

(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2014-501536

(P2014-501536A)

(43) 公表日 平成26年1月23日 (2014.1.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 K 1/18 (2006.01)	A 2 3 K 1/18 A	2 B 0 0 5
A 2 3 K 1/16 (2006.01)	A 2 3 K 1/16 3 O 1 C	2 B 1 5 0
	A 2 3 K 1/16 3 O 1 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2013-548631 (P2013-548631)	(71) 出願人	595056859
(86) (22) 出願日	平成24年1月11日 (2012.1.11)		ザ・アイムス・カンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成25年7月8日 (2013.7.8)		The Iams Company
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/020852		アメリカ合衆国オハイオ州45202, シンシナティ, ワン・プロクター・アンド・ギャンブル・ブラザ
(87) 国際公開番号	W02012/097018		
(87) 国際公開日	平成24年7月19日 (2012.7.19)	(74) 代理人	100117787
(31) 優先権主張番号	61/432, 627		弁理士 勝沼 宏仁
(32) 優先日	平成23年1月14日 (2011.1.14)	(74) 代理人	100091487
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100109841
			弁理士 堅田 健史
		(74) 代理人	100120617
			弁理士 浅野 真理

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カロチノイドに関連する組成物及び方法

(57) 【要約】

少なくとも2種のカロチノイドを有するペットフード組成物。このカロチノイドは、ケトーカロチノイド及び少なくとも1種の非ケトーカロチノイドを含み得る。ケトーカロチノイドは、アスタキサンチンを含み得る。ケトーカロチノイドは、アスタキサンチンエステルを含み得る。非ケトーカロチノイドは、β-カロチン及び／又はルテインを含み得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 3 種のカロチノイドを含むペットフード組成物であって、前記少なくとも 3 種のカロチノイドが、ケトーカロチノイド、第 1 の非ケトーカロチノイド、及び第 2 の非ケトーカロチノイドを含む、ペットフード組成物。

【請求項 2】

前記ケトーカロチノイドが、アスタキサンチンを含む、請求項 1 に記載のペットフード組成物。

【請求項 3】

前記ケトーカロチノイドが、アスタキサンチンエステルを含む、請求項 1 に記載のペットフード組成物。

【請求項 4】

前記第 1 の非ケトーカロチノイドが β -カロチンを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 5】

前記第 2 の非ケトーカロチノイドがルテインを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 6】

前記ケトーカロチノイドが、カロチノイドの約 0.1 重量%～約 25 重量%で存在し、前記第 1 の非ケトーカロチノイドが、カロチノイドの最大で約 99.9 重量%で存在し、前記第 2 の非ケトーカロチノイドが、カロチノイドの最大で約 99.9 重量%で存在する、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 7】

前記ペットフード組成物が、栄養的にバランスの取れたキブル、栄養補助食品、ペットスナック、ビスケット、湿潤組成物、並びにこれらの組み合わせ及び混合物からなる群から選択される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 8】

β -カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンを含み、前記 β -カロチン対ルテイン対アスタキサンチンの比率が、約 1 : 1 : 0.6 ～ 約 10 : 1 : 3.5 である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 9】

β -カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンを含み、前記 β -カロチン対ルテイン対アスタキサンチンの比率が、約 1 : 1 : 0.6 ～ 約 1 : 10 : 3.5 である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 10】

β -カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンを含み、前記 β -カロチン対ルテイン対アスタキサンチンの比率が、約 1 : 1 : 0.002 ～ 約 10 : 1 : 0.01 である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 11】

β -カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンを含み、前記 β -カロチン対ルテイン対アスタキサンチンの比率が、約 1 : 1 : 0.002 ～ 約 1 : 10 : 0.01 である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【請求項 12】

少なくとも 2 種のカロチノイドを含むペットフード組成物であって、前記 2 種のカロチノイドは、アスタキサンチン、アスタキサンチンエステル、又はこれらの組み合わせのいずれか、及び非ケトーカロチノイドを含む、ペットフード組成物。

【請求項 13】

前記非ケトーカロチノイドが β -カロチンを含む、請求項 12 に記載のペットフード組成物。

【請求項 14】

前記非ーケトーカロチノイドがルテインを含む、請求項 1 2 又は 1 3 に記載のペットフード。

【請求項 1 5】

前記非ーケトーカロチノイドとアスタキサンチンとの比率が、約 2 5 : 7 5 ~ 約 9 0 : 1 0 である、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載のペットフード組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明の実施形態は、カロチノイドを使用する組成物及び方法に関する。更に詳しくは、限定するものではないが、本発明の実施形態は、カロチノイドの生物学的利用能を増加させるペットフード組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

食餌からのカロチノイドの生物学的利用能は、種々のカロチノイドの物理化学特性（遊離型対エステル型；炭化水素型対酸化型）；物理状態（結晶性対タンパク質結合性対油中可溶性）；脂肪及び繊維の量や種類などの食餌要素；被験者の栄養学的及び生理学的状態、及び遺伝子型などの多くの要素に影響を受けることがある。更に、腸管レベルでのカロチノイドの相互作用によって、いずれかのカロチノイドの吸収が減少され得る。ミセル取り込み、腸取り込み、リンパ輸送、又は 1 つを超えるレベルにおいて、吸収に関しての競争が起こり得る。例えば、β-カロチンは、ルテイン吸収を減少させるが、ルテインは、あるヒト被験者においてβ-カロチン吸収を減少させ、他の患者においては上昇させることが報告されている（Kostic D, White WS, Olson JA. Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and β-carotene when administered to human adults in separated or combined oral doses. Am J Clin Nutr. 1995; 62: 604~610 を参照）。その他の研究では、ルテインはヒト被験者におけるβ-カロチン吸収を削減するが、カイロミクロン中のレチニルエステルの分泌に影響を与えない（van den Berg H, van Vliet T. Effect of simultaneous, single oral dose of β-carotene with lutein or lycopene on the β-carotene and retinyl ester responses in the triglyceride-rich fraction of men. Am J Clin Nutr 1998; 68: 82~89 を参照）。それとは対照的に、β-カロチン吸収は、これらの被験者におけるリコピンに影響を受けない。ヒト及び動物の血漿における食後の外観に影響する純カロチノイド間の相互作用における、更なる報告が、van den Berg によってなされている（van den Berg H. Carotenoid interactions. Nutr Rev. 1999; 57: 1~10 を参照）。Tyssandierらは、食品が単独で投与される際、単一の野菜からのβ-カロチン、ルテイン、及びリコピンの吸収は、カロチノイドが豊富な第 2 の野菜又は第 2 の野菜において豊富化される精製カロチノイドのいずれかと一緒に投与される際よりも多いことが報告されている（Tyssandier V, Reboul E, Dumas J, Bouteiloup-Demange C, Arm and M, Marcand J, Sallas M, Borel P. Processing of vegetable-borne carotenoids in human stomach and duodenum. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol). 2003; 284: G913~G922 を参照）。

【0 0 0 3】

初期の研究では、イヌ科動物及び飼いネコの双方は、食餌からカロチンを吸収すること

10

20

30

40

50

ができないことが報告されている (Goodwin T. Mammalian carotenoids. In: Goodwin TW, ed. The comparative biochemistry of the carotenoids. London: Chapman and Hall Ltd., 1952; 229~269)。近年、いくつかの系統的な研究によって、イヌとネコがβ-カロチン及びルテインを吸収することができることが示されている (Weng BC, Chew BP, Park JS, Wong TS, Combs RL, Hayek MG, Reinhart GA. β-Carotene uptake by blood plasma and leukocytes in dogs. FASEB J 1997; 11: A180. Kim HW, Chew BP, Wong TS, Park JS, Weng BB, Byrne KM, Hayek MG, Reinhart GA. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. Vet Immunol Immunopathol. 2000 May 23; 74 (3~4): 315~27. Chew BP, Weng BC, Park JS, Wong TS, Combs RL, Hayek MG, Reinhart GA. Uptake of β-carotene by blood plasma and lymphocytes in cats. FASEB J 1997; 11: A447. Kim, H. W., Chew, B. P., Wong, T. S., Park, J. S., Weng, B. C., Byrne, K. M., Hayek, M. G. & Reinhart, G. A. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. Vet. Immunol. Immunopath. 2000, 73: 331~341)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、イヌとネコにおいて、カロチノイドがどのように相互作用するかは分かっていない。個々のカロチノイドは、イヌとネコの健康に寄与する潜在的な役割を有すると思われるため、コンパニオンアニマルに使用される際に、カロチノイド間に有益な効果があることが望ましい。したがって、製品は、これらのカロチノイドの吸収に良い影響を与える方法で、カロチノイドを組み込むことが望ましい。また、かかる製品は動物においてより有益な効果を示し得る。

【課題を解決するための手段】

【0005】

1つの実施形態では、少なくとも3種のカロチノイドを含むペットフード組成物が開示されている。カロチノイドは、ケト-カロチノイド、第1の非-ケト-カロチノイド、及び第2の非-ケト-カロチノイドを含み得る。ケト-カロチノイドは、アスタキサンチンを含み得る。ケト-カロチノイドは、アスタキサンチンエステルを含み得る。第1の非-ケト-カロチノイドは、β-カロチンを含み得る。第2の非-ケト-カロチノイドは、ルテインを含み得る。ケト-カロチノイドは、カロチノイドの約0.1重量%~約25重量%で存在し、第1の非-ケト-カロチノイドは、カロチノイドの最大で約99.9重量%で存在し、第2の非-ケト-カロチノイドは、カロチノイドの最大で約99.9重量%で存在し得る。ペットフード組成物は、栄養的にバランスの取れたキブル、栄養補助食品、ペットスナック、ビスケット、湿潤組成物、並びに及びこれらの組み合わせ及び混合物からなる群から選択され得る。

【0006】

その他の実施形態では、少なくとも2種のカロチノイドを含み得るペットフード組成物が開示されている。2種のカロチノイドは、アスタキサンチン又はアスタキサンチンエステル、及び非-ケト-カロチノイドのいずれかを含み得る。非-ケト-カロチノイドは、β-カロチン又はルテインを含み得る。非-ケト-カロチノイド対アスタキサンチンの比

率は、約 25 : 75 ~ 約 90 : 10 であり得る。ペットフード組成物は、栄養的にバランスの取れたキブル、栄養補助食品、ペットスナック、ビスケット、湿潤組成物、並びに及びこれらの組み合わせ及び混合物からなる群から選択され得る。

【0007】

他の実施形態では、コンパニオンアニマルにおける非ーケトーカロチノイドの生物学的利用能を上昇させる方法が開示されている。この方法は、コンパニオンアニマルにペットフード組成物を投与する工程を含み、この投与工程は、毎日約 2 mg ~ 約 100 mg のカロチノイドをコンパニオンアニマルに送達するように行われる。

【発明を実施するための形態】

【0008】

用語の定義

本明細書において使用するとき、「the」、「a」及び「an」を含む冠詞は、特許請求の範囲又は明細書において使用される場合、特許請求されるか又は記載されるものの 1 つ以上を意味するものとして理解される。

【0009】

本明細書において使用するとき、「含む (include)」、「含む (includes)」、及び「含んでいる (including)」という用語は、非限定的であることを意味する。

【0010】

本明細書で使用するとき、「複数」という用語は、1 よりも多いことを意味する。

【0011】

本明細書において使用するときの「動物」又は「ペット」なる用語は、これらに限定されるものではないが、飼いイヌ (イヌ科動物)、ネコ (ネコ科動物)、ウマ、ウシ、フェレット、ウサギ、ブタ、ラット、マウス、ジャービル、ハムスター、ウマなどを含む家畜を意味する。飼いイヌ及び飼いネコは、ペットの特定例であり、本明細書においては「コンパニオンアニマル」と称する。本開示を通して、動物、ペット、又はコンパニオンアニマルという用語が使用されるとき、動物、ペット、又はコンパニオンアニマルは、特に指定のない限り、健康状態であると理解されるべきである。

【0012】

本明細書で使用するとき、「動物飼料」、「動物飼料組成物」、「動物飼料キブル」、「ペットフード」又は「ペットフード組成物」という用語はいずれも、ペットによって摂取されることを目的とした組成物を意味する。ペットフードとしては、これらに限定されるものではないが、毎日の食餌に適した栄養的にバランスの取れた組成物、並びに栄養的にバランスが取れていてもいなくともよい湿潤食品、栄養補助食品及び／又はペットスナックを挙げることができる。

【0013】

本明細書で使用するとき、「栄養的にバランスの取れた」という用語は、ペットフードなどの組成物が、更に加える必要のある水を除き、生命を維持するうえで必要とされる既知の栄養素を、ペット栄養分野における、米国食品医薬品局動物薬センター (United States Food and Drug Administration's Center for Veterinarian Medicine)、米国飼料検査官協会 (the American Feed Control Officials Incorporated) などの (ただしこれらに限定されない) 行政機関を含む広く認識された当局の推奨に基づく適切な量及び割合で有することを意味する。

【0014】

本明細書で使用するとき、コンパニオンアニマルに対する「経口投与」という用語は、本明細書の 1 つ以上の組成物を動物が摂取するか、ヒトが動物に与えることを目的としているか、又は動物に与えることを意味する。

【0015】

本明細書で使用するとき、「吸収」という用語は、例えば、コンパニオンアニマルにおいて、食品からの食餌成分 (本明細書に開示されるようなカロチノイドなど) の場合などに、食餌成分が胃腸空間で消化され、拡散のプロセスを通して、腸壁の血管内に入ること

10

20

30

40

50

を意味する。

【0016】

本明細書で使用する時、「生物学的利用能」という用語は、体内で使用又は貯蔵するための食品の食餌成分の吸収を意味する。摂取されるが、消化プロセス中に吸収のために放出はされない食餌成分は、栄養価において制限されない。目的部位に対する摂取された食餌成分及び生理活性代謝産物の送達は、小腸からの吸収に依存する。したがって、生物学的利用能は、食品からの食餌成分の相対的な吸収であるとも見なされ得る。

【0017】

本明細書で使用する時、吸収及び生物学的利用能という用語は互換可能であり得る。

【0018】

本明細書全体にわたって記載されるあらゆる最大数値限定は、それより小さいあらゆる数値限定を、そのような小さい数値限定が本明細書に明示的に記載されたものとして包含すると理解されるべきである。本明細書の全体を通じて与えられる全ての最小数値限定は、それよりも大きい全ての数値限定を、あたかもそれらの大きい数値限定が本明細書に明確に記載されているものと同様にして含むものである。本明細書の全体を通じて与えられる全ての数値範囲は、そのようなより広い数値範囲内に含まれるそれよりも狭い全ての数値範囲を、あたかもそれらのより狭い数値範囲が全て本明細書に明確に記載されているものと同様にして含むものである。

【0019】

品目の全リスト、例えば、成分のリストは、マーカッシュ群として解釈されることを意図しており、またそのように解釈されるべきである。したがって、全てのリストは、... リストの品目... 「からなる群から選択される」品目「並びにこれらの組み合わせ及び混合物」として読んで解釈することができる。

【0020】

本明細書では、本発明の実施形態において使用される異なる成分を含む各成分についてはその商品名で参照している。本明細書において特定の商品名の材料により限定されることは、本発明者らの意図するところではない。本明細書の説明文中において、商品名によって参照される材料と同等の材料（例えば、異なる名称又は参照符合で異なる供給源から得られるもの）に置き換えて使用することもできる。

【0021】

本明細書におけるプロセス、方法、組成物、及び装置は、本明細書に述べられる特徴又は実施形態の任意のものを含むか、これらから基本的になるか、又はこれらからなり得る。

【0022】

本開示の異なる実施形態の説明において、異なる実施形態又は個々の特徴について開示する。当業者には明らかなように、このような実施形態及び特徴の全ての組み合わせが可能であり、本開示の好ましい実施となり得るものである。本発明の様々な実施形態及び個々の特徴について例示及び説明したが、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、他の様々な変更及び改変を行うことが可能である。やはり明らかなことであるが、上記の開示において教示された実施形態及び特徴の全ての組み合わせが可能であり、本発明の好ましい実施となり得るものである。

【0023】

本発明の実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、食餌性カロチノイドの生物学的利用能を上昇させる組成物及び方法に関する。

【0024】

本明細書に記載されるように、β-カロチン、ルテイン、及び／又はアスタキサンチンなどの食餌成分の食品からの吸収とは、食餌成分が胃腸空間で消化され、拡散プロセスを通して、腸壁中の血漿に入ることを意味する。本明細書中で、吸収は生物学的利用能と互換可能に使用することができ、一般的には、食品からの食餌成分の吸収を意味する。摂取

10

20

30

40

50

されるが、消化工程中に吸収のために放出はされない食餌成分には、栄養価において制限されない。目的部位に対する摂取された食餌成分及び生理活性代謝産物の送達は、小腸からの吸収に依存する。したがって、生物学的利用能は、食品からの食餌成分の相対的な吸収であるとも見なされ得る。

【0025】

カロチノイドは、中央の2つのメチル基が1, 6位の関係にあり、残りの非末端メチル基が、1, 5位の関係にあるように、中央を除いて分子に対して対称となるように、ヘッドトウテイル型に結合された8個のイソプレノイド単位からなる炭化水素種である。この構造をもとにして、準系統的番号方式が使用され、カロチノイドは親化合物の誘導体として命名される。IUPACシステムにおいて、構造の末端基を記載するためにギリシャ文字を使用する。水素添加及び基置換の位置は、接頭及び接尾に示される。カロチノイドの大半は、40個の炭素ポリエン鎖から得られ、これは、典型的には分枝の主鎖であると見なされる。この鎖は、環状末端基（環）によって終端し、官能基を含有する酸素で補足され得る。全てのカロチノイドは、以下を含む反応によるリコピン（ $C_{40}H_{56}$ ）誘導体であるとも見なされ得る：（1）水素添加反応、（2）脱水素化反応、（3）環化反応、（4）酸素挿入、（5）二重結合移動、（6）メチル移動、（7）鎖伸長、及び（8）鎖短縮。これらの化学構造をもとにして、カロチノイドは、2つの群：炭素及び水素から構成されるカロチンとして一般的に知られている炭化水素；並びに、炭素、水素、及び更に酸素を有するオキシカロチノイド又はキサントフィルに分類される。カロチンの例には、 α -カロチン、 β -カロチン、 γ -カロチン、 δ -カロチン、 ϵ -カロチン、 ζ -カロチン、リコピン、ノイロスポレン、フィトエン、フィトフルエンがある。酸化カロチノイド又はキサントフィルは、更に、ルテイン、ゼアキササンチン、クリプトキササンチン、アンテラキササンチン、ネオキササンチン、及びビオラキササンチンなどの水酸基のみを含有するもの（本明細書ではヒドロキシルキサントフィル類と称される）；及びアスタキササンチン、カンタキササンチン、及びフコキササンチンなどの水酸基を有するか有さないケト基を有するもの（本明細書ではケトキサントフィル類と称される）に分類できる。ケト基を有さないカロチノイドは、本明細書中では非ケトカロチノイド（ β -カロチン及びルテインなど）と呼ばれ、ケト基を有するカロチノイドは、本明細書中ではケトカロチノイド（アスタキササンチンなど）と呼ばれる。

【0026】

アスタキササンチンはケトカロチノイドであって、ケトキサントフィルに分類される。多くのカロチノイドは、彩り豊かな脂溶性色素である。アスタキササンチンは、微細藻類、酵母、サケ、マス、オキアミ、エビ、ザリガニ、甲殻類、及び数種の鳥類の羽において見出される。アスタキササンチンの商業生産は、天然源及び合成源の両方から得られる。合成アスタキササンチンは、立体異性体の混合物中で遊離（非エステル化）アスタキササンチンとして生成され、この立体異性体（3R, 3'R）、（3R, 3'S）及び（3S, 3'S）は1:2:1の比率である。一方、天然アスタキササンチンは、通常はエステル化され、大部分は（3S, 3'S）配置であるか、又は、頻度は少ないが主に（3R, 3'R）である。現在、アスタキササンチンの主要な天然源は、微細藻類であるヘマトコッカス・プルビアリスである。ヘマトコッカス・プルビアリスにおいて、アスタキササンチンは、3S, 3'S立体異性体であり、主にモノエステル（>90%）として存在し、ジエステルを8%以下含み、遊離分子を1%以下含む（Renstromら、1981）。その他の天然源は、ファフィア属酵母から得られる。ファフィア属酵母の赤色酵母は、3R, 3'R及び非エステル化形態で100%か100%に近い遊離アスタキササンチンを示す。遊離アスタキササンチンの1つの好適な源は、<http://www.naturxan.com/products/aquasta/natural-vs-synthetic.html>に記載されている。本明細書で使用するとき、アスタキササンチンという用語は、組成物の一部分として使用され、アスタキササンチンエステルをも意味し得る。

【0027】

天然に存在する炭化水素カロチノイドである β -カロチンは、ニンジン及びヤムなどの

オレンジの根野菜、及びほうれん草、ケール、サツマイモの葉などの緑の葉野菜において見出され得る。他の源としては、合形成態又はパーム油、藻類、又は菌類から天然形態で市販されてもいる。ほとんどの哺乳類において、 β -カロチンはビタミンAの前駆体であるため、 β -カロチンからビタミンAへ変換することができることを意味する。ネコは、変換する能力が限られているため、明らかな例外である。 β -カロチンは、プロビタミンA活性に加えて酸化防止活性もある。 β -カロチンはガン及び心臓疾患を予防する栄養補助食品として使用することが可能であり、免疫を増強し、視力を支えることが可能である。 β -カロチンは免疫効果やその他の効果を提供するための酸化防止剤としてペットフードにも使用される。

【0028】

キサントフィル (xanthophyll) の種に属する天然由来のカロチノイドであるルテインは、ほうれん草及びケールなどの緑の葉野菜中に見出される。他の源としては、合成物、又はマリゴールド抽出物、コーングルテンミール、及びコーンカーネルオイルから得られる天然物も市販されている。ルテインは、目の健康に有益であることが知られている。ルテインは、黄斑において濃縮されることが分かっており、目を酸化応力及び高エネルギーの光から保護するのを助ける。ルテインはまた、心臓血管の健康及び皮膚の健康に利益をもたらす。ルテインは、薬剤、栄養補給食品、食品、動物飼料、及び魚飼料に使用されている。免疫効果やその他の効果を提供するための酸化防止剤としてペットフードにも使用される。

【0029】

本明細書で使用する時、 β -カロチン、ルテイン、アスタキサンチンの量又は比率が記載されている際、量又は比率には、これらの成分の全て異性体及び形態を含む、これらの成分の全量が含まれる。例えば、 β -カロチンのシス-及びトランス-形態は、 β -カロチンの量に含まれる。

【0030】

更には、カロチノイドは酸化防止剤の一部であり、一般的には β -カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンなどが挙げられる天然由来の植物色素である。ヒトにおいて、果物及び野菜からのカロチノイドを消費することは、冠状動脈性心疾患及びいくつかの種類のガンのリスクの減少と関連していた (Van Poppel G. Epidemiological evidence for beta-carotene in prevention of cancer and cardiovascular disease. Eur. J. Clin. Nutr. 1996; 50: S57~S61を参照)。カロチノイドはまた、ネコ及びイヌなどのコンパニオンアニマルに対して利益があることが見出されている。

【0031】

イヌにおいて、食餌性 β -カロチン及びルテインは、ビーグル犬における細胞性及び体液性免疫反応を向上することが見出されている (Chew BP, Park JS, Wong TS, Weng BC, Kim HW, Byrne KM, Hayek MG, Reinhardt GA. Role of dietary beta-carotene in modulating cell-mediated and humoral immune responses in dogs. FASEB J 12: A967, 1998及びKim HW, Chew BP, Wong TS, Park JS, Weng BC, Byrne KM, Hayek MG. Modulation of cell-mediated immunity by dietary lutein in dogs. FASEB J 1998; 12: A966を参照)。アスタキサンチンは、イヌにおいて、細胞性及び体液性免疫反応の向上、DNA損傷の削減、及び炎症の減少など、イヌにおける免疫調節効果を示すことが分かっている (米国特許出願公開第2004/0151761号を参照)。

【0032】

ネコにおいて、食餌性ルテインは特定及び非特定の抗原に対するDTH反応を向上する

ことが分かっている (Park, J. S., Chew, B. P., Hayek, M. G., Massimino, S. & Reinhart, G. A. (2004). Dietary beta-carotene enhances cell-mediated and humoral immune response in cats. FASEB J. 18: A53)。更には、アスタキサンチンを与えられたネコは、細胞性及び体液性免疫反応が向上することが分かっている (United States Patent Publication No. 20040151761 及び Chew BP, Park JS, Hayek MG, Reinhart GA. Dietary astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune response in cats. FASEB J 2003 を参照)。

【0033】

本発明の実施形態は、特定量のカロチノイドを含む組成物に関する。特定の実施形態は、カロチノイドであるアスタキサンチン、 β -カロチン及びルテインに関する。本明細書に記載されるように、これらの特定のカロチノイドは、コンパニオンアニマルに健康上の利益を提供する。更には、カロチノイドにおける特定の組み合わせによって、カロチノイドの吸収、又は生物学的利用能を増加させ得ることが明らかになっている。

【0034】

本明細書の組成物は、例えばイヌ及びネコなどのコンパニオンアニマルによる使用に適応され得る。この点において、当業者に周知であるように、本明細書に記載の組成物の主な使用は、コンパニオンアニマルでの使用であるため、組成物はそのように処方されると理解されるべきである。本明細書で使用される組成物は、ペットフード組成物に使用できる。これらは、必要な食餌における要求を満たすことを目的とした食品、並びにペットスナック (例えばビスケット) 又は他の栄養補助食品を有利に含む。本明細書の組成物は、乾燥組成物 (例えばキブル)、半湿潤組成物、湿潤組成物、又はこれらの任意の混合物などのペットフード組成物であり得る。その代わり又はそれに加えて、組成物は、グレービー、飲料水、ヨーグルト、粉末、懸濁液、チュー、ペットスナック (例えばビスケット)、ふりかけ粉末、又は他の任意の送達形態などの栄養補助食品であり得る。一例として、1つの実施形態では、組成物は、栄養的にバランスが取れており、栄養的にバランスの取れたキブルであり得る。

【0035】

本明細書で記載される組成物は、通常の食餌における要求に対する栄養補助食品として使用され得るか、コンパニオンアニマルにおける主食 (及び、栄養的なバランスを取り得る栄養補助食品又は食品など) として供し得る。投与は、必要又は希望に応じて、例えば、月に1回、週に1回、又は毎日 (1日に数回も含む) なされ得る。通常の食餌における要求に対する栄養補助食品として使用する際、組成物は、哺乳類に直接投与されてよく、あるいは、毎日の食餌又は食品又は水に入れるか予め混ぜることで投与され得る。毎日の食餌又は食品として使用する際、投与は当業者に周知であろう。

【0036】

本明細書で使用される組成物は、1つ以上の更なる要素を含み得る。1つの実施形態では、組成物は、乾燥物基準で、組成物の約10重量%~約90重量%の粗タンパク質、あるいは約20重量%~約50重量%の粗タンパク質、あるいは約20重量%~約40重量%の粗タンパク質、あるいは組成物の約20重量%~約35重量%の粗タンパク質を含み得る。粗タンパク質材料には、大豆、穀物 (トウモロコシ、小麦など)、綿の実、及びピーナツなどの植物性タンパク質、又はカゼイン、アルブミン、及び肉タンパク質などの動物性タンパク質が含まれ得る。本明細書で有用な肉タンパク質の非限定的な例としては、牛肉、豚肉、羊肉、鶏肉、魚、及びこれらの混合物からなる群から選択されるタンパク質源が挙げられる。

【0037】

更に、組成物は、乾燥物基準で、組成物の約5重量%~約40重量%の脂肪、又は約1

10

20

30

40

50

0重量%～約35重量%の脂肪を含み得る。

【0038】

本発明の組成物に関する各実施形態は、炭水化物源を更に含み得る。一実施形態では、組成物は、組成物の約35重量%～組成物の約50重量%までの炭水化物源を含み得る。他の実施形態では、組成物は、組成物の約35重量%～約45重量%、又は組成物の約40重量%～50重量%の炭水化物源を含み得る。例示的な炭水化物源としては、米、トウモロコシ、ミロ、ソルガム、大麦、小麦などのグレイン又は穀物がある。

【0039】

組成物は、これらに限定されるものではないが、乾燥ホエイ及び他の乳製品副産物、ビートパルプ、セルロース、繊維、魚油、亜麻、ビタミン類、ミネラル類、香味料、酸化防止剤、並びにタウリンなどの他の材料も含み得る。

10

【0040】

組成物は、他の任意成分を更に含んでもよい。任意成分としては、プロバイオティック成分（ビフィズス菌及び／又は乳酸菌）及びプレバイオティック（フラクトオリゴ糖類）成分が挙げられる。含まれ得るプロバイオティック成分及びプレバイオティック成分の例並びに量については、例えば米国特許出願公開第2005/0158294号に開示されている。含まれ得る他の任意成分は、オメガ6及びオメガ3脂肪酸、カルニチン、ヘキサメタリン酸塩、グルコサミン、及びコンドロイチン硫酸塩がある。組成物は、胃腸の健康を増進させるための少なくとも1つ以上の繊維源も含み得る。かかる繊維源には、例えば、少なくとも1つの中度発酵性繊維を含み得る。中度発酵性繊維は、コンパニオンアニマルの免疫系に利益をもたらすことが上述されている。中度発酵性繊維又は、腸内のプロバイオティクス微生物の成長を促進するプロバイオティクス組成物を提供する当業者に既知の他の組成物は、本発明によって動物の免疫系にもたらされる利益を増加させるのに役立たせるために、組成物に組み込まれ得る。更に、ラクトバシラス又はビフィドバクテリウム種などのプロバイオティック微生物は、例えば組成物に添加されてもよい。

20

【0041】

他の任意成分としては、緑茶、紅茶、烏龍茶、白茶などの茶；アルファリポ酸及びその塩；ハーブ及びスパイス並びにハーブとスパイスから得られる精油；組成物1kg当たり約100mg～約2000mgのビタミンE；ビタミンC（アスコルビン酸）；セレン；ローズマリーエキス；イソフラボン；クロム；果物；及び野菜が挙げられる。

30

【0042】

本発明の方法は、コンパニオンアニマル及び最も好ましくは飼いイヌ又はネコに本発明の組成物を経口投与（すなわち摂食）する工程を含む。組成物をヒトが摂取するように指示された場合には、その指示は、組成物の使用によって、例えば、炎症の軽減又は免疫反応の増強などの利益を提供し得る及び／又は提供するであろうことをヒトに教示及び／又は報告するものであり得る。例えば、かかる指示は、口頭の指示（例えば、医師、獣医、又は他の医療従事者からの口頭の説明による）；又はラジオ若しくはテレビ媒体（すなわち広告）；又は書面の指示（例えば、医師、獣医若しくは他の医療従事者（例えば、手書き）、又は販売員若しくは販売組織（例えば、販売冊子、パンフレット、若しくは他の指示するための道具による）、書記媒体（例えば、インターネット、電子メール、若しくは他のコンピューター関連媒体）からの書面の指示による）；及び／又は組成物に関連する包装（例えば、組成物を保持する容器上に存在するラベル）であってもよい。本明細書で使用されるとき、「書面」は、単語、絵、記号、及び／又は他の目に見える記述によることを意味する。こうした情報は、例えば「軽減する」、「炎症」、「増強する」、「免疫性」、「反応」、などといった、本明細書において使用される実際の単語を利用する必要はなく、むしろそれと同一又は類似の意味を伝達する単語、絵、記号等の使用が本発明の範囲内で想到される。

40

【0043】

使用される組成物の量は、コンパニオンアニマルの状態及び／又は年齢、ペットフード組成物又は栄養補助食品の品質（必要に応じて）、及びコンパニオンアニマルの大きさ又

50

は品種（必要に応じて）、などの様々な要素に左右され得る。

【0044】

したがって、少なくとも3種のカロチノイドを含み、この3種のカロチノイドには、ケト-カロチノイド及び第1の非-ケト-カロチノイド及び第2の非-ケト-カロチノイドが含まれる、ペットフード組成物が本明細書に開示される。ケト-カロチノイドは、アスタキサンチン及びアスタキサンチンエステルなどの任意のケト-カロチノイドを含み得る。第1及び第2の非-ケト-カロチノイドには、 β -カロチン及びルテインなどの本明細書に開示される任意の非-ケト-カロチノイドが挙げられる。

【0045】

1つの実施形態では、ペットフード組成物は、2種のカロチノイドを含み、この2種のカロチノイドは、アスタキサンチン又は1つの非-ケト-カロチノイドを含むアスタキサンチンエステルを含む。

【0046】

記載されるように、本発明の実施形態は、 β -カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンを様々な量、組み合わせ、及び／又は比率で含む組成物を含む。したがって、これらの要素は、組成物全体の重量においてカロチノイドの全量を占め得る。1つの実施形態では、栄養学的にバランスの取れたペットフード組成物におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.0025重量%である。他の実施形態では、栄養学的にバランスの取れたペットフード組成物におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.0005重量%～約0.025重量%である。他の実施形態では、栄養学的にバランスの取れたペットフード組成物におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.0001重量%～約0.01重量%である。他の実施形態では、栄養学的にバランスの取れたペットフード組成物におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.001重量%～約0.01重量%である。他の実施形態では、栄養学的にバランスの取れたペットフード組成物におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.001重量%～約0.005重量%である。他の実施形態では、栄養学的にバランスの取れたペットフード組成物におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.002重量%～約0.003重量%である。

【0047】

他の実施形態では、ビスケットなどの栄養補助食品におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.0525重量%である。他の実施形態では、ビスケットなどの栄養補助食品におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.01重量%～約0.1重量%である。他の実施形態では、ビスケットなどの栄養補助食品におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.02重量%～約0.08重量%である。他の実施形態では、ビスケットなどの栄養補助食品におけるカロチノイドの全量は、組成物の約0.04重量%～約0.06重量%である。

【0048】

1つの実施形態では、 β -カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンは、3種のカロチノイドの全量に対して、様々な量で組み合わせられてよい。1つの実施形態では、 β -カロチンは、カロチノイド全量の0重量%～約99.9重量%で含まれ得る。1つの実施形態では、ルテインは、カロチノイド全量の0重量%～約99.9重量%で含まれ得る。1つの実施形態では、アスタキサンチンは、カロチノイド全量の約0.1重量%～約25重量%で含まれ得る。1つの実施形態では、 β -カロチン及びルテインのうちの1種のみがアスタキサンチンとともに組成物中に存在している。1つの実施形態では、全3種のカロチノイドが組成物中に存在している。1つの実施形態では、 β -カロチンは、カロチノイド全量の約30重量%～約80重量%、又は約40重量%～約60重量%、又は約50重量%、又は約55重量%で存在し得る。1つの実施形態では、ルテインは、カロチノイド全量の約10重量%～約40重量%、又は約20重量%～約40重量%、又は約25重量%、又は約35重量%、又は約25重量%、又は約30重量%で存在し得る。1つの実施形態では、アスタキサンチンは、カロチノイド全量の約6重量%～約25重量%、又は約6重量%～約25重量%、又は約10重量%～約25重量%、又は約15重量%、又は約

20重量%、又は約25重量%で存在し得る。

【0049】

β-カロチン及びルテインのうち1種のみがアスタキサンチンとともに存在し得る1つの実施形態では、β-カロチン又はルテインとアスタキサンチンとの比率は、約25：75～約90：10、又は約40：60～約70：30、又は約75：25～約90：10、又は約80：20～約90：10、又は約50：50で存在し得る。

【0050】

β-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンである全3種のカロチノイドが存在する1つの実施形態では、アスタキサンチンの量に関わらず、β-カロチンとルテインの比率は、約1：10～約10：1、又は約1：9～約9：1、又は約1：8～約8：1、又は約1：7～約7：1、又は約1：6～約6：1、又は約1：5～約5：1、又は約1：4～約4：1、又は約1：3～約3：1、又は約1：2～約2：1、又は約2：1、又は約1：1で存在し得る。

【0051】

β-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンである全3種のカロチノイドが存在する1つの実施形態では、β-カロチン対ルテイン対アスタキサンチンの比率は、約1：1：0.6～約10：1：3.5、又は約1：1：0.6～約1：10：3.5で存在する。β-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンである全3種のカロチノイドが存在する1つの実施形態では、β-カロチン対ルテイン対アスタキサンチンの比率は、約1：1：0.002～約10：1：0.01、又は約1：1：0.002～約1：10：0.01、又は約4：1：1.5、又は約2：1：1又は約2：1：0.5で存在する。

【0052】

1つの実施形態は、本発明に開示されるカロチノイドの生物学的利用能を向上させる方法には、本明細書に開示される組成物をコンパニオンアニマルに投与する工程を含む。記載されるように、コンパニオンアニマルに投与され、消費される際、カロチノイドの組み合わせによってカロチノイドの生物学的利用能が向上し得る。

【0053】

1つの実施形態では、コンパニオンアニマルに投与されるカロチノイドの全量は、1日当たり、約2mg～約100mg、又は約2mg～約50mg、又は約2mg～約20mgであり得る。1つの実施形態では、コンパニオンアニマルに投与されるカロチノイドの全量は、1日当たり、約20mgである。もちろん、当該技術分野において既知であるように、これらの量は、組成物が処方されるコンパニオンアニマルの種類及び大きさによって変化し得る。例えば、イヌにおいて、超大型犬に投与される1日当たりのカロチノイドの全量は約20mgであって、大型犬に投与される1日当たりのカロチノイドの全量は約12～13mgであって、中型犬に投与される1日当たりのカロチノイドの全量は約4～5mgであって、小型犬に投与される1日当たりのカロチノイドの全量は約2mgであり得る。20ポンド未満の体重のイヌを小型犬と称し、20～50ポンドの体重のイヌを中型犬と称し、50～90ポンドの体重のイヌを大型犬と称し、90ポンドを超える体重のイヌを超大型犬と称し得る。カロチノイドの全量において、個々のカロチノイド自体の量を変更して投与することができる。1つの実施形態では、β-カロチンは、1日当たり約1mg～約50mg、又は1日当たり約1mg～約20mg、又は1日当たり約1mg～約15mg、又は1日当たり約2mg～約10mg、又は1日当たり約1mg、又は1日当たり約2mg、又は1日当たり約5mgで投与され得る。1つの実施形態では、ルテインは、1日当たり約1mg～約50mg、又は1日当たり約1mg～約20mg、又は1日当たり約1mg～約15g、又は1日当たり約2mg～約10mg、又は1日当たり約1mg、又は1日当たり約2mg、又は1日当たり約5mgで投与され得る。1つの実施形態では、アスタキサンチンは、1日当たり約0.001mg～約25mg、又は1日当たり約0.01mg～約25mg、又は1日当たり約0.1mg～約20mg、又は1日当たり約0.1mg～約10mg、又は1日当たり約0.5mg～約5mg、又は1日当たり約0.5mg～約2.5mg、又は1日当たり約1mg～約2.5mg、又は1日当

たり約 1 mg ～ 約 2 mg、又は 1 日当たり約 1 mg、又は 1 日当たり約 2 mg、又は 1 日当たり約 5 mg で投与され得る。もちろん、これらの個別のカロチノイドは、コンパニオンアニマルの種類及び血統に基づいて変更されてもよい。

【実施例】

【0054】

(実施例 1)

カロチノイド栄養補助食品ーインビボ

避妊手術／去勢手術がなされた 18 頭のロットワイラー犬（5 ～ 6 歳）を無作為に 3 群に分けた。1 つの群を対照群とし、β-カロチン、ルテイン、又はアスタキサンチンを含まない対照ビスケットを与え、他の 2 群には、以下のような酸化防止剤混合物を含有するビスケットを与えた：1 群にはβ-カロチン及びルテイン含有ビスケット（BL）を与え、もう 1 つの群にはβ-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチン含有ビスケット（BLA）を与えた。全てのイヌは、Iams（登録商標）Large Breed Diet（ビタミン E GA レベル = 140 IU）を与えた。カロチノイドの 1 日用量を送達するためにビスケットを使用した。所望のレベルのカロチノイドを供給するために、1 日に 4 個のビスケットを各イヌに与えた。ビスケットの大きさは、約 10 ～ 12 グラムであった。

【0055】

対照ビスケットは、Eukanuba（登録商標）Healthy Extra Adult Maintenance biscuits であった。

【0056】

β-カロチン及びルテイン含有ビスケットは、Eukanuba（登録商標）Healthy Extra Adult Maintenance biscuits であった。β-カロチンとルテインとを 63：37 の比率で組み合わせたものを、イヌが 1 日に 21.36 mg 消費するように、イヌにビスケットを供給した。

【0057】

β-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチン含有ビスケットは、Eukanuba（登録商標）Healthy Extra Adult Maintenance biscuits であった。β-カロチン、ルテイン及びアスタキサンチンを 61：16：23 の比率で組み合わせたものを、イヌが 1 日に 21.55 mg 消費するように、イヌにビスケットを供給した。

【0058】

表 1 は、BL ビスケット（ペットスナック 1）及び BLA ビスケット（ペットスナック 2）を消費するロットワイラー犬のまとめを示している。イヌの生理学的測定値を測定及び比較するために、対照ビスケットを使用した。表に示されるように、イヌは、1 日にほぼ同量のカロチノイド（21.36 対 21.55）を消費したが、ペットスナック 1 ではβ-カロチン及びルテインのみが提供されており、ペットスナック 2 ではβ-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチンが提供されている。したがって、個々のカロチノイドの比率も異なるため、表 1 に示す。本実施例において、アスタキサンチンは、アスタキサンチンとアスタキサンチンエステルの混合物であることに留意すべきである。

【表 1】

表 1：カロチノイド吸収

	カロチノイド全供給量 mg/日/イヌ	カロチノイド比率	カロチノイド供給 1mg 当たりの 血清濃度 nM/L		吸収増加率%	
			B	L	B	L
ペットスナック 1	21.36	B:L::63:37	0.73	2.25	0	0
ペットスナック 2	21.55	B:L:A::61:16:23	1.48	5.46	102.02	142.27

【0059】

表1で示されるように、カロチノイドは、ペットスナック1ビスケット及びペットスナック2ビスケットを消費するロットワイラー犬に吸収され、体循環に到達することが可能であった。血清カロチノイドは、ビスケットの形態でカロチノイドを与えた6週間後にHPLCによって測定した。血清濃度を表1に示す。

【0060】

ペットスナック1を消費したイヌには、約13.5mg/日のβ-カロチン(B)及び約7.8mg/日のルテイン(L)を含む21.36mg/日の全カロチノイドを与えられた。これらの量によって、β-カロチンとルテインの比率は約63:37(現物基準)となった。ペットスナック2を消費したイヌには、約13.2mg/日のβ-カロチン(B)及び約3.4mg/日のルテイン(L)、及び約4.9mg/日のアスタキサンチン(A)を含む21.55mg/日の全カロチノイドを与えた。これらの量によって、β-カロチン対ルテイン対アスタキサンチンの比率は約61:16:23となり、アスタキサンチンは全カロチノイドの約23%含まれる(現物基準)ものであった。

10

【0061】

したがって、ペットスナック1とペットスナック2のカロチノイドの全量をほぼ同じに保ち、ペットスナック2に対してアスタキサンチンを加え、血清濃度を測定してみると、アスタキサンチンを含有しないペットスナック1と比較して、β-カロチン吸収が約102%増加し(1.48対0.73)、ルテイン吸収が約142%増加した2.25対5.46)。

【0062】

20

更には、DNA損傷に対する感受性の指標となる、末梢血リンパ球(PBL)のエキスビポのH₂O₂攻撃に対する感受性が、本実施例におけるイヌにおいて変化した。β-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチン含有ビスケットを消費したイヌにおいて検査したPBLは、イヌがビスケットを消費し始める前の基準と比較して5.2% DNA損傷が減少した。しかしながら、β-カロチン及びルテイン含有ビスケットにおいて、検査したイヌのPBLは、2.4%しかDNA損傷が減少していなかった。これらは、β-カロチン、ルテイン、又はアスタキサンチンを含有しない対照ビスケットを消費したイヌにおいて検査したPBLと比較して、10.1% DNA損傷が増加した。したがって、本実施例から明らかなように、β-カロチン及びルテイン含有ビスケットとβ-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチン含有ビスケットの双方は、PBLをDNA損傷から守るのを助けるが、β-カロチン、ルテイン、及びアスタキサンチン含有ビスケットの方が、よりDNA損傷からPBLを守る。本実施例によって、カロチノイド含有ビスケットを消費したイヌにおけるDNA損傷の疑いの減少に反映されるため、酸化応力が減少する。

30

【0063】

インビトロにおいて、Caco-2細胞モデルのインビトロ消化とともに、カロチノイドの細胞取り込みを、消化した食品からミセル化したカロチノイドの細胞獲得を調べ、それによって、食品/食餌からのカロチノイドの吸収を予測するのに使用した。実施例2、3、及び4にこれらを示す。

【0064】

(実施例2)

40

カロチノイドーインビトロ吸収

カロチノイドのインビポ吸収を模倣するために、腸管培養モデルを用いたインビトロ消化を展開させた。インビトロ消化によって測定される吸収は、カロチノイド豊富化野菜を供給されたヒト被験者の小腸管腔内容物から試料を採取することで得られるデータ、及び刊行されているヒトの研究から得られる生物学的利用能データと非常に関連があることに注意することが重要である。

【0065】

連動した擬似消化/Caco-2細胞モデルを使用して、β-カロチン(B)、ルテイン(L)、及びアスタキサンチン(A)又はアスタキサンチンエステル(AE)における相互作用反応を試験した。カロチノイド豊富化油の擬似消化中に生成するミセルで4時間

50

インキュベーションした後の細胞カロチノイドが以下の表2で見られる。

【0066】

B L A (Aは全カロチノイドの25%)において、B細胞取り込みは8.59%であって、BのみににおけるB取り込みと比較して50.6%上昇し、L取り込みは6.37%であって、LのみににおけるL取り込みと比較して5.88%上昇した。B L A E (A Eは全カロチノイドの25%)において、B細胞取り込みは12.09%であって、BのみににおけるB細胞取り込みと比較して112.05%上昇し、L細胞取り込みは12.18%であって、LのみににおけるL細胞取り込みと比較して102.35%上昇した。

【0067】

カロチノイド細胞取り込み% = (細胞中のカロチノイド / 試験食品に加えられたカロチノイド) × 100%。

【表2】

表2：インビトロカロチノイド細胞取り込み

	添加量 nmol/50mL	カロチノイド比率	カロチノイド 取り込み%		カロチノイド細胞 取り込み上昇%	
			B	L	B	L
β-カロチン	205.1	100	5.70	NA	0.00	NA
ルテイン	193.5	100	NA	6.02	NA	0.00
B:L:A	201.2	51:24:25	8.59	6.37	50.60	5.88
B:L:AE	201.2	51:24:25	12.09	12.18	112.05	102.35
B:A	203.2	51:50	5.49	NA	-3.77	NA
L:A	197.4	48:50	NA	5.76	NA	-4.33
L:AE	197.4	48:50	NA	9.05	NA	50.35

【0068】

擬似消化：10mLの120mM食塩水で無脂肪ヨーグルト(2.7g)を均質化した。混合物を50mLのガラス試験管に移した。カロチノイド豊富化油を注意深く各反応物(試験油1つ当たり6個複製)に加え、大豆油を使用して、油の全容量を300μLに調整した。この擬似消化の手順は、反応物が脾酵素及び胆汁抽出物を含む以外、標準的なプロトコルに従った(Failla ML, Chitchumroonchokchai C. (2005) In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. Harvest Plus Technical Monograph Series 3. 32 p. www.harvestplus.org/pdfs/tech03.pdfを参照)。胆汁抽出物を含まない擬似消化も、油から水性分画へのカロチノイドの送達には胆汁に依存することを示すために行った。胃及び小腸消化の終了後、消化物のアリコート(9mL)を45分間4℃で12,000回転で遠心分離し、ミセルカロチノイドを含む水性分画を残りの非消化物質と分離した。水性分画をシリンジフィルター(0.22μm)に通し、水相又はミセル相のいずれかに分画されるカロチノイドを測定した。消化物及び水性分画のアリコートは、抽出前に最大でも1週間、-20℃で保管した。β-カロチン及びルテインをChitchumroonchokchaiらに従って定量化し、(Chitchumroonchokchai C., Schwartz S.J., Failla ML. Assessment of lutein bioavailability from meals and supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. J Nutr. 2004;134:2280~2286を参照)、アスタキサンチンをLin WCらに記載されるように測定した(Lin WC, Chien JT, Chen BH. Determination of carotenoids in spear shrimp shells (Parapenaeops

is hardwickii) by liquid chromatography. J Agric Food Chem. 2005 Jun 29; 53 (13): 5144 ~ 9)。

【0069】

細胞取り込みは、個々のカロチノイド又はカロチノイドの混合物が豊富化された油の消化中に発生し：ATCC (American Tissue Cell Culture) から入手したCaco-2細胞 (HTB37; 25~28継代) を19継代で6-ウェルのプラスチック皿に維持した。細胞を15%の熱失活したFBSを加えた完全DMEM中で培養した。コンフルエントにした後、FBSを7.5%まで減少させ、1日おき及び実験の前日に培地を交換した。11~14dpcで培養物を実験に使用した。試験培地が細胞を処理できるように、試験体の擬似消化から得られた水性分画を基礎DMEMで1:4に希釈した。6-ウェルプラスチック皿の各ウェルに2mLの試験培地を加え、皿を細胞培養インキュベーター (5% CO₂、37℃) に4時間戻した。試験培地を4時間暴露した後、2g/Lのアルブミンを加えた1×冷PBS及び2×冷PBSで洗浄して細胞を採取した。1.5mLの冷PBS中で細胞をかきだして、15mLのポリプロピレン試験管に移した。800×gで、10分間4℃で細胞ペレットを遠心分離して収集した。PBSを廃棄した後、細胞ペレットを窒素で空試験し、HPLCでカロチノイド分析をするために、1週間以内-20℃で保存した。

【0070】

(実施例3)

カロチノイドーインビトロ吸収

Caco-2細胞モデルを使用して、β-カロチン (B)、ルテイン (L)、及びアスタキサンチン (A) 間の相互作用を調べた。表3に結果を示す。

【0071】

B L A_高 (Aは全カロチノイドの25%) において、B吸収は18.5%であって、BのみにおけるB吸収と比較して20.92%上昇し、L吸収は34.1%であって、LのみにおけるL吸収と比較して5.88%上昇した。B L A_低 (Aは全カロチノイドの12.5%) において、B及びL吸収は、B L A_高と比較して同様の上昇度合を示す。

【0072】

カロチノイド取り込み% = (細胞中のカロチノイド + 外側肺底区画中のカロチノイド) × 100% / 試験培地中のカロチノイド

【表3】

表3：インビトロカロチノイド細胞取り込み

処置	合成ミセル中の カロチノイド (nmol/50mL)	カロチノイド比率	カロチノイド細胞 取り込み%		カロチノイド単体と比較した カロチノイド細胞取り込み上昇%	
			B	L	B	L
B	50	100	15.30	NA	0.00	NA
L	25	100	NA	31.8	NA	0.00
B:L:A _高	100	50:25:25	18.50	34.10	20.92	7.23
B:L:A _低	87.5	57:29:14	18.50	34.10	20.92	7.23

【0073】

Failla ML., Chitchumroonchokchai C. (2005) In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. HarvestPlus Technical Monograph Series 3.32 p. www.harvestplus.org/pdfs/tech03.pdf. のプロトコルに従って、トランスウェルインサート (孔: 3.0 μm) 上でCaco-2ヒト腸細胞を生育し、維持した。培養物は、コンフルエント21日後 (dpc) に使用した。

【0074】

β-カロチン（B）、ルテイン（L）、又はアスタキサンチン（A）のいずれかを含有する合成ミセルストック（SM）を、Chit chum roon chok chaiら（2004）に記載されるように調製した。

【0075】

アピカルチャンバ（AP）及び側底培地（BL）中で使用した培地を収集する前に、95%空気、5%CO₂の湿潤環境で、37℃で18時間、処理した細胞をインキュベートした。分析まで、全ての試料を窒素下で-80℃で冷凍した。培地及び細胞におけるカロチノイド分析は、Chit chum roon chok chai（Chit chum roon chok chai C., Schwartz S.J., Faila ML. Assessment of lutein bioavailability from meals and supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. J Nutr. 2004;134:2280~2286を参照）に記載されるように定量化した。細胞のタンパク質含有量は、ビシンコニン酸分析によって測定した（Pierce-www.piercenet.com/files/1296as8.pdf）。フェノールレッドの傍細胞輸送率を監視して単分子層の一体性を測定した（Chit chum roon chok chai C., Schwartz S.J., Faila ML. Assessment of lutein bioavailability from meals and supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. J Nutr. 2004;134:2280~2286を参照）。

【0076】

（実施例4）

カロチノイドーインビトロ吸収

実施例2に記載されるような擬似消化及びCaco-2細胞モデルを使用してβ-カロチン（B）、ルテイン（L）及びアスタキサンチン（A）間の相互作用を試験した。試験媒体におけるカロチノイドの最終濃度は、200nmolのβ-カロチン若しくは200nmolのルテイン、並びに100nmolのβ-カロチン、50nmolのルテイン及び50nmol若しくは8nmolの遊離（非エステル化）アスタキサンチンを含む混合物、のいずれかであった。Caco-2細胞の単分子層（12dpc）を試験化合物に暴露し、4時間インキュベートした。HPLCで細胞取り込みの分析を行うために、細胞を採取し、抽出した。細胞中のカロチノイド（pmol）を2mLの試験培地におけるカロチノイド（pmol）で割ることで、細胞取り込みパーセントを算出した。

【0077】

表4に結果を示す。BLA高（Aは全カロチノイドの25%）において、B吸収は20.9%であった。L吸収は41.2%であった。BLA低（Aは全カロチノイドの5%）において、B吸収は25.4%であり、L吸収は46.9%であった。

【表4】

表4：インビトロカロチノイド吸収

処置	添加量 nmol/50mL	カロチノイド比率	カロチノイド取り込み%	
			B	L
B:L:A高	200	100:50:50	20.90	41.20
B:L:A低	158	100:50:08	25.40	46.90

【0078】

したがって、表1～4に示されるように、アスタキサンチン（又はアスタキサンチンエステル）がβ-カロチン及び／又はルテインと組み合わされる際、ケトーカロチノイドが比較的少量であったとしてもカロチノイドの吸収に上昇が起こった。この吸収の上昇は、

インビトロとインビボの双方において見られた。

【0079】

利点

本明細書で開示されるカロチノイド含有組成物は、コンパニオンアニマルに健康上の利益を提供し得る。利益としては、学習能力、最適な脳機能、脳の発達、記憶、神経の発達、敏捷性、注意力、認知能力、認知機能障害、神経変性障害、神経伝達障害、脳虚血損傷の減少、加齢に関連した衰えである精神力／認知力／記憶力の低下の防止又は減少、身体持久力及び筋力回復力、持久力及び回復時間の減少、ランニング／ウォーキング／ハンティング時間、階段上昇数、筋肉細胞にエネルギーをもたらす脂肪燃焼、視界がはっきりするといった感覚的な利益、眼の混濁の減少、加齢に関連した網膜変性の減少、疲れ目の減少、聴覚及び嗅覚の改善、UV保護における皮膚の改善、皮膚の天然の酸化防止剤ネットワーク及びDNAの保護、皮膚、皮膚及び毛並みの抗炎症（皮膚のかゆみ及び耳感染の減少）、酸化応力（核酸損傷など）、免疫反応／生体防御／耐病性、ワクチン反応、移動性、関節／骨の健康、活動活性レベル、生活の質、虚弱指標の実行、炎症の減少、胃腸（GI）における利益、腸内微生物叢の改善、GI、下痢における不調の減少、酸化応力の向上（実施例1に開示されるように）、AOXの組み合わせによるAOXの状態、老齢のペット又は下痢状態におけるAOXの保持、腎臓の健康、腎疾患、健康体重の維持、歯及び歯肉の健康、ガンの予防、心臓保護及び心臓の健康、及び心臓血管疾患の予防が挙げられる。

10

【0080】

加えて、本発明の実施形態は、本明細書の実施形態は、本明細書に開示される組成物を投与することによって、コンパニオンアニマルの健康を増進する方法にも関する。知られているように、これらのカロチノイドはコンパニオンアニマルに対して健康上の利益を有し、これらのカロチノイドの生物学的利用能を上昇させることで、結果的に健康上の利益が増加することに繋がる。

20

【0081】

よって、本明細書で示され、実証されるように、本明細書で開示されるカロチノイドの組み合わせは、カロチノイドの生物学的利用能を上昇させ、それによってコンパニオンアニマルの健康を増進し得る。特定の実施形態では、イヌの末梢血リンパ球に働く酸化応力に対する保護が向上した。

30

【0082】

方法

HPLC分析

Lin WC, Chien JT, Chen BH. Determination of carotenoids in spear shrimp shells (*Parapenaeopsis hardwickii*) by liquid chromatography. J Agric Food Chem. 2005 Jun 29; 53(13): 5144~9に記載されるようにHPLC分析を実行した。50マイクロリットルの試料をHPLCシステムに注入した。全ての手順は、薄明かりのもと氷上で実行した。

40

【0083】

血清カロチノイド

血清カロチノイドの濃度を以下のようにして測定した。各被験者から5mL非空腹時の静脈血を血清分離チューブ（BD, San Jose, CA）中に採取した。血液試料を4℃で5分間5,000rpm遠心分離し、次に、血清を取り除き、ただちに-70℃で分析まで保管した。上述で報告したKhachik Fらの方法によって、100μLの血清からカロチノイド（脂溶性）を抽出した（Khachik F, Spangler CJ, Smith JC Jr, Canfield LM, Steck A, Pfander H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids an

50

d their metabolites in human milk and serum. Anal Chem. 1997 May 15; 69 (10): 1873~81)。簡単にいうと、100 μ Lの血清をエタノール中で0.1%のブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) 200 μ Lに加えてタンパク質を沈殿させ、次に、500 μ Lの酢酸エチルを抽出物に加えてカロチノイドを抽出した。試料を4℃で5分間2,000 $\times$ gで遠心分離し、上清相を収集した。次に、試料を500 μ Lの酢酸エチルで2回以上抽出し、500 μ Lのヘキサンで1回抽出した。収集した上清を混合し、真空下で乾燥させた。乾燥した試料を1 mLの50%メタノールで溶解し、500 μ Lのヘキサンで3回抽出した。次に、収集した上清を乾燥させ、HPLC分析の前に100 μ Lの展開溶媒で再溶解した。

10

【0084】

食品組成物中のカロチン定性

カロチン：HPLCによる食品組成物中のカロチンの測定

【表5】

機器：

UV検出付きのHPLC.....PDA検出器又はその等価物を備えるAgilent 1100シリーズ

データシステム.....Dionex Chromeleonクロマトグラフィデータシステム又はその等価物

HPLCカラム.....ProntoSil C30; 3m粒子; 150mm $\times$ 4.6mm; MacMod Scientific (Chads Ford, PA) #2546H300PS030

化学てんびん.....0.0001g精度

試料ミル.....Straub Model 4E electric powered Grinding Mill、4Bプレート、ウォーム駆動

振盪恒温水槽.....70℃ $\pm$ 0.1℃の温度を維持することが可能などもの; 50ストローク/分

遠心分離器.....50mLの遠心管を入れるのに適したバスケットを備え、1750rpmが可能なもの

20

【表6】

消耗品：

遠心管.....フタ付きの50mL容量; VWR #21020-695又はその等価物

試料フィルター.....Coming 0.45 μ m Spin-X遠心分離フィルター; VWR #29442-762又はその等価物。

オートサンプラーバイアル瓶.....2mL; オートサンプラーと一緒に使用するのに適した隔膜キャップを備えるアンバーバイアル。

30

【表7】

試薬：

ヘキサン.....HPLC等級; J. T. Baker #9304又はその等価物

酢酸エチル.....HPLC等級; J. T. Baker #9282又はその等価物

アセトン.....HPLC等級; J. T. Baker #9002又はその等価物

トルエン.....HPLC等級; J. T. Baker #9351又はその等価物

エタノール.....Apper Chemical、非変性

メタノール.....HPLC等級; J. T. Baker #9093又はその等価物

メチルー- α -ブチルエーテル.....HPLC等級; J. T. Baker #9042又はその等価物

水酸化カリウム.....試薬等級; J. T. Baker #3140-01

α -ブチルヒドロキシトルエン.....>99.0%; Sigma #C-4582

エトキシキン.....90%; VWR #IC15796380

トランス- β -カロチン.....Chromadex #CDXA-10-0385 (Irvine, CA)、非置換

精製水.....Milli-Q精製水又はその等価物

40

【表 8】

溶液：

抽出溶媒1. ヘキサン(300mL)+アセトン(210mL)+トルエン(210mL)+酢酸エチル
(180mL)+BHT(10g)

抽出溶媒2. 75%ヘキサン／25%酢酸エチル(v/v)

メタノールKOH. KOH 40%メタノール(w/v)

10%硫酸ナトリウム. 10%硫酸ナトリウム精製水(w/v)

移動相. 75%メタノール／25%メチル-tert-ブチルエーテル(v/v)

【0085】

10

手順：

1. Straub Grinding Millを使用して、約250g～300gの試料を粉砕する。

2. 1.0gの試料粉末を50mLのガラス製遠心管に精密に測り入れる。質量を±0.0001gまで記録する。

3. 7.5mLの抽出溶媒1を試料に加えて、1分間攪拌する。

4. 4mLの40%メタノールKOH溶液を試料に加え、1分間攪拌する。

5. 試料にフタをして、振盪恒温水槽に60分間載置する。

6. 試料を取り外し、室温まで冷却する。

7. 7.5mLの抽出溶媒2を加え、1分間攪拌する。

20

8. 10mLの10%硫酸ナトリウム溶液を加え、1分間攪拌する。

9. 1750rpmで8分間遠心分離する。

10. 約2mLの有機層を取り外し、0.45μmのナイロンフィルターに通す。

11. 1.00mLの濾液をアンバーオートサンプラーバイアルに正確にピペットで移し、窒素下で乾燥する。

12. 1.00mLの移動相をアンバーオートサンプラーバイアルに正確にピペットで移し、1分間攪拌した。

【表 9】

HPLC条件：

流速. 1.7mL／分アイソクラチック

30

稼働時間. 20分

注入容量. 100μL

カラム温度. 25℃

検出. 452nm

【表 10】

近似定着時間：

4. 3分 15-シス-β-カロチン

4. 7分 13-シス-β-カロチン

40

5. 3分 トランス-α-カロチン

6. 25分 トランス-β-カロチン

7. 20分 9-シス-β-カロチン

【0086】

校正：

1. 1年に1回又はシステムが変更した際にはいつでも、トランス-β-カロチン標準の校正を行う。

a. 移動相中に全ての標準を調製する。

b. 測定された質量を、分析証明書の調整濃度に補正する。

c. 最小二乗法を使用して、0.1～1.0μg/mLにわたる3点標準曲線をもと

50

に較生し、直線回帰はゼロ点に当てはめられる。

d. 全てのカロチン異性体に同様の反応曲線を当てはめる。

2. 較正中、100 ppmのエトキシキンを含むする1 µg/mLのトランス-β-カロチン品質管理基準を調製し、-20℃で保管する。各試料品質管理基準を各試料に注入し、システムの適合性を確認する。

【0087】

ルテイン：HPLCで食品組成物中のルテインを画定する。

【表11】

機器：

UV検出付きのHPLC. PDA検出器又はその等価物を備えるAgilent 1100シリーズ
データシステム. Dionex Chromeleonクロマトグラフィデータシステム又はその等価物
HPLCカラム. Phenomenex Luna Silica(2)カラム;5m粒子;150mm×4.6mm;
Phenomenex(Torrance, CA) #00F-4043-E0
化学てんびん. 0.0001g精度
試料ミル. Straub Model 4E electric powered Grinding Mill、4Bプレート、
ウォーム駆動
振盪恒温水槽. 70℃±0.1℃の温度を維持することが可能なもの;50ストローク/分
遠心分離器. 50mLの遠心管を入れるのに適したバスケットを備え、1750rpmが可能なもの

10

【表12】

消耗品：

遠心管. フタ付きの50mL容量;VWR #21020-695又はその等価物
試料フィルター. Corning 0.45 µm Spin-X遠心分離フィルター;VWR
#29442-762又はその等価物。
オートサンプラーバイアル瓶. 2mL;オートサンプラーと一緒に使用するのに適した隔膜キャップを
備えるアンバーバイアル

20

【表13】

試薬：

ヘキサン. HPLC等級;J. T. Baker #9304又はその等価物
酢酸エチル. HPLC等級;J. T. Baker #9282又はその等価物
アセトン. HPLC等級;J. T. Baker #9002又はその等価物
トルエン. HPLC等級;J. T. Baker #9351又はその等価物
エタノール. Apper Chemical、非変性
メタノール. HPLC等級;J. T. Baker #9093又はその等価物
水酸化カリウム. 試薬等級;J. T. Baker #3140-01
ブチルヒドロキシトルエン. >99.0%;Sigma #C-4582
エトキシキン. 90%、VWR #IC15796380
ルテイン. Chromadex #CDXA-08-0549(Irvine, CA)、非置換
精製水. Milli-Q精製水又はその等価物。

30

40

【表14】

溶液：

抽出溶媒1. ヘキサン(300mL)、アセトン(210mL)、トルエン(210mL)、酢酸エチル
(180mL)、BHT(10g)
抽出溶媒2. 75%ヘキサン/25%酢酸エチル(v/v)
メタノールKOH. KOH 40%メタノール(w/v)
10%硫酸ナトリウム. 10%硫酸ナトリウム精製水(w/v)
移動相. 65%ヘキサン/30%酢酸エチル、5%アセトン(v/v/v)

50

【0088】

手順：

1. Straub Model 4E Grinding Millを使用して、約250g～300gの試料を粉砕する。
2. 1.0gの試料粉末を50mLのガラス製遠心管に精密に測り入れる。質量を±0.0001gまで記録する。
3. 7.5mLの抽出溶媒1を試料に加えて、1分間攪拌する。
4. 4mLの40%メタノールKOH溶液を試料に加え、1分間攪拌する。
5. 試料にフタをして、振盪恒温水槽に60分間載置する。
6. 試料を取り外し、室温まで冷却する。
7. 7.5mLの抽出溶媒2を加え、1分間攪拌する。
8. 10mLの10%硫酸ナトリウム溶液を加え、1分間攪拌する。
9. 1750rpmで8分間遠心分離する。
10. 約2mLの有機層を取り外し、0.45mのナイロンフィルターに通す。

10

【表15】

HPLC条件：

流速.....1.5mL/分アイソクラチック
 稼働時間.....15分ア
 注入容量.....100μL
 カラム温度.....25℃
 検出.....452nm

20

【表16】

近似定着時間：

5. 5分 トランスルテイン
7. 0分 9-シスルテイン
7. 3分 13-シスルテイン
8. 0分 15-シスルテイン

【0089】

校正：

1. 1年に1回又はシステムが変更した際にはいつでも、トランスルテイン標準の校正を行う。
 - a. 移動相中に全ての標準を調製する。
 - b. 測定された質量を、分析証明書の調整濃度に補正する。
 - c. 最小二乗法を使用して、0.1～1.0μg/mLにわたる3点標準曲線をもとに較正し、直線回帰はゼロ点に当てはめられる。
 - d. 全てのルテイン異性体に同様の反応曲線を当てはめる。
2. 較正中、100ppmのエトキシキンを含む1μg/mLのトランスルテイン品質管理基準を調製し、-20℃で保管する。各試料品質管理基準を各試料に注入し、システムの適合性を確認する。

30

40

【0090】

アスタキサンチン：HPLCで食品組成物中のアスタキサンチンの測定を行う。

【0091】

本方法は、「Spectrophotometric and HPLC Analysis Method for Determining astaxanthin Content in AstaREAL（登録商標）L10」という題名で、Fujii Chemical Industry Co., Ltd. によってwww.astareal.comに掲載されている方法をもとにしている。エステル化アスタキサンチンは、まず、全てのアスタキサンチンを遊離化するために酵素手順によって完全に加水分解（脱

50

アセチル化) されなければならない。

【0092】

試薬及び装置：

0.05M Tris-HCl バッファ (pH 7.0)

コレステロールエステラーゼ：Wako Pure Chem., cat # 037-11221 又は Sigma, cat # : C9281

トランス-β-アポ-8'-カロテナール、Fluka cat # : 10829 [HPLC 分析における内部標準]

アスタキサンチン：Wako Pure Chem., cat # 019-18663 又は Sigma, cat # A9335 [分析標準]

1% (v/v) リン酸溶液

アセトン、分光光度等級

ヘキサン、HPLC 等級

石油エーテル

メタノール、分析等級

MTBE：t-ブチル-メチル-エーテル、分光光度等級

硫酸ナトリウム十水和物

無水硫酸ナトリウム

10mL 遠心管

20mL メスフラスコ

50mL メスフラスコ

100mL メスフラスコ

200mL メスフラスコ

1.0mL メスピペット

2.0mL メスピペット

5.0mL メスピペット

10.0mL メスピペット

0.45 μm シリンジフィルタ

水浴

化学てんびん

遠心分離機

超音波処理器

分光光度計

UV/VIS 検出器を備えた HPLC

HPLC カラム：YMC-Carotenoid (商標) S5 μm、長さ 250 mm × 直径 4.6 mm。

【0093】

手順：

アスタキサンチンエステルの加水分解に用いるコレステロールエステラーゼ溶液：

正確に秤量したコレステロールエステラーゼ (Wako Pure Chem., Cat # : 037-11221 or Sigma, cat # : C9281) を、1mL 当たり 4 単位の既知の濃度を有する 50mM Tris-HCl (pH 7.0) 中で溶解する。

【0094】

内部標準調製：

約 7.5mg のトランス-β-アポ-8'-カロテナール (Fluka, Cat # : 10829, >20% (UV-VIS) Apocaro tenal) を正確に秤量し、200mL のメスフラスコに移す。

アセトンで溶解し、アセトンで容量まで希釈し、混合する。

【0095】

基準調製：

約 5 mg のアスタキサンチン試薬 (Wako Pure Chem., cat # 019-18663 又は Sigma, Cat # : A9335) を 200 mL のメスフラスコに移し、約 100 mL のアセトンで溶解し、湯中で 1 分間超音波処理を行い、15 分間、周囲温度まで均衡化した。

規定容量までアセトンで希釈し、混合する (標準原液)。

2. 0 mL の標準原液を 20 mL メスフラスコにピペットで移し、規定容量までアセトンで希釈し、混合する (標準原液 A)

2. 0 mL の標準原液及び 10. 0 mL の内標準溶液を 20 mL のメスフラスコにピペットで移し、アセトンで希釈し、混合する (標準原液 B)。

10

【0096】

アッセイ調製：

予め温めた水浴中で、50～60℃で30分間 AstaREAL (登録商標) L10 を温める。10分間隔でよく攪拌する。

約 30 mg の AstaREAL (登録商標) L10 を 10 mL のガラス管に移し、* 約 5 mL のアセトンを加えて AstaREAL (登録商標) L10 を溶解する。* 正確な重量を記録する。

そのガラス管から AstaREAL (登録商標) L10 溶液を 100 mL のメスフラスコにピペットで移す。多量のアセトンでそのガラス管を濯ぎ、残っている全てのオレンジ色を回復させる。濯ぎを増やすごとに、5 mL のアセトンをガラス管に加え、穏やかに回転させ、内容物をフラスコにピペットで移す。アセトンを加えて最終容量を 100 mL とし、このストックを試料ストックとする。

20

2. 0 mL の試料ストックを 20 mL のメスフラスコにピペットで移し、規定容量までアセトンで希釈し、混合する (アッセイ溶液 A)。

2. 0 mL のアッセイ溶液を 10 mL のガラス製の遠心管に移し、1. 0 mL の I. S. 溶液を加えて混合する。

蓄熱ヒーターを 37℃ に設定し、3. 0 mL のコレステロールエステラーゼ溶液を試験管に加え、穏やかに反転させることで混合する。

37℃ で 45 分間にわたって反応させる。反応中、10 分おきに少なくとも 2 回、穏やかに／ゆっくりと反転させる。

30

1 g の硫酸ナトリウム十水和物及び 2 mL の石油エーテルを加え、30 秒間攪拌し、3, 000 rpm で 3 分間遠心分離する。

石油エーテル層を 1 g の硫酸ナトリウム無水和物を含んだ 10 mL のガラス製遠心管に加える。

石油エーテル層を減圧下又は不活性ガスのストリーム中、室温で蒸発させ、3 mL のアセトンを加え、超音波処理を行い、濾過する (アッセイ溶液 B)。

【0097】

アスタキサンチン内容物における逆相 HPLC 分析方法

ブランクとしてアセトンを使用して、474 nm で、標準溶液 A の吸光度を測定する。

試料分析の前に、移動相を HPLC 表 1 で指定される HPLC 条件に通過させる。

40

以下の条件のもと、HPLC によって標準溶液 B 及びアッセイ溶液 B のアリコート进行分析する。

HPLC 表：

検出器：UV/VIS 検出器、474 nm

カラム：YMC-Carotenoid (商標) S5 μ 、4. 6 $\times$ 250 mm

カラム温度：25℃

流速：1. 0 mL/分

注入容量：20 μ L

移動相：メタノール、*t*-ブチルメチルエーテル、1% リン酸水溶液

移動相の処方 (%) は以下の通りである：

50

【表 17】

時間(分)	メタノール	t-ブチルメチルエーテル	1%リン酸水溶液
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
27.1	81	15	4
35	81	15	4

【表 18】

10

画定における保持時間：

構成成分	保持時間(分)
13-シス-アスタキサンチン	9
トランス-アスタキサンチン	10
9-シス-アスタキサンチン	14
トランス-β-アポ-8'-カロテナール(内部標準)	17

【0098】

式： $ASa / 210$ によって、 mg/mL で、標準溶液A中のアスタキサンチンの濃度を算出し：

20

式中、 ASa は、標準溶液の吸光度であり、 210 は、 $474nm$ で $1cm$ キュベット中、 $1(mg/mL)$ のアスタキサンチンのアセトン溶液の吸光度である。標準溶液Aの予想吸光度は 0.525 であり、これは、 $2000mL$ の希釈体積中 $5mg$ のアスタキサンチン標準試薬と等価である。

【0099】

全アスタキサンチンのピーク反応とアッセイ溶液B及び標準溶液Bから得られた $I.S.$ のピーク反応との比率を、式： $(1.3P_{13-シス} + P_{トランス} + 1.1P_{9-シス}) / P_{IS}$ から算出する：

式中、 $P_{13-シス}$ 、 $P_{トランス}$ 、 $P_{9-シス}$ 、及び P_{IS} は、13-シス-、トランス-、9-シス-アスタキサンチン異性体のピーク応答及び IS のピーク応答であり、 1.3 及び 1.1 は、13-シス-アスタキサンチン及び9-シス-アスタキサンチンとトランスアスタキサンチンとの比較応答係数である。

30

【0100】

$AstaREAL$ （登録商標） $L10$ 中のアスタキサンチン含有量（% w/w ）を以下の式から算出する：

$$C_{SA} (R_{AB} / R_{SB}) \times 1000 / W \times 100$$

式中、 C_{SA} は、標準溶液Aにおける、 mg/mL で表すアスタキサンチンの濃度であり、 1000 はアッセイ調製における希釈体積であり、 W は、 mg で表される、アッセイ調製に供される $AstaREAL$ （登録商標） $L10$ 試料の重量であり、 R_{AB} 及び R_{SB} は、全アスタキサンチンのピーク反応とアッセイ溶液B及び標準溶液Bから得られた $I.S.$ のピーク反応との比率である。

40

【0101】

DNA損傷

Shen Sら (Shen S, Cooley DM, Glickman LT, Glickman N, Waters DJ. Reduction in DNA damage in brain and peripheral blood lymphocytes of elderly dogs after treatment with dehydroepiandrosterone (DHEA). Mutat Res. 2001 Sep 1; 480~481: 153~62) の方法をもとにして、細胞ゲル電気泳動（コメットアッセイ）でDNA損傷を検出した。基礎的なDNA損傷の範囲を

50

検出するのに、37℃でPBS中の低融点アガロース中にPBLを懸濁させ、標準融点アガロースで予め被覆されたガラス製の顕微鏡スライド上にピペットで移した。最終層は、80 μLの低融点アガロースのみで構成した。アガロースの凝固後、スライドを冷溶解液（2.5M NaCl、100mM Na₂-EDTA、10mM Tris及び300mM NaOHをpHを10になるように調整し、10% DMSO及び1% Triton X-100を新たに加えた）中に浸し、4℃でオーバーナイトで暗所に保管した。次に、スライドを溶解液から取り除き、新たに調製したアルカリ性緩衝剤バッファ（（300mM NaOH及び1mM Na₂-EDTA、pH>13）を含む水平ゲル電気泳動タンク（Fisher, Fair Lawn, NJ）中に載置した。25V及び300mAで30分間の電気泳動にかける前に、20分間、スライドをバッファ中に浸漬したままにしておいた。次に、スライドをpH 7.5で0.4MのTrisで3回洗浄（各5分）した。最後の洗浄後、スライドの水を切って、冷100%エタノールにさらして乾燥させた。細胞溶解から中和の終了までの全工程を、暗所か黄色灯のもとで実行した。分析前に、150 μLのSYBRグリーン1（pH 7.5でTEバッファ中1:10, 000希釈）で染色した。酸化防止剤でイヌを処置することによって、酸化応力に対するイヌのPBLの感受性に影響を与えるかどうかを判定するために、アガロース中に懸濁して電気泳動にかける前に、各イヌから新に分離したPBLを25 μMのH₂O₂に4℃で5分間暴露した。各セルを以下のように0～4スケールで視覚的にスコア化した：

- ・ 損傷なし（タイプ0）；
- ・ 軽度から中程度の損傷（タイプ1 & 2）、
- ・ 重篤なDNA損傷（タイプ3 & 4）

【0102】

相互参照されるか又は関連する全ての特許又は特許出願を含む、本願に引用される全ての文書を、特に除外すること又は限定することを明言しない限りにおいて、その全容にわたって本願に援用するものである。いずれの文献の引用も、こうした文献が本願で開示又は特許請求される全ての発明に対する先行技術であることを容認するものではなく、また、こうした文献が、単独で、あるいは他の全ての参照文献とのあらゆる組み合わせにおいて、こうした発明のいずれかを参照、教示、示唆又は開示していることを容認するものでもない。更に、本文書において、用語の任意の意味又は定義の範囲が、参考として組み込まれた文書中の同様の用語の任意の意味又は定義と矛盾する場合には、本文書中で用語に割り当てられる意味又は定義に準拠するものとする。

【0103】

本発明の特定の実施形態が例示され記載されてきたが、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく他の様々な変更及び修正を実施できることが、当業者には自明であろう。したがって、本発明の範囲内にあるそのような全ての変更及び修正を添付の特許請求の範囲で扱うものとする。

10

20

30

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/020852

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A23K1/16 A23K1/18 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 937 790 A (ITO SHINOBU [JP] ET AL) 17 August 1999 (1999-08-17) column 4, lines 51-60 column 8; table 1	1-9, 12-15
X	----- DATABASE WPI Week 197929 Thomson Scientific, London, GB; AN 1979-53307B XP002672250, "Feed for culture of red sea-bream - contg. colouring agents to give improved fish colour", & JP 54 070995 A (KYOWA FERMENTATION KK) 7 June 1979 (1979-06-07) abstract ----- -/--	1,2,7, 12,13,15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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
13 April 2012		24/04/2012
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 Stiegler, Petra

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/020852

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/009422 A1 (HAINES DAVID [US]; MAHMOUD FADIA F [KW]; PRATT STEVEN G [US]; WISE JOH) 3 February 2005 (2005-02-03) page 1, lines 3-10 page 16 - page 17; table A -----	1,2,4,12
X	DE 10 2007 001156 A1 (LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH [DE]) 10 July 2008 (2008-07-10) paragraphs [0002], [0006], [0009], [0019], [0021], [0032]; claims 1-14; tables 1, 2 -----	1,2,4,5, 7,12-15
X	US 2003/206972 A1 (BABISH JOHN G [US] ET AL) 6 November 2003 (2003-11-06) paragraphs [0045], [0062] - [0065]; examples 3, 4 -----	12-15
X	US 2008/124391 A1 (EVANS DAVID A [CA] ET AL) 29 May 2008 (2008-05-29) paragraphs [0003], [0051], [0060], [0061] -----	1-5, 12-14
X	US 2009/220640 A1 (XU XINDE [CN] ET AL) 3 September 2009 (2009-09-03) paragraphs [0001], [0047], [0048], [0050], [0054]; example 4; table 1 -----	1,3,5,7, 12,14,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/020852

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5937790	A	17-08-1999	NONE	
JP 54070995	A	07-06-1979	NONE	
WO 2005009422	A1	03-02-2005	AU 2004259223 A1 CA 2532596 A1 EP 1653935 A1 WO 2005009422 A1	03-02-2005 03-02-2005 10-05-2006 03-02-2005
DE 102007001156	A1	10-07-2008	NONE	
US 2003206972	A1	06-11-2003	AU 1534402 A US 2003206972 A1 WO 0230419 A1	22-04-2002 06-11-2003 18-04-2002
US 2008124391	A1	29-05-2008	AU 2006318357 A1 CA 2631266 A1 CN 101325961 A DE 202006020886 U1 EP 1954300 A1 JP 2009517482 A KR 20080082641 A US 2008124391 A1 US 2009142431 A1 WO 2007062274 A1	31-05-2007 31-05-2007 17-12-2008 23-09-2010 13-08-2008 30-04-2009 11-09-2008 29-05-2008 04-06-2009 31-05-2007
US 2009220640	A1	03-09-2009	CN 101461450 A EP 2071964 A1 US 2009220640 A1	24-06-2009 24-06-2009 03-09-2009

フロントページの続き

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

(74)代理人 100155631

弁理士 榎 保孝

(72)発明者 ツァン、ジン

アメリカ合衆国オハイオ州、クレイトン、デンウッド、トレイル、125

Fターム(参考) 2B005 AA05

2B150 AA06 DA02 DA17