

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年12月21日 (21.12.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/144943 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/702 (2006.01) *A61K 31/7016* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 33/30* (2006.01)
A23L 1/304 (2006.01) *A61P 37/04* (2006.01)
A61K 8/27 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/311910
- (22) 国際出願日: 2006年6月14日 (14.06.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ハウスウェルネスフーズ株式会社 (HOUSE WELLNESS FOODS CORPORATION) [JP/JP]; 〒6640011 兵庫県伊丹市鑄物師三丁目2番地 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 児山 洋平 (KOYAMA, Yohei) [JP/JP]; 〒6660023 兵庫県川西市東久代1丁目11-32-301 Hyogo (JP). 室▲崎▼伸二 (MUROSAKI, Shinji) [JP/JP]; 〒6308114 奈良県奈良市芝辻町3丁目6-27-208 Nara (JP). 山本 佳弘 (YAMAMOTO, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒6640002 兵庫県伊丹市荻野7丁目7-2 Hyogo (JP). 山本 憲朗 (YAMAMOTO, Norio) [JP/JP]; 〒6580066 兵庫県神戸市東灘区渦森台4丁目10-3 Hyogo (JP). 廣▲瀬▼義隆 (HIROSE, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒6640001 兵庫県伊丹市荒牧5丁目21-20-201 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 O R I X 堂島ビル3階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
 — 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
 — 発明者である旨の申立て (規則4.17(iv))
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION FOR ENHANCING IMMUNE FUNCTION

(54) 発明の名称: 免疫機能増強組成物

(57) Abstract: A composition for enhancing an immune function characterized by containing, as the active ingredient, a saccharide having zinc and 3-O- α -D-glucopyranosyl-D-glucose as a constituting unit. This composition for enhancing an immune function exerts an effect of enhancing the immune function that is superior to the effect achieved by using either zinc or 3-O- α -D-glucopyranosyl-D-glucose alone.

(57) 要約: 本発明は、亜鉛および3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類を有効成分とすることを特徴とする免疫機能増強組成物である。本発明の免疫機能増強組成物は、3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類または亜鉛をそれぞれ単独で使用する時よりも顕著に優れた免疫機能増強作用を発揮する。



WO 2007/144943 A1

明 細 書

免疫機能増強組成物

技術分野

[0001] 本発明は、亜鉛および3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類を有効成分とすることを特徴とする免疫機能増強組成物に関する。

背景技術

[0002] これまで3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類についてその免疫賦活効果が報告されている(非特許文献1及び2参照)。これらの糖類を有効成分とする組成物は免疫賦活剤(特許文献1、2及び3参照)、ナチュラルキラー細胞活性化剤(特許文献4参照)、QOL向上剤(特許文献5参照)等として公開されている。

[0003] 一方、亜鉛はヒトの生体内に存在する微量元素の中では鉄に次いで多い元素である。亜鉛の生理作用については様々な報告がなされており(非特許文献3参照)、酵素の成分や蛋白質の合成、味覚・嗅覚への関与、インスリンの生成や機能への関与、また生殖機能や免疫能の賦活に重要な役割を果たしている。特に、免疫機能全般に大きな役割を果たし、Tリンパ球やナチュラルキラー細胞の活性化といったリンパ球の機能を調節することが知られている(非特許文献4参照)。

特許文献1:特開平9-52834

特許文献2:特開2001-64174

特許文献3:特開2002-80364

特許文献4:特開2002-265366

特許文献5:特開2002-265385

非特許文献1: Biosci. Biotechnol. Biochem. , 1999, 63:373-378

非特許文献2: Int. Immunopharmacol. , 2002, 2:151-159

非特許文献3: J. Leukoc. Biol. , 2002, 71:25-27

非特許文献4: J. Nutr. 2003, 133:1452S-1456S

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、より優れた免疫増強作用を有する組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、鋭意研究を行なった結果、3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類と亜鉛を併用することで、それぞれを単独で摂取する時よりも顕著に優れた免疫機能増強作用を発揮することを知見し、さらに検討を重ね、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち、本発明は次の通りである。

(1) 亜鉛および3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類を有効成分とすることを特徴とする免疫機能増強組成物。

(2) 糖類が、ニゲロース、ニゲロシルグルコースおよびニゲロシルマルトースのうち少なくとも1種を含有するニゲロオリゴ糖であることを特徴とする前記(1)に記載の免疫機能増強組成物。

(3) 亜鉛とニゲロオリゴ糖の重量比が、1:200~2000であることを特徴とする前記(2)に記載の免疫機能増強組成物。

(4) 免疫機能増強が、免疫担当細胞の代謝活性上昇作用であることを特徴とする前記(1)~(3)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。

(5) 免疫機能増強が、免疫担当細胞の増殖能上昇作用であることを特徴とする前記(1)~(3)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。

(6) 免疫機能増強が、Tリンパ球の代謝活性上昇作用であることを特徴とする前記(1)~(3)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。

(7) 免疫機能増強が、Tリンパ球の増殖能上昇作用であることを特徴とする前記(1)~(3)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。

(8) 免疫機能増強が、Tリンパ球の細胞死抑制作用であることを特徴とする前記(1)~(3)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。

(9) 医薬または食品である前記(1)~(8)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。

(10)前記(1)～(8)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物を配合してなることを特徴とする食品。

(11)前記(1)～(8)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物を配合してなることを特徴とする飼料。

(12)前記(1)～(8)のいずれかに記載の免疫機能増強組成物を配合してなることを特徴とする化粧品。

発明の効果

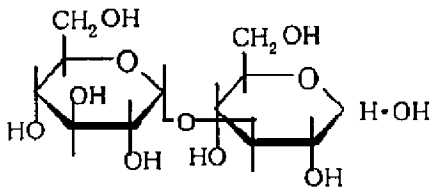
[0007] 本発明の免疫機能増強組成物は、3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類または亜鉛をそれぞれ単独で使用する時よりも顕著に優れた免疫機能増強作用を発揮する。このため、より効果的に健康を維持増進することができる。

発明を実施するための最良の形態

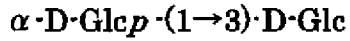
[0008] 本発明の免疫機能増強組成物は、亜鉛および3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類を有効成分とすることを特徴とする。

本発明で使用される3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類としては、特に限定されず、自体公知のものを用いてよい。具体的には、例えば、少なくとも1つ以上の α -1, 3グルコシド結合を含むグルコース重合度2程度以上のオリゴ糖が挙げられ、好ましくはグルコース重合度2～10程度のオリゴ糖、より好ましくは重合度2～7程度のオリゴ糖であるニゲロオリゴ糖が挙げられる。かかるニゲロオリゴ糖には、 α -1, 3グルコシド結合のみからなるオリゴ糖の他に、 α -1, 3グルコシド結合とそれ以外の結合(例えば α -1, 1, α -1, 2, α -1, 4, α -1, 6グルコシド結合など)とからなるオリゴ糖も包含される。中でも、本発明においては、下記式で表されるニゲロース、ニゲロシルグルコースまたはニゲロシルマルトースを用いるのがより好ましい。これらは単独で用いても、2種以上を併用してもよい。

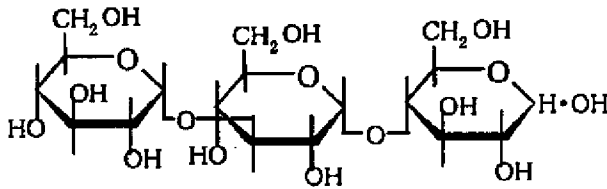
[0009] [化1]



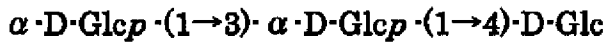
ニゲロース



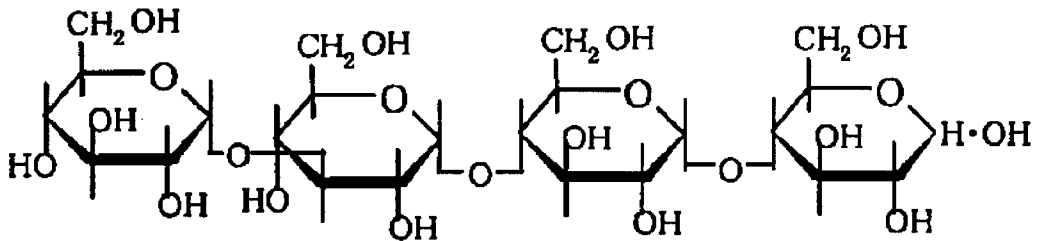
[0010] [化2]



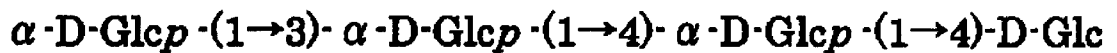
ニゲロシルグルコース



[0011] [化3]



ニゲロシルマルトース



[0012] 3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類は、自体公知の方法に従って容易に製造することができる。具体的には、例えば、ニゲロオリゴ糖は、下記のような公知の方法によって調製することができる。例えば、M. Stacey and J. M. Webber: Methods in Carbohydrate Chemistry, I, 339-341, Academic Press (1962)には、微生物の生産する多糖類である、ニゲランまたはエルシナン等を基質として、酵素または酸類などを用いて加水分解してニゲロオリゴ糖を製造する方法が記載されている。また、公知の α -グルコシダーゼ

の糖転移・縮合反応を用いてニゲロースを調製する方法も知られている(金谷憲一他, 日本農芸化学会誌, 53, 385-390(1979)、H. Fujimoto et al., Agric. Biol. Chem., 52, 1345-1351(1988)など)。更に、特開平3-22958号公報には、澱粉加水分解物に、サイクロデキストリン生成酵素を作用させてニゲロースを製造する方法が開示されている。更にまた、特開平7-59559号公報には、 α -1, 4グルコシド結合したポリサッカライドまたはオリゴサッカライドを含む基質に α -1, 3グルコシド結合をもたらす糖転移酵素(具体的には、Acremonium属に属し、 α -1, 3結合をもたらす糖転移酵素を生産する真菌、例えばAcremonium sp. S4G13(FERM BP-4373)を常法に従い、培養することによって調製される糖転移酵素)を作用させてニゲロオリゴ糖を製造する方法が開示されている。本発明において用いるニゲロオリゴ糖は、いずれの方法で調製されたものでも良く、上記の方法に限定されない。ただし、現在までに知られている方法の中で最も経済的な面で優れていると考えられるのは、上記特開平7-59559号公報に記載された糖転移酵素(ニゲロオリゴ糖生成酵素)を用いた方法であり、本発明においてもこの方法に従って調製したニゲロオリゴ糖を使用するのが好ましい。

[0013] 一方、本発明の免疫機能増強組成物の有効成分である亜鉛は、通常、亜鉛塩(例えば、硫酸亜鉛、硝酸亜鉛、リン酸亜鉛等)として供給される。

有効成分である亜鉛と3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類(以下、単に糖類ともいう。)の含有割合は、特に限定されないが、亜鉛:糖類(例えば、ニゲロオリゴ糖等)の重量比として、例えば、約1:100~5000、好ましくは約1:200~2000、より好ましくは約1:500~1500である。本発明の免疫機能増強組成物は、亜鉛と糖類を自体公知の方法で混合(例えば、攪拌混合等)することにより製造できる。

[0014] 本発明の免疫機能増強組成物を哺乳動物や魚類に投与することによって、哺乳動物や魚類の免疫機能を増強することができる。該哺乳動物としては、ヒトが好ましいが、ヒトに限られることはなく、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等の家畜、ニワトリ等の家禽、イヌ、ネコ等のペット動物であってもよい。該魚類としては、ハマチ等の養殖魚が好ましい。

- [0015] 本発明の免疫機能増強組成物を医薬として用いる場合、経口的にも非経口的にも投与することができる。また、その投与量は、投与対象、投与ルート、患者の状態などにより差異はあるが、例えば、有効成分である糖類の量が、成人一人(体重約60kg)に対して、一日につき、約4mg～40g程度、好ましくは約10mg～20g程度、さらに好ましくは約50mg～10g程度であるのがよい。また、ヒト以外の哺乳動物や魚類に対しても、体重換算して同様の量を投与することができる。
- [0016] 本発明の免疫機能増強組成物を医薬として使用する場合、その剤形は、経口剤(散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤もしくはシロップ剤等)、または坐剤もしくは注射剤等の非経口剤であってもよい。これらの製剤は、自体公知の方法によって製造することができる。
- [0017] また、本発明の免疫機能増強組成物は、それ自体を食品(特に、機能性食品)として、あるいは飲食品または飼料に配合して使用することができる。飲食品としては、例えば、甘味料、菓子、ガム、キャンディ、ゼリー、茶またはジュース等が挙げられ、また飼料としては、ヒト以外の哺乳動物用飼料や魚類用飼料が挙げられる。
- [0018] 本発明の免疫機能増強組成物の飲食品または飼料への配合量は、飲食品または飼料全体に対し、有効成分である糖類の量として、例えば、1～80%(W/W)程度が好ましい。
- [0019] また、本発明の免疫機能増強組成物は、化粧品に配合して使用することもできる。化粧品としては、例えば、外用ローション、外用乳液、外用クリームまたは外用ジェル等が挙げられる。
- [0020] 本発明の免疫機能増強組成物の化粧品への配合量は、化粧品全体に対し、有効成分である糖類の量として、例えば、1～20%(W/W)程度が好ましい。
- [0021] 本発明の免疫機能増強組成物が奏する免疫機能増強作用としては、例えば、免疫担当細胞の代謝活性上昇作用もしくは増殖能上昇作用、またはTリンパ球の代謝活性上昇作用、増殖能上昇作用もしくは細胞死抑制作用等が挙げられる。
- [0022] 本発明の免疫機能増強組成物は、ウイルス、バクテリア等の微生物による感染症、例えば、経口感染によるコレラ菌、毒素原性大腸菌、赤痢菌、サルモネラ、ウイルス等の感染性腸炎や、気道感染によるインフルエンザ、かぜ症候群や、口腔内感染に

よる口内炎、歯周疾患等、また、各種悪性腫瘍、例えば、消化管や呼吸器粘膜、肝・腎等の実質臓器に発生する上皮性悪性腫瘍や、運動器や軟部組織などに発生する非上皮性悪性腫瘍の予防や治療に有効である。

実施例

[0023] 以下に試験例および実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[試験例1]

3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類であるニゲロオリゴ糖と亜鉛を用いて、免疫担当細胞の代謝活性に対するニゲロオリゴ糖と亜鉛の併用効果を検証した。亜鉛は、硫酸亜鉛を蒸留水に溶かした形で用いた。マウス(Balb/c、雌、10週齢)から脾臓を無菌的に摘出し、ストレプトマイシン、ペニシリン(SIGMA社製)を添加したRPMI1640培地(GIBCO社製)中で押しつぶし、#200メッシュに通して免疫担当細胞からなる脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液の細胞数を自動血球計測装置(シスメックス社製:CDA-500)により測定した後、 1×10^7 細胞/mLの濃度になるように上記のRPMI1640培地で調整し、96穴培養プレートに一穴あたり50 μ Lを播種した。播種した細胞液に上記のRPMI1640培地に溶解した細胞増殖刺激因子であるConcanavalin A(SIGMA社製)を最終濃度2.0 μ g/mLとなるように1穴あたり50 μ L添加した。さらに上記のRPMI1640培地に溶解した亜鉛を最終濃度0または1ng/mLになるように、さらに、ニゲロオリゴ糖を最終濃度0または1000ng/mLとなるように各々1穴あたり50 μ Lずつ添加した。このようにして調整した培養用の免疫担当細胞を5%炭酸ガス培養器内にて37°Cで48時間培養した。培養終了後、WST-1(2-(4-インドフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム、モノソジウム塩;同仁化学研究所製)を10mMの濃度になるように0.4mM 1-methoxy PMS(同仁化学研究所製)に溶解した溶液を1穴あたり10 μ L添加し、炭酸ガス培養器内にて3時間培養して生細胞のミトコンドリアの脱水素酵素によりテトラゾリウム塩であるWST-1から水溶性ホルマザンを形成させた。生成したホルマザン濃度を免疫担当細胞の代謝活性の指標とした。ホルマザン濃度は、マイクロプレートリーダー(コ

ロナ電気社製:MTP-32)にて測定波長415nmの吸光度により測定した(参照波長630nm)。その結果を表1に示す。

[0024] [表1]

		亜鉛 (ng/ml)	
		0	1
ニゲロオリゴ糖 (ng/ml)	0	0.800 ± 0.030	0.815 ± 0.013
	1000	0.811 ± 0.008	0.857 ± 0.019*

表1中の数値は、吸光度(415nm)であり、例数3穴の平均値±標準偏差を示す。

*:亜鉛およびニゲロオリゴ糖非添加群に対して有意差あり(ダネットの検定)。

[0025] 表1から明らかなように、免疫機能増強作用を有するニゲロオリゴ糖あるいは亜鉛単独ではマウス免疫担当細胞の代謝活性をほとんど上昇させない条件下で両者を併用すると、細胞代謝活性の有意な上昇が認められた。このような細胞代謝活性の上昇は細胞増殖を大きく反映することが知られており、免疫担当細胞、特にTリンパ球やBリンパ球などのリンパ球の機能発現には細胞増殖が必須であるので、ニゲロオリゴ糖と亜鉛の併用による明らかな免疫機能増強作用が示された。さらに、細胞代謝活性の上昇は細胞死の抑制も反映しており、このような機序を介した当該組成物の免疫増強作用も示された。

[0026] [試験例2]

本試験例では、試験例1と同様にニゲロオリゴ糖と亜鉛を用いて、免疫担当細胞の長期間培養による代謝活性に対するニゲロオリゴ糖と亜鉛の併用効果を検証した。マウス(Balb/c、雌、10週齢)から脾臓を無菌的に摘出し、ストレプトマイシン、ペニシリン(SIGMA社製)を添加したRPMI1640培地(GIBCO社製)中で押しつぶし、#200メッシュに通して免疫担当細胞からなる脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液の細胞数を自動血球計測装置(シスメックス社製:CDA-500)により測定した後、 1×10^7 細胞/mLの濃度になるように上記のRPMI1640培地で調整し、96穴培養プレートに一穴あたり50 μ Lを播種した。播種した細胞液に上記のRPMI1640培地に溶解した細胞増殖刺激因子であるConcanavalin A(SIGMA社製)を最終濃度0.4 μ g/mLとなるように1穴あたり50 μ L添加した。さらに上記のRPMI1640

培地に溶解した亜鉛を最終濃度0または1または2ng/mLになるように、さらに、ニゲロオリゴ糖を最終濃度0または1000ng/mLとなるように各々1穴あたり50 μ Lずつ添加した。このようにして調整した培養用の免疫担当細胞を5%炭酸ガス培養器内にて37°Cで144時間培養した。培養終了後、WST-1(2-(4-インドフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム, モノソジウム塩; 同仁化学研究所製)を10mMの濃度になるように0.4mM 1-metoxypms (同仁化学研究所製)に溶解した溶液を1穴あたり10 μ L添加し、炭酸ガス培養器内にて4.5時間培養して生細胞のミトコンドリアの脱水素酵素によりテトラゾリウム塩であるWST-1から水溶性ホルマザンを形成させた。生成したホルマザン濃度を免疫担当細胞の代謝活性の指標とした。ホルマザン濃度は、マイクロプレートリーダー(コロナ電気社製:MTP-32)にて測定波長415nmの吸光度により測定した(参照波長630nm)。その結果を表2に示す。

[0027] [表2]

		亜鉛 (ng/ml)		
		0	1	2
ニゲロオリゴ糖 (ng/ml)	0	0.772	0.793	0.786
	1000	0.791	0.813	0.827

表2中の数値は、吸光度(415nm)であり、例数3~6穴の平均値を示す。

[0028] 表2から明らかなように、長期間の培養においてニゲロオリゴ糖あるいは亜鉛単独ではマウス免疫担当細胞の代謝活性をほとんど上昇させない条件下で、亜鉛とニゲロオリゴ糖を1対1000あるいは1対500の割合で併用すると亜鉛の濃度依存的に細胞代謝活性の上昇が認められた。すなわち、長期培養におけるマウス免疫担当細胞に対しても当該組成物による免疫増強作用が示された。

[0029] [試験例3]

試験例1と同様にニゲロオリゴ糖と亜鉛を用いて、ヒト末梢血単核球細胞の細胞代謝活性に対するニゲロオリゴ糖と亜鉛の相乗効果を検証した。健常な成人男子より採取した血液20mLをカルシウム・マグネシウム不含リン酸緩衝食塩水(PBS)で2倍

に希釈した後、30mLのFicoll-Paque PLUS (GEヘルスケア バイオサイエンス社製) 上に界面を乱さないように静かに重層し、 $400 \times g$ 、 20°C の条件で40分間遠心分離を行った。遠心後、中間層に存在するリンパ球と単球をパスツールピペットで慎重に回収し、回収した細胞懸濁液を10倍量のPBSで2度洗浄した。得られた単核球細胞の細胞数を自動血球計測装置 (シスメックス社製; CDA-500) により測定した後、 2×10^6 細胞/mLの濃度になるように10%ウシ胎児血清、ストレプトマイシン、ペニシリンを含有するRPMI1640培地で調整し、96穴培養プレートに一穴あたり $50 \mu\text{L}$ を播種した。播種した細胞液に上記のRPMI1640培地に溶解したConcanavalin A (SIGMA社製) を最終濃度 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように1穴あたり $50 \mu\text{L}$ 添加した。さらに上記のRPMI1640培地に溶解した亜鉛を最終濃度0および $10 \text{ng}/\text{mL}$ になるように、さらに、ニゲロオリゴ糖を最終濃度0および $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように各々1穴あたり $50 \mu\text{L}$ ずつ添加した。このようにして調整したヒト末梢血単核球細胞を5%炭酸ガス培養器内にて 37°C で48時間培養した。培養終了後、WST-1 (同仁化学研究所製) を 10mM の濃度になるように 0.4mM 1-methoxy PMS (同仁化学研究所製) に溶解した溶液を1穴あたり $10 \mu\text{L}$ 添加し、炭酸ガス培養器内にて1.5時間培養して生細胞のミトコンドリアの脱水素酵素によりテトラゾリウム塩であるWST-1から水溶性ホルマザンを形成させた。生成したホルマザン濃度をヒト末梢血単核球細胞の代謝活性の指標とした。ホルマザン濃度は、マイクロプレートリーダー (コロナ電気社製: MTP-32) にて測定波長 415nm の吸光度により測定した (参照波長 630nm)。その結果を表3に示す。

[0030] [表3]

		亜鉛 (ng/ml)	
		0	10
ニゲロオリゴ糖 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	0.350 ± 0.005	0.348 ± 0.003
	10	0.358 ± 0.007	$0.367 \pm 0.012^*$

表3中の数値は、吸光度 (415nm) であり、例数3穴の平均値 \pm 標準偏差を示す。

*: 亜鉛およびニゲロオリゴ糖非添加群に対して有意差あり (ダネットの検定)。

[0031] 表3から明らかなように、ニゲロオリゴ糖あるいは亜鉛単独ではヒト免疫担当細胞の代謝活性をほとんど上昇させないような条件下で、亜鉛とニゲロオリゴ糖を1対1000の割合で併用すると細胞代謝活性の有意な上昇が認められた。すなわち、ヒト末梢血単核球細胞を用いた実験においてもニゲロオリゴ糖と亜鉛からなる組成物の免疫機能増強作用が示された。

[0032] [実施例1]

下記表4に記載の配合量にて、1錠あたりの重量が700mgとなるように、各原料をよく混合した後、打錠して錠剤を製造した。

[0033] [表4]

成分	配合量（重量％）
ニゲロオリゴ糖	1.4
硫酸亜鉛（亜鉛として）	0.07
乳糖	8.1
結晶セルロース	1
タルク	4

[0034] [実施例2]

下記表5に記載の配合量にて各原料をよく混合し、粉末状の乳牛用濃厚飼料を製造した。

[0035] [表5]

成分	配合量（重量％）
ニゲロオリゴ糖	10
硫酸亜鉛（亜鉛として）	0.005
大麦圧ペン	20
ふすま	23
とうもろこし圧ペン	15
大豆粕	9
大豆皮	9
加熱大豆	7
綿実	7

[0036] [実施例3]

下記表6に記載の配合量にて、1粒あたりの重量が5gとなるように、各原料をよく混合した後、ソフトキャンディーを製造した。

[0037] [表6]

成分	配合量（重量％）
ニゲロオリゴ糖	8
硫酸亜鉛（亜鉛として）	0.008
グラニュー糖	9
水飴	20
牛乳	50
生クリーム	9
フォンダントクリーム	3.5
シュガーエステル	0.5

産業上の利用可能性

[0038] 本発明の免疫機能増強組成物は、3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類または亜鉛をそれぞれ単独で使用する時よりも顕著に優れた免疫機能増強作用を発揮する。

請求の範囲

- [1] 亜鉛および3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類を有効成分とすることを特徴とする免疫機能増強組成物。
- [2] 糖類が、ニゲロース、ニゲロシルグルコースおよびニゲロシルマルトースのうち少なくとも1種を含有するニゲロオリゴ糖であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の免疫機能増強組成物。
- [3] 亜鉛とニゲロオリゴ糖の重量比が、1:200~2000であることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の免疫機能増強組成物。
- [4] 免疫機能増強が、免疫担当細胞の代謝活性上昇作用であることを特徴とする請求の範囲第1項~第3項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。
- [5] 免疫機能増強が、免疫担当細胞の増殖能上昇作用であることを特徴とする請求の範囲第1項~第3項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。
- [6] 免疫機能増強が、Tリンパ球の代謝活性上昇作用であることを特徴とする請求の範囲第1項~第3項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。
- [7] 免疫機能増強が、Tリンパ球の増殖能上昇作用であることを特徴とする請求の範囲第1項~第3項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。
- [8] 免疫機能増強が、Tリンパ球の細胞死抑制作用であることを特徴とする請求の範囲第1項~第3項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。
- [9] 医薬または食品である請求の範囲第1項~第8項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物。
- [10] 請求の範囲第1項~第8項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物を配合してなることを特徴とする食品。
- [11] 請求の範囲第1項~第8項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物を配合してなることを特徴とする飼料。
- [12] 請求の範囲第1項~第8項のいずれかに記載の免疫機能増強組成物を配合してなることを特徴とする化粧品。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311910

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/702(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L1/304(2006.01)i, A61K8/27(2006.01)i, A61K8/60(2006.01)i, A61K31/7016(2006.01)i, A61K33/30(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/702, A23L1/30, A23L1/304, A61K8/27, A61K8/60, A61K31/7016, A61K33/30, A61P37/04, A61P43/00</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), CA (STN), CPlus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN), JMEDPlus (JDream2), JSTPlus (JDream2)</p>														
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">Y</td> <td>JP 2002-80364 A (Takeda Food Products, Ltd.), 19 March, 2002 (19.03.02), Claims; Par. Nos. [0002], [0007] (Family: none)</td> <td align="center">1-12</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td>JP 09-52834 A (Takeda Food Products, Ltd.), 25 February, 1997 (25.02.97), Claims; Par. Nos. [0009] to [0017], [0020] to [0022] & JP 3396129 B2</td> <td align="center">1-10</td> </tr> <tr> <td align="center">Y</td> <td>MUROSAKI, S. et al., Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(2), pp.373-378, Figs. 1 to 3, page 375, left column, line 37 to page 376, right column, line 7</td> <td align="center">1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	JP 2002-80364 A (Takeda Food Products, Ltd.), 19 March, 2002 (19.03.02), Claims; Par. Nos. [0002], [0007] (Family: none)	1-12	Y	JP 09-52834 A (Takeda Food Products, Ltd.), 25 February, 1997 (25.02.97), Claims; Par. Nos. [0009] to [0017], [0020] to [0022] & JP 3396129 B2	1-10	Y	MUROSAKI, S. et al., Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(2), pp.373-378, Figs. 1 to 3, page 375, left column, line 37 to page 376, right column, line 7	1-9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	JP 2002-80364 A (Takeda Food Products, Ltd.), 19 March, 2002 (19.03.02), Claims; Par. Nos. [0002], [0007] (Family: none)	1-12												
Y	JP 09-52834 A (Takeda Food Products, Ltd.), 25 February, 1997 (25.02.97), Claims; Par. Nos. [0009] to [0017], [0020] to [0022] & JP 3396129 B2	1-10												
Y	MUROSAKI, S. et al., Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(2), pp.373-378, Figs. 1 to 3, page 375, left column, line 37 to page 376, right column, line 7	1-9												
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>														
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:50%;"> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%;"> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>										
<p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>													
<p>Date of the actual completion of the international search 06 September, 2006 (06.09.06)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 12 September, 2006 (12.09.06)</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>												
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/311910

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-512966 A (Sudzucker AG.), 08 May, 2002 (08.05.02), Claims; Par. No. [0033] & WO 99/55342 A1 & US 6139864 A & EP 1079839 A1 & EP 1079839 B1	1-12
Y	Yasuaki ARAKAWA, "Biryo Genso kara Mita Seitai Kino to sono Ijo", Biomed.Res.Trace.Elements., 1995, 6(3), pages 135 to 136, page 135, right column, lines 12 to 37	1-12
Y	Flynn, A., In vitro levels of copper, magnesium and zinc required for mitogen stimulated T lymphocyte proliferation. Nutr. Res., 1985, 5, pages 487 to 495, Table 1	1-12

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K31/702(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L1/304(2006.01)i, A61K8/27(2006.01)i, A61K8/60(2006.01)i, A61K31/7016(2006.01)i, A61K33/30(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K31/702, A23L1/30, A23L1/304, A61K8/27, A61K8/60, A61K31/7016, A61K33/30, A61P37/04, A61P43/00</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年</p>											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>BIOSIS(STN), BIOTECHABS(STN), CA(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), REGISTRY(STN), JMEDPlus(JDream2), JSTPlus(JDream2)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2002-80364 A (武田食品工業株式会社), 2002.03.19, 【特許請求の範囲】, 【0002】, 【0007】 (ファミリーなし)</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 09-52834 A (武田食品工業株式会社), 1997.02.25, 【特許請求の範囲】, 【0009】-【0017】, 【0020】-【0022】 & JP 3396129 B2</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	Y	JP 2002-80364 A (武田食品工業株式会社), 2002.03.19, 【特許請求の範囲】, 【0002】, 【0007】 (ファミリーなし)	1-12	Y	JP 09-52834 A (武田食品工業株式会社), 1997.02.25, 【特許請求の範囲】, 【0009】-【0017】, 【0020】-【0022】 & JP 3396129 B2	1-10
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
Y	JP 2002-80364 A (武田食品工業株式会社), 2002.03.19, 【特許請求の範囲】, 【0002】, 【0007】 (ファミリーなし)	1-12									
Y	JP 09-52834 A (武田食品工業株式会社), 1997.02.25, 【特許請求の範囲】, 【0009】-【0017】, 【0020】-【0022】 & JP 3396129 B2	1-10									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>06.09.2006</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p>12.09.2006</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>川口 裕美子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>									

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MUROSAKI, S., et al. Immunopotentiating activity of nigerooligosaccharides for the T helper 1-like immune response in mice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(2), pp.373-378, Fig.1-3, 第 375 頁左欄第 37 行-第 376 頁右欄第 7 行	1 - 9
Y	JP 2002-512966 A (シューズッカー アクティエンゲゼルシャフト), 2002.05.08, 【特許請求の範囲】, 【0033】 & WO 99/55342 A1 & US 6139864 A & EP 1079839 A1 & EP 1079839 B1	1 - 1 2
Y	荒川泰昭, 微量元素からみた生体機能とその異常, Biomed. Res. Trace. Elements., 1995, 6(3), pp.135-136, 第 135 頁右欄第 12-37 行	1 - 1 2
Y	Flynn, A., In vitro levels of copper, magnesium and zinc required for mitogen stimulated T lymphocyte proliferation. Nutr. Res., 1985, 5, pp.487-495, Table 1	1 - 1 2