202106308

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202106308 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：109113760　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 04 月 24 日

(51)Int. Cl.：　*A61K31/704 (2006.01)*　*A61P3/04 (2006.01)*

A61P3/10 (2006.01)　*A23L33/10 (2016.01)*

(30)優先權：2019/04/26　日本　2019-086868

(71)申請人：日商三得利控股股份有限公司 (日本) SUNTORY HOLDINGS LIMITED　(JP)

日本

(72)發明人：浦井聡一郎 URAI, SOICHIRO (JP) ；長尾浩二 NAGAO, KOJI (JP) ；横尾芳明 YOKOO, YOSHIAKI (JP)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：有　申請專利範圍項數：7 項　圖式數：22　共 72 頁

(54)名稱

ＧＬＰ－１分泌促進劑

(57)摘要

期待開發促進 GLP-1 之分泌的新穎 GLP-1 分泌促進劑。依據本發明，提供一種 GLP-1 分泌促進劑，其包含 0.4~4,440ppm 之具有鼠李糖鍵結而成之結構的甜菊醇醣苷。

202106308

【發明摘要】

【中文發明名稱】

ＧＬＰ－１分泌促進劑

【中文】

期待開發促進GLP-1之分泌的新穎GLP-1分泌促進劑。依據本發明，提供一種GLP-1分泌促進劑，其包含0.4~4,440ppm之具有鼠李糖鍵結而成之結構的甜菊醇醣苷。

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

ＧＬＰ－１分泌促進劑

【技術領域】

【0001】本發明係關於GLP-1分泌促進劑等。詳細而言，係關於GLP-1分泌促進劑等，其包含具有鼠李糖鍵結而成之結構的甜菊醇醣苷。

【先前技術】

【0002】GLP-1[類升糖素胜肽-1 (Glucagon-like peptide-1)]為自消化道黏膜上皮等被分泌之激素。作為GLP-1的作用，已知有刺激胰島素合成或分泌、阻礙升糖素分泌、阻礙食物攝取、減低高血糖症等。藉由活化GLP-1之分泌，可期待此等作用的提升。

【0003】專利文獻1中記載有一種用於促進GLP-1分泌之組成物，其包含選自由苦瓜所含之11種類的葫蘆烷型三萜類中至少1種的成分(A)。又，專利文獻2中，記載甜菊苷、瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷B、瑞鮑迪苷D有促進GLP-1分泌的性質。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1] 國際公開第2017/159725號

[專利文獻2] 國際公開第2017/018404號

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

【0005】期待開發促進GLP-1之分泌的新穎GLP-1分泌促進劑。

[解決課題之手段]

【0006】本發明之一態樣提供下述。

[1] 一種GLP-1分泌促進劑，其特徵為包含0.4~4,440 ppm之具有鼠李糖鍵結而成之結構的甜菊醇醣苷。

[2] 如上述[1]中記載之GLP-1分泌促進劑，其中前述甜菊醇醣苷，包含選自由瑞鮑迪苷C、瑞鮑迪苷K、杜爾可苷(Dulcoside) A、杜爾可苷C、杜爾可苷D及杜爾可苷F所成群組中之至少1種。

[3] 如上述[1]中記載之GLP-1分泌促進劑，其中前述甜菊醇醣苷包含瑞鮑迪苷C。

[4] 如上述[1]~[3]中任一項記載之GLP-1分泌促進劑，其係用於改善糖代謝、用於抑制食慾或用於預防或改善糖尿病或肥胖症。

[5] 一種用於促進GLP-1分泌之飲料，其含有如上述[1]~[4]中任一項記載之GLP-1分泌促進劑。

[6] 一種用於促進GLP-1分泌之食品，其含有如上述[1]~[4]中任一項記載之GLP-1分泌促進劑。

[7] 一種醫藥組成物，其包含如上述[1]~[4]中任一項記載之GLP-1分泌促進劑。

[發明效果]

【0007】本發明之GLP-1分泌促進劑，可使用於期望促進GLP-1分泌的用途。

【圖式簡單說明】

【0008】

[圖1]顯示實驗例1中之各種甜味料的GLP-1分泌量之圖表。

[圖2]顯示實驗例2所得之含有瑞鮑迪苷C (以下，有時將瑞鮑迪苷簡稱為Reb)之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖3]顯示實驗例3所得之含有甜菊苷之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖4]顯示實驗例4所得之含有瑞鮑迪苷A之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖5]顯示實驗例5所得之含有RebA乳化物之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖6]顯示實驗例6中之各種甜味料所具有的表面張力之圖表。

[圖7]顯示實驗例7中之RebA的香味特性之圖表。

[圖8]顯示實驗例8~13所得之各種試料之濃度與GLP-1

分泌量的關係之圖表。

[圖9]顯示實驗例8所得之含有RebA之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖10]顯示實驗例9所得之含有RebA乳化物之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖11]顯示實驗例10所得之含有乳化粒子之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖12]顯示實驗例11所得之含有RebA之試料與含有乳化粒子之試料的混合液之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖13]顯示實驗例12所得之含有甘油之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖14]顯示實驗例13所得之含有MCT油之試料之濃度與GLP-1分泌量的關係之圖表。

[圖15]顯示實驗例15~20所得之各種試料之細胞毒性(死細胞為指標)之圖表。a為自投予2小時後，b為24小時後之結果。

[圖16]顯示實驗例21~31所得之各種試料之GLP-1分泌量之圖表。a為自投予2小時後，b為24小時後之結果。

[圖17]顯示實驗例32所得之各甜菊醇醣苷之分配比率，與試驗中樣子的照片。

[圖18]顯示實驗例32中，試驗後之含有RebA之溶液狀態的照片。

[圖19]顯示實驗例33中保存溫度之對香味特性的影響

之圖。

[圖20]顯示實驗例33中震動環境下的穩定性之圖。

[圖21]顯示實驗例33中乳化所致之甜味強度的下降程度之圖。

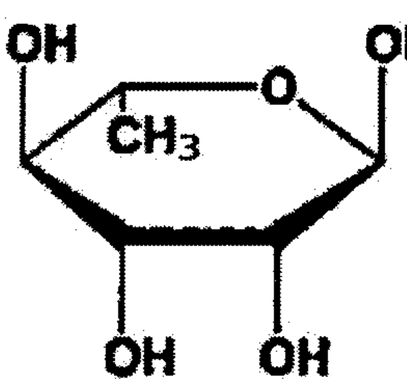
[圖22]顯示實驗例34中GLP-1分泌量之圖。

【實施方式】

【0009】依據本發明者的研究，得知RebC等之具有鼠李糖鍵結而成之結構的甜菊醇醣苷，具有其本身作用於人類或具有GLP-1分泌能力之非人類動物的細胞使GLP-1之分泌量增加的效果，即具有促進GLP-1分泌的能力。本發明之一觀點係關於一種GLP-1分泌促進劑(用於促進GLP-1分泌之組成物)，其包含具有鼠李糖鍵結而成之結構的甜菊醇醣苷。

【0010】鼠李糖具有下述結構，為化學式$C_6H_{12}O_5$所示之六碳糖。鼠李糖亦稱為6-去氧甘露糖、mannomethylose。

[化1]

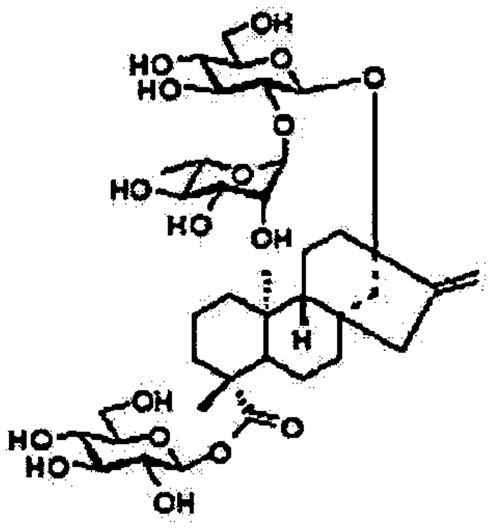


【0011】較合適為鼠李糖系甜菊醇醣苷包還選自由瑞鮑迪苷C、瑞鮑迪苷K、杜爾可苷A、杜爾可苷C、杜爾可苷D及杜爾可苷F所成群組中之至少1種。更合適為鼠李糖

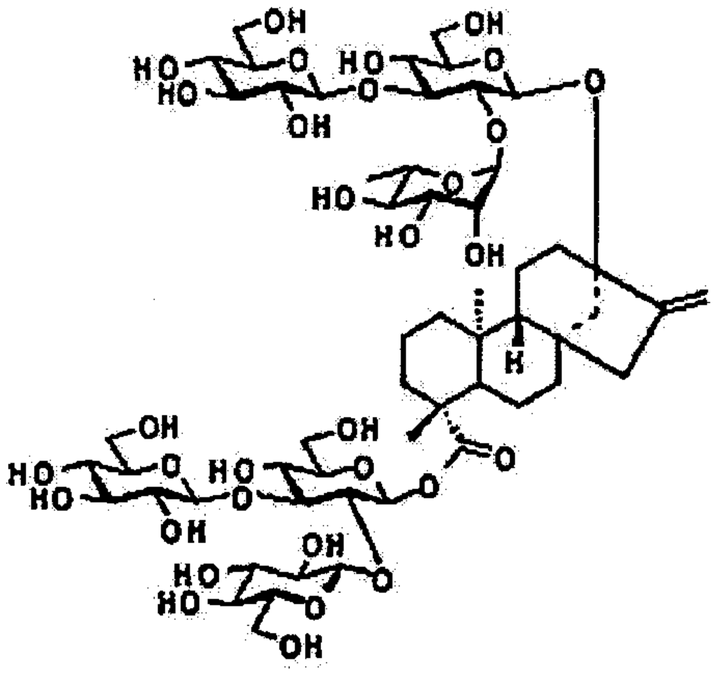
系甜菊醇醣苷包含瑞鮑迪苷C。

【0012】杜爾可苷A、杜爾可苷C、杜爾可苷D及杜爾可苷F之結構如下。

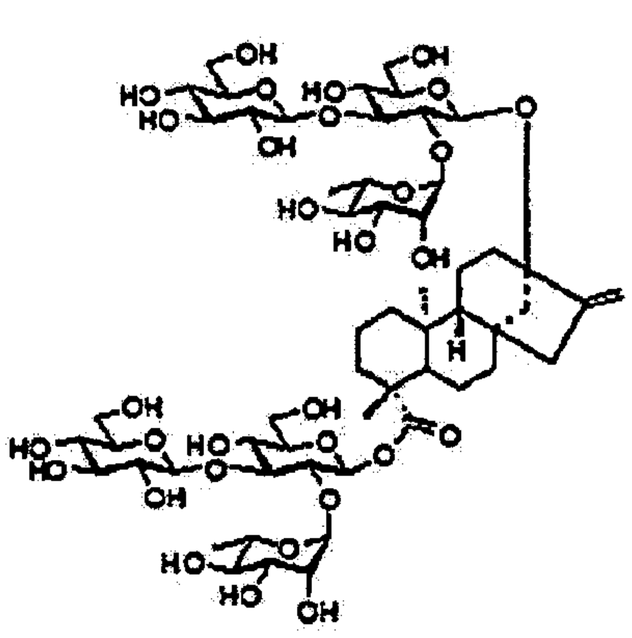
[化2]



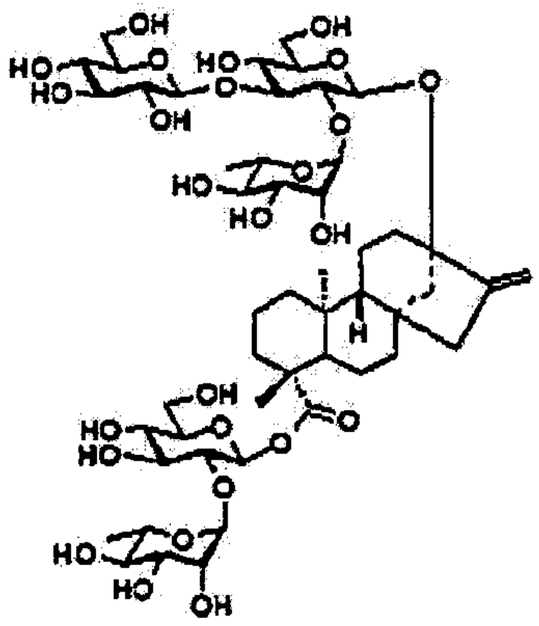
杜爾可苷 A



杜爾可苷 C



杜爾可苷 D



杜爾可苷 F

【0013】本發明之GLP-1分泌促進劑中之鼠李糖系甜菊醇醣苷的含有比例為0.4~4,440ppm。較合適為以質量基準為0.4~3,440、0.4~2,440、0.4~1,440、0.4~940、0.4~440、0.4~240、0.4~40、0.4~30、0.4~20、0.4~10、0.4~5、0.4~1、1~4,440、5~4,440、10~4,440、50~4,440、100~4,440、300~4,440、500~4,440、700~4,440、

900~4,440、1,000~4,440、2,000~4,440、3,000~4,440、1~3,440、5~2,440、10~1,440、50~940或100~440ppm。或，較合適為以質量基準計，為95~1,000、95~900、95~800、95~700、95~600、95~500、95~400、95~200、200~1,000、300~1,000、400~1,000、500~1,000、600~1,000、700~1,000、800~1,000、900~1,000、200~900、300~800、400~700或500~600ppm。

【0014】或是，較合適為本發明之GLP-1分泌促進劑中之鼠李糖系甜菊醇醣苷的含有比例，為5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99質量%以上，適宜的上限值為100質量%以下。

【0015】或是，較合適為本發明之GLP-1分泌促進劑中之鼠李糖系甜菊醇醣苷的含有比例，以質量基準計，為95~10,000或950~10,000ppm。

【0016】本發明中，亦可組合鼠李糖系甜菊醇醣苷與其他醣苷甜味料。作為其他醣苷甜味料，可舉例例如甜菊醇、瑞鮑迪苷A、瑞鮑迪苷B、瑞鮑迪苷D、瑞鮑迪苷F、瑞鮑迪苷M、瑞鮑迪苷N、瑞鮑迪苷O、瑞鮑迪苷E、甜葉懸鉤子苷(Rubusoside)等之不具有鼠李糖之甜菊醇醣苷；羅漢果苷IV、11-側氧基-MogV、賽門苷I (Siamenoside I)、羅漢果苷V等之羅漢果苷(以下，有時將羅漢果苷簡稱為Mog)；甘草酸醣苷；等。

【0017】其他醣苷甜味料，包含具有GLP-1分泌促進

性者較佳，在具有GLP-1分泌促進性的條件下，包含不具有鼠李糖之甜菊醇醣苷或羅漢果苷更佳，包含選自由RebA、RebB、甜菊苷或羅漢果苷V所成群組中之至少1種進而佳，包含RebA特佳。

【0018】若將其他醣苷甜味料相對於鼠李糖系甜菊醇醣苷的比例以P (質量%)表示，P為以下之數值範圍較佳。

1~100,000、5~100,000、10~100,000、30~100,000、50~100,000、70~100,000、90~100,000、100~100,000、200~100,000、300~100,000、400~100,000、500~100,000、600~100,000、700~100,000、800~100,000、900~100,000、1~9,000、5~9,000、10~9,000、30~9,000、50~9,000、70~9,000、90~9,000、100~9,000、200~9,000、300~9,000、400~9,000、500~9,000、600~9,000、700~9,000、800~9,000、900~9,000、1~8,000、5~8,000、10~8,000、30~8,000、50~8,000、70~8,000、90~8,000、100~8,000、200~8,000、300~8,000、400~8,000、500~8,000、600~8,000、700~8,000、800~8,000、900~8,000、1~7,000、5~7,000、10~7,000、30~7,000、50~7,000、70~7,000、90~7,000、100~7,000、200~7,000、300~7,000、400~7,000、500~7,000、600~7,000、700~7,000、800~7,000、900~7,000、1~6,000、5~6,000、10~6,000、30~6,000、50~6,000、70~6,000、90~6,000、100~6,000、200~6,000、300~6,000、400~6,000、500~6,000、600~6,000、700~6,000、800~6,000、900~6,000、1~5,000

、5~5,000、10~5,000、30~5,000、50~5,000、70~5,000、90~5,000、100~5,000、200~5,000、300~5,000、400~5,000、500~5,000、600~5,000、700~5,000、800~5,000、900~5,000、1~4,000、5~4,000、10~4,000、30~4,000、50~4,000、70~4,000、90~4,000、100~4,000、200~4,000、300~4,000、400~4,000、500~4,000、600~4,000、700~4,000、800~4,000、900~4,000、1~3,000、5~3,000、10~3,000、30~3,000、50~3,000、70~3,000、90~3,000、100~3,000、200~3,000、300~3,000、400~3,000、500~3,000、600~3,000、700~3,000、800~3,000、900~3,000、1~2,000、5~2,000、10~2,000、30~2,000、50~2,000、70~2,000、90~2,000、100~2,000、200~2,000、300~2,000、400~2,000、500~2,000、600~2,000、700~2,000、800~2,000或900~2,000。

【0019】又，P為以下之數值範圍較佳。

1~100、5~100、10~100、30~100、50~100、70~100、90~100、1~90、5~90、10~90、30~90、50~90、70~90、1~80、5~80、10~80、30~80、50~80、70~80、1~70、5~70、10~70、30~70、50~70、1~60、5~60、10~60、30~60、50~60、1~50、5~50、10~50、30~50、1~40、5~40、10~40、30~40、1~30、5~30、10~30、1~20、5~20、10~20或1~10。

【0020】進而又，P為以下之數值範圍較佳。

100~10,000、200~10,000、300~10,000、400~10,000

、500~10,000、600~10,000、700~10,000、800~10,000、900~10,000、1,000~10,000、2,000~10,000、3,000~10,000、4,000~10,000、5,000~10,000、6,000~10,000、7,000~10,000、8,000~10,000、9,000~10,000、100~9,000、200~9,000、300~9,000、400~9,000、500~9,000、600~9,000、700~9,000、800~9,000、900~9,000、1,000~9,000、2,000~9,000、3,000~9,000、4,000~9,000、5,000~9,000、6,000~9,000、7,000~9,000、8,000~9,000、100~8,000、200~8,000、300~8,000、400~8,000、500~8,000、600~8,000、700~8,000、800~8,000、900~8,000、1,000~8,000、2,000~8,000、3,000~8,000、4,000~8,000、5,000~8,000、6,000~8,000、7,000~8,000、100~7,000、200~7,000、300~7,000、400~7,000、500~7,000、600~7,000、700~7,000、800~7,000、900~7,000、1,000~7,000、2,000~7,000、3,000~7,000、4,000~7,000、5,000~7,000、6,000~7,000、100~6,000、200~6,000、300~6,000、400~6,000、500~6,000、600~6,000、700~6,000、800~6,000、900~6,000、1,000~6,000、2,000~6,000、3,000~6,000、4,000~6,000、5,000~6,000、100~5,000、200~5,000、300~5,000、400~5,000、500~5,000、600~5,000、700~5,000、800~5,000、900~5,000、1,000~5,000、2,000~5,000、3,000~5,000、4,000~5,000、100~4,000、200~4,000、300~4,000、400~4,000、500~4,000、600~4,000、700~4,000、800~4,000、900~4,000、1,000~4,000

、2,000~4,000、3,000~4,000、100~3,000、200~3,000、300~3,000、400~3,000、500~3,000、600~3,000、700~3,000、800~3,000、900~3,000、1,000~3,000、2,000~3,000、100~2,000、200~2,000、300~2,000、400~2,000、500~2,000、600~2,000、700~2,000、800~2,000、900~2,000、1,000~2,000、1500~10000、1500~9000、1500~8000、1500~7000、1500~6000、1500~5000、1500~4000、1500~3000或1500~2000。

【0021】本發明之GLP-1分泌促進劑，在不損及本發明效果的範圍內，亦可含有上述鼠李糖系甜菊醇醣苷與適當含有之其他醣苷甜味料以外的成分。作為其他成分，可舉例鼠李糖系甜菊醇醣苷與其他醣苷甜味料以外之其他甜味料、乳化劑、蛋白質、糖蛋白質、賦形劑、結合劑、崩解劑、塗層劑、潤滑劑、著色劑、矯味矯臭劑、安定劑、吸收促進劑、pH調製劑、防腐劑、抗氧化劑、香料、維生素類、微量金屬成分等。

【0022】其他甜味料，可為天然甜味料、糖醇、人工甜味料等。可舉例例如葡萄糖；果糖；麥芽糖；蔗糖；乳糖；稀少糖；阿斯巴甜、紐甜、阿力甜等之胜肽系甜味料；蔗糖素等之蔗糖衍生物；乙醯磺胺酸K、糖精、Advantame、甜蜜素、甘味精等之合成甜味料；莫內林、仙茅甜蛋白、甜味蛋白(brazzein)、索馬甜等之植物性之蛋白質系甜味料；沙馬甜；新橘皮苷二氫查酮；赤藻糖醇、木糖醇、山梨糖醇、麥芽糖醇、甘露醇等之糖醇；高

果糖液糖；果糖葡萄糖液糖；葡萄糖果糖液糖；寡糖；蜂蜜；甘蔗榨汁液(黑糖蜜)；砂糖(白糖、三溫糖、黑糖、和三盆等)；楓糖漿；糖蜜(molasses)；水飴等。

【0023】本發明之GLP-1分泌促進劑，可為任意之形狀，例如，可為固體狀(例如，粉末狀)、凝膠狀或液狀。

【0024】本發明之GLP-1分泌促進劑，可使用於以起因於或相關於GLP-1分泌促進作用的作用、機能為目的之用途。

【0025】例如，本發明之GLP-1分泌促進劑，可使用於選自用於抑制血糖值上升、用於抑制食慾、用於抑制過度飲食、用於改善糖代謝、用於預防或治療糖尿病、用於預防或治療肥胖症、用於減低體重，及用於減低體脂肪率中之至少1種用途。較合適為可使用於選自用於改善糖代謝、用於抑制食慾及用於預防或改善糖尿病或肥胖症中之至少1種用途。

【0026】又，可使用在促進胃內容物排出、抑制胃酸分泌、抑制肝醣釋出、保護心肌、提升學習記憶能力、預防或治療餐後高血糖(隱性糖尿病)、預防或治療潰瘍性大腸炎等之目的。

【0027】又，可使用於用以預防或治療動脈粥樣硬化等之血管性疾病、神經退化性疾病、非酒精性肝炎、肝斑、哮喘(參照：Young-Sun Lee et al., "Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control", Mediators of Inflammation Volume 2016, Article ID

3094642, 11 pages)。

【0028】本發明之GLP-1分泌促進劑，可將其本身直接使用(攝取、服用或投予)在人類或具有促進GLP-1分泌的能力之非人類動物。

【0029】作為直接使用於人類或非人類動物時之本發明之GLP-1分泌促進劑的態樣，可舉例用於抑制血糖值上升、用於抑制食慾、用於抑制過度飲食、用於改善糖代謝、用於預防或治療糖尿病、用於預防或治療肥胖症、用於減低體重、用於減低體脂肪率、用於促進胃內容物排出、用於抑制胃酸分泌、用於抑制肝醣釋出、用於保護心肌、用於提升學習記憶能力、用於預防或治療血管性疾病、用於預防或治療神經退化性疾病、用於預防或治療非酒精性肝炎、用於預防或治療肝斑，或用於預防或治療哮喘之食品，例如麵類(蕎麥麵、烏龍麵、中華麵、泡麵等)、豆腐、糖果甜點類(糖果、口香糖、巧可力、零食點心、餅乾(biscuit)、餅乾(cookie)、軟糖等)、麵包類、水產或畜產加工食品(魚板、火腿、香腸等)、乳製品(發酵乳等)、油脂及油脂加工食品(沙拉油、天婦羅油、人造奶油、美乃滋、酥油、鮮奶油、淋醬、油脂抹醬等)、調味料(醬汁、佐醬等)、調理品或半調理品(雜炒等)、殺菌袋裝食品(咖哩、燉物、丼、粥、雜炊等)、冰品(冰淇淋、雪霜、刨冰等)、粉末食品(飲料粉、湯粉等)、經腸流質食物等。又，上述用途之食品中，所謂的健康食品之外，亦包含特定保健用食品、營養機能食品等之保健機能食品、營

養補充品(營養輔助食品)、飼料。

又，可舉例用於抑制血糖值上升、用於抑制食慾、用於抑制過度飲食、用於改善糖代謝、用於預防或治療糖尿病、用於預防或治療肥胖症、用於減低體重、用於減低體脂肪率、用於促進胃內容物排出、用於抑制胃酸分泌、用於抑制肝醣釋出、用於保護心肌、用於提升學習記憶能力、用於預防或治療血管性疾病、用於預防或治療神經退化性疾病、用於預防或治療非酒精性肝炎、用於預防或治療肝斑，或用於預防或治療哮喘之飲料，例如茶飲料、清涼飲料、碳酸飲料(包含無酒精啤酒)、營養飲料、果實飲料、乳酸飲料、果汁、飲用劑、酒精飲料、加工乳、調製豆乳；等。

【0030】或是，本發明之GLP-1分泌促進劑，亦可在被含在飲料、食品、醫藥組成物等之狀態下，藉由經口、經鼻、經腸等之路徑或經管的路徑來使用。

【0031】將本發明之GLP-1分泌促進劑添加於飲食品(或使其含有)來使用時，飲食品之種類並無特別限定。作為食品，可舉例例如麵類(蕎麥麵、烏龍麵、中華麵、泡麵等)、豆腐、糖果甜點類(糖果、口香糖、巧可力、零食點心、餅乾(biscuit)、餅乾(cookie)、軟糖等)、麵包類、水產或畜產加工食品(魚板、火腿、香腸等)、乳製品(發酵乳等)、油脂及油脂加工食品(沙拉油、天婦羅油、人造奶油、美乃滋、酥油、鮮奶油、淋醬、油脂抹醬等)、調味料(醬汁、佐醬等)、調理品或半調理品(雜炒等)、殺菌袋

裝食品(咖哩、燉物、丼、粥、雜炊等)、冰品(冰淇淋、雪霜、刨冰等)、粉末食品(飲料粉、湯粉等)、經腸流質食物等。又，所謂的健康食品之外，亦包含特定保健用食品、營養機能食品等之保健機能食品、營養補充品(營養輔助食品)、飼料等。

作為飲料，可舉例例如茶飲料、清涼飲料、碳酸飲料(包含無酒精啤酒)、營養飲料、果實飲料、乳酸飲料、果汁、飲用劑、酒精飲料、加工乳、調製豆乳等。

【0032】飲食品，只要包含本發明之GLP-1分泌促進劑，亦可包含食品添加劑(食品用添加劑)等之其他成分。作為食品添加劑，雖無特別限定，但可舉例例如賦形劑(例如，小麥澱粉、玉米澱粉、纖維素、乳糖、蔗糖、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇、α化澱粉、酪蛋白、矽酸鋁酸鎂、矽酸鈣等)、結合劑(例如，α化澱粉、羥基丙基甲基纖維素、聚乙烯基吡咯啶酮等)、崩解劑(例如，纖維素、羥基丙基纖維素、玉米澱粉等)、流動化劑(例如，輕質無水矽酸等)、油脂(例如，大豆油、芝麻油、橄欖油、亞麻仁油、荏胡麻油、油菜籽油、椰子油、玉米油等之植物油或源自動物、魚的油)、營養素(例如，各種礦物質、各種維生素、胺基酸)、香料、鼠李糖系甜菊醇醣苷以外之甜味料、矯味劑、著色料、溶劑(例如，乙醇)、鹽類、pH調節劑、緩衝劑、抗氧化劑、安定劑、凝膠化劑、增黏劑、潤滑劑、膠囊化劑、懸濁劑、塗層劑、防腐劑、乳化劑等。食品添加劑可單獨含有或組合2種以上含有。

【0033】使飲食品含有本發明之GLP-1分泌促進劑時，使用乳化劑較佳。

特別是，以於藉由乳化劑所形成之乳化粒子中併入鼠李糖系甜菊醇醣苷及視需要使用之其他醣苷甜味料，或是，使乳化粒子之核中包含鼠李糖系甜菊醇醣苷及視需要使用之其他醣苷甜味料之方式較佳。本發明中，並不一定總是要特定之醣苷併入特定之乳化粒子中，或是，持續被包含。醣苷或是併入乳化粒子中，或是被包含，或是向乳化粒子外的區域移動，但系統全體中，過半數之乳化粒子中併入或包含醣苷較佳。

【0034】使用乳化劑時，可期待獲得更進一步的促進GLP-1分泌的效果，或，減低鼠李糖系甜菊醇醣苷具有的苦味之效果。

【0035】期待在保存後，特別是在高溫條件、酸性條件、震動環境等之嚴酷的環境下保存後，亦維持使用乳化劑所致之上述效果。

【0036】作為乳化劑，可使用已知者。作為已知的乳化劑，可舉例單甘油酯、有機酸單甘油酯、聚甘油脂肪酸酯等之甘油脂肪酸酯；去水山梨醇脂肪酸酯；蔗糖脂肪酸酯；丙二醇脂肪酸酯；硬脂醯基乳酸鹽；聚山梨醇酯；植物卵磷脂、卵黃卵磷脂、分別卵磷脂、酵素處理卵磷脂等之卵磷脂類；皂樹皮萃取物、絲蘭泡沫萃取物(Yucca foam extract)；植物性固醇；神經鞘脂質；膽汁末；動物性固醇等。

【0037】乳化劑，較合適為包含水中油型之乳化劑，更合適為包含HLB值為7~18之水中油型之乳化劑，進而合適為HLB值為7~18的條件下，包含蔗糖脂肪酸酯、卵磷脂類、甘油脂肪酸酯或聚甘油，更合適為HLB值為7~18的條件下，包含卵磷脂類，特合適為HLB值為7~18的條件下，包含酵素處理卵磷脂。

【0038】使用乳化劑時，組合以碳數6~12之脂肪酸構成之油脂等之可存在於乳化粒子之核的成分，或甘油等之水性基劑較佳。

【0039】作為飲食品中之鼠李糖系甜菊醇醣苷的比例(ppm)，較合適為可採取以質量基準計，為例如2~550、25~550、30~550、35~550、40~550、45~550、50~550、55~550、20~540、25~540、30~540、35~540、40~540、45~540、50~540、55~540、20~530、25~530、30~530、35~530、40~530、45~530、50~530、55~530、20~520、25~520、30~520、35~520、40~520、45~520、50~520、55~520、20~510、25~510、30~510、35~510、40~510、45~510、50~510、55~510、20~505、25~505、30~505、35~505、40~505、45~505、50~505、55~505、20~500、25~500、30~500、35~500、40~500、45~500、50~500、55~500、20~495、25~495、30~495、35~495、40~495、45~495、50~495、55~495、20~490、25~490、30~490、35~490、40~490、45~490、50~490或55~490ppm的值。又，較合適為可採取以質量基準計，為2~1500、2~1200、

5~1200、2~1000、5~1000、10~1000、2~900、5~900、10~900、15~900、20~900、25~900、30~900、35~900、40~900、45~900、50~900、55~900、2~800、5~800、10~800、15~800、20~800、25~800、30~800、35~800、40~800、45~800、50~800、55~800、2~700、5~700、10~700、15~700、20~700、25~700、30~700、35~700、40~700、45~700、50~700、55~700、2~600、5~600、10~600、15~600、20~600、25~600、30~600、35~600、40~600、45~600、50~600、55~600、2~540、2~530、2~520、2~510、2~505、2~500、2~495、2~490、5~550、5~540、5~530、5~520、5~510、5~505、5~500、5~495、5~490、10~550、10~540、10~530、10~520、10~510、10~505、10~500、10~495、10~490、15~550、15~540、15~530、15~520、15~510、15~505、15~500、15~495或15~490ppm的值。又，較合適為可採取以質量基準計，為0.4~4,440、0.4~3,440、0.4~2,440、0.4~1,440、0.4~940、0.4~440、0.4~240、0.4~40、0.4~30、0.4~20、0.4~10、0.4~5、0.4~1、1~4,440、5~4,440、10~4,440、50~4,440、100~4,440、300~4,440、500~4,440、700~4,440、900~4,440、1,000~4,440、2,000~4,440、3,000~4,440、1~3,440、5~2,440、10~1,440、50~940或100~440ppm的值。

【0040】本發明中，鼠李糖系甜菊醇醣苷之攝取量(服用量、投予量)並無特別限定，可視對象年齡、體重、

健康狀態等適當地選擇。

【0041】將本發明之GLP-1分泌促進劑製劑化使用時，作為劑型，可舉例例如錠劑、散劑、細粒劑、顆粒劑、乾式糖漿劑、被覆錠劑、口腔內崩解錠、咀嚼錠、膠囊劑、軟膠囊劑、糖漿劑、經腸營養劑等。

【0042】本發明，可使用或適用於治療的用途(醫療用途)或非治療用途之任一者。具體而言，不論是否被分類成醫藥品、準醫藥品、化妝品等，可使用或適用作為明示或暗示性訴求促進GLP-1之分泌的機能或起因於GLP-1之分泌促進的機能之任何組成物或飲食品。又，使用本發明之製品中，亦可標示促進GLP-1之分泌的機能或起因於GLP-1之分泌促進的機能。作為如此之標示雖無特別限定，但可舉例GLP-1之分泌促進機能，或起因於GLP-1之分泌促進的機能，例如，抑制血糖值上升機能、抑制食欲機能、抑制過度飲食機能、改善糖代謝機能、預防或治療糖尿病機能、預防或治療肥胖症機能、減低體重機能、減低體脂肪率機能、促進胃內容排出機能、抑制胃酸分泌機能、抑制肝醣釋出機能、保護心肌機能、提升學習記憶能力機能、預防或治療血管性疾病機能、預防或治療神經退化性疾病的機能、預防或治療非酒精性肝炎機能、預防或治療肝斑機能、預防或治療哮喘機能，或是可視同此等的標示等。

【0043】本發明之GLP-1分泌促進劑之使用的時間點，並無特別限定，例如，可為餐前、餐中、餐間、餐

後，睡前等。

【0044】本發明之一觀點，係關於以0.4~4,440ppm使用之用以處置藉由促進GLP-1分泌可改善之疾病的鼠李糖系甜菊醇醣苷。又，本發明之一觀點，係關於在對象中促進GLP-1之分泌，或，治療在對象中藉由促進GLP-1之分泌可改善之疾病的方法，其包含將0.4~4,440ppm之濃度的鼠李糖系甜菊醇醣苷投予至需要其之對象。進而又，本發明之一觀點，係關於0.4~4,440ppm之鼠李糖系甜菊醇醣苷之在製造用以治療藉由促進GLP-1分泌可改善之疾病之醫藥的使用。此外，上述各觀點，亦可具有本說明書中記載的各種特徵。

疾病，包含高血糖症、過度飲食症、胃酸過多症、糖尿病、肥胖症、血管性疾病、神經退化性疾病、非酒精性肝炎、肝斑、哮喘等。

【0045】本發明之GLP-1分泌促進劑，藉由視其用途、組成等之已知的方法來製造。使本發明之GLP-1分泌促進劑含有乳化劑之情形中，若經過混合水中油型之乳化劑與鼠李糖系甜菊醇醣苷與水性介質調製混合物的步驟，及，於所得之混合物中加入油脂等可包含至乳化粒子核中的成分並攪拌的步驟來製造，則至少一部分的鼠李糖系甜菊醇醣苷至少部分併入乳化粒子中，其結果，可更提升促進GLP-1分泌的效果故較佳。此時，攪拌係使用均質混合器等，以油脂等可包含至乳化粒子核中之方式，以較混合更激烈的條件進行高速攪拌較佳。

【0046】以較混合更激烈的條件進行高速攪拌時，攪拌速度，較合適為5,000~10,000、5,000~8,000或8,000~10,000rpm。

【0047】作為另一態樣，使本發明之GLP-1分泌促進劑含有乳化劑之情形中，可經過混合水中油型之乳化劑與水性介質而調製混合物的步驟，及，於所得之混合物中加入鼠李糖系甜菊醇醣苷與油脂等之可包含至乳化粒子核中的成分進行攪拌的步驟來製造。攪拌，係使用均質混合器等，以油脂等可包含至乳化粒子核中之方式，以較混合更激烈的條件進行高速攪拌較佳。以較混合更激烈的條件進行高速攪拌時，攪拌速度，較合適為5,000~10,000、5,000~8,000或8,000~10,000rpm。

【0048】本說明書中，用語「對象」係指具有GLP-1分泌能力之任意的生物個體，較佳為動物，進而佳為哺乳動物，進而佳為人類之個體。雖對象可為健康正常者(例如，不具特定之或任意之疾病)，亦可為罹患某些疾病者，但企圖用於藉由促進GLP-1之分泌可改善之疾病的處置等時，係指典型地罹患該疾病，或具有罹患風險的對象。

本說明書中，用語「處置」，係定為包含以疾病之治癒、一時性緩解或預防等為目的之醫學上容許之所有種類的預防的及/或治療的介入者。例如，「處置」包含包括疾病之進行延遲或停止、病變之退縮或消失、預防該疾病發病或防止復發等之各種目的之醫學上容許的介入。因

此，本發明之組成物可使用於疾病之治療及/或預防。

[實施例]

【0049】以下藉由實施例進一步具體說明本發明。此外，實驗例14為缺號。

<實驗例1>

探討RebA、RebB、RebM、RebN、RebD、RebC、MogV及甜菊苷是否具有促進GLP-1分泌的效果。具體而言，藉由以下之程序，測定GLP-1分泌量，將較對照組之no sample分泌量多者判定為有促進GLP-1分泌的效果。

【0050】

(各被驗物質之調整)

使用PBS(Thermo Fisher Scientific)(Cat. No. 14190250)溶解各被驗物質(B, C, D, E, F, G, I, J)，得到儲備原液。儲備原液之濃度表示如下。

B(RebA)；5mM,C (RebB)；1M,D(RebM)；2.5mM,

E(RebN)；1M,F(RebD)；2.5mM,G (RebC)；2.5mM,

I(MogV)；1M,J(甜菊苷)；1M

【0051】

(GLP-1之定量)

將H716 (ATCC) (Cat.No.ATCC(註冊商標) CCL-251)以RPMI1640 (10%FBS(Thermo Fisher Scientific) (Cat. No. 10439024), 1mM Sodium Pyruvate)，於37℃、5%CO_2之培

養箱中培養。

進行前培養2週，充分喚醒細胞後，製作細胞的原液。

於96孔盤中每1孔以2×10^5cells/90μL (high)播種細胞(N=4)。此時將培養基所含之FBS降至0.5%，抑制細胞的增殖。

24小時後，各加入10μL之最高濃度的樣本(即，儲備原液)。

進而24小時後進行GLP-1之定量。具體的程序依照PerkinElmer公司提供之Human GLP-1 (7-36 amide) Immunoassay kit (Cat.No.AL359) (Lot number 2361115)使用者指南。此外，使用PBS作為陰性對照組(no sample)。

【0052】結果表示於圖1。依據圖1，GLP-1分泌量顯著地較no sample多者，為RebA、RebB、RebC、MogV、甜菊苷。

【0053】

<實驗例2>

相對於RebC 20mg，加入21μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，藉由試管震盪器攪拌，靜置數小時得到RebC濃度1,000mM之儲備原液。使用所得之儲備原液與PBS，製作10mM溶液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋10mM溶液，得到試料G-1mM~試料G-10mM。表1中記載RebC之濃度。

【0054】

<實驗例3>

相對於甜菊苷15mg，加入12.4μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，藉由試管震盪器攪拌，得到甜菊苷濃度150mM之儲備原液。使用所得之儲備原液與PBS，製作15mM溶液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋15mM溶液，得到試料J-0.1mM~試料J-15mM。表1中記載甜菊苷之濃度。

【0055】

<實驗例4>

相對於RebA 20mg，加入8.27μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入74.5μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，獲得RebA濃度250mM之儲備原液。使用所得之儲備原液與PBS，製作25mM溶液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋25mM溶液，獲得試料B-1mM~試料B-25mM。表1中記載RebA之濃度。

【0056】

<實驗例5>

混合甘油490g、RebA 100g及聚甘油脂肪酸酯10g，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT油300g作為油脂，利用均質混合器(特殊機化工業製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g，得到RebA加工液。

相對於所得之RebA加工液241.8μL，加入10μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及

748.2μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA濃度25mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋儲備原液，得到試料B加工-0.25mM~試料B加工-25mM。表1中記載RebA之濃度。

【0057】

<GLP-1分泌量之測定>

表1所示條件下，將實驗例2~5所得之試料添加至培養基中，以所得之培養基培養細胞，測定2小時後之GLP-1分泌量。具體的程序如下。

將H716（源自人類結腸的細胞)以RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific製，型號：61870-036) (10%FBS (Hyclone製，型號：SH30396.03), 1mM Sodium Pyruvate)，於37℃、5%CO_2之培養箱中培養。

進行前培養2週，充分喚醒細胞後，製作細胞的原液。

於96孔盤中每1孔以2×10^5cells/90μL播種細胞。此時將培養基所含之FBS降至0.5%，抑制細胞的增殖。

24小時後，各試料各加入10μL(試料B為n=3~4，試料B加工、試料G、試料J為n=4)。培養基中之最終濃度，表示於表1之「樣本F.C.(mM)」之欄中。

自添加經過指定時間(2小時)後，回收96孔盤。

將回收之96孔盤以300g離心5分鐘，回收上清液。

使用Human GLP-1 (7-36amide) Immunoassay kit

(PerkinElmer公司製，型號：AL359C)定量回收之上清液中的GLP-1，結果表示於圖2~5。圖2~5中，亦記載作為無刺激性對照組(陰性對照)之含有1%DMSO之溶液的GLP-1分泌量，與作為陽性對照組之PMA (富士軟片和光純藥公司製，型號：162-23591)之水系溶液的GLP-1分泌量。PMA之水系溶液，係藉由相對於PMA 1mg加入16.21μL之DMSO調製儲備原液，並於該儲備原液中添加PBS製作1mM溶液，以含有1%DMSO之PBS稀釋此溶液而得。

【0058】以下顯示表1。表1中之陽性對照亦稱為陽性對照組。陰性對照亦稱為陰性對照組。

[表1]

	#	試料	添加濃度 (mM)	ppm換算	添加量 (μL)	培養基 (μL)	總計 (μL)	樣本 F.C. (mM)	ppm換算
無刺激陰性對照	1	含有1% DMSO之PBS	–	–	10	90	100	–	–
陽性對照	2	PMA 1%DMSO	0.01	6.2	10	90	100	0.001	0.6
	3		1	616.8	10	90	100	0.1	61.7
被驗物質	4	B 1%DMSO	1	967.0	10	90	100	0.1	96.7
	5		2.5	2417.5	10	90	100	0.25	241.8
	6		5	4835.1	10	90	100	0.5	483.5
	7		10	9670.1	10	90	100	1	967.0
	8		15	14505.2	10	90	100	1.5	1450.5
	9		20	19340.2	10	90	100	2	1934.0
	10		25	24175.3	10	90	100	2.5	2417.5
	11	B加工 1%DMSO	0.25	241.8	10	90	100	0.025	24.2
	12		0.5	483.5	10	90	100	0.05	48.4
	13		1	967.0	10	90	100	0.1	96.7
	14		2.5	2417.5	10	90	100	0.25	241.8
	15		5	4835.0	10	90	100	0.5	483.5
	16		10	9670.0	10	90	100	1	967.0
	17		15	14505.0	10	90	100	1.5	1450.5
	18		20	19340.0	10	90	100	2	1934.0
	19		25	24175.0	10	90	100	2.5	2417.5
	20	G 1%DMSO	1	951.01	10	90	100	0.1	95.1
	21		2.5	2377.5	10	90	100	0.25	237.8
	22		5	4755.1	10	90	100	0.5	475.5
	23		10	9510.1	10	90	100	1	951.0
	25	J 1%DMSO	0.1	80.5	10	90	100	0.01	8.0
	26		1	804.9	10	90	100	0.1	80.5
	27		2.5	2012.2	10	90	100	0.25	201.2
	28		5	4024.4	10	90	100	0.5	402.4
	29		10	8048.7	10	90	100	1	804.9
	30		15	12073.1	10	90	100	1.5	1207.3

・關於試料B加工，將最終濃度0.025 mM (#11)及0.05 mM (#12)追加至試驗預定濃度(0.1~2.5 mM)中。
・關於試料G，由於最終濃度成為1.5 mM (#24)無法溶解，故以最終濃度1 mM以下進行評估。

【0059】

<實驗例6：表面張力之測定>

為了調查促進GLP-1分泌的效果與乳化劑之表面張力之間是否有相關關係，以下述程序進行了實驗。

調製分別摻合RebA、RebD及RebM（市售品）之水溶液。RebA、RebD及RebM之摻合量，以蔗糖換算統整為Brix10。即，做成RebA 333ppm、RebD 351ppm、RebM 351ppm。藉由使用自動表面張力計(CBVP-Z型，協和界面科學股份有限公司製)之平板法測定所得水溶液之表面張力。將水作為對照，同樣地進行試驗。結果表示於圖6。

【0060】

<實驗例7：香味特性之評估>

藉由下述程序評估RebA之乳化組成物之香味特性。

將RebA溶解於純水中，製作100ppm及300ppm之水溶液，作為對照組。接著將實驗例5製作之RebA加工液添加至純水中，同樣地製作100ppm及300ppm之水溶液。由訓練有素的官能檢查員7人，將對照組定為3分，以0.5分為間隔實施添加RebA加工液之水溶液的香味評估，以平均值表示於圖。此外，香味評估，係以甜味強度、甜味後韻、苦味強度進行評估。

結果表示於圖7。

【0061】

<實驗例8>

相對於RebA 20mg，加入8.27μL之DMSO（富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入74.43μL之PBS

藉由試管震盪器攪拌，獲得RebA濃度250mM之儲備原液。使用所得之儲備原液與PBS，製作50mM溶液。

使用含有1%DMSO之PBS稀釋50mM溶液，得到試料B-1mM~試料B-25mM。表2中記載RebA之濃度。

【0062】

<實驗例9>

混合甘油490g、RebA 100g及聚甘油脂肪酸酯10g，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT油300g作為油脂，利用均質混合器(特殊機化工業製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g，得到RebA加工液。

相對於所得之RebA加工液241.8μL，加入10μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及748.2μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA濃度25mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋儲備原液，得到試料B加工-1mM~試料B加工-25mM。表2中記載RebA之濃度。

【0063】

<實驗例10>

除不使用RebA 100g，使用甘油490g、聚甘油脂肪酸酯10g、MCT油300g及水200g之點以外，與實驗例9之RebA加工液之調整同樣的進行，得到C溶液。

相對於所得之C溶液483.5μL，加入DMSO (富士軟片

和光純藥公司製，型號：037-24053) 10μL及PBS 506.5μL藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度50mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS稀釋所得之儲備原液，得到試料C-1mM~試料C-25mM。表2中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C中之甘油、聚甘油脂肪酸酯及MCT油之濃度與實驗例9之某試料B加工中之甘油、聚甘油脂肪酸酯及MCT油之濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0064】

<實驗例11>

與實驗例8同樣地進行，得到包含試料B+C之2倍濃度之RebA的試料B。即，得到試料B-2mM、試料B-5mM、試料B-10mM、試料B-20mM、試料B-30mM、試料B-40mM、試料B-50mM。連字符後之濃度，表示RebA之濃度。

與實驗例10同樣地進行，得到包含試料B+C之2倍濃度之聚甘油脂肪酸酯等的試料C。即，得到試料C-2mM、試料C-5mM、試料C-10mM、試料C-20mM、試料C-30mM、試料C-40mM、試料C-50mM。連字符後之濃度，表示RebA相當濃度。

將相同濃度之試料B與試料C (例如試料B-2mM與試料C-2mM)等量混溶，得到試料B+C-1mM~試料B+C-25mM。表2中記載了RebA之濃度。

【0065】

<實驗例12>

相對於甘油118.5μL，加入10μL之DMSO（富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及871.5μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度25mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料D-1mM~試料D-25mM。表2中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料D中之甘油濃度，與實驗例9之某試料B加工中之甘油濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0066】

<實驗例13>

相對於MCT油72.5μL，加入10μL之DMSO（富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及917.5μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度25mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料E-1mM~試料E-25mM。表2中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料E中之MCT油之濃度，與實驗例9之某試料B加工中之MCT油濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0067】

<GLP-1分泌量之測定>

在表2所示條件下，將上述實驗例8~13所得之試料添加至培養基，以所得之培養基培養細胞，測定2小時後之GLP-1分泌量。具體的程序如下。

將H716（源自人類結腸的細胞）以RPMI1640（Thermo Fisher Scientific公司製，型號：61870-036）（10%FBS（Hyclone製，型號：SH30396.03），1mM Sodium Pyruvate），於37℃、5%CO_2之培養箱中培養。

進行前培養2週，充分喚醒細胞後，製作細胞的原液。

於96孔盤中每1孔以2×10^5cells/90μL播種細胞。將此時培養基所含之FBS（Hyclone公司製，型號：SH30396.03）降至0.5%，抑制細胞的增殖。

24小時後，各試料各加入10μL(n=3~4)。培養基中之最終濃度，顯示於表2之「樣本F.C.」之欄。

自添加經過指定時間(2小時)後，回收96孔盤。

將回收之96孔盤以300g離心5分鐘，回收上清液。

使用PerkinElmer公司製Human GLP-1 (7-36amide) Immunoassay kit，定量經回收之上清液中的GLP-1。此時，校正曲線之標準的範圍為30~100,000pg/mL，由於有大於100,000pg/mL之值為錯誤者，故將認為100,000pg/mL以上之值作為100,000pg/mL算出。

藉由史密諾夫-格拉布斯(Smirnov-Grubbs)檢定將離群值($p<0.01$)除外。

結果表示於圖8。圖8中，亦揭示作為無刺激性對照組之含有1%DMSO之溶液的GLP-1分泌量，與作為陽性對照組之PMA（富士軟片和光純藥公司製，型號：162-23591）之水系溶液的GLP-1分泌量。PMA之水系溶液，係藉由相

對於PMA 1mg加入16.21μL之DMSO調製儲備原液，並於該儲備原液中添加PBS製作1mM溶液，以含有1%DMSO之PBS稀釋此溶液而得。

【0068】接著，為了確認，其他盤亦進行GLP-1分泌量之測定。具體而言，使用與圖8相同之培養上清液，將試料B~D以1個測定盤，試料E以另1個測定盤進行GLP-1量之測定。2小時後之培養上清液以同一測定盤測定的結果表示於圖9~14。使用之各試料之濃度記載於圖9~14中。此外，圖11、13、14記載之C、D、E之濃度，為RebA相當濃度。

雖校正曲線之範圍為30~100,000pg/mL，但由於此次有大於100,000pg/mL之值為錯誤之數值，故關於大於100,000pg/mL之值作為理論值算出。

【0069】以下顯示表2。表2中之陽性對照，亦稱為陽性對照組。陰性對照，亦稱為陰性對照組。

[表2]

	#		添加濃度		ppm換算	添加量 (μL)	PBS	培養基 (μL)	總計 (μL)	樣本 F.C.		ppm換算
無刺激陰性對照	1	含有1% DMSO之溶液	-		-	10	0	90	100	-		-
陽性對照	2	PMA 1%DMSO	0.01	mM	-	10	0	90	100	0.001	mM	-
	3		1	mM	-	10	0	90	100	0.1	mM	-
被驗物質	4	B 1%DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	5		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	6		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	7		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	8		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	9		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	10		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	11	B加工 1%DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	12		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	13		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	14		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	15		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	16		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	17		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	18	C 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	19		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	20		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	21		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	22		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	23		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	24		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-
	25	B+C 1% DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	26		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	27		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	28		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	29		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	30		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	31		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	32	D 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	33		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	34		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	35		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	36		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	37		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	38		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-
	39	E 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	40		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	41		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	42		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	43		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	44		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	45		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-

【0070】

<實驗例15>

相對於RebA36.3mg，加入9.4μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入929.0μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA濃度40mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS稀釋所得之儲備原液與PBS，得到試料B-0.31mM~試料B-20mM。表3中記載了

RebA之濃度。

【0071】

<實驗例16>

混合甘油490g、RebA 100g及聚甘油脂肪酸酯10g，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT油300g作為油脂，利用均質混合器(特殊機化工業製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g，得到RebA加工液。

相對於所得之RebA加工液193.4μL，加入10μL之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及796.6μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA濃度20mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋儲備原液，得到試料B加工-0.31mM~試料B加工-20mM。表3中記載了RebA之濃度。

【0072】

<實驗例17>

除不使用RebA 100g，使用甘油490g、聚甘油脂肪酸酯10g、MCT油300g及水200g之點以外，與實驗例16之RebA加工液之調整同樣地進行得到C溶液。

相對於C溶液386.8μL，加入10μL之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及603.2μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度40mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS稀釋儲備原液，得到試料C-

0.31mM~試料C-20mM。表3中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C中之聚甘油脂肪酸酯之濃度，與實驗例16之某試料B加工中之聚甘油脂肪酸酯濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0073】

<實驗例18>

與實驗例15同樣地進行，得到包含試料B+C之2倍濃度之RebA的試料B。即，得到試料B-0.62mM、試料B-2.5mM、試料B-10mM、試料B-40mM。連字符後之濃度，表示RebA之濃度。

與實驗例17同樣地進行，得到包含試料B+C之2倍濃度之聚甘油脂肪酸酯的試料C。即，得到試料C-0.62mM、試料C-2.5mM、試料C-10mM、試料C-40mM。連字符後之濃度，表示RebA相當濃度。

將相同濃度之試料B與試料C (例如試料B-0.62mM與試料C-0.62mM)等量混溶，得到試料B+C-0.31mM~試料B+C-20mM。表3中記載了RebA之濃度。

【0074】

<實驗例19>

相對於甘油94.8μL，加入10μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及895.2μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度20mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料D-0.31mM~試料D-20mM。表3中記載了

RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料D中之甘油之濃度，與實驗例16之某試料B加工中之甘油濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0075】

<實驗例20>

相對於MCT油58.0μL，加入10μL之DMSO（富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及932.0μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度20mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之儲備原液，得到試料E-0.31mM~試料E-20mM。表3中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料E中之MCT油之濃度，與實驗例16之某試料B加工中之MCT油濃度相同時之該試料B加工中的RebA之濃度的意思。

【0076】

<細胞毒性>

表3所示之條件下，將上述實驗例15~20所得之試料添加至培養基，以所得之培養基培養細胞，測定2小時後與24小時後之細胞毒性。具體的程序如下。

將H716細胞以RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific公司製，型號：61870-036) (10%FBS (Gibco製，型號：SH102770), 1mM Sodium Pyruvate)於37℃、5%CO_2下培養於培養箱內。H716細胞以2×10^5cells/90μL/孔(死細胞評估用)播種於96孔盤及以4×10^5cells/180μL/孔(形態觀察用)播種於48孔盤。播種於盤時之培養基中FBS定為0.5%。細胞

播種24小時後，將各濃度之試料以10μL/孔(96孔盤)或20μL/孔(48孔盤)添加。培養基中之最終濃度，顯示於表3之「樣本F.C.」之欄。評估添加試料2小時後各試料之最高濃度(表3記載之#1、#6、#10、#14、#18、#22、#26、#30)。

【0077】

(死細胞作為指標之評估)

試料添加2小時後及24小時後，將細胞以100×g離心5分鐘去除上清液。以50μL/孔添加Propidium iodide溶液(0.66μg/mL，以PBS進行1：1500稀釋)，室溫靜置15分鐘進行死細胞的染色。藉由吸移使細胞懸濁後，顯微鏡下拍攝相位差圖像及螢光圖像。藉由ImageJ基於相位差圖像計算測量細胞總數，基於螢光圖像計算測量死細胞數。使用計算測量之細胞數算出死細胞率。

死細胞率(%)=死細胞數/細胞總數×100

添加各試料時之死細胞率，係以將細胞播種24小時後之未添加時中的死細胞率定為0%，添加70%乙醇於冰上靜置30分鐘以上時的死細胞率定為100%來修正。結果表示於圖15。圖15a顯示2小時後之結果，圖15b顯示24小時後之結果。

【0078】由顯示2小時後之結果的圖15a可知，所有試料中皆未誘導細胞死。

【0079】又，由顯示24小時後之結果的圖15b可理解，雖添加試料B+C (RebA濃度2mM)時之死細胞率為最

高，但與PMA之最低濃度為同等之死細胞率。關於試料B+C以外，為與陰性對照(-)(亦稱為陰性對照組)同等或低於陰性對照的死細胞率。因此，以試料B+C誘導細胞死的可能性低，其他試料中未誘導細胞死。

【0080】

(以細胞形態作為指標之評估)

添加試料2小時後及24小時後，在顯微鏡下拍攝細胞，確認形態變化的有無。雖由於試料B加工、C及B+C呈白濁故添加0.5mM及2mM時在顯微鏡下之判定困難，但即使添加其他試料至H716細胞，亦未見到細胞的收縮或破裂等之形態變化。

【0081】以下顯示表3。表3中之陽性對照，亦稱為陽性對照組。陰性對照，亦稱為陰性對照組。

[表3]

	#	被驗物質	添加濃度		ppm換算	樣本 F.C.		ppm換算
無刺激陰性對照	1	含有1% DMSO之溶液	-		-	-		-
陽性對照	2	PMA (1%DMSO)	0.004	mM	-	0.0004	mM	-
	3		0.016	mM	-	0.0016	mM	-
	4		0.063	mM	-	0.0063	mM	-
	5		0.25	mM	-	0.025	mM	-
	6		1	mM	-	0.1	mM	-
被驗物質	7	B 1%DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	8		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	9		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	10		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	11	B加工 1%DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	12		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	13		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	14		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	15	C 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	16		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	17		5	mM	-	0.50	mM	-
	18		20	mM	-	2.00	mM	-
	19	B+C 1% DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	20		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	21		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	22		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	23	D 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	24		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	25		5	mM	-	0.50	mM	-
	26		20	mM	-	2.00	mM	-
	27	E 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	28		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	29		5	mM	-	0.50	mM	-
	30		20	mM	-	2.00	mM	-

【0082】

<實驗例21>

相對於RebA 134.3mg，加入34.7μL之DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)後，加入3438μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA濃度40mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS稀釋所得之儲備原液，得到試料B-1mM~試料B-20mM。表4中記載了RebA之濃度。

【0083】

<實驗例22>

除將RebA 100g替換成水100g之點，以及，作為乳化劑使用蔗糖脂肪酸酯10g代替聚甘油脂肪酸酯10g之點以外，與實驗例16之RebA加工液之調整同樣地進行得到C-1溶液。具體而言，混合甘油490g、蔗糖脂肪酸酯10g (三菱化學食品製　HLB=16)於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT油300g作為油脂，利用均質混合器(特殊機化工業製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水200g，得到C-1溶液。

相對於所得之C-1溶液580.2μL，加入15μL之DMSO(富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)及904.8μL之PBS藉由試管震盪器攪拌，得到RebA相當濃度40mM之儲備原液。

使用含有1%DMSO之PBS稀釋所得之儲備原液，得到試料C-1-1mM~試料C-1-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C-1中之甘油及乳化劑之濃度，與實驗例25之某試料B+C-1中之甘油及乳化劑之濃度相同時之該試料B+C-1中的RebA之濃度的意思。

【0084】

<實驗例23>

除使用酵素分解卵磷脂(太陽化學製　HLB=12.0) 10g代替蔗糖脂肪酸酯(三菱化學食品製　HLB=16) 10g之點以外，與實驗例22同樣地進行，得到試料C-2-1mM~試料C-2-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C-2中之甘油及乳化劑之濃度，與實驗例26之某試料B+C-2中之甘油及乳化劑之濃度相同時之該試料B+C-2中的RebA之濃度的意思。

【0085】

<實驗例24>

除使用有機酸單甘油酯(太陽化學製　HLB=9.0) 10g代替蔗糖脂肪酸酯(三菱化學食品製　HLB=16) 10g之點以外，與實驗例22同樣地進行，得到試料C-3-1mM~試料C-3-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料C-3中之甘油及乳化劑之濃度，與實驗例27之某試料B+C-3中之甘油及乳化劑之濃度相同時之該試料B+C-3中的RebA之濃度的意思。

【0086】

<實驗例25>

與實驗例21同樣地進行，得到包含試料B+C-1之2倍濃度之RebA的試料B。即，得到試料B-2mM、試料B-5mM、試料B-10mM、試料B-20mM、試料B-30mM、試料B-40mM。連字符後之濃度，表示RebA之濃度。

與實驗例22同樣地進行，得到包含試料B+C-1之2倍濃度之蔗糖脂肪酸酯的C-1試料。即，得到試料C-1-2mM、

試料C-1-5mM、試料C-1-10mM、試料C-1-20mM、試料C-1-30mM、試料C-1-40mM。連字符後之濃度，表示RebA相當濃度。

將相同濃度之試料B與試料C（例如試料B-1-2mM與試料C-1-2mM)等量混溶，得到試料B+C-1-1mM~試料B+C-1-20mM。表4中記載了RebA之濃度。

【0087】

<實驗例26>

除使用酵素分解卵磷脂(太陽化學製　HLB=12.0) 10g代替蔗糖脂肪酸酯(三菱化學食品製　HLB=16) 10g之點以外，與實驗例25同樣地進行，得到試料B+C-2-1mM~試料B+C-2-20mM。表4中記載了RebA之濃度。

【0088】

<實驗例27>

除使用有機酸單甘油酯(太陽化學製　HLB=9.0) 10g代替蔗糖脂肪酸酯(三菱化學食品製　HLB=16) 10g之點以外，與實驗例25同樣地進行，得到試料B+C-3-1mM~試料B+C-3-20mM。表4中記載了RebA之濃度。

【0089】

<實驗例28>

相對於蔗糖脂肪酸酯13.1mg加入339μL之DMSO（富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)進行試管震盪，進而以DMSO稀釋20倍，得到RebA相當濃度2,000mM之儲備原液。於所得之儲備原液摻合PBS，得到20mM溶液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之20mM溶液，得到試料G-1-1mM~試料G-1-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料G-1中之蔗糖脂肪酸酯之濃度，與實驗例25之某試料B+C-1中之蔗糖脂肪酸酯之濃度相同時之該試料B+C-1中的RebA之濃度的意思。

【0090】

<實驗例29>

相對於酵素分解卵磷脂20.9mg加入540μL之PBS進行試管震盪，進而以DMSO (富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053)稀釋20倍，得到RebA相當濃度2,000mM之儲備原液。於儲備原液摻合PBS與DMSO，製作20mM溶液(1%DMSO)。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之20mM溶液，得到試料G-2-1mM~試料G-2-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料G-2中之酵素分解卵磷脂之濃度，與實驗例26之某試料B+C-2中之酵素分解卵磷脂之濃度相同時之該試料B+C-2中的RebA之濃度的意思。

【0091】

<實驗例30>

於60℃溶解有機酸單甘油酯，相對於35.0mg加入905μL之DMSO進行試管震盪，進而以DMSO稀釋20倍，得到RebA相當濃度2,000mM之儲備原液。於儲備原液摻合

PBS得到20mM溶液。

使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之20mM溶液，得到試料G-3-1mM~試料G-3-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料G-3中之有機酸單甘油酯之濃度，與實驗例27之某試料B+C-3中之有機酸單甘油酯之濃度相同時之該試料B+C-3中的RebA之濃度的意思。

【0092】

<實驗例31>

於60℃溶解聚甘油脂肪酸酯，相對於50μL加入259μL之DMSO（富士軟片和光純藥公司製，型號：037-24053）後，加入984μL之PBS進行試管震盪，得到RebA相當濃度400mM之儲備原液。

使用所得之儲備原液與PBS，調製20mM溶液。使用含有1%DMSO之PBS視需要稀釋所得之20mM溶液，得到試料G-4-1mM~試料G-4-20mM。表4中記載了RebA相當濃度。所謂RebA相當濃度，係指某試料G-4中之聚甘油脂肪酸酯之濃度，與實驗例25~27之某試料B+C中之乳化劑之濃度相同時之該試料B+C中的RebA之濃度的意思。

【0093】

<GLP-1分泌量>

測定將上述實驗例21~31所得之試料給予細胞2小時後與24小時後之GLP-1分泌量。具體的程序如下。

將H716細胞以RPMI1640（Thermo Fisher Scientific公

司製，型號：61870-036)(10%FBS (Gibco製，型號：SH102770), 1mM Sodium Pyruvate)於37℃、5%CO_2下培養於培養箱內。H716細胞以2×10^5cells/90μL/孔播種於96孔盤中。播種於盤時之培養基中FBS定為0.5%。

細胞播種24小時後，如表4所示，將實驗例21~31所得之試料以10μL/孔添加至培養基。培養基中之最終濃度，顯示於表4之「樣本F.C.」之欄。

自添加試料2小時後及24小時後，將96孔盤以300×g離心5分鐘，回收培養上清液。

使用Human GLP-1 (7-36amide) Immunoassay kit (PerkinElmer公司製，型號：AL359C)定量經回收之培養上清液中的GLP-1。關於定量值，將超過校正曲線之範圍為錯誤之值除外。又，使用統計解析軟體R製作Box plot，將小於第一四分位或大於第三四分位之值為1.5四分位範圍以上之情形當作離群值除外。

結果表示於圖16。圖16中亦揭示作為無刺激性對照組之含有1%DMSO之溶液的GLP-1分泌量，與作為陽性對照組之PMA (富士軟片和光純藥公司製，162-23591)之水系溶液的GLP-1分泌量。PMA之水系溶液，係藉由相對於PMA 1mg加入16.21μL之DMSO調製儲備原液，並於該儲備原液中添加PBS製作1mM溶液，以含有1%DMSO之PBS稀釋此溶液而得。

【0094】以下顯示於表4。表4中之陽性對照，亦稱為陽性對照組。陰性對照，亦稱為陰性對照組。

[表4]

	#	添加濃度			ppm換算	添加量 (μL)	培養基 (μL)	總計 (μL)	樣本 F.C.	
無刺激陰性對照	1	含有1%DMSO之PBS	-		-	10	90	100	-	
陽性對照	2	PMA (1%DMSO)	0.01	mM	-	10	90	100	0.001	mM
	3		1	mM	-	10	90	100	0.1	mM
被驗物質	4	B (1%DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	5		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	6		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	7		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	8		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	9		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	10	C-1 (1%DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	11		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	12		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	13		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	14		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	15		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	16	C-2 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	17		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	18		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	19		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	20		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	21		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	22	C-3 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	23		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	24		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	25		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	26		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	27		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	28	B + C-1 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	29		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	30		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	31		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	32		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	33		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	34	B + C-2 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	35		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	36		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	37		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	38		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	39		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	40	B + C-3 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	41		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	42		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	43		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	44		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	45		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	46	G-1 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	47		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	48		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	49		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	50		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	51		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	52	G-2 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	53		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	54		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	55		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	56		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	57		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	58	G-3 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	59		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	60		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	61		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	62		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	63		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	64	G-4 (1% DMSO)	1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	65		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	66		5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	67		10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	68		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	69		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM

※關於#10~69以B加工濃度記載

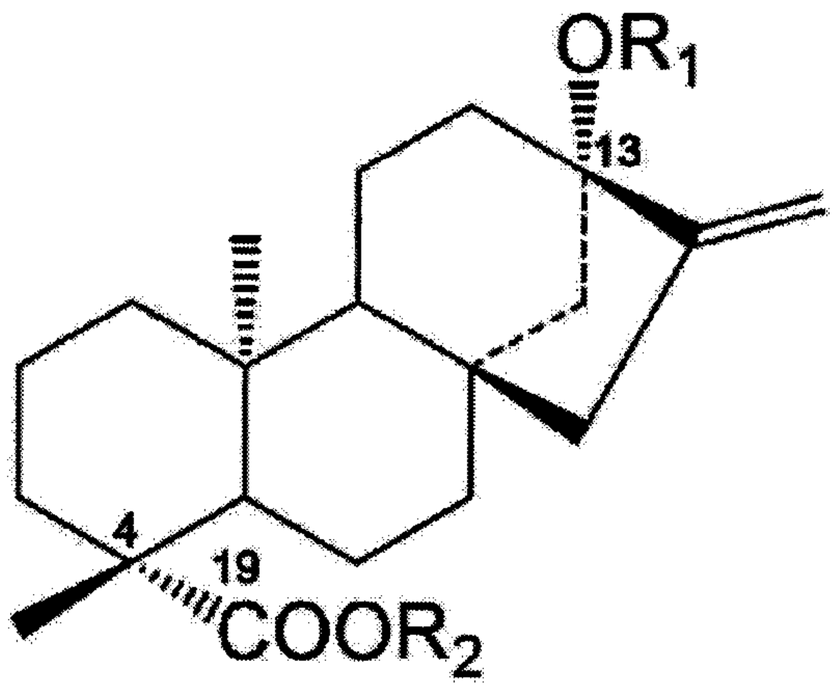
【0095】

<實驗例32>

測定甜菊苷、RebA、RebD、RebM之分配比率。用於

參考，甜菊苷、RebA、RebD、RebM之結構式表示於下。

[化3]



化合物名	R_1	R_2
瑞鮑迪苷A (rebA)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1-
甜菊苷 (stv)	Glcβ1, 2Glcβ1-	Glcβ1-
瑞鮑迪苷D (rebD)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1, 2Glcβ1-
瑞鮑迪苷M (rebM)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-

具體而言，進行以下之操作。

於分液漏斗中放入純水與甲苯各約100mL後，添加各甜菊醇醣苷30mg。以液體不漏出之方式密閉，藉由震盪機震盪約30分鐘攪拌後靜置分液漏斗。分配比率在液層分離成2層時，自各別的層進行取樣，藉由LCMS進行測定。

測定結果與試驗中之照片顯示於圖17。試驗後之含RebA之液的照片顯示於圖18。

【0096】

<實驗例33>

1.樣本調製

以下述程序準備樣本SA-70A、SA-70B、SA-200A、SA-200B、SA-206A、SA-206B、SA-207A、SA-207B。此外，以A結尾的樣本，為使RebA溶解於水系而調製的樣

本。以B結尾的樣本，為使RebA分散於油系而調製的樣本。

【0097】

(SA-70A)

混合甘油487g、RebA 103g及聚甘油脂肪酸酯10g (太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解獲得水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT 300g作為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到乳化組成物SA-70A。

【0098】

(SA-70B)

混合甘油487g及聚甘油脂肪酸酯10g (太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解獲得水系混合溶液。又，於室溫混合MCT 300g及RebA 103g得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到乳化組成物SA-70B。

【0099】

(SA-200A)

混合甘油567g、RebA 103g及聚甘油脂肪酸酯30g (太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT 200g作

為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到乳化組成物SA-200A。

【0100】

(SA-200B)

混合甘油567g及聚甘油脂肪酸酯30g (太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。又，於室溫混合MCT 200g及RebA 103g得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到乳化組成物SA-200B。

【0101】

(SA-206A)

混合甘油537g、RebA 103g及聚甘油脂肪酸酯60g (太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT 200g作為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到預備乳化組成物後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力150MPa加以細微乳化得到乳化組成物SA-206A。

【0102】

(SA-206B)

混合甘油578g及聚甘油脂肪酸酯55g (太陽化學股份有

限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。又，於室溫混合MCT 182g及RebA 94g得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水91g得到預備乳化組成物後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力150MPa加以細微乳化得到乳化組成物SA-206B。

【0103】

(SA-207A)

混合甘油706g、RebA34g及聚甘油脂肪酸酯60g (太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。於此水系混合溶液中添加MCT 100g作為油脂，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到預備乳化組成物後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力150MPa加以細微乳化得到乳化組成物SA-207A。

【0104】

(SA-207B)

混合甘油706g及聚甘油脂肪酸酯60g (太陽化學股份有限公司製，HLB=16.7)，於70℃升溫溶解做成水系混合溶液。又，於室溫混合MCT 100g及RebA 34g得到油系混合溶液。於水系混合溶液中添加油系混合溶液，藉由均質混合器(特殊機化工業(股)製)以旋轉數8000rpm進行乳化。攪拌結束後冷卻至40℃，加入水100g得到預備乳化組成物

後，進而藉由濕式微粒化裝置以壓力150MPa加以細微乳化得到乳化組成物SA-207B。

【0105】

2.乳化穩定性之評估

使用上述1.所調整的樣本，進行穩定性之評估。具體的程序如下。

【0106】

2.1調整後立即之乳化粒徑的測定

測定調製後立即之各樣本中乳化粒子的平均粒徑。具體而言，將調製後立即之各樣本以離子交換水適當稀釋成雷射散射強度成為1%左右，之後，以雷射繞射散射式粒度分佈測定器(Spectris股份有限公司Malvern Panalytical事業部)測定。

【0107】

2.2冷藏保存後之乳化粒徑的測定

將各樣本靜置於冷藏庫(4℃)內2個月。之後，與2.1同樣地進行，測定乳化粒徑。

【0108】結果表示於下述表中。

[表5]

(%)	SA-70		SA-200		SA-206		SA-207	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Reb A	10.3		10.3		10.3	9.4	3.4	
MCT	30.0		20.0		20.0	18.2	10.0	
乳化劑	1.0		3.0		6.0	5.5	6.0	
甘油	48.7		56.7		53.7	57.8	70.6	
水	10.0		10.0		10.0	9.1	10.0	
總計	100.0		100.0		100.0	100.0	100.0	
乳化粒徑(μm) 調製時	0.40	0.27	0.20	0.17	0.07	0.08	0.06	0.06
乳化粒徑(μm) 冷藏保存2個月時	0.36	0.29	0.20	0.18	0.11	0.10	0.09	0.10

【0109】

3.香味特性之評估

使用上述1.所調整的樣本，評估香味特性。具體而言，以下述程序進行評估。

將RebA溶解於純水，製作RebA濃度為467ppm的水溶液，作為對照組。接著，在1.中所調整之各樣本中添加純水，製作RebA濃度為467ppm的水溶液。由訓練有素的官能檢查員7人，將對照組定為3分，以0.5分為間隔實施各水溶液的香味評估，算出平均值後，進行排序。香味評估，係以甜味強度、甜味後韻、苦味強度進行評估。相同分數者定為相同序位。序位表示於下述表之各評估項目的欄中。下述表之總計的欄中，表示序位的和。

［表6］

	70A	200A	206A	207A
甜味強度	2	3	1	3
後韻	3	1	2	1
苦味	1	4	2	3
總計	6	8	5	7

	70B	200B	206B	207B
甜味強度	4	2	3	1
後韻	3	2	1	2
苦味	4	2	1	3
總計	11	6	5	6

【0110】

4.保存後之各種特性之評估

使用1.中所調整之樣本，評估保存後之乳化穩定性、香味特性、震動穩定性。具體而言，以下述程序進行評估。

於16990.3mg之樣本SA-70A中，添加純水3,483ml，得到評估用液70A。除使用樣本SA-206A代替樣本SA-70A之點以外，同樣地進行，得到評估用液206A。各評估用液之組成如下。

[表7]

	70A	206A
樣本量 (mg)	16,990.3	16,990.3
樣本中之RebA率 (%)	10.3	10.3
RebA換算 (mg)	1,750.0	1,750.0
純水添加量 (ml)	3,483.0	3,483.0
總量 (ml)	3,500	3,500
RebA濃度 (ppm)	500.0	500.0

將所得之評估用液70A與評估用液206A，於庫內溫度5℃之冷藏庫靜置4週。又，將另外的評估用液70A與評估用液206A靜置於55℃的恆溫保存庫4週。

又，使用無水檸檬酸，將評估用液70A與評估用液206A之pH調整至2.5，於庫內溫度5℃之冷藏庫靜置4週。使用無水檸檬酸，將另外的評估用液70A與評估用液206A之pH調製成2.5，於55℃之恆溫保存庫靜置4週。

【0111】

4-1.保存後之乳化穩定性

觀察靜置4週後評估用液之液面的外觀。結果表示於下述表。

[表8]

		靜置溫度	
		5℃	55℃
無pH調製	70A	無浮油	無浮油
	206A	無浮油	無浮油
pH2.5	70A	有浮油	有浮油
	206A	無浮油	無浮油

【0112】

4-2.保存溫度之對香味特性的影響

又，確認靜置溫度之對香味的影響。具體而言以下述程序進行確認。

將無pH調製、靜置溫度5℃之評估用液70A作為對照組。以0.5分為間隔評估以對照組之評估定為5分時之無pH調製、靜置溫度55℃之評估用液70A的香味。檢查員為訓練有素的官能檢查員4人。算出各檢查員之評估的平均值。

同樣地進行，將無pH調製、靜置溫度5℃之評估用液206A作為對照組，以0.5分為間隔評估無pH調製、靜置溫度55℃之評估用液206A的香味。

同樣地進行，將pH2.5、靜置溫度5℃之評估用液70A作為對照組，以0.5分為間隔評估pH2.5、靜置溫度55℃之評估用液70A的香味。

同樣地進行，將pH2.5、靜置溫度5℃之評估用液206A作為對照組，以0.5分為間隔評估pH2.5、靜置溫度55℃之評估用液206A的香味。

【0113】結果表示於圖19。又，檢查員的評論記載於下。

70A，無pH調製；

苦味的尖銳被去除而溫和、乳白、微透明。變得溫和苦味減少。乳白度增加。變得容易飲用。雖稍微少了清新感，但沒有嚴重的劣化。

206A，無pH調製；

苦味的尖銳被去除而溫和、乳白、微透明。變得溫和苦味減少。乳白度增加。甜度未改變。無變化。雖稍微少了清新感，但沒有嚴重的劣化。

70A，pH2.5；

酸味被抑制。酸味增加。刺激。變成溫和的酸味。良好。稍稍變得溫和，酸味的刺激減少。

206A，pH2.5；

酸味被抑制。酸味增加。但變得容易飲用。無變化。苦味略有減少。良好。稍稍變得溫和，酸味的刺激減少。

【0114】

4-3.震動加速試驗

對於在5℃靜置4週後之評估用液，藉由分光光度計(島津公司製 UV1800 UV spectrophotometer)測定波長680nm中之吸光度。

接著，以3000rpm將評估用液離心30分鐘。對於離心後之評估用液，測定波長680nm中之吸光度。算出離心前後吸光度的差Δabs，Δabs為0.02以下者，係震動時之乳化穩定性優異，評估為「良好」。

結果表示於圖20。

【0115】

5.甜味強度的降低程度

使用上述1.中所調整之樣本SA-70A及SA-206A，評估乳化所致之甜味強度的降低程度。具體而言，以下述程序進行評估。

將RebA溶解於純水製作467ppm之水溶液，作為對照組。接著，添加1.所調整之各樣本至純水，製作RebA濃度為467ppm的水溶液。讓訓練有素之官能檢查員4人，選擇各水溶液為接近蔗糖水溶液之Brix 2、5、8、11、14哪一個的甜味強度。算出各檢查員之評估結果的平均值。結果表示於圖21。

【0116】

<實驗例34>

與實驗例33之「4.保存後之各種特性之評估」同樣地進行，得到評估用液70A及評估用液206A。

以含DMSO之PBS稀釋所得之評估用液70A與評估用液206A，調整下述表中添加濃度之欄所示RebA濃度的稀釋液。

又，將另外的評估用液70A與評估用液206A靜置於55℃的恆溫保存庫4週。以含DMSO之PBS稀釋靜置後之評估用液70A與評估用液206A，調整下述表中添加濃度之欄所示RebA濃度的稀釋液。

此外，調製含有1%DMSO之溶液作為無刺激性對照組(陰性對照)。又，以成為下述表中添加濃度之欄所示濃度之方式，調整以1%DMSO稀釋PMA (富士軟片和光純藥公司製，型號：162-23591)而成者作為陽性對照組。

[表9]

各被驗物質之添加量與最終濃度

#		添加濃度(mM)	添加量 (μL)	培養基 (μL)	總計 (μL)	最終濃度 (mM)
1	含有1%DMSO之溶液	-	10	90	100	-
2	PMA (1%DMSO)	0.01	10	90	100	0.001
3		1	10	90	100	0.100
4	70A	0.25	10	90	100	0.025
5		0.5	10	90	100	0.050
6		1	10	90	100	0.100
7		2.5	10	90	100	0.250
8		5	10	90	100	0.500
9		10	10	90	100	1.000
10	70A4W	0.25	10	90	100	0.025
11		0.5	10	90	100	0.050
12		1	10	90	100	0.100
13		2.5	10	90	100	0.250
14		5	10	90	100	0.500
15		10	10	90	100	1.000
16	206A	0.25	10	90	100	0.025
17		0.5	10	90	100	0.050
18		1	10	90	100	0.100
19		2.5	10	90	100	0.250
20		5	10	90	100	0.500
21		10	10	90	100	1.000
22	206A4W	0.25	10	90	100	0.025
23		0.5	10	90	100	0.050
24		1	10	90	100	0.100
25		2.5	10	90	100	0.250
26		5	10	90	100	0.500
27		10	10	90	100	1.000

【0117】在上述表所示條件下，將稀釋液No.1~27添加至培養基，以所得之培養基培養細胞。具體的程序如下。

將H716細胞以RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific公司製，型號：61870-036) (10%FBS (Gibco製，型號：SH102770), 1mM Sodium Pyruvate)於37℃、5%CO_2下培養於培養箱內。H716細胞以2×10^5cells/90μL/孔播種於96孔盤中。播種於盤時之培養基中FBS定為0.5%。自細胞播種經過24小時後，將稀釋液No.1~27以10μL/孔的量加至孔中。添加稀釋液後之培養基中的RebA最終濃度(No.2,3之情形中為PMA濃度)，顯示於上述表之「Final conc (mM)」欄中。

【0118】確認自添加稀釋液2小時後與24小時後的細胞生存率。任一樣本皆無問題。

【0119】自添加稀釋液2小時後及24小時後，將96孔

盤以300×g離心5分鐘，回收培養上清液。

使用Human GLP-1 (7-36amide) Immunoassay kit (PerkinElmer公司製，型號：AL359C)，定量經回收之培養上清液中的GLP-1。關於定量值，將超過校正曲線之範圍為錯誤之值除外。又，使用統計解析軟體R製作Box plot，將小於第一四分位或大於第三四分位之值為1.5四分位範圍以上之情形當作離群值除外。

結果表示於圖22。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種GLP-1分泌促進劑，其特徵為包含0.4~4,440ppm之具有鼠李糖鍵結而成之結構的甜菊醇醣苷。

【請求項2】如請求項1之GLP-1分泌促進劑，其中前述甜菊醇醣苷，包含選自由瑞鮑迪苷C、瑞鮑迪苷K、杜爾可苷A、杜爾可苷C、杜爾可苷D及杜爾可苷F所成群組中之至少1種。

【請求項3】如請求項1之GLP-1分泌促進劑，其中前述甜菊醇醣苷包含瑞鮑迪苷C。

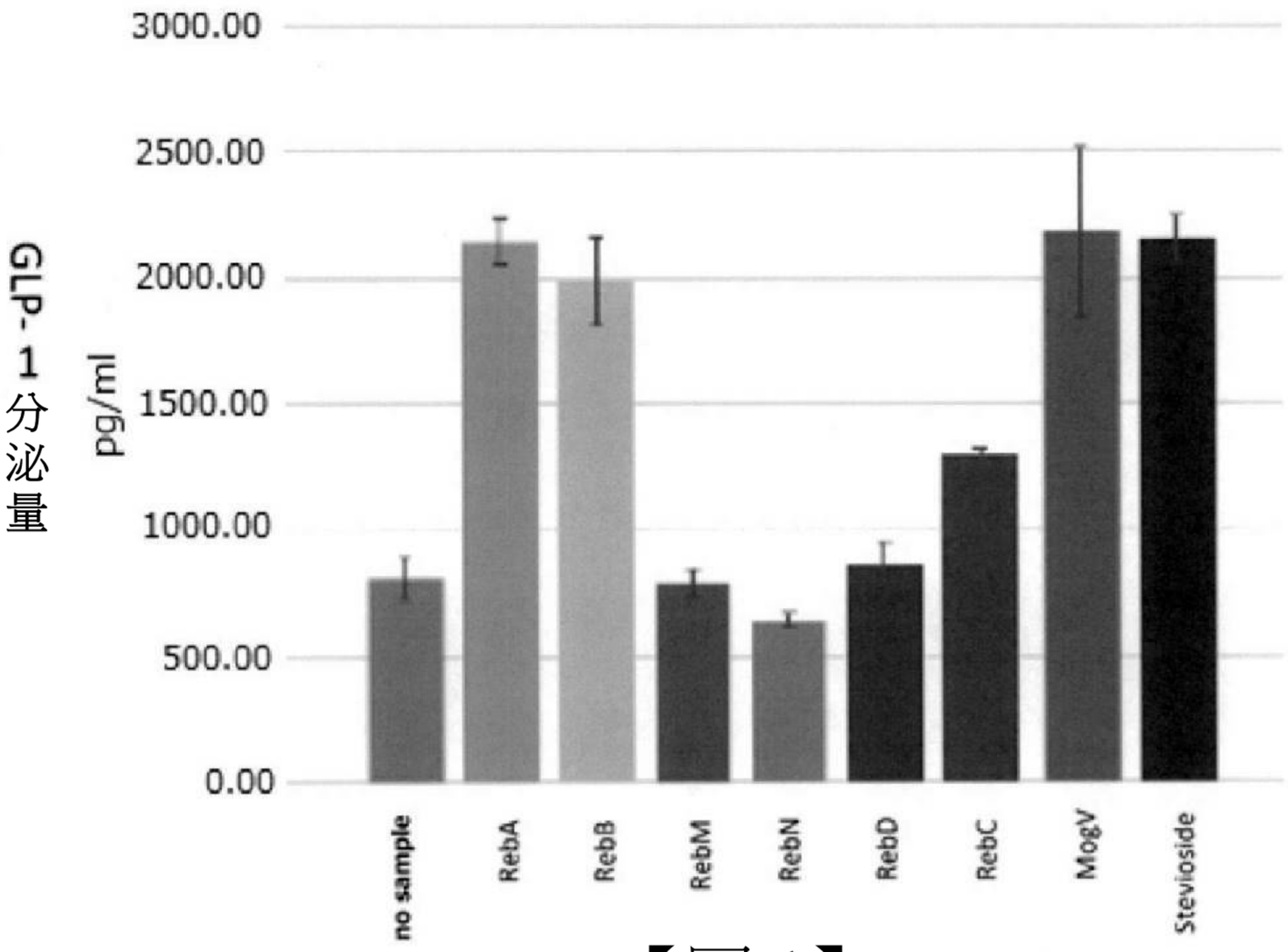
【請求項4】如請求項1~3中任一項之GLP-1分泌促進劑，其係用於改善糖代謝、用於抑制食慾或用於預防或改善糖尿病或肥胖症。

【請求項5】一種用於促進GLP-1分泌之飲料，其含有如請求項1~4中任一項之GLP-1分泌促進劑。

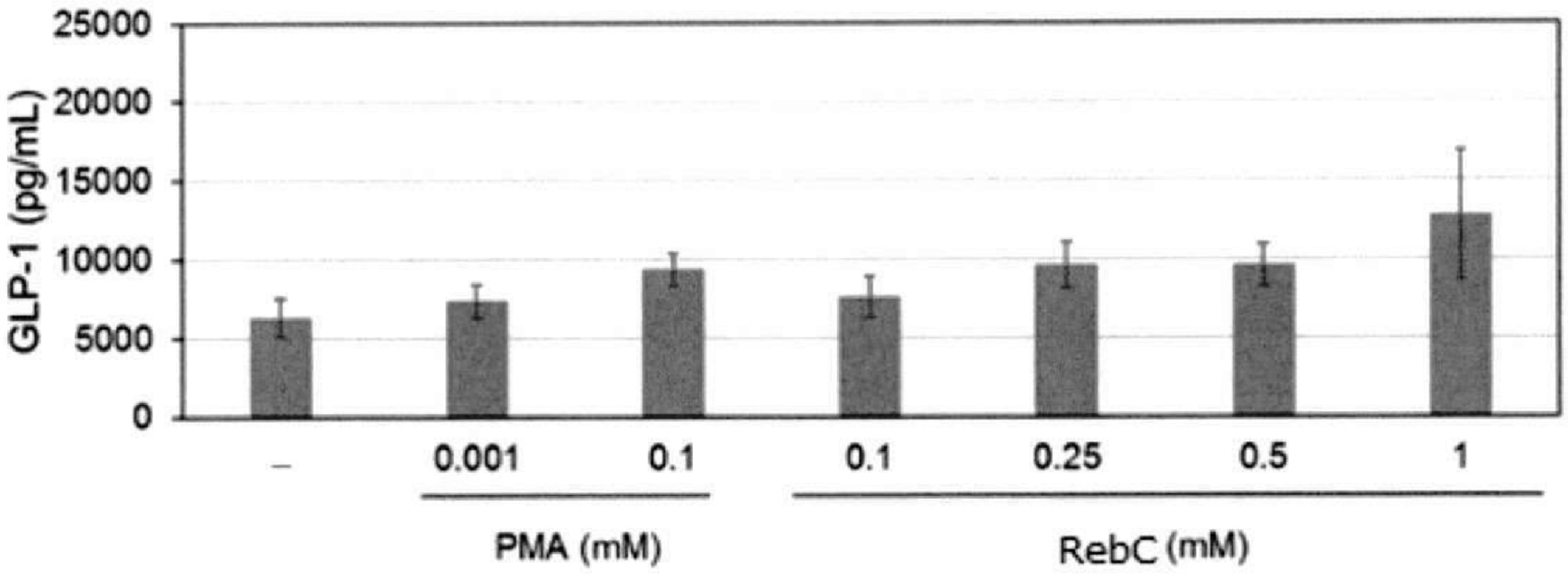
【請求項6】一種用於促進GLP-1分泌之食品，其含有如請求項1~4中任一項之GLP-1分泌促進劑。

【請求項7】一種醫藥組成物，其包含如請求項1~4中任一項之GLP-1分泌促進劑。

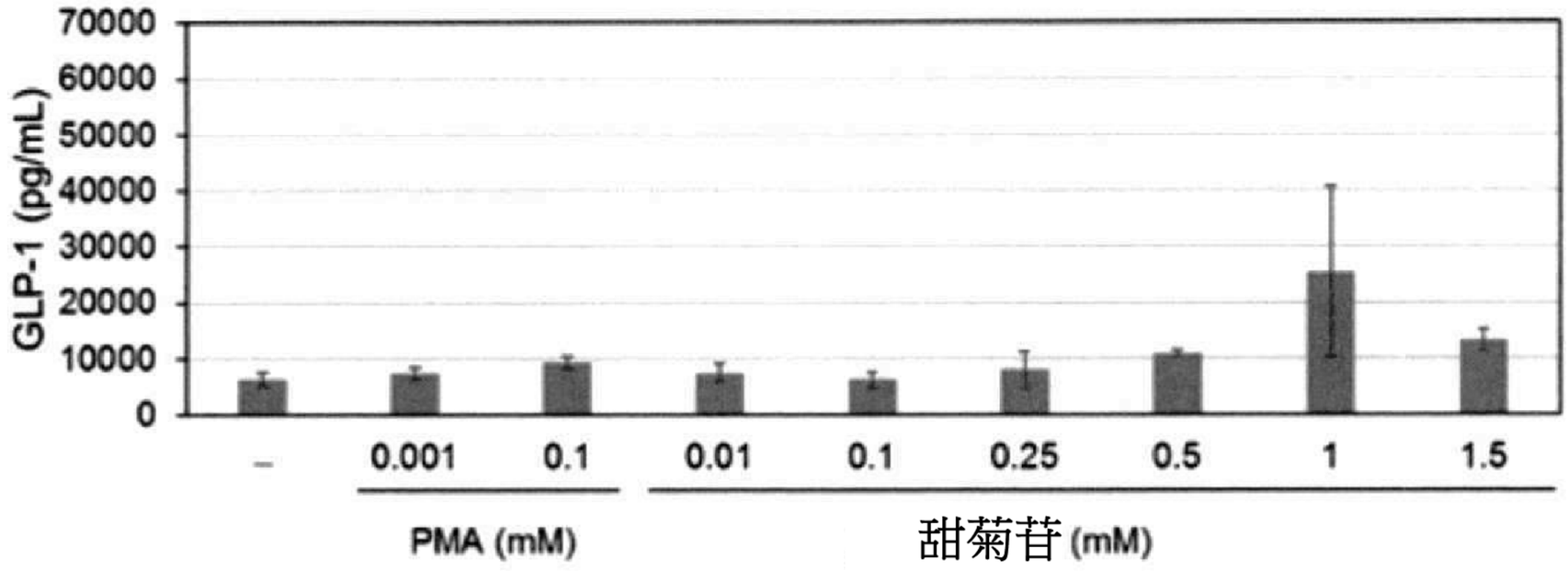
【發明圖式】



【圖 1】

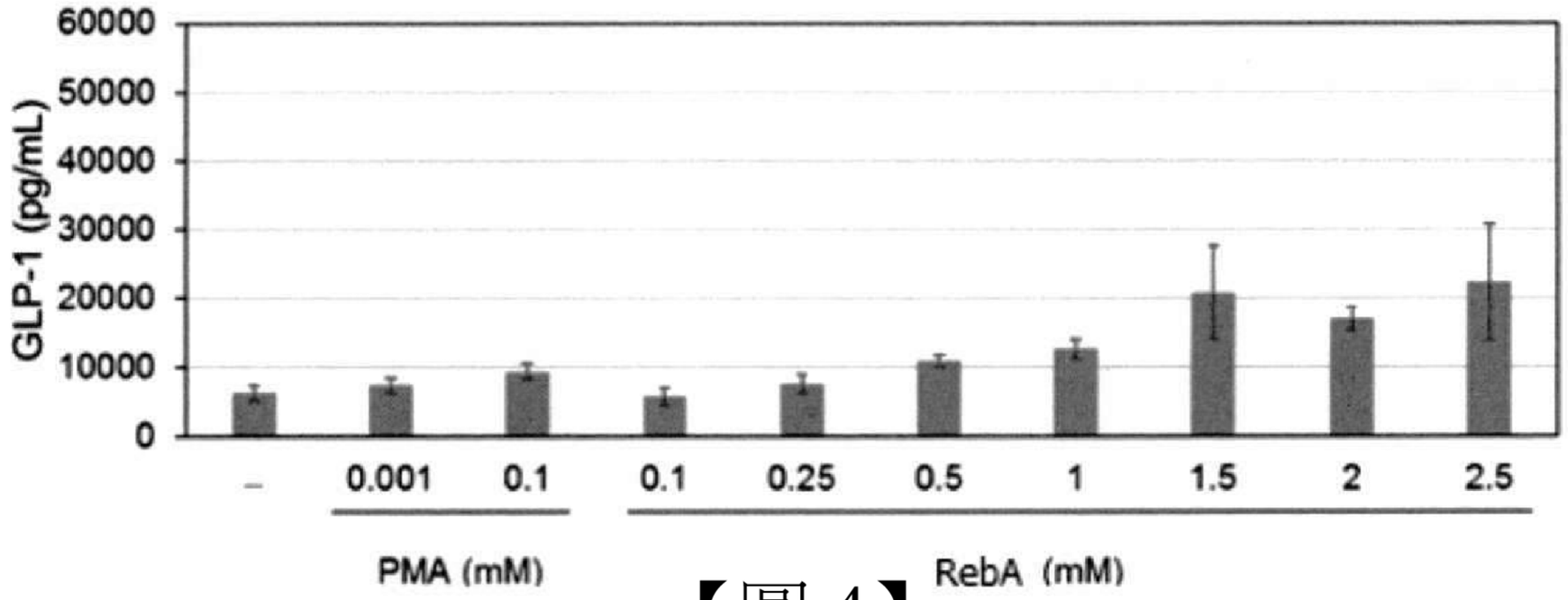


【圖 2】

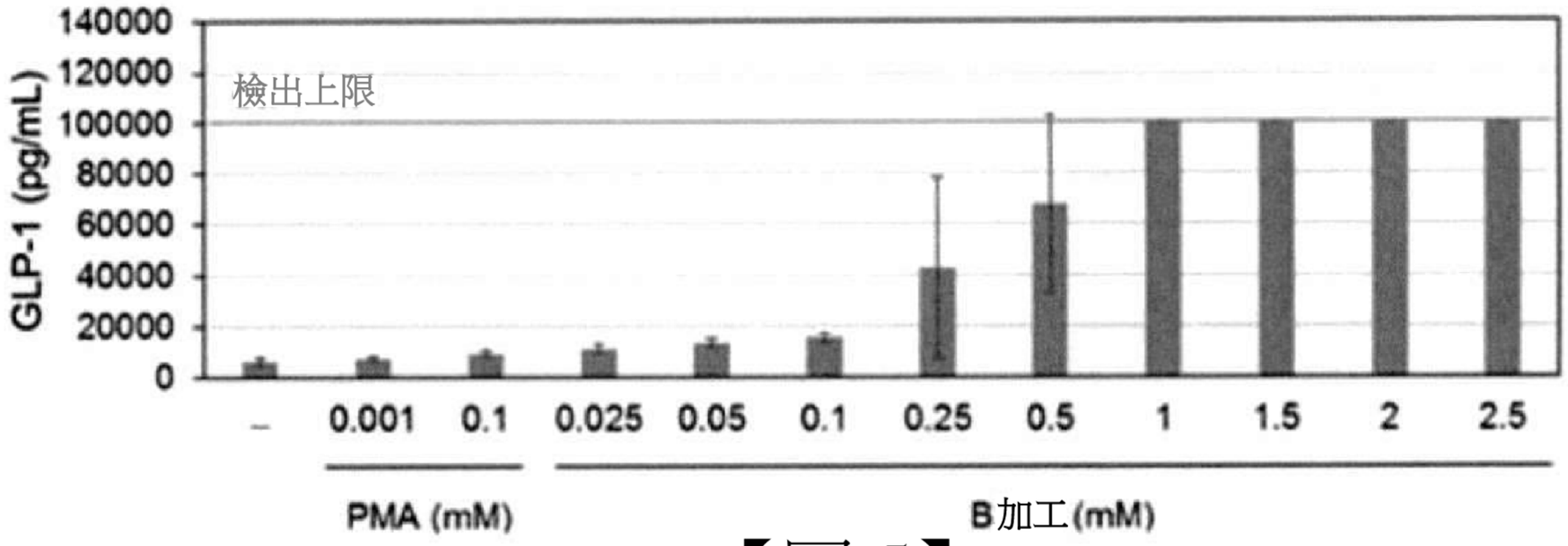


【圖 3】

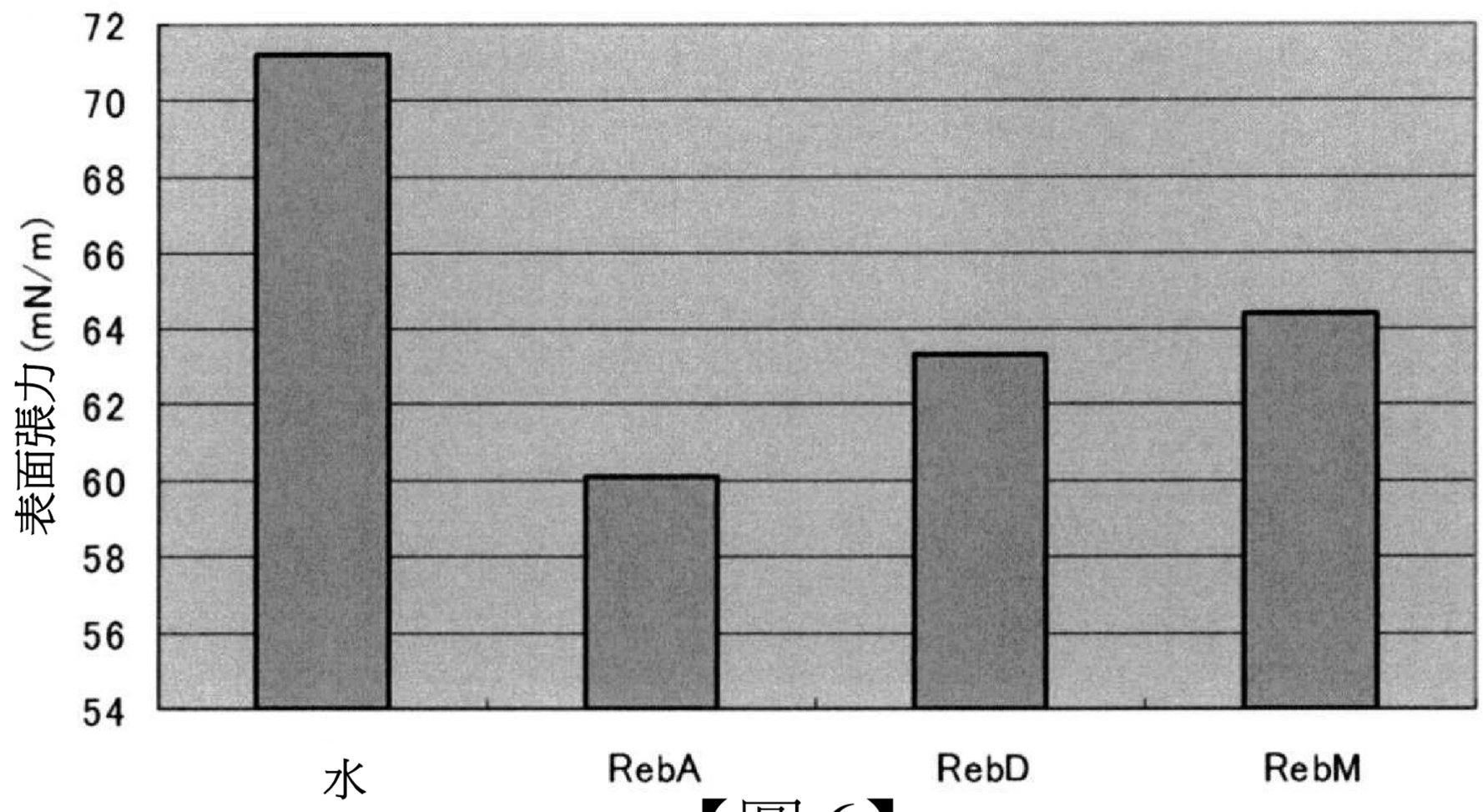
7B2842


GLP-1 (pg/mL)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
–
0.001
0.1
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
RebA (mM)

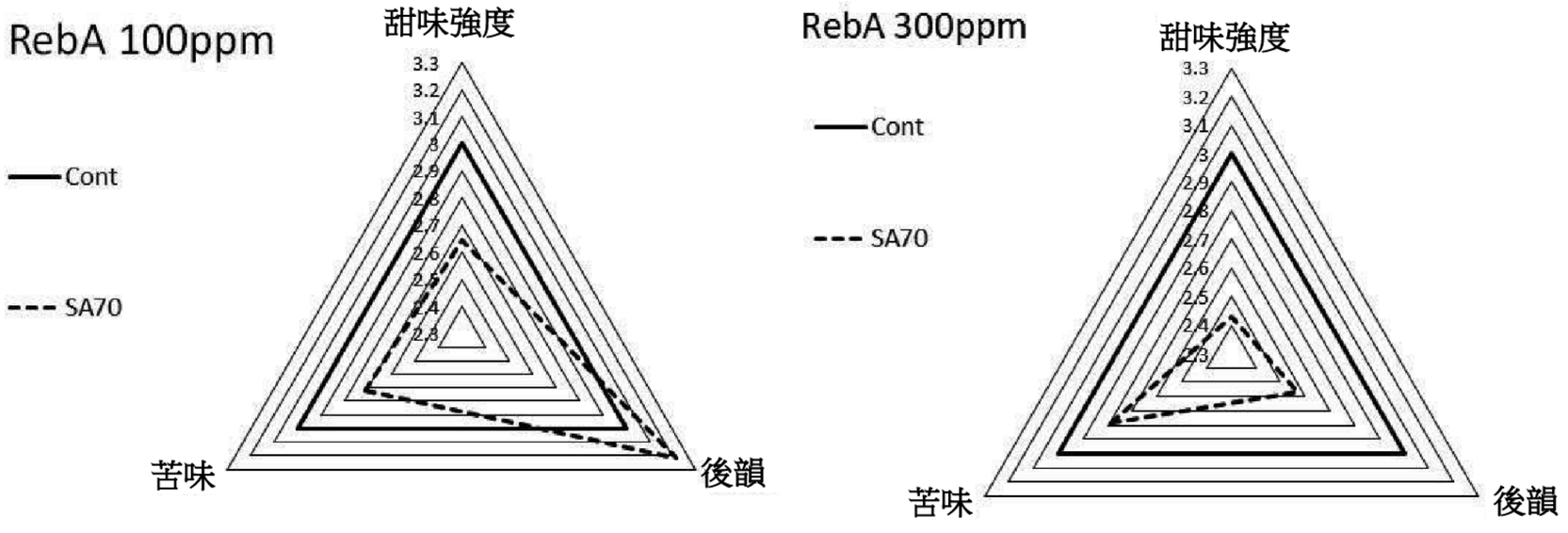
【圖 4】


GLP-1 (pg/mL)
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
檢出上限
–
0.001
0.1
0.025
0.05
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
B加工(mM)

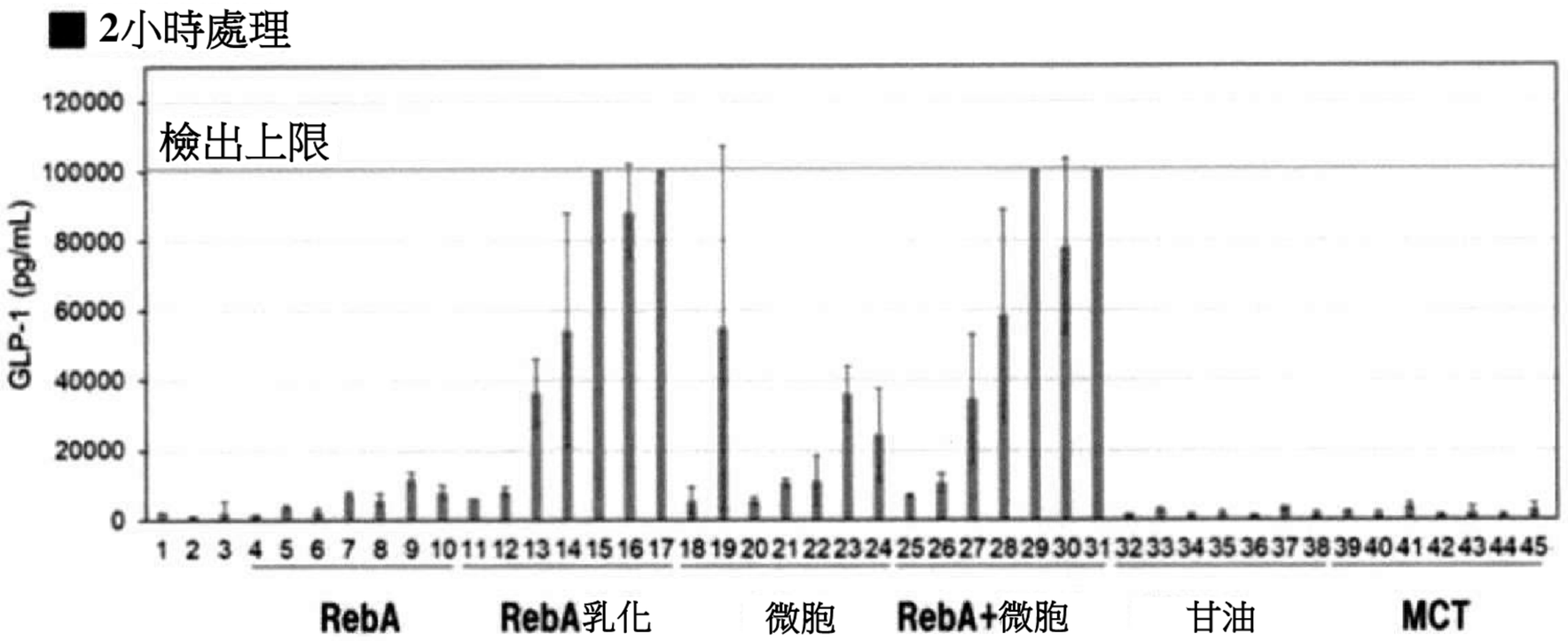
【圖 5】


表面張力(mN/m)
72
70
68
66
64
62
60
58
56
54
水
RebA
RebD
RebM

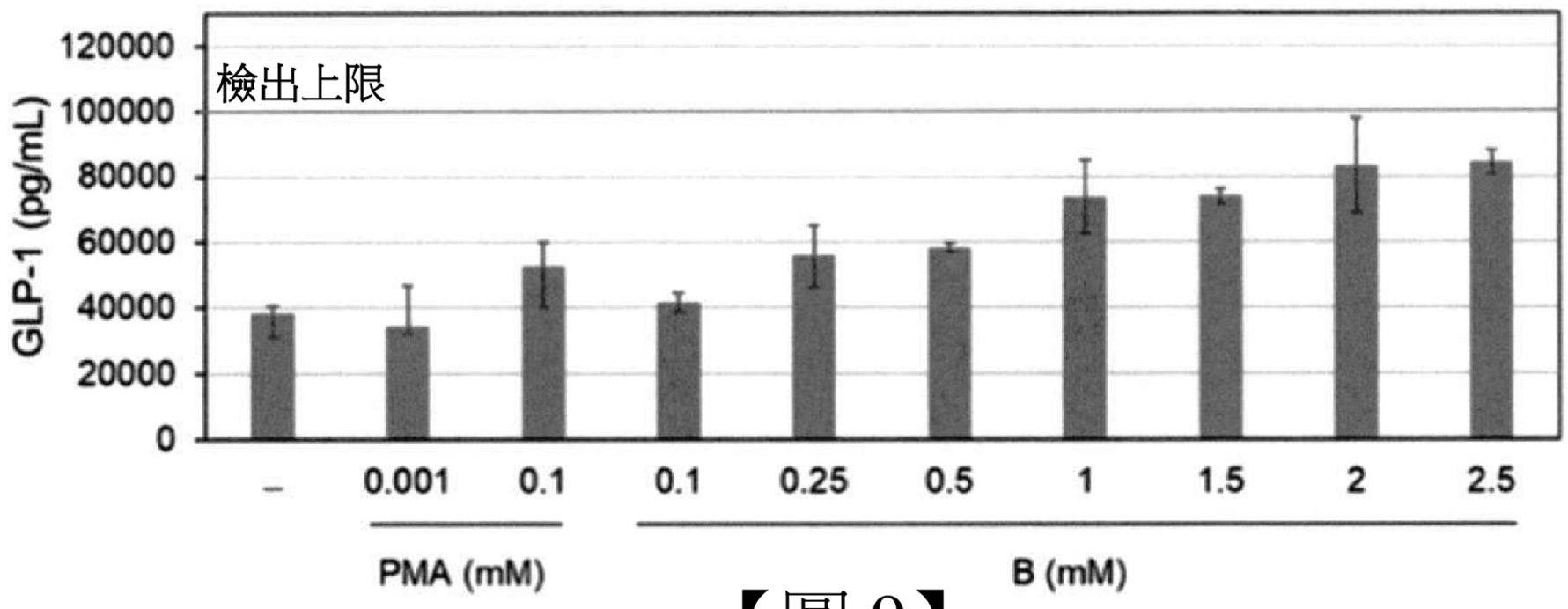
【圖 6】


RebA 100ppm
甜味強度
Cont
SA70
苦味
後韻
RebA 300ppm
甜味強度
Cont
SA70
苦味
後韻

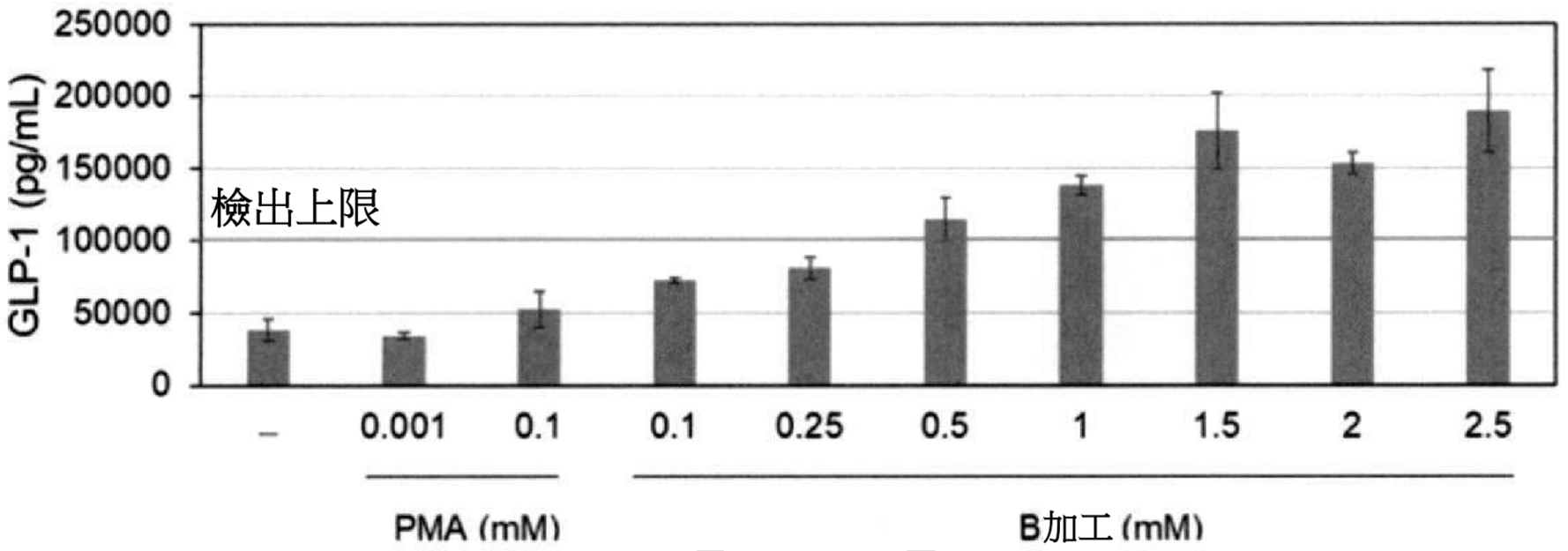
【圖 7】


2小時處理
檢出上限
GLP-1 (pg/mL)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45
RebA
RebA乳化
微胞
RebA+微胞
甘油
MCT

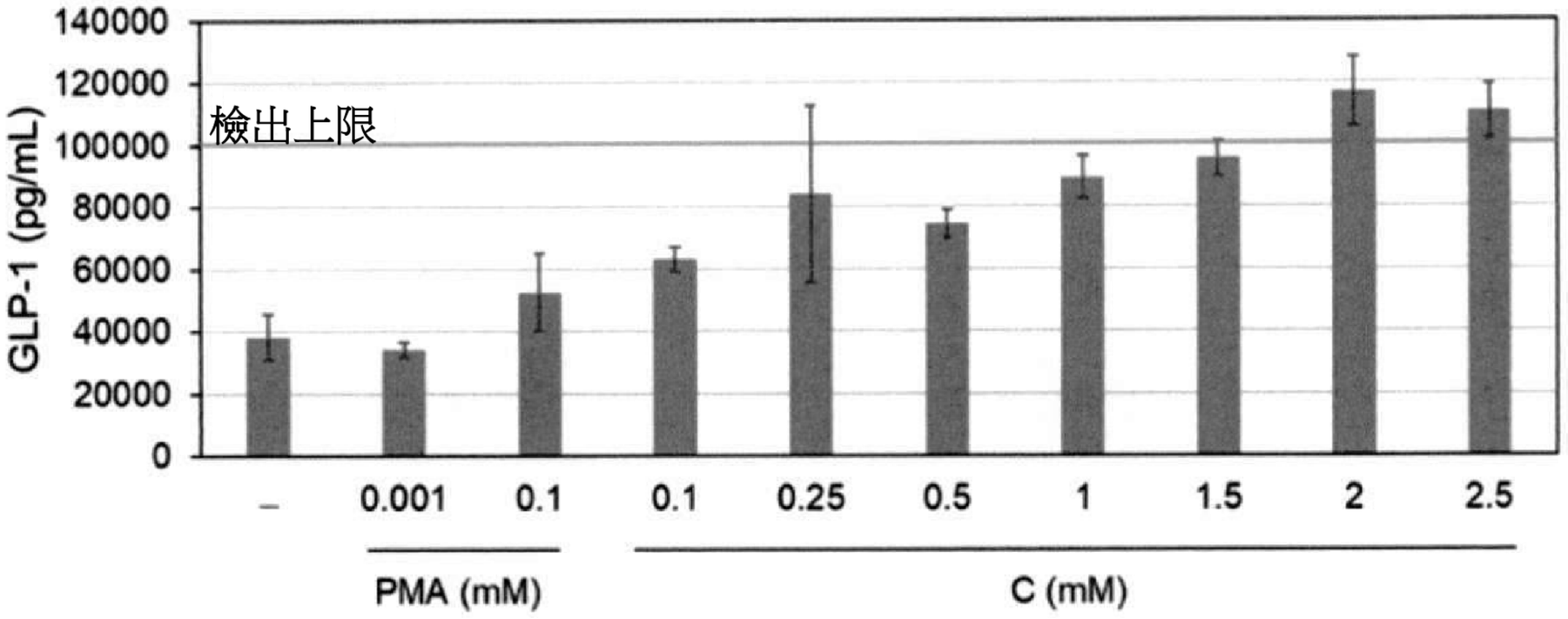
【圖 8】


檢出上限
GLP-1 (pg/mL)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
–
0.001
0.1
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
B (mM)

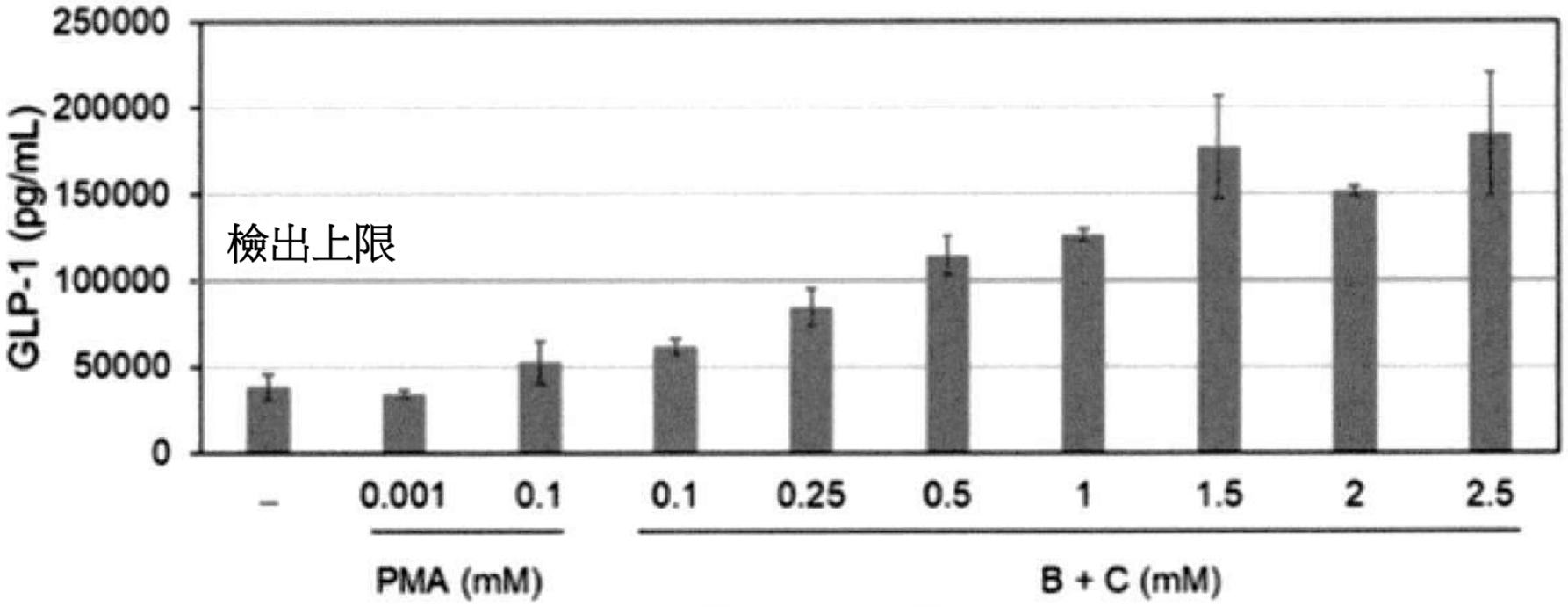
【圖 9】


檢出上限
GLP-1 (pg/mL)
250000
200000
150000
100000
50000
0
–
0.001
0.1
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
B加工 (mM)

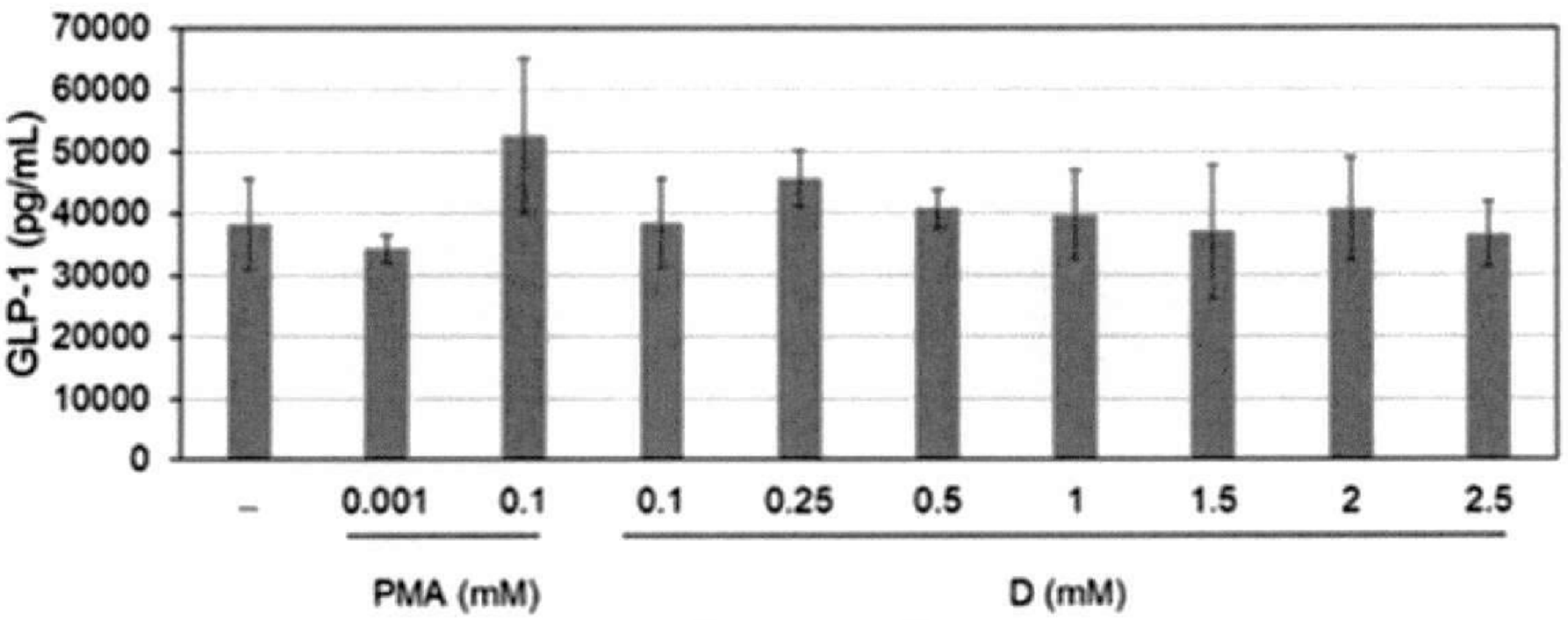
【圖 10】


檢出上限
GLP-1 (pg/mL)
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
–
0.001
0.1
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
C (mM)

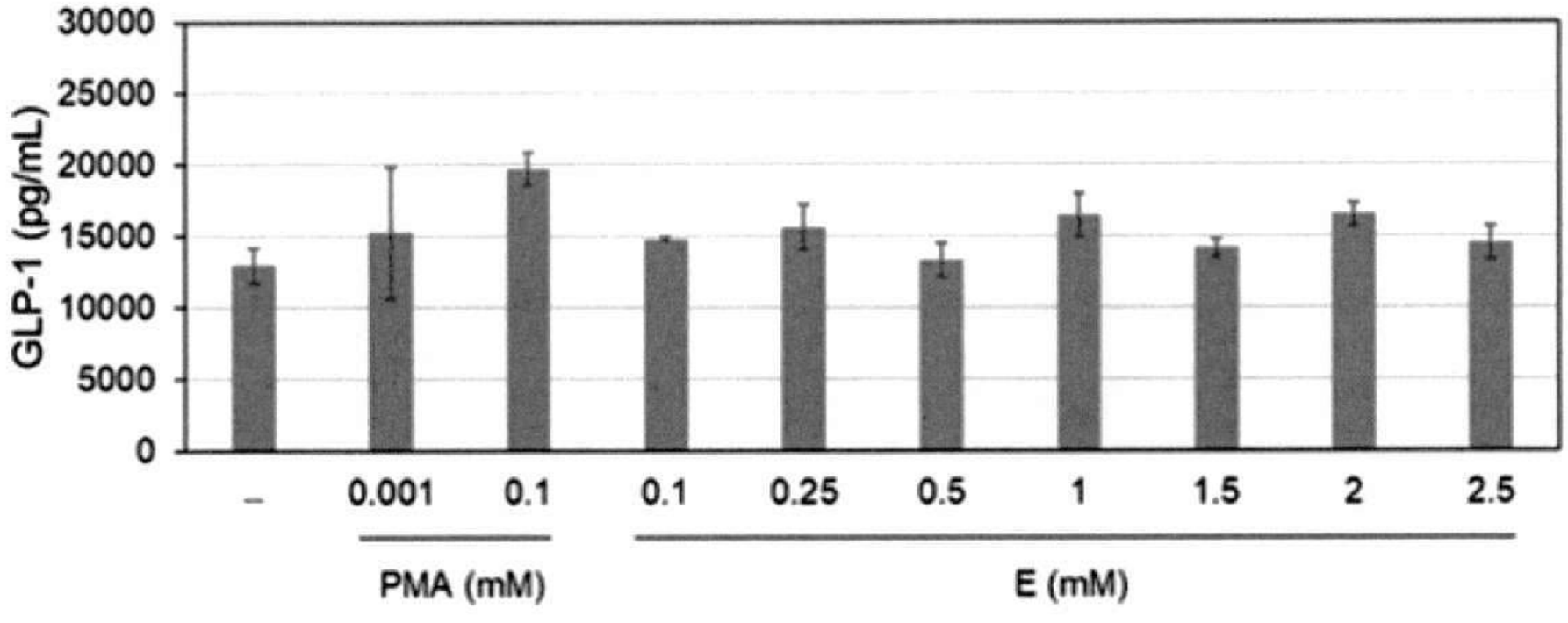
【圖 11】


250000
200000
150000
100000
50000
0
GLP-1 (pg/mL)
檢出上限
–
0.001
0.1
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
B + C (mM)

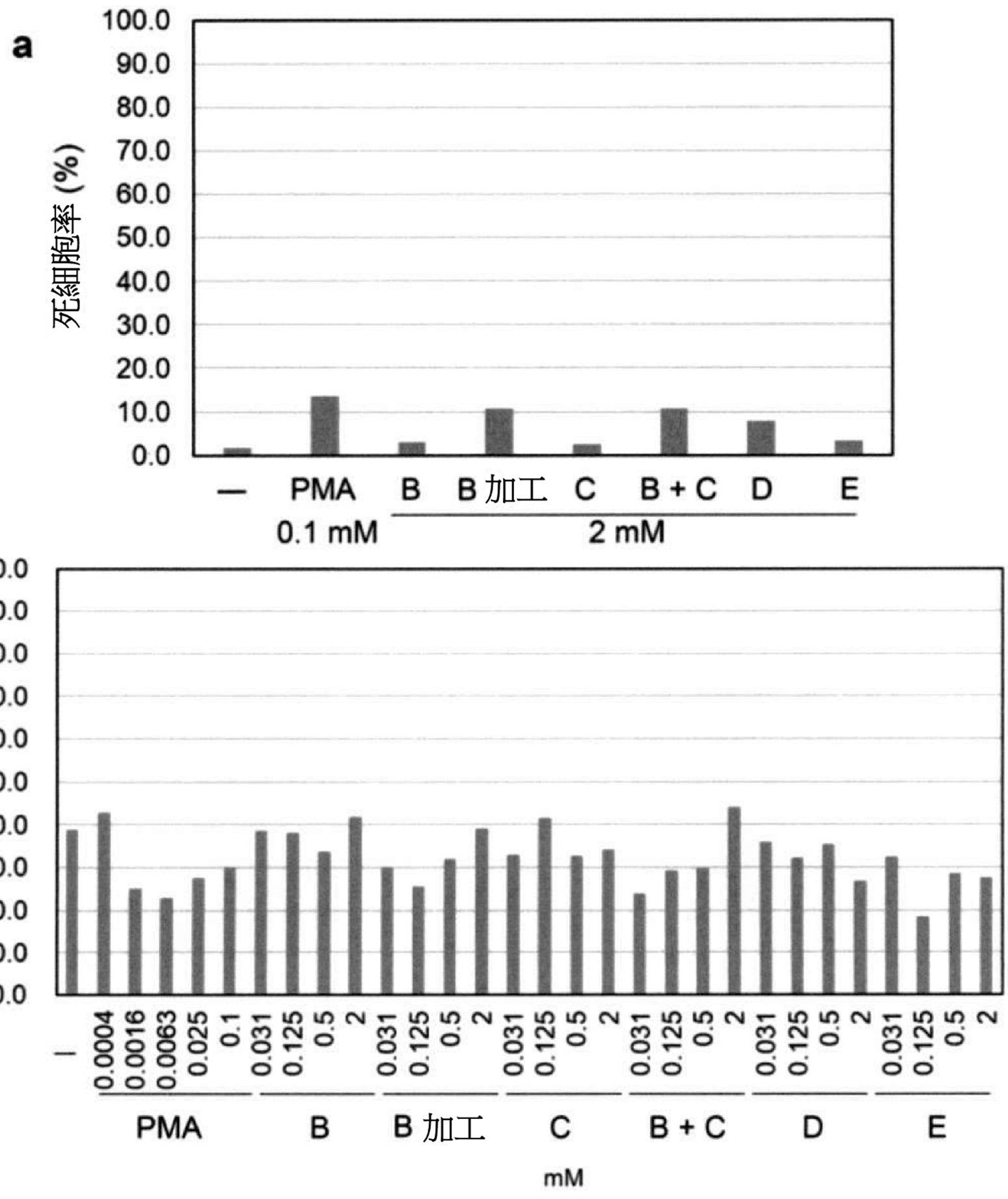
【圖 12】


70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
GLP-1 (pg/mL)
–
0.001
0.1
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
D (mM)

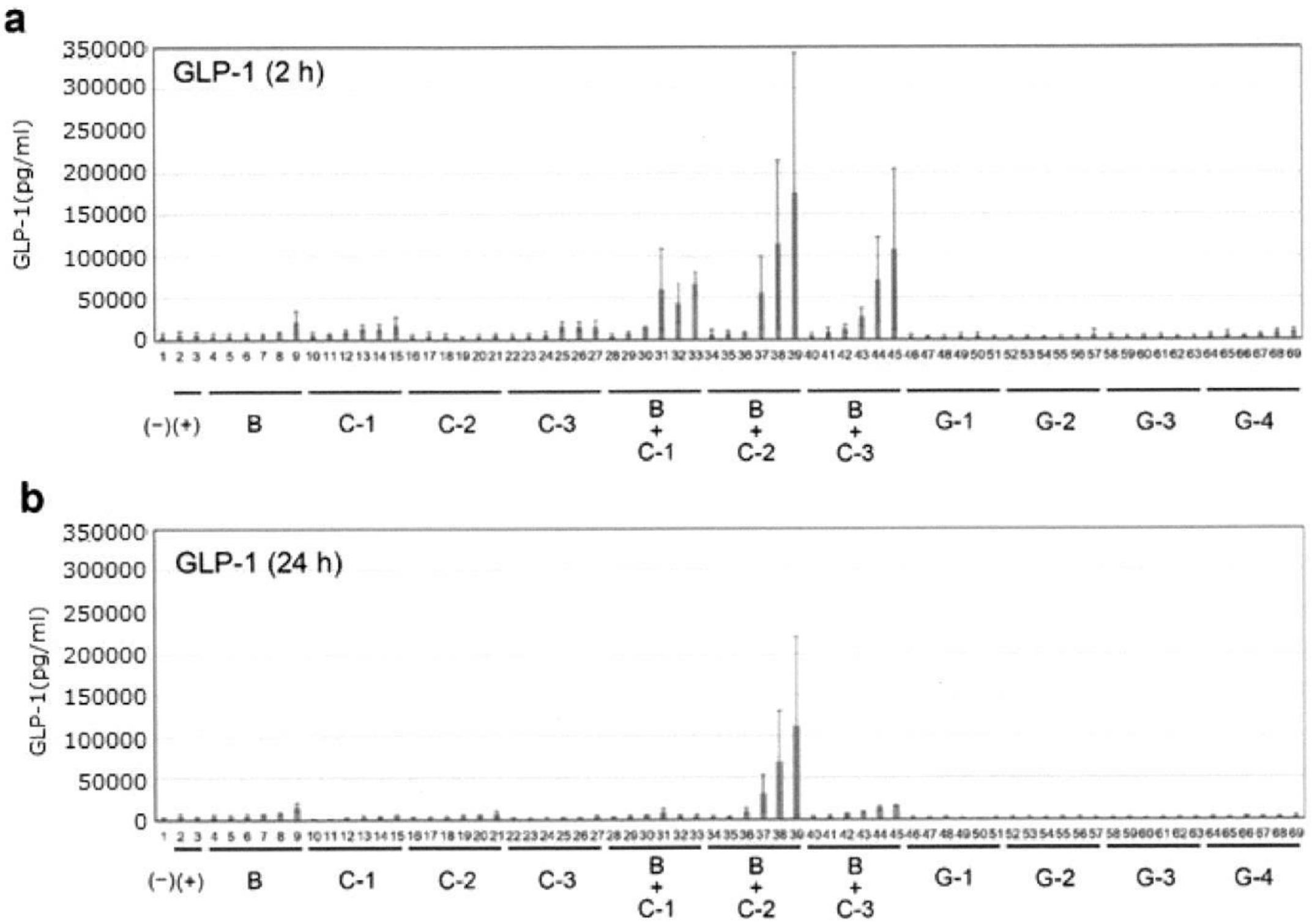
【圖 13】


30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
GLP-1 (pg/mL)
–
0.001
0.1
0.1
0.25
0.5
1
1.5
2
2.5
PMA (mM)
E (mM)

【圖 14】


a
死細胞率 (%)
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
—
PMA
B
B 加工
C
B + C
D
E
0.1 mM
2 mM
b
死細胞率 (%)
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
—
0.0004
0.0016
0.0063
0.025
0.1
0.031
0.125
0.5
2
PMA
B
B 加工
C
B + C
D
E
mM

【圖 15】



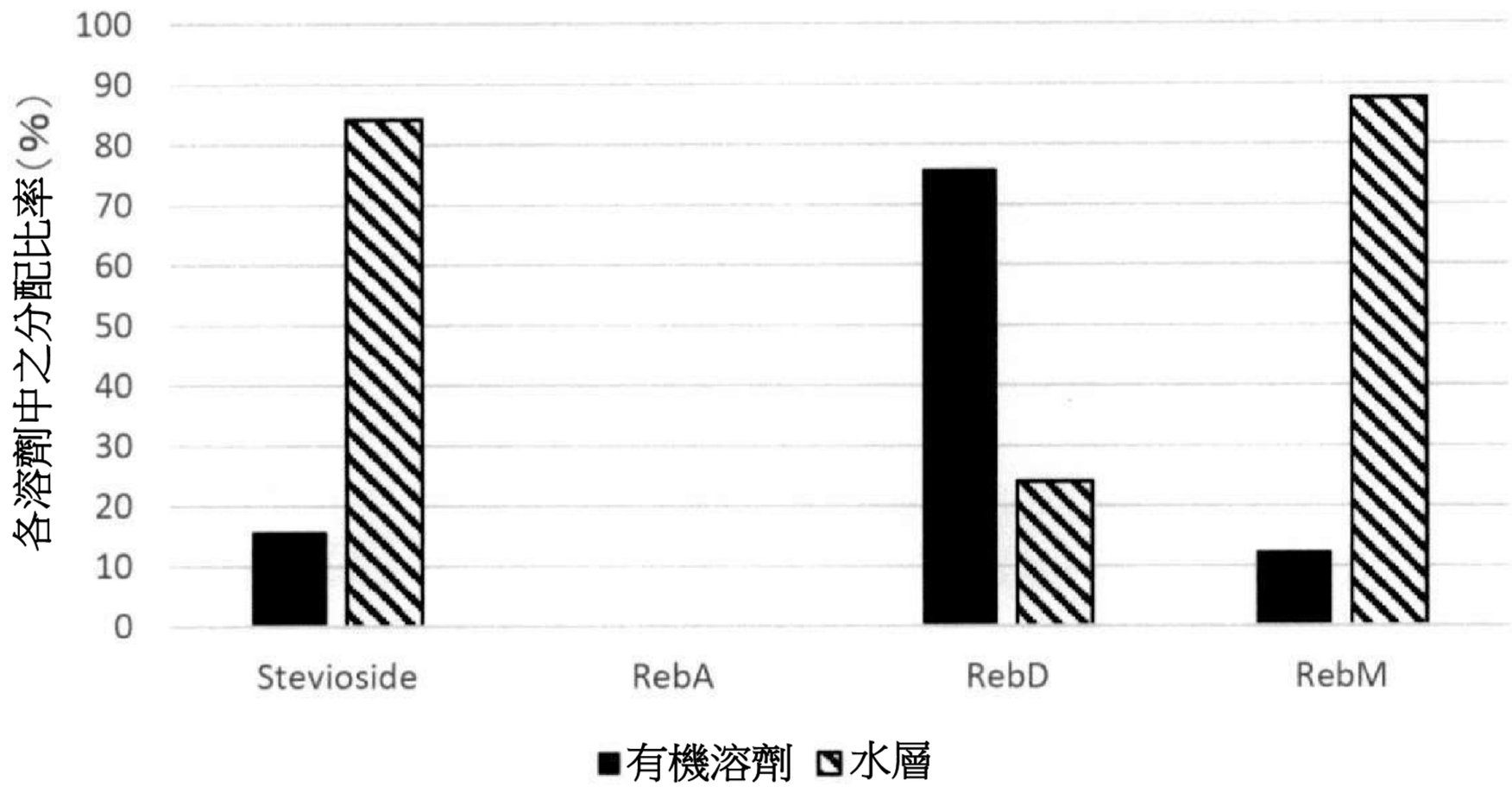
mean ± SD, n = 4-6

(−): 陰性對照 **(最終濃度0.1% DMSO)**

(+): 陽性對照(PMA)

【圖 16】

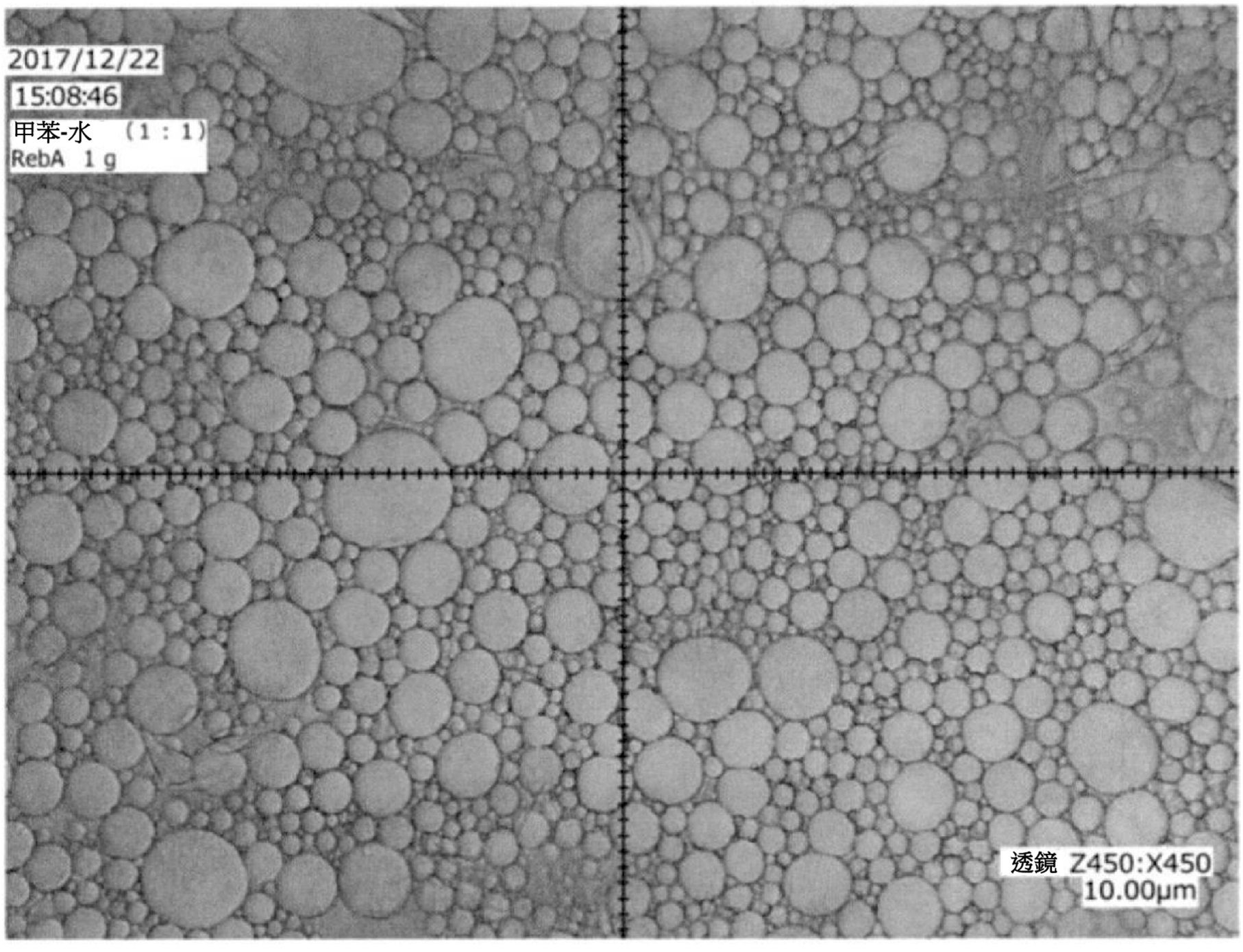
(a)


各溶劑中之分配比率(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Stevioside
RebA
RebD
RebM
■有機溶劑 ◪水層

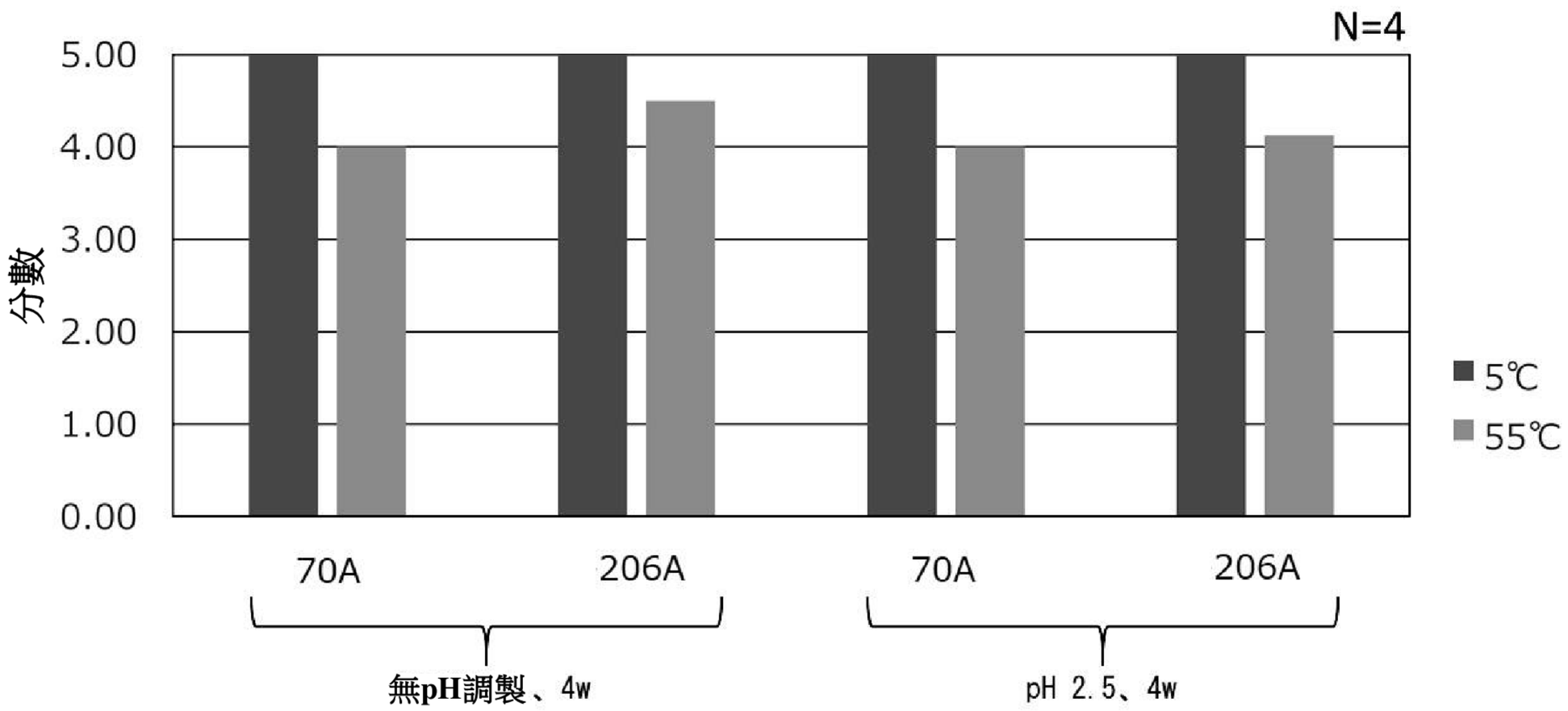
(b)


Stevioside
攪拌前
攪拌後①
攪拌後②
RebA
攪拌前
攪拌後①
攪拌後②
RebD
攪拌前
攪拌後①
攪拌後②
RebM
攪拌前
攪拌後①
攪拌後②

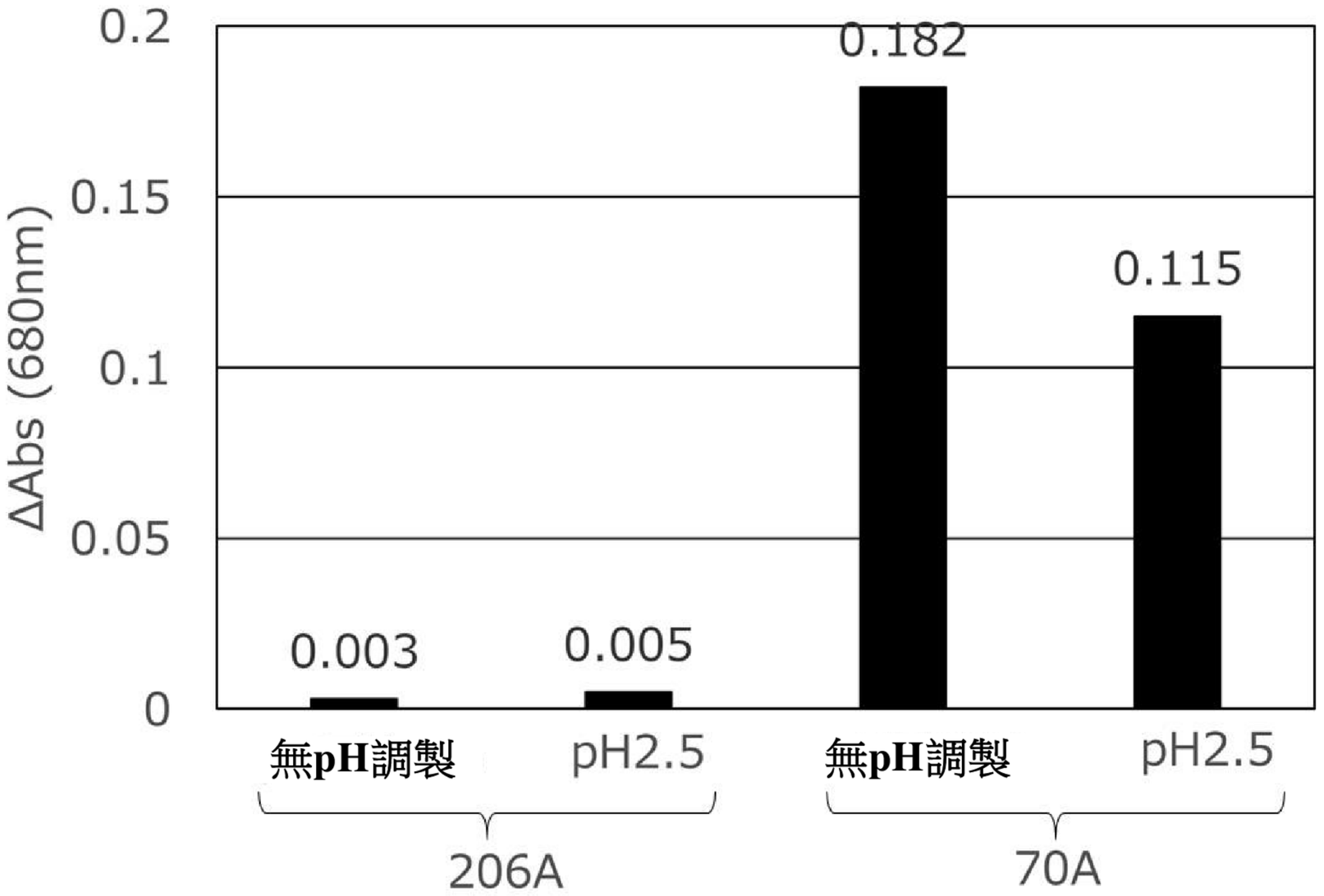
【圖 17】


2017/12/22
15:08:46
甲苯-水 (1 : 1)
RebA 1 g
透鏡 Z450:X450
10.00μm

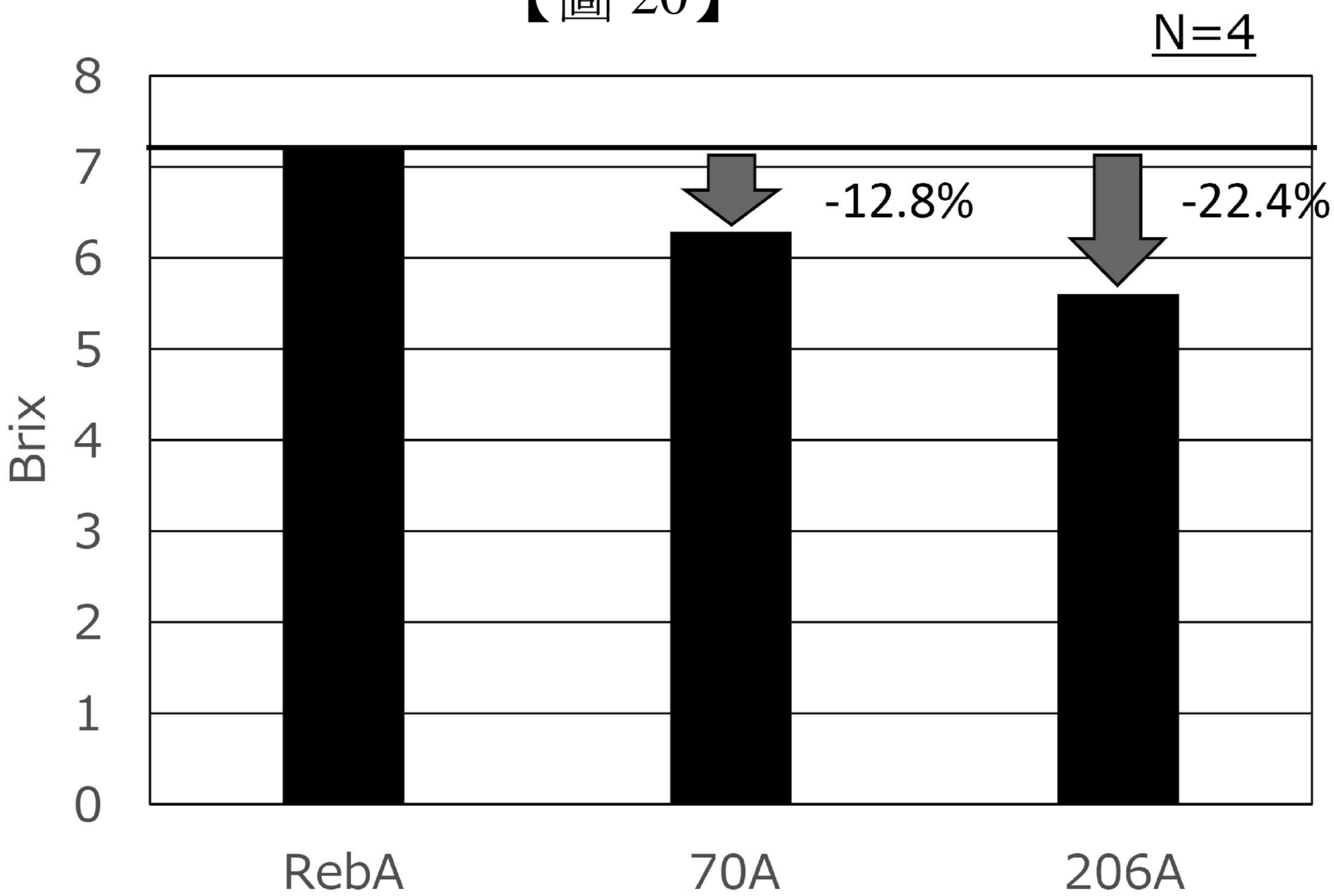
【圖 18】


N=4
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
分數
5℃
55℃
70A
206A
70A
206A
無pH調製、4w
pH 2.5、4w

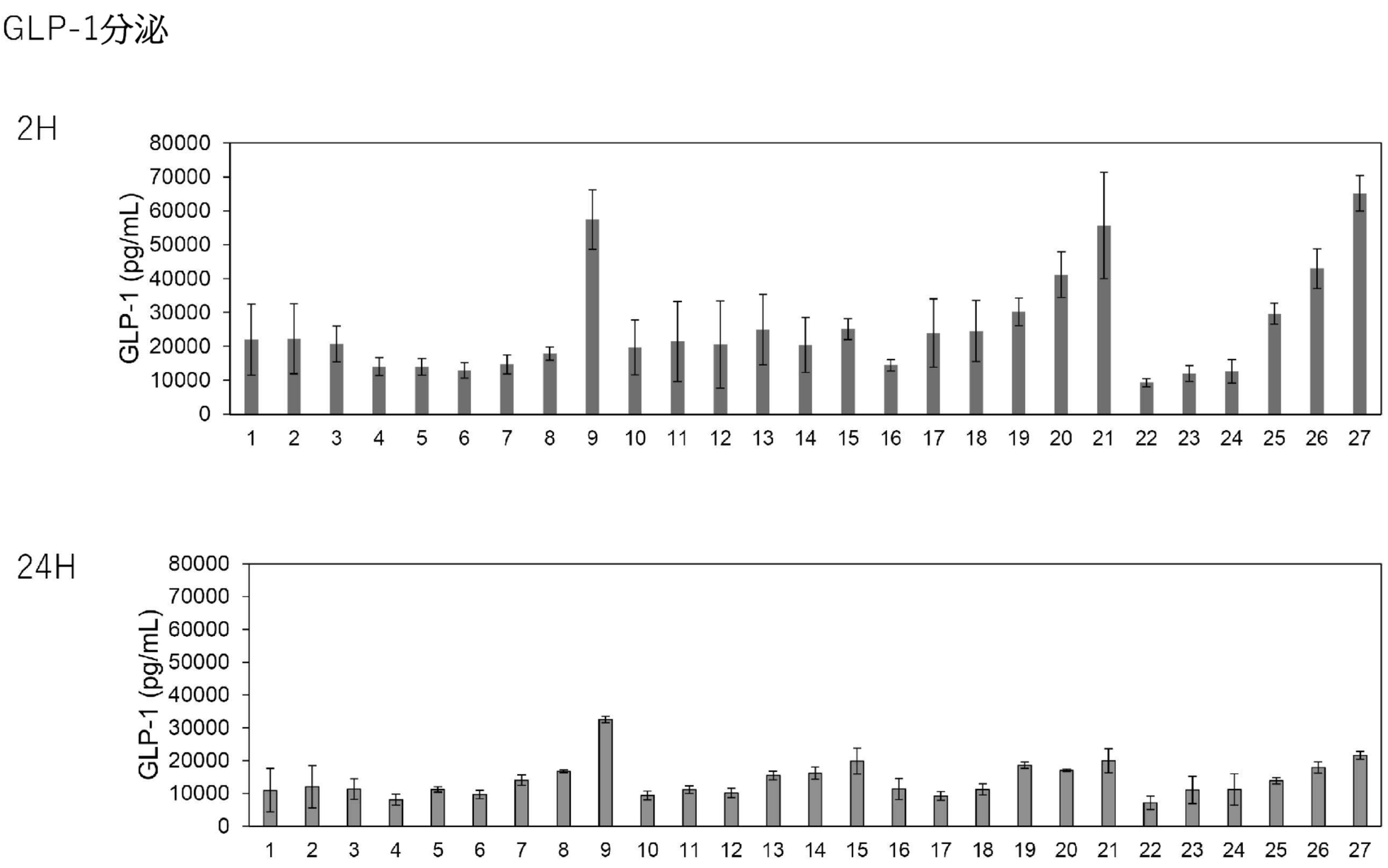
【圖 19】


0.2
0.15
0.1
0.05
0
ΔAbs (680nm)
0.182
0.115
0.003
0.005
無pH調製
pH2.5
無pH調製
pH2.5
206A
70A

【圖 20】


N=4
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Brix
-12.8%
-22.4%
RebA
70A
206A

【圖 21】


GLP-1分泌
2H
GLP-1 (pg/mL)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
24H
GLP-1 (pg/mL)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27

【圖 22】