

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6009467号  
(P6009467)

(45) 発行日 平成28年10月19日 (2016. 10. 19)

(24) 登録日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 38/46	(2006. 01)	A 6 1 K 37/54
A 6 1 K 31/375	(2006. 01)	A 6 1 K 31/375
A 6 1 K 31/70	(2006. 01)	A 6 1 K 31/70
A 6 1 K 9/20	(2006. 01)	A 6 1 K 9/20
A 6 1 K 9/48	(2006. 01)	A 6 1 K 9/48

請求項の数 19 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-555512 (P2013-555512)
(86) (22) 出願日	平成24年2月22日 (2012. 2. 22)
(65) 公表番号	特表2014-506597 (P2014-506597A)
(43) 公表日	平成26年3月17日 (2014. 3. 17)
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/026036
(87) 国際公開番号	W02012/116018
(87) 国際公開日	平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
審査請求日	平成27年2月10日 (2015. 2. 10)
(31) 優先権主張番号	61/445, 156
(32) 優先日	平成23年2月22日 (2011. 2. 22)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	513212604
	コーディル・シード・カンパニー・インコーポレイテッド
	CAUDILL SEED COMPANY, INC.
	アメリカ合衆国、ケンタッキー州、ルイビル、ウェスト・メイン・ストリート 1402
	1402 West Main Street, Louisville, KY 40203, United States of America

(74) 代理人	100110423
	弁理士 曾我 道治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 噴霧乾燥ミロシナーゼ、及びイソチオシアネートを製造するための使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物であって、  
ミロシナーゼの供給源を準備することと、  
アスコルビン酸カルシウムを該ミロシナーゼの供給源に添加することと、  
該ミロシナーゼの供給源を約 104 °F (約 40 °C) 以上の温度に加熱することと、  
加熱後にミロシナーゼ / アスコルベート混合物を噴霧乾燥させることと、  
を含む工程から生成される、噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

【請求項 2】

前記アスコルビン酸カルシウムが加熱工程前に前記ミロシナーゼの供給源に添加される  
、請求項 1 に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

10

【請求項 3】

前記アスコルビン酸カルシウムが加熱工程後に前記ミロシナーゼの供給源に添加される  
、請求項 1 に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

【請求項 4】

前記ミロシナーゼの供給源がブロッコリーの種子である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項  
に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

【請求項 5】

前記ミロシナーゼの供給源が少なくとも 7 分間加熱される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一  
項に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

20

## 【請求項 6】

前記ミロシナーゼの供給源及び前記アスコルビン酸カルシウムが水溶液に添加され、該ミロシナーゼ供給源と該アスコルビン酸カルシウムとを含む該水溶液が約 104 °F ~ 約 225 °F ( 約 40 ~ 約 107 ) の温度に加熱され、該水溶液が残留固形物から分離され、噴霧乾燥される、請求項 1、2、4 及び 5 のいずれか一項に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

## 【請求項 7】

前記混合物が、噴霧乾燥される前に均質化される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

## 【請求項 8】

水が約 4.5 ~ 約 7.5 の pH を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物と、グルコラファニンの供給源とを含む、錠剤又はカプセル剤。

## 【請求項 10】

前記グルコラファニンの供給源がブロッコリーの種子である、請求項 9 に記載の錠剤又はカプセル剤。

## 【請求項 11】

アスコルベートを更に含む、請求項 9 又は 10 に記載の錠剤又はカプセル剤。

## 【請求項 12】

前記噴霧乾燥ミロシナーゼ及び前記グルコラファニンの供給源が腸溶性コーティングに封入される、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の錠剤又はカプセル剤。

## 【請求項 13】

前記錠剤又はカプセル剤が、水に溶解させた後 2 時間 ~ 3 時間で、約 12  $\mu\text{mol}$  ~ 約 20  $\mu\text{mol}$  のスルフォラファンを生成することができる、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項に記載の錠剤又はカプセル剤。

## 【請求項 14】

イソチオシアネートを生成する方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物を、水溶液中でグルコシノレートの供給源と混合させることを含む、イソチオシアネートを生成する方法。

## 【請求項 15】

前記水溶液がアスコルベートを含む、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記水溶液を少なくとも約 90 °F ( 約 32 ) の温度に加熱する、請求項 14 又は 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物を製造する方法であって、ミロシナーゼの供給源を準備する工程と、アスコルビン酸カルシウムを該ミロシナーゼの供給源に添加する工程と、該ミロシナーゼの供給源を約 104 °F ~ 約 225 °F ( 約 40 ~ 約 107 ) の温度に加熱する工程と、ミロシナーゼ / アスコルベート混合物を噴霧乾燥させる工程と、を含む、噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベート混合物を製造する方法。

## 【請求項 18】

前記ミロシナーゼの供給源がブロッコリーの種子である、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記ミロシナーゼの供給源を少なくとも 7 分間加熱する、請求項 17 又は 18 一項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

## [ 関連出願の相互参照 ]

本出願は、2011年2月22日付で出願された米国仮特許出願第61/445156号（その開示は全体を引用することにより本明細書の一部をなすものとする）の利益を主張するものである。

## 【0002】

或る特定の野菜、とりわけアブラナ科の野菜を食べることによって発がんリスクを減らすことができることが数多くの研究により示されてきた。この化学防御効果の要因は概して、植物細胞壁が破られたときに内因性ミロシナーゼ酵素と接触することによってイソチオシアネートに変換される、野菜に含まれるグルコシノレートにある。これらのイソチオシアネートの幾つかは、発がん性物質の毒性効果及び腫瘍効果から細胞を守ることができる強力な第ⅠⅠ相酵素誘導物質であることが示されている。

10

## 【0003】

ミロシナーゼは、イソチオシアネートへのグルコシノレートの変換を触媒するものである。イソチオシアネートの変換速度及び収率は、ミロシナーゼの供給源及び品質によって変わる可能性がある。1つの既知のイソチオシアネートはスルフォラファンである。

## 【0004】

グルコシノレートは、ミロシナーゼ酵素の使用によりイソチオシアネートへと変換され得る。しかしながら、変換中、生成されるイソチオシアネートの量及び純度を減少させる他の生成物も形成される可能性がある。

20

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物が、ミロシナーゼの供給源を準備することと、アスコルベートをミロシナーゼの供給源に添加して、混合物を生成することと、混合物を溶媒中で約104°F（約40℃）以上の温度に加熱することと、ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を噴霧乾燥させることとを含む工程から生成される。

## 【0006】

一実施の形態において、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を製造する方法は、ミロシナーゼの供給源を準備する工程と、アスコルベートをミロシナーゼの供給源に添加することとあって、ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を生成する工程と、混合物を溶媒中で約104°F（約40℃）以上の温度に加熱する工程と、ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を噴霧乾燥させる工程とを含む。

30

## 【0007】

一実施の形態において、イソチオシアネートを製造する方法は、約5～約6.5のpHの水中で、グルコシノレートを含む植物原材料と、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物と、アスコルベートとを混合することを含む。

## 【0008】

活性錠剤又は活性カプセル剤は、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物とグルコラファニンとを含む。

40

## 【発明を実施するための形態】

## 【0009】

グルコシノレートは、ミロシナーゼ酵素による触媒作用によりイソチオシアネートに変換することができる。グルコシノレート及びミロシナーゼはともに、多くのアブラナ科植物に見ることができ、概して植物の他の部分よりも新芽及び種子中における濃度が高い。よく知られているイソチオシアネートは、第2相酵素活性を誘導することにより哺乳動物の解毒作用及び化学防御の強力な誘導物質となるスルフォラファンである。グルコシノレートであるグルコラファニンは、スルフォラファンの前駆物質である。

## 【0010】

50

グルコラファニンからのスルフォラファンの収率は、ミロシナーゼとともにアブラナ科植物中に同様に存在するエピチオ特異タンパク質（ESP）によって低減される。ESPは、スルフォラファンニトリルの形成を触媒し、この代替反応経路は、スルフォラファンを作る反応経路と競合する。ESPを不活性化させる1つの方法は加熱によるものである。

#### 【0011】

一実施形態において、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物は、ミロシナーゼの供給源をアスコルベートと混合して、混合物を約104°F（約40℃）以上の温度に加熱した後、混合物を噴霧乾燥させることによって作られる。得られる噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物の特性は他のミロシナーゼよりも改善される。噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物はより安定であり、加えて、グルコラファニンからスルフォラファンを生成する上でより活性である。噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物は、スルフォラファンの収率を改善させることができるか、より速い速度でスルフォラファンを生成することができるか、又はその両方を満たす。

#### 【0012】

別の実施形態では、ミロシナーゼの供給源を約104°F（約40℃）以上の温度に加熱した後、アスコルベートと混合し、約95°F（35℃）以上の温度に加熱し、その後噴霧乾燥させる。アスコルベートとミロシナーゼの供給源とを混合した後、噴霧乾燥させる前に混合物をインキュベートしてもよい。

#### 【0013】

ミロシナーゼの供給源は、ダイコン、ブロッコリー及び菜種等のアブラナ科の植物由来のものであってもよい。一実施形態において、ミロシナーゼの供給源は、アブラナ科の植物の種子、小花又は新芽であってもよい。別の実施形態では、ミロシナーゼの供給源がブロッコリー植物であってもよい。別の実施形態では、ミロシナーゼの供給源がブロッコリー植物の種子であってもよい。ブロッコリー植物の種子は、粉末へと磨砕することによって加工されていてもよい。別の実施形態では、種子を破砕するか又はさもなければ、外殻を割るか若しくは除去するように加工してもよい。

#### 【0014】

アスコルベートはアスコルビン酸の塩と定義される。アスコルベートの例としては、アスコルビン酸カルシウム、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸カリウム及びアスコルビン酸マグネシウムが挙げられる。一実施形態において、噴霧乾燥ミロシナーゼの生成に使用されるアスコルベートはアスコルビン酸カルシウムである。アスコルベートの量は、水溶液のpHを変えるのに十分なものである必要はない。一実施形態において、アスコルベートの量は水10L当たり約5グラムである。別の実施形態では、アスコルベートの量が水10L当たり約1グラム～約5グラムである。別の実施形態では、アスコルベートの量が、水10L当たり、約1グラム～約10グラム、約2グラム～約10グラム又は約3グラム～約12グラムであってもよい。一実施形態では、ブロッコリーの種子ミールを水中でアスコルビン酸カルシウムと混合する。混合物は約104°F（約40℃）以上の温度に加熱した後、噴霧乾燥させる。

#### 【0015】

ミロシナーゼの供給源を加熱する。典型的に、ミロシナーゼは、約104°F（約40℃）以上の温度範囲に加熱する。一実施形態において、ミロシナーゼは約104°F～約225°F（約40℃～約107℃）、約110°F～約220°F（約43℃～約104℃）、約120°F～約190°F（約49℃～約88℃）、約130°F～約180°F（約54℃～約82℃）、約135°F～約175°F（約57℃～約79℃）、約140°F～約175°F（約60℃～約79℃）、約145°F～約175°F（約62℃～約79℃）、約150°F～約175°F（約66℃～約79℃）、約155°F～約175°F（約68℃～約79℃）、約160°F～約175°F（約71℃～約79℃）、約164°F～約175°F（約73℃～約79℃）、又は約164°F（約73℃）に加熱する。

## 【 0 0 1 6 】

ミロシナーゼの供給源を加熱すると、E S Pは不活性化すると考えられる。より高温であれば時間はそれほど必要ないが、より低温では時間が長く必要とされる。一実施形態において、ミロシナーゼの供給源を約1分以上加熱する。ミロシナーゼの供給源を約2分以上、3分以上、4分以上、5分以上、6分以上、7分以上又は10分以上加熱してもよい。

## 【 0 0 1 7 】

ミロシナーゼの供給源及びアスコルベートを水溶液中で加熱してもよい。ミロシナーゼの供給源とアスコルベートとの水性混合物のpHは典型的に、初め約4.5～約7.5である。一実施形態において、pH範囲は、約5～約7.5、約5.5～約7.5、約5.5～約7.0、約6.0～約7.0、又は約5.0～約6.0である。混合物を水溶液の中に入れた後、pHは変化する可能性がある。

10

## 【 0 0 1 8 】

一実施形態において、水溶液中の熱処理されたミロシナーゼ/アスコルベート混合物は、種子ミール又は他の植物原材料から分離される。別の実施形態では、ミロシナーゼを濾過してもよい。その後、ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を含有する溶液を噴霧乾燥させる。別の実施形態では、種子ミール又は他の植物原材料から分離する必要がない代わりに、ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を均質に噴霧乾燥させる。一実施形態において、ミロシナーゼ/アスコルベート混合物及び種子ミール又は他の植物原材料を均質化してから、噴霧乾燥させる。別の実施形態では、ミロシナーゼ/アスコルベート混合物及び種子ミール又は他の植物原材料を超音波処理してから、噴霧乾燥させる。

20

## 【 0 0 1 9 】

ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を、噴霧乾燥前にデンプン物質と混合してもよい。デンプン物質の例は、シクロデキストリン、マルトデキストリン、スクロース、デキストロース、コーンスターチ及び植物ガムである。デンプン物質の量は約10重量%とすることができる。ミロシナーゼ/アスコルベート混合物が噴霧されるエアの温度は約180°F～約215°Fであってもよい。噴霧乾燥の方法は当業者に既知のものである。典型的に、噴霧乾燥される材料は、溶解されているか、懸濁されているか、又は別の形で溶液形態でなければならない。加熱工程を溶液中でミロシナーゼの供給源に実施しなかった場合には、噴霧乾燥工程前に液体を添加しなければならない。

30

## 【 0 0 2 0 】

スルフォラファン等のイソチオシアネートは、グルコシノレートを含む植物原材料から生成することができる。一実施形態において、グルコシノレートの供給源は、米国特許出願公開第2009/0081138号（その全体が引用することにより本明細書の一部をなすものとする）に記載される方法を含む当該技術分野で既知の任意の方法によって生成することができるグルコラファニンである。グルコシノレートの他の供給源は、キャベツ、ケール、カリフラワー、ブロッコリー、カラシナ、コールラビ、芽キャベツ、カブ及びホースラディッシュルートの他のアブラナ科の植物である。典型的に、新芽及び種子が最も多くのグルコシノレートを含むが、植物の他の部分を使用してもよい。

## 【 0 0 2 1 】

一実施形態において、グルコシノレート及び噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を水中で合わせて混合する。混合物は少なくとも1分間95°F超に加熱してもよい。混合物は約70分～100分間加熱してもよい。イソチオシアネートへのグルコシノレートの変換速度は温度に依存する。より低温では変換に長く時間がかかる可能性があり、より高温では変換時間が短くなるであろう。混合物を95°F超に加熱する必要はない。この手法は、様々なグルコシノレートをイソチオシアネートへ、例えばグルコラファニンをスルフォラファンへと変換するのに使用することができる。

40

## 【 0 0 2 2 】

変換プロセスには様々な溶媒を使用してもよい。一実施形態において、グルコシノレート及び噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物のための溶媒は、鉄イオン又は亜鉛

50

イオンを実質的に含まないため、蒸留水又は脱イオン水である。別の実施形態では、水が蒸留水でも脱イオン水でもない。別の実施形態では、溶媒が水を含む水溶液であってもよい。

【0023】

一実施形態において、グルコシノレート及び噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物の初期pHは、約5～約6.5である。一実施形態において、pH範囲は、約5～約7.5、約5.5～約7.5、約5.5～約7.0、約6.0～約7.0、又は約5.0～約6.0である。混合物を水溶液中に入れた後、pHは変化する可能性がある。

【0024】

一実施形態において、グルコラファニンの供給源と噴霧乾燥ミロシナーゼとの混合物は、アスコルベートを更に含む。一実施形態において、アスコルベートの量は、約0.1重量%～約2重量%、約0.5重量%～約1.5重量%、又は約1重量%であってもよい。

【0025】

イソチオシアネートへのグルコシノレートの変換後、イソチオシアネートの溶液を噴霧乾燥させてもよい。

【0026】

活性錠剤又は活性カプセル剤は、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物と、グルコラファニン等のグルコシノレートとを含んでいてもよい。人によっては腸管内でグルコラファニンをスルフォラファンに変換することができるが、全ての人が効率よくそうすることができるとは限らない。ミロシナーゼとグルコラファニンとを含有する錠剤又はカプセル剤は、生体内でグルコラファニンをスルフォラファンに変換するのに用いることができる。これは、スルフォラファンのより確実かつばらつきのない用量をもたらすであろう。スルフォラファンはグルコラファニン及びミロシナーゼよりも安定でなく、分解してしまう。そのため、生体内でスルフォラファンを生成する噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物を含有する錠剤又はカプセル剤の方が、スルフォラファンを含有する錠剤又はカプセル剤よりも長い保存寿命を有すると考えられる。

【0027】

錠剤又はカプセル剤はまたアスコルベートを含んでいてもよい。一実施形態において、錠剤又はカプセル剤は、2時間～3時間で約12  $\mu\text{mol}$ ～約20  $\mu\text{mol}$ のスルフォラファンを生成することができる、アスコルベートと、グルコラファニンと、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物との混合物を含む。この組成の錠剤は、固定用量のスルフォラファンを生成することができる。生体内で生成されるスルフォラファンの量は、錠剤又はカプセル剤に使用されるグルコラファニンの量に依存すると考えられる。一実施形態において、錠剤又はカプセル剤は、約100mgのグルコラファニンを含む。錠剤又はカプセル剤に使用される、アスコルベートと、グルコラファニンと、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物との混合物は、アスコルベート1g、噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物7.5g、及びグルコラファニン100gの比率で混合することができる。成分の比率は様々な値をとることができる。

【0028】

腸管を介して小腸に錠剤を送るために、腸溶性コーティングを錠剤上に形成してもよい。別の実施形態では、錠剤が持続放出コーティング又は制御放出コーティングを有していてもよい。噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物及びグルコラファニン粒子は、腸溶性コーティングで、別々にコーティングされても又は混合物としてコーティングされてもよい。腸溶性コーティング、持続放出コーティング及び制御放出コーティングの使用がよく知られている。腸溶性コーティングは腸内で内容物を放出する。別の実施形態では、カプセル剤を使用してもよい。噴霧乾燥ミロシナーゼ、グルコラファニン及びアスコルベートは、カプセル剤内において腸溶性コーティングでコーティングされていてもよい。

【0029】

本開示は本明細書によって幾つかの実施形態を例示しており、かつ例示的な実施形態をかなり詳細に記載しているが、添付の特許請求の範囲をこのような詳述に制限又は多少な

10

20

30

40

50

りとも限定することは本出願人の意図するところではない。更なる利点及び変更形態は当業者にとって容易に明らかにすることができる。

【実施例】

【0030】

実施例1（噴霧乾燥ミロシナーゼ）

ミロシナーゼを含有するブロッコリーの種子（200g）を粉末に粉砕した。粉末化した種子は95°F（35）の蒸留水（200mL）と混合した。この混合物を5分間急速に混合した後、165°F～175°F（74～79）に加熱し、その温度で5分間保持した。アスコルビン酸カルシウム（10mg）を混合物に添加し、その後これを98°F（37）で24時間インキュベートした。混合物を濾して液体を均質化した。その後、均質化した液体を噴霧乾燥させた。

10

【0031】

実施例2（スルフォラファンへのグルコラファニンの変換）

高濃度のグルコラファニン（スルフォラファングルコシノレート）を含有するブロッコリーの種子を270°F（132）において押出機内で破砕した。破砕させた種子を、超臨界CO<sub>2</sub>を用いた超臨界抽出によって脱脂すると、グルコラファニン粉末が生成された。

【0032】

実施例1による噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物（100mg）、グルコラファニン粉末（1g、130μmolのグルコラファニン/g）、及びアスコルビン酸カルシウム（10mg）を99.5°F（37.5）の蒸留水（500mL）中で合わせて混合した。70分～100分後、液体を濾過して、噴霧乾燥させると、スルフォラファン（62μmol）が生成された。

20

【0033】

実施例3

グルコラファニン（スルフォラファングルコシノレート）を含有するブロッコリーの種子を270°F（132）において押出機内で破砕した。破砕させた種子を、超臨界CO<sub>2</sub>を用いた超臨界抽出によって脱脂した。水をこの種子ミールに添加した（5：1 水：種子ミール）。

【0034】

ミロシナーゼ酵素の供給源であるブロッコリーの種子を粉砕した。粉砕させた種子は水に水和させた（5：1 水：粉砕させた種子（重量基準））。この混合物を135°F～145°F（57～63）に3分～5分間加熱した後、およそ90°Fに冷却させた。アスコルベート（0.01g/g 粉砕させた種子ミール）を水和させた粉砕種子に添加した。この混合物のpHは約5.9～6.1であった。混合物は99.5°F（37.5）で24時間インキュベートした。

30

【0035】

ミロシナーゼ混合物をグルコラファニン混合物に99.5°F（37.5）で添加した（1：100 ミロシナーゼ：グルコラファニン（重量基準））。70分～100分後、液体を濾過して噴霧乾燥させると、スルフォラファンが生成された。

40

【0036】

実施例4

グルコラファニン粉末及び脱イオン水（1：5～1：10（重量比））を135°Fの温度で15分間混合した。混合物は95°F～100°F（35～38）に冷却させ、アスコルビン酸カルシウム（0.01：1のアスコルベート対ミロシナーゼ（重量基準））を混合物に添加した。実施例1による噴霧乾燥ミロシナーゼ/アスコルベート混合物（0.1：1のミロシナーゼ対グルコラファニン（重量基準））を混合物に添加し、95°F～100°F（35～38）で1時間インキュベートした。

【0037】

実施例5（噴霧乾燥ミロシナーゼ）

50

ブロッコリーの種子 (100 g) を磨砕し、73 (164 °F) の蒸留水 (10 L) に添加した。アスコルベート (5 g) を添加し、混合物を7分間攪拌した後、冷却させた。この混合物を35 (95 °F) で24時間放置した。液体を傾瀉し、10重量%のマルチデキストリンとともに噴霧乾燥させた。この手法を用いて4つのサンプルを作製した。使用されるアスコルベートは以下の表に示す。サンプル3は、他のサンプルと違い、混合物を冷却した後に傾瀉し、35 (95 °F) で24時間放置しなかった。噴霧乾燥ミロシナーゼのサンプルは全て、生成することができるスルフォラファンの速度及び量について試験したので、以下の表を参照されたい。アスコルベート (1 g) と、噴霧乾燥ミロシナーゼ (7.5 g) と、グルコラファニン (100 g) との混合物からの1グラムのサンプルを試験した。

10

## 【0038】

噴霧乾燥ミロシナーゼ / アスコルベートは、噴霧乾燥ミロシナーゼよりも迅速にスルフォラファンを生成することができた。3時間でそれぞれ30.2  $\mu\text{mol}$  及び47.7  $\mu\text{mol}$  のスルフォラファンを生成したサンプル1及びサンプル3を参照されたい。これらのサンプルは、アスコルベートと混合させなかったミロシナーゼ (25.2  $\mu\text{mol}$  のスルフォラファン) 及びアスコルビン酸と混合させたミロシナーゼ (20.79  $\mu\text{mol}$  のスルフォラファン) と比較して3時間でより多くのスルフォラファンを生成させた。スルフォラファンへのグルコラファニンの完全な変換が起きた場合、グルコラファニンは消化管内に24時間留まることはないと考えられるため、3時間でのスルフォラファンの急速な生成が全収率よりも重要となる。

20

## 【0039】

## 【表1】

噴霧乾燥ミロシナーゼの生成				
サンプル	アスコルベート	初期 pH	攪拌後の pH	24時間後の pH
1	アスコルビン酸カルシウム	6.3	5.43	5.66
2	アスコルビン酸	6.3	5.33	5.54
3	アスコルビン酸カルシウム	6.2	4.82	—
4	—	6.3	5	4.6

30

## 【0040】

## 【表2】

噴霧乾燥ミロシナーゼの試験							
サンプル	初期 pH	1時間での pH	1時間でのスルフォラファン ( $\mu\text{mol}$ )	3時間での pH	3時間でのスルフォラファン ( $\mu\text{mol}$ )	24時間での pH	24時間でのスルフォラファン ( $\mu\text{mol}$ )
1	5.3	5.3	12.4	5.2	30.2	4.8	83
2	5.3	5.3	11	5.2	20.79	4.5	83.6
3	5.4	5.2	20	5	47.7	4.5	87
4	5.3	5.21	17	5.21	25.2	4.86	85.3

40



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**A 6 1 P 35/00 (2006.01)** A 6 1 P 35/00  
**A 6 1 K 47/22 (2006.01)** A 6 1 K 47/22

(74)代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(74)代理人 100161115

弁理士 飯野 智史

(72)発明者 サリバン、リチャード・シー

アメリカ合衆国、ケンタッキー州、ルイビル、ウッズ・クラブ・ロード 2 8 1 6

(72)発明者 ライアンズ、ジョセフ・エー

アメリカ合衆国、ケンタッキー州、ジェファーソンタウン、スティルウォーター・コート 1 3 8  
 0 7

(72)発明者 コーディル、サンフォード

アメリカ合衆国、ケンタッキー州、ルイビル、ロング・ラン・ロード 1 9 0 1

(72)発明者 アシャースト、キーン

アメリカ合衆国、ケンタッキー州、テイラーズビル、ライジング・サン 7 7

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表2004-514456(JP,A)

特開平04-072137(JP,A)

国際公開第2010/140435(WO,A1)

特表2009-529324(JP,A)

特開2002-191323(JP,A)

特開2000-166549(JP,A)

J.Biochem.Biophys.Methods, 2004年, 59, p.253-265

Journal of Food Protection, 2000年, 63(3), p.400-403

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

W P I

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )