(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4485074号
(P4485074)

(45)発行日　平成22年6月16日(2010.6.16)　(24)登録日　平成22年4月2日(2010.4.2)

(51)Int.Cl.		F I		
A23K 1/16	(2006.01)	A23K	1/16	302B
A23K 1/18	(2006.01)	A23K	1/16	301A
A61K 31/035	(2006.01)	A23K	1/18	A
A61K 31/047	(2006.01)	A61K	31/035	
A61K 31/355	(2006.01)	A61K	31/047	

請求項の数 16　(全 14 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-620819(P2000-620819)
(86)(22)出願日	平成12年5月26日(2000.5.26)
(65)公表番号	特表2003-500076(P2003-500076A)
(43)公表日	平成15年1月7日(2003.1.7)
(86)国際出願番号	PCT/US2000/014690
(87)国際公開番号	WO2000/072698
(87)国際公開日	平成12年12月7日(2000.12.7)
審査請求日	平成14年8月29日(2002.8.29)
審判番号	不服2006-17862(P2006-17862/J1)
審判請求日	平成18年8月16日(2006.8.16)
(31)優先権主張番号	60/136,176
(32)優先日	平成11年5月27日(1999.5.27)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　595056859
ザ・アイムス・カンパニー
Ｔｈｅ　Ｉａｍｓ　Ｃｏｍｐａｎｙ
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・プラザ
(74)代理人　100089705
弁理士　社本　一夫
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100080137
弁理士　千葉　昭男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酸化防止剤の組み合わせによりコンパニオンアニマルの免疫反応を高めるためのプロセスと生産物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

餌キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテイン、および約20から約50 mg／日のβ-カロチンを含む餌をコンパニオンアニマルに与えることを含む、コンパニオンアニマルの免疫反応を高める方法。

【請求項２】

該コンパニオンアニマルがイヌである、請求項1記載の方法。

【請求項３】

該餌が約18から40％の粗タンパク質、約4から30％の脂肪、および約4から20％の総食物繊維を含む、請求項1記載の方法。

【請求項４】

餌キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテインおよび約20から約50 mg／日のβ-カロチンの組み合わせの効果的な量を含有する餌をイヌに与えることを含む、イヌにおける細胞分裂誘起反応を高める方法。

【請求項５】

餌キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテインおよび約20から約50 mg／日のβ-カロチンの組み合わせの効果的な量を含有する餌をイヌに与えることを含む、イヌにおける特異的免疫を高める方法。

【請求項６】

コンパニオンアニマルの免疫反応を高めるためのペットフード組成物であって、餌キロ

グラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテインおよび約20から約50 mg／日のβ-カロチンの組み合わせの効果的な量を含有する、前記ペットフード組成物。

【請求項７】

該コンパニオンアニマルがイヌである、請求項6記載のペットフード組成物。

【請求項８】

該組成物が約18から40％の粗タンパク質、約4から30％の脂肪、および約4から20％の総食物繊維を含む、請求項6記載のペットフード組成物。

【請求項９】

コンパニオンアニマルの免疫反応を高める際に使用するためのペットフード製品を製造する際の、餌キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテインおよび約20から約50 mg／日のβ-カロチンの組み合わせを含有するペットフード組成物の使用方法。

【請求項１０】

該コンパニオンアニマルがイヌである、請求項9記載の使用方法。

【請求項１１】

該組成物が約18から40％の粗タンパク質、約4から30％の脂肪、および約4から20％の総食物繊維を含む、請求項9記載の使用方法。

【請求項１２】

イヌにおける細胞分裂誘起反応を高めるためのペットフード製品を製造する際の、餌キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテインおよび約20から約50 mg／日のβ-カロチンの組み合わせを含有するペットフード組成物の使用方法。

【請求項１３】

イヌにおける特異的免疫を高めるためのペットフード製品を製造する際の、餌キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテインおよび約20から約50 mg／日のβ-カロチンの組み合わせを含有するペットフード組成物の使用方法。

【請求項１４】

コンパニオンアニマルの免疫反応を高めるためのペットフード製品であって、餌キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、約5から約20 mg／日のルテインおよび約20から約50 mg／日のβ-カロチンの組み合わせの効果的な量を含む、ペットフード製品。

【請求項１５】

該コンパニオンアニマルがイヌである、請求項14記載のペットフード製品。

【請求項１６】

該ペットフード製品が約18から40％の粗タンパク質、約4から30％の脂肪、および約4から20％の総食物繊維を含む、請求項14記載のペットフード製品。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明は、イヌのようなコンパニオンアニマルの免疫反応を高め、総体的な健康を改善するためのプロセスと生産物に関し、より詳しくは、コンパニオンアニマルの餌に有益な量の酸化防止剤を供給するプロセスと生産物に関する。

【０００２】

近年、酸化防止剤の健康的利点に関心が高まってきている。酸化防止剤は反応性酸素種（フリーラジカルとしても知られる）の影響を妨げる栄養素である。これらの有害な分子は通常の代謝の副産物である。酸化防止栄養素はフリーラジカルと結合することにより、この分子の影響を妨害し、中和して、体の外に排出する。効率よくフリーラジカルが除去されないと、ヒトへ損傷を引き起こすことに関係して、アルツハイマー病、自己免疫疾患、癌、心疾患、白内障、糖尿病、黄斑変性（症）、多発性硬化症、筋ジストロフィー、膵炎、パーキンソン病、および、リウマチ様関節炎などの一定の病気という結果になると考えられている。これらのフリーラジカルの蓄積により起こる損傷は、時間に渡って蓄積した

これらのフリーラジカルが年齢に伴って起こる免疫反応の抑制を生じさせてシニア世代の病気の発生率を高める結果となっている、老化のプロセスの原因である可能性がある。

【０００３】

酸化防止栄養素は有害なフリーラジカルを中和するという似通った役割の、様々な化合物の分類である。ビタミンA、ビタミンCおよびビタミンEといったよく知られたビタミンが、酸化防止剤に含まれ得る。また、カロチノイドとして分類される他の化合物も酸化防止剤に含まれる。カロチノイドの例としては、β-カロチン、ルテイン、アスタキサンチン、カンタキサンチン（canthaxanthin）、リコピンなどが含まれる。これらの化合物は、果物、花および野菜に見られる緑、黄色、オレンジおよびピンクの色素形成に寄与する。これらのカロチノイドは免疫系を調節するのに重要な役割を担っていることが知られている（例えば、カンタキサンチンはラットにおけるリンパ球増殖を増大させるだけでなく、マウスにおける化学誘導性の発癌を妨げることが見出されている）。アスタキサンチンとβ-カロチンはT依存性抗原に対するマウス脾細胞のex vivo抗体反応を増大させることが見出されている。食餌のルテインはマウス脾細胞でのリンパ球増殖を高めることが見出されている。

【０００４】

これらの化合物はすべて酸化防止剤として分類されているが、これらがすべて同様に作用しているのではないことが明らかになってきた。例えば、ヒトにおける歴史的研究は、酸化防止剤を多く含む食事を消費する（すなわち、果物や野菜の高摂取）集団は、他のヒトの集団よりも癌の発生率が低いことを示している。しかし、ビタミンEやβ-カロチンのような酸化防止剤のみの補足を供給する臨床試験は同じ大きさの防御を与えなかった。現在は、酸化防止栄養素から得られるヒトの健康は、高レベルの一つの酸化防止剤によるというより、幾つかの低レベルの異なる酸化防止剤の組み合わせによるのであろうと考えられている。

【０００５】

イヌは大量の果物と野菜を基にした食餌で進化してきたわけではないが、これらの化合物を高濃度に有する植物を消費する小草食動物を狩って食べていた。従って、イヌの酸化防止剤への要求は自然に発達したということができる。従って、本技術分野において、健康的恩恵を供給するためにイヌのようなコンパニオンアニマルの餌に有益な酸化防止剤を供給する必要性がある。

【０００６】

本発明は、イヌのようなコンパニオンアニマルに、酸化防止剤の組み合わせを有効量含有する餌を与えて、免疫反応を高め、その動物を総体的な健康を改善するためのプロセスを提供する。好ましくは、動物はビタミンE、ルテインおよびβ-カロチンの組み合わせを含む餌を与えられる。この酸化防止剤のパッケージは、餌1キログラムあたり約175から約400 IUのビタミンE、あたり約1から約50 mg／日のルテイン、およびあたり約1から約50 mg／日のβ-カロチンをコンパニオンアニマルに供給する。このような餌はイヌのワクチン認識を増大させるだけでなく、イヌの免疫細胞を最適化することが見出された。

【０００７】

従って、動物の餌に酸化防止剤の組み合わせを有効量供給することにより、イヌのようなコンパニオンアニマルの免疫反応を高め、総体的な健康を改善するためのペットフードとプロセスを提供するのが本発明の特徴である。本発明のこの、そして他の特徴と利点は、以下の詳細な説明、添付の図面、および添付の請求の範囲で明らかになるであろう。

【０００８】

本発明は、イヌのようなコンパニオンアニマルに酸化防止剤の組み合わせを含有する餌を与え、免疫反応を高め、その動物の総体的な健康を改善するためのプロセスを提供する。酸化防止剤の組み合わせはサプリメントとしてまたは動物に与える餌に含有させて動物に与えればよい。このようなサプリメントは、錠剤またはカプセルの形態、トリートやビスケット、またはその他のどのような食用の形態でもよい。「餌」によって、動物が定期的に消費する飲食物を意味する。酸化防止剤の組み合わせを用いて、健康的な利益は免疫系

の多くの領域に提供される、例えば免疫細胞の活性化が、最適化され、抗体レベルが増加し、およびワクチン認識が増加すると考えられている。

【０００９】

餌は動物に適切な栄養をも提供する適当なペットフードフォーミュラでよい。例えば、本発明で使用される典型的なイヌの餌は約18-40％の粗たんぱく質、約4-30％の脂肪、そして約4-20％の総食物繊維を含有してよい。しかし、これらまたは他の栄養の特定の比率やパーセントは要求されない。酸化防止剤の組み合わせは必要とされる有益な量を供給できるように混合すればよい。

【００１０】

本発明の理解をより容易にするために、本発明の例証を意図する以下の実施例が参照されるが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【００１１】

【実施例】

実施例１

ビタミンE

20匹の若い（平均年齢2歳）ビーグル犬と20匹の老齢の（平均年齢9.2歳）ビーグル犬が、餌１ kgあたり27 IUのビタミンEを含有するように調合された標準の市販の鶏肉／とうもろこしベースの餌（NRC推奨）（標準餌）を、実験開始前一ヶ月間、イヌのビタミンEレベルを安定させるために与えられた。若いイヌと老齢のイヌはそれから、ランダムに、餌1 kgあたり27 IUのビタミンE、または餌1 kgあたり280 IUのビタミンEを含有する餌に8週間割り当てられた。餌処置の前と8週間後に、血漿ビタミンEレベルの測定と、ConA（コンカナバリンA）とPHA（フィトヘムアグルチニン）に対するリンパ球細胞分裂誘起反応の評価のために、血液が採取された。餌処置の前は、他の種と同様に、老齢のイヌは若いイヌよりもPHAとConAに対する細胞分裂誘起反応が有意に低かった。驚いたことに、餌1 kgあたり27 IUのビタミンEを与えられた若いイヌと老齢のイヌの血漿ビタミンEレベルには有意の減少があり、若いイヌのほうが高いパーセントの減少を示した（老齢のイヌ35％に対し、若いイヌ50％、P=0.12）。施設に来る前に実験イヌが与えられていた市販の固形飼料のビタミンE含有量を調べたところ、市販の食物は、平均で、1 kgあたり60 IUのビタミンEを含有していることが示された。従って、血漿ビタミンEレベルの低下は、市販のイヌの固形飼料に比較して、対照餌のビタミンEレベルが低いことが原因とすることができる。ビタミンEを補足された若いイヌも老齢のイヌも血漿ビタミンEレベルで有意な増加を示し、若いイヌは老齢のイヌよりも有意に高いパーセントの増加を示した（老齢のイヌ20％に対し、若いイヌ50％の増加、P=0.02）。餌1 kgあたり27 IUのビタミンEを与えられた若いイヌもまた、8週間の給餌期間の間、ConAとPHA誘起の増殖に有意の減少があった。このような減少は餌1 kgあたり280 IUのビタミンEを補足されたイヌには見られなかった。餌1 kgあたり27 IUまたは280 IUのビタミンEを与えられた老齢のイヌはマイトジェン誘起リンパ球増殖で有意の変化を示さなかった。

【００１２】

β-カロチン

メスのビーグル犬（18から19月齢；体重7から9 kg）が、全ての必須栄養の必要性に適合、または超過する基本餌（The Iams Co., Lewisburg, OH）を与えられた。動物は屋内にて、光（14時間明、10時間暗）と温度が調節された部屋に収容された。試験はβ-カロチンの1回の経口投与の後のβ-カロチンの吸収プロファイルを調べるために行われた。

【００１３】

経口でβ-カロチンを一回投与されたイヌの経口β-カロチンの吸収を調べるため、イヌ（ｎ=6／処置）は、一回経口で、0、50、100または200 mgのβ-カロチン（10％冷水可溶；BASF Corp., Ludwigshafen, Germany）を与えられた。適切な用量のβ-カロチンが5mlの水に溶かされ給餌注射器を使って経口で与えられた。適切なサンプリング時間を確立するため、2匹のイヌが予備的な実験に使用された。これらのイヌは50 mgのβ-カロチンを一度与えられ、血液は0（β-カロチンを与える直前）、3、6、9、12、15、18、21および24時

間で採取された。

【００１４】

血漿は遠心分離により分けられ、β-カロチン濃度は後述のように高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使って分析された。全ての手順は弱い光のもとで行われた。二つの血漿のアリコート、白血球ホモジェネートのそれぞれおよび白血球亜細胞画分のそれぞれは、BHTの存在下、ジエチルエーテルと石油エーテル1:1の混合溶液で抽出された。エーテル相を取りだし、窒素気流下で乾燥された。残渣はβ-カロチンのHPLC測定のために移動相に再構成された。サンプル（50μl）は、5μm球状C-18逆相カラム（3.9×150mm; Resolve）にインジェクトされ、アセトニトリル、メタノールおよびクロロホルムの47:47:6(v/v/v)の混合溶液で、溶出速度1.0ml／分で溶出された。

【００１５】

この実施例の結果は、β-カロチンのピーク濃度は投与後3時間から6時間の間に生ずることを示し、ピーク濃度は24時間まで観測できなかった。続いて、残りのイヌから、同じ時間間隔で血液が採取された。血漿は同様に分離され、HPLCで分析された。

【００１６】

補足されないイヌでは、血漿β-カロチン濃度は実験の全ての期間で検出できなかった。対照的に、β-カロチンの経口投与を受けたイヌでは、血漿β-カロチンの投与量依存の増加（P＜0.01）があった。ピーク濃度は投与後6時間で観測され、それは全ての処置群で一貫していた。その後、全てのβ-カロチン補足イヌでβ-カロチン濃度の急激な低下（P＜0.01）があった。濃度は投与後24時間まで検出できなかった。血漿β-カロチンの半減期は約3（投与量50と100 mg）から4（投与量100 mg）時間であった。血液β-カロチンのピーク濃度はネコよりイヌで早期に生じた（以下の実施例４と５参照）。また、イヌ血漿のβ-カロチン濃度は、ネコで観測されるものより、体重差を調整した後に10から16倍低い。

【００１７】

2番目の実験では、イヌ（n=6／処置）は連続7日間、毎日の0800時に0、12.5、25、50または100 mgのβ-カロチンを与えられた。β-カロチンは食物の上に撒かれ、朝食に与えられた。血液は1日1回、0日目（最初の投与の直前）、続いてそれぞれの投与の6時間後（1日目から7日目）に採取された。この血液採取時間は、β-カロチンのピーク濃度が投与6時間後に示した実施例１で得られた結果に基づいて選ばれた。血漿は単離され、β-カロチン濃度が測定された。

【００１８】

7日間毎日β-カロチンをイヌに投与することにより、用量依存的に増加が循環β-カロチンに生じた（P＜0.01）。β-カロチン100 mgを与えられたイヌは毎日の血漿β-カロチン濃度で一番急な増加を示した。この実施例で100 mgのβ-カロチンを与えられたイヌの1日目の血漿β-カロチンのピーク濃度（18μg／L）は、一番目の実験で観測されたものと同様であった。最後の投与後の血漿β-カロチン濃度は、最初の投与後に観測されたものより、概して2.5から4倍高かった。

【００１９】

3番目の実験は、血液リンパ球によるイヌのβ-カロチン吸収を調べるよう計画された。イヌ（n=8／処置）は30日間、0、50、または100 mgのβ-カロチンを毎日与えられた。血液は10、20および30日に全てのイヌの頸静脈から採取された。血液リンパ球と好中球は密度勾配遠心分離法で分離された。細胞数を数え上げた。リンパ球と好中球は酸化防止剤としてのアスコルビン酸ナトリウムを3%含有するPBSに再懸濁した。細胞懸濁液のアリコートは細胞を破壊するため30秒間超音波を当てられた。白血球ホモジェネートはβ-カロチンのHPLC分析のため抽出された。

【００２０】

30日目に血液の大きいほうのアリコートが取られ、続く亜細胞分画を行うため、上述のように白血球懸濁液が用意された。細胞は、5容量の0.25Mスクロースの中で20秒間、超音波処理することにより破壊された。アスコルビン酸ナトリウムが酸化防止剤として添加された。ホモジェネートは遠心分離され（600×g、4℃で10分間）、核ペレットが上清から分

離された。核除去後の上清を遠心分離し（17,300×g、4℃で20分間）、ミトコンドリアの画分が分離された。ミトコンドリア除去後の上清を遠心分離し（102,000×g、4℃で60分間）、細胞質ゾル画分からミクロソームを分離した。亜細胞画分はそれぞれ、HPLCでβ-カロチン量を測定された。

【００２１】

0日目（β-カロチンの補足前）、末梢血液リンパ球でのβ-カロチン濃度は全てのイヌで観測できなかった。また、補足されなかったイヌのリンパ球のβ-カロチンは実験中ずっと検出されないままであった。対照的に、β-カロチンを与えられたイヌから単離されたリンパ球のβ-カロチン濃度は、概して時間に依存するかたちで増加した（P＜0.01）。50に対して100 mgのβ-カロチンを与えられたイヌを比較した場合リンパ球のβ-カロチン濃度に有意の処置差はなかった。

【００２２】

β-カロチンは、補足されなかったイヌから得られたリンパ球の様々な亜細胞画分において検出できなかった。対照的に、β-カロチン補足のイヌから単離された血液リンパ球の全ての亜細胞画分にβ-カロチンは吸収された。細胞質ゾル画分はリンパ球の総β-カロチンの52から62％を占め、核は総β-カロチンの最も低い量（6から8％）を含有した。ミトコンドリア（14から17％）とミクロソーム（16から23％）は細胞質ゾルと核の中間であった。食餌のβ-カロチン投与量は、給餌30日目において亜細胞画分によるβ-カロチン吸収に有意の影響がなかった。この結果は、β-カロチンは全てのリンパ球亜細胞画分に吸収されたことを示す。しかし、β-カロチンは細胞質ゾルで最も高い。

【００２３】

リンパ球で見られるように、血液好中球も同様にβ-カロチンを吸収する。しかし、リンパ球と異なり、最大の吸収は10日までに生じ、30日に好中球β-カロチン濃度のそれ以上の増加はなかった。血液好中球の細胞質ゾル、ミトコンドリアおよびミクロソームもまたβ-カロチンの有意の吸収を示した。対照的に、核ではβ-カロチンは検出されなかった。血液リンパ球亜細胞画分のように、β-カロチンは血液好中球の細胞質ゾル画分で最も高かった（61から68）。有意な投与量の影響は観測されなかった。

【００２４】

４番目の実験では、メスのビーグル犬（4から5月齢）が毎日0、25、50または100 mgのβ-カロチンを補足され、食餌のβ-カロチンがイヌの細胞性および体液性免疫系を促進する役割が調べられた。次のパラメーターが、全ての動物達または末梢血液リンパ球において評価された：（１）PHA（非特異性免疫）およびワクチン（特異性免疫）に対する遅延型過敏症（DTH）、（２）リンパ球増殖、（３）リンパ球集団および（４）免疫グロブリン（Ig）。

【００２５】

β-カロチン補足は、用量依存的に血漿β-カロチン濃度を上げたが、血漿レチノールまたはα-トコフェロールには影響しなかった。これらの変化は概して、特異的（ワクチン）および非特異的（PHA）抗原両方に対するDTH反応に影響した。PHAチャレンジに対する最も大きい反応は50 mgのβ-カロチンを与えられたイヌに観測され、一方、20または50 mgのβ-カロチンを与えられたイヌはどちらもワクチンに対する有意に高いDTH反応を示した。遅延型過敏症は、厳密に、T細胞とマクロファージが関与し、抗体要素が関与することのない細胞反応である。抗原提示細胞（例えばマクロファージ）が抗原またはアレルゲンをT細胞に提示し、T細胞は活性化してリンホカインを放出する。これらのリンホカインは、マクロファージを活性化して外部侵入者の強力なキラーにする。従って、データはβ-カロチンを与えられたイヌにおいて強化された細胞性反応を示す。

【００２６】

β-カロチンを与えることにより、リンパ球サブセットにも有意の変化が生じた。対照に比較して、20または50 mgのβ-カロチンを与えられたイヌはCD4＋細胞の集団が増加した（8週）。20 mgのβ-カロチンを与えられたイヌはまた、2週と4週にCD8細胞の集団が増加した。T細胞はCD4膜分子の発現に従って分類することができる。CD4は接着分子として、

また、共同でシグナル伝達する共同受容体として機能する。CD4はT細胞活性化の役割を果たす。CD4+ Tリンパ球はクラスII MHC分子と一緒に抗原を認識し、主として、ヘルパー細胞として機能する。この実験でのTヘルパー細胞集団の増加は、20または50 mgのβ-カロチンを与えられたイヌのDTH反応が対応して増加していることを説明できる。

【００２７】

IgG、IgMおよび総IgGの濃度はβ-カロチンを与えられたイヌにおいて、毎日の補足後たった1週間で有意に増加した。Igの増加はβ-カロチン0から20 mgを与えられたイヌでは用量依存的であった。最も高いレベルのβ-カロチン（50 mg）はそれ以上の増加を生じさせなかった。20 mgのβ-カロチンを与えられたイヌは一貫して、両方のIgについて最も大きい抗体反応があった。免疫系の主要な機能の一つは、外来物質から身体を守るために、自由に循環する抗体を産生することである。抗体は、毒素を無毒化し、特定の微生物を固定化し、ウィルス活性を中和にし、微生物または抗原粒子を凝集し、および可溶性抗原を沈殿させるのに役立つ。

【００２８】

β-カロチンを与えることはマイトジェン誘導リンパ球幼若化反応（blastgenesis）とIL-2産生には影響しなかった。リンパ球は細胞性免疫に関与する。抗原を認識すると、リンパ球はすぐに分裂し、自らをクローニングして起こりうる侵入と戦う準備をする。体液性免疫では、IL-2はTヘルパー細胞とB細胞の両方を刺激して、抗原への反応で増殖させる。抗原またはマイトジェン活性化T細胞のクローン性増殖が必要である。細胞性免疫では、IL-2はナチュラルキラー細胞を活性化し、胸腺細胞の増殖を刺激し、細胞障害性T細胞活性を誘導する。

【００２９】

これらの実験結果に基づいて、イヌは餌から有意の量のβ-カロチンを吸収し、そのβ-カロチンを、免疫細胞と食細胞の亜細胞オルガネラに運ぶ。これらの細胞において、β-カロチンは、増加した細胞性免疫反応（DTH反応、リンパ球サブセットに転ずる）および体液性反応（IgGとIgM産生）により、イヌの免疫系を強化するようである。

【００３０】

ルテイン

56匹のビーグル犬（17から18月齢；平均体重11.4±0.4 kg）が17週間、0、5、10または20 mgのルテインを毎日補足されるようにランダムに割り当てられた。そのルテインは76.66％のルテインと5.23％のゼアキサンチンを含有するものであった。ルテインサプリメントは適当な濃度になるよう大豆油に再懸濁され、1 mLが0800時に毎日経口投与された。食物（200 g／1匹1日）はルテイン補足の直後に与えられた。基本食は全ての必須栄養（NRC1985）の要求性に適合または超過するものであった。全てのイヌは温度（20から22℃）と光（14時間光）の調節された設備の、2×2mのおり（おり一つに2匹）に収容された。体重は0、6および12週に記録された。

【００３１】

血液は、頸静脈穿刺でヘパリン添加の真空試験管に0、2、4、8および12週目に集められ、アリコートはHPLC分析と免疫反応の評価のために使われた。

【００３２】

抽出とHPLC分析

血漿は、ルテイン、ゼアキサンチン、レチノールおよびα-トコフェロールの分析のために抽出された。簡単には、血漿タンパク質は0.1％ブチルヒドロキシトルエン（BHT）（Aldrich Chemical Co.,Milwaukee, WI）含有のエタノールを同容量添加することにより沈殿した。混合物は石油エーテル：無水ジエチルエーテルの1：1混合溶液5mlで抽出された。

【００３３】

乾燥残渣はHPLC等級のアセトニトリル：メタノール：クロロホルム（Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ）の47：47：6（v：v：v）の混合溶液を含有する移動相に再懸濁された。ルテイン、ゼアキサンチンおよびα-トコフェロールは曲線下の領域を比較することにより定量されたが、レチノールはピーク高度を用いて定量された。溶出された化合物の同定

は、吸収スペクトルを純粋な標準のものと比較することにより確定された。ルテインとゼアキサンチンのベースラインの分離ができなかったので、血漿濃度はルテイン＋ゼアキサンチンとして報告された。

【００３４】

遅延型過敏症反応

0、6および12週に、全てのイヌについて皮膚硬結（induration）反応が評価された。イヌは横腹に、生理食塩水（8.5 g/L；対照）、イヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルスタイプ-２、イヌパラインフルエンザウイルスおよびパルボウイルス（Vanguard 5, Smithkline Beacham, West Chester, PA；特異的抗原）を含有する減弱多価ワクチン、並びにPHA（0.5 g/L；非特異的抗原）を皮下注射された。用いられたワクチンとPHAの投与量は、同様の年齢のビーグル犬で最適の皮膚反応を与えるように以前に定められた。注射位置は毛を刈り込まれ、70%エチルアルコールで拭かれた。注射量は100μlであった。皮膚硬結は注射後0、24、48および72時間に、圧力感受のデジタルマイクロメータ（Mitsutoyo, Tokyo, Japan）で測定され、反応は、0時間に測定した皮膚厚さのパーセントで表された。

【００３５】

リンパ球増殖

0、2、4、8および12週に集められた血液は、末梢血液単核細胞（PBMC）によるマイトジェン誘導リンパ球増殖の評価に用いられた。全血液培養はin vivoの状態を模倣するために用いられた。使用されたマイトジェンはフィトヘムアグルチニン（PHA）、コンカナバリンA（ConA）およびヤマゴボウマイトジェン（PWM）である。全血液はよく混合され、25mMのHepes、ペニシリン（100U／ml）およびストレプトマイシン（100μg/ml）（Sigma, St. Louis, MO）を含有するRPMI-1640で1:12に希釈された。希釈しない血液と1:2、1:4、1:8、1:12および1:16に希釈した血液を使った予備的な実験では、1:12の希釈で最適なPBMC増殖反応が示された。トリプリケートの150μl容量が96ウェル丸底プレートにピペットで入れられ、適切なマイトジェン50μlが添加された。培養でのマイトジェンの最終的な濃度はPHAは2と10μg/mL、ConAは1と5μg/mLおよびPWMは0.5と2.5μg/mLであった。この二つのマイトジェン濃度は、似通った動物の血液を使った予備的な実験で、最大の（高い方のマイトジェン濃度）および最適以下の（低い方のマイトジェン濃度）増殖反応を与えた。混合物は、5%CO_2空気下の加湿インキュベータで37℃で72時間インキュベートされた。インキュベーション期間の終了前4時間のときに、20μLの[^{3}H]-チミジン（1[μCi／ウェル]）が添加された。細胞はファイバーグラスフィルター上で回収され、液体シンチレーションにより放射能が測定された。PBMCの増殖反応は刺激インデックス（刺激した培養のcpm／刺激しない培養のcpm）として表された。

【００３６】

リンパ球サブセット

血液リンパ球はHistopaque-1119(Sigma, St. Louis, MO)を用いて分離された。細胞はリン酸緩衝化生理食塩水（PBS、pH7.4）で３回洗浄され、混合している赤血球はNH_4Cl（8.4 g/L）中で溶解された。リンパ球サブセットはフローサイトメトリー（FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA）により測定された。単離された単核細胞は2%ガンマグロブリン不含血清、5%ヤギ血清および0.2 g/Lのアジ化ナトリウムを補足されたPBSに1×10^7細胞／mLとなるように再懸濁された。免疫蛍光分析のために、総量5×10^5の細胞が最適濃度のマウス抗イヌモノクローナル抗体（mAb）と氷上で30分間インキュベートされた。用いられたmAbは次のリンパ球サブセットに特異的であった：全T細胞（抗-CD5）、T-ヘルパー細胞（抗-CD4）、T-細胞障害性／サプレッサー細胞（抗-CD8）、主要組織適合遺伝子複合体（MHQクラスII抗原）を発現しているリンパ球（抗-MHCクラスII）、およびB細胞（抗-CD21）。細胞はその後3回洗浄され、2次抗原、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）複合ヤギF(ab')$_2$抗マウスIgG＋IgM（H+L）(Caltag, Burlingame, CA)と氷上で30分間インキュベートされ、結合したmAbを可視化した。染色された細胞は、データ取得の準備に4%パラホルムアルデヒド中で固定された。

【００３７】
バックグラウンド蛍光について修正するため、適当な陰性対照が含まれた。データは、2次抗体で非特異的に染色された細胞について修正した陽性染色細胞のパーセントとして表された。
【００３８】
NK細胞細胞障害性
イヌ甲状腺癌細胞がNK細胞細胞障害性活性を評価する標的細胞として用いられた。この細胞株は、イヌNK細胞により殺されやすいことが以前に示された。標的細胞は10％ウシ胎仔血清（FCS）、100U/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシンを補足された20mLの最小必須培地（MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, MO）によりT75フラスコ内で培養された。コンフルエントの時に、標的細胞をトリプシン処理し、3回洗浄し、完全培地（RPMI-1640＋10％FCS＋100U/mLのペニシリン＋100μg/mLのストレプトマイシン）に5×10^5細胞／mLとなるように再懸濁された。トリプリケートの100μLアリコートの標的細胞が96穴U底プレート（Costar, Cambridge, MA）にピペットで入れられ、細胞接着させるため8時間インキュベートされた。パーコール分離（上述）で単離されたリンパ球（エフェクター細胞；100μL）はその後、エフェクター：標的細胞（E:T）比10:1になるように標的細胞に加えられた。37℃10時間のインキュベーションの後、5μgの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド（MTT）を含有する20μlの基質が添加された。混合物は370℃で4時間インキュベートされ、その後代謝されていないMTTを吸引により除去した。ホルマザン結晶は95％エタノール200μLを添加することにより溶解された。光学密度はマイクロプレートリーダーを用いて570nmで測定された。NK細胞特異的溶解の％は下記のように計算された：
特異的細胞障害性（％）＝100×｛1－［（標的細胞とエフェクター細胞のOD－エフェクター細胞のOD）／（標的細胞のOD）］｝
【００３９】
IL-2産生
全血液はHepesと抗生物質（上述）で補足されたRPMI-1640で1:2に希釈され、希釈血液の400μLは48穴プレート（Costar, Cambridge, MA）にピペットで入れられた。細胞は、48時間5％CO_2空気中37℃で、PHA（5μg/mL溶液の400μL）により刺激された。プレートは200×gで10分間遠心分離され、上清は -80℃で凍結された。培養上清のIL-2含有量はELISA（Intergen, Purchase, NY）により3回測定された。イヌIL-2と交差反応するポリクローナル抗ヒトIL-2と組換えヒトIL-2が標準として用いられた。
【００４０】
血清IgGとIgM
0、2、4、8および12週に採取された血清は単純放射状免疫拡散法（SRID）によりIgGとIgM濃度が測定された。さらに、全てのイヌは13週に、再び15週に多価ワクチン（Vanguard 5, Smithkline Beacham, West Chester, PA）注射され、食餌のルテインの可能性のある既往効果が調べられた。血液は13週から17週まで毎週集められた。イヌIgG（10％、全分子）またはIgM（7.5％、μ鎖特異的）に対するヤギ抗血清（ICN, Aurora, OH）が、溶解アガロース（PBS中10 g/L；Sigma Chem Co., St. Louis, MO）と混合され、混合物はSRIDプレートに凝固させられた。血清またはIgG（0、2.88、5.75、11.5、および23.0 mg/ml）またはIgM（0、0.25、0.5、1.0および2.0 mg/ml）標準の、デュプリケートの5μlがウェルにのせられた。加湿チャンバー内、室温で24時間インキュベートしたあと、輪の直径がSRIDリーダー（Transidyne General Corp., Ann Arbor, MI）を使って測定された。
【００４１】
脂質過酸化反応（TBARS）アッセイ
血漿脂質過酸化反応活性はマロンジアルデヒド（MDA）生成を測定することにより決定された。用いられた標準は1,1,3,3-テトラメトキシプロパン（JMP）（Sigma Chem Co., St. Louis, MO）であった。デュプリケートの500μLの血漿サンプルが15mlのガラス試験管にピペットで入れられ、10 g/Lのリン酸3mLと6 g/LのTBA溶液1mlが添加された。混合物は水

浴で45分間沸騰させられた。試験管は冷却され、TBA-MDA複合体は4mlのn-ブタノールで抽出された。ブタノール相は1,000×g、10分間の遠心分離で分離され、吸光度が、532nmで測定された（Beckman, Fullerton, CA）。TBARS活性は血漿１LあたりのMDAのnmoleで表された。

【００４２】

統計

データは統計的分析システム（SAS）の一般線形モデルを使ってスプリット-プロット（split-plot）ANOVAで分析された。統計モデルは$Y_{ijk}=\mu+Diet_i+Dog_j$（Diet）（Dietの影響を分析するのに用いた誤差用語)$+Period_k+Diet_i*Period_k+e_{ijk}$であった。処置平均間の違いは直交対比（orthogonal contrast）を使って比較され、P＜0.05のとき統計学的に有意であるとした。

【００４３】

結果

血漿

ルテインを補足されたイヌのルテイン＋ゼアキサンチンの血漿濃度は給餌の2週後に急激に増加した（図１）。血漿濃度は、より緩やかではあるが、10および20 mgのルテインを与えられたイヌでその後増加を続けた。対照的に、補足されていないイヌでは、ルテイン＋ゼアキサンチンは検出できなかった。2から12週の血漿ルテイン＋ゼアキサンチンの濃度は補足されなかった動物よりもルテインを与えられたイヌで、有意に高かった（P＜0.05）。ルテイン補足は血漿のレチノールとα-トコフェロールの濃度には影響しなかった。全ての処置と全ての期間にわたるこれらのビタミンの濃度はそれぞれ平均して、3.63±0.14および37±2μmol/Lであった。

【００４４】

遅延型過敏症反応

実験された全ての期間で、生理食塩水に対するDTH反応は低く（皮膚厚さの増加3から10％）、処置グループ間で有意な差がなかった。ルテインを与える前（0週）、PHAとワクチンに対するDTH反応は全ての食餌グループ間で同様であった。処置期間に関わらず、PHAに対する最大のDTH反応は注射後24時間付近で観測され、ワクチンに対する最大反応は48から72時間に生じた。また、PHAに対する皮膚厚さの反応はワクチンに対するものより、約2倍高かった。

【００４５】

6週に、注射後24時間で投与量に関連したPHAに対するDTH反応があった。DTH反応は48から72時間までに減少し、これらの時間の間、有意な処置の差は観測されなかった。ワクチンに対するDTH反応は注射後48から72時間に投与量に関連し、24時間には有意ではなかった。

【００４６】

12週に、24、48および72時間に、PHAに対するDTH反応に一般的な投与量に従った増加があった；しかし、反応は、補足されないイヌに比較して、20 mgルテインを与えられたイヌで有意に高かった。6週と対照的に、ワクチンに対するDTH反応に有意な食餌の影響はなかった。

【００４７】

マイトジェン誘導PBMC増殖

食餌のルテインは、刺激されていないPBMCの自発的増殖に有意に影響しなかった。０および4週にはPHA刺激されたPBMC反応に対する食餌のルテインの有意な影響はなかった。しかし、8週（10 pg/mL PHA）および12週（2と10μg/mL PHA）に、補足されないイヌと比較して20 mgのルテインを与えられたイヌにおいて、増殖反応は増加した（p＜0.01）。5および10 mgのルテインを与えられたイヌも、8週に10μg/ml PHAに反応して、高いPBMC増殖をした。

【００４８】

ConA刺激されたPBMC増殖反応に対する食餌のルテインの影響は概して、PHA誘導の増殖に

観測されたものと似通っていた。8および12週に、20 mgのルテインを与えられたイヌは、ConAの両方の濃度に反応して高いPBMC増殖をした。10 mgのルテインを与えられたイヌも、8および12週に5μg/mL ConAに反応して高いPBMC増殖を示した。一般に、1μg/mL ConAによるより、5μg/mL ConAによって、PBMC増殖はより高かった。

【００４９】

PWMに反応してのPBMCの増殖は、概してPHAとConAで観測されたものと似通っていた。20 mgのルテインを与えられたイヌは、8および12週にPWMの両方の濃度に反応して、補足されない対照と比較して有意に高いPBMC増殖を有した。10 mgのルテインを与えられたイヌも8週に高い増殖反応をした。ここでも、0および4週では、有意な処置の差は観測されなかった。

【００５０】

ナチュラルキラー細胞細胞障害性活性

食餌のルテイン補足はNK細胞細胞障害性活性に有意に影響しなかった。PBMCによる標的細胞の特異的な溶解は全ての処置とサンプリング期間を通して平均して49.1±1.1%だった。

【００５１】

リンパ球亜集団

食餌ルテイン補足前（0週）、どのリンパ球マーカーのパーセントにも有意の差はなかった。12週に、CD4+細胞の%が5および10 mgのルテインを与えられたイヌにおいてより高く、CD8+集団は食餌に影響されなかった。一方、20 mgのルテインを与えられたイヌは8週に、対照と比較して有意に高いCD8+ T細胞障害性細胞%を有した。CD4：CD8の比は0、4および8週には処置間で同様であったが、対照（2.10±0.16）と比較して、10 mg与えられたイヌ（2.50±0.16）で高い傾向があった（P＜0.08）。

【００５２】

4および8週に、ルテインを与えられたイヌは概して、補足されない対照よりも高いCD5+細胞のパーセントを有し、5および20 mgのルテインを与えられたイヌで統計的に有意であった。20 mgのルテインを与えられたイヌも、8および12週に、補足されないイヌと比較して高いMHCクラスII細胞集団%を有していた。より少ない量のルテインを与えられたイヌは対照と同様にMHCクラスII集団を有していた。

【００５３】

他のリンパ球亜集団と対照的に、食餌のルテインはCD21+B細胞集団には有意に影響しなかった。

【００５４】

インターロイキン－２産生

全血液培養でのPHA刺激PBMCによるIL-2産生は、実験期間中、食餌間で有意な差異はなかった。培養培地でのIL-2濃度は実験中平均して15.7±0.4 ng/mLであった。

【００５５】

免疫グロブリン産生

血漿IgG濃度は17週のサンプリング期間中増加する傾向があった（P＞0.05）。濃度は、食餌補足の最初の12週の間、食餌処置間で同様であった。しかし、15週の再ワクチン化の後、5 mgのルテインを与えられたイヌで16週に（P＜0.05）、20 mgのルテインを与えられたイヌで17週に（P＜0.05）血漿IgGは高くなり、血漿IgM濃度には変化がなかった。

【００５６】

脂質過酸化反応

ルテイン補足は血漿TBARS活性に有意に影響せず、全ての処置と期間にわたり平均して95.8±0.1 nmol MDA/Lであった。

【００５７】

検討

結果は、食餌のルテインがイヌの細胞性免疫反応を有意に高めたことを示している。ルテイン補足はPHA、ConAおよびPWMに対するPBMCの増殖反応を刺激した。20 mgのルテインを

与えられたイヌにおいて12週に、PHAとConAに反応してPBMC増殖に顕著な増加があった。

【００５８】

データは食餌のルテインにより強化される有糸分裂誘発は増加したリンパ球集団のためであるらしいことを示す。ルテイン補足されたイヌは高いCD5+とCD4+細胞集団を有していた。ルテイン補足によってB細胞集団に変化が観測されなかったので、食餌のルテインはTリンパ球に特異的に働くのかもしれない。

【００５９】

データはまた、ルテイン補足が8および12週にPWM誘導PBMC増殖を有意に増加させたことを示した。

食餌のルテインはまた、ワクチンに対するDTH反応を有意に増加させたが、これは特異的免疫反応を暗示するものである。ルテイン補足は、MHCクラスII分子に陽性に染色された細胞の数を、補足されないイヌと比較して有意に増加させた。

【００６０】

ルテインは補足の最初の12週の間、イヌのポリクローナル抗体（IgGとIgM）のex vivo産生に有意に影響しなかった。しかし、再び抗原に触れさせると、血漿IgG濃度はルテインを与えられたイヌで増加し、IgGを分泌する記憶B細胞の能力を増加させる食餌ルテインの既往効果を示唆した。

【００６１】

まとめると、食餌のルテインは、イヌのTヘルパー細胞集団とMHCクラスIIの分子発現を高め、その結果、マイトジェン誘導のイヌPBMC増殖とDTH反応を増加させた。また、ルテインはIg産生を増加させると考えられている。

【００６２】

それぞれの実験の結果の概要を表1にまとめる。

【００６３】

【表１】

利点	ビタミンE	β-カロチン	ルテイン
免疫細胞活性を最適化する	✓（T細胞）		✓（B細胞）
血液中にある細胞種を最適化する		✓	
血液中の抗体レベルを増加させる		✓	
イヌによるワクチン認識を最適化する		✓	✓

【００６４】

図１は食餌へのβ-カロチン添加により血液中の抗体レベルが20％増加したことを示す。図２はイヌがワクチンを認識する能力を示す。示されているように、食餌にルテインを添加すると認識は32％まで改善する。このことは、イヌに、疾患からさらに防御するための予防接種に対する改良された反応を与える。

【００６５】

注目すべきは、どの酸化防止剤も、考察された免疫系の全ての側面について利点があったわけではないことである。例えば、ビタミンEとルテインの両方とも免疫細胞活性を最適化するが、ビタミンEはT細胞に働き、ルテインはB細胞に働いていた。T細胞の機能が増進することは、ウイルス感染と癌と戦うために重要である一方、B細胞機能の増進は、細菌感染のために重要である。従って、酸化防止剤の組み合わせは、免疫系に相乗効果を与え、どれか一つの酸化防止剤のレベルを増加させる利点にまさる。

【００６６】

本発明を説明する目的で特定の代表的な態様と詳細が示されたが、添付の請求の範囲で定

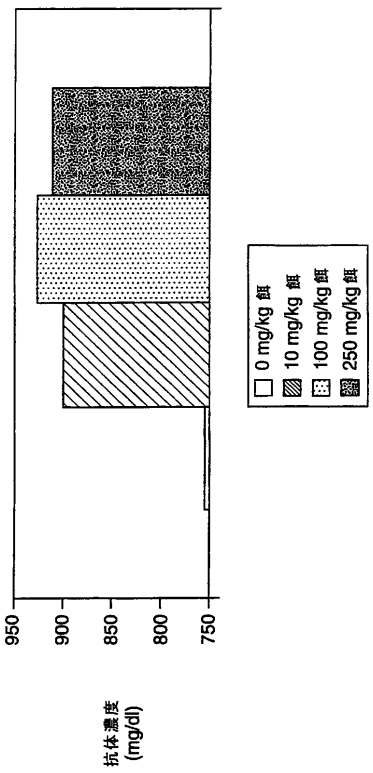
義された本発明の範囲をはずれることなく、ここで開示された方法や装置の様々な変更がされ得ることは、当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

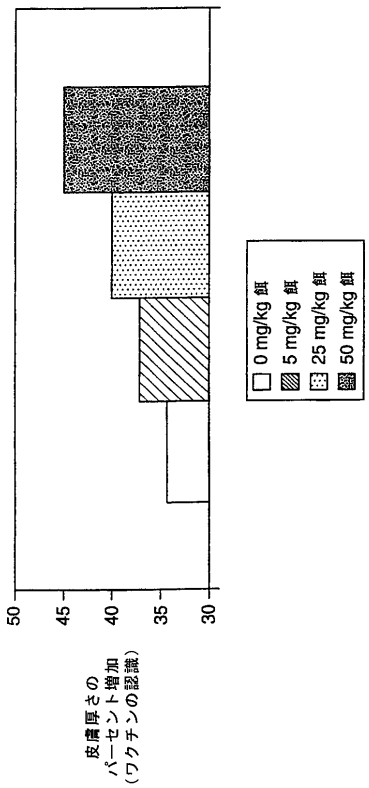
【図１】　図１は、餌１ kgあたりのベータカロチンmgに対する、イヌにおける抗体濃度（mg/dl）のグラフである。

【図２】　図２は食餌のルテインのイヌにおけるワクチン認識への影響を示したグラフである。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ａ６１Ｐ 37/04 (2006.01) Ａ６１Ｋ 31/355
Ａ６１Ｐ 37/04

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(74)代理人 100117813
弁理士 深澤 憲広
(72)発明者 ヘイエック，マイケル・ジー
アメリカ合衆国オハイオ州４５４１５，デイトン，タミー・サークル ９２６

合議体
審判長 山口 由木
審判官 宮崎 恭
審判官 関根 裕

(56)参考文献 特開平１１－８９５３９（ＪＰ，Ａ）
特開平１０－１７５８６６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A23K1/16,A23K1/18