻害のための、これらの画分の適合性を確認することであった。この目的のために、これらが腸上皮による吸収される低い生体利用効率を有することを試験した。MIF（遊走

阻止因子) タンパク質の誘導によるCaco-2細胞モデル中のM細胞の分化に基づく方法を用いて、トランスウェルプレート中で評価を行った。

【0126】

M細胞の調製

Caco-2細胞をトランスウェルプレート上で培養した。細胞を14日間、37℃、5%CO₂ですべての分化まで培養した。成長している間、上清の0.3 μg/mLの濃度でMIFタンパク質を加えた際の250 Ω・cm²の値まで、経上皮抵抗 (TEER) をモニタリングした。5時間、37℃で、5% CO₂で培養した。

【0127】

DAMM製品画分のDTAF (ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン)ラベル化

最初に画分を微粉が得られるまで製粉した。20～25mgの粉末を1mLのホウ酸塩緩衝液 (pH9) 中に希釈した。この混合物を10分間、室温で超音波処理した。次いで、1mLのDTAF (1mg/mL) を加え、一晩、一定の攪拌下に保持した。最終溶液を、5mLのPBSを用いる連続的な洗浄と共に、4000rpmで10分間遠心分離した。種々のラベル化された画分をトランスウェルプレートの上部に加え、3時間培養した。

【0128】

蛍光光度モードのウェルスキヤニング520 (Em) -490 (Ex) により、測定を行った。各画分において、1/50及び1/100の希釈を用いた。分析を2回行い、平均値を求めた。各ケースにおいて、モデルの腸上皮中の画分の浸透の%を評価した。前述した捕捉の結果と共に、生体利用効率の結果を表14に示す。

【0129】

【表14】

表14

画分	平均の生体利用効率 (%)	平均の捕捉 (%)
DAMM 製品	7.20	19.3
画分 2 (30 分 80°C NaOH 50%)	58.24	10.3
画分 3 (120 分 80°C NaOH 50%)	55.02	16.3
画分 5 (30 分 80°C NaOH 25%)	47.25	13.05
画分 7 (240 分 80°C NaOH 25%)	51.07	12.5
画分 9 (120 分 40°C NaOH 50%)	0.15	18.8
画分 11 (30 分 40°C NaOH 25%)	62.53	15.42
画分 12 (120 分 40°C NaOH 25%)	46.25	13.10

【0130】

より多い捕捉を示す画分と、より少ない吸収を示す画分との間に、顕著な重複が見られた。これは、解毒の目的のために理想的である。

【0131】

実施例8. 免疫賦活剤の効果

一連の試験を行って本製品の免疫系の効果を測定した。

- 「ファージ試験」；ヘパリン化血液中の単球及び顆粒球の食作用活性の定量的測定
- 「バースト試験」：ヘパリン化血液中の単球及び顆粒球の酸化活性の測定。

【0132】

Wistarラットを2つのグループに分け、各1つのグループのn=8であり；1のグループは試験製品を用い、他のグループにはコントロールを用いた。試験製品は、25%のNaOHを用いて、40℃で30分間の加水分解により得られた前述した項目7の画分2であった

。3週間のアッセイを行った。ラットを12時間、自由に飲食できる明／暗サイクルに保持した。飼料の基準は同じであるが、試験される製品を用いて変更した。

- コントロールの食餌：標準的なラットの食餌 (Teklad Global Diet, 2014)；
- 試験の食餌：1.2gの試験製品を補った標準的なラットの食餌(Teklad Global Diet, 2014)。免疫賦活剤の投与量は、試験製品100 mg / 動物 1kg (30 mg / 日)であった。

【0133】

試験の間、各グループにおいて、免疫系の状態を示す値と共に、動物の体重及び消費された飼料を定期的にモニターした。サンプルの回収を、イソフルランで動物を麻酔し、伏在静脈の血液サンプルを取り出すことによって、0及び12日目（全期間は22日）で行った。最終日において、動物を麻酔し、犠牲にして、心臓穿刺により最大量の血液を得た。

【0134】

8.1. ファージ試験

ファージ試験により、貪食能を有するリンパ球の割合及びそうした活性を示すリンパ球により貪食された細菌の数を測定することが可能である。

【0135】

100 μ Lの血液を0℃まで氷浴中で冷却し、20 μ Lの冷却した蛍光標識した大腸菌 (*Escherichia coli*) の懸濁液を加えた。サンプルを氷浴中で、10分間、37℃で培養した。次いで、このサンプルを冷却した。100 μ Lのキレート剤溶液を加えて、取り込まれていない細菌を取り除いたが、細胞表面に付着したものは取り除かなかった。3 mLの緩衝洗浄液を加えて、サンプルを5分間、4℃で、250 gで遠心分離した。上清を取り除き、溶菌緩衝液を加えた。このサンプルをインキュベートし、非免疫細胞を取り除いた。200 μ LのDNA標識溶液を加えて、白色の細胞分画を得た。標識化から1時間未満に、細胞をフラックスサイトメトリー(フラックス細胞数測定)により解析した。赤色領域の蛍光を発する白血球細胞のDNA標識により、白血球である事象(細胞)を他のものから区別することが可能になる。各細胞タイプの光屈折特性を用いることにより、好中球及び単球を区別できるヒストグラムを描いた。ファージ試験により得られた結果を表15に示す。

【0136】

【表15】

表15. ファージ試験の結果

日	処理	好中球		単球	
		増加 (Boosted) %	平均 蛍光発光	増加 (Boosted)%	平均 蛍光発光
12	コントロール	85.30 $\pm$ 0.96	93.20 $\pm$ 4.52	64.30 $\pm$ 3.31	59.07 $\pm$ 2.39
	試験例	91.17 $\pm$ 4.52	133.23 $\pm$ 38.60	66.27 $\pm$ 6.93	76.47 $\pm$ 21.65
22	コントロール	96.34 $\pm$ 1.32	157.11 $\pm$ 29.31	65.54 $\pm$ 13.57	129.33 $\pm$ 18.75 a
	試験例	96.46 $\pm$ 1.05	183.11 $\pm$ 37.32	66.07 $\pm$ 9.97	162.44 $\pm$ 23.35 b

【0137】

0日目の結果は、十分な血液量が無かったので、入手できなかった。結果を、12日目の結果を、n=3で、平均 $\pm$ S.D.として表し(血液サンプルは、サンプルの量が十分になかったので、プールに加えた)、22日目の結果をn=9で表した。異なる文字で示している同じ日で同じ列のサンプルは、統計的に有意な差を示している ($p < 0.05$)。

【0138】

12日目のサンプルの数は、細胞の数に関しての処理間での統計的に有意な差異を確立するのに十分大きくないことが確認できる。しかしながら、コントロールサンプルに

対して、試験グループの好中球及び単球の平均蛍光発光の増加において、統計的有意性が確認される。22日目では、活性化された好中球及び単球の割合、すなわち、貪食活性を示すことができた細胞の数において差異はなかった。単球に関して、コントロールグループに対して、試験製品はこれらの活性を著しく増加させた($p<0.01$)。したがって、貪食能力を示す単球の割合は、処理間で相違しないが、試験製品を与えられたこれらの動物の単球は、活性化した単球あたりにより多くの細菌E. coliを貪食又は捕食する能力を示す。

【0139】

8.2. バースト試験

バースト試験により、免疫系細胞が酸化活性を示す能力、すなわち、酸素依存性メカニズムを用いるブースター粒子を除去する潜在的な能力を測定できる。

【0140】

各サンプルにおいて、100 μ Lの血液（氷浴中で0℃に冷却されていた）を3つの異なるチューブ中に加えた。20 μ Lの緩衝液（ネガティブコントロール）を3つのチューブのうちの1つに加え、一方、酸化活性のための異なるブースター（大腸菌粒子及び高いコントロールとしての、プロテインキナーゼのリガンドの、C-ホルボール 13-ミリスタート 12-アセテート(PMA))を他のチューブに加えた。サンプルを混合し、10分間、37℃で、水浴中で培養した。酸化して緑色の蛍光を発することができる、20 μ Lのジヒドロローダミン(dehydrorodamine) 123基質(DHR)を加えた。これを10分以上培養した。2 mLの溶菌溶液を加えて、このサンプルを25℃でインキュベートし、赤血球を取り除いた。これを緩衝液で洗浄した。200 μ LのDNA標識溶液を得られた白色細胞分画に加えた。標識化から1時間経過する前に、細胞をフラックスサイトメトリーにより解析した。0日目と12日目のサンプルサイズは、処理間での統計的に有意な差異を測定するのに十分大きくなかった。したがって、データ分析は主に最終日の処理に集中した。

【0141】

結果に基づくと、高い刺激(PMA)を用いた場合、好中球の活性において有意な差は確認されなかった。しかしながら、試験グループにおいて、単球において検出された蛍光発光の強度が向上する傾向があり、これは、これらの活性を増大させる傾向を表す。サンプルが粒子状の刺激（大腸菌）を与えられた場合、試験製品を与えられた動物は、酸化能力を示す好中球の割合の、僅かではあるが有意ではない増加の傾向を示した。単球に言及すると、試験グループは、酸化能力を示す細胞のより大きい割合を示した($p<0.05$)。したがって、ファージ試験と同様に、試験製品の消費は主に単球の応答の向上に作用する。バースト試験の結果を表16に示す。

【0142】

【表16】

表 16. 大腸菌粒子におけるバースト試験の結果（22日目）

日	処理	好中球		単球	
		増加 (Boosted) %	平均 蛍光発光	増加 (Boosted) %	平均 蛍光発光
22	コントロール	88.33 $\pm$ 5.48	6.06 $\pm$ 1.68	18.5 $\pm$ 7.4	3.37 $\pm$ 0.42
	試験例	91.64 $\pm$ 4.19	6.1 $\pm$ 1.38	28.16 $\pm$ 7.6	3.59 $\pm$ 0.55

【0143】

結果として、試験製品は免疫応答の増加における有意な効果を有した。この活性は、潜在的な感染プロセスに対する単球の応答が増大する製品の能力に主に集中した。本製品の摂取は、好中球の貪食活性の増加及び単球の貪食活性の統計的に有意な増加の傾向を示した。本製品は、活性を示す白血球の割合を増大させないが、活性を示した白血球は、より多くの病原体の捕食能力を有した。本製品は、大腸菌等の粒子状の刺激を与えられた場合

、酸化活性を示す単球の割合を増大させた。そのため、本製品は単球により捕食される細菌の量を増加させ、これは酸化活性を示す単球のより多い量を可能にすることができる。人体の場合を想定すると、同じ生物学的機能性を検出するための消費は、1日当たり5～6 gとなるだろう。

【0144】

実施例9. 工業的スケールアップ

製品の異なったバッチを工業プロセスにより得て、実施例1により得られたもの（「DAMM製品」及び本明細書でバッチ1として示される）と比較した。

【0145】

工業的スケールアップのために、醸造プロセスから得られたサッカロマイセス・セレビシエの副生成物の湿潤バイオマスを原料として用いた。

【0146】

9.1. バッチ2

湿潤バイオマス中の乾燥物の量は、この製品を105℃で乾燥させた後で約17%であった。この17%のうち、13%が不溶性固体（サッカロマイセス・セレビシエ細胞）に相当し、4%が可溶性固体に相当した。

【0147】

反応媒体を、反応器に300 kgの蒸留水を充填し、4 kgのNaOHを加えて調製した。100 kgの湿潤バイオマスをこの反応媒体に加えた。これは、湿潤バイオマス：反応媒体の比が、1：3であったことを意味する。湿潤バイオマスが13%の酵母を含むことを考慮すると、この比率は、乾燥酵母：反応媒体で示す場合、1：39になる。NaOHの最終濃度は0.25 Mであった。

【0148】

この混合物を80℃まで加熱し、一定の攪拌をしながら、この温度で16時間反応させた。反応時間が経過すると、生成物を室温まで冷却した。この混合物を、Gea Westfalia遠心分離（SC 6-01-576モデル、Hidrostop）を用いて遠心分離し、塩基性媒体中の不溶性画分を分離した。100～300 L／時間の流速を用いて、遠心分離を行った。得られた残渣を、370 Lの蒸留水を用いて再度懸濁し、3 MのHClを加えてpH=7.1まで中和した。続いて、この混合物を上述したとおりに遠心分離した。残渣を最後に360 mLの水を加えて洗浄し、遠心分離した。得られた生成物をスプレードライヤーにより乾燥させた。この目的のために、4.5 Lの水を加えて、このプロセスの間一定に攪拌することにより、水性懸濁液をスプレードライヤー中に保持した。入口及び出口温度は、それぞれ180℃及び93～94℃であった。このプロセスから得られた生成物は微粒子であり、本明細書においてバッチ2とした。

【0149】

9.2. バッチ3

バッチ2のためのプロセスをわずかに変更したプロセスに従ってこの生成物を得た。具体的には、80℃、16時間で、0.25 MのNaOHでの加水分解の後に、3 MのHClを加えることにより混合物を直接中和した（反応媒体の最初の遠心分離を行わない）。中和の後、混合物を遠心分離し、上述した手順に従った。そのため、バッチ2と比較すると、この手順は1の遠心分離工程を取り除くことができ、工業的コストを最適化する。こうして得られた生成物を、本明細書においてバッチ3とした。

【0150】

9.3. バッチ4

湿潤バイオマス中の乾燥物の量は約18%であった。この18%のうち、11%は不溶性固体（サッカロマイセス・セレビシエ細胞）に相当し、7%が可溶性固体に相当した。

【0151】

バッチ3のためのプロセスをわずかに変更したプロセスに従って生成物を得た。反応器に300 kgの蒸留水を充填し、次いで5.7 kgのNaOHを加えて反応媒体を調製した。143 kgの湿潤バイオマスを、100 kgの湿潤バイオマスの代わりに用いた。こ

れらを反応媒体に加え、これは、湿潤バイオマス：反応媒体の比が、1：2であったことを意味する。湿潤バイオマスが11%の酵母を含むことを考慮すると、この比率は、乾燥酵母：反応媒体で示す場合、1：2.3になる。NaOHの最終濃度は0.32Mであった。加水分解時間を16時間から10時間に短縮した。そのため、バッチ3と比較すると、この手順は加水分官の短縮をもたらす。こうして得られた生成物を、本明細書においてバッチ4とした。

【0152】

9.4. 製品（生成物）特性

食物繊維を公定法AOAC 991.43 (AOAC 公定法 991.43 「食物中の合計の可溶性及び不溶性の食物繊維」、酵素－重量法、MES－TRIS緩衝液)に従って測定した。屈折率検出器を備えるHPLCにより単糖を定量した。結果を表17に示す。

【0153】

【表17】

表17(乾燥質量%)

パラメーター	バッチ1	バッチ2	バッチ3	バッチ4	方法
食物繊維	44.18%	47.53%	51.64%	51.46%	AOAC 991.43
単糖	<0.5%	<0.5%	<0.5%	<0.5%	HPLC/RI

【0154】

K-YBGL 07/11を参照として用い、Megazyme社からのキットを用いる方法（後で説明する）に従ってグルカン进行測定した。この方法において用いられた試薬は：

ボトル1：エキソ-1,3-β-グルカナラーゼ（100 U/mL）と、β-グルコシダーゼ（20 U/mL）を含む懸濁液、2.0mL。8mLの200mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）をボトル1に加えた（すなわち、バイアルの内容物を10mLに希釈した）。これを適当なサイズの一定分量に分割し、-20℃でポリプロピレンチューブ中に保管し、使用の間氷上に置いた。

ボトル2：アミログルコシダーゼ（1630 U/mL）と、インベルターゼ（500 U/mL）との50% v/vグリセリン溶液、20mL。

ボトル3：GOPOD試薬緩衝液。緩衝液（48 mL, pH 7.4）、p-ヒドロキシ安息香酸、及びアジ化ナトリウム（0.4% w/v）。ボトル3の内容物を、蒸留水又は脱イオン水で1.0 Lまで希釈した。

ボトル4：GOPOD試薬酵素。グルコースオキシダーゼと、ペルオキシダーゼと、4-アミノアンチピリン。ボトル3の内容物を、ボトル3の希釈した内容物中に溶解させた（上記の試薬を参照）。この試薬の混合物（GOPOD試薬）を、次いで、保管のために適した容量の一定分量に分割した。

ボトル5：0.2%w/v安息香酸中のD-グルコース標準溶液（5mL、1.00 mg/mL）。

ボトル6：コントロールの酵母のβ-グルカン調製物（～2 g、β-グルカン含量は、ボトルのラベルに記載されている）。

【0155】

オリゴ糖、スクロース、及び遊離したD-グルコース中の全グルカン（α-グルカン+β-グルカン）及びD-グルコースの測定

【0156】

(a) 全グルカンの可溶化及び部分的な加水分解：Retsch遠心ミルを用いて0.5mmスクリーンを通過させてサンプルを製粉した。製粉化したサンプル（100mg）を20 x 125 mmのFisher Brand培養チューブに入れた。このチューブをタッピングして、すべてのサンプルがチューブ底部に沈殿したことを確認した。1.5mLの濃HCl（37%v/v）を各チューブに加え、チューブをキャップしてボルテックスミキサーで強く攪拌した。このチューブを30℃の水浴中に45分間静置するとともに、15分毎にボルテックスで攪拌し、β-グルカンを完全に溶解させた。10mLの水を各チューブに加え、チューブをキャップしてボルテックスで攪

拌した。キャッピングを緩め、沸騰水浴（～100℃）中に入れた。5分後にキャップを締め、2時間インキュベーションを続けた。チューブを室温まで冷却させ、キャップを注意深く緩め、10mLの2N KOHを加えた。各チューブの内容物を定量的に、200mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）を用いてチューブを洗浄しながら100mLのメスフラスコに移し、容量を調整した。これを反転して完全に混合した。各懸濁液の一定分量を1500gで10分間遠心分離した。

【0157】

(b) スクロース及び遊離したD-グルコース中の全グルカン及びD-グルコースの測定：0.1mLの一定分量（2回分）の遠心分離した抽出物をガラス試験管（16 x 100 mm）の底部に移した。200mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）中のエキソ-1,3-β-グルカナーゼ（20 U/mL）及びβ-グルコシダーゼ（4 U/mL）の混合物（0.1mL）を各チューブの底部に加えた。このチューブをボルテックスで混合し、40℃で60分間インキュベートした。3.0mLのグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ混合物（GOPOD）を各チューブに加えて、40℃で20分間インキュベートした。すべての溶液の吸光度を510nmでブランク試薬に対して測定した。

【0158】

スクロース及び遊離D-グルコース中のα-グルカン及びD-グルコースの測定

製粉したサンプル（100 mg）を20 x 125 mmのFisher Brand培養チューブに入れた。このチューブをタッピングして、すべてのサンプルがチューブ底部に沈殿したことを確認した。マグネチックスターラー（5 x 15 mm）を追加して、続いて2 mLの2 M KOHを各チューブに加え、マグネチックスターラーを用いて氷/水浴中で約20分間攪拌して、ペレットを再懸濁した。8mLの1.2M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 3.8）を攪拌しながら各チューブに加えた。すぐに0.2mLのアミログルコシダーゼ（1630 U/mL）及びインベルターゼ（500 U/mL）を加えて、よく混合し、このチューブを40℃の水浴中に静置した。このチューブを、断続的にボルテックスで混合しながら、40℃で30分間インキュベートした。各チューブの内容物を定量的に100mLのメスフラスコに移し、水で容量を調整した。よく混合し、この溶液の一定分量を1500gで10分間遠心分離させた。各希釈又は未希釈の上清を0.1mLの一定分量（2回分）をガラス試験管に移し、0.1mLの酢酸ナトリウム緩衝液（200 mM, pH 5.0）及び3.0 mLのGOPOD試薬を加えて、40℃で20分間インキュベートした。すべての溶液の吸光度を510nmでブランク試薬に対して測定した。

【0159】

ブランク試薬は、0.2mLの酢酸ナトリウム緩衝液（200 mM, pH 5.0）+3.0mLのグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ試薬からなっていた。D-グルコースのスタンダードは、0.1mLのD-グルコーススタンダード（1 mg/mL）+0.1mLの酢酸ナトリウム緩衝液（200 mM, pH 5.0）+3.0mLのグルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ試薬からなっていた。

【0160】

計算

全グルカン（% w/w）= $\Delta E \times F \times 100 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 = \Delta E \times F / W \times 90$ 。

α-グルカン（% w/w）= $\Delta E \times F \times 1000 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 = \Delta E \times F / W \times 90$
（最終容量100 mL）= $\Delta E \times F / W \times 9.27$ （最終容量 10.3 mL）

β-グルカン = 全グルカン - α-グルカン

ここで、 ΔE = 反応物吸光度 - ブランク吸光度。

F = 吸光度をD-グルコース（μg）に変換するための係数 = 100（D-グルコースのスタンダード（μg））/ D-グルコースのスタンダード100 μgにおけるGOPOD吸光度。

100/0.1 = 全グルカン（酵母）のための容量補正係数（100mL中の0.1mLを分析した。）。

1000 = α-グルカンのための容量補正係数（100mL中の0.1mLを分析した。）。

1/1000 = μgからmgへの変換。

100/W = サンプル100mgへの再変換（すなわち、% w/wとして）。

W = 解析したサンプルの質量。

162/180 = β-グルカン中に生じる、測定された遊離D-グルコースからの無水グルコース

への変換係数

【0161】

結果を表18に示す。酵素的方法は、結果が全グルカンの%で示されるが、他の非グルカンオリゴ糖に由来するグルコースの定量を可能にすることに注意すべきである。

【0162】

【表18】

表 18 (乾燥物の質量%)

パラメーター	バッチ 1	バッチ 2	バッチ 3	バッチ 4	方法
β-グルカン (1-3, 1-6)	22.77%	29.32%	31.66%	34.68%	酵素的方法
α-グルカン	50.80%	42.36%	30.24%	27.55%	酵素的方法
全グルカン	73.57%	71.68%	61.90%	62.23%	酵素的方法

10

【0163】

β-グルカン(1-3, 1-6)は、非消化性の多糖であるので、「食物繊維」のカテゴリーに含まれる。このカテゴリーはまた、他のうち、キチン／キトサンも含み得る。α-グルカンは、消化性の多糖であり、そのため「食物繊維」には含まれない。単糖の量は、すべてのバッチで無視できる。生成物が最初の遠心分離の前に中和されたバッチ3において、β-グルカンの含有量は、バッチ2に比べて維持したが、より少ないα-グルカンが抽出された。これは、生成物の生体機能性がβ-グルカン及びキチン／キトサンを含む食物繊維に起因するので、問題にはならない。

20

【0164】

元素組成 (3回の繰り返しの平均)

バッチ2: 0.27% N, 42.99% C, 6.67% H

バッチ3: 0.50% N, 43.79% C, 6.77% H

バッチ4: 0.75% N, 42.82% C, 6.83% H

【0165】

値は、異なるプロセスにより得られたもので同程度である。1mgのサンプルを1200℃での燃焼及び微量分析に供した。

30

【0166】

NMRs

¹H-NMRスペクトルを、D₂O中に20mg/mLの濃度でサンプルを溶解し、30 μLのDClを用いて酸性化してサンプルを完全に溶解させて行った。5 μLのTMS P溶液 (D₂O中に20 mg/mL) を内部基準として加えた (0ppm)。70℃でスペクトルを行い、水のシグナルとキトサンのH1のシグナルとの間の重なりを回避した。Bruker Avance 600 MHzを用い、以下の解析条件で実施した: zgpr (90のパルスによる水シグナルの事前飽和), 積算回数: 128; スペクトル幅: 12 ppm; 事前飽和 2-4.

【0167】

図4は、バッチ2、3、及び4のNMRスペクトルを示している。3.5~4ppmの領域は、多糖類 (グルカン、キチン、キトサン) のプロトンに関連付けられるすべてのピークを示している。これらはスペクトル中で最も強いものであり、これは多糖類が生成物中で主要な成分だからである。キトサンのH1は、すべてのスペクトルにおいて5.3ppm周辺で確認できる。ベータプロトンのシグナルは、水のシグナルの直前に確認でき、アルファプロトンは水のシグナルの後に確認できる。スペクトルのこの領域において、シグナルは同様な強度であり、3つのバッチ中の異なる多糖類の比率が非常に似ていることを示している。同時に、これらのスペクトルは、バッチ1のNMRスペクトル (図1) と一致する。

40

【0168】

50

本明細書中に引用された参考文献
【表 19】

N. Nwe et al. 2010, "Production of fungal chitosan by enzymatic method and applications in plant tissue culture and tissue engineering: 11 years of our progress, present situation and future prospects" *Biopolymers*, edited by Magdy Elnashar, published: September 28, 2010, chapter 7 pp. 135-162

H. Yao et al., "Effect of chitosan on plasma lipids, hepatic lipids, and fecal bile acid in hamsters human trials failed to show these effects" *J. Food Drug Anal.* 2006, vol. 14, pp. 183-189

10

M.D. Gades et al., "Chitosan supplementation and fat absorption in men and women" *J. Am. Diet. Assoc.* 2005, vol. 105, pp. 72-77

C.N. Mhurchu et al., "Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: a systematic review of randomized controlled trials" *Obes. Rev.* 2005, vol. 6, pp. 35-42

20

K. Zhou et al., "*In vitro* binding of bile acids and triglycerides by selected chitosan preparations and their physico-chemical properties" *Food Science and Technology* 2006, vol. 39, pp. 1087-1092

EP1483299

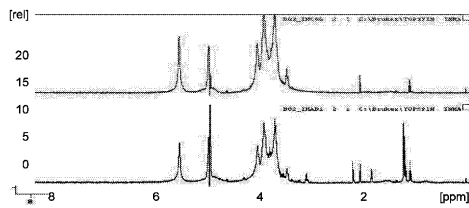
WO 91/03495

30

US 4810646

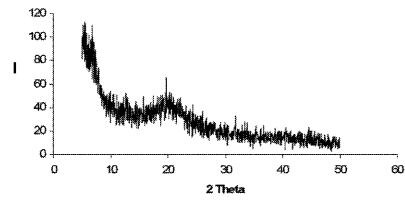
【図 1】

FIG. 1



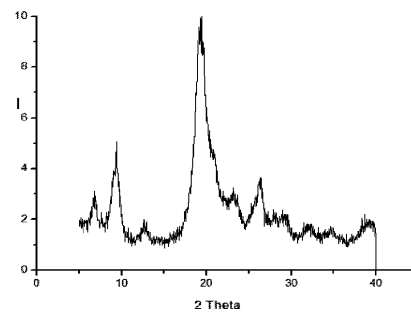
【図 2 A】

FIG. 2A



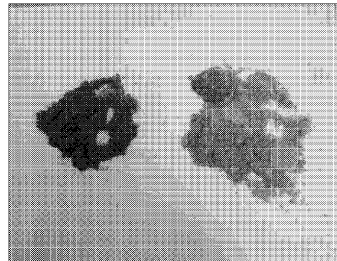
【図 2 B】

FIG. 2B



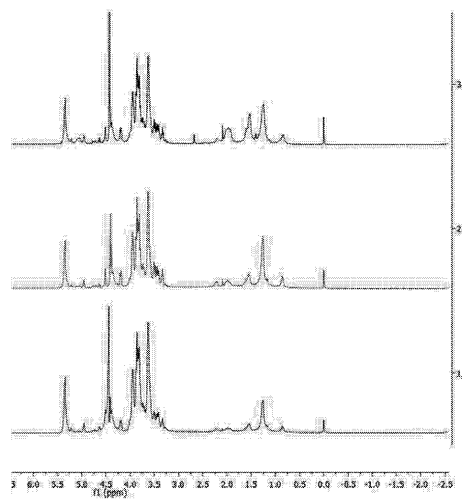
【図 3】

FIG. 3



【図 4】

FIG. 4



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 K	31/722 (2006.01)	A 6 1 K 31/722
A 6 1 K	31/716 (2006.01)	A 6 1 K 31/716

- (72)発明者 レメディオス・マンセボ・モリーナ
 スペイン・E-08820・アル・プラ・ダ・リョブレガート・(バルセロナ)・アベニーダ・ピ
 ルヘン・デ・モンセラート・120・プリメル・ピソ・1アー
- (72)発明者 フランセスク・ザビエル・カスターニェ・シッチャス
 スペイン・E-08025・バルセロナ・カリェ・インドウストリア・64・プリメル・ピソ・2
 アー
- (72)発明者 ジョルディ・クーニェ・カステラーナ
 スペイン・E-08191・ルビ・(バルセロナ)・カリェ・デスコブリドール・コロム・36
- (72)発明者 ジョナタン・サントス・グティエレス
 スペイン・E-08860・カステルデフェルス・(バルセロナ)・カリェ・アントニオ・マチャ
 ド・69・セグンド・ピソ・2アー
- (72)発明者 マグダレナ・ラフェカス・マルティネス
 スペイン・E-08037・バルセロナ・カリェ・プロヴェンカ・326・プリメル・ピソ・1ア
 ー
- (72)発明者 マリア・アンヘレス・ベアトリス・ミラレス・ブラグリア
 スペイン・E-28003・マドリッド・カリェ・ガリレオ・102・クイント・ピソ・デー・エ
 スカレーラ・アー
- (72)発明者 インマクラダ・マテオス・アパリシオ・セディエル
 スペイン・E-28005・マドリッド・カリェ・ウミジャデロ・22・テルセロ・ピソ・エー
- (72)発明者 アンヘレス・マリア・ヘラス・カバレロ
 スペイン・E-28040・マドリッド・カリェ・パセオ・デ・ファン・ビヘシモ・54・クアル
 ト・ピソ

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0299034 (US, A1)
 国際公開第1996/025437 (WO, A1)
 国際公開第1999/021566 (WO, A1)
 英国特許出願公開第02026515 (GB, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12P 19/04
 A23L 33/10
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)