

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-526444
(P2014-526444A)

(43) 公表日 平成26年10月6日(2014.10.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	C 4 B 0 1 8
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 C 0 8 8
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-528810 (P2014-528810)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月10日 (2012. 9. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月7日 (2014. 5. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2012/000832
 (87) 国際公開番号 W02013/033828
 (87) 国際公開日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (31) 優先権主張番号 61/532, 808
 (32) 優先日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511216569
 フェデラシオン デ プロダクテュール
 アセリコール デュ ケベック
 FEDERATION DES PROD
 UCTEURS ACERICOLES
 DU QUEBEC
 カナダ国 ケベック ジェイ4エイチ 4
 ジー5 ロンゲール プールバード ロー
 ランド テリン 555 メゾン ド ラ
 ユーピーエイ
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニュートリプロテクティブダイエット

(57) 【要約】

本書類は、糖料植物シロップ、糖料植物シロップ抽出物、糖料植物抽出物、またはそれらの組合せのもののニュートリプロテクティブ量を含む、ニュートリプロテクティブダイエットを記載する。また本書類は、対象体におけるニュートリプロテクティブ効果を引き出す方法を記載し、それには、本発明に従うニュートリプロテクティブダイエットのニュートリプロテクティブ量を管理することが含まれる。また、本書類はさらに、本発明に従うニュートリプロテクティブダイエットのニュートリプロテクティブ量を施すことによって、障害を有する対象体を処置する方法を記載する。また、本書類は、吸着剤物質を使用して、メープルシロップからポリフェノール化合物を抽出するためのプロセス、およびそれから得られる抽出物を記載する。

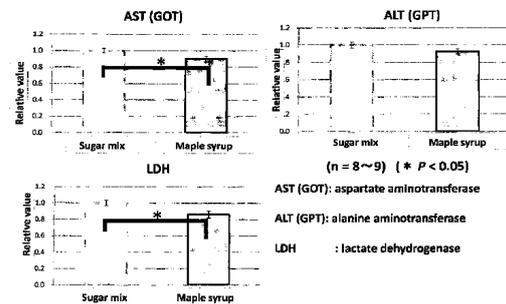


Fig. 3

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖料植物シロップ、糖料植物シロップ抽出物、糖料植物抽出物、植物抽出の廃棄物、またはそれらの組合せのニュートリプロテクティブ量を含む、ニュートリプロテクティブダイエット。

【請求項 2】

糖料植物シロップの前記ニュートリプロテクティブ量は、少なくとも1%の糖料植物シロップで最大99%の糖料植物シロップまでである、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 3】

糖料植物シロップの前記ニュートリプロテクティブ量は、少なくとも10%の糖料植物シロップで最大70%の糖料植物シロップまでである、請求項 2 に従うダイエット。

10

【請求項 4】

糖料植物シロップの前記ニュートリプロテクティブ量は20%の糖料植物シロップである、請求項 2 に従うダイエット。

【請求項 5】

糖料植物シロップ抽出物の前記ニュートリプロテクティブ量は約0.0010%から約0.15%までの糖料植物シロップ抽出物である、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 6】

糖料植物シロップ抽出物の前記ニュートリプロテクティブ量は約0.0020%から約0.10%までの糖料植物シロップ抽出物である、請求項 1 に従うダイエット。

20

【請求項 7】

糖料植物シロップ抽出物の前記ニュートリプロテクティブ量は約0.0027%から約0.1023%までの糖料植物シロップ抽出物である、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 8】

前記糖料植物シロップには、糖料植物シロップ由来生成物が含まれる、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 9】

前記糖料植物シロップ由来生成物には、バター、グラニュー糖、硬化糖、ソフトシュガー（粉末糖）、タフィー、糖料植物シロップろ過残留物、プロダクト生成の廃棄物、またはそれらの組合せが含まれる、請求項 8 に従うダイエット。

30

【請求項 10】

前記糖料植物抽出物には、逆浸透から生じる濃縮糖料植物水、プレ沸騰ナノろ過から生じる濃縮糖料植物水、パステライズ糖料植物水、滅菌糖料植物水、樹液からの抽出物、濃縮樹液、糖料植物シロップ、シロップろ過残留物、サマラ、果実、種子、茎、葉、枝、根、ハートウッド、サップウッド、およびパーク、前記抽出物のいずれか一つの調製物からの廃棄物残さ、またはそれらの組合せが含まれる、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 11】

前記糖料植物は、メープルツリー、カバノキ、サトウキビ、テンサイ、コーン、イネ、ヤシノキ、およびアゲープからなる群より選ぶことができる、請求項 1 に従うダイエット。

40

【請求項 12】

前記糖料植物はメープルツリーである、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 13】

前記糖料植物シロップ抽出物は、メタノール抽出物、ブタノール抽出物、糖を伴うブタノール抽出物、糖を伴わないブタノール抽出物、エチルアセタート抽出物、エタノール抽出物、メチルターシャリーブチルエーテル抽出物、樹脂精製されたメープルシロップ抽出物（MSX）、またはそれらの組合せから選ばれる、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 14】

前記糖料植物シロップ抽出物は肝保護効果を有する、請求項 1 に従うダイエット。

【請求項 15】

50

前記ブタノール抽出物は肝保護効果を有する、請求項 1 3 に従うダイエット。

【請求項 1 6】

請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に従うダイエットのニュートリプロテクティブ量を管理することを含む、対象体におけるニュートリプロテクティブ効果を引き出す方法。

【請求項 1 7】

前記ニュートリプロテクティブ効果はニュートリセラピーまたは肝保護効果である、請求項 1 6 に請求する方法。

【請求項 1 8】

前記肝保護効果には、肝臓の細胞アミノ酸代謝におけるダウンレギュレーションが含まれる、請求項 1 7 に請求する方法。

【請求項 1 9】

前記肝保護効果には、アンモニア形成酵素の肝生産におけるダウンレギュレーションが含まれる、請求項 1 7 に請求する方法。

【請求項 2 0】

前記肝保護効果には、アスパルタートアミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および/またはラクタートデヒドロゲナーゼ (LDH) の対象体しょう液レベルにおけるダウンレギュレーションが含まれる、請求項 1 7 に請求する方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に従うダイエットのニュートリプロテクティブ量を管理することを含む、障害を有する対象体の処置方法。

【請求項 2 2】

前記障害には、肝障害、炎症性疾患、癌、糖尿病、心血管疾患、神経変性疾患、および記憶障害が含まれる、請求項 2 1 に従う方法。

【請求項 2 3】

前記肝障害には、メタボリックシンドローム、損傷肝機能、ヘパティック酸肝、脂質異常症、肝炎および肝癌が含まれる、請求項 2 2 に従う方法。

【請求項 2 4】

対象体における障害の処置用の薬を調製するための、請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に従うニュートリプロテクティブダイエットの使用。

【請求項 2 5】

対象体における障害を処置するための請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に従うニュートリプロテクティブダイエットの使用。

【請求項 2 6】

前記障害には、肝障害、炎症性疾患、癌、糖尿病、心血管疾患、神経変性疾患、および記憶障害が含まれる、請求項 2 4 または 2 5 に従う使用。

【請求項 2 7】

前記肝障害には、メタボリックシンドローム、損傷肝機能、ヘパティック酸肝、脂質異常症、肝炎および肝癌が含まれる、請求項 2 6 に従う使用。

【請求項 2 8】

製薬上および栄養補助上の化合物、機能性食物、および自然健康生産物からなる群より選ばれる少なくとも一つのダイエタリーサプリメントの相乗的な取込みおよび/または管理のために、糖料植物シロップ、糖料植物シロップ抽出物、糖料植物抽出物、またはそれらの組合せを含む、ニュートリプロテクティブキャリアー。

【請求項 2 9】

前記キャリアーは、飲用液体、エナジードリンク、治療上の飲料、およびタンパク質リッチ飲料から選ばれる、請求項 2 8 のキャリアー。

【請求項 3 0】

前記キャリアーは前記ダイエタリーサプリメント上のコーティングである、請求項 2 8 のキャリアー。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

製薬上および栄養補助上の化合物、機能性食物、および自然健康生産物からなる群より選ばれる少なくとも一つのダイエタリーサプリメントを、請求項 2 8 のキャリアーと組み合わせて施すことを含み、前記キャリアーは同時に、または前記サプリメントに先立って施される、受動体における障害を予防または処置する方法。

【請求項 3 2】

a) 吸着剤物質でその上に吸着したメープルシロップポリフェノールフラクションを有するものと、有機溶媒とを、前記メープルシロップポリフェノールフラクションを溶出させ、そして収集するために、十分な時間の間、および十分な回数にわたり接触させることを含む、メープルシロップからポリフェノール化合物を抽出するためのプロセス。

10

【請求項 3 3】

前記十分な時間は約30分である、請求項 3 2 のプロセス。

【請求項 3 4】

前記十分な回数は約1回乃至約3回である、請求項 3 2 のプロセス。

【請求項 3 5】

ステップa) に先立ち、メープルシロップ混合物は、前記吸着剤物質上に、前記ポリフェノールフラクションが前記吸着剤物質上に吸着するのに十分な時間の間、吸着され、前記混合物には、水において希釈されるメープルシロップが含まれる、請求項 3 2 のプロセス。

【請求項 3 6】

前記ポリフェノールフラクションを吸着するのに十分な前記時間は、約12乃至約20時間である、請求項 3 5 のプロセス。

20

【請求項 3 7】

前記ポリフェノールフラクションを吸着するのに十分な前記時間は、約16時間である、請求項 3 6 のプロセス。

【請求項 3 8】

さらに前記吸着剤物質上への吸着に先立って水においてメープルシロップを希釈するステップを含む、請求項 3 5 のプロセス。

【請求項 3 9】

さらにステップa) に先立って前記吸着剤物質を水で洗浄するステップを含む、請求項 3 5 のプロセス。

30

【請求項 4 0】

さらにステップb)、すなわち

b) 前記有機溶媒を蒸発させ、および乾燥ポリフェノールフラクションを得るために、前記収集ポリフェノールフラクションを加熱することを含む、請求項 3 2 のプロセス。

【請求項 4 1】

加熱は約37 乃至約40 の温度である、請求項40のプロセス。

【請求項 4 2】

前記有機溶媒は、メタノール、エチルアセタート、ブタノール、エタノール、メチルターシャリーブチルエーテル、およびそれらの組合せから選ばれる、請求項 3 2 乃至 4 1 のいずれか一項のプロセス。

40

【請求項 4 3】

前記吸着剤物質は、Amberlite™ XAD-4、Amberlite™XAD-2、Amberlite™ XAD-7、Amberlite™ XAD 7HP、Amberlite™XAD16、Amberlite™ XAD16HP、Amberlite™ XAD761、Amberlite™XAD1180、Amberlite™ XAD1600、Amberlite™ XFS-4257、Amberlite™XFS-4022、Amberlite™ XUS-40323、Amberlite™ XUS-40322、Amberlite™FPX66、Amberlite™強アニオン交換 (SAX)、Amberlite™ WAX、ペンタフルオロフェニル誘導体化シリカゲル、HLB (疎水性-親脂性バランスの) タイプのSIL1aPrepX™相、シリカ上の強アニオン交換 (SAX) 樹脂、混合モード強アニオン交換 (SAX) -C₁₈、水性C₁₈相、C₁₈相、C₁₈タイプSIL1a

50

PrepX™相、珪藻土から選ばれる、請求項 3 2 乃至 4 2 のいずれか一項のプロセス。

【請求項 4 4】

さらにステップ a) に先立ち、前記メープルシロップからの糖の抽出のために、固体の混合物での抽出が含まれる、請求項 3 2 のプロセス。

【請求項 4 5】

固体の混合物での前記抽出には、MgSO₄、NaCl、および固形吸収剤での抽出が含まれる、請求項 4 4 のプロセス。

【請求項 4 6】

固形吸収剤は、アミノ化シリカ樹脂、C₁₈シリカ樹脂、またはその組合せから選ばれる、請求項 4 4 のプロセス。

【請求項 4 7】

さらにステップ a) に先立ち、前記メープルシロップの液-液抽出が含まれる、請求項 3 2 のプロセス。

【請求項 4 8】

前記液-液抽出には、エチルアセタート抽出、ブタノール抽出、またはその組合せ、次いで約85%の二酸化ケイ素 (SiO₂) および約15%の酸化マグネシウム (MgO) の比を有するSiO₂/MgO固相上での吸着が含まれる、請求項 4 7 のプロセス。

【請求項 4 9】

請求項 3 2 乃至 4 8 のいずれか一項のプロセスから得られる抽出物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

【0002】

この出願は、2011年9月9日付け出願の、米国仮特許出願第61/532808号による優先権を請求し、ここに参照することによりその詳細を組み込む。

【0003】

背景

【0004】

(a) 分野

本書類は、糖料植物シロップ、糖料植物シロップ抽出物、糖料植物抽出物、糖料植物抽出の廃棄物、またはそれらの組合せのもののニュートリプロテクティブ量を含む、ニュートリプロテクティブダイエットを説明する。また本書類は、対象体においてニュートリプロテクティブ効果を引き出す方法を説明し、それには、本発明に従うニュートリプロテクティブダイエットのニュートリプロテクティブ量を管理することが含まれる。また、本書類はさらに、本発明に従うニュートリプロテクティブダイエットのニュートリプロテクティブ量を施すことによって、障害を有する対象体を処置する方法を説明する。また、本書類は、吸着物質を使用して、メープルシロップからポリフェノール化合物を抽出するためのプロセス、およびそれから得られる抽出物を説明する。

【0005】

(b) 関連先行技術

【0006】

メープルシロップ (MS) は、味の良い甘味料として消費される自然甘味料で、北米を原産とするシュガーメープル [Acer saccharum (サトウカエデ)] を含む一定のメープル種から収集される樹液を濃縮することによって得られる。世界中の子供たち、大人および高齢者でも多数によって好まれる非常に人気のあるフードである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

異なる集団のダイエットおよびライフスタイルは、癌や他の疾患のそれらの率を決定す

10

20

30

40

50

ることがあるという認識のもと、ますます多くの人々は、MSのような天然物において、それがまた、かれらの健康のためによいという見込みから、それらの摂取量を増やそうと試みる。

【0008】

肝疾患または肝機能不全は、たとえば、（真性）糖尿病などのようなあらゆる生活習慣病において密接に関与することが知られている。加えて、低下した肝機能は老化の主要な原因として指摘されている。近代では、そこに、人々は、器官に有害な活性酸素種を増加させる多くの要因、たとえば、タバコ、アルコール、高脂肪ダイエット（食事、食餌）およびストレスのようなものに曝露され、人々が肝機能を損傷する傾向にある環境で生きていると言える。毎日の食事は、メタボリックシンドローム（代謝異常症候群）を含む生活習慣病を予防するための重要な鍵である。肝臓保護機能を有する食物の継続摂取が、それらの予防のために有望でありうる。

10

【0009】

肝疾患は、それらの原因に応じて、ウイルス性肝疾患、アルコール性肝疾患、薬物毒性による肝疾患、脂肪肝疾患、自己免疫性肝疾患、代謝性肝疾患および他の肝疾患に分類される。肝疾患は、自覚症状がないために初期の段階での診断が困難であり、それで多くの国における死亡の主因である。しかしながら、肝疾患のための有効な治療上の薬剤および診断方法は依然として存在しない。

【0010】

肝疾患の予防および処置のための天然材料の使用に関する多くの研究が実行されている。そのような自然素材の典型的な例には、*Silybum marianum*（マリアアザミ、オオアザミ）の種子から分離されるシリマリン、*Schizandra chinensis*（チョウセンゴミン）から分離されるゴミン、カンゾウ（根）から分離されるグリシリジン、および同様な他のものが含まれる。もっとも、どれも、MSの使用に関連しない。

20

【0011】

人体の化学的工場である肝臓は、それが直接我々の食物摂取により影響を受ける。MSの世界的な人気、そしてメープルシロップ含有ダイエットの健康促進効果に関して利用可能な科学的な証拠がないという事実を考慮すると、MSの機能のさらなる知識は、肝疾患などのような生活習慣病の予防に役立つであろう。

【課題を解決するための手段】

30

【0012】

概略

【0013】

実施形態に従い、糖料植物シロップ、糖料植物シロップ抽出物、糖料植物抽出物、植物抽出の廃棄物（rejection）、またはそれらの組合せのニュートリプロテクティブ量を含む、ニュートリプロテクティブダイエットを提供する。

【0014】

糖料植物シロップのニュートリプロテクティブ量は、少なくとも1%の糖料植物シロップで最大99%の糖料植物シロップまでであることができる。

【0015】

糖料植物シロップのニュートリプロテクティブ量は、少なくとも10%の糖料植物シロップで最大70%の糖料植物シロップまででありうる。

40

【0016】

糖料植物シロップのニュートリプロテクティブ量は20%の糖料植物シロップでありうる。

【0017】

糖料植物シロップ抽出物のニュートリプロテクティブ量は約0.0010%から約0.15%までの糖料植物シロップ抽出物であることができる。

【0018】

糖料植物シロップ抽出物のニュートリプロテクティブ量は約0.0020%から約0.10%まで

50

の糖料植物シロップ抽出物であってよい。

【0019】

糖料植物シロップ抽出物のニュートリプロテクティブ量は約0.0027%から約0.1023%までの糖料植物シロップ抽出物であってよい。

【0020】

糖料植物シロップは糖料植物シロップ由来生成物 (derived product) であることができる。糖料植物シロップ由来生成物は、バター、グラニュー糖、硬化糖 (hardened sugar)、ソフトシュガー (粉末糖)、タフィー、糖料植物シロップろ過残留物、プロダクト生成 (生成物発生) の廃棄物、またはそれらの組合せであってよい。

【0021】

糖料植物抽出物は、逆浸透から生じる濃縮糖料植物水、プレ沸騰ナノろ過から生じる濃縮糖料植物水、パスチャライズ (低温殺菌) 糖料植物水、滅菌糖料植物水および樹液、濃縮樹液からの抽出物、糖料植物シロップ、シロップろ過残留物、サマラ (翼果)、果実、種子、茎、葉、枝、根、ハートウッド (心材)、サップウッド (辺材)、およびパーク (皮)、抽出物のいずれか一つの調製物からの廃棄物残さ、またはそれらの組合せであることができる。

【0022】

糖料植物は、メープルツリー (カエデ、モミジ)、カバノキ、サトウキビ、テンサイ、コーン (トウモロコシ)、イネ、ヤシノキ、およびアゲープ (リュウゼツラン) から選ぶことができる。

【0023】

糖料植物シロップ抽出物は、メタノール抽出物、ブタノール抽出物、糖を伴うブタノール抽出物、糖を伴わないブタノール抽出物、エチルアセタート (酢酸エチル) 抽出物、エタノール抽出物、メチルターシャリー (tert-) ブチルエーテル抽出物、樹脂精製されたメープルシロップ抽出物 (MSX)、またはそれらの組合せから選ぶことができる。

【0024】

糖料植物シロップ抽出物は肝保護効果を有しうる。

【0025】

ブタノール抽出物は肝保護効果を有することができる。

【0026】

第2の実施形態において、対象体におけるニュートリプロテクティブ効果を引き出す方法を開示し、それには、本発明に従うダイエットのニュートリプロテクティブ量を管理する (施す) ことが含まれる。

【0027】

ニュートリプロテクティブ効果はニュートリセラピーまたは肝保護効果でありうる。

【0028】

肝保護効果は、肝臓の細胞アミノ酸代謝におけるダウンレギュレーション (下方制御) であることができる。

【0029】

肝保護効果は、アンモニア形成酵素の肝生産におけるダウンレギュレーションであることができる。

【0030】

肝保護効果には、アスパルタート (アスパラギン酸) アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および/またはラクタート (乳酸) デヒドロゲナーゼ (LDH) の対象体しょう液 (血清) レベルにおけるダウンレギュレーションが含まれうる。

【0031】

第3の実施形態において、障害を有する対象体の処置方法を開示し、それには、本発明に従うダイエットのニュートリプロテクティブ量を管理することが含まれる。

【0032】

10

20

30

40

50

障害は、肝障害、炎症性疾患、癌、糖尿病、心血管疾患、神経変性疾患、および記憶障害でありうる。

【0033】

肝障害は、メタボリックシンドローム（代謝症候群）、損傷肝機能（damaged hepatic function）、ヘパティック酸肝（hepatic acid liver）、脂質異常症、肝炎および肝癌でありうる。

【0034】

別の実施形態において、対象体における障害の処置用の薬を調製するために、本発明に従うニュートリプロテクティブダイエットの使用を開示する。

【0035】

別の実施形態において、対象体における障害を処置するために、本発明に従うニュートリプロテクティブダイエットの使用を開示する。

【0036】

障害は、肝障害、炎症性疾患、癌、糖尿病、心血管疾患、神経変性疾患、および記憶障害でありうる。

【0037】

肝障害は、メタボリックシンドローム、損傷肝機能、ヘパティック酸肝、脂質異常症、肝炎および肝癌でありうる。

【0038】

別の実施形態において、製薬上および栄養補助上（pharmaceutical and nutraceutical）の化合物、機能性食料（functional food）、および自然健康生産物（natural health products）からなる群より選ばれる少なくとも一つのダイエタリーサプリメントの相乗的な取込みおよび/または管理のために、糖料植物シロップ、糖料植物シロップ抽出物、糖料植物抽出物、またはそれらの組合せを含む、ニュートリプロテクティブキャリアを開示する。

【0039】

キャリアーは、飲用液体、エナジードリンク、治療上の飲料、およびタンパク質リッチ（豊富）飲料から選ばれうる。

【0040】

キャリアーはダイエタリーサプリメント上のコーティングでありうる。

【0041】

別の実施形態に従い、受動体における障害を予防または処置する方法を提供し、それには、製薬上および栄養補助上の化合物、機能性食物、および自然健康生産物からなる群より選ばれる少なくとも一つのダイエタリーサプリメントを、本発明のキャリアーと組み合わせて施すことが含まれ、キャリアーは同時に、またはサプリメントに先立って施される。

【0042】

実施形態に従い、メープルシロップからポリフェノール化合物を抽出するためのプロセスを提供し、それには、

a) 吸着剤物質（adsorbent material）でその上に吸着したメープルシロップポリフェノールフラクション（画分）を有するものと、有機溶媒とを、前記メープルシロップポリフェノールフラクションが溶出し、そして収集されるために、十分な時間の間、および十分な回数にわたり接触させることが含まれうる。

【0043】

十分な時間は約30分であることができる。

【0044】

十分な回数は約1回乃至約3回でありうる。

【0045】

本発明のプロセスでは、ステップa)に先立ち、メープルシロップ混合物は、前記吸着

10

20

30

40

50

剤物質上に、前記ポリフェノールフラクションが前記吸着剤物質上に吸着するのに十分な時間の間、吸着され、前記混合物には、水において希釈されるメープルシロップが含まれる。

【0046】

ポリフェノールフラクションを吸着するのに十分な時間は、約12乃至約20時間でありうる。

【0047】

ポリフェノールフラクションを吸着するのに十分な時間は、約16時間でありうる。

【0048】

本プロセスは、さらに吸着剤物質上への吸着に先立って水においてメープルシロップを希釈するステップを含むことができる。

10

【0049】

本プロセスは、さらにステップa)に先立って吸着剤物質を水で洗浄するステップを含むことができる。

【0050】

本プロセスは、さらにステップb)、すなわち

2)有機溶媒を蒸発させ、および乾燥ポリフェノールフラクションを得るために、収集ポリフェノールフラクションを加熱することを含むことができる。

【0051】

加熱は約37 乃至約40 の温度である。

20

【0052】

有機溶媒は、メタノール、エチルアセタート、ブタノール、エタノール、メチルターシャリーブチルエーテル、およびそれらの組合せから選ばれる。

【0053】

吸着物質は、Amberlite™(「アンバーライト」商品名)XAD-4、Amberlite™ XAD-2、Amberlite™ XAD-7、Amberlite™XAD 7HP、Amberlite™ XAD16、Amberlite™ XAD16HP、Amberlite™XAD761、Amberlite™ XAD1180、Amberlite™ XAD1600、Amberlite™XFS-4257、Amberlite™ XFS-4022、Amberlite™ XUS-40323、Amberlite™XUS-40322、Amberlite™ FPX66、Amberlite™強アニオン交換(SAX)、Amberlite™ WAX、ペンタフルオロフェニル誘導体化シリカゲル、HLB(疎水性-親脂性バランスの)タイプのSIL1aPrepX相、シリカ上の強アニオン交換(SAX)樹脂、混合モード強アニオン交換(SAX)-C₁₈、水性C₁₈相、C₁₈相、C₁₈タイプSIL1aPrepX™相、珪藻土から選ぶことができる。

30

【0054】

本プロセスは、さらにステップa)に先立ち、メープルシロップからの糖(シュガー)の抽出のために、固体の混合物での抽出を含むことができる。

【0055】

固体の混合物での抽出には、MgSO₄、NaCl、および固形吸収剤(solid absorbent)での抽出が含まれる。

【0056】

固形吸収剤は、アミノ化シリカ樹脂、C₁₈シリカ樹脂、またはその組合せから選ぶことができる。

40

【0057】

本プロセスには、さらにステップa)に先立ち、前記メープルシロップの液-液抽出を含むことができる。

【0058】

液-液抽出には、エチルアセタート抽出、ブタノール抽出、またはその組合せ、次いで約85%の二酸化ケイ素(SiO₂)および約15%の酸化マグネシウム(MgO)の比を有するSiO₂/MgO固相上での吸着を含むことができる。

【0059】

50

実施形態に従い、本発明のプロセスから得られる抽出物を提供する。

【0060】

下記に以下の用語を定義する。

【0061】

用語「糖料植物」は、メープルツリー（カエデ、モミジ）、カバノキ、サトウキビ（カンショ）、テンサイ（サトウダイコン）、コーン（トウモロコシ）、イネ、ヤシノキ（シユロノキ）、およびアゲープ（リュウゼツラン）を意味することを意図する。

【0062】

用語「メープルツリー」は、現在まで知られている種のメープルツリーを意味することを意図し、たとえば、*Acer nigrum*（アセル・ニグラム、ブラックメープル）、*Acer lanu* 10
m、*Acer acuminatum*、*Acer albopurpurascens*、*Acer argutum*、*Acer barbinerve*、*Acer b*
uergerianum、*Acer caesium*、*Acer campbellii*、*Acer campestre*、*Acer capillipes*、*Ace*
r cappadocicum、*Acer carpinifolium*、*Acer caudatifolium*、*Acer caudatum*、*Acer cinn*
amomifolium、*Acer circinatum*、*Acer cissifolium*、*Acer crassum*、*Acer crataegifoliu*
m、*Acer davidii*、*Acer decandrum*、*Acer diabolicum*、*Acer distylum*、*Acer divergens*
 、*Acer erianthum*、*Acer erythranthum*、*Acer fabri*、*Acer garrettii*、*Acer glabrum*、*A*
cer grandidentatum、*Acer griseum*、*Acer heldreichii*、*Acer henryi*、*Acer hyrcanum*、
Acer ibericum、*Acer japonicum*、*Acer kungshanense*、*Acer kweilinense*、*Acer laeviga*
tum、*Acer laurinum*、*Acer lobelii*、*Acer lucidum*、*Acer macrophyllum*、*Acer mandshur*
icum、*Acer maximowiczianum*、*Acer miaoshanicum*、*Acer micranthum*、*Acer miyabei*、*Ac* 20
er mono、*Acer mono x Acer truncatum*、*Acer monspessulanum*、*Acer negundo*、*Acer nin*
gpoense、*Acer nipponicum*、*Acer oblongum*、*Acer obtusifolium*、*Acer oliverianum*、*Ac*
er opalus、*Acer palmatum*、*Acer paxii*、*Acer pectinatum*、*Acer pensylvanicum*、*Acer*
pentaphyllum、*Acer pentapomicum*、*Acer pictum*、*Acer pilosum*、*Acer platanoides*、*Ac*
er poliophyllum、*Acer pseudoplatanus*、*Acer pseudosieboldianum*、*Acer pubinerve*、*A*
cer pycnanthum、*Acer rubrum*、*Acer rufinerve*、*Acer saccharinum*、*Acer saccharum*、*A*
cer sempervirens、*Acer shirasawanum*、*Acer sieboldianum*、*Acer sinopurpurens*、*A*
cer spicatum、*Acer stachyophyllum*、*Acer sterculiaceum*、*Acer takesimense*、*Acer ta*
taricum、*Acer tegmentosum*、*Acer tenuifolium*、*Acer tetramerum*、*Acer trautvetteri*
 、*Acer triflorum*、*Acer truncatum*、*Acer tschonoskii*、*Acer turcomanicum*、*Acer ukur* 30
unduense、*Acer velutinum*、*Acer wardii*、*Acer x peronai*、*Acer x pseudoheldreichii*
 またはまだ知られていない任意の新種のようなものである。

【0063】

用語「糖料植物シロップ」は糖料植物シロップおよび糖料植物シロップ誘導生成物、たとえば、バター、樹液バター、グラニュー糖、硬化糖（hardened sugar）、ソフトシュガー（粉末糖）、タフィー、砂糖植物シロップろ過残留物、およびプロダクト生成のなんらかの廃棄物などのようなものを意味することが意図される

【0064】

用語「糖料植物抽出物」は、樹液、サマラ（翼果）、果実、種子、茎、葉、枝、根、ハートウッド（心材）、サップウッド（辺材）、バーク（皮）からの抽出物、ならびに逆浸 40
 透から生じる濃縮糖料植物水、プレ沸騰ナノろ過から生じる濃縮糖料植物水、パステライズ（低温殺菌）糖料植物水、および滅菌糖料植物水を意味することが意図される。

【0065】

用語「糖料植物シロップ抽出物」は、メタノール抽出物、ブタノール抽出物、糖を伴うブタノール抽出物、糖を伴わないブタノール抽出物、エチルアセタート抽出物、エタノール抽出物、メチルターシャリーブチルエーテル抽出物、精製樹脂抽出物から得られる抽出物、またはそれらの組合せを意味することが意図される。

【0066】

用語「ニュートリプロテクティブ」は、対象体における任意の障害または疾患のニュー 50
 トリプロテクティブおよびニュートリセラピーを意味することを意図し、制限されないが

、肝障害、炎症性疾患、癌、糖尿病、心血管疾患および神経変性疾患が含まれ、そこでは、肝臓の場合に、それは「ヘパトプロテクティブ（肝保護）」と称される。

【0067】

用語「ダイエタリーサプリメント」はまた、糖料植物抽出物またはその合成等価物、薬用化粧品、製薬上および栄養補助上の化合物、機能性食物、自然健康生産物を意味することが意図される。

【0068】

用語「肝保護」は、肝臓の損傷を防止する能力を有するダイエット、化合物、組成物、方法、処置のいずれか一つを意味することが意図される。

【0069】

添付の図に示すように、本文書の主題の特色および利益は、選ばれた実施形態の以下の詳細な説明に照らし、より一層明らかになるであろう。当然ながら、開示され、およびクレームされた主題は、すべてが請求の範囲から離れることなく、様々な点において修飾が可能である。したがって、図面および説明は、本質的に例示として見なされるべきであり、そして制限としてではなく、および主題のすべての範囲は請求の範囲に述べられる。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】試験した対象体についてのダイエットスケジュールおよび生物学的試料分析法を示す。

【図2】試験した対象体の体重および総食物摂取を示す。

【図3】対象体の血液生化学を示す。

【図4】DNAマイクロアレイデータ解析の方法を示す。

【図5】階層的クラスタ化を示す。

【図6】アミノ酸メタボライジング（代謝）酵素のダウンレギュレーション（下方制御）された遺伝子を示す。

【図7】セリン/トレオニン（スレオニン）デヒドラターゼおよびヒスチジンアンモニアリアーゼのようなアンモニア形成酵素の細胞アミノ酸代謝プロセスのダウンレギュレーションを示す。

【図8】ここに記載する調査の実験的設計を示す。

【図9】ここに記載する調査の生化学的測定分析を示す。

【図10】ここに記載する調査の生化学的測定分析を示す。

【図11】ここに記載する調査の生化学的測定分析を示す。

【図12】ここに記載する調査の生化学的測定分析の概要を示す。

【図13】ここに記載するDNAマイクロアレイ分析のデータを示す。

【図14】ここに記載するマイクロアレイ分析の解析ストラテジーを示す。

【図15】ここに記載するマイクロアレイ分析の機能的解析を示す。

【図16】ここに記載する分析で観察された脂質代謝関連遺伝子を示す。

【図17】ここに記載する分析で観察された炎症および免疫関連遺伝子を示す。

【図18】ここで実行する機能的解析の概要を示す。

【図19】インスリンシグナル伝達経路に対するMSEダイエットの効果を示す。

【図20】インスリン受容体ベータサブユニットに対するMSEの効果を示す。

【図21】インスリン受容体基質2に対するMSEの効果を示す。

【図22】プロテインキナーゼB（Akt）に対するMSEの効果を示す。

【図23】肝臓のシグナル伝達および関連する表現型に対するMSEの効果の概要を示す。

【図24】KK-Ayマウスの肝臓代謝に対するMSE摂取の効果の予想作用機序を示す。

【図25】ここに記載する調査の実験的設計を示す。

【図26】ここに記載する調査の実験結果を示す。

【図27】ここに記載する調査の実験結果を示す。

【図28】ここに記載する調査の実験結果を示す。

【図29】ここに記載する調査の実験結果を示す。

10

20

30

40

50

【図30】ここに記載する調査の実験結果を示す。

【図31】今後の研究の実験的設計を示す。

【発明を実施するための形態】

【0071】

好適実施形態の詳細な説明

【0072】

メープルシロップ生成物（ミディアムグレード）は、多少茶色がかった色で、the Federation of Maple Syrup Producers of Quebec（ケベック州のメープルシロップ生産者連盟）（Quebec、カナダ）によって提供される。それは、33%水、61.0%スクロース（ショ糖）、0.5%グルコース（ブドウ糖）、0.3%フルクトース（果糖）、1.8%糖（サッカリド）（オリゴ糖および多糖類）、0.40%のタンパク質誘導化合物、0.25%ミネラル、0.15%有機酸、0.10%ビタミン、0.02%フェノール化合物、0.002%アミノ酸、および0.0001%植物ホルモンからなる。

10

【0073】

三週齢の雄性ウイスター（Wistar）ラットは、平均で約51gの重さがあり、Charles River Japan（チャールス・リバー・ジャパン）（神奈川、日本）から購入する。それらを、検疫し、そしてAIN93Gダイエット（食餌）〔Research Diets（リサーチダイエット）、New Brunswick（ニューブランズウィック）、ニュージャージー州、米国〕の投与により以下の条件：温度、 24 ± 1 ；相対湿度 $48 \pm 4\%$ ；および人工照明、12時間/日（8:00-20:00）で4日間コンディショニングする。

20

【0074】

ラットを、この順化期間中、ダイエットおよび飲料水を自由に摂取させた。フィーディング（給餌）試験のため、それぞれ、メープルシロップおよび糖ミックスシロップのグループのために、それらを二分し（ $n=7$ および 8 ）、そしてその後、20%メープルシロップ含有のAIN93Gダイエットを、または同様の糖組成の20%糖ミックスシロップを11日間与える（図1）。メープルシロップまたは糖混合シロップの量を、各ダイエットにおいて添加されたショ糖およびコーンデンプンの量を考慮することによりアレンジする。その後、双方のダイエット群において、ラットを、解剖のために麻酔作用により犠牲にする前に16時間絶食させる。直後に、Nagahama Life Science Laboratory（長浜ライフサイエンス研究所）（滋賀県、日本）による次の生化学的研究のために、血液試料を各ラットの頸動脈から採取する。

30

【0075】

なんらの有意なダイエット差も、合計食物摂取または経時的体重増加のいずれでも観察されない（図2）。ラットがメープルシロップだけでなく、なんら感覚上拒否せずにシミュレートされた糖ミックスシロップを好んだことは注目すべきである。メープルシロップ含有のダイエット（食餌）を与えられたラットの血清生化学的パラメーターは、コントロールを与えたものと比較したとき、血清グルコース、総コレステロールおよびトリグリセリドのレベルにおいて有意な差を示さなかった。これらの代謝パラメーターは互いに類似するが、アスパルタート（アスパラギン酸）アミノトランスフェラーゼ（AST）アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）およびラクタート（乳酸）デヒドロゲナーゼ（LDH）の血清レベルにおいて重要な違いが肝障害マーカーとして存在する（図3）。特に、ASTおよびLDHにおいて有意な減少がある（ $P<0.05$ ）（表1）。

40

【0076】

【表1】

表1. 研究した血清生化学的パラメーター[†]

	シュガーミックスシロップ	メープルシロップ
AST, IU/L	219.4 ± 9.5	185.6 ± 10.1*
ALT, IU/L	35.5 ± 2.3	31.9 ± 1.6
LDH, IU/L	3079.5 ± 173.8	2478.0 ± 179.1*
グルコース, mg/dL	51.0 ± 7.1	51.7 ± 4.5
総コレステロール, mg/dL	73.0 ± 3.4	80.2 ± 5.1
トリグリセリド, mg/dL	66.1 ± 15.5	56.1 ± 9.8

値は平均±SEMとしてシュガーミックスシロップおよびメープルシロップにおいてそれぞれn=8およびn=7について表す。

[†] AST、アスパルタートアミノトランスフェラーゼ；ALT、アラニンアミノトランスフェラーゼ；LDH、ラクタートデヒドロゲナーゼ。

* P<0.05、ダイエット差の間について

10

20

【0077】

全体のRNAサンプルは肝臓から調製され、そして6つの無作為化されたサンプルはGeneChip Rat Genome (ジーンチップ・ラットゲノム) 230 2.0アレイ [Affymetrix (アフィメトリックス社)、Santa Clara (サンタ・クララ)、CA (カリフォルニア州)、USA (アメリカ合衆国)] を用いて、マイクロアレイ分析に供する。得られたマイクロアレイデータ (CELファイル) は、統計的言語Rand Bioconductor (ランド・バイオコンダクター) を使用して分布によらない加重法 (distribution free weighted method) (DFW) により定量する。

30

【0078】

すべてのマイクロアレイデータを、the National Center for Biotechnology Information (国立バイオテクノロジー情報センター) (NCBI) Gene Expression Omnibus (遺伝子発現情報データベース (GEOシリーズID GSE30532)) に提出する。遺伝子発現に対するメープルシロップの具体的な効果を決定するために、二群間で異なって発現された遺伝子 (DEGS) を、ランクプロダクト (RP) メソッドを、DFW定量化データに適用することにより識別する。

【0079】

偽発見率 (FDR) 有意性<0.05を用い、246のアップレギュレーション (上方制御) および236のダウンレギュレーション (下方制御) された遺伝子を選ぶ。DEGsにおいて大きな比率を占めるGene Ontology (ジーンオントロジー) (GO) タームを識別するために、アノテーション (注釈付け)、ビジュアライゼーション (視覚化)、およびインテグレートッド・ディスカバリー (統合発見) (DAVID) およびQuickGO (クイックGO) のためにデータベースにおいて機能的なアノテーションツールを用いる。Benjamini (ベンジャミニ) およびHochberg (ホッホバーグ) のFDR修正された0.05より低いP値を有するGOタームは、有意に富んでいるとみなされる。メープルシロップの摂取によりアップ-またはダウン-レギュレーションされる遺伝子について、そのようなGOタームを表2および図5および6に要約する。

40

【0080】

50

【表2】

表2. トップ246アップ-(A)および236ダウンレギュレートド(B)遺伝子の間に識別された有意に豊富化されたGOターム (FDR修正されたP値<0.05)

A		
GO_ID	ターム	FDR修正されたP値
0050896	刺激に対する反応	2.63E-02
0065007	生物学的調節	
0065008	生物学的特質の調節	
0010817	ホルモンレベルの調節	1.54E-01
0042445	ホルモン代謝プロセス	2.97E-02
0008152	代謝プロセス	3.18E-01
0055114	オキシ酸還元プロセス	
0044237	細胞代謝プロセス	
0006082	有機酸代謝プロセス	3.02E-02
0043436	オキシ酸代謝プロセス	3.70E-02
0019752	カルボン酸代謝プロセス	3.70E-02
0042180	細胞ケトン代謝プロセス	2.91E-02
0044281	小分子代謝プロセス	
0002376	免疫系プロセス	
0019882	抗原プロセッシングおよび提示	2.33E-01
0048002	抗原プロセッシングおよびペプチド抗原の提示	1.23E-01
0002474	抗原プロセッシングおよびMHCクラスIによるペプチド抗原の提示	4.48E-02

B		
GO_ID	ターム	FDR修正されたP値
0050896	刺激に対する反応	7.59E-02
0042221	化学的刺激に対する反応	3.65E-02
0002376	免疫系プロセス	
0019882	抗原プロセッシングおよび提示	1.55E-02
0019740	窒素利用	
0009308	アミン代謝プロセス	7.75E-02
0009310	アミン異化プロセス	3.20E-02
0009987	細胞プロセス	
0044106	細胞アミン代謝プロセス	3.67E-02
0006520	細胞アミノ酸代謝プロセス	3.83E-02
0019752	カルボン酸代謝プロセス	7.21E-03
0043436	オキシ酸代謝プロセス	7.21E-03
0042180	細胞ケトン代謝プロセス	3.29E-03
0006082	有機酸代謝プロセス	3.97E-03
0044237	細胞代謝プロセス	8.52E-01
0044248	細胞異化プロセス	3.96E-02
0009056	異化プロセス	6.51E-02
0008152	代謝プロセス	6.81E-01

P値を伴わないGOタームは有意でないことを示す。最も深い階層を表すカテゴリーのFDR修正P値は影付けする。

10

20

30

40

【0081】

アップレギュレートGOタームは、抗原プロセッシング 提示 (プレゼンテーション)、カルボン酸 (アミノ酸を含む) の代謝、酸化還元、ホルモン代謝、および外部刺激に対する反応 (表2A)、ならびに転写、グルタミンファミリーアミノ酸代謝プロセス、有機物質に対する反応、薬物に対する反応の負の調節を含み、それに対し、ダウンレギュレートGOタームには、アミンの異化、細胞アミノ酸代謝、アスパラギン酸 (アスパラギン酸) ファミリー酸代謝プロセス、抗原プロセッシング 提示および化学的刺激に対する反応が含まれる (表2B)。

【0082】

50

細胞アミノ酸代謝プロセスのための遺伝子は、ダウンレギュレーションされ、セリン/トレオニンデヒドラターゼおよびヒスチジンアンモニアラーゼのようなアンモニアを形成する酵素のためのものが含まれることに注目される(図6-7)。概して、体内での遊離アンモニアの過剰形成は、肝臓に有害であり、AST、ALTおよびLDHの増加した値をもたらされる。

【0083】

若干のケースで、20%カゼインダイエットの投与が、セリン/トレオニンデヒドラターゼを活性化することが報告されている。トレオニンは、代謝し難いアミノ酸として知られており、そしてそれは、カゼインと一緒に摂取されたとき、より一層良好に代謝されえ、2-オキソ酪酸およびアンモニアの産生のためトレオニンデヒドラターゼ活性の誘導が導かれる。AIN93Gダイエットにおいて、カゼインの高含量(20%)は、おそらく、アンモニアを遊離するセリン/トレオニンデヒドラターゼの活性を高めることがある(図6-7)。

10

【0084】

この酵素のための遺伝子がメープルシロップの投与によってダウンレギュレートされたとき、強化が相殺される可能性がある。他方、ASTのために遺伝子のmRNAレベルがダウンレギュレートされる。これはまた、血清ASTのダウンレギュレーションに関連すべきである。本文書は、摂取したメープルシロップの体の保護効果の一部を説明する最初のものである。

【0085】

実施形態では、カナディアンメープルシロップ(MS)から、およびメープルツリー〔例は、レッド(アメリカハナノキ)、シルバー(ウラジロサトウカエデ)、またはシュガーマープル〕からのフェノール抽出物および化合物を開示する。化合物および抽出物は、それらの肝保護特性のために使用することができる。

20

【0086】

他の実施形態では、クロマトグラフィー法を用いてカナディアンメープルシロップ(MS)のブタノール抽出物から分離(単離)した、二十三のフェノール化合物を開示する。これらの化合物は、それらの核磁気共鳴および質量スペクトルデータから七つのリグナンとして識別される。

【0087】

リオニレシノール(1)、セコイソラリシレシノール(2)、デヒドロコニフェリルアルコール(3)、5'-メトキシ-デヒドロコニフェリルアルコール(4)、エリスロ-グアイアシルグリセロール-3-0-4'-コニフェリルアルコール(5)、エリスロ-グアイアシルグリセロール-3-0-4'-ジヒドロコニフェリルアルコール(6)、および[3-[4-[(6-デオキシ-L-マンノピラノシル)オキシ]-3-メトキシフェニル]メチル]-5-(3,4-ジメトキシフェニル)ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-(ヒドロキシメチル)-2(3H)-フラノン(7)；

30

【0088】

二つのクマリン：スコボレチン(8)およびフラキセチン(9)；

【0089】

スチルベン：(E)-3,3'-ジメトキシ-4,4'-ジヒドロキシスチルベン(10)、および

【0090】

十三のフェノール誘導体：2-ヒドロキシ-3',4'-ジヒドロキシアセトフェノン(11)、1-(2,3,4-トリヒドロキシ-5-メチルフェニル)-エタノン(12)、2,4,5-トリヒドロキシアセトフェノン(13)、カテクアルデヒド(catechaldehyde)(14)、バニリン(15)、シリングアルデヒド(16)、没食子酸(17)、トリメチル没食子酸メチルエステル(18)、シリング酸(19)、シリングニン(20)、(E)-コニフェロール(21)、C-フェラトロイルグリコール(veratroylglycol)(22)、およびカテコール(23)。

40

【0091】

MS抽出物、純粋な化合物、ビタミンC($IC_{50}=58\mu M$)、および合成の商業上の酸化防止剤、ブチル化ヒドロキシルエン($IC_{50}=2651\mu M$)の抗酸化活性を、ジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル捕捉アッセイにおいて評価する。分離物の中で、フェノール

50

誘導体およびクマリンは、リグナンおよびスチルベン ($IC_{50} > 100 \mu M$) と比較して優れた抗酸化活性 ($IC_{50} < 100 \mu M$) を示した。

【0092】

概略的な実験手順

【0093】

1H および ^{13}C 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、Bruker (ブルカー) TMの400MHzまたはVarian (バリアン) TMの500 MHzの装置のいずれかで、重水素化メタノール (CD3OD) を溶媒として使用して得られる。エレクトロスプレーイオン化質量スペクトル (ESIMS) データは、Turbo Ionspray (ターボ・イオンスプレー) 供給源を備えたQ-Star Elite (スター・エリート) [Applied Biosystems MDS (アプライド・バイオシステムズMDS)] 質量分析計で取得され、そして純粋な化合物の直接注入により得られる。分析用の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、L2130ポンプ、L-2200オートサンプラー、およびL-2455 Diode Array Detector (ダイオード・アレイ・デテクター) からなり、それらのすべてはEZChrom (EZクロム) TMElite (エリート) ソフトウェアによって操作されるHitachi Elite LaChrom (ヒタチ・エリート・ラクロム) TMシステム上で実行する。セミ調製用スケールのHPLCを、Beckman System Gold (ベックマン・システム・ゴールド) TM126溶剤モジュールポンプ、168フォトダイオードアレイ (PDA) -UV/VIS検出器、および508オートサンプラーからなり、それらのすべてが32 Karat (カラット) 8.0ソフトウェアにより操作されるBeckman-Coulter HPLC (ベックマン・クーラーHPLC) システム上で実行する。すべての溶媒は、ACSまたはHPLCグレードのどちらかであり、およびWilkem Scientific (ウィルケム・サイエンティック) [Pawcatuck (ポーカタック)、RI (ロードアイランド州)] から入手される。アスコルビン酸 (ビタミンC)、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、およびジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) 試薬は、Sigma-Aldrich (シグマ・アルドリッチ社) [St Louis (セントルイス)、MO (ミズーリ州)] から購入する。

10

20

【0094】

メープルシロップ (MS) ブタノール抽出

【0095】

メープルシロップ (グレードC、20L) は、the Federation of Maple Syrup Producers of Quebec (ザ・フェデレーション・オブ・メープル・シロップ・プロデューサーズ・オブ・ケベック) (カナダ国) によって提供される。シロップは、それを、酢酸エチル (10 L x 3)、次いでn-ブタノール (10L x 3) 溶剤で、液液パーティショニング (液液分配) に供されるときに抽出するまで凍結保存され、酢酸エチル (4.7g) およびブタノール (108g) 抽出物を、それぞれ、真空中で溶媒を除去した後に産生する。

30

【0096】

分析用HPLC

【0097】

すべての分析はLuna (ルナ) C18カラム [250 x 4.6mm内径、5 μ M; Phenomenex (フェノメネクス)] 上で0.75mL/分の流速および20 μ Lの注入量で行う。溶媒A (0.1%トリフルオロ酢酸水溶液) および溶媒B (メタノール、MeOH) からなるグラジエント溶媒系を、以下のように用いる。すなわち、0-10分、10%乃至15%B; 10-20分、15%B; 20-40分、15%乃至30%B; 40-55分、30%乃至35%B; 55-65分、35%B; 65-85分、35%乃至60%B; 85-90分、60%乃至100%B; 90-93分、100%B; 93-94分、100%乃至10%B; 94-104分、10%B。図1Aおよび1Bは、それぞれ、ブタノール抽出物および単離されたフェノール類のすべて (一つの溶液/注入に組み合わせる) のHPLC-UVプロファイルを示す。

40

【0098】

MSブタノール抽出物からの化合物の分離

【0099】

ブタノール抽出物 (108g) を、メタノール可溶性 (57g; 暗褐色粉末) およびメタノール不溶性 (51g、オフホワイト粉末) のフラクション (分画) を与えるためにメタノール (100mL x 3) で抽出する。メタノール可溶性抽出物の分析用HPLC分析は、220、280および

50

360nmでのフェノール性化合物の多数のピーク特徴を明らかにした（方法論の詳細について上記を参照；クロマトグラムについては図1Aを参照）。したがって、このフラクション（画分）を、さらに精製するために、Sephadex（セファデックス）TMLH-20カラム（4.5 × 64cm）上での繰り返しクロマトグラフィー、MeOH : H₂O（3:7v/v乃至7:3v/v乃至100:0v/v）での、および次いでアセトン : H₂O（7:3v/v）での勾配システムによる溶出によって選ぶ。分析用HPLCプロファイル、十二の組み合わせたフラクションに基づき、Fr.（フラクション）1-12が得られる。Fr.4（1.5g）を、十二のサブフラクション、Fr.4.1-4.12が与えられるように、SephadexTMLH-20カラム（4.5 × 64cm）上でMeOH : H₂O（3:7v/v乃至7:3v/v）の勾配溶媒システムを用いてカラムクロマトグラフィーに供する。これらを個々に、Waters Sunfire Prep（ウォーターズ・サンファイア・プレップ）TMC₁₈カラム（250 × 10 mm 内径、5 μm ; 2mL/分の流れ）を用い、そしてMeOH : H₂O勾配システムで溶出するsemi-prep（セミ調製）HPLC分離の系列に供し、化合物1（4.6mg）、3（3.8mg）、5（4.0mg）、6（4.1.6mg）、7（6.6mg）、11（3.5mg）、15（0.3mg）、16（0.8mg）、18（0.2mg）、20（1.3 mg）、22（1.5mg）および23（3.0mg）を産出する。同様に、Fr. 5（0.47g）を、Waters X Bridge Prep（ウォーターズ・Xブリッジ・プレップ）C₁₈カラム（250 × 19mm内径、5 μm ; 3.5mL/分の流れ）およびMeOH : H₂O勾配溶媒系を用い、セミ調製HPLCによって精製し、サブフラクションFr.5.1-5.4を与える。これらのサブフラクションを別に、セミ調製HPLCおよび/またはSephadexTMLH-20カラムクロマトグラフィーとMeOH : H₂Oの勾配溶媒系との組合せに供し、化合物2（1.9mg）、4（1.9mg）、8（2.0mg）、9（2.3mg）、14（2.5mg）、17（2.4mg）、19（1.8mg）および21（1.3mg）を与える。同様に、Fr.6（0.2g）は、化合物12（1.4mg）および13（1.3mg）を与え、そしてFr.11は化合物10（4.8mg）を産生した。

10

20

【 0 1 0 0 】

MS酢酸エチル抽出物からの化合物の分離

【 0 1 0 1 】

メイプルシロップ（グレードC、20L）は、the Federation of Maple Syrup Producers of Quebec（カナダ国）によって提供される。シロップ（20L）は、それが酢酸エチル（10 L × 3）、続いてn-ブタノール（10L × 3）溶媒を用いて液 - 液パーティショニングを施され、酢酸エチル（4.7g）およびブタノール（108mg）の抽出物がそれぞれ、真空中で溶媒を除去した後に産生されるとき、抽出されるまで、冷凍庫（-20 °C）に保存される。酢酸エチル抽出物（4.7g）は、XAD-16、シリカゲル、SephadexTMLH-20、およびC-18カラムクロマトグラフィーを用いたクロマトグラフィーによる分離手順の系列に供される。これらのカラムから得られるセミ精製（Semi-purified）フラクションは、さらに二十の純粋な化合物を得るために調製用HPLCに供される。

30

【 0 1 0 2 】

化合物の識別

【 0 1 0 3 】

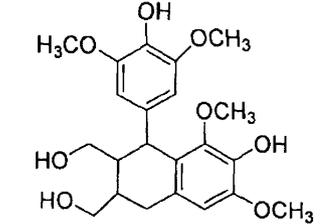
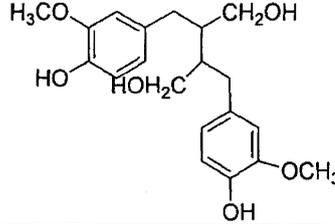
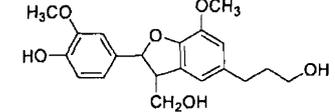
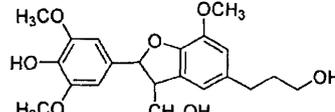
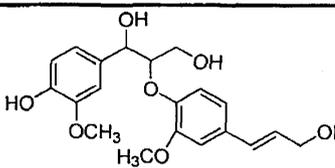
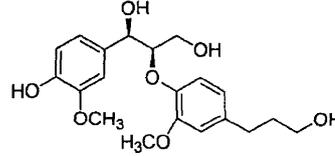
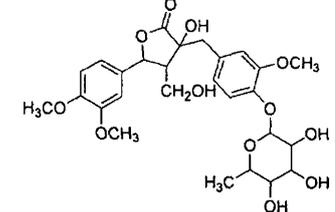
分離した化合物のすべてを、それらの¹Hおよび/または¹³C NMRおよび質量スペクトルデータの検査によって、および利用可能なとき、これらを刊行された文献報告書と比較することにより識別される（表3）。化合物7、12、および13についてのNMRデータをここに提供する。

40

【 0 1 0 4 】

【表 3 - 1】

カナディアンメープルシロップ (MS) のブタノール抽出物で識別された化合物

	確認	構造
1	リオニレシノール	
2	セコイソラリシレシノール	
3	デヒドロコニフェリルアルコール	
4	5'-メトキシデヒドロコニフェリルアルコール	
5	グアイアシルグリセロール-β-0-4'- コニフェリルアルコール (1,3-プロパンジオール, 1-(4-ヒドロキシ-3- メトキシフェニル)-2-[4-[(1E)-3-ヒドロキシ-1- プロペニル]-2-メトキシフェノキシ]-, (1R,2R)-)	
6	グアイアシルグリセロール-β-0-4'- ジヒドロコニフェリルアルコール 1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2- [4-(3-ヒドロキシプロピル)-2-メトキシ フェノキシ]-プロパン-1,3-ジオール	
7	[3-[4-[(6-デオキシ-α-L-マンノピラノシル) オキシ]-3-メトキシフェニル]メチル]-5- (3,4-ジメトキシフェニル) ジヒドロ-3- ヒドロキシ-4-(ヒドロキシメチル)-2(3H)- フラノン	

10

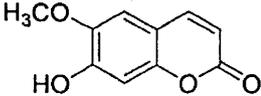
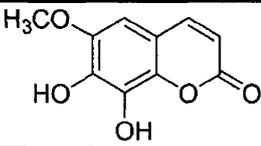
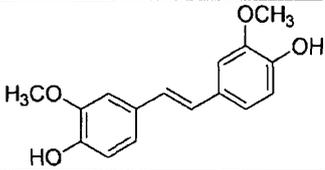
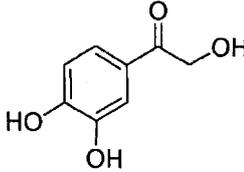
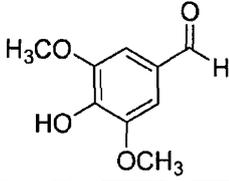
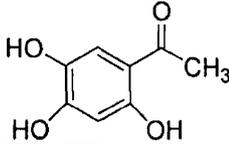
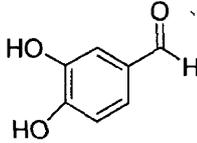
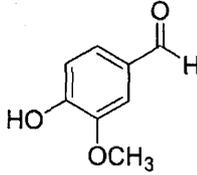
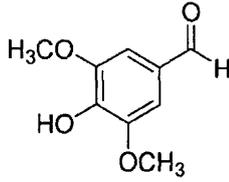
20

30

40

【表 3 - 2】

表 3 (つづき)

8	スコポレチン	
9	フラキセチン	
10	(E)-3,3'-ジメトキシ-4,4'-ジヒドロキシルスチルベン	
11	2-ヒドロキシ-3',4'-ジヒドロキシアセトフェノン	
12	1-(2,3,4-トリヒドロキシ-5-メチルフェニル)-エタノン	
13	2,4,5-トリヒドロキシアセトフェノン	
14	カテクアルデヒド	
15	バニリン	
16	シリングアルデヒド	

10

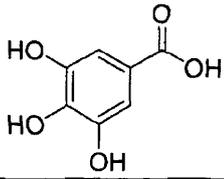
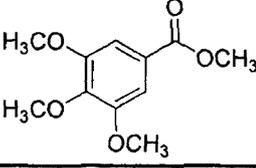
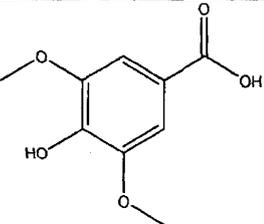
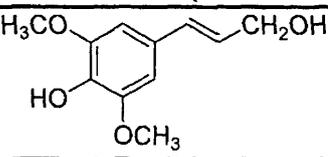
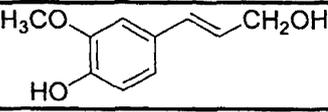
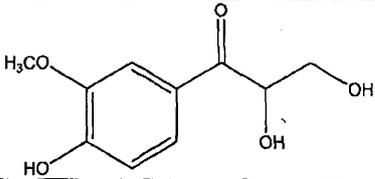
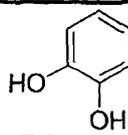
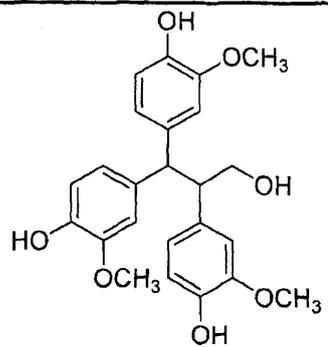
20

30

40

【表 3 - 3】

表 3 (つづき)

17	没食子酸		
18	トリメチル没食子酸メチルエステル		10
19	シリング酸		
20	シリンゲニン		20
21	(E)-コニフェロール		
22	C-ベラトロイルグリコール		30
23	カテコール		
54	クエベコール		40

【0105】

別の実施形態では、メイプルシロップの酢酸エチル抽出物 (MS-EtOAc) から得られた三十のフェノール類を開示する。

【0106】

化学薬品および試薬。すべての溶媒は、ACSまたはHPLCグレードであり、そしてWillem

10

20

30

40

50

Scientific (Pawcatuck, RI) を介して、Sigma-Aldrich から得られる。Sephadex LH-20、アスコルビン酸、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、およびジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) 試薬は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入する。

【 0 1 0 7 】

メープルシロップ酢酸エチル (MS-EtOAc 酢酸エチル) 化合物の抽出および分離。メープルシロップ (グレードC、20L) は、the Federation of Maple Syrup Producers of Quebec (カナダ国) によって提供される。メープルシロップは凍結して出荷され、および配送時に保存されている。メープルシロップは、真空中で溶媒を除去した後に乾燥酢酸エチル抽出物 (MS-EtOAc; 4.7g) を得るために、酢酸エチル (10L x 3) での液液パーティショニングに供する。MS-EtOAc (4.5g) を、最初に、MeOH/H₂O の勾配系 (3:7 乃至 1:0、v/v) を伴うセファデックス LH-20 カラム (4 x 65cm) 上で精製し、七つの画分 A1-A7 を与える。画分 A1 (2.08g) を、次に MeOH/H₂O の勾配系 (3:7 乃至 1:0、v/v) により溶出する C18 MPLC カラム (4 x 37cm) にてクロマトグラフィーにかけ、十六のサブフラクション、B1- B16 を与える。これらのサブフラクションは、個々に、Phenomenex Luna C18 カラム (250 x 10mm 内径、5 μm、流量=2mL/分) を MeOH/H₂O の異なるアイソクラティック (定組成) 溶出システムと共に用いて、セミ調製 HPLC 分離の系列に供し、化合物 25 (0.9mg)、26 (2.5mg)、27 (0.8mg)、28 (0.5mg)、29 (17.5mg)、730 (0.7mg)、31 (1.1mg)、32 (3.9mg)、33 (1.1mg)、34 (2.1mg)、35 (2.8mg)、36 (3.2mg)、38 (2.4mg)、39 (5.2mg)、40 (0.8mg)、および 53 (0.5mg) を与える。同様に、フラクション A3 (0.71g) は、Waters XBridge Prep C18 カラム (250 x 19mm 内径、5 μm; 流量=3.5mL/分) および MeOH/H₂O の勾配溶媒系を使用したセミプレパラティブ (セミ調製用) HPLC によって精製し、四つのサブフラクション C1-C4 を与える。これらのサブフラクションを別々に、セミ調製用 HPLC に、MeOH/H₂O のアイソクラティック溶剤システムと共に供し、化合物 24 (2.2mg)、37 (4.5mg)、42 (4.5mg)、43 (2.2mg)、44 (4.2mg)、50 (3.7mg)、および 51 (1.1mg) を与える。同様に、フラクション A4 (0.097g) を、セミ調製用 HPLC により精製し、化合物 41 (1.4mg)、45 (2.6mg)、46 (8.0mg)、47 (0.4mg)、および 49 (3.2mg) を与え、およびサブフラクション A5 (0.022g) は化合物 48 (3.6mg) および 52 (1.1mg) をもたらした。

【 0 1 0 8 】

10

20

【表4】

表4

カナディアンメープルシロップの酢酸エチル抽出物 (MS-EtOAc) から分離した全体の化合物

化合物	確認
1	リオニレシノール
2	セコイソラリシレシノール
6	1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-[4-(3-ヒドロキシプロピル)-2-メトキシフェノキシ]- -プロパン-1,3-ジオール(グアイアシルグリセロール-β-0-4' -ジヒドロコニフェリルアルコール)
8	スコボレチン
22	C-ベラトロイルグリコール
24	5-(3'', 4'' -ジメトキシフェニル)-3-ヒドロキシ-3-(4-ヒドロキシ-3' -メトキシベンジル)-4- ヒドロキシメチル-ジヒドロフラン-2-オン*
25	(エリスロ, エリスロ)-1-[4-[2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1- (ヒドロキシメチル)エトキシ]-3,5-ジメトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール*
26	(エリスロ, トレオ)-1-[4-[2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1- (ヒドロキシメチル)エトキシ]-3,5-ジメトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール*
27	(トレオ, エリスロ)-1-[4-[2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1- (ヒドロキシメチル)エトキシ]-3-メトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール ^a
28	(トレオ, トレオ)-1-[4-[2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1- (ヒドロキシメチル)エトキシ]-3-メトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール ^a
29	トレオ-グアイアシルグリセロール-β-0-4' -ジヒドロコニフェリルアルコール
30	エリスロ-1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-[4-(3-ヒドロキシプロピル)-2,6- ジメトキシフェノキシ]-1,3-プロパンジオール ^a
31	2-[4-[2,3-ジヒドロ-3-(ヒドロキシメチル)-5-(3-ヒドロキシプロピル)-7-メトキシ-2-ベンゾフラニル]- -2,6-ジメトキシフェノキシ]-1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1,3-プロパンジオール
32	アセルニコール
33	レプトレピソールD ^a
34	ブッドレノールE ^a
35	(1S, 2R)-2-[2,6-ジメトキシ-4-[(1S, 3aR, 4S, 6aR)-テトラヒドロ-4-(4-ヒドロキシ-3,5- ジメトキシフェニル)-1H,3H-フロ[3,4-c]フラン-1-イル]フェノキシ]-1-(4-ヒドロキシ-3- メトキシフェニル)-1,3-プロパンジオール ^a
36	シリンガレシノール
37	イソラリシレシノール ^a
38	イカリンドE ^a
39	サクラレシノール ^a
40	1,2-ジグアイアシル-1,3-プロパンジオール ^a
41	2,3-ジヒドロキシ-1-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-1-プロパノン*
42	2,3-ジヒドロキシ-1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-プロパノン ^a
43	3-ヒドロキシ-1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)プロパン-1-オン ^a
44	ジヒドロコニフェリルアルコール
45	4-アセチルカテコール ^a
46	3',4',5'-トリヒドロキシアセトフェノン ^a
47	3,4-ジヒドロキシ-2-メチルベンズアルデヒド
48	プロトカテク酸
49	4-(ジメトキシメチル)-ピロカテコール ^a
50	チロソール
51	イソフラキシジン ^a
52	4-ヒドロキシカテコール ^a
53	ファゼイン酸 ^a

^aメープルシロップからの最初の報告

*新化合物

10

20

30

40

メープルシロップから食物グレード承認抽出物の調製の準備。

【0110】

本発明の別の実施形態によれば、メープルツリーからの食物グレード抽出物が開示され、メープルツリーの一部分ならびにシロップ（例は、メープルシロップ XAD抽出物）が含まれる。抽出物の生成は、非食物グレードの溶媒および方法の利用を要求し、将来の栄養補助上（nutraceutical）の適用のためのメープルシロップの「食物グレード承認」フェノール類リッチ（フェノール化合物に富む）抽出物が調製される。この目的のため、メープルシロップのメタノール抽出物（MS-MeOH）は、たとえば、ポリマー樹脂のようなもので、FDA食物グレードの樹脂を用いて調製することができ、それには、制限されないが、スチレンおよびジビニルベンゼン樹脂、およびスチレン ジビニルベンゼン（SDVB）架橋共重合体樹脂が含まれる。そのような樹脂の例は、制限されないが、Amberlite（アンバーライト）TMXAD-4（ジビニルベンゼン共重合体）、XAD-2（ポリスチレン共重合体樹脂）、XAD-7（脂肪族エステル）、XAD7HP（脂肪族エステル）、XAD16（ポリスチレン ジビニルベンゼン）、XAD16HP（ポリスチレン ジビニルベンゼン）、XAD761（架橋フェノールホルムアルデヒド重縮合物）、XAD1180（ポリジビニルベンゼン）、XAD1600（ポリスチレン ジビニルベンゼン）、FPx-66（マクロ網状芳香族ポリマー）、XFS-4257、XFS-4022（官能化されていないポリスチレンビーズ）、XUS-40323およびXUS-40322を含む。AmberliteTM強アニオン交換（SAX）樹脂、AmberliteTM WAX樹脂、ペンタフルオロフェニル誘導体化シリカゲル、HLB（疎水性 親脂性バランスのとれた）タイプのSIL1aPrepX相、シリカまたは混合モードの強アニオン交換（SAX）-C₁₈上の強アニオン交換（SAX）樹脂、水性C₁₈相、C₁₈相、C₁₈タイプのSIL1aPrepXTM相、珪藻土。本発明の一実施形態によれば、ポリメリック（polymeric）は、AmberliteTM XAD-16（Sigma）であってよく、そして吸着クロマトグラフィーは、XAD-16樹脂カラム上にメープルシロップを吸着させることにより行われ、自然糖を除去するために多量の水で溶出させ、次に最終的には真空中で溶媒を除去した後にメープルシロップメタノール抽出物（MS-MeOH）を生じさせるためにMeOHで溶出する。溶出はまた、エタノールが含まれる他の溶媒を用いてもたらしすることができる。

10

20

【0111】

1. 1kgのAmberliteTM XAD-16（Sigma）は、一晩浸し、そして大きなガラスカラムに充填した。

【0112】

2. 大量の水でXAD-16カラムを溶出した。

30

【0113】

3. 予め、メープルシロップの溶液が粘着性になりすぎないように水で希釈したものの一定量を吸着させる〔ca.（約）500mL；決定されるべきであり；（それが過剰に負荷されないことを確認する）〕。

【0114】

4. 約1時間の間、XAD-16カラム上にメープルシロップカラムを置く。

【0115】

5. 糖を除去するために大量の水でカラムを溶出する（溶出液を色についてチェックする）。

40

【0116】

6. フェノール類を除去するためにメタノールで溶出する。

【0117】

7. 真空中でのロータリーエバポレーターの使用によりメタノール画分を乾燥させ、水浴の温度は37 からに設定すべきであり、そして40 を超えるべきではない。

【0118】

8. 乾燥した試料はメープルシロップXAD抽出物であり、またMSXとしても知られる。

【0119】

9. 十分な量を準備するためにこれらのステップを繰り返す。

【0120】

50

別の実施形態によれば、また、メープルシロップからのポリフェノール性化合物の抽出のためのプロセスを開する。そのプロセスは、吸着剤物質の上に吸着されたメープルシロップポリフェノール画分を有する吸着剤物質を、前記メープルシロップポリフェノール画分を溶出し、そして収集するのに十分な時間の間および十分な回数の間、有機溶媒と接触させることを含む。

【0121】

一実施形態によれば、十分な時間は約30分であることができる。十分な回数は約1回から約3回までである。

【0122】

別の実施形態によれば、メープルシロップ混合物は、吸着剤物質上に、ポリフェノール画分を吸着するのに十分な時間の間、吸着剤物質上に吸着され、そしてその混合物は水において希釈したメープルシロップを含む。

10

【0123】

前記ポリフェノール画分を吸着させるのに十分な時間は、約12から約20時間まで、または約12から約19時間まで、または約12から約18時間まで、または約12から約17時間まで、または約12から約16時間まで、または約12から約15時間まで、または約12から約14時間まで、または約12から約13時間までである。前記ポリフェノール画分を吸着させるのに十分な時間は、12、13、14、15、16、17、18、19、20時間でよい。好ましくは、その時間は16時間である。

【0124】

吸収性 (absorbent) 物質の例には、制限されないが、Amberlite™ XAD-4 (ジビニルベンゼン共重合体)、XAD-2 (ポリスチレン共重合体樹脂)、XAD-7 (脂肪族エステル)、XAD 7HP (脂肪族エステル)、XAD16 (ポリスチレン-ジビニルベンゼン)、XAD16HP (ポリスチレン-ジビニルベンゼン)、XAD761 (架橋フェノール-ホルムアルデヒド重縮合物)、XAD1180 (ポリジビニルベンゼン)、XAD1600 (ポリスチレン-ジビニルベンゼン)、FPx-66 (マクロ網状芳香族ポリマー)、XFS-4257、XFS-4022 (官能化されていないポリスチレンビーズ)、XUS-40323およびXUS-40322が含まれる。Amberlite™強アニオン交換 (SAX) 樹脂、Amberlite™ WAX樹脂、ペンタフルオロフェニル誘導体化シリカゲル、HLB (疎水性親脂性バランスのとれた) タイプのSIL1aPrepX相、シリカまたは混合モードの強アニオン交換 (SAX) -C₁₈上の強アニオン交換 (SAX) 樹脂、水性C₁₈相、C₁₈相、C₁₈タイプのSIL1a

20

30

【0125】

別の実施形態によれば、プロセスはさらに、前記吸着剤 (adsorbent) 物質上の吸着の前に先立ち水においてメープルシロップを希釈するステップを含んでもよい。

【0126】

別の実施形態によれば、プロセスはさらに、ステップa)の前に、水で吸着剤物質を洗浄するステップを含んでもよい。

【0127】

別の実施形態によれば、プロセスはさらに、ステップb)を含むことができ、すなわち、収集されたポリフェノール画分を加熱することであり、それで有機溶媒が蒸発し、そして乾燥されたポリフェノール画分が得られる。加熱は約37 から約40 までの温度でよい。

40

【0128】

別の実施形態によれば、本発明のプロセスに適した有機溶媒は、メタノール、酢酸エチル、ブタノール、エタノール、メチルターシャリーブチルエーテル、およびそれらの組合せから選ぶことができる。

【0129】

さらに別の実施形態によれば、本発明のプロセスはさらに、ステップa)の前に、前記メープルシロップからの糖の抽出のために固体の混合物による抽出を含むことができる。たとえば、固体の混合物によるそのような抽出には、MgSO₄、NaCl、および固形吸収性物

50

質による抽出を含む。好適には、この抽出のために固形吸収剤は、アミノ化されたシリカ樹脂、C₁₈シリカ樹脂、またはそれらの組合せから選ぶことができる。

【0130】

さらに別の実施形態によれば、本発明のプロセスはさらに、ステップa)の前に、メープルシロップの液 液抽出が含まれる。たとえば、液 液抽出は、酢酸エチル抽出、ブタノール抽出、またはそれらの組合せ、次いで約85%の二酸化ケイ素 (SiO₂) および約15%の酸化マグネシウム (MgO) の比を有するSiO₂/ MgO固形相〔Florisil (フロリジル) (R) (商標)〕上への吸着を含むことができる。

【0131】

さらに別の実施形態によれば、本発明のプロセスから得られる抽出物を開示する。

10

【0132】

糖を伴わないメープルシロップブタノール抽出物の調製 (糖を伴わないMS-BuOH)

【0133】

本発明の別の実施形態によれば、糖を有さないMSブタノール抽出物が開示される。

【0134】

1. メープルシロップの既知の容量 (あなたがたの分液漏斗のサイズに基づいて) を、n-ブタノールで液 液パーティショニング (1:1 v/v、3回) に供する。メープルシロップはパーティショニングする前に水で希釈するが、その理由はそれが粘着性でありすぎるからである。(通常ならば、本発明者らは1Lのメープルシロップにおよそ300mlの水を加える)。

20

【0135】

2. ブタノール分画および乾燥を真空下で前に説明したように組み合わせる。

【0136】

3. 乾燥したブタノール分画は、まだ非常に粘着性であり、それで本発明者は通常なら、それが一貫性のある粉末状を有することを保証するために凍結乾燥または真空乾燥を行う。

【0137】

4. 乾燥ブタノール抽出物粉末をメタノール中で再構成させ、そして白色の固体、すなわち、糖を除去するためにろ過した。液体部分は、前述のように真空で乾燥された一部分である。

30

【0138】

5. 液体部分から溶媒を除去した後、再び糖を除去するために、一定のメタノールを加える。ろ過および乾燥を繰り返す。

【0139】

6. 最終的な乾燥抽出物は、糖なしのMS-BuOH抽出物である。

【0140】

7. 十分な量を調製するためステップを繰り返す。

【0141】

糖を伴うメープルシロップブタノール抽出物の調製 (糖を伴うMS-BuOH)

【0142】

本発明の別の実施形態によれば、糖なしMSブタノール抽出物が開示される。

40

【0143】

上記のステップ1-3に従う。この場合、糖はメタノールで除去されない。

【0144】

Folin-Ciocalteu (ホリン シオカルトー) 法による総フェノール含量の測定

【0145】

メープルシロップ抽出物の合計フェノール含量は、Folin-Ciocalteu (ホリン シオカルトー) 法に従って決定され、そして没食子酸当量 (GAEs) として測定される。簡潔には、抽出物をメタノール/H₂O (1:1、v/v) で1:100に希釈し、そして各試料の200 μLを、メタノール/H₂O (1:1、v/v) の3mLおよびFolin-Ciocalteu試薬の200 μLと、25 で10分間

50

インキュベートした。この後、20%Na₂CO₃溶液の600 μLを各チューブに加え、ボルテックス（渦攪拌）した。チューブをさらに、40 °Cで20分間インキュベーションし、そして後、インキュベーション；試料を直ちに氷浴中で室温まで冷却した。試料および標準（没食子酸）を同じく処理した。吸光度を755nmで測定し、そして最終結果を、Spectramax（スペクトラマックス）プレートリーダーから得られた標準曲線から算出した。

【0146】

溶媒除去の方法

【0147】

若干の実施形態に従い、本（presnt）発明の抽出物からの溶媒除去は、減圧下で行うことができる。しかし、他の既知の技術は、たとえば、アトマイゼーション（噴霧）、凍結乾燥、蒸発、結晶化（crystallization）、脱水（dehydration）、沈殿、遠心分離、または本発明の抽出物のいずれかから水相を排除するために任意の他の適切なプロセスのようなものを採用することができる。

10

【0148】

【表 5 - 1】

表 5

異なるメープルシロップ抽出物*における純粋分離フェノール化合物の存在
および相対レベル

化合物	名称	MS- BuOH	MS- EtOAc	MS- MeOH	
1	リオニレシノール	+	+	+	10
2	セコイソラリシレシノール	+	+	+	
3	2,3-ジヒドロ-3-(ヒドロキシメチル)-2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-7-メトキシ-5-ベンゾフラン プロパノール(ジヒドロデヒドロジコニフェリルアルコール)	+		+	
4	5'-メトキシデヒドロコニフェリルアルコール	+			
5	1,3-プロパンジオール, 1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-[4-[(1E)-3-ヒドロキシ-1-プロペニル]-2-メトキシフェノキシ]-, (1R, 2R)	+		+	
6	1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2-[4-(3-ヒドロキシプロピル)-2-メトキシフェノキシ]- プロパン-1,3-ジオール(グアイアシルグリセロール-β-0-4'-ジヒドロコニフェリルアルコール)	+	+	+	20
7	3-[4-[(6-デオキシ-α-L-マンノピラノシル)オキシ]-3-メトキシフェニル]-5-(3,4-ジメトキシフェニル) ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-(ヒドロキシメチル)-2(3H)- フラノン	+		+	
8	スコボレチン	+	+	+	
9	フラキセチン	+		+	
10	(E)-3,3'-ジメトキシ-4,4'-ジヒドロキシスチルベン	+		+	
11	2-ヒドロキシ-3',4'-ジヒドロキシアセトフェノン	+		+	30
12	1-(2,3,4-トリヒドロキシ-5-メチルフェニル)-エタノン	+		+	
13	2,4,5-トリヒドロキシアセトフェノン	+			
14	カテクアルデヒド	+		+	
15	バニリン	+	+	+	
16	シリングアルデヒド	+		+	
17	没食子酸	+		+	
18	トリメチル没食子酸メチルエステル	+			
19	シリング酸	+	+	+	40
20	シリングニン	+		+	
21	(E)-コニフェリルアルコール(コニフェロール)	+		+	

【表 5 - 2】

表 5 (つづき)

化合物	名称	MS- BuOH	MS- EtOAc	MS- MeOH	
22	C-ベラトロイルグリコール	+	+	+	
23	1,2-ベンゼンジオール(カテコール)	+		+	10
24	5-(3'', 4'' -ジメトキシフェニル)-3-ヒドロキシ-3-(4'- -ヒドロキシ-3'-メトキシベンジル)-4-ヒドロキシメチル -ジヒドロフラン-2-オン		+	+	
25	(エリスロ, エリスロ)-1-[4-[2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ -3-メトキシフェニル)-1-(ヒドロキシメチル) エトキシ]-3,5- ジメトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール		+	+	
26	(エリスロ, トレオ)-1-[4-[2-ヒドロキシ-2-(4-ヒドロキシ -3-メトキシフェニル)-1-(ヒドロキシメチル) エトキシ] -3,5-ジメトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール		+	+	
27	(トレオ, エリスロ) 1-[4-[(1R,2R)-2-ヒドロキシ-2-(4- ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1-(ヒドロキシメチル) エトキシ]-3-メトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール		+	+	20
28	(トレオ, トレオ) 1-[4-[(1R,2R)-2-ヒドロキシ-2-(4- ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1-(ヒドロキシメチル) エトキシ]-3-メトキシフェニル]-1,2,3-プロパントリオール		+	+	
29	トレオ-グアイアシルグリセロール- β -0-4' -ジヒドロコニフェリルアルコール		+	+	
30	エリスロ-1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-2- [4-(3-ヒドロキシプロピル)-2,6-ジメトキシフェノ キシ]-1,3-プロパンジオール		+		
31	2-[4-[(2S,3R)-2,3-ジヒドロ-3-(ヒドロキシメチル)-5- (3-ヒドロキシプロピル)-7-メトキシ-2-ベンゾフラニル] -2,6-ジメトキシフェノキシ]-1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ フェニル)-1,3-プロパンジオール		+	+	30
32	アセルニコール		+	+	
33	レプトレピソールD		+	+	
34	ブッドレノールE		+	+	
35	(1S, 2R)-2-[2,6-ジメトキシ-4-[(1S, 3aR, 4S, 6aR)- テトラヒドロ-4-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシ フェニル)-1H,3H-フロ[3,4-c]フラン-1-イル]フェノ キシ]-1-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)-1,3- プロパンジオール		+	+	
36	シリンガレシノール		+	+	
37	イソラリシレシノール		+	+	40
38	イカリシドE4		+	+	
39	サクラレシノール		+	+	
40	1,2-ジグアイアシル-1,3-プロパンジオール		+	+	

【表 5 - 3】

表 5 (つづき)

化合物	名称	MS- BuOH	MS- EtOAc	MS- MeOH	
41	2,3-ジヒドロキシ-1-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-1-プロパノン		+	+	
42	2,3-ジヒドロキシ-1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)-1-プロパノン		+	+	
43	3-ヒドロキシ-1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメトキシフェニル)プロパン-1-オン		+	+	10
44	ジヒドロコニフェリルアルコール		+	+	
45	4-ヒドロキシカテコール		+	+	
46	3',4',5'-トリヒドロキシアセトフェノン		+	+	
47	3,4-ジヒドロキシ-2-メチルベンズアルデヒド		+		
48	プロトカテク酸		+	+	
49	4-(ジメトキシメチル)-ピロカテコール		+	+	
50	チロソール		+	+	
51	イソフラキシジン		+	+	20
52	4-アセチルカテコール		+	+	
53	ファゼイン酸		+		
54	クエベコール	+			
55	フェルラ酸			+	
56	p-クマル酸			+	
57	カテキン			+	
58	エピカテキン			+	

30

【0149】

本発明は、以下の例を参照することによって、より一層た容易に理解されるであろうが、それらの例は、本発明の範囲を制限するためよりはむしろ、それを例証するために与えられる。

【実施例】

【0150】

例1

ニュートリプロテクティブダイエットのメタボリックシンドローム予防効果の評価

40

【0151】

本例の目的は、ニュートリプロテクティブダイエットのメタボリックシンドローム改善効果を評価することである。

【0152】

材料および方法

【0153】

メーブルシロップ抽出物を用い、それはメーブルシロップのアンバーグレード (amber grade) からn-ブタノールを用いた処理によって調製され、それは、極めて低い糖の生成物を調製するために有用でありうる。50gのブタノール抽出物、20mgのブタノール抽出物

50

基準 (extract basis) の合計量は、20gダイエツト/キャピタ (capita) /日にて飼育した8匹のラツトを用いた60日間フィーディング (給餌) トライアル (試験) の5回の反復のために必要である。

【0154】

フィーディング (給餌)

【0155】

雄性ラツト [Wistar (ウイスター系)] を、メープルシロップの0.1%のブタノールの抽出物 (n=8) でのAIN93Gベースの高脂肪ダイエツトで、または同じダイエツトで抽出物を伴わないもの (n=8) での2ヶ月について飼育される。フィーディングの間、毎日の体重増加およびダイエツト摂取量を日毎に測定する。

10

【0156】

ディセクション (切開)

【0157】

フィーディング後の各ラツトは、全身血、小腸上皮、肝臓および脂肪組織をサンプリングするために切開を施す。

【0158】

血液化学分析

【0159】

全身血の質を20-50項目について分析する。

【0160】

ゲノミクス (ゲノム研究)

20

【0161】

トランスクリプトミクス (転写学) は、アフィメトリクス遺伝子チップを用いるDNAマイクロアレイ分析によって各器官または組織からの全RNA試料について行う。

【0162】

結果

【0163】

高脂肪 [または高カロリー (calorie)] ダイエツトに対するサプリメントとしてメープルシロップのブタノール抽出物の使用は、脂質および/または糖代謝経路を調節することによって、メタボリックシンドロームの危険性を低減する。

30

【0164】

例2

糖尿病 (DIABATES) モデルKK-Ayマウスにおける肝遺伝子発現プロファイルのグローバル分析 (網羅的解析)

【0165】

ここで図8を参照し、この研究の目的は、T2DMモデルマウス KK-Ayマウス (糖尿病マウス) の肝臓に及ぼすメープルシロップのブタノール抽出物 (上述のように、MSE) の効果を明らかにすることである。雄性KK-Ayマウスで、4週齢の、肥満、高血糖およびインスリン抵抗性の研究のためのT2DMモデルマウスとしてのものは、図8に示すように、選択され、および二つの実験群に分離される。すなわち、16匹の雄性の、コントロール群 (n=8) で、AIN-93Gダイエツトを与えたもの、および実験群 (N=8) で、MSE (AIN-93Gダイエツト+0.1%MSE) を与えたものである。動物は、7日間同じ普通のダイエツトをプレ供給 (pre fed) され、その後43日間、実験ダイエツトを供給した。それらは、16時間絶食させ、そして肝臓および血清試料を収集する。

40

【0166】

ここで図9乃至11を参照する。血清グルコース、インスリンおよびグリコアルブミン (glycoalbumin) レベルの測定は、MSE摂取には、高血糖を改善する傾向があることを示す (図9)。また、図10に示すように、MSEの摂取には、肝臓での脂質β-酸化を大幅に活性化させ、総ケトン体の濃度の増加がもたらされる。さらに、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の活性を測定するこ

50

とによって示されるように(図11)、MSE摂取は、有意に(それぞれ、 $p<0.01$ および $p<0.05$)、肝障害を緩和する。

【0167】

図12にまとめるように、KK-AyマウスへのMSEの給餌は、改良された高血糖、ベータ酸化の活性化、および肝障害の軽減をもたらす。

【0168】

次に、肝臓トランスクリプトーム解析は、Affymetrix Genechip(アフィメトリックス・ジーンチップ)[Mouse Genome(マウスゲノム)430 2.0]を用いて行う。マイクロアレイが実行され、そして結果が分布によらない加重法(DFW)により正規化される。二つの実験群は互いとは別にクラスター化し(図13)、両群間に遺伝子発現の顕著な違いがあることが示される。さらに、そこにはMSE群において736の大幅にアップレギュレーション(上方制御)される遺伝子および1078の大幅にダウンレギュレーション(下方制御)される遺伝子がある(FDR<0.05)。

【0169】

有意に異なって発現される遺伝子は、その後、遺伝子アノテーションエンリッチメント分析(gene annotation enrichment analysis)によって分析され、およびインスリンシグナル伝達は、このシグナル伝達経路の遺伝子の統計的有意性を検証すること、ならびに免疫プロテオミクスによって集束される。

【0170】

遺伝子アノテーションエンリッチメント分析に関して、図15乃至18に示すように、それらの結果は、有意な変化を、脂質代謝、炎症および免疫、材料輸送、アミノ酸代謝、酸化還元、ならびに上皮細胞の発達、化学的恒常性、および細胞酸化還元ホメオスタシスにおいて示す。脂質代謝関連遺伝子に関して、MSE摂取は、肝臓における脂質蓄積をダウンレギュレーションすると考えられる(図16)。炎症および免疫関連遺伝子に関して、MSEは、肝臓における炎症の発症を抑制すると考えられる(図17)。図18にまとめるように、肝臓での脂質蓄積の抑制は、血清中の総ケトン体の増加と一致し、その一方で、炎症の抑制は、減少と一致し、血清ASTおよびALTである。

【0171】

次に、図19乃至24に示すように、インスリンシグナル伝達経路を分析する(図19)。インスリン受容体およびホスホインスリン受容体(IR)のベータサブユニットの免疫プロテオミクスは、各群において、インスリン受容体ベータサブユニットのリン酸化における増加を明らかにする(図20)。インスリン受容体基質2(IRS2)の免疫プロテオミクスは、MSE処置動物におけるIRS2のタンパク質発現での増加を明らかにする。プロテインキナーゼB(Akt)タンパク質およびリンタンパク質の免疫プロテオミクスは、MSE処置群における増加リン酸化されたAktを明らかにした(図22)。図23に示すように、KK-AyマウスによるMSE摂取は、KK-Ayマウス肝臓のインスリンシグナル伝達機能の全体的な改善を導く。この結果は、高血糖症の抑制のためにグリコシル化血しょうアルブミンの観察されたダウンレギュレーションと一致する。図24に示すように、KK-Ayマウスの肝臓でのMSEの影響の示唆されたメカニズムは、減少脂質蓄積、改善されたインスリン感受性、増加した酸化(-oxidation)および減少した炎症によるものである。

【0172】

例3

メープルシロップ抽出物補充高脂肪ダイエットのメタボリックシンドローム予防効果の評価

【0173】

ここで図25乃至31を参照し、この調査の目的は、高脂肪ダイエットで、メープルシロップエキス(MSX)での補充を伴うもの、または伴うものを与えたマウスを使用して、メープルシロップの肝臓保護効果を明らかにすることである。MSX抽出物は、食物グレードの承認された樹脂XAD-16の使用により、上記のように準備し、メープルシロップからの食物グレード承認抽出物を調製する。MSX抽出物はメープルシロップの50Lから調製される。実

10

20

30

40

50

験群を以下の表6に定義する。

【 0 1 7 4 】

【 表 6 】

表6

実験群およびそれぞれのダイエツト

群	ダイエツト
LFD	10%-ファツトダイエツト
45F	45%-ファツトダイエツト
45F+0.06MSX	45%-ファツトダイエツト0.06% MSXを伴う
45F+0.12MSX	45%-ファツトダイエツト0.12% MSXを伴う

LFD=低ファツトダイエツト；45F=高ファツトダイエツト

10

20

30

40

50

【 0 1 7 5 】

図25に示すように、3週齢のC57/BL/6J雄性マウス（各群においてN=4）に、7日間の間低ファツトダイエツトを与え、そして次いで各群を4週間（28日間）の間、それらのそれぞれの実験ダイエツトに切り替える。肝臓および血液試料を、4週間の期間の終了時に収集する。図26における結果は、体重増加およびエネルギー摂取が、すべての4つの実験群間で同じであることを示す。

【 0 1 7 6 】

しかしながら、図27に示すように、血しょうコリンエステラーゼのレベルは、MSXで処置した動物において有意に減少する。図28に示すように、血しょうAST、ALTおよびLDHのレベルは、すべて、MSX処置群において用量依存的な様式で低下し、MSXが肝臓保護効果を有し、そして肝臓保護因子がMSXにおいて存在することが示唆される。

【 0 1 7 7 】

図29に示すように、総血しょうタンパク質レベル、アルブミンレベルは各群間でほぼ不変であり、そして血中尿素窒素レベルは0.12%MSX群においてわずかにより一層高いと考えられる。図30に示すように、総血しょうカリウム、カルシウムレベル、総ビリルビンおよびアルカリホスファターゼレベルは、0.12%MSX群での低ファツトダイエツトのレベルが好まれる傾向（trend toward）に見える。また、総ビリルビンレベルは、各MSX処理群について低脂肪ダイエツトのレベルに向かって下降傾向にあると考えられる。結論として、そこには、これらの結果は、コリンエステラーゼレベルがMSTダイエツト群において有意に減少し、そしてAST、ALTおよびLDHレベルがMSXダイエツト群において用量依存的な様式で減少することを示す。これらの結果は、MSXが肝臓保護効果を有することを示す。これらの結果を確認するために、新たな実験を遂行し、そこでは、各n=14匹の動物の実験群を、低ファツトダイエツト、高ファツトダイエツト、または0.6%MSXを補充した高ファツトダイエツトにより合計で8週間処置する。

【 0 1 7 8 】

例4

メープルシロップからの食物グレード承認抽出物の調製の準備

【 0 1 7 9 】

二つのタイプの樹脂1) FPX 66および2) XAD-16を用い、糖部分を伴わないメープルシロップから生物活性化合物を抽出するための方法論を説明する。これらの二つの樹脂の双方はジビニルベンゼン相である。これらの相上でのポリフェノール類の吸着のメカニズムはもっぱら疎水性相互作用による。

方法体系：

1. メープルシロップの5L（6kg）部分の脱イオン水2,1Lによる希釈。

2. 16時間、ウェット（湿式）Amberlite™ FPX66またはXAD-16（5,0-6,7kg乾燥質量）

の16,8kg上へのメープルシロップ混合物の吸着。

3. 脱イオン水(7×15L)でのカラムの洗浄。

4. 変性エタノール(3×15L)での溶出。各溶出の前に、30分間、エタノールを樹脂と接触させる。

5. 「ロータリーエバポレーター」でのエタノールの蒸発。水浴の温度を37 から設定し、そして40 を超えさせない。

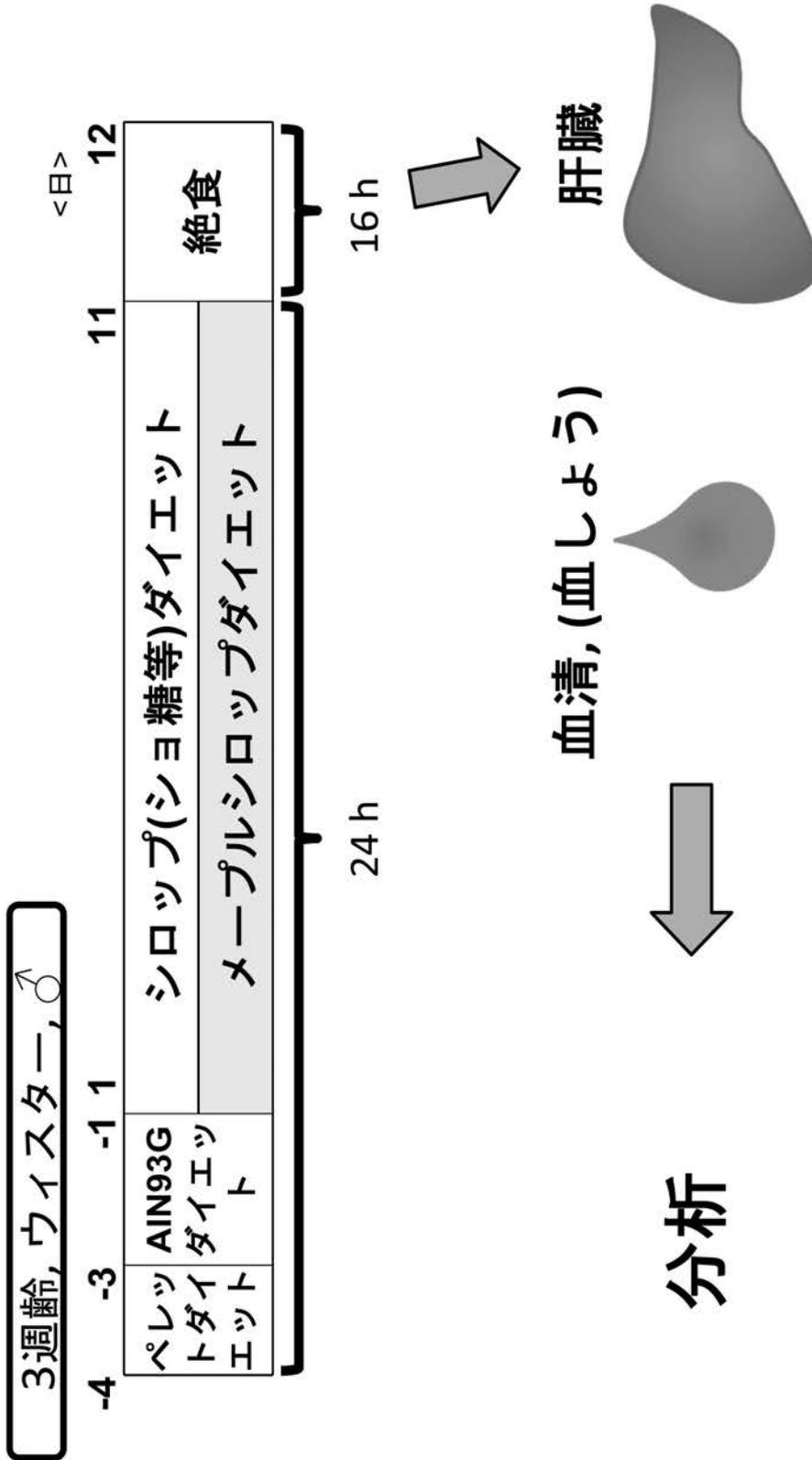
6. MSX画分の分離(15,3g)。

7. 脱イオン水の10Lの2つの部分を用いる樹脂のリコンディショニング(再生)。

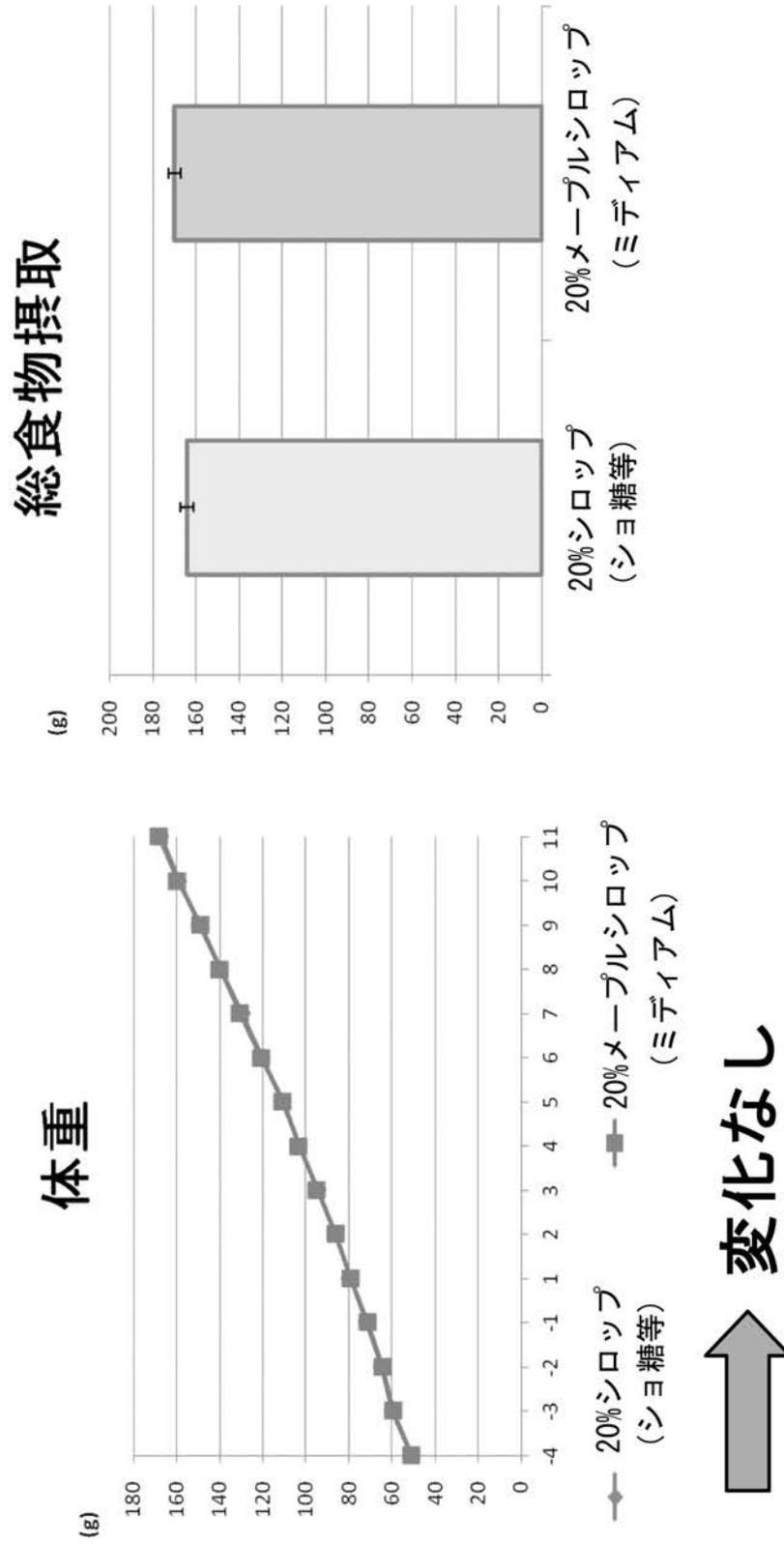
【0180】

好適な実施形態を上記に説明し、そして添付の図面に例を挙げたが、この技術における熟練者にとって、なんらかの修飾をこの開示から離れることなく行いうることは明らかであろう。そのような修飾はあり得る変形と考えられ、本開示の範囲に含まれる。

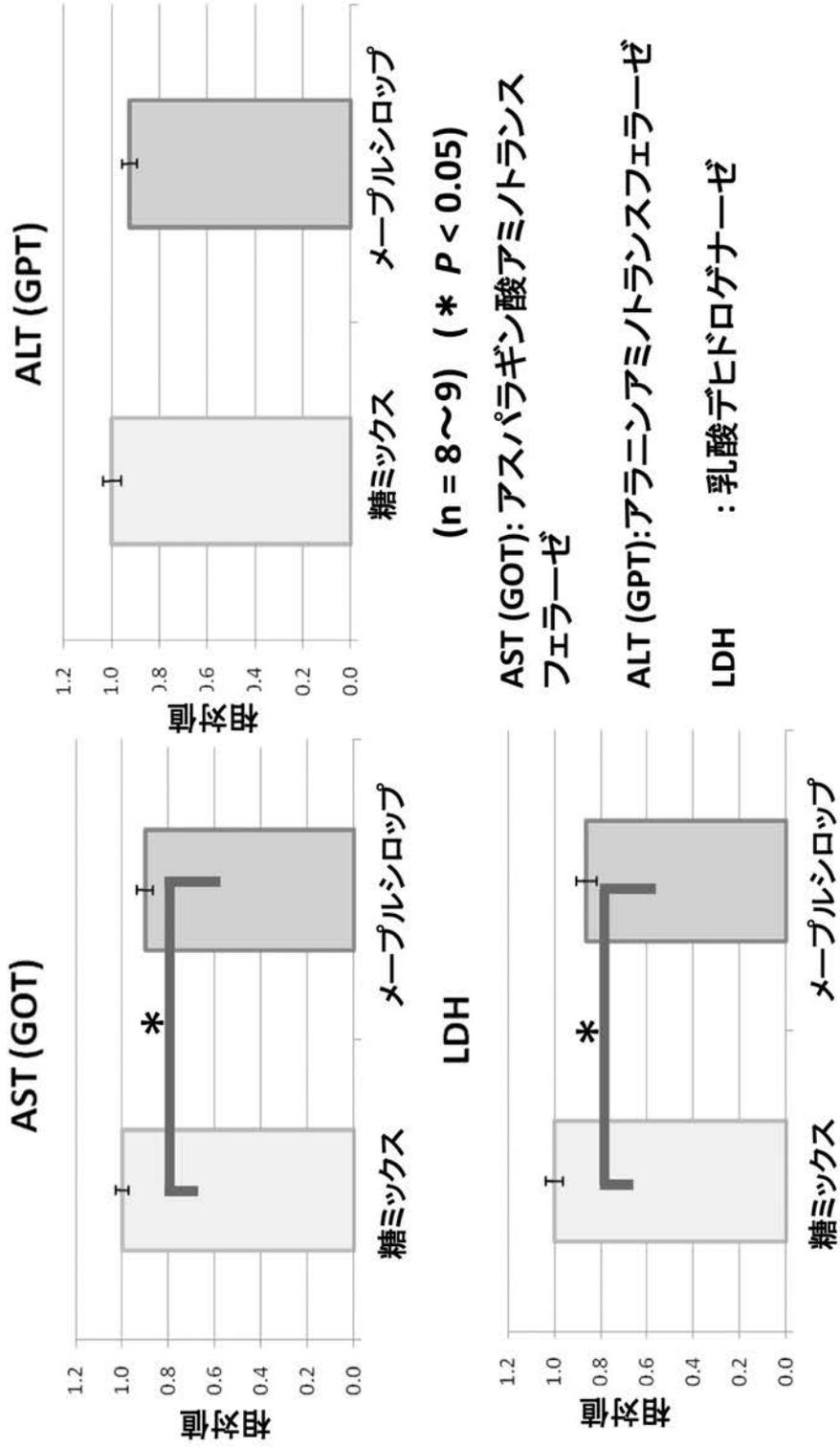
【 図 1 】



【 図 2 】

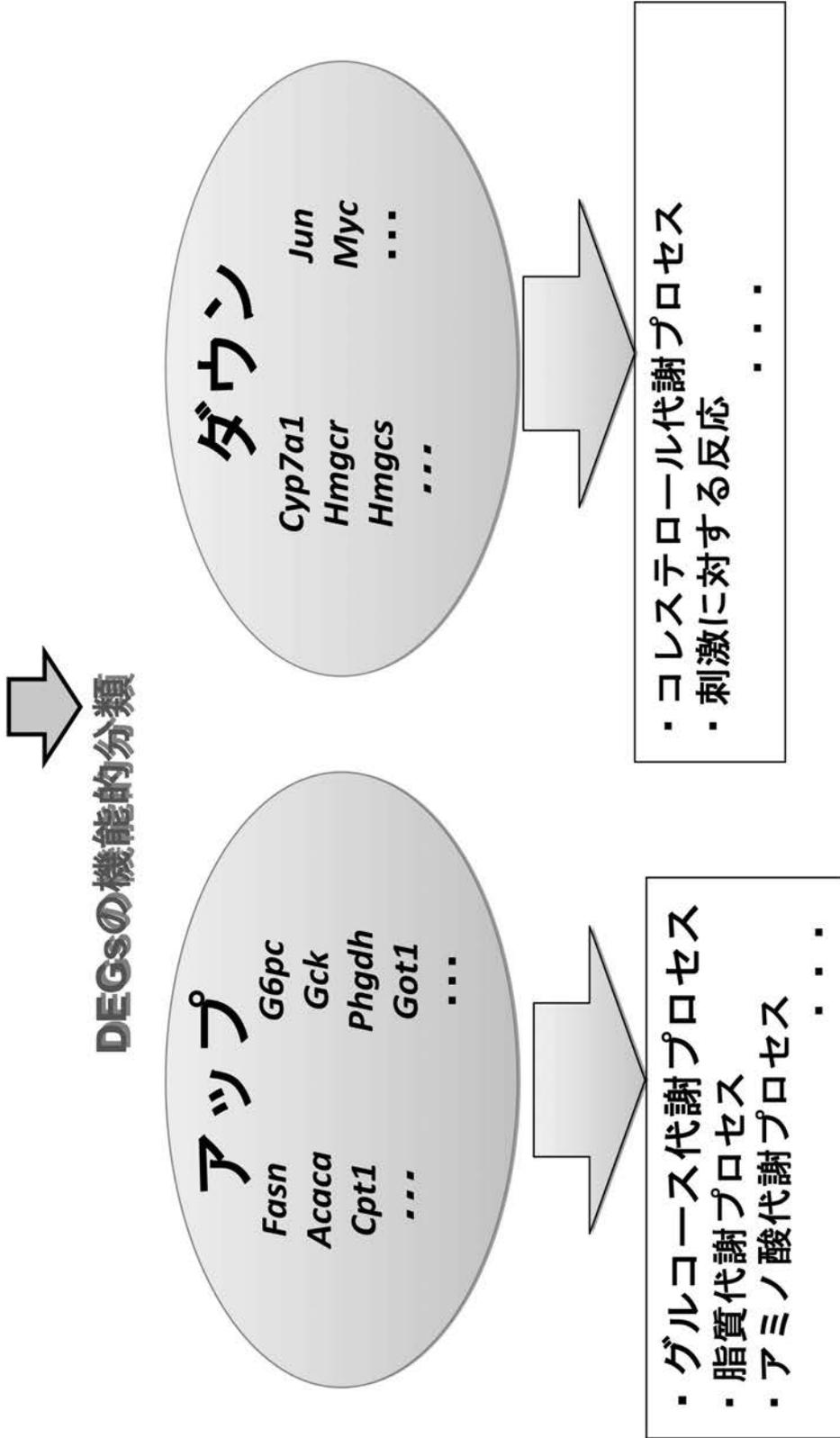


【 図 3 】

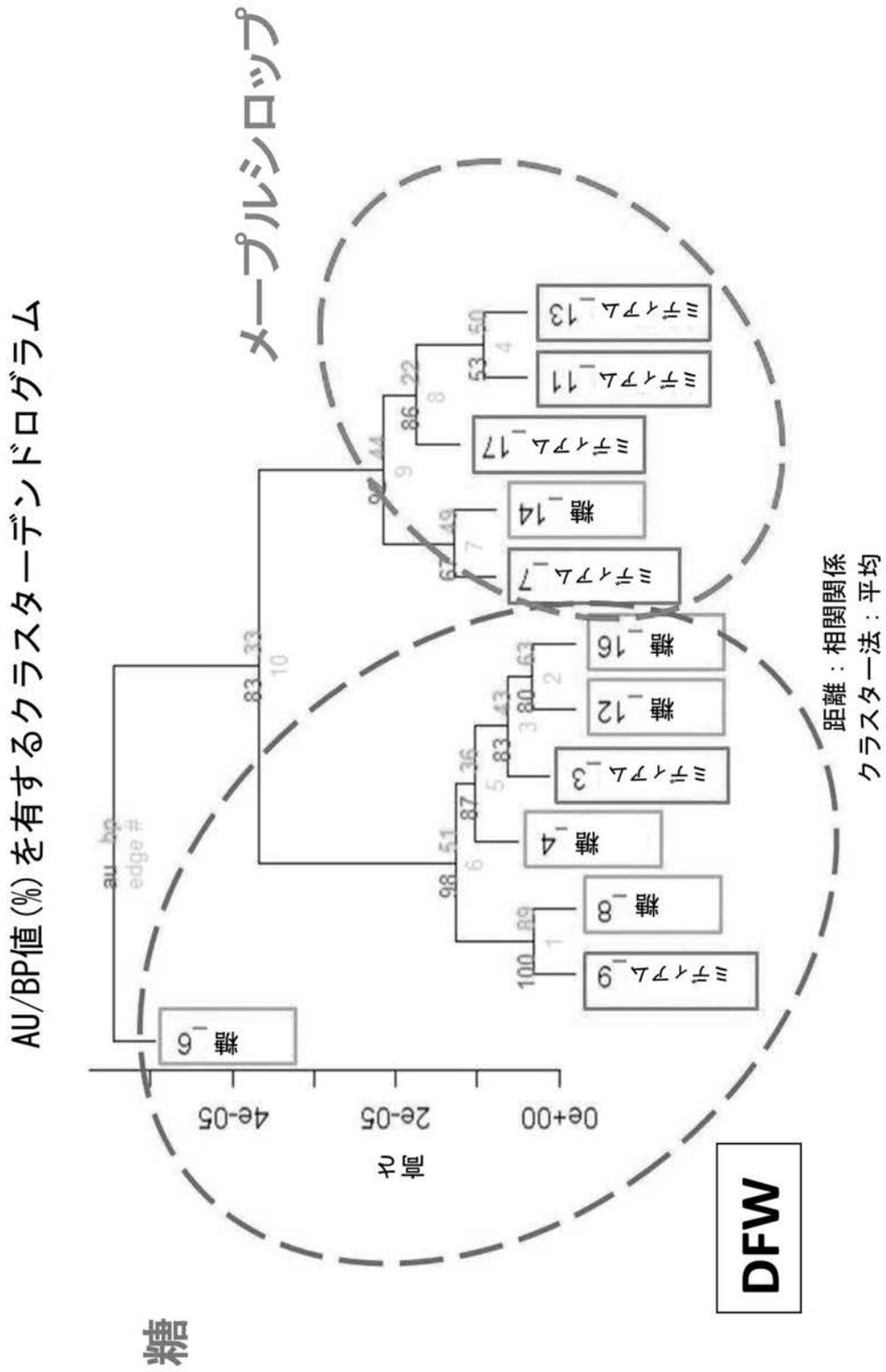


【 図 4 】

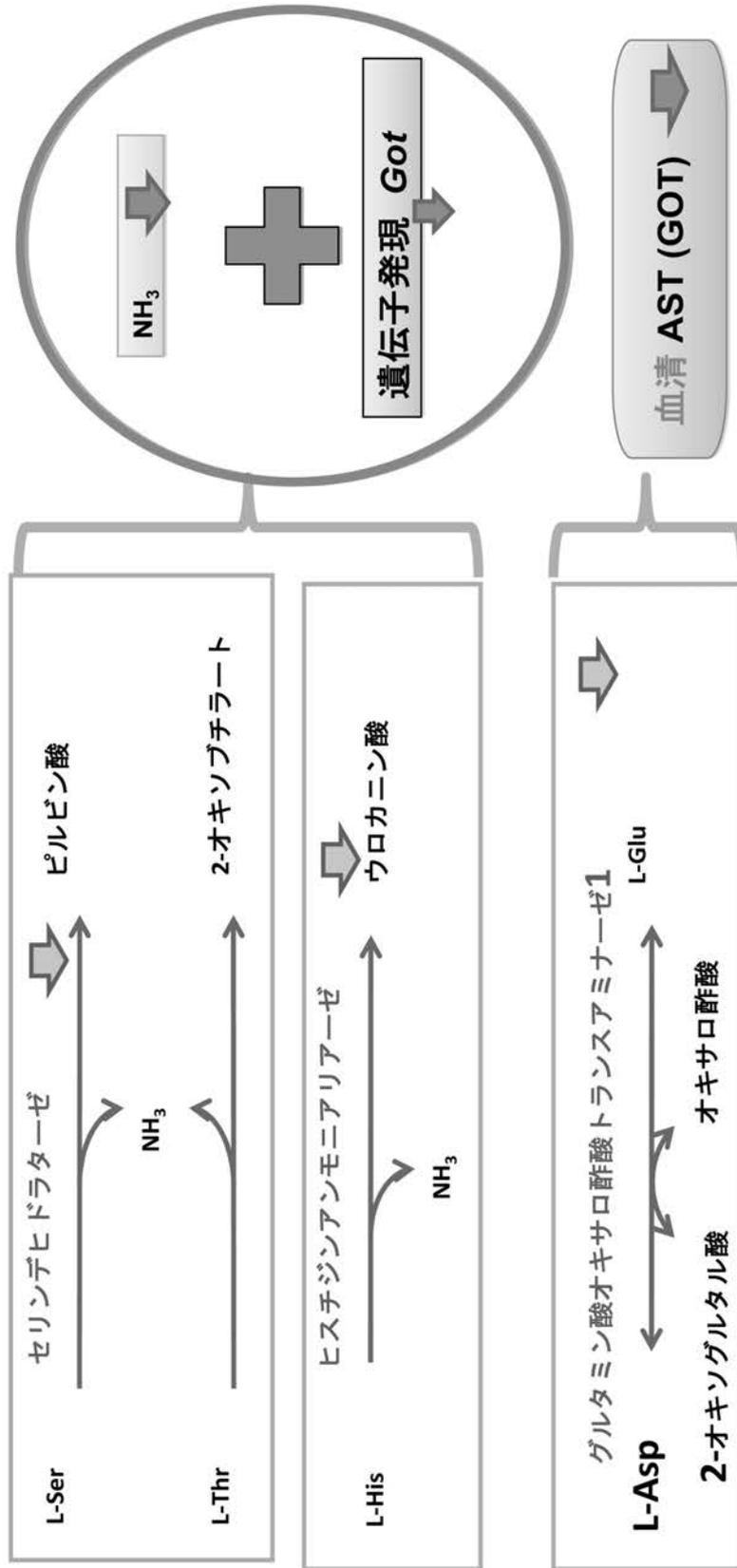
比較解析 → 異なって発現される遺伝子(DEGs)



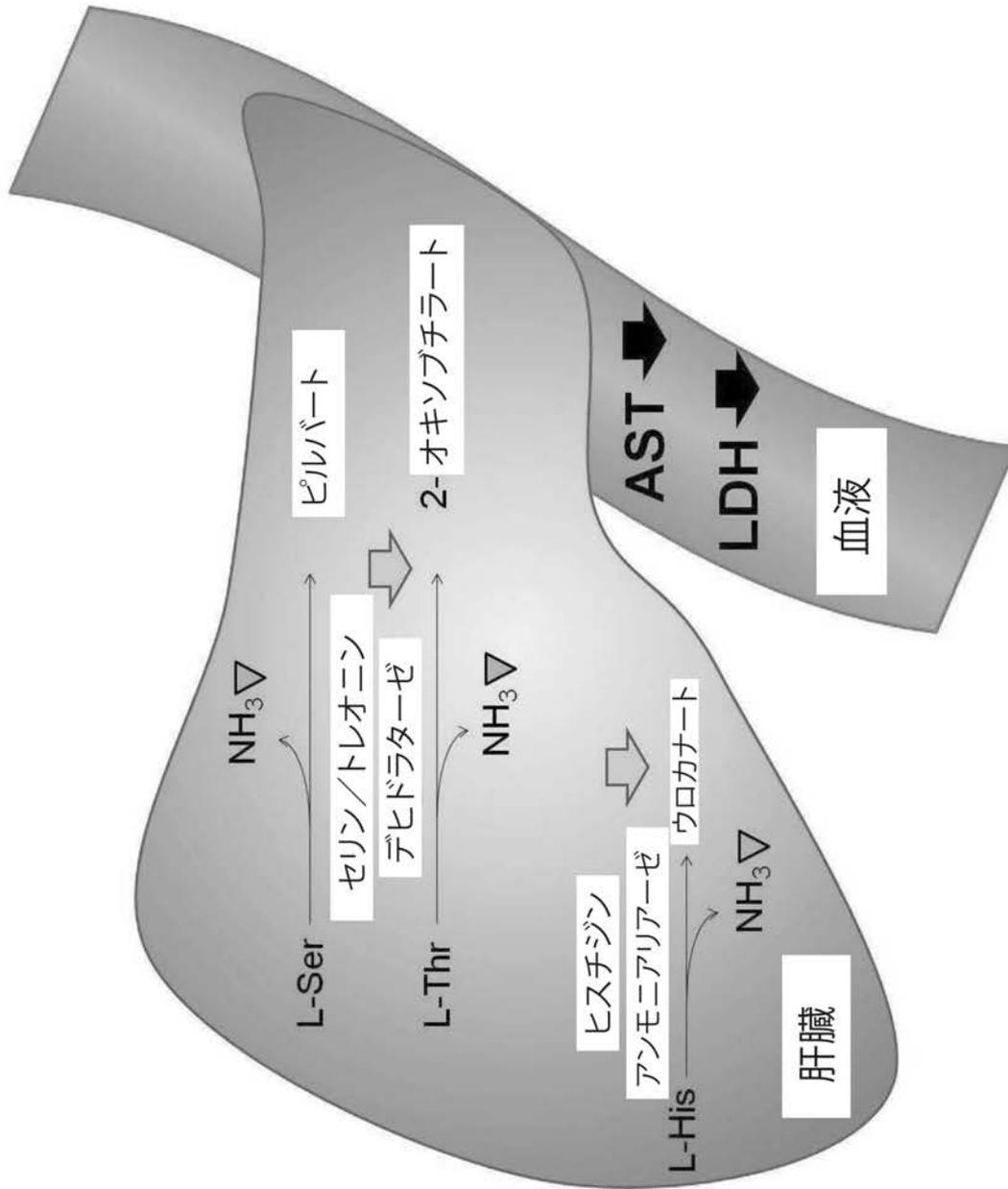
【 図 5 】



【 図 6 】



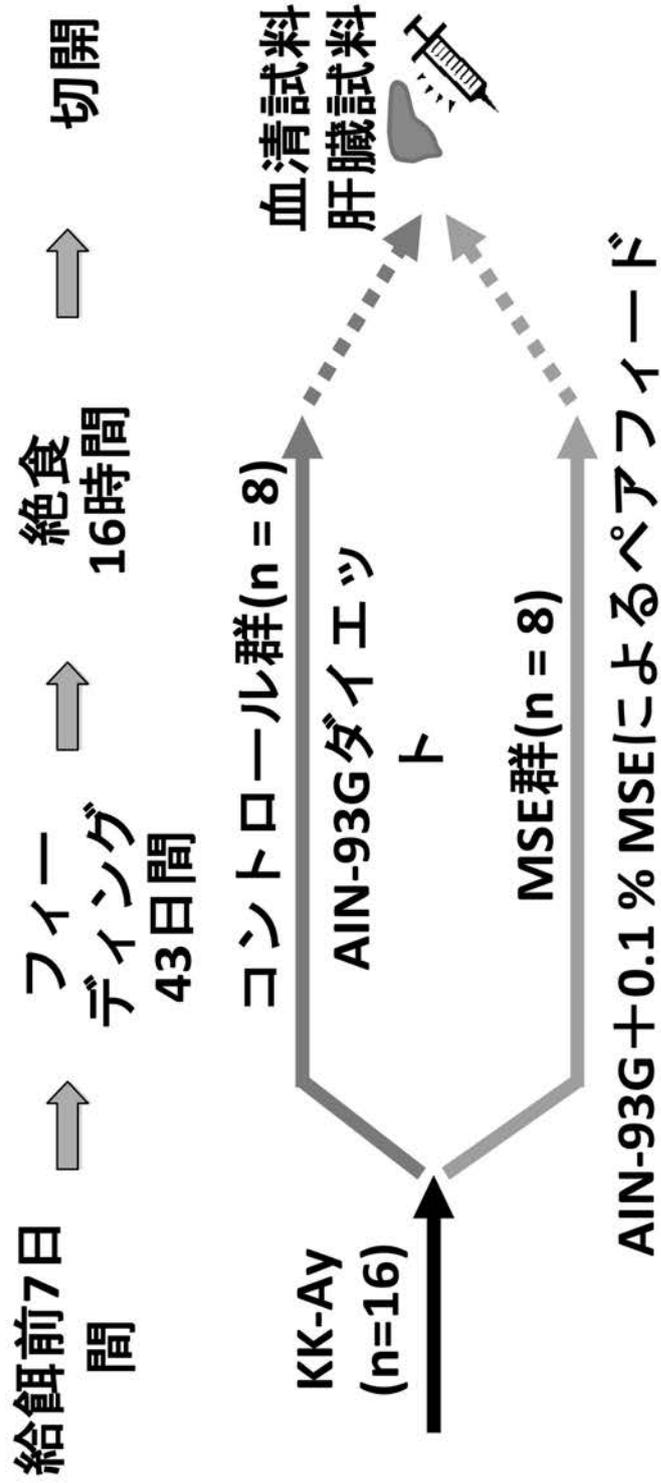
【 図 7 】



【 図 8 】

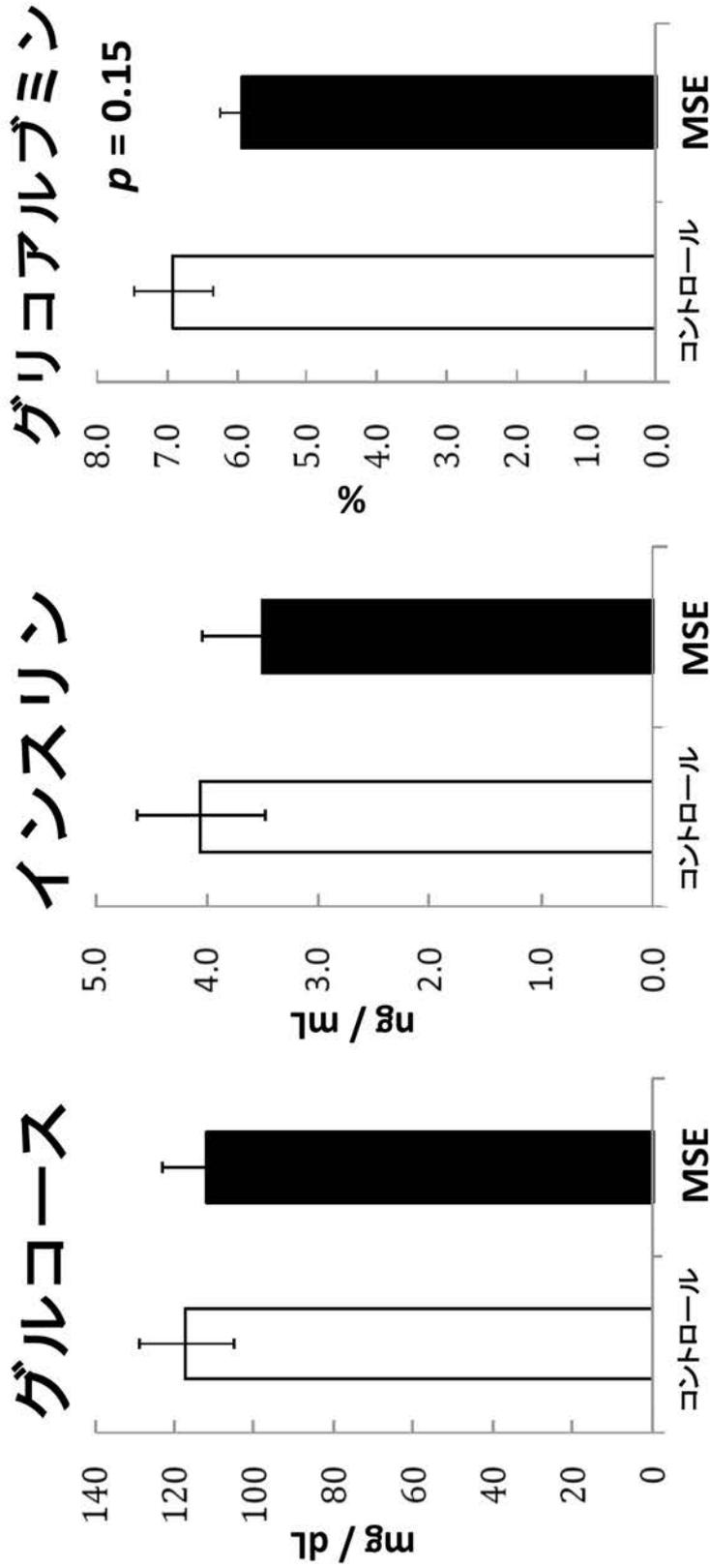
実験的設計

動物: 雄性KK-A_yマウス, 4週齢,
肥満, 高血糖およびインスリン抵抗性の研究のため
のT2DMモデルマウス



【 図 9 】

血液生化学①

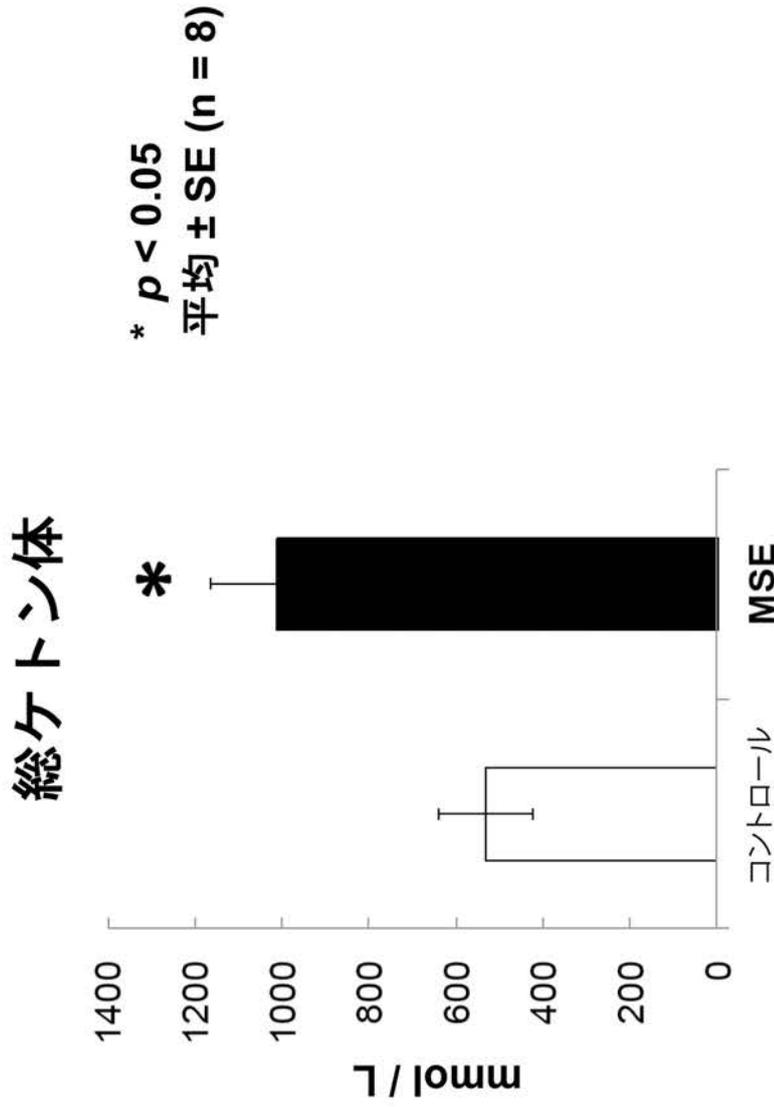


平均 ± SE (n = 8)

MSE摂取は高血糖を改善する傾向がある

【 図 1 0 】

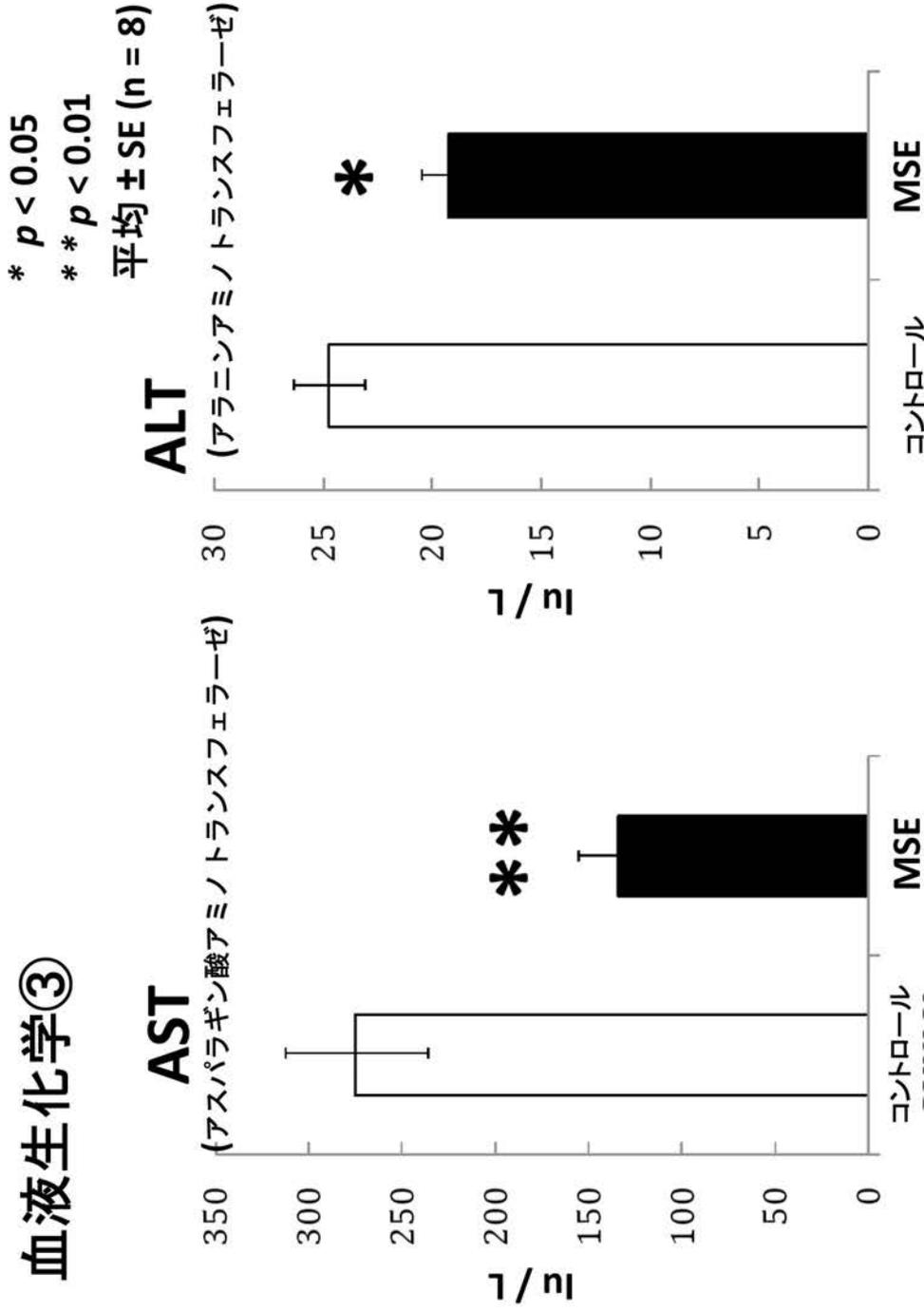
血液生化学②



MSE摂取は肝臓での脂質b酸化を著しく活性化する

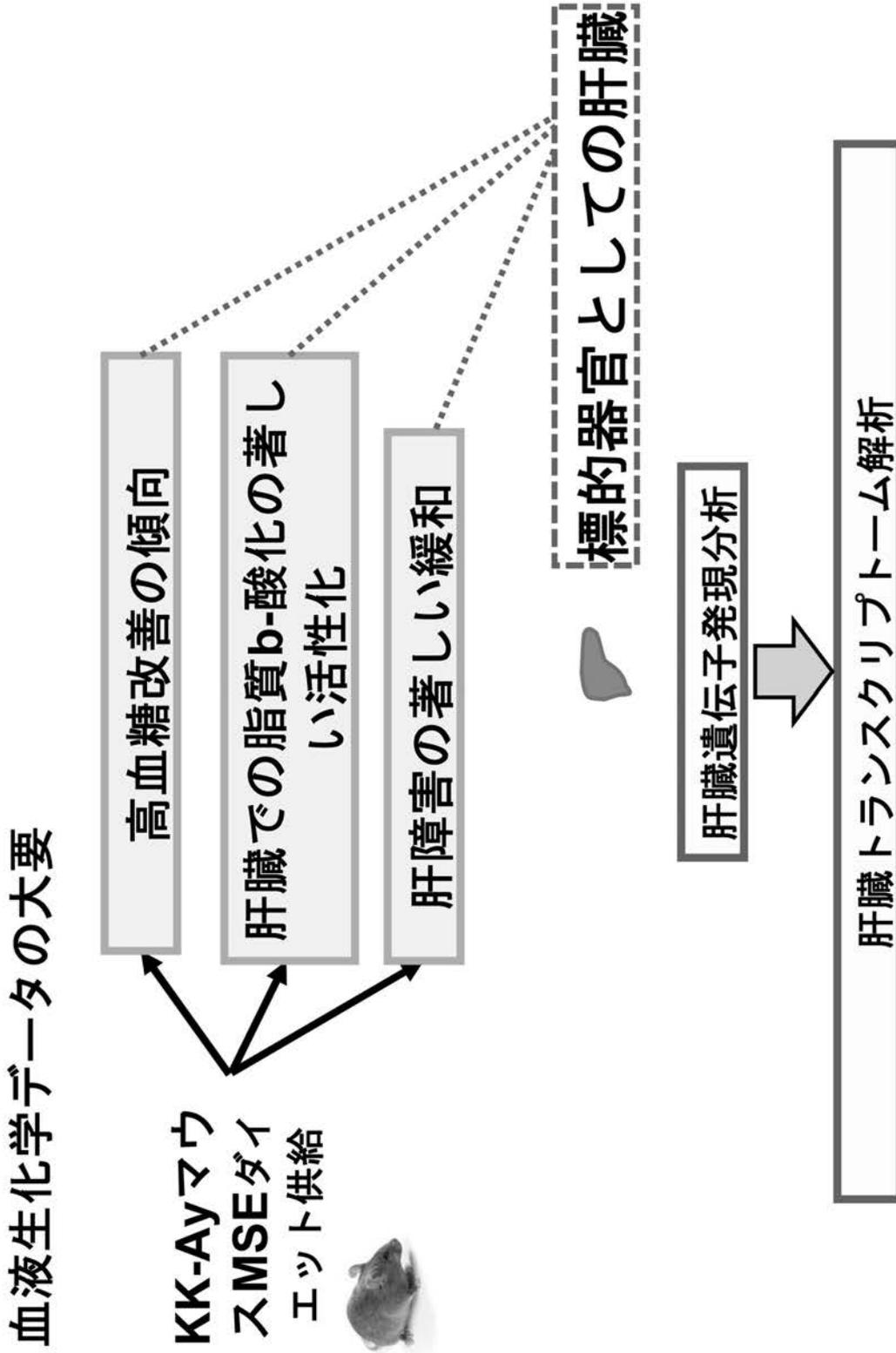
【 図 1 1 】

血液生化学③



MSE摂取は肝障害を著しく回復させる

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

DNAマイクロアレイ分析

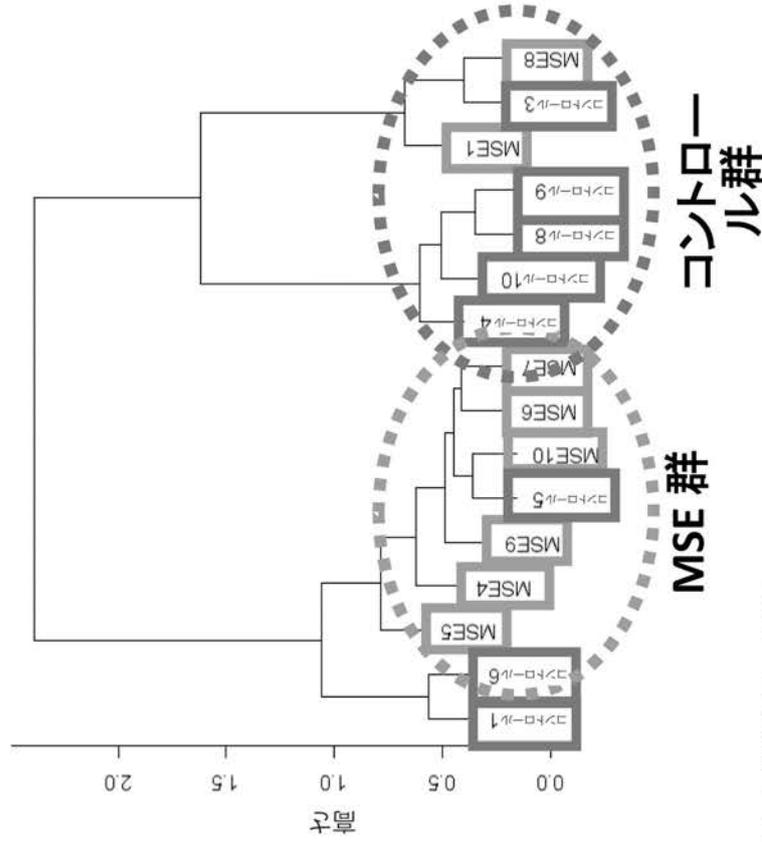
アレイ:アフィメトリックス・ジーンチップ・マウスゲノム430 2.0

正規化:分布によらない加重法(DFW)

- 生じた別個のクラスター化

- ランクプロダクトによるダイ
エット群間比較

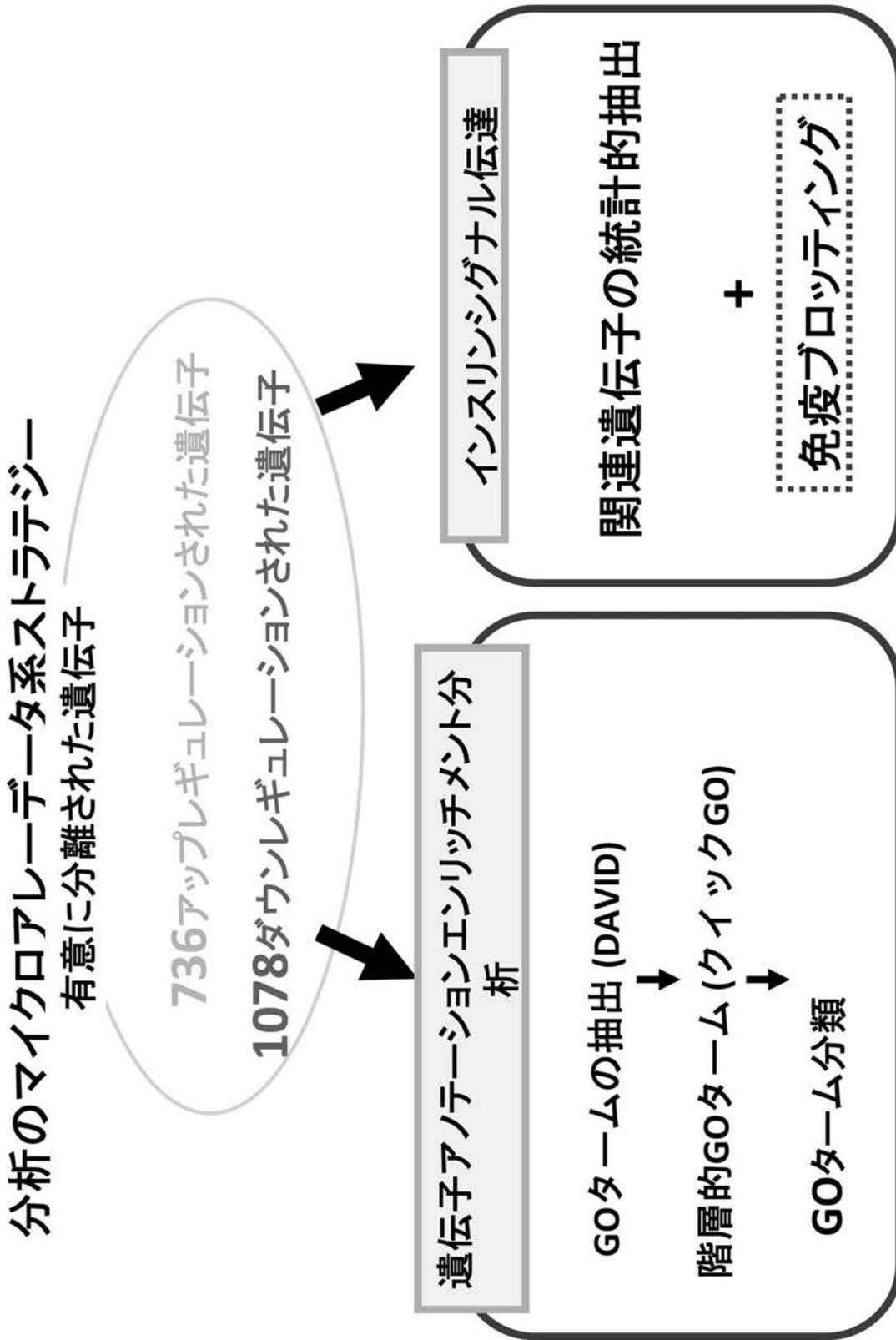
発現において著しい変化を有する遺伝子
の抽出 (**FDR < 0.05**)



MSE群において著しくアップレギュレーションされた遺伝子: 736

MSE群において著しくダウンレギュレーションされた: 1078

【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

機能分析

脂質代謝

- 脂肪酸代謝プロセス
- 脂質異化プロセス
- アシル-CoA代謝プロセス
- 脂質輸送
- ステロイド合成プロセス
- アシルグリセロール合成プロセス
- ステロイド代謝プロセス

炎症 & 免疫

- 外部刺激に対する反応の調節
- 変性タンパク質 (unfolded protein) に対する反応
- 急性期反応
- 急性炎症反応に関与する血しょうタンパク質の活性化
- 補体活性化, 古典経路
- 補体活性化, 代替経路
- 抗アポトーシス

材料輸送

- 有機アニオン輸送
- 膜貫通輸送

アミノ酸代謝

- 細胞アミノ酸誘導代謝プロセス
- 細胞アミノ酸異化プロセス

その他

- 上皮細胞発達
- 化学的恒常性
- 細胞酸化還元ホメオスタシス

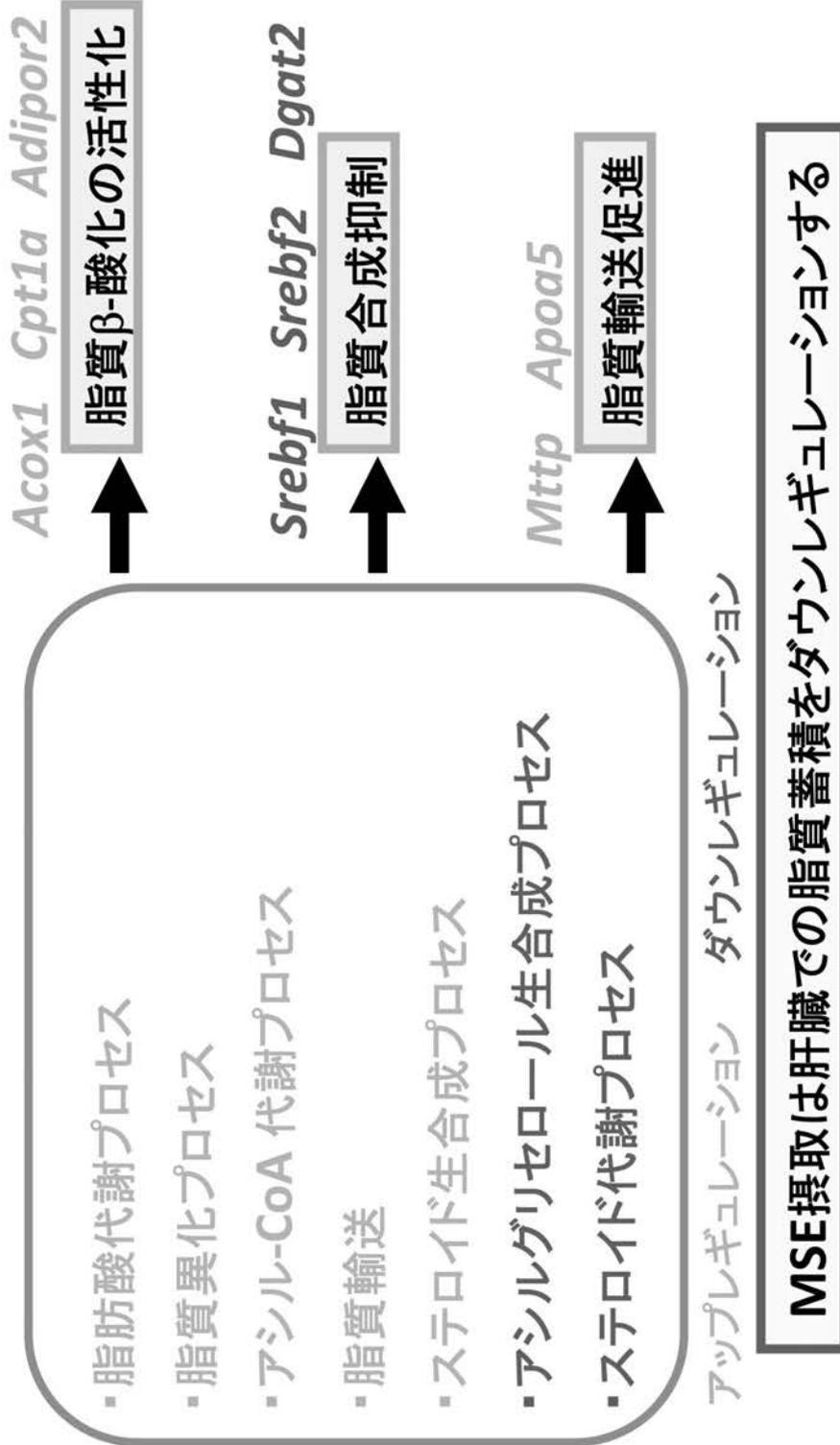
酸化還元

- 酸化還元
- 酸化還元

アップレギュレーション
ダウンレギュレーション

【 図 1 6 】

関与する脂質代謝関連遺伝子:



【 図 1 7 】

関与する炎症 & 免疫関連遺伝子:

- 外部刺激に対する反応の調節
- 変性タンパク質に対する反応
- 急性期反応
- 急性炎症反応に関与する血しょうタンパク質の活性化
- 補体活性化, 古典経路
- 補体活性化, 代替経路
- 抗アポトーシス

Crp, Cd163, Orm1, Orm2, Orm3, Saa1, Saa4

抑制された炎症



C1qa, C1qb, C4b, C4bp, C8a, C8b, C9, Cfb, Cfh

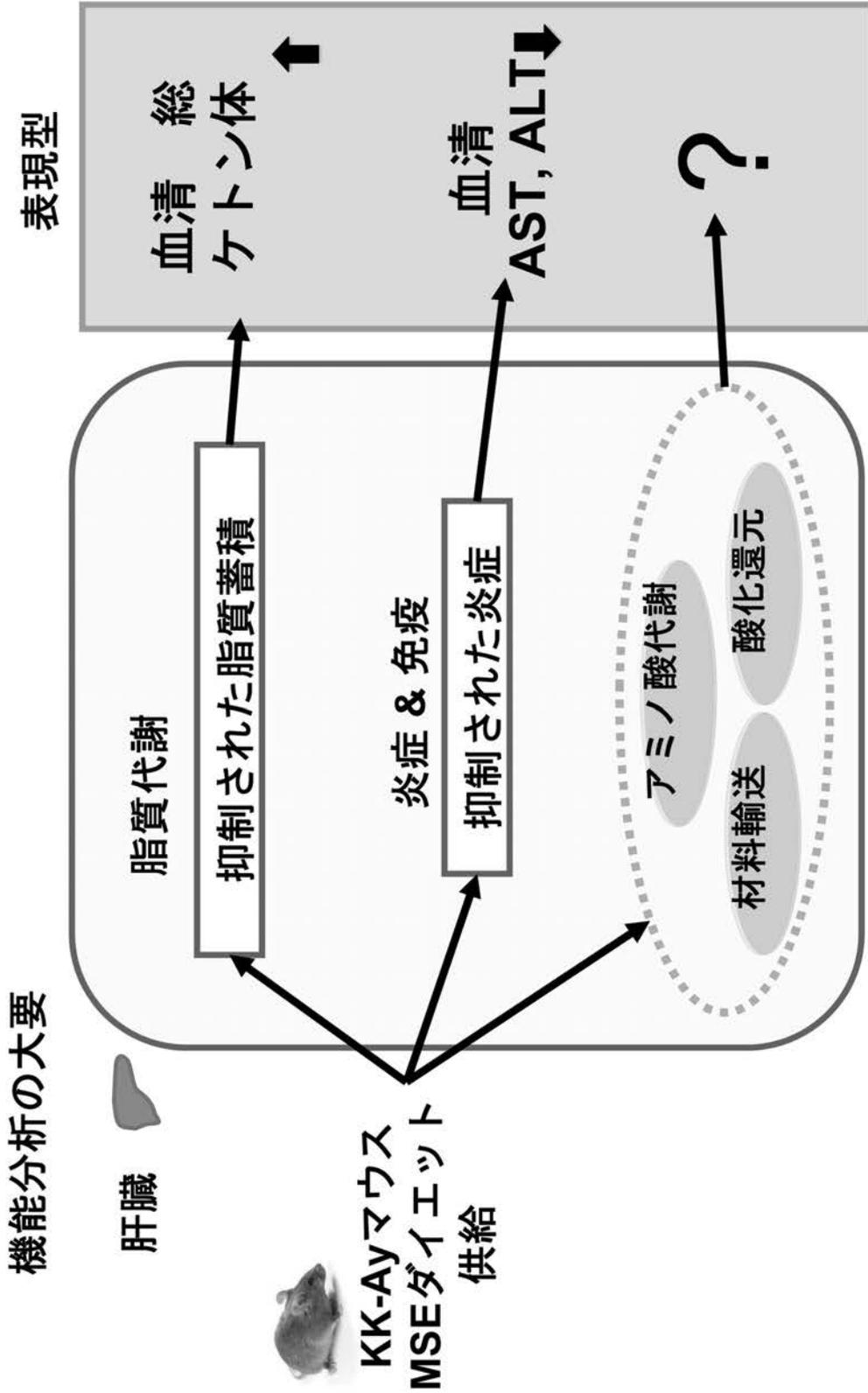
抑制された免疫



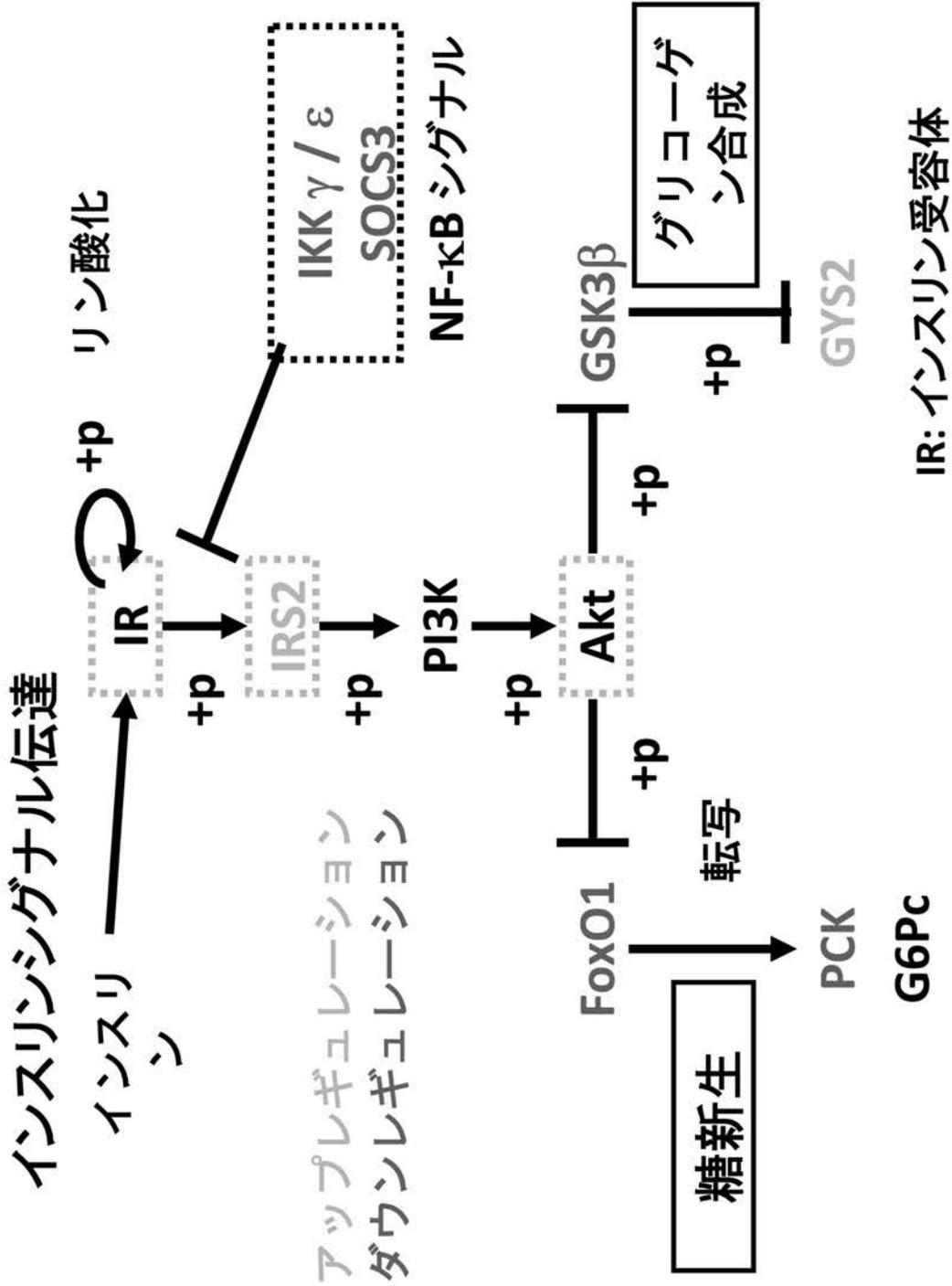
ダウンレギュレーション

MSE摂取は肝臓での炎症の発生を抑制する

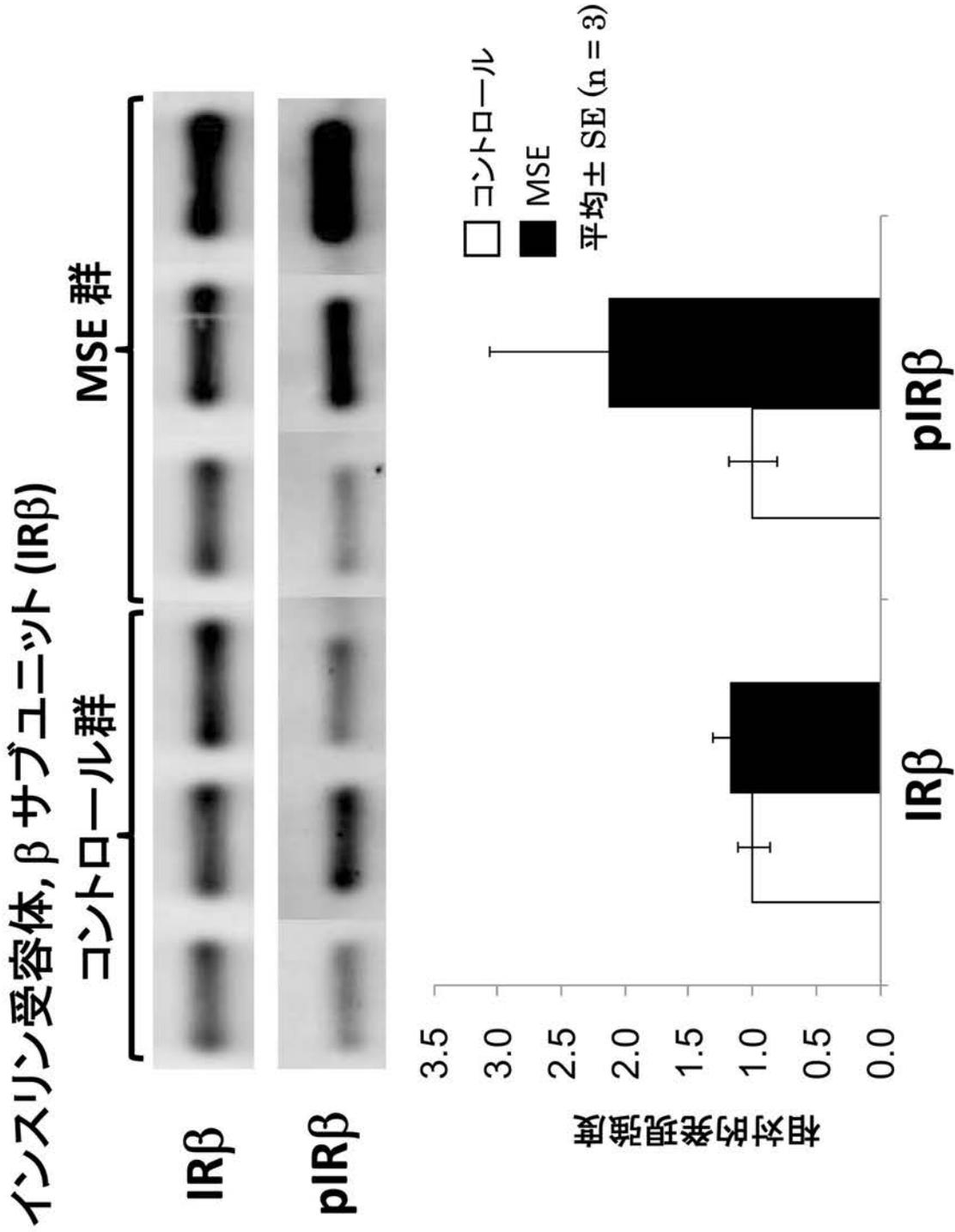
【 図 1 8 】



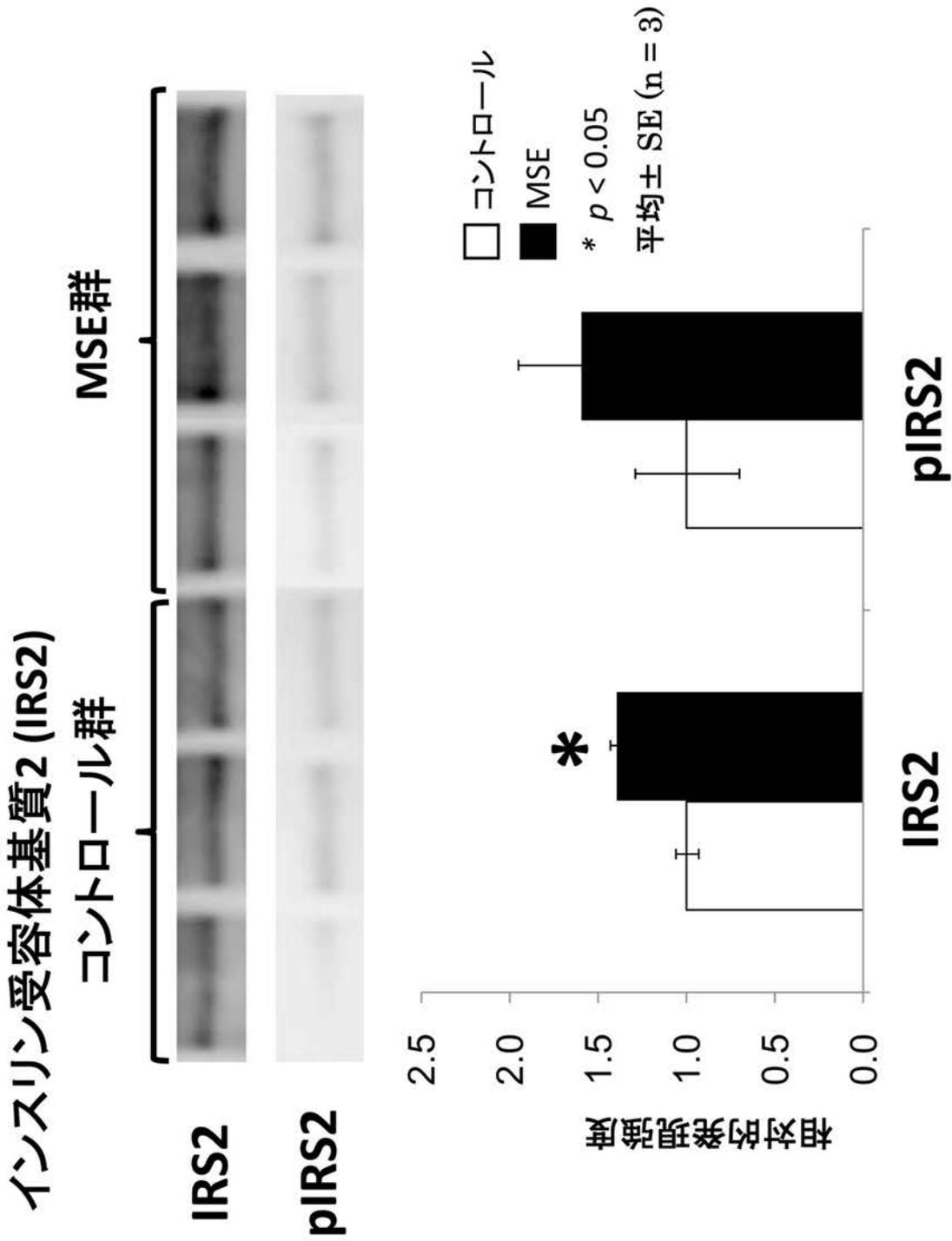
【 図 1 9 】



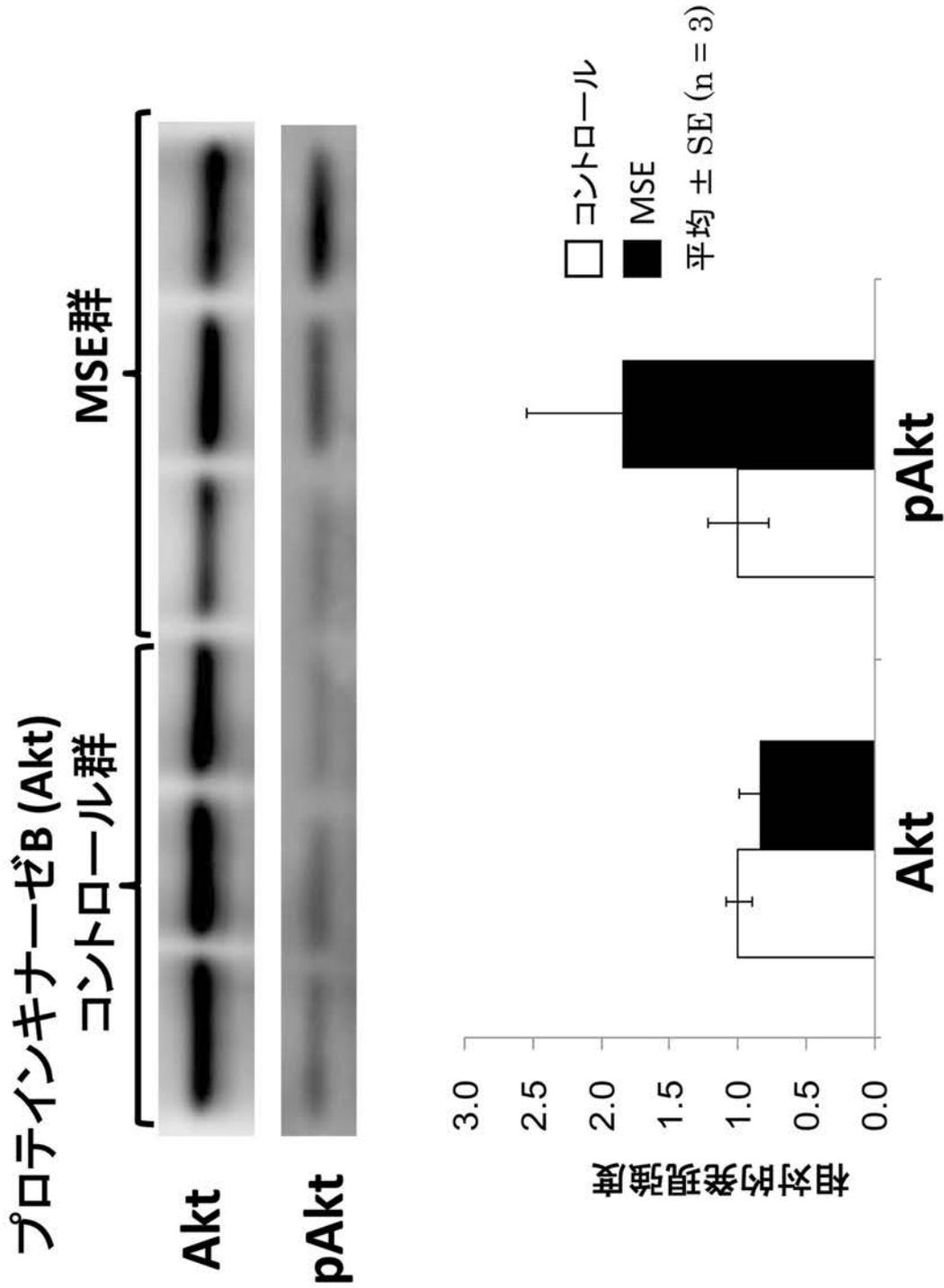
【 図 2 0 】



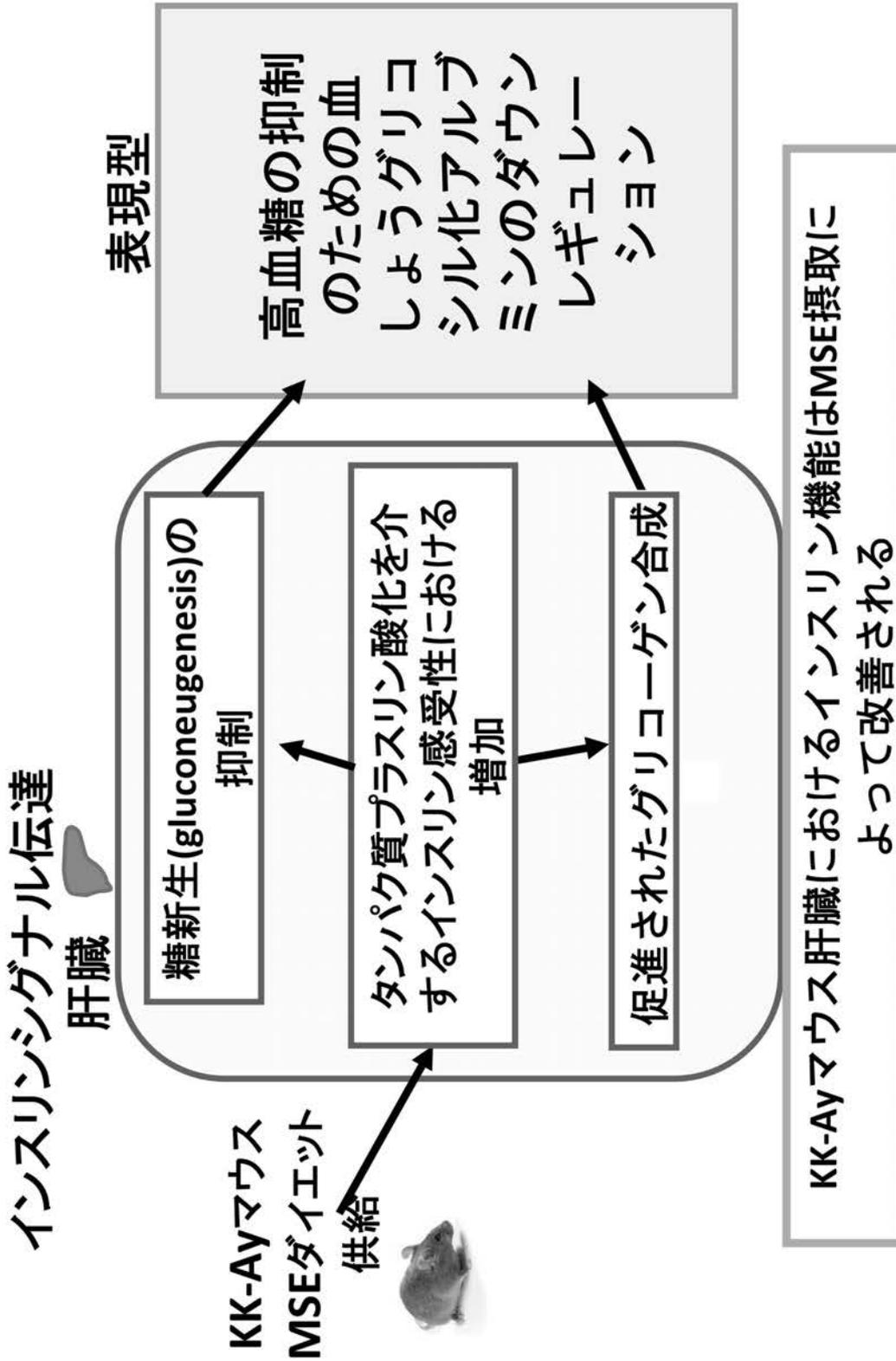
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



表現型

高血糖の抑制のための血しょうグリコシル化アルブミンのダウンレギュレーション

糖新生(gluconeogenesis)の抑制

タンパク質プラスリン酸化を介するインスリン感受性における増加

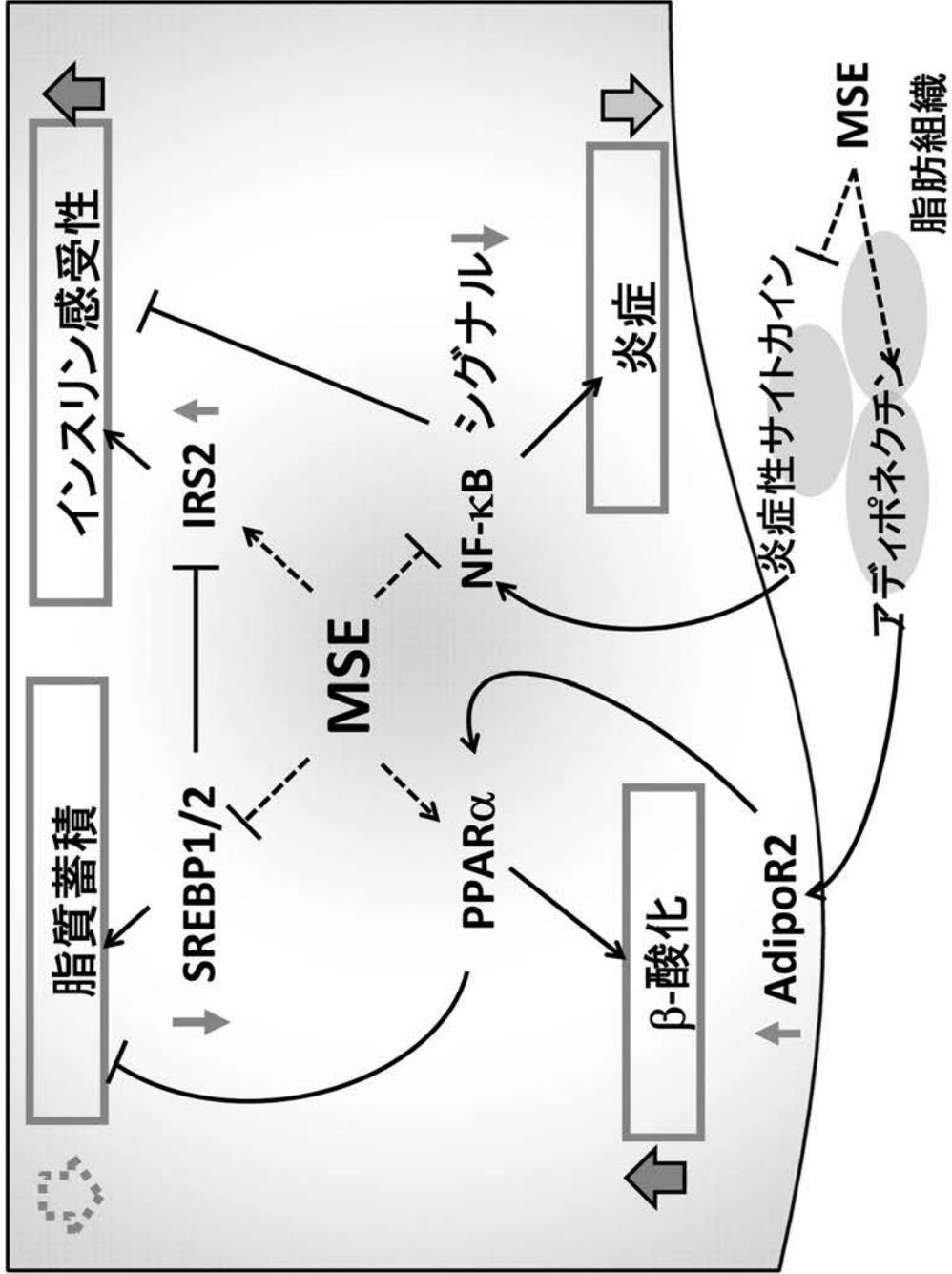
促進されたグリコーゲン合成

KK-Ayマウス MSEダイエツト供給

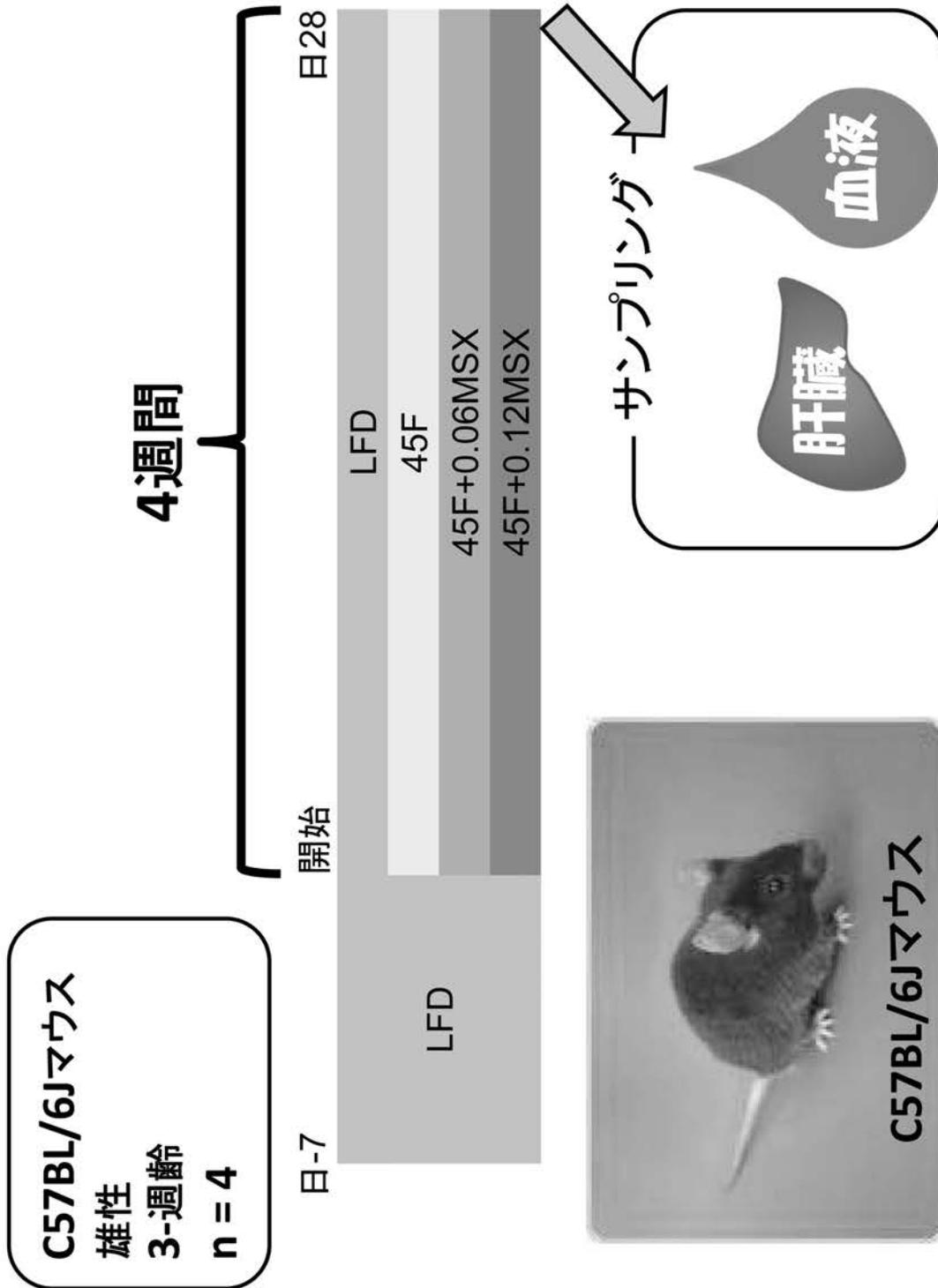
KK-Ayマウス肝臓におけるインスリン機能はMSE摂取によって改善される

【 図 2 4 】

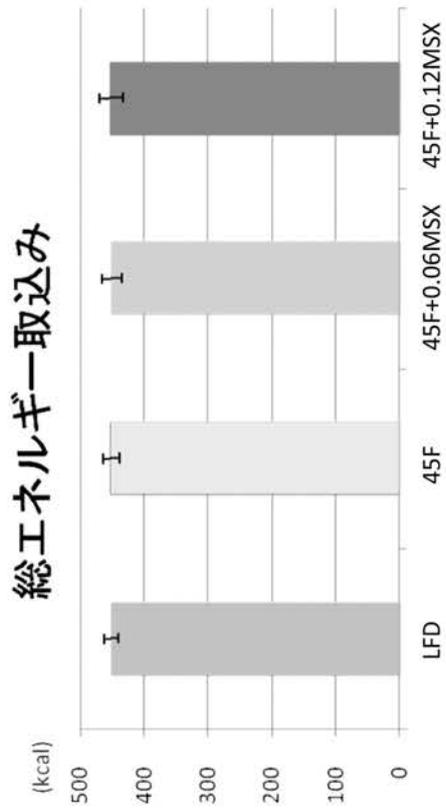
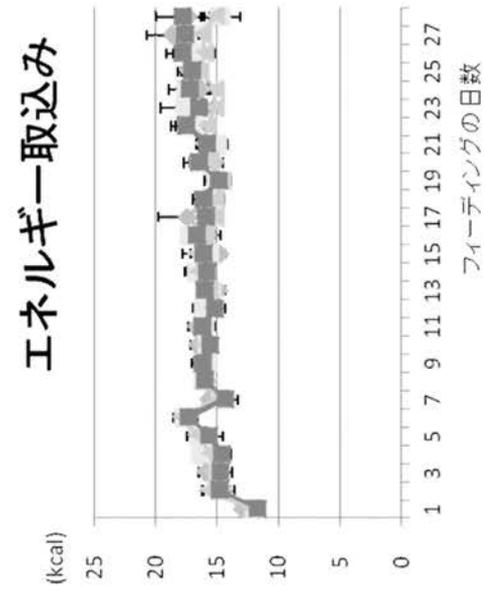
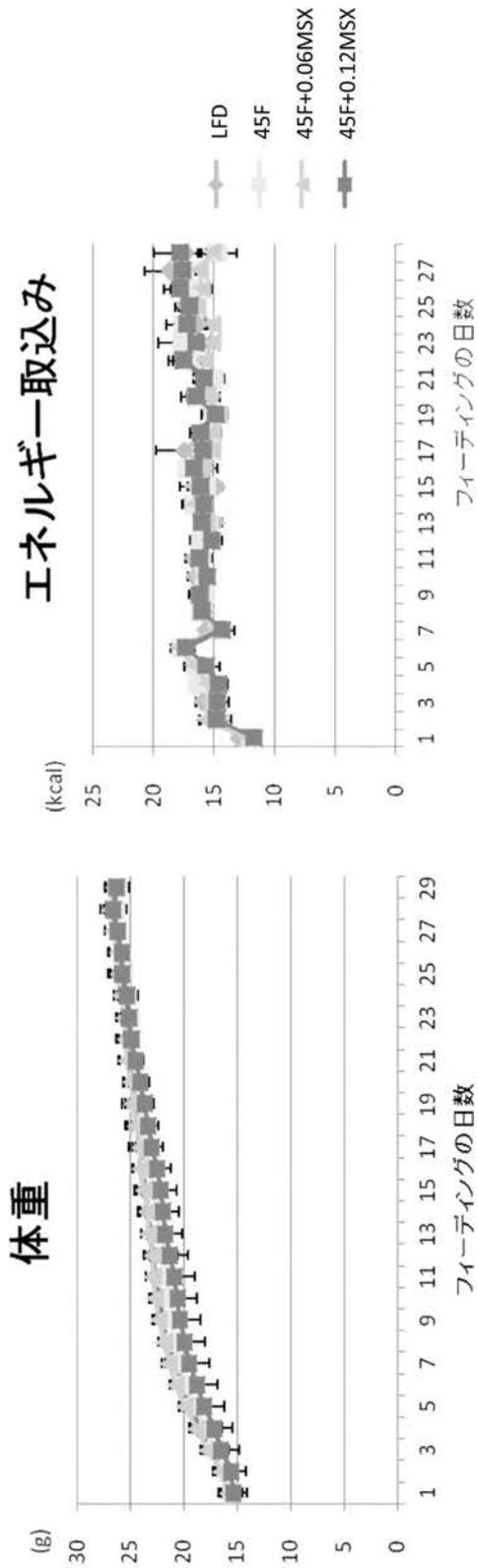
KK-Ayマウスの肝臓に及ぼすMSE摂取の効果の期待されたメカニズム



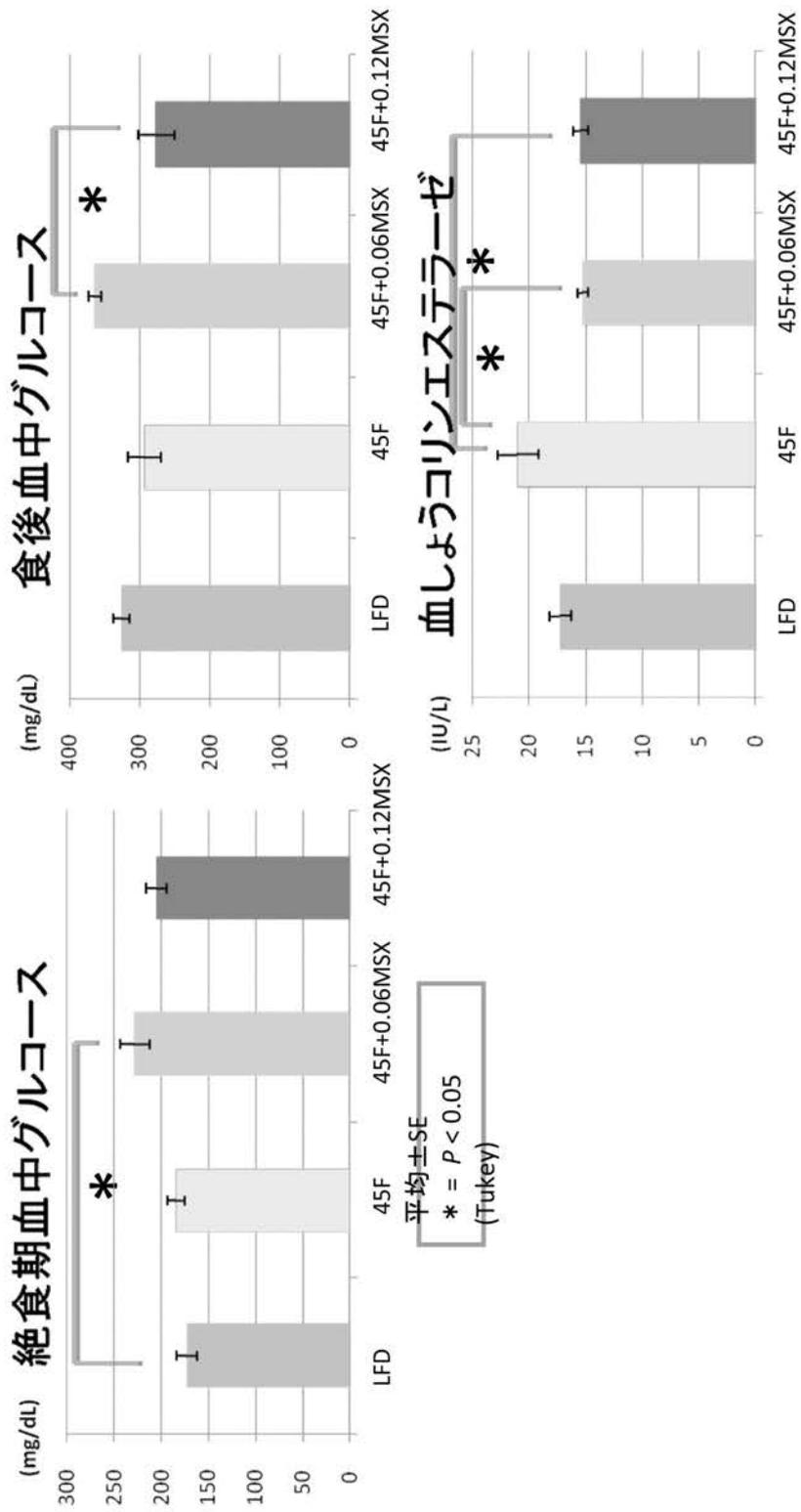
【 図 2 5 】



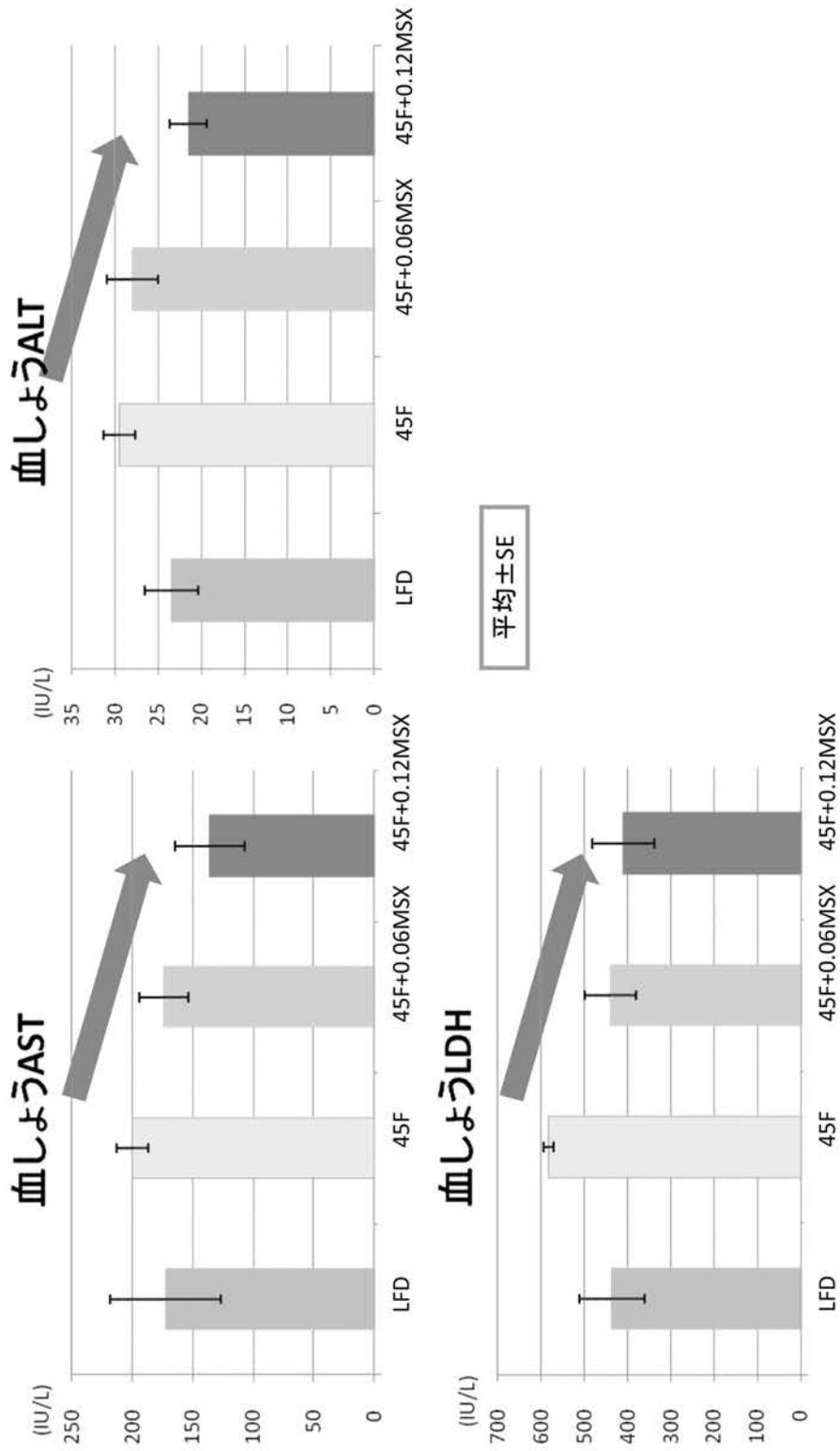
【 図 2 6 】



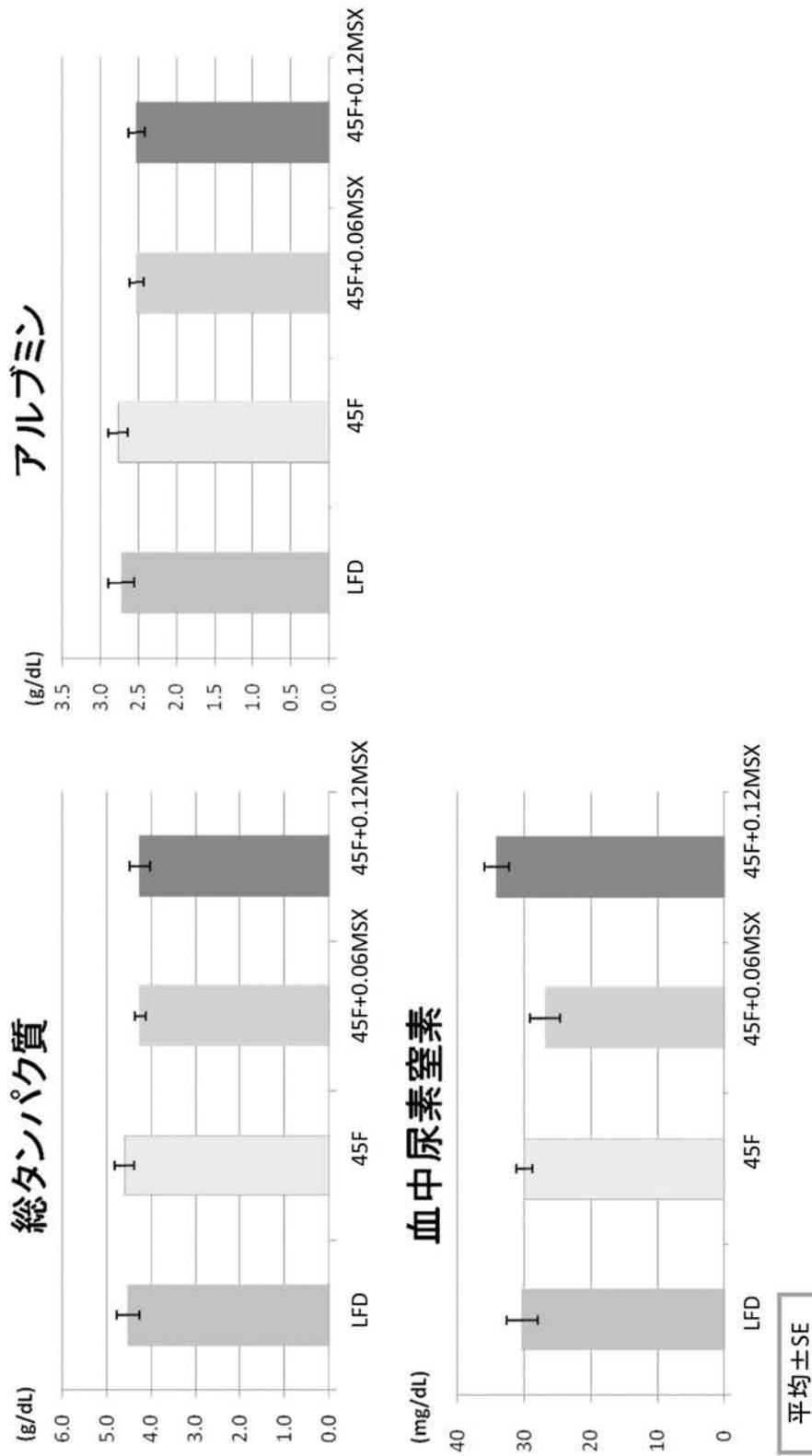
【 図 2 7 】



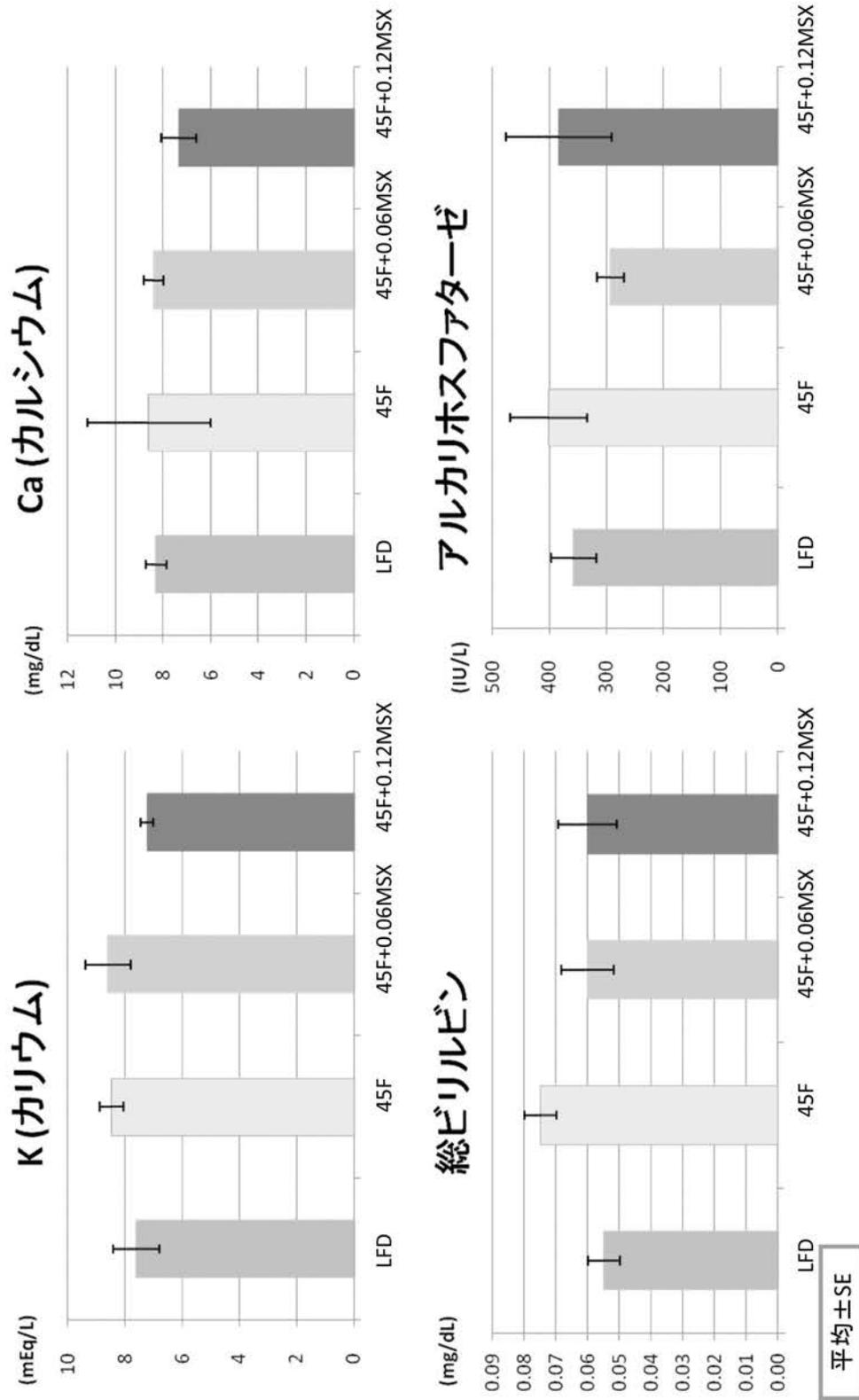
【 図 2 8 】



【 図 2 9 】

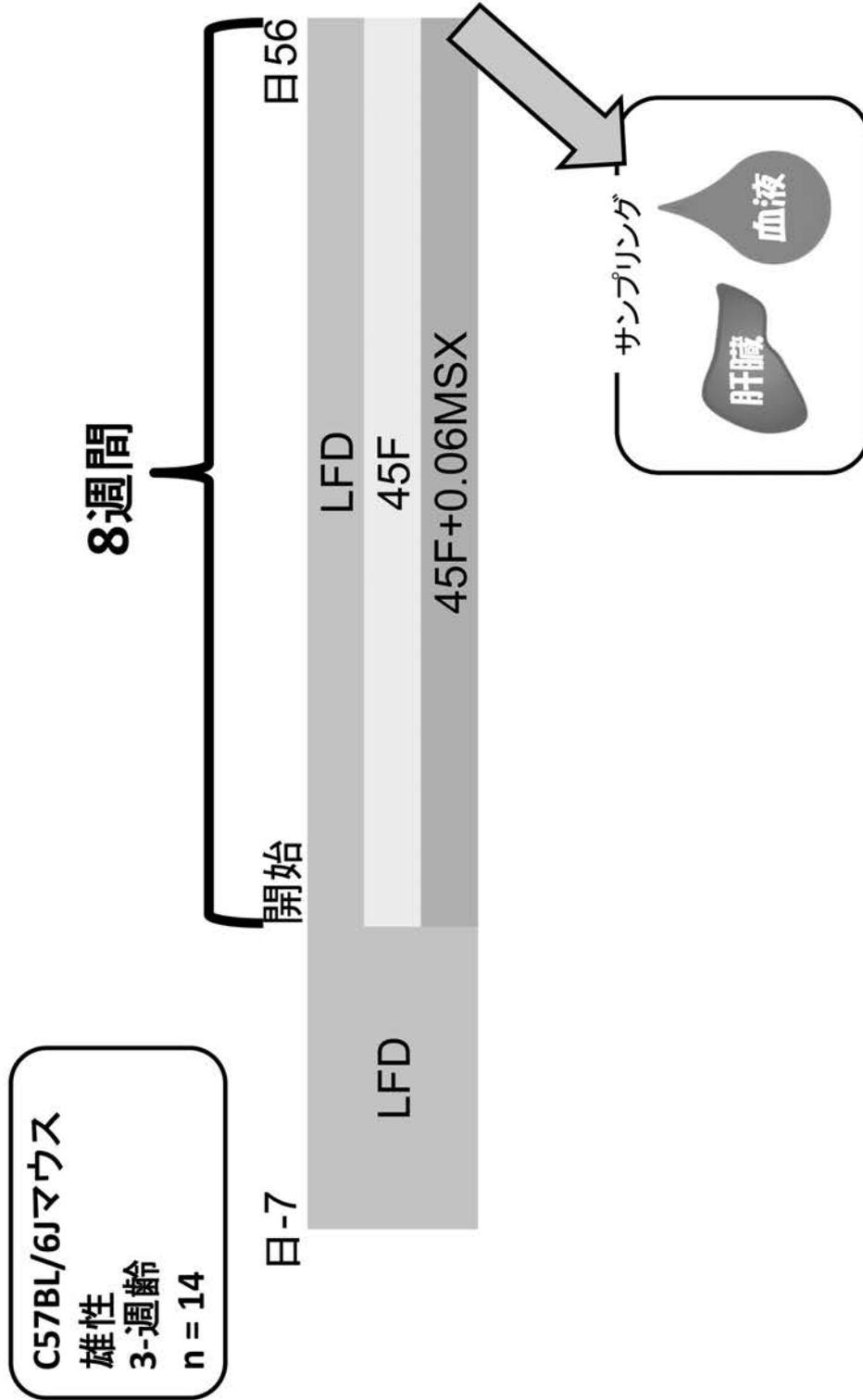


【 図 3 0 】



【 図 3 1 】

新しい実験



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2012/000832
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>A61K 36/77</i> (2006.01), <i>A23L 1/09</i> (2006.01), <i>C13B 50/00</i> (2011.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>A61K 36/77</i> (2006.01), <i>A23L 1/09</i> (2006.01), <i>C13B 50/00</i> (2011.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) SCIRUS, Canadian Patent Database, TotalPatent. Keywords: maple, syrup, diet, sugar cane, extract.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	YAMAUCHI K et al. April 2006 (04-2006) "Histological Intestinal Recovery in Chickens Fed Dietary Sugar Cane Extract" <i>Poultry Science</i> 85(4):645-651, eISSN: 1525-3171 *the whole document*	1, 5-11, 13, 16-17 and 25 2-4, 12, 14-15 and 26-27
X	WO2010/099617 (BELAND G et al.) 10 September 2010 (10-09-2010) *Abstract, Example 6, p. 12, lines 1-14*	28-30
X Y	DESLAURIERS I March 2000 (03-2000) "Recovery, separation and characterization of phenolic compounds and flavonoids from maple products" MSc Thesis, McGill University, Canada, retrieved on 17 December 2012 (2012-12-17) from < http://digitool.Library.McGill.CA:80/R/-?func=dbin-jump-full&object_id=30366&silc_library=GEN01 >	32-35, 40-43 and 47-49 14-15, 26-27, 36-39 and 44-46
[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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.
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 17 December 2012 (17-12-2012)		Date of mailing of the international search report 09 January 2013 (09-01-2013)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Sonja Kosuta (819) 994-9535

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/000832

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UNIVERSITY OF RHODE ISLAND 30 March 2011 (30-03-2011) "54 beneficial compounds discovered in pure maple syrup" <i>Science Daily</i> , retrieved on 17 December 2012 (17-12-2012) from < http://www.sciencedaily.com/releases/2011/03/110330131316.htm > *the entire document*	2-4 and 12
Y	FAVATI F et al. 1994 "Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil" <i>Grasas y Aceites</i> 45(1-2):68-70, eISSN: 1988-4214 *the entire document*	36-39 and 44-46
PX	WATANABE Y et al. 07 December 2011 (07-12-2011) "Ingested maple syrup evokes a possible liver-protecting effect - physiologic and genomic investigations with rats" <i>Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry</i> 75(12):2408-2410, eISSN:1347-6947 *the entire document*	

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2012/000832

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claim Nos. : 21-23 and 31 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :</p> <p style="padding-left: 40px;">Claims 21-23 and 31 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged therapeutic effect derived from the use of a diet comprising maple syrup.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claim Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :</p> <p>The claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:</p> <p>See Extra Sheet.</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :</p> <p style="padding-left: 40px;">Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p style="padding-left: 80px;"><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p style="padding-left: 80px;"><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2012/000832
--

Continued from Box No. III

The nutriprotective effects of a diet comprising sugar plant syrup, or extract thereof, was known in the art on the claim date (D1) and therefore cannot serve as a unifying technical feature. Thus, the claims are directed to a plurality of inventive concepts as follows:

Group A - Claims 1-27 are directed to a nutriprotective diet comprising sugar plant syrup or extract thereof, and related therapeutic uses and methods.

Group B - Claims 28-31 are directed to a nutriprotective carrier comprising a sugar plant syrup or extract thereof, and related method.

Group C - Claims 32-49 are directed to a process for the extraction of polyphenolic compounds from maple syrup.

The claims must be limited to one inventive concept as set out in Rule 13 of the PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/CA2012/000832

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2010099617A1	10 September 2010 (10-09-2010)	CA2753083A1 CN102438639A EP2403511A1 JP2012519659A US2012027735A1 WO2010099617A8	10 September 2010 (10-09-2010) 02 May 2012 (02-05-2012) 11 January 2012 (11-01-2012) 30 August 2012 (30-08-2012) 02 February 2012 (02-02-2012) 18 November 2010 (18-11-2010)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 K 36/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	X
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	B

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

(74) 代理人 100136858

弁理士 池田 浩

(72) 発明者 スティーヴス ポツヴィン

カナダ国 ケベック ジー2ピー 5エイ2 ケベック ナンテル 9580

(72) 発明者 ビンセント ベグード

カナダ国 ケベック ジー1ジー 0ピー1 ケベック リュ ドゥ ダム 7735 ユニテ
503

(72) 発明者 フランソワ ベラン

カナダ国 ケベック ジー2イー 6エル4 リュ ドゥ ジロン 928 ランシエンヌ - ロレ
ット

(72) 発明者 ジュヌピエーヴ ベラン

カナダ国 ケベック ジェイ2エス 4ピー3 サン - ティアシント ル ベイヤン 2460

(72) 発明者 阿部 啓子

埼玉県蕨市南町1 - 16 - 15

Fターム(参考) 4B018 MD16 MD30 MD48 MD94 ME01 ME03 ME08 ME14 MF01 MF14

4C088 AB12 AC02 BA10 BA14 CA14 MA02 NA14 ZA01 ZA15 ZA36

ZA70 ZA75 ZB11 ZB26 ZC33 ZC35