

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5584937号
(P5584937)

(45) 発行日 平成26年9月10日 (2014. 9. 10)

(24) 登録日 平成26年8月1日 (2014. 8. 1)

(51) Int. Cl. F 1
A 6 1 K 31/19 (2006. 01) A 6 1 K 31/19
A 6 1 P 25/28 (2006. 01) A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 43/00 (2006. 01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 4 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2010-535305 (P2010-535305)	(73) 特許権者	503220392
(86) (22) 出願日	平成20年12月3日 (2008. 12. 3)		ディーエスエム アイビー アセツ ビー・ブイ・
(65) 公表番号	特表2011-505344 (P2011-505344A)		オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘーレン, ヘット オーバールーン 1
(43) 公表日	平成23年2月24日 (2011. 2. 24)	(74) 代理人	100094318
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/010231		弁理士 山田 行一
(87) 国際公開番号	W02009/071277	(74) 代理人	100123995
(87) 国際公開日	平成21年6月11日 (2009. 6. 11)		弁理士 野田 雅一
審査請求日	平成23年12月1日 (2011. 12. 1)	(74) 代理人	100128381
(31) 優先権主張番号	07023334. 1		弁理士 清水 義憲
(32) 優先日	平成19年12月3日 (2007. 12. 3)	(74) 代理人	100107456
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 池田 成人
前置審査		(74) 代理人	100139000
			弁理士 城戸 博兒

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ステビア抽出物またはステビア抽出物構成物質を含有する新規な栄養補給食品組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性成分としてステビオール、イソステビオール、およびそれらの混合物からなる群から選択される化合物の、動物またはヒトにおいて認知機能を改善する薬剤の製造における使用であって、

前記認知機能が、良好な認知性およびバランスの維持、学習、問題解決、知的機能、心理社会的負担に対処する能力、注意力および集中力、記憶、および想起能力からなる群から選択される、使用。

【請求項 2】

前記化合物がステビア抽出物中に存在し、前記ステビア抽出物が少なくとも 10～90 %ステビオールおよび／またはイソステビオールを含有する、請求項 1 に記載の化合物の使用。

【請求項 3】

前記薬剤が 6～10 日間に投与される、請求項 1 に記載の化合物の使用。

【請求項 4】

ステビオール、イソステビオール、およびそれらの混合物からなる群から選択される化合物の、ヒトを除く動物において認知機能を改善するための使用であって、

前記認知機能が、良好な認知性およびバランスの維持、学習、問題解決、知的機能、心理社会的負担に対処する能力、注意力および集中力、記憶、および想起能力からなる群から選択される、使用。

10

20

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、学習、記憶、および敏捷性などの認知機能を改善し、ならびに心理社会的圧力を緩和するための、活性成分としてステビア抽出物またはステビオールおよびステビオシドなどのその構成物質を含んでなる新規な栄養補給食品組成物または食品添加剤に関する。

【0002】

[背景技術]

記憶、学習、および敏捷性は、中脳内の、特に情報が処理されて記憶が固定される海馬内の神経回路に依存する。精神能力および学習はシナプスの柔軟性、すなわち新しい受容体の動員による神経結合の強化、新しいシナプスの形成、および最終的に新しい神経結合の発生に依存する。

【0003】

(長期)記憶の形成および脳の効率的な機能は、ニューロン間の伝達強度を強化するための新しいタンパク質の合成に依存する。シナプス強化に充てられる新しいタンパク質の生成は、ニューロン内の化学および電気信号によって始動される。

【0004】

長期増強(LTP)は、短い馴化シナプス前電気的刺激バースト(およそ100Hzで1秒間)に続いて中枢神経系(CNS)内の特定のシナプスで生じる、シナプス伝達の持続性の増強(生体外では数時間、生体内では数日間または数週間)について述べるのに使用される用語である。この現象は、それによって記憶が形成されて脳内に保存される主要機序の1つであると広く見なされる。LTPは、生体外および生きている動物の双方で観察されている。実験条件下では、一連の短い高周波数の電気的刺激をシナプスに与えることで、化学シナプス強度を数分から数時間にわたり増強できる。最も重要なことには、LTPは生きている動物においてシナプスの柔軟性に寄与し、高度に適応できる神経系の基礎を提供する。

【0005】

2つの異なる受容体タイプ、すなわちN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体複合体および α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸(AMPA)受容体が、LTP過程に主に関与する。LTP中に、主要な興奮性神経伝達物質グルタメートがシナプス前ニューロンから放出され、シナプス後膜上のAMPA受容体に結合して活性化し、その脱分極を引き起こす。静止膜電位では、NMDA受容体チャネルはマグネシウムイオンによってブロックされるが、シナプス後膜の脱分極がこのブロックを除去し、NMDA受容体の活性化と引き続くカルシウムの細胞内への侵入を可能にする。この細胞内カルシウムの上昇はタンパク質キナーゼを活性化すると考えられ、遺伝子転写および強化タンパク質の構築を引き起こし(Niehoff(2005年)、The Language of Life: How Cells Communicate in Health and Disease, 210~223)、AMPA受容体の強化された感受性をもたらし、ひいては神経伝達とLTP維持をさらに促進する。

【0006】

NMDA受容体はNR1およびNR2サブユニットのアセンブリーから構成され、グルタメート結合領域はこれらのサブユニットの接合部に形成される。グルタメートに加えて、NMDA受容体は受容体機能を調節するために共作動薬グリシンを必要とする。グリシン結合部位がNR1サブユニット上に見られるのに対し、NR2サブユニットはNMDA受容体の機能を調節する制御分子であるポリアミンのための結合部位を保有する。

【0007】

このようにしてアミノ酸グリシンは、NMDA受容体複合体において、グルタメートと

10

20

30

40

50

共に正のアロステリックな調節因子および必須共作動薬として機能することが知られている (Danyasz および Parsons 1998 年, Pharmacol. Rev., 50 (4) : 597~664)。グリシン輸送体 (GlyT) は、シナプス前神経末端または膠細胞内へのグリシンの再取り込みによる、シナプス後グリシン作動性作用の終結、および低細胞外グリシン濃度の維持において重要な役割を果たす。したがってグリシン作用の終結は、概して迅速な再取り込みによって仲介される。2つのグリシン輸送体 GlyT1 および GlyT2 が知られており、12個の推定上の膜貫通領域によって特徴づけられている一方、同一遺伝子からコードされる3種の変異型 GlyT1 (GlyT1a、b、およびc) が同定されている (Borowsky および Hoffman 1998 年 J. Biol. Chem., 273 (44) : 29077~29085)。

10

【0008】

GlyT1 は前脳内の唯一の塩化ナトリウム依存グリシン輸送体であり、それはそこで NMDA 受容体と共に同時発現される。この部位で GlyT1 は、シナプスにおけるグリシンの細胞外レベルを調節する役割を担うと考えられ (Lopez-Corcuera ら 2001 年 Mol. Membr. Biol., 18 (1) : 13~20)、NMDA 受容体機能の調節をもたらす。

【0009】

実際、マウスおよびラット双方の海馬の切片標本において、シャッフアー側枝刺激に際し、選択的 GlyT1 拮抗薬 N-[3-(4'-フルオロフェニル)-3-(4'-フェニルフェノキシ)] プロピルサルコシン (NFPS) の存在下で、CA1 錐体細胞内に強化された NMDA 受容体反応が観察された (Bergeron ら 1998 年, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (26) : 15730~15734)。生体内では、成体マウスにおいて NFPS の全身性投与が歯状回中で LTP を増大させ、音響驚愕反応のプレパルス抑制を強化し、GlyT1 の阻害が NMDA 受容体機能に行動に関わる様式で影響することが示唆された (Kinney ら 2003 年, J. Neurosci., 23 (20) : 7586~7591 頁)。

20

【0010】

このようなデータは、正常な個人において、精神病性症候群の予防のために、そして記憶および学習などの生理学的認知機能を維持または促進するために、シナプスの NMDA 受容体の局所微小環境においてグリシンの細胞外レベルを上昇させることで、NMDA 受容体シナプスの機能を増強できる化合物の潜在的有用性を強調する。

30

【0011】

高齢者および若年者の双方、学生、建設労働者、運転手、パイロット、医師、販売員、重役、主婦、「高度専門職」をはじめとする毎日の仕事において特に高い記憶および注意力を必要とする個人、および精神的ストレスおよび日々のストレスを受けている人々、ならびに統合失調症などの精神医学的不安定性を起こしやすい人々において学習、記憶および敏捷性を改善するのに使用してもよい化合物、ならびに栄養補給食品組成物の開発に対する関心の高まりがある。

【0012】

したがって NMDA 受容体機能を増強し、学習、記憶、および敏捷性を改善できる化合物または栄養補給食品組成物が、非常に望ましいであろう。

40

【0013】

ステビア抽出物は、これまでに飲料／食品組成物に添加されている (例えば日本製紙ケミカル株式会社の特開 2005-278467 号公報を参照されたい) が、ステビア抽出物は甘味料として機能する。

【0014】

[発明の詳細な説明]

本発明に従って、下の式 I および II の化合物は、LTP を誘発する能力による海馬機能の活性化物質であり、したがって認知機能を増強する栄養補給食品および／または医薬品として有用であることが分かった。これらの化合物はグリシン輸送体 GlyT1 を阻害

50

することでグリシンの再取り込みを阻害することによって、またはLTP誘発をもたらす別の経路の活性化によって、または双方の機序によって機能できる。したがって本発明は、認知機能を増強する量の式I、IIの化合物、またはそれらの混合物を動物（ヒトを含む）に投与することによって、認知機能を増強する方法に関する。

【0015】

本発明に従って、ステビア抽出物が、グリシン輸送体GlyT1の阻害によってグリシンの再取り込みを抑制する能力を有することが分かった。結果として生じる細胞外グリシンレベル増大はNMDA受容体の活性化強化をもたらし、これはいくつかの遺伝子の転写活性化を誘発する第1のステップであり、引き続いて記憶形成および固定に参与する主要な細胞機序であるLTPを誘発する。

10

【0016】

さらに本発明に従って、ステビア抽出物中に見られる化合物であるステビオール、イソステビオール、およびステビオシドが、異なる機序を通じてLTPを誘発することが分かった。どちらの過程も同じ生物学的利点を有し、すなわちそれらはどちらも海馬機能を促進するので、本発明の別の態様は、認知機能を増強するためにこれらの活性成分の1つ以上を使用することである。

【0017】

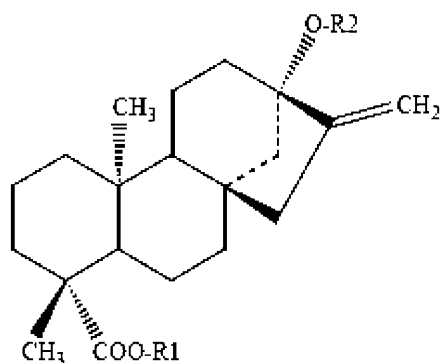
したがって本発明の一態様は、認知機能を増強するためのステビア抽出物または1つ以上の式IまたはIIの化合物を含んでなる新規な栄養補給食品組成物である。特に好ましい表1の化合物は、イソステビオールに加えてステビオールおよびステビオシドである。

20

【0018】

式I：R基の詳細については表1を参照されたい。

【化1】



30

【0019】

【表 1】

表1: ステビオールおよび関連グリコシドの構造(式 I)。Glc、Xyl、および Rha は、それぞれグルコース、キシロース、およびラムノース糖部分を表す(Kuznesof(2007年)Steviol glycosides-chemical and technical assessment、第68回 JECFA 会議)

化合物名	R1	R2
ステビオール	H	H
ステビオールビオシド	H	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
ステビオシド	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
レバウジオシド A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1) β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
レバウジオシド B	H	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1) β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
レバウジオシド C (ズルコシド B)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 $\rightarrow$ 1) β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
レバウジオシド D	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1) β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
レバウジオシド E	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)	β -Glc- β -Glc(2 $\rightarrow$ 1)
レバウジオシド F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 $\rightarrow$ 1) β -Glc(3 $\rightarrow$ 1)
ルブソシド	β -Glc	β -Glc
ズルコシド A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 $\rightarrow$ 1)

10

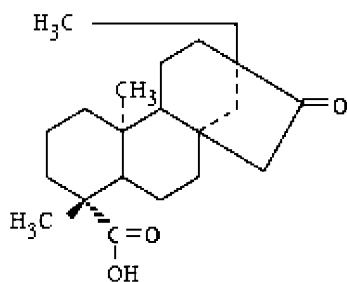
20

30

【0020】

式 I I：イソステビオール（C A S 番号、27975-19-5）は、ステビオールグリコシドの分解産物である。

【化 2】



40

【0021】

式 I および I I の化合物は、既知の方法を使用して合成的に生成でき、既知の手順を使用して植物などの天然原料から抽出でき、またはそれらは好ましくはステビア抽出物である植物抽出物の構成要素として使用してもよく、それは海馬機能の効果的な増強剤である

50

のに十分な量のステビオールおよび／またはステビオシドを含有する。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】Gly T1阻害アッセイにおける、ステビア抽出物の用量反応曲線を示す。アッセイ結果は、放射性グリシンの細胞内への内部移行の阻害百分率として提示される。図1は細胞アッセイにおいて、ステビア抽出物がGly T1の作用を特異的に阻害できることを明らかに実証する。

【図2a】飛び降り試験における誤り率を示す。a：訓練期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。b：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。c：休薬期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。d：休薬期間中、イチョウ（ginkgo biloba）処置マウスと有意差がある。いかなる場合でも有意性は $p < 0.05$ として示される。これらのデータは、ステビア処置マウスがその他の群よりもさらに良く学習しただけでなく、記憶をより長期間保ったことを示す。

【図2b】飛び降り行動試験の（電気ショックを回避するまでの）遅延時間の結果を示す。b：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。c：休薬期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。d：休薬期間中、イチョウ（Ginkgo biloba）処置マウスと有意差がある。いかなる場合でも有意性は $p < 0.05$ として示される。したがって150mg/kgステビア抽出物で処置されたマウスは、それらの年齢をマッチさせた対照よりも顕著により良い学習および記憶能力を示す一方、最高用量ではステビア処置マウスは、年齢をマッチさせた対照マウスおよびイチョウ（ginkgo biloba）処置陽性対照のどちらよりも成績がより良かった。

【図3a】訓練期間中にモリス水迷路において隠れた踏み台の以前の位置を探し出すまでの遅延時間を示す。a：初日におけるビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子との有意差は、低用量ステビア抽出物（50mg/kg）での処置抽出物が動物の学習能力を顕著に改善することを強調する。有意性は $p < 0.05$ として示される。

【図3b】試験日（4日目）にモリス水迷路において隠れた踏み台の以前の位置を探し出すまでの遅延時間。a：ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差があり、中（150mg/kg）および高（450mg/kg）用量のステビア抽出物による処置が、参照物質のイチョウ（Ginkgo biloba）を投与されたマウスで観察されたのと同程度に、そしてロリプラム処置動物よりもさらに良く動物の記憶能力を顕著に改善したことが示される。有意性は $p < 0.05$ として示される。

【図4a】シャトルボックス試験における誤り率を示す。a：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。b：消去期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。有意性は $p < 0.05$ として示される。したがって試験期間中、調べた最高用量では、ステビア処置動物はビヒクル処置同腹子よりも顕著により良く、陽性対照化合物ロリプラムを投与されたマウスと同等の能力を示した。

【図4b】シャトルボックス試験における回避時間を示す。a：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。b：試験期間中、イチョウ（Ginkgo biloba）処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。有意性は $p < 0.05$ として示される。これらの結果は、ステビア処置（用量150および450mg/kg）マウスが、脚ショックの回避を学習したことを示し、それらの能力はビヒクル処置対照マウス、および参照物質イチョウ（Ginkgo biloba）投与マウスのどちらよりも良かった。

【図5】物体提示の3時間前および3時間後の各コーナーの滞在時間を示す。矢印は物体の配置を表す。イチョウ（Ginkgo biloba）およびステビア抽出物は、ビヒクル処置対照マウスと比較して、新しい物体が入れられたコーナーの訪問時間を顕著に増大した（それぞれ $p = 0.004$ および $p = 0.005$ ）。したがってどちらの処置も物体認識試験におけるマウスの探索活動を顕著に増大した。

【図6】場所誤り率（不正確なコーナー訪問の百分率）を示す。ステビア抽出物処置は、ビヒクル処置対照マウスおよびイチョウ（*g i n k g o b i l o b a*）を投与されたマウスの双方と比較して、顕著により低い%誤り率をもたらした（それぞれ $p = 0.012$ および $p = 0.017$ ）。この効果はモジュール開始時から観察され、最初の12時間（活動期）全体を通じて保たれ、ステビアでの処置がより高レベルの注意力および改善された記憶能力をもたらすことが実証された。

【図7】側面誤り率（正確なコーナーの不正確な側面のノーズポークの百分率）を示す。ステビア抽出物はここでもまた、ビヒクル処置対照およびイチョウ処置マウスの双方と比較して、顕著により低い%誤り率を誘発する（それぞれ $p = 0.002$ および $p = 0.035$ ）。この効果はモジュール開始時から観察され、最初の12時間（活動期）全体を通じて保たれ、ステビア処置マウスにおける改善された注意力および記憶が示唆される。

【0023】

〔ステビア抽出物〕

ステビア抽出物は、アマハステビア（*S t e v i a r e b a u d i a n a*）、ステビア・エウパトリア（*S t e v i a e u p a t o r i a*）、ステビア・オバータ、（*S t e v i a o v a t a*）、ステビア・プルメラエ（*S t e v i a p l u m m e r a e*）、ステビア・サリシフォリア、（*S t e v i a s a l i c i f o l i a*）、およびステビア・セラータ（*S t e v i a s e r r a t a*）などのステビア属のあらゆる種から作られてもよい。一般にステビア抽出物は、少なくとも約10～95%、好ましくは約40～85%のステビオシドおよびステビオールを含有すべきである。

【0024】

明細書および特許請求の範囲全体を通じた用法で、「ステビア抽出物」という用語は広く使用されることが意図され、水蒸気蒸留、水性抽出、アルコールベースの抽出、または酢酸エチルなどの有機溶剤ベースの抽出、およびイオン交換クロマトグラフィーなどの従来の手段によって作られる植物抽出物を包含することができる。

【0025】

ステビア抽出物に関する重要パラメーターは、次の2つのみである。

1) それは動物またはヒト消費栄養補給食品組成物における使用のために許容可能でなくてはならない。したがってその調製のために使用される溶剤は、意図される用途について様々な規制当局により認可されなくてはならない。したがって好ましい抽出は熱水、蒸気、アルコール、および酢酸エチルである。

2) それは有効であるために十分な量のステビオシド、イソステビオールおよび／またはステビオールを含有しなくてはならない。

【0026】

さらに乾燥植物部分（葉など）が、十分な量の活性成分を含有することが分かった。したがってステビアの乾燥形態もまた、ステビア抽出物およびその構成物質の価値ある原料として本発明に含まれることが意図される。ステビア抽出物は典型的にその他の化合物を含有し、それは生物活性でありおよび／またはステビアの活性構成要素の生物学的利用能を増大させても良い。それらがステビア抽出物中に存在する量は、使用されるステビア種、植物の生育条件、そしてもちろんステビア抽出物を調製するのに使用される方法をはじめとする、いくつかの要素に基づいて変動する。水性抽出法を使用して調製される典型的なステビア抽出物は、ステビオール、イソステビオール、ステビオシド、およびレバウジオシドを含有する。

【0027】

〔ステビア抽出物およびその構成物質は精神状態に有益である〕

既述したように、記憶、学習、および精神的安定性の基盤はLTPであり、または脳内、特に海馬内のAMPAおよびNMDA受容体活性化を通じて起きる神経結合の強化である。GlyT1におけるそれらの活性を通じて、ステビア抽出物はグリシン再取り込み阻害物質として、NMDA受容体近傍にグリシンを蓄積させることでそれを活性化し、記憶形成および固定に関与する主要な細胞機序であるLTPの誘発を究極的にもたらす。

【0028】

さらにステビオール、イソステビオール、およびステビオシドもまた、（ステビア抽出物とは異なるステップにおいてではあるが）同一生化学的経路の活性化を誘発してLTP誘発をもたらし、記憶機能を改善するのに同様に有益である。

【0029】

したがってステビア抽出物およびその構成物質は、海馬機能を活性化して記憶の形成および固定を改善し、ならびに精神的健康を改善できる。したがって明細書および特許請求の範囲全体を通じた用法で、「認知機能を増強する量」とは投薬量が海馬機能を活性化するのに十分であり、改善された認知機能をもたらすことができることを意味し、これについて下でさらに詳しく述べる。

10

【0030】

[本発明により改善される状態]

本発明の文脈で「処置」とは、共同処置ならびに予防、特定の疾患に関連する症状を軽減すること、特定の疾患の発症期間を短くすること、重症度を改善すること、および無症候者が将来発症する可能性を低減することも包含する。

【0031】

明細書および特許請求の範囲全体を通じた用法で、「改善された認知機能」という用語は、次のような良好な認知性およびバランスをサポートし維持する状態を指すことを意図する。

●次をはじめとする強化された学習

20

- 言語処理
- 問題解決
- 知的機能

●心理社会的負担に対処する能力

●強化された注意力および集中力

●強化された記憶および想起能力、特に短期記憶

●強化された精神的敏捷性および精神的覚醒状態、精神的疲労の低減

●次をはじめとする精神状態の安定化

- 分娩後の病状の緩和

○パートナー、子供との離別、愛する人の死亡に起因する、または結婚生活の問題に起因する心理学的負担の緩和

30

- 転居、転職または類似した出来事に付随する問題の緩和

- 交通事故に続くストレスの多い状態またはその他のネガティブな社会的圧力の緩和

●次をはじめとするストレス緩和

○作業過負荷、疲労および／または燃え尽きに関連した症状の治療、予防、および軽減

- ストレスに対する抵抗性または耐性の増大

- 健常人におけるリラクセーションのサポートおよび促進

●次をはじめとする「状態改善」

- 過敏および倦怠感の低減

40

- 新しい状況への対処能力

- 肉体的および精神的疲労の低減、予防または軽減

○病人または健常人における良質な睡眠の促進、すなわち不眠症および睡眠障害への対処、およびエネルギーのより概括的な増大

【0032】

本発明の好ましい一態様では、特に、強化された認知機能および／または心理社会的サポートに対する必要性を感じる人々のために、組成物を栄養補給剤として使用してもよい。強化された認知機能から恩恵を受けるであろう人々の限定的一覧には、以下が含まれる。

高齢者、

50

学生または試験準備中の人々、
多大な学習をしている子供、すなわち乳児、幼児、就学前児童、および就学児童、
建設労働者、または潜在的に危険な機械類を操作する人々、
トラック運転手、パイロット、鉄道運転士、またはその他の運輸専門職、
航空管制官、
販売員、重役、およびその他の「高度専門職」、
警察官および兵士、
主婦、

またはスポーツ競技者、チェス競技者、ゴルファー、（俳優、音楽家などの）職業的パフォーマンスなどの毎日の仕事において多量のストレスに曝されるあらゆる人々、または毎日の仕事において特に高度な注意力／集中力／高い精神的および心理的能力を必要とする人々。

10

【0033】

これらの改善を達成するために、数日間（例えば少なくとも6または10日間）にわたる投与が推奨され、数週間にわたる毎日の投与が一般に好ましい。

【0034】

ヒトへの応用の他に、本発明の組成物は獣医学界における追加的用途を有する。強化された認知機能から恩恵を受ける動物としては、ストレスの多い状況に置かれる動物が挙げられる。このような状態は、例えば捕獲または輸送後に起き、または畜舎環境（居住場所または飼い主の変更）に起因するかもしれず、動物が類似性障害を発生し、苦痛を感じ、または攻撃的であり、または常同行為、または不安および強迫行動を示す場合に生じる。ストレスを被る動物としては、競技用動物（例えばイヌ、ウマ、ラクダ）、または様々なスポーツで使用される動物、芸当する動物（サーカス動物、および舞台、テレビまたは映画に出演する動物など）、および馬場馬術およびその他の高度に訓練された動作を演じるウマもまた挙げられる。

20

【0035】

好ましい「動物」は、ペットまたはコンパニオンアニマルおよび家畜である。ペットの例は、イヌ、ネコ、鳥、観賞魚、モルモット、（ジャック）ウサギ、ノウサギ、およびフェレットである。家畜の例は、水産養殖魚、ブタ、ウマ、反芻動物（畜牛、ヒツジ、およびヤギ）、および家禽である。

30

【0036】

[栄養補給食品の用途／調合／投薬]

「栄養補給食品」という用語は、ここでの用法では栄養および製薬の応用分野の双方における有用性を表す。したがって新規な栄養補給食品組成物は、食品および飲料に対する栄養補給剤として、そしてカプセルまたは錠剤などの固形製剤、または溶液または懸濁液などの液剤であってもよい、経腸的または非経口用途のための医薬製剤として使用できる。

【0037】

本発明に従った栄養補給食品組成物は、保護親水コロイド（ガム、タンパク質、加工デンプンなど）、バインダー、塗膜形成剤、封入剤／材、壁／シェル材料、マトリックス化合物、コーティング、乳化剤、表面活性剤、可溶化剤（油、脂肪、ワックス、レシチンなど）、吸着材、キャリア、充填材、共化合物、分散剤、湿潤剤、加工助剤（溶剤）、流動化剤、味覚マスキング材、増量剤、ゼリー化剤、ゲル形成剤、抗酸化剤、および抗菌剤をさらに含有してもよい。

40

【0038】

さらに本発明の栄養補給食品組成物にマルチビタミン剤およびミネラル補給剤を添加して、食生活によっては欠けている適量の必須栄養素を得てもよい。マルチビタミン剤およびミネラル補給剤はまた、疾患予防と、生活習慣パターンに起因する栄養損失および欠乏症からの保護のためにも有用である。

【0039】

50

本発明に従った栄養補給食品組成物は、例えば食品または飼料（のための添加剤／栄養補給剤）、食品または飼料プレミックス、強化食品または飼料、錠剤、丸薬、顆粒、糖衣丸、カプセル、および粉末および錠剤などの発泡性調合物などの固形形態の、または例えば飲料、ペースト、および油性懸濁液などの溶液、エマルジョンまたは懸濁液などの液体形態の、特に経口投与に標準的なあらゆる形態である、身体に投与するのに適したあらゆるガレヌス製剤形態であってもよい。ペーストは硬質または軟質シェルカプセルに組み込まれてもよく、カプセルは例えば（魚、ブタ、家禽、ウシ）ゼラチン、植物タンパク質またはリグニンスルホネートのマトリックスを特徴とする。その他の使用形態の例は、経皮、非経口または注射投与のためのものである。食餌および医薬組成物は、制御（遅延）放出製剤の形態であってもよい。

10

【0040】

食品および酪農製品の例としては、例えばマーガリン、スプレッド、バター、チーズ、ヨーグルトまたは乳飲料が挙げられる。

【0041】

強化食品の例は、スイートコーン、パン、シリアルバー、およびケーキやクッキーなどのベーカリー製品、およびポテトチップである。

【0042】

飲料は、非アルコールおよびアルコール飲料、ならびに飲用水および液体食品に添加するための液体調製品を包含する。非アルコール飲料は、例えば清涼飲料、スポーツドリンク、果汁、レモネード、茶、およびミルクベースの飲料である。液体食品は、例えばスー

20

【0043】

栄養補給食品組成物が医薬製剤であれば、組成物は薬学的に許容できる賦形剤、希釈剤またはアジュバントをさらに含有する。それらの調合のために、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, Williams & Wilkins, PA, USAで開示されるような標準技術を使用してもよい。経口投与のためには、好ましくは錠剤およびカプセルが使用され、それは例えばゼラチンまたはポリビニルピロリドンなどの適切な結合剤、例えば乳糖またはデンプンなどの適切な充填材、例えばステアリン酸マグネシウムなどの適切な潤滑剤、および任意にさらなる添加剤を含有する。好ましいのは投与単位あたり、例えば錠剤またはカプセルあたり 10～750mg、より好ましくは 50～500mg のステビア抽出物またはその構成物質を含有する調合物である。

30

【0044】

ヒトをはじめとする動物では、本発明の目的では、ステビア抽出物またはその構成物質の適切な1日量は、1日あたり体重1kgあたり0.15mg～体重1kgあたり約10mgの範囲であってもよい。好ましくはヒト成人（体重約70kg）に約10mg/日～約750mg/日、好ましくは約50mg/日～約500mg/日の投薬量を投与するのに十分な量のステビア抽出物またはその構成物質を含有する、本発明の栄養補給食品組成物がより好ましい。

40

【0045】

本発明をより良く例示するために、以下の限定を意図しない例を提示する。

【0046】**[実施例1]****[ステビア抽出物の組成および調製]**

本発明によって開示される典型的なステビア水性抽出物は、以下を含有する。

ステビオシド 約70%

50

レバウジオシド 約 20%

ステビオール、イソステビオール 約 10%

【0047】

アマハステビア (*Stevia rebaudiana*) の粉碎した葉を熱水と 20～30 分間混合する。引き続いて最大量の抽出物を達成するために、圧力を使用して脱水により水性抽出物を除去する。何種類かの温浸／脱水工程を使用してもよい。抽出物を室温に放冷する。粒子を除去するために、抽出物を粒子状物質が沈降する間静置してもよく、または遠心分離してもよい。噴霧乾燥または凍結乾燥のどちらかによって、抽出物を引き続いて乾燥する。この抽出物は、甘味料主成分、植物色素、およびその他の水溶性構成要素を含有する。

10

【0048】

以下の実施例で使用されたステビア抽出物（「ステビア葉抽出物、85%粉末」；カタログ番号 S1964）は、米国カリフォルニア州ガーディナ (Gardene) の Spectrum Laboratory Products Inc. から購入した。

【0049】

〔実施例 2〕

〔細胞アッセイにおけるグリシン輸送体 1 の阻害〕

10% 透析ウシ胎仔血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、プロリン、および抗生物質 G418 を含有するダルベッコ変法イーグル培地（米国カールズバッドのインビトロジェン (Invitrogen (Carlsbad, USA)) 中で、ヒトグリシン輸送体 1b cDNA (GlyT1) を安定して発現する CHO 細胞を慣例的に生育させた。アッセイの 1 日前に、細胞をトリプシン処理によって収集し、前述の培地に接種した。アッセイ直前に、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂、2.5 mM KCl、2.5 mM MgCl₂、10 mM グルコース、および 10 mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸を含有する取り込み緩衝液 (HEPES 緩衝液) によって培地を置換した。

20

【0050】

細胞内へのグリシン取り込みは、英国スラウのアマシャムバイオサイエンス GE ヘルスケア (Amersham Biosciences GE Healthcare (Slough, UK)) からの 60 nM 放射性標識 [³H]-グリシンの添加と、室温で 30 分のインキュベーションによって測定された。上の緩衝液で 3 回穏やかに洗浄して組み込まれていない標識を除去した後、組み込まれたグリシンを液体シンチレーション測定によって定量化した。

30

【0051】

GlyT1 輸送体を通じたグリシン取り込みは、ステビア抽出物の添加によって用量依存的様式で阻害された。GlyT1 の既知の阻害剤として、全て米国セントルイスのシグマ (Sigma (St. Louis, USA)) からのサルコシン ORG24598 および ALX5407 を使用した。グリシン取り込み阻害について測定された IC₅₀ 値 (ステビア抽出物、抽出物構成物質、および基準化合物) および代表的な用量反応曲線 (ステビア抽出物) をそれぞれ表 2 および図 1 に示す。

40

【0052】

【表 2】

表 2: 基準化合物サルコシン ORG24598 および ALX5407 に加えて、ステビア抽出物およびその主要構成要素ステビオール、イソステビオール、およびステビオシドによる CHO 細胞中へのグリシン取り込み阻害について測定された IC₅₀ 値。データは平均±平均値の標準誤差(実験を 2 回以上実施した場合)として示される; IC₅₀ は抽出物では µg/ml、純粋化合物では µM として提示される

物質	トリチウム化グリシン 取り込みの IC ₅₀
ステビア抽出物(実施例 1 に記載の組成物)	45±6.9µg/ml
ステビオール(Chromadex; カタログ番号 ASB-00019352-025)	不活性
イソステビオール(和光純薬; カタログ番号 090-02341)	不活性
ステビオシド(Indofine Chemical Co.; カタログ番号 023718)	不活性
サルコシン(シグマ; カタログ番号 S7672)	35.9µM
ORG24598(シグマ; カタログ番号 O7639)	0.02µM
ALX5407(シグマ; カタログ番号 A8977)	6.46nM
レバウジオシド A	不活性
イチョウ(Ginkgo biloba)(Huisong Pharmaceuticals; GB102-070116)	不活性

10

20

【0053】

[実施例 3]

[海馬切片培養]

ギロチンを使用して 7 日齢のウィスター系ラットを断頭した。1 分以内に開頭して大脳半球を分離して取り出し、双方の海馬を切り出して、137mM NaCl、5mM KCl、0.85mM Na₂HPO₄、1.5mM CaCl₂、0.66mM KH₂PO₄、0.28mM MgSO₄、1mM MgCl₂、2.7mM NaHCO₃、1mM キヌレン酸、および 0.6% D-グルコースを含有する氷冷緩衝液に入れた。

30

【0054】

同一緩衝液中で、振動刃ミクロトーム (VT1200S; Leica Microsystems (Schweiz) AG, Heerbrugg, スイス国) を使用して、海馬の横断切片 (400 µm) を調製した。海馬切片を膜インサート (Millicell Culture Plate Inserts, 0.4 µm) に個別にのせて、35℃、5% CO₂、湿度 95% で、25% 熱不活性化ウマ血清、1× GlutaMAX、1× ペニシリン/ストレプトマイシン、0.6% グルコース、および 1mM キヌレン酸を含有する、BME および MEM (どちらもインビトロゲンから) の 1:1 混合物を含有する培養液中で培養した (Stoppini 1991 年 J. Neurosci. Methods 37 (2): 173~82)。

40

【0055】

48 時間の培養後に、140mM NaCl、5mM KCl、1.3mM CaCl₂、25mM HEPES (pH 7.3)、33mM D-グルコース、および 0.02mM ビククリンメチオダイド中で 15 分間にわたり、ステビア抽出物、その主要構成物質または対照物質の添加によってシナプスの NMDA 受容体を活性化した。サルコシン (100 µM) および ALX5407 (20 nM) を陽性対照として慣例的に使用した。追加的な陽性対照は、姉妹培養物への 200 µM のグリシンの添加を含んでなった。処置後に切片を洗浄して、免疫組織化学的検査免疫組織化学のために固定した。常態では長期増強

50

と関連付けられている強化されたシナプス活性のマーカーを定量化し、学習および記憶の生体外モデルとした（下の表3参照）。

【0056】

【表3】

表3: 緩衝液で処置された姉妹培養物と比較した、ステビア抽出物またはいくつかのその構成物質化合物(ステビオール、イソステビオール、ステビオシド、およびレバウジオシド A)による処置後のシナプスマーカーの相対活性化。古典的 LTP 実験では、これらのマーカーのいずれかの(またはその組み合わせの)活性化が観察される

物質	pCREB	pMAPK	GluR1
ステビア抽出物	±	+	255%
ステビオール	++	±	340%
イソステビオール	+	±	361%
ステビオシド	±	++	±
レバウジオシド A	±	±	±
イチョウ(Ginkgo biloba)	±	+	±

++++が定性的最大活性化を示し、++および+がそれぞれ最大の半分および中程度の活性化を表す一方、±は免疫反応性の無変化を示す。GluR1 では、値は対照値の増大百分率として示される

【0057】

海馬培養物のステビア抽出物、ステビオール、イソステビオール、およびステビオシドによる処置は、LTPに典型的な1つ以上の生化学的マーカー（pCREB：cAMP応答要素結合タンパク質の活性化型；pMAPK：マイトジェン活性化タンパク質キナーゼの活性化型；GluR1：のAMPA受容体1細胞表面存在）を誘発する。

【0058】

〔実施例4〕

〔3つの伝統的な齧歯類学習および記憶モデルにおけるステビア抽出物の効果：1-飛び降り試験〕

連合学習および記憶パラダイムである飛び降り試験をマウスに実施した。床に36Vの電気格子を装着した反応ボックスに、マウスを個別に入れた。動物が電気ショックを受けた際、それらの正常な反応は絶縁踏み台上に飛び上がって疼痛刺激を避けることである。したがって格子上に飛び降りた動物の大部分は、電気ショックを受けると迅速に飛び上がり踏み台に戻るだろう。0日目に動物を5分間にわたり訓練し、各マウスがショックを受けた回数、すなわち誤りを犯した回数を記録した。このデータは学習データを構成した。マウスを24時間後（1日目、訓練日）および48時間後（2日目、試験日）に再試験して、これらの試行は記憶力テストの役割を果たした。各群でショックを受けた動物数、踏み台からの最初の飛び降りまでの時間（遅延時間）および最初の3分間の誤り回数を記録した。8日目、訓練終結の6日後に、記憶の減退を試験した（休薬試験）。

【0059】

試験は6つの試験群を含んだ（1群あたりn=12）。動物を訓練するのに先だって、全てのマウスに、毎日経口胃管栄養法（10ml/kg）で30日間、試験物質またはビヒクルを投与した。ステビア抽出物を50（低）、150（中）および450（高）mg/kgの3用量で試験する一方、参照物質イチョウ（Ginkgo biloba）は100mg/kgの用量で投与した。薬理学的陽性対照ロリプラム（0.1mg/kg）は、試験の30分前に腹腔内注射によって投与した。

【0060】

誤り率の低下（図2 a）によって示されるように、訓練および記憶期間中、そして休薬期間後に、ステビア処置動物の全群は、ビヒクル処置同腹子（陰性対照）と比べて顕著により良い学習および記憶能力を示した。さらに訓練期間中、ステビア処置マウス（50 mg/kg）は、基準化合物イチョウ（Ginkgo biloba）を投与されたマウスと同様に成績が良く、ロリプラム処置マウスよりも成績が良かった。試験期間中、3用量のステビア抽出物は全て、イチョウ処置およびロリプラム処置マウスの双方で観察されたのと同様の成績をもたらした。休薬期間中、低および中用量のステビア抽出物を投与されたマウスは、参照物質で処置されたマウスおよび陽性対照と同様に成績が良かった一方、最高用量のステビアは、イチョウ処置マウスで見られたのよりも顕著により良い成績をもたらした。

10

【0061】

試験期間中、遅延時間は中用量のステビア抽出物を投与されたマウスで、ビヒクル処置対照マウスに比べて顕著に増大した。さらにこの効果は、ロリプラム処置マウスで観察されたものと同等であった。休薬期間中、最高用量のステビア抽出物は、ビヒクル処置対照マウスおよびイチョウ（ginkgo biloba）抽出物を投与されたマウスの双方と比較して、遅延に顕著な増大を誘発した（図2 b）。

【0062】

したがって要約するとステビア抽出物は、天然参照物質イチョウ（ginkgo biloba）、および医薬品陽性対照化合物ロリプラムと同様に、またはそれ以上に学習および記憶能力を改善させた。

20

【0063】

図2 a：飛び降り試験における誤り率。a：訓練期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。b：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。c：休薬期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。d：休薬期間中、イチョウ（ginkgo biloba）処置マウスと有意差がある。いかなる場合でも有意性は $p < 0.05$ として示される。これらのデータは、ステビア処置マウスがその他の群よりもさらに良く学習しただけでなく、記憶をより長期間保ったことを示す。

【0064】

図2 bは、飛び降り行動試験の結果；電気ショックを回避するまでの遅延時間を示す。b：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。c：休薬期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。d：休薬期間中、イチョウ（ginkgo biloba）処置マウスと有意差がある。いかなる場合でも有意性は $p < 0.05$ として示される。したがって150 mg/kgステビア抽出物で処置されたマウスは、それらの年齢をマッチさせた対照よりも顕著により良い学習および記憶能力を示す一方、最高用量ではステビア処置マウスは、年齢をマッチさせた対照マウスおよびイチョウ（ginkgo biloba）処置陽性対照のどちらよりも成績がより良かった。

30

【0065】

[実施例5]

[3つの伝統的な齧歯類学習および記憶モデルにおけるステビア抽出物の効果：2-モリス水迷路]

40

モリス水迷路は、齧歯類において空間記憶を試験するための最も良く認められたパラダイムの1つである。マウスは、実験室内の視覚的手がかりの助けを借りて、丸いプール内で泳いで隠れた踏み台を探し出さなくてはならない。

【0066】

飛び降り試験パラダイムと同一の用量および処置時間をここでも用いた。

【0067】

この研究では、北西四分円（時計の10時方向）でプールの縁から10 cmに位置する隠れた踏み台（10 cm×10 cm）を含むモリス水迷路（直径=1.5 m）を使用した

50

。0日目にマウスを試験アリーナに順応させて、訓練トライアルを2回受けさせ、その間に踏み台に向かって泳ぐように訓練した。

【0068】

1～3日目に踏み台を水迷路から除去し、マウスに1日に2回訓練トライアルを受けさせた。各トライアル（90秒間）後、踏み台を同一位置に戻してマウスにそれを探させて、上に登らせた。この手順は、マウスが各訓練日に踏み台の位置を効率的に学習し、引き続くトライアル中に踏み台の位置を思い出すことを確実にした。踏み台があった領域を最初に探し出すまでの時間（踏み台初回横断時間；FCPT）、およびマウスが踏み台があった領域を泳ぎ渡った回数（横断回数）を記録して、各訓練日の平均スコアを提供した（1～3日目：訓練スコア）。4日目にマウスにトライアルをさらに2回受けさせ、その結果が試験スコアであった。

10

【0069】

訓練セッション1日目には、最低用量のステビアを投与されたマウスは、ビヒクル処置対照マウスおよび陽性対照化合物ロリプラムを投与されたマウスよりも成績が顕著により良かった（図3a）。4日目、試験トライアル中に、中および高用量のステビアで処置されたマウスは、年齢をマッチさせた対照動物と比較して、顕著により短い遅延時間を示した（図3b）。したがってこれらのデータは、ステビア抽出物による処置がマウスの学習および記憶能力双方に影響を与え、この影響が使用された用量に依存したことを示す。

【0070】

図3aは訓練期間中にモリス水迷路において隠れた踏み台の以前の位置を探し出すまでの遅延時間を示す。a：初日におけるビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子との有意差は、低用量ステビア抽出物（50mg/kg）での処置抽出物が動物の学習能力を顕著に改善することを強調する。有意性は $p < 0.05$ として示される。

20

【0071】

図3bは試験日（4日目）にモリス水迷路において隠れた踏み台の以前の位置を探し出すまでの遅延時間を示す。a：ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差があり、中（150mg/kg）および高（450mg/kg）用量のステビア抽出物による処置が、参照物質のイチョウ（ginkgo biloba）を投与されたマウスで観察されたのと同程度に、そしてロリプラム処置動物よりもさらに良く動物の記憶能力を顕著に改善したことが示される。有意性は $p < 0.05$ として示される。

30

【0072】

[実施例6]

[3つの伝統的な齧歯類学習および記憶モデルにおけるステビア抽出物の効果：3シャトルボックス試験]

この動物試験の根底にあるパラダイムは、有害刺激の能動的回避である。シャトルボックスの一部に電気ショックを送達する格子を装着した。聴覚信号（電子音、7秒間持続）が電気ショックに先行する。動物はシャトルボックスの向こう側に避難することを学習しなくてはならず、それによって赤外線を横断する。

【0073】

飛び降り試験パラダイムと同一の用量および処置時間をここでも用いた。

40

【0074】

マウスを5日間にわたり1日1回訓練した。訓練プログラムは15回のセッションを構成し、各セッションは次を含んだ。（1）15秒間の休止、（2）7秒間の聴覚信号（電子音期間）、および（3）8秒間の電気ショック（刺激期間）。電子音または刺激期間にマウスがシャトルボックスの両側にある2本の赤外線の1つ本を横切ったら、次のセッションに進む。能動的回避時間（電子音期間）および受動的回避時間（刺激期間）を記録して、総回避時間を計算した。マウスが電子音期間内に赤外線光線を横断しなかったら、それは誤りとして記録された。4日目に記録された誤りおよび回避時間を訓練スコアとし、5日目を試験スコア、および8日目を消去スコアとした。

【0075】

50

試験期間中（5日目）、最高用量のステビア抽出物は、ビヒクル処置対照マウスと比較して顕著により少ない誤りを誘発した。誤り率に対する影響は、ロリプラム処置陽性対照マウスで観察されたのと同等であった。さらに中および高用量のステビア抽出物は、ビヒクル処置およびイチョウ処置マウスの双方と比較して回避時間を顕著に低下させた。したがってこれらのデータは、ここでもまたステビア抽出物による処置がマウスの学習能力に影響を与えること、しかしこの効果が使用された用量に依存することを示唆する。

【0076】

図4aはシャトルボックス試験における誤り率を示す。a：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。b：消去期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。有意性は $p < 0.05$ として示される。したがって試験期間中、調べた最高用量では、ステビア処置動物はビヒクル処置同腹子よりも顕著により良く、陽性対照化合物ロリプラムを投与されたマウスと同等の能力を示した。

10

【0077】

図4bはシャトルボックス試験における回避時間を示す。a：試験期間中、ビヒクル処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。b：試験期間中、イチョウ（Ginkgo biloba）処置して年齢をマッチさせた同腹子と有意差がある。有意性は $p < 0.05$ として示される。これらの結果は、ステビア処置（用量150および450mg/kg）マウスが、脚ショックの回避を学習したことを示し、それらの能力はビヒクル処置対照マウス、および参照物質イチョウ（Ginkgo biloba）投与マウスのどちらよりも良かった。

20

【0078】

[実施例7]

[新しい完全自動化された学習および記憶の齧歯類モデルにおけるステビア抽出物の影響]

ホームケージ様環境内において、トランスポンダー装着マウスの自発的および学習行動の自動モニタリングができるようにするシステムであるIntelliCage（登録商標）内で、ステビア抽出物またはイチョウ（Ginkgo biloba）で処置されたマウスの認知能力をビヒクル処置した年齢をマッチさせた対照と比較した（スイス国チューリッヒのNew Behavior AG、www.newbehavior.com；Galsworthyら 2005年、Behav Brain Res 157:211~217；Onishchenkoら 2007年、Toxicol Sci 97:428~437）。個々のマウスは、マウスの首筋に埋め込まれたトランスポンダー（参照識別票）を読み取るIntelliCage四隅のセンサーによって認識される。各IntelliCage（登録商標）は、本質的に大型ケージ（37.5×55×20.5cm）であり、その中に4つの記録（オペラント）チャンバーを含んでなる金属フレームが入れられる。記録チャンバーはケージの四隅に収められ、それぞれ15×15×21cmの床領域の直角三角形領域をカバーする。ケージ内アンテナが個々のマウス毎のコーナー訪問の自動モニタリングを可能にし、各コーナー内の光線が個々のノーズポークおよび給水瓶口のリッキングの自動記録を可能にする。4個の三角形マウスシェルターがケージ中央に配置され、その上には餌に自由にアクセスできるようにする給餌ホッパーが位置している。

30

40

【0079】

各記録チャンバーは、次を含んでなる。（1）チャンバーへの入口の役割を果たし、コーナー訪問を記録する環状アンテナを収容するプラスチック環（内径30mm）、（2）マウスがチャンバーに入ったらその上に座る格子床、（3）給水瓶口にアクセスできるようにする2つの円形開口部（13mm径）、ノーズポークを記録する光線が各開口部を横切っている、（4）給水瓶口へのアクセスを許可する（ドア開放）または禁止する（ドア閉鎖）2つの電動式ドア、（5）2本の給水瓶、（6）それを通じて空気の吹き付けが嫌悪刺激として送達できる管、（7）馴化実験に使用できる異なる色の光ダイオード。

【0080】

50

[実験期間]

研究は、ビヒクル（対照）、イチョウ（*Ginkgo biloba*）（ $100\text{mg}/\text{kg}$ ）、およびステビア抽出物（ $450\text{mg}/\text{kg}$ ）の3つの試験群を含んだ（1群あたり $n=12\sim14$ ）。8週間の研究期間全体を通じて、全てのマウスに毎日経口胃管栄養法（ $10\text{ml}/\text{kg}$ ）で試験物質またはビヒクルを投与した。

【0081】

順化期間（4～5日間）中、マウスは全てのコーナー、水および餌に自由にアクセスでき、ケージを自由に探索できた。引き続いて、マウスはノーズポークを利用することを学ばねばならない（ノーズポーク順化モジュール、3日間）。最初は全てのドアが閉じられ（水へのアクセスが禁じられ）、マウスはドアを開けて給水瓶口に到達するためにノーズポークを行わなければならなかった。収集されたデータは、個々のマウスが最も好まないコーナーなどのいくつかのパラメーターを含んでなり、それは次のモジュールのプログラミングのために記録された。

【0082】

[物体認識]

マウスの内在性探索活動を試験するために、それぞれ各群が最も好まないコーナーを含む、コーナー1および2内またはコーナー3および4内のどちらかに2つの同一の物体を置いた。動物にはケージを自由に探索する機会があり、水と餌への完全アクセスがあった。物体提示の3時間前および3時間後に訪問を記録した。コーナー1および2内の物体提示後、対照群の訪問パターンが変化しなかったのに対し、イチョウおよびステビア処置の双方は、新しい物体が入れられたコーナーの訪問の長さに顕著な増大をもたらした（それぞれコーナー4および2）（図5）。したがってステビア抽出物の慢性投与は、イチョウ（*Ginkgo biloba*）と同程度にマウスの探索活動を顕著に増大した。

【0083】

図5は物体提示の3時間前および3時間後の各コーナーの滞在時間を示す。矢印は物体の配置を表す。イチョウ（*Ginkgo biloba*）およびステビア抽出物は、ビヒクル処置対照マウスと比較して、新しい物体が入れられたコーナーの訪問時間を顕著に増大した（それぞれ $p=0.004$ および $p=0.005$ ）。したがってどちらの処置も物体認識試験におけるマウスの探索活動を顕著に増大した。

【0084】

[側面識別]

このモジュールは、注意力および連想記憶を試験するようにデザインされた。各マウス毎に1つの正解コーナーを割り当てた。このコーナー中の（両側中の）片側だけを正解と指定して、緑色LEDによって動物に示した。正解側面において、動物はノーズポークし引き続いて給水瓶から飲むことができた。このモジュール中に、場所の誤り（すなわち不正確なコーナー訪問の百分率）および側面の誤り（すなわち正確なコーナーの不正確な側面のノーズポークの百分率）を記録した。

【0085】

試験の最初の12時間（活動期）全体を通じて、場所誤り率（図6）および側面誤り率（図7）の双方が、ビヒクル処置およびイチョウ処置マウスのどちらよりも顕著に低かったことから、これらのデータはステビア抽出物での慢性処置に続く改善された注意力を示唆する。

【0086】

図6は、場所誤り率（不正確なコーナー訪問の百分率）を示す。ステビア抽出物処置は、ビヒクル処置対照マウスおよびイチョウ（*Ginkgo biloba*）を投与されたマウスの双方と比較して、顕著により低い%誤り率をもたらした（それぞれ $p=0.012$ および $p=0.017$ ）。この効果はモジュール開始時から観察され、最初の12時間（活動期）全体を通じて保たれ、ステビアでの処置がより高レベルの注意力および改善された記憶能力をもたらすことが実証された。

【0087】

図7は側面誤り率（正確なコーナーの不正確な側面のノーズポークの百分率）を示す。ステビア抽出物はここでもまた、ビヒクル処置対照およびイチョウ処置マウスの双方と比較して、顕著により低い%誤り率を誘発する（それぞれ $p = 0.002$ および $p = 0.035$ ）。この効果はモジュール開始時から観察され、最初の12時間（活動期）全体を通じて保たれ、ステビア処置マウスにおける改善された注意力および記憶が示唆される。

【0088】

要約すれば、自動化 IntelliCage（登録商標）研究からの結果は古典的試験（実施例4、5、および6）からの行動結果を確認し、8週間にわたるステビア抽出物の処置は、マウスにおいてビヒクル処置同腹子と比べて学習および記憶の顕著な改善をもたらした。場合によってはステビア処置マウスで見られた能力の改善は、天然参照物質であるイチョウ（*Ginkgo biloba*）、または医薬品陽性対照化合物であるロリプラムのどちらかを投与されたマウスで観察されたものよりなお大きかった。

【0089】

[実施例8]

[軟質ゼラチンカプセルの調製]

次の成分を含んでなる軟質ゼラチンカプセルを調製してもよい。

【0090】

【表4】

成分	カプセルあたりの量
ステビア抽出物(凍結乾燥/噴霧乾燥)	200mg
レシチン	50mg
ダイズ油	250mg

【0091】

成人に3ヶ月間にわたり1日あたり2個のカプセルを投与してもよい。認知機能、敏捷性、および作業集中能力が改善される。

【0092】

[実施例9]

[即席フレーバー清涼飲料の調製]

【0093】

【表5】

成分	量 [g]
ステビア抽出物	0.5
スクロース、微粉	763.1
アスコルビン酸、微粉	2.0
無水クエン酸粉末	55.0
レモン香料	8.0
無水クエン酸三ナトリウム粉末	6.0
三カルシウムリン酸	5.0
スイス国カイザーアウグストの DNP AG からの β カロテン 1%CWS	0.4
総量	840

【0094】

全成分を混合して、500 μ mの篩を通して篩掛けする。得られた粉末を適切な容器に入れて、管状ブレンダー内で少なくとも20分間混合する。飲料を調製するためには、得られた混合粉末の105gを十分な水と混合して1リットルの飲料を生成する。

【0095】

即席清涼飲料は、1食あたり(250ml)約15mgの濃縮ステビア抽出物を含有する。強化剤として、そして一般的な健康のために、1日あたり2食(500ml)を飲用してもよい。認知機能、敏捷性、および作業集中能力が改善される。

【0096】

[実施例10]

[強化ノンベークドシリアルバーの調製]

【0097】

【表6】

成分	量 [g]
ステビア抽出物	0.3
水	54.0
塩	1.5
グルコースシロップ	130.0
転化糖シロップ	95.0
ソルビトールシロップ	35.0
パーム核脂肪	60.0
ベーキング油脂	40.0
レシチン	1.7
硬化パーム油	2.5
乾燥カットリンゴ	63.0
コーンフレーク	100.0
ライスクリスピー	120.0
小麦クリスピー	90.0
煎りヘーゼルナッツ	40.0
脱脂粉乳	45.0
リンゴ香料 74863-33	2.0
クエン酸	5.0
総量	885

【0098】

濃縮ステビア抽出物を脱脂粉乳と予混合して、遊星形ボールミキサーに入れる。コーンフレークおよびライスクリスピーを添加して、全てを穏やかに混合する。次に乾燥カットリンゴを添加する。1つの調理鍋中で、水、および塩を上掲の量で混合する(溶液1)。第2の調理鍋中で、グルコース、転化糖シロップ、およびソルビトールシロップを上掲の量で混合する(溶液2)。脂肪層はベーキング油脂、パーム核油、レシチン、および乳化剤の混合物から構成される。溶液1を110℃に加熱する。溶液2を113℃に加熱して、次に冷水浴中で冷却する。引き続いて溶液1および2を合わせる。脂肪相を水浴中で75℃で溶解し、次に溶液1および2を合わせた混合物に添加する。リンゴ香料およびクエン酸を液体糖/脂肪ミックスに添加する。液塊を乾燥成分に添加して、遊星形ボールミキサー内で良く混合する。塊を大理石板上にのせて、所望の厚さに伸ばす。塊を室温に冷却

して裁断する。ノンベークドシリアルバーは、一食（30 g）あたり約10 mgの濃縮ステビア抽出物を含有する。総体的健康および元気づけのために、1日あたり1～2個のシリアルバーを摂食してもよい。認知機能、敏捷性、および作業集中能力が改善される。

【0099】

[実施例11]

[ステビア抽出物を含有する乾燥ドッグフード]

市販のイヌ用基礎食（例えばMERA-Tiernahrung GmbH, Marienstrasse 80-84, D-47625 Kevelaer-Wetten, GermanyからのMera Dog「Brocken」）に、ビタミンC（例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX（登録商標）C-EC）およびその誘導体、すなわち一リン酸アスコルビルナトリウム（例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのSTAY-C（登録商標）50）またはL-アスコルビン酸ナトリウム／カルシウムの三リン酸、二リン酸、および一リン酸エステルの混合物（例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX（登録商標）STAY-C（登録商標）35）などの抗酸化剤と共に、体重1 kgあたり4 mgのステビア抽出物の1日量をイヌに投与するのに十分な量で、ステビア抽出物水溶液を噴霧する。約90重量%の乾燥物質を含有するように、食品組成物を乾燥させる。1日あたりおよそ200 gの乾燥ドッグフードを消費する体重10 kgの平均的なイヌでは、ドッグフードは1 kgあたりおよそ200 mgのステビア抽出物を含有する。より体重の重いイヌでは、飼料混合物を適宜調製する。イヌのストレス、恐怖、および攻撃性の低減のために、動物保護施設のイヌにドッグフードを定期的に与えることができる。動物病院の受診、または動物病院への滞在、または休暇中の別離前には、少なくとも1週間前、ストレス性の事象の最中、そしてその後1週間、ドッグフードを与えることができる。

【0100】

[実施例12]

[ステビア抽出物を含有する湿潤キャットフード]

市販のネコ用基礎食（例えばHappy Cat「Adult」, Tierfeinnahrung, Suedliche Hauptstrasse 38, D-86517 Wehringen, Germany）に、ビタミンC（例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX（登録商標）C-EC）およびその誘導体、すなわち一リン酸アスコルビルナトリウム（例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのSTAY-C（登録商標）50）またはL-アスコルビン酸ナトリウム／カルシウムの三リン酸、二リン酸、および一リン酸エステルの混合物（例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX（登録商標）STAY-C（登録商標）35）などの抗酸化剤と共に、体重1 kgあたり4 mgのステビア抽出物の1日量をネコに投与するのに十分な量で、ステビア抽出物水溶液を混合する。およそ400 gの湿潤キャットフードを消費する体重5 kgの平均的なネコでは、キャットフードは1 kgあたりおよそ50 mgのステビア抽出物を含有する。約90重量%の乾燥物質を含有するように、食品組成物を乾燥させる。ネコのストレス、恐怖、および攻撃性の低減のために、動物保護施設のネコにキャットフードを定期的に与えることができる。動物病院の受診、または動物病院への滞在前には、少なくとも1週間前、ストレス性の事象の最中、そしてその後1週間、キャットフードを与えることができる。

【0101】

[実施例13]

[ステビア抽出物を含有するイヌのおやつ]

市販のイヌのおやつ（例えばMera-Tiernahrung GmbH, Mari

10

20

30

40

50

enstrasse 80-84, 47625 Kevelaer-Wetten, Germanyが供給するMera Dog「Biscuit」)に、ビタミンC(例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX(登録商標)C-EC)およびその誘導体、すなわちーリン酸アスコルビルナトリウム(例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのSTAY-C(登録商標)50)またはL-アスコルビン酸ナトリウム/カルシウムの三リン酸、二リン酸、およびーリン酸エステルの混合物(例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX(登録商標)STAY-C(登録商標)35)などの抗酸化剤と共に、おやつ1gあたりが0.5~5mgのステビア抽出物を投与するのに十分な量で、ステビア抽出物水溶液を噴霧する。約90重量%の乾燥物質を含有するように、食品組成物を乾燥させる。恐怖および緊張を低下させるために、日中ドッグフードに加えて、または給餌が保証されない場合、すなわち旅行中に1日5回まで、おやつを与えることができる。

10

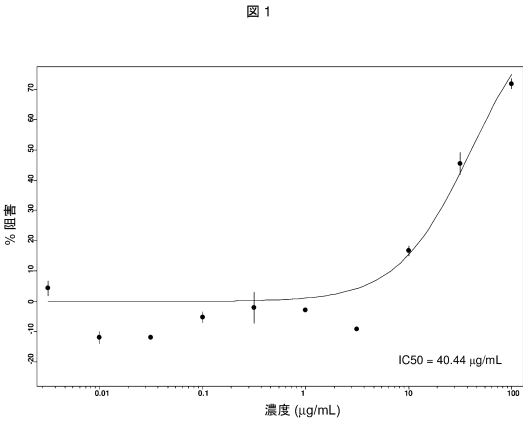
【0102】**[実施例14]****[ステビア抽出物を含有するネコのおやつ]**

市販のネコのおやつ(例えばWhiskas, Masterfoods GmbH, Eitzer Str. 215, 27283 Verden/Aller, Germanyが供給するWhiskas Dentabits)に、ビタミンC(例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX(登録商標)C-EC)およびその誘導体、すなわちーリン酸アスコルビルナトリウム(例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのSTAY-C(登録商標)50)またはL-アスコルビン酸ナトリウム/カルシウムの三リン酸、二リン酸、およびーリン酸エステルの混合物(例えばスイス国カイザーアウグストのDSM Nutritional Products Ltd. からのROVIMIX(登録商標)STAY-C(登録商標)35)などの抗酸化剤と共に、おやつ1gあたりが0.5~5mgのステビア抽出物を投与するのに十分な量で、ステビア抽出物水溶液を噴霧する。約90重量%の乾燥物質を含有するように、食品組成物を乾燥させる。恐怖および緊張を低下させるために、日中キャットフードに加えて、または給餌が保証されない場合、すなわち旅行中に1日5回まで、おやつを与えることができる。

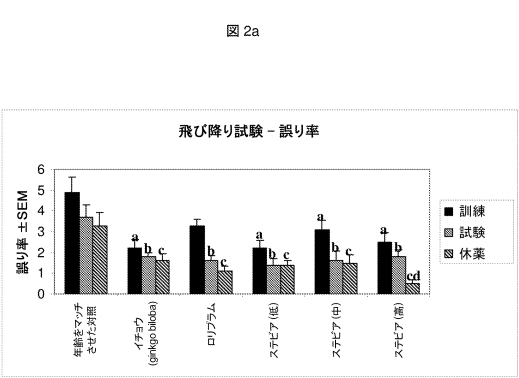
20

30

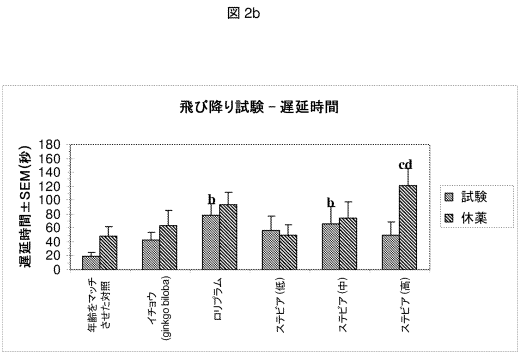
【図 1】



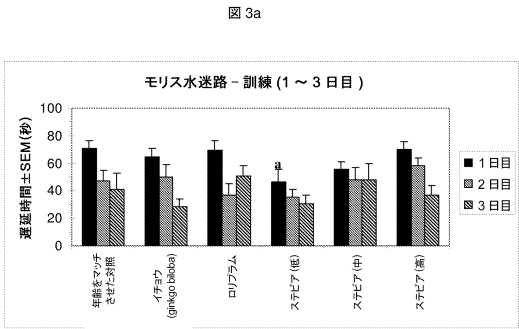
【図 2 a】



【図 2 b】

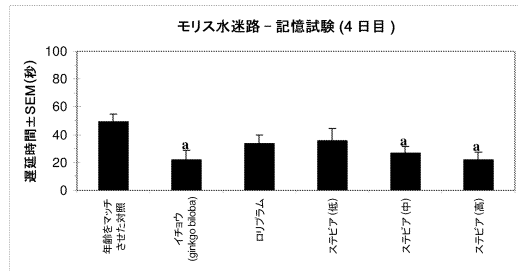


【図 3 a】



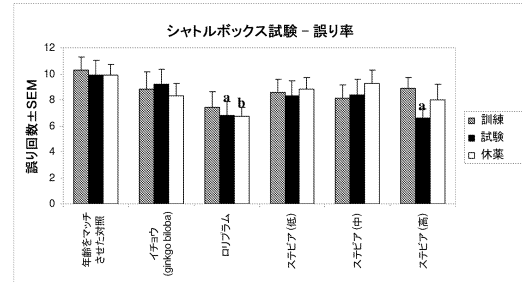
【図 3 b】

図 3b



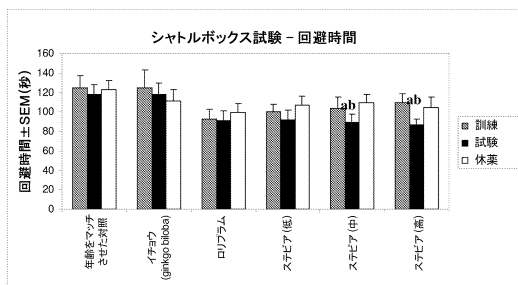
【図 4 a】

図 4a



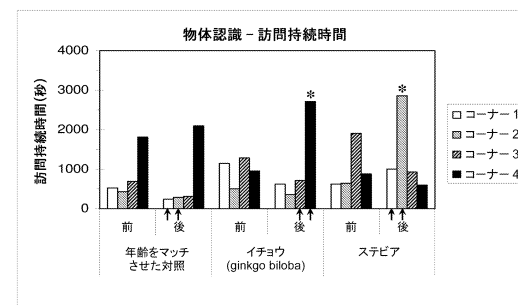
【図 4 b】

図 4b



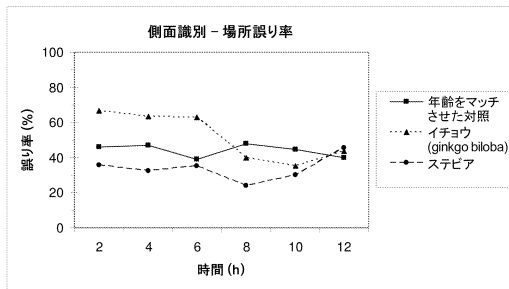
【図 5】

図 5



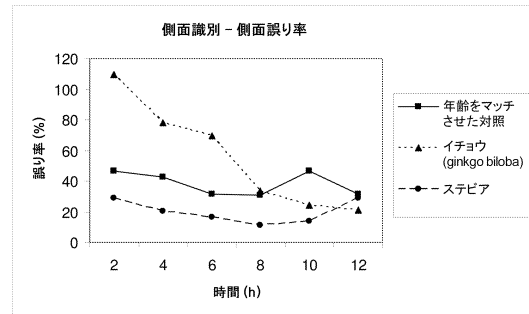
【図 6】

図 6



【図 7】

図 7



フロントページの続き

- (74)代理人 100152191
弁理士 池田 正人
- (72)発明者 フォウラー, アン
スイス, シーエイチ - 4 3 1 0 ラインフェルデン, マークトガッセ 8 シー
- (72)発明者 ゴラルチュク, レジーナ
ドイツ, 7 9 6 3 9 グレツァッハ - ヴィーレン, アルメントヴェーク 7
- (72)発明者 キルペルト, クラウス
ドイツ, 6 8 3 0 5 マンハイム, エッシェンホフ 5
- (72)発明者 メイン - メシヤン, アニス, オリビア
スイス, シーエイチ - 4 3 1 3 モーリン, アホルンシュトラーセ 1
- (72)発明者 モハジェリ, ハサン
スイス, シーエイチ - 8 1 3 2 エッグ ビー. チューリッヒ, ビュエルシュトラーセ 4
5
- (72)発明者 ムスラー, ベルン
ドイツ, 7 7 9 3 3 ラール, アルト バンホフシュトラーセ 1 4
- (72)発明者 ヴァイス, エイドリアン
スイス, シーエイチ - 4 0 5 2 バーゼル, シャウエンブルゲルシュトラーセ 1 0

審査官 田中 耕一郎

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0224292 (US, A1)
特開2001-192342 (JP, A)
特開2004-344071 (JP, A)
米国特許出願公開第2007/0116840 (US, A1)
特表2002-528063 (JP, A)
国際公開第2005/089782 (WO, A1)
中国特許出願公開第101024082 (CN, A)
中国特許出願公開第101049435 (CN, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - A 6 1 K 3 3 / 4 4
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)