

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-68825
(P2019-68825A)

(43) 公開日 令和1年5月9日(2019.5.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 L 33/10 (2016.01)	A 2 3 L 33/10 Z N A	4 B 0 1 8
A 6 1 K 36/9066 (2006.01)	A 6 1 K 36/9066	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/353 (2006.01)	A 6 1 K 31/353	4 C 0 8 6
A 6 1 K 36/53 (2006.01)	A 6 1 K 36/53	4 C 0 8 8
A 6 1 P 39/06 (2006.01)	A 6 1 P 39/06	

審査請求 有 請求項の数 10 O L 外国語出願 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-234453 (P2018-234453)
 (22) 出願日 平成30年12月14日 (2018.12.14)
 (62) 分割の表示 特願2015-544164 (P2015-544164) の分割
 原出願日 平成25年11月25日 (2013.11.25)
 (31) 優先権主張番号 61/729, 919
 (32) 優先日 平成24年11月26日 (2012.11.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 302070822
 アクセス ビジネス グループ インター
 ナショナル リミテッド ライアビリティ
 カンパニー
 アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 3 5 5,
 エイダ, フルトン ストリート イースト
 7 5 7 5
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗酸化栄養補助食品と、それに関連する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗酸化剤応答配列 (ARE) 又はキノンレダクターゼ (QR) を刺激する、及び/又は関連する遺伝子 (例えばヘムオキシゲナーゼ-1 (HMOX-1)) の発現を誘導するホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスとが、バランスの取れた特定の比率で存在するブレンドを含む補助食品の提供。

【解決手段】 栄養補助食品であって、以下：ホーリー・バジル；ワサビ；及びブロッコリ種子エキス；を含有し、ここで：前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが、この補助食品の中にそれぞれ1：1：0.2の比率で存在し；かつこの補助食品が被験対象に投与されたとき、前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが協働して、キノンレダクターゼの産生刺激、及びヘムオキシゲナーゼ-1(HMOX-1)の発現誘導の1つ以上を引き起こす栄養補助食品。

【選択図】 図 1

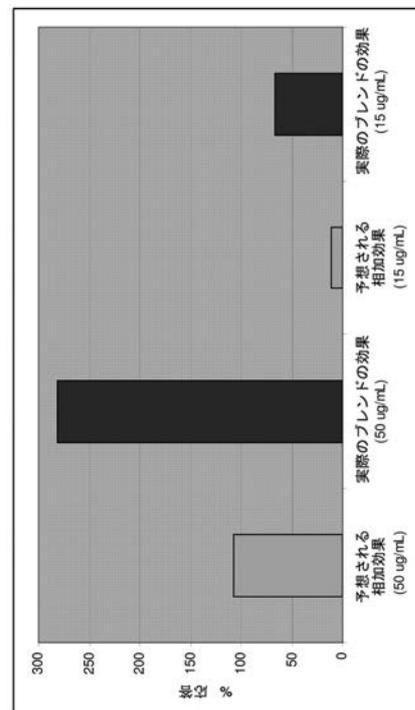


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ターメリックと、
ケルセチンと、
ローズマリーを含有する栄養補助食品であって、
前記ターメリックとケルセチンとローズマリーがこの補助食品の中に1：3：5の比率で存在し、

この補助食品が被験対象に投与されたとき、前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが協働して、AREを刺激することとHMOX-1の発現を誘導することの少なくとも一方を実現する栄養補助食品。

10

【請求項2】

前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが、それぞれ33mg、100mg、167mgの量で中に存在している、請求項1に記載の栄養補助食品。

【請求項3】

前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが、それぞれ66mg、200mg、333mgの量で中に存在している、請求項1に記載の栄養補助食品。

【請求項4】

ビタミンとミネラルの少なくとも一方を含む、請求項1に記載の栄養補助食品。

【請求項5】

栄養補助食品に含めるためのブレンドであって、このブレンドは、ターメリックとケルセチンとローズマリーからなり、そのターメリックとケルセチンとローズマリーが、それぞれ、前記補助食品が被験対象に投与されたとき、AREを刺激することとHMOX-1の発現を誘導することの少なくとも一方に十分な量かつ比率で前記補助食品の中に存在するブレンド。

20

【請求項6】

前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが、1：3：5の比率で前記補助食品の中に存在している、請求項5に記載のブレンド。

【請求項7】

前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが、ARE DNA配列5'-GTGACTCAGCA-3'を含むベクターをステーブルトランスフェクトしたヒト肝細胞中において、前記ターメリックとケルセチンとローズマリーの個別の任意の1つの応答の約2～4倍の応答でAREを刺激するのに十分な比率で存在する、請求項5に記載のブレンド。

30

【請求項8】

前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが、ヒトの尿中の8-イソプロスタンのレベルと血清中のカタラーゼのレベルの一方を低下させるのに十分な比率で存在する、請求項5に記載のブレンド。

【請求項9】

前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが、ヒトにおいてグルタチオンペルオキシダーゼとスーパーオキシドディスムターゼの一方の産生を増やすのに十分な比率で存在する、請求項5に記載のブレンド。

40

【請求項10】

ヒトの食事を補助する方法であって、
ターメリックとケルセチンとローズマリーが1：3：5の比率で存在するように含まれた栄養補助食品を用意し、

その栄養補助食品をヒトに経口投与することで、そのヒトでAREを刺激することと、そのヒトの細胞でHMOX-1の発現を誘導することの一方を実現する操作を含有する方法。

【請求項11】

前記ターメリックとケルセチンとローズマリーが、前記被験対象に経口投与するためのカプセル、錠剤、液体形態のうちの少なくとも1つに含まれている、請求項8に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

ホーリー・バジルと、
ワサビと、

ブロッコリ種子エキスを含有する栄養補助食品であって、
前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、この補助食品の中に1:1:0.2の比率で存在し、

この補助食品が被験対象に投与されたとき、前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、キノンレダクターゼの産生を刺激し、HMOX-1の発現を誘導する栄養補助食品。

【請求項 1 3】

前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、それぞれ136mg、136mg、28mgの量で中に存在している、請求項12に記載の栄養補助食品。

【請求項 1 4】

前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、それぞれ273mg、273mg、54mgの量で中に存在している、請求項12に記載の栄養補助食品。

【請求項 1 5】

栄養補助食品に含めるためのブレンドであって、このブレンドは、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスからなり、そのホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、前記補助食品が被験対象に投与されたとき、キノンレダクターゼ活性を刺激することとHMOX-1の発現を誘導することの少なくとも一方に十分な量かつ比率で前記補助食品の中に存在するブレンド。

【請求項 1 6】

前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、前記補助食品の中に1:1:0.2の比率で存在している、請求項15に記載のブレンド。

【請求項 1 7】

前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、ヒトで尿中の8-イソプロスタンのレベルを低下させるのに十分な比率で存在している、請求項15に記載のブレンド。

【請求項 1 8】

前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、ヒトでスーパーオキシドディスムターゼを増やすのに十分な比率で存在している、請求項15に記載のブレンド。

【請求項 1 9】

ヒトの食事を補助する方法であって、

ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが1:1:0.2の比率で存在するように含まれた栄養補助食品を用意し；

この栄養補助食品をヒトに経口投与し、そのヒトの細胞中でキノンレダクターゼ活性を刺激することとHMOX-1の発現を誘導することの少なくとも一方を実現する操作を含有する方法。

【請求項 2 0】

前記ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが、前記被験対象に経口投与するためのカプセル、錠剤、液体形態のうちの少なくとも1つに含まれる、請求項15に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の開示内容は、補助食品と投与方法に関するものであり、より具体的には、抗酸化剤応答配列(ARE)またはキノンレダクターゼ(QR)を刺激すること、および/または関連する遺伝子(例えばヘムオキシゲナーゼ-1(HMOX-1))の発現を誘導することのできるターメリックとケルセチンとローズマリー、またはホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが特定の比率にされたブレンドを含有する栄養補助食品(栄養補助食品)に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

多彩な症状や疾患（例えば炎症、アレルギー反応、関節の悪化、関節リウマチ、骨粗鬆症、心血管疾患、がんなど）の発症と進展にフリー・ラジカルが重要な役割を演じている。より具体的には、一例として、フリー・ラジカルが脂質分子にダメージを与えると低密度リポタンパク質の過酸化が起こって動脈でプラークの形成が始まる可能性があるため、心血管疾患やアテローム性動脈硬化症になりうると考えられている。別の一例では、フリー・ラジカルがタンパク質分子にダメージを与えると組織構造の変化と免疫異常が起こる可能性があるため、関節リウマチや結合組織の損傷につながり、皮膚の外観や機能が変化する可能性がある。そのため、生物系の体内でフリー・ラジカルを取り除くため、栄養補助食品と食品に抗酸化剤を添加することが大いに注目されている。

10

【0003】

多彩な組成物が抗酸化能力を有することが確認されている。例えば香辛料であるターメリック由来のクルクミンは、抗酸化剤かつ抗炎症剤であることが試験管内と生体内の両方で示されている。ウシ大動脈内皮細胞をクルクミンに曝露することに焦点を当てたいくつかの研究から、クルクミンは、そのような内皮細胞におけるHMOX-1の強力な誘導剤であり、ヘムオキシゲナーゼの活性を大きくすることが示唆されている。Mottetlinin R.他、「クルクミンは抗酸化剤かつ抗炎症剤であり、ヘムオキシゲナーゼ-1を誘導し、内皮細胞を酸化ストレスから保護する」、Free Radic. Biol. Med.、4月15日；第28巻(8)：1303～1312ページ（2000年）。しかしこれらの研究は、クルクミンの全性能を利用しているわけではない。

20

【0004】

それとは無関係な他のいろいろな試みとして、クルクミンを他の諸成分（ケルセチンやローズマリーなど）と組み合わせることが、特定の炎症関連疾患を改善するためになされてきた。例えばDarlandに付与されたアメリカ合衆国特許第6,210,701号（参考としてこの明細書に組み込まれている）では、そのような疾患を改善するため、ターメリックとケルセチンとローズマリーを約2：1：2の比率で組み合わせている。この参考文献には、この比率だと、諸成分の組み合わせをこの比率にして観察された酸素ラジカル吸収能力（ORAC）が、ORACに関して個別のそれら諸成分よりも優れた結果になることも示されている。しかしこの参考文献では、ORACの結果が他の機能（AREやHMOX-1などの発現）に関して似た結果になるかどうかは考察されておらず、これらの発現に対するクルクミンの効果は評価さえされていない。実際、アメリカ合衆国農業省は、最近、ORAC活性はサンプルの実際の健康上の利点を反映していないという仮説があることを考慮して、自らの包括的なORACデータベースを削除した。したがって、これらの領域で探索と改善の余地が残されている。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

補助食品とそれに関連する方法により、ターメリックとケルセチンとローズマリーがバランスの取れた所定の比率で存在する組み合わせまたはブレンドを含む製剤、またはホーリー・バジルとワサビとプロッコリ種子エキスが所定の比率にされた組み合わせまたはブレンドを含む製剤が提供される。この補助食品は、抗酸化剤応答配列（ARE）またはキノレダクターゼ（QR）を刺激する、および/または関連する遺伝子（例えばヘムオキシゲナーゼ-1（HMOX-1））の発現を誘導する。諸成分のこの製剤とブレンドは、この補助食品が投与される被験対象の細胞内の天然抗酸化剤応答経路に相乗的に影響を与えることができる。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

一実施態様では、この製剤は、被験対象に容易に投与できる錠剤またはカプセルまたは他の形態になった栄養補助食品の形態である。この補助食品は、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドを含むことができ、場合によっては他の諸成分も含むことが

50

できる。この栄養補助食品は、ターメリックとケルセチンとローズマリーが補助食品の中で1:3:5という所定の比率で存在するように製剤化することができる。

【0007】

別の一実施態様では、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドを含むこの栄養補助食品は、細胞または被験対象に投与することができる。投与の結果として、このブレンドは細胞または被験対象の中でAREを刺激することができる。AREは、Nrf2転写因子のための結合部位であるDNA配列である。酸化ストレスに対する細胞防御における主要な1つの機構は、Nrf2 AREシグナル伝達経路の活性化である。この経路、特にNrf2は、以下のような諸遺伝子、すなわちそれら遺伝子のタンパク質産物が、反応を通じて、そして細胞の抗酸化能力の増大により、反応性酸化種の減弱化と還元に関する諸遺伝子の発現を制御する。したがってこの補助食品は、酸化ストレスを減らすこと、および/または反応性酸化種と戦うことができる。

10

【0008】

さらに別の一実施態様では、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドの投与により、HMOX-1などの遺伝子の発現を誘導することができる。するとそのように発現した細胞を誘導して保護性酵素（HMOX-1など）の抗酸化バッテリーを提供することができる。

【0009】

さらに別の一実施態様では、ヒトの食事を補助する方法が提供される。この方法は、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドを含み、場合によっては他の諸成分も含む補助食品を用意し；その補助食品をヒトに投与することで、そのヒトの食事を補助する操作を含んでいる。場合によっては、そのヒトは、抗酸化剤が不足して抗酸化剤を補助する必要がある可能性がある。場合によってはさらに、そのヒトは、酸化ストレスを受けているか、反応性酸化種に曝されている可能性がある。

20

【0010】

本発明により、AREを刺激し、および/またはHMOX-1の発現を誘導し、そのことによって酸化ストレスを減らすこと、および/または反応性酸化種と戦うことができるよう、ターメリックとケルセチンとローズマリーと、場合によっては他の諸成分とのブレンドを相乗的な比率で含む製剤が提供される。さらに、この補助食品は、抗酸化状態と栄養状態を改善し、フリー・ラジカルのダメージを最少にできるため、それに伴う疾患と症状を改善するのに使用できる。

30

【0011】

一実施態様では、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドは、ヒトにおける尿中の8-イソプロスタンのレベルと血清中のカタラーゼのレベルのうち的一方を低下させるのに十分な比率で存在している。

【0012】

一実施態様では、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドは、ヒトでグルタチオンペルオキシダーゼとスーパーオキシドディスムターゼの一方の産生を増やすのに十分な比率で存在している。

【0013】

一実施態様では、この製剤は、被験対象に容易に投与できる錠剤、またはカプセル、または他の形態になった栄養補助食品の形態である。この補助食品は、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスと、場合によっては他の諸成分とのブレンドにすることができる。この製剤は、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが補助食品の中に所定の1:1:0.2という比率で存在するように調製することができる。

40

【0014】

別の一実施態様では、栄養補助食品に含めるためのブレンドは、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスを含むことができ、そのホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスは、この補助食品を被験対象に投与するとき、キノンレダクターゼ活性を刺激することとHMOX-1の発現を誘導することのうち少なくとも一方に十分な量と比率で

50

補助食品の中に存在している。

【0015】

一実施態様では、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスのブレンドは、ヒトで尿中の8-イソプロスタンのレベルを低下させるのに十分な比率で存在している。

【0016】

一実施態様では、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスのブレンドは、ヒトでスーパーオキシドディスムターゼを増やすのに十分な比率で存在している。

【0017】

さらに別の実施態様では、ヒトの食事を補助する方法が提供される。この方法は、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスを含んでいて、そのホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスが1:1:0.2の比率で存在する栄養補助食品を用意し；その栄養補助食品をヒトに経口投与することで、キノンレダクターゼ活性を刺激することとHMOX-1の発現を誘導することの一方を実現する操作を含んでいる。

10

【0018】

本発明のこれらの目的、利点、特徴と、他の目的、利点、特徴は、本発明の実施態様と図面の説明を参照することで、より十分に理解し、評価することができよう。

【0019】

実施態様を詳細に説明する前に、本発明が、操作の詳細や、以下の説明や図面に示した諸要素の構成や配置の詳細には限定されないことを理解されたい。本発明は、さまざまな他の実施態様で実現することや、この明細書に明示的に開示したのではない別の方法で実施したり遂行したりすることができる。また、この明細書で用いる句や用語は記述を目的としているため、限定的であると見なしてはならないことを理解されたい。“含む”と“包含する”ならびにこれらのパリエーションの使用は、その後に列挙した項目ならびにその等価物のほか、追加の項目とその等価物を包含することを意味する。さらに、さまざまな実施態様の記述では列挙を利用することができる。明示的に断わらない限り、列挙の利用は、本発明を諸成分の特定の順番や数に制限すると見なしてはならない。さらに、列挙の利用は、列挙した工程や諸成分と組み合わせられたり、列挙した工程や諸成分に含まれたりする可能性のある追加のあらゆる工程や諸成分を本発明の範囲から除外することであると見なしてもならない。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0020】

【図1】異なる濃度でのAREアッセイにおいて、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドの相乗効果を、このブレンドで予想される相加効果と比較して示したグラフである。

【0021】

【図2】AREアッセイにおいて、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドの相乗効果を、このブレンドで予想される相加効果およびターメリックとケルセチンとローズマリーの個別の成分の効果と比較して示したグラフである。

【0022】

【図3】AREアッセイにおいて、ターメリックとケルセチンとローズマリーのさまざまな比率のブレンドの相乗効果を示すグラフである。

40

【0023】

【図4】AREアッセイにおいて、ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドの相乗効果と個別の成分の効果をさまざまな濃度について示すグラフである。

【0024】

【図5】ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンドのEC50値を示すグラフである。

【0025】

【図6】HMOX-1遺伝子の発現に関し、ターメリックとケルセチンとローズマリーを1:3:5の比率にしたブレンドの相乗効果と、個別の成分の効果を示すグラフである。

50

【0026】

【図7】ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスを異なる比率で50 µgにしたブレンドの効果を示すグラフである。

【0027】

【図8】ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスを1:1:0.2の比率にしたブレンドのキノンレダクターゼ(QR)の用量依存活性を示すグラフである。

【0028】

【図9】HMOX-1遺伝子の発現に対するホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスのブレンドの効果を示すグラフである。

【0029】

【図10】臨床研究のためのスケジュールの概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本実施態様により、ターメリックとケルセチンとローズマリーの組み合わせまたはブレンドを含む製剤が提供される。ターメリックとケルセチンとローズマリーは、このブレンドの中に、そして一般に製剤の中に、1:3:5の比率で存在することができる。あるいは製剤は、1:1:0.2の比率で存在するホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスを含むことができる。製剤そのものは、以下に記載する多彩な送達用ビヒクルに入れて、被験対象(ヒトやそれ以外の哺乳動物)への投与に適した栄養補助食品に組み込むことができる。原始的な形態のブレンドも、試験管内での試験や応用に適した送達用ビヒクル(溶液や濃縮液など)に組み込むことができる。

【0031】

ターメリックとケルセチンとローズマリーは、多彩な供給源からのものが可能である。ターメリックは、例えば、クルクマ・ロンガに由来するもの、クルクマ・ロンガから抽出したもの、クルクマ・ロンガからそれ以外の方法で得たものが可能である。クルクマ・ロンガとは、ショウガ科の根茎性、草本性、多年生の植物である。状況によっては、クルクマ・ロンガを他のショウガ科植物材料で置き換えることができる。ターメリックは、製剤および/またはブレンドの中にさまざまな量で存在することができる。ターメリックは、例えば、製剤または栄養補助食品の重量%にして、下限値が1%、2%、3%、4%、5%のいずれかであり、それに対応する上限値が12%、15%、17%、20%のいずれかである範囲で存在することができる。さらに別の一例として、ターメリックは、製剤または栄養補助食品のミリグラム単位の重量にして、下限値が10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50mgのいずれかであり、それに対応する上限値が130 mg、140 mg、150 mg、160 mg、170mgのいずれかである範囲で存在することができる。

【0032】

ケルセチンは、多彩な果実、野菜、草木(柑橘類の果実、リンゴ(例えばマルス・ドメスティカ)、タマネギ(アリウム・ケパなどだが、それに限定されない)、パセリ、セージ、茶、ブルーベリー、ブラックベリー、コケモモ、ファヴァ・ダンタ(Fava d' anta)(例えばディモルファンドラ・モリス)、ソフォラ・ジャボニカなど)に由来するもの、それらから抽出したもの、それらからそれ以外の方法で得たものが可能である。ケルセチンは、製剤および/またはブレンドの中にさまざまな量で存在することができる。ケルセチンは、例えば、製剤または栄養補助食品の重量%にして、下限値が3%、4%、5%のいずれかであり、それに対応する上限値が33%、35%、40%のいずれかである範囲で存在することができる。さらに別の一例として、ケルセチンは、製剤または栄養補助食品のミリグラム単位の重量にして、下限値が20 mg、30 mg、40 mg、50mgのいずれかであり、それに対応する上限値が440 mg、450 mg、460 mg、470mgのいずれかである範囲で存在することができる。

【0033】

ローズマリーは、ロスマリヌス・オフィキナリスに由来するもの、ロスマリヌス・オフィキナリスから抽出したもの、ロスマリヌス・オフィキナリスからそれ以外の方法で得た

10

20

30

40

50

ものが可能である。ロスマリヌス・オフィキナリスは、シソ科の草本性、多年生の植物である。状況によっては、ロスマリヌス・オフィキナリスを他のシソ科の植物材料で置き換えることができる。ローズマリーは、製剤および/またはブレンドの中にさまざまな量で存在することができる。ローズマリーは、例えば、製剤または栄養補助食品の重量%にして、下限値が4%、5%、6%、7%いずれかであり、それに対応する上限値が45%、50%、55%、60%のいずれかである範囲で存在することができる。さらに別の一例として、ローズマリーは、製剤または栄養補助食品のミリグラム単位の重量にして、下限値が45 mg、50 mg、55 mg、60mgのいずれかであり、それに対応する上限値が740 mg、750 mg、760 mg、770mgのいずれかである範囲で存在することができる。

【0034】

ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスも多彩な供給源からのものが可能である。ホーリー・バジルは、シソ科の植物オキムム・サンクトゥム(トゥルシーまたはトゥラシーとしても知られる)に由来するもの、オキムム・サンクトゥムから抽出したもの、オキムム・サンクトゥムからそれ以外の方法で得たものが可能である。状況によっては、ホーリー・バジルを他のバジル(スイート・バジル(オキムム・バシリクム)などだが、それに限定されない)で置き換えることができる。ホーリー・バジルは、Verdure Sciences社(ノブレスヴィル、インディアナ州)を含め、いくつかの供給源から入手することができる。

【0035】

ワサビ材料は、純粋な根茎を乾燥させた粉末として、ワサビア・ジャポニカに由来するものが可能である。ワサビアは、キャベツ、セイヨウワサビ、カラシが含まれるアブラナ科の一員である。状況によっては、ワサビア・ジャポニカをアブラナ科からの他の植物材料で置き換えることができる。ワサビ粉末は、B&D Nutritional Ingredients社(ヴィスタ、カリフォルニア州)を含め、多彩な供給源から入手することができる。

【0036】

ブラシカ・オレラケア・イタリカからのエキス、すなわちブロッコリ種子エキスは、アブラナ科の植物に由来する。ブロッコリ種子エキスは、13%グルコラファニンに標準化されている可能性がある。なおグルコラファニンはグルコシノレート的一种であり、イソチオシアネートの一種であるスルフォラファンの前駆体である。ブラシカ・オレラケアは、キャベツ、ブロッコリ、カリフラワー、芽キャベツ、サボイキャベツ、中国ケールを含んでいる種である。状況によっては、ブロッコリ種子エキスをアブラナ科からの他の植物材料で置き換えることができる。ブロッコリ種子エキスは、B&D Nutritional Ingredients社(ヴィスタ、カリフォルニア州)から入手することができる。

【0037】

これらのブレンドは、製剤中でさまざまなやり方で混合することができる。例えば製剤が以下に記載するような他の諸成分を含んでいる場合、ブレンドは、それがどのような物理的形態を取っていようと、一般に製剤全体で均一になるように、それら他の諸成分と直接混合することができる。もちろん、ときにはブレンドをあらかじめ混合しておいき、他の諸成分に添加して製剤を製造することもできる。望むのであれば、ブレンドの諸成分を、マイクロカプセルや、コーティングや、他の構造体の中で、他の諸成分の内部に集積させることができる。

【0038】

製剤は、上述のように、栄養補助食品中に含めることができる。この補助食品は、錠剤、粉末、ゲル、液体いずれかの形態にすることができる(本発明の目的では、この明細書全体を通じ、錠剤は、固体経口投与物の任意の形態を意味し、その中には、錠剤、カプレット、カプセル、粉末などが含まれる)。補助食品は、消費可能な液体(牛乳、ジュース、水など)と混合するための粉末として、または他の食品用液体または食品の中に混合するための消費可能なゲルやシロップとして製剤化することができる。補助食品は、他の食品または液体とともに製剤化してあらかじめ計量した補助食品(例えば一回使用の棒)にすることもできる。用途に応じ、香料、賦形剤、結合剤、タンパク質、炭水化物複合体、

10

20

30

40

50

保存剤、キレート剤などを添加することができる。

【0039】

製剤は、栄養補助食品にすると、1個以上の錠剤として1日に2回投与することができる。もちろん、望むのであれば、栄養補助食品は、他の形態で投与することや、望みに応じて単位用量の形で投与することができる。

【0040】

栄養補助食品は、医薬として許容可能な任意の形態の他の諸成分（それは例えば、濃縮液、ファイトケミカル、ビタミン、ミネラル、他の栄養素であり、その中には塩やその誘導体が含まれる）を利用して製剤化することができる。製剤と補助食品で使用するのに適したビタミンとして、例えば、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ナイアシン/ナイアシンアミド、パントテン酸、葉酸、ピオチン、コリン、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンEが挙げられる。これらビタミンは、場合によっては植物やそれ以外の天然供給源に由来するものである。上記のビタミンに加え、製剤と補助食品で使用するのに適したミネラルとして、ホウ素、カルシウム、クロム、銅、ヨウ素、マグネシウム、マンガン、モリブデン、カリウム、セレン、バナジウム、亜鉛が挙げられる。他のビタミンとミネラルも使用できる。

10

【0041】

場合によっては、この明細書に記載した製剤とブレンドは、その中でも特にブレンドは、抗酸化剤とそれに関連する栄養素が不足しているか不足する傾向があることが判明しているヒト、被験対象、生物系に投与すること、および/または酸化ストレスを受けやすいか受けているヒト、被験対象、生物系に投与すること、および/または反応性酸化種に曝されてきたヒト、被験対象、生物系に投与すること、および/またはそれに付随する疾患や症状を呈しやすいか、その疾患や症状が確認されているヒト、被験対象、生物系に投与することができる。場合によってはさらに、被験対象は、必要とされる製剤の投与の恩恵を受ける可能性があるかどうかや、定期的な補助食品療法のコースとして製剤を単純に投与できるかどうかを評価するための通常の試験を受けることができる。

20

【0042】

本発明の実施態様の製剤を以下の実施例で説明するが、その製剤が以下の実施例によって制限されることは意図していない。

【実施例1】

30

【0043】

ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンド（TQRブレンド。この明細書ではブレンドAとも呼ぶ）を含む製剤を試験して、このブレンドのAREを評価した。特に、個別の3つの成分、ターメリックとケルセチンとローズマリーを、単独に試験するとともに、ブレンドとしての組み合わせで試験した。試験では、AREを調べる通常のアッセイを利用した。一般に、アッセイには、ベクターをステーブルトランスフェクトしたヒト肝細胞系HepG2（ヴァージニア州マナサスのATCCから入手）が含まれていた。このベクターは、レポータとしてホタルのルシフェラーゼ遺伝子を用いた最小プロモータの上流にARE DNA配列（5'-GTGACTCAGCA-3'（配列番号：1））の繰り返しを4つ含んでいた。次に、この実施例と以下に記載の他の実施例では、これらの細胞を、さまざまな濃度にした個別の成分であるターメリック、ケルセチン、ローズマリーと、TQRブレンドで48時間処理した。ヒト肝細胞を溶解させ、Biotium社（ハイワード、カリフォルニア州）から購入したルシフェラーゼ基質を添加し、相対的蛍光値をすべてのサンプルで取得した。結果は、対照と比較とした%応答として示す。対照物質は、10 μMのスルフォラファンであった。

40

【0044】

一般に、組み合わせTQRブレンド（ブレンドA）を用いた処理により、異なる濃度においてさえ、個別の成分で予想される活性を足し合わせたよりも有意に大きなARE活性が誘導されたことを結果は示している。例えば図1に示したように、予想される相加応答は、各成分をそれぞれ単独で試験したときの%応答を合計することによって計算した。相乗効果が生じないのであれば、ブレンドの実際の%応答は相加%応答にほぼ等しくなることが予

50

想された。しかし、ブレンドを用いた処理では、試験した両方の濃度、すなわち15 µg/mlと50 µg/mlで、予想よりも3~5倍大きい応答が観察された。その結果として、TQRブレンドでは、ターメリックとケルセチンとローズマリーという3種類の成分が相乗的に作用してAREを活性化させることが結論された。

【0045】

図2に示したように、AREアッセイにおいて、ターメリックとケルセチンとローズマリーという3種類の成分それぞれを個別に試験するとともに、TQRブレンドにした組み合わせを試験した。50 µg/mlの濃度におけるTQRブレンドの実際の%応答は、50 µg/mlの濃度で予想される相加効果の%応答よりも有意に高く、ほぼ2.5倍であった。なお予想される相加効果の%応答は、ターメリックとケルセチンとローズマリーの%応答を、それらの重量%を考慮して足し合わせるによって単純に計算した。ここから、TQRブレンドがAREに対して相乗効果を有することが再び確認された。

10

【実施例2】

【0046】

ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンド、すなわちTQRブレンド(ブレンドA)を含む製剤をさらに調べ、これら成分の相乗比を明らかにした。特に、実施例1のAREアッセイでターメリック:ケルセチン:ローズマリーをさまざまな比率にして試験し、最も相乗的な組み合わせを求めた。どのブレンドも50 µg/mlの濃度で試験した。図3に示したように、TQRブレンドで試験した最も相乗的な比率に、1:3:5の比率のターメリックとケルセチンとローズマリーが含まれることが見いだされた。これは予想外であった。というのも、以前は、ターメリックの相対的な比率がより大きいと、全体的な相乗効果を向上させるはずであるように思われたからである。だが何らかの理由で、ターメリックの相対的なレベルがより低いと相乗効果が増大した。それはおそらく、ターメリックが、10~20 µg/mlよりも大きな濃度では培養中の細胞にとって毒性を持っていたからであろう。

20

【実施例3】

【0047】

ターメリックとケルセチンとローズマリーのブレンド、すなわちTQRブレンド(ブレンドA)を含む製剤をさらに調べ、これら成分が1:3:5であるときの相乗比率を異なるさまざまな濃度で評価・検証した。特に、図4に示したように、ターメリック、ケルセチン、ローズマリーという個別の成分それぞれを異なる濃度(単位はµg/ml)にしてAREアッセイで調べ、対応する濃度(単位はµg/ml)において、その異なるさまざまなTQR濃度でそれら成分を1:3:5の比率にしたTQRブレンドと比較した。試験の結果として、TQRブレンドは、ターメリックとケルセチンとローズマリーが1:3:5の比率になっていて50 µg/mlの濃度であるとき、AREアッセイにおける%応答が、その濃度でのターメリックとケルセチンとローズマリーのどの個別の1つの対応する%応答よりも、少なくとも1倍、または2倍、または3倍、または4倍、または5倍、または6倍、または7倍、または8倍大きいことが観察された。例えばケルセチンは約50%の応答を示したのに対し、TQRブレンドは約375%の応答を示した。

30

【0048】

TQRブレンドの濃度が60 µg/mlで、ターメリックとケルセチンとローズマリーが1:3:5の比率になっているとき、このTQRブレンドは、AREアッセイにおける%応答が、その濃度でのターメリックとケルセチンとローズマリーのどの個別の1つの対応する%応答よりも、少なくとも1倍、または2倍、または3倍、または4倍、または5倍、または6倍、または7倍大きいことも観察された。例えばケルセチンは約75%の応答を示したのに対し、TQRブレンドは約525%の応答を示した。

40

【0049】

それに加え、TQRブレンドの濃度が70 µg/mlで、ターメリックとケルセチンとローズマリーが1:3:5の比率になっているとき、このTQRブレンドは、AREアッセイにおける%応答が、その濃度でのターメリックとケルセチンとローズマリーのどの個別の1つの対応する%応答よりも、少なくとも1倍、または2倍、または3倍、または4倍、または5倍、また

50

は6倍、または7倍、または7.5倍大きいことが観察された。例えばケルセチンは約80%の応答を示したのに対し、TQRブレンドは約600%の応答を示した。

【0050】

さらに、TQRブレンドの濃度が80 µg/mlで、ターメリックとケルセチンとローズマリーが1:3:5の比率になっているとき、このTQRブレンドは、AREアッセイでの%応答が、その濃度でのターメリックとケルセチンとローズマリーのどの個別の1つの対応する%応答よりも、少なくとも1倍、または2倍、または3倍、または4倍、または5倍、または6倍、または7倍大きいことが観察された。例えばケルセチンは約90%の応答を示したのに対し、TQRブレンドは約525%の応答を示した。

【0051】

さらに試験することで、TQRブレンドは用量に依存してAREを活性化することがわかった。それを図5にEC50値のグラフで示す。

【実施例4】

【0052】

上記の実施例で示された相乗効果をさらに試験して検証するため、個別のターメリックとケルセチンとローズマリーと、1:3:5の比率にしたTQRブレンド(ブレンドA)が、ヘムオキシゲナーゼ-1の遺伝子発現に及ぼす効果を二次アッセイで評価した。一般に、二次アッセイでは、ヒト乳癌MCF-7を、一晩にわたり、ターメリック(1.3 µg/ml)、ケルセチン(3.9 µg/ml)、ローズマリー(6.5 µg/ml)のそれぞれで個別に処理するとともに、TQRブレンド(15 µg/ml)で処理した。翌日、処理した細胞からmRNAを単離し、2段階のRT-qPCRを実施した。図6に示した結果から、それぞれの成分がこれらの細胞で3倍を超えるHMOX-1の発現を誘導したことが証明される。これら成分をすべて足し合わせると、相加効果は約11.9倍になることが予想されよう。しかしTQRブレンドの実際の応答は、50.9倍であった。このことに基づき、TQRブレンドの応答は、ターメリックとケルセチンとローズマリーの相加効果によるHMOX-1発現応答の少なくとも2倍、または3倍、または4倍、または5倍であることが予想される。

【実施例5】

【0053】

ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスのブレンド(ブレンドB)を含む製剤を試験し、キノンレダクターゼ(QR)酵素を誘導する能力を評価した(II相)。QRは、AREを上方調節するのと同じシグナルによって活性が上方調節される酵素である。特に、これら3種類の材料を、個別に試験するとともに、さまざまな比率のブレンドとしての組み合わせで試験した。さまざまな比率には、ホーリー・バジル:ワサビ:ブロッコリ種子エキスが、2:1:0.1、2:1:0.2、1:1:0.1、3:3:0.6、1:1:0.6、1:1:0.5、1:2:0.2が含まれる。試験では、QR活性を求調べる通常のアッセイを利用した。一般に、このアッセイには、ヴァージニア州マナサスのATCCから入手したマウス肝細胞系Hepalclc7が含まれていた。次に、この実施例では、これらの細胞を、ホーリー・バジル、ワサビ、ブロッコリ種子エキスという個別の材料と、さまざまな比率のブレンドで48時間処理した。マウス肝細胞を溶解させ、QR基質(グルコース6リン酸、フラビンアデノシンジヌクレオチド("FAD")、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸("NADP")、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、MTT、メナジオンを含む)を添加し、室温で3~4分間インキュベートして紫色を発色させた(QR活性の指標)。QRの活性は、610nmでの吸収値に比例していた。ブレンドの比率の結果を、対照と比較した%応答として図7に示す。対照の基質は、1Mのスルフォラファンであった。

【0054】

この明細書で以下に議論する臨床試験で用いるため、ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスの比率を1:1:0.2に選択した。この比率におけるキノンレダクターゼの活性化の用量依存性の研究を実施した。その結果を図8に示す。

【0055】

抗酸化遺伝子発現に対するブレンドB(ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エ

10

20

30

40

50

キス)の効果を図9に示す。5 μ gの濃度のホーリー・バジル、5 μ gの濃度のワサビ、1 μ gの濃度のブロッコリ種子エキスを組み合わせた。RT-qPCRを実施した。実施例4に関して説明したのと同じ方法で測定すると、各サンプルは、個別に、HMOXを約1.5倍誘導したのに対し、3種類すべての存在下では応答が約2倍であった。

【0056】

臨床分析

植物をベースとした異なる4種類のブレンド(ブレンドA、B、C、D)をそれぞれ2通りの用量(300mgと600mg)で調製した。研究に参加する健康な男性を60人集めた。参加者は、ランダムに4つの群に分け、4種類のブレンドそれぞれに15人の参加者を割り当てた。ブレンドAとブレンドBを消費することを選択した参加者群からの結果は、この明細書の中でのちに議論する。ブレンドCとブレンドDを消費することを選択した参加者群からの結果は、本発明とは関係がない。なぜならブレンドCとブレンドDは、ブレンドAとブレンドBとは異なる材料のブレンドを含んでいるからである。

10

【0057】

加齢は酸化ストレスのモデルであると考えられているため、45~65歳の年齢の参加者からなる比較的高齢の部分集団を選択した。個々人の人種的背景は考慮しなかった。しかしブエナ・パーク、カリフォルニア州のサウスベイ・ファルマ研究サイトの参加候補集団には、約40%の白人、20%のヒスパニック、30%のアジア/太平洋諸島の人、10%のその他の人が含まれている。結果に対するホルモンの影響を避けるため、女性は除外した。参加者をスクリーニングし、慢性疾患や健康上の大きな問題を抱えている人を除外した。さらに、現在の食事ガイドラインで推奨されている食品を各人がどのレベルで消費しているかを明らかにするため、参加候補者は、推奨食品チェックリスト("RFC")と62品目食品頻度アンケート("FFQ")に記入した。果実と野菜の摂取が少ない参加者を選択してさらにスクリーニングした。

20

【0058】

薬と食品のなかには、Nrf2/ARE経路を活性化するか抑制する能力を持つという理由で、酸化ストレス・バイオマーカーのレベルを変化させる可能性があるものがある。一般的な医薬や食品からの潜在的な干渉(偽陽性の結果など)を避けるため、血液と尿のサンプルを回収する少なくとも10時間の間は、参加者は、以下の品目を消費することが許されなかった。

30

【0059】

1. スタチン(例えばシンバスタチン、フルバスタチン)。これらは、Nrf2/ARE経路を活性化するか抑制する可能性があってARE受容体に影響を与えると考えられるため；

【0060】

2. NSAID(アスピリンを含む)；

【0061】

3. 一酸化窒素(eNOS)アクチベータ(スタチンを含む)；

【0062】

4. セレギリン。AREを活性化する可能性があるため；

【0063】

5. パイアグラ(登録商標)などのPDE5阻害剤。AREを活性化する可能性があるため(HMOX-1の上方調節と血管NOの増加が証明されている)；

40

【0064】

6. (血圧用の)アンギオテンシンII受容体阻害剤テルミサルタン；

【0065】

7. カプサイシン(香辛料)、コーヒー、茶、ハーブ茶。これらはARE経路を活性化させる可能性があるため。

【0066】

参加者は、基本的な健康情報と医学情報を収集された後、一晚(少なくとも10時間)絶食に耐え、その後、血液サンプルと尿サンプルを回収されて酸化ストレス・バイオマーカー

50

ーと遺伝子発現のベースライン・レベルが調べられた。初期サンプルを回収した後、参加者をA群またはB群に割り当てた。各群に関する研究スケジュールをまとめた概略図を図10に示す。A群は、低用量のブレンドAを14日間摂取し、次いで高用量のブレンドAを14日間摂取した後、高用量のブレンドAに加えてビタミンとミネラルと色ブレンドを14日間摂取した。B群は、低用量のブレンドBを14日間摂取した。B群は、その14日間の低用量相の後、高用量のブレンドBを14日間供給された。14日間の期間が終了した後、より高用量の補助食品または追加補助食品が続く場合にはそれに進む前に、絶食後の血液サンプルと尿サンプルを全参加者から約14日間の間隔で回収した。高用量と低用量のブレンドAとブレンドBに関するより詳しい情報を、以下の表1に示す。

【 0 0 6 7 】

【表 1】

10

表1. 抗酸化剤ブレンド

	レベル	一日の 用量 (mg)	一日当たりの内容	頻度
AOXブレンドA	低	300	R/Q/T (5:3:1) : ローズマリー 167mg、ケルセチン100mg、 ターメリック33mg	朝 (150mg) と 晩 (150mg)
AOXブレンドA	高	600	R/Q/T (5:3:1) : ローズマリー 333mg、ケルセチン200mg、 ターメリック67mg	朝 (300mg) と 晩 (300mg)
AOXブレンドB	低	300	HB/W/BS (5:5:1) : ホーリー・ バジル136mg、ワサビ136mg、 ブロッコリ28mg	朝 (150mg) と 晩 (150mg)
AOXブレンドB	高	600	HB/W/BS (5:5:1) : ホーリー・ バジル273mg、ワサビ273mg、 ブロッコリ54mg	朝 (300mg) と 晩 (300mg)

20

【 0 0 6 8 】

R/Q/T = ターメリック / ケルセチン / ローズマリー

【 0 0 6 9 】

HB/W/BS = ホーリー・バジル / ワサビ / ブロッコリ種子エキス

【 0 0 7 0 】

回収した血液サンプルおよび / または尿サンプルから、6種類のバイオマーカーおよび / または遺伝子発現レベルを分析し、植物をベースとした各ブレンドが、AREの刺激および / または関連する遺伝子発現の誘導に及ぼす効果を求めた。分析したバイオマーカー / 遺伝子発現インディケータは、メロンジアルデヒド、イソプロスタノール、スーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、ヘムオキシゲナーゼ-1、カタラーゼであった。

40

【 0 0 7 1 】

比色法と分光法によって測定したメロンジアルデヒド (“MDA”) を分析した。MDAは、反応性酸素種 (“ROS”) から生成される多不飽和脂質の分解産物である可能性があるため、酸化ストレス状態のバイオマーカーである。MDA分析は以下の方法で実施した。

【 0 0 7 2 】

以下のようないくつかの溶液を調製した。

【 0 0 7 3 】

TMOP = 20mMのPBS緩衝液中の10mM (あらかじめ消滅係数が156,000M/cmのTBARS反応をさせた後に532nmでの吸光度を測定することによって正確なTMOP濃度を求めるが、典型的には重量計算からの6%を超えることはない)。TMOPをPBSで希釈して0.0、0.2、0.4、0.6 μ

50

gの標準液にした。

【 0 0 7 4 】

BHT = 0.5グラムのBHTを100mlのMeOHに溶かす (0.0227M)。

【 0 0 7 5 】

TBA = 0.5グラムのTBAを約80mlの超純水 (nanopure water) に溶かす。激しく震盪し、残留物が残っている場合には約50 に加熱する。加熱した場合には室温まで冷却し、超純水を用いて希釈して100.0mlにする (0.5%)。

【 0 0 7 6 】

TCA = 70gのTCAを超純水に溶かし、超純水を用いて希釈して全体積を100mlにする (70%)。超純水を用いて70%TCAの一部を希釈して10%にする。

10

【 0 0 7 7 】

MDA分析のための調製物も、3通り用意した試験するサンプルと各標準液のためのラベリングできるクリーンなボイル-ブルーフ型マイクロチューブに含めた。温度を60 に設定してVWRブロック乾燥機をオンにした。この手続きの間、ラベリングしたボイル-ブルーフ型マイクロチューブの底に15.0 μ lのBHT溶液を添加した。270.0 μ lのTMOP標準液または血漿サンプルを添加し、15.0 μ lの10%TCAを添加し、300.0 μ lのTBA溶液を添加するという操作をこの順番で実施した。マイクロチューブにキャップをして溶液を混合した。すべての標準液とサンプルを処理した後、マイクロチューブをVWR乾燥ブロック・ヒーターの上に同時に置いて60 で90分間インキュベートした。冷却後、300.0 μ lの70%TCAを添加し、次いで900.0mlのクロロホルムを添加し、サンプルを激しく震盪した後、13,000gで3分

20

間遠心分離した。上側の水層をセミマイクロキュベットに移し、430nmから630nmまで走査することによってUV-VISスペクトルを測定した。

【 0 0 7 8 】

UV-VISスペクトルを3次微分スペクトルに変換した。標準液とサンプルに関して d^3A/dx^3 の値を542nmで読み取った。標準曲線を標準液から構成し、直線回帰公式を用いてTBARS (MDA) の濃度を求めた。

【 0 0 7 9 】

イソプロスタンは、フリー・ラジカルを触媒とした機構によって生成する。イソプロスタンは、アラキドン酸が過酸化されたプロスタグランジン様の産物である。イソプロスタンはフリー・ラジカルに依存して形成されることを考慮すると、イソプロスタン8-イソPGF₂ は、身体全体の酸化ストレス状態を反映している可能性のあるバイオマーカーである。

30

【 0 0 8 0 】

尿イソプロスタンELISAキット (Oxford Biomedical Research社 (オックスフォード、ミシガン州) からの製造番号EA85) によってイソプロスタン8-イソPGF₂ を分析した。このELISAキットを使用する前に、尿サンプルをクレアチニンに関して規格化し、サンプルを比較するのに合理的なサンプルとなるようにした。尿中のクレアチニン濃度は、以下の手続きによって測定した。

【 0 0 8 1 】

以下の3通りの溶液を調製した。

40

【 0 0 8 2 】

ピクリン酸 = 真空下で2時間にわたってドライ・ウォーターで湿潤にしたピクリン酸。9.156gのピクリン酸を1.0リットルの超純水に溶かす (残留物が残っている場合には濾過する、0.04M)。茶色の瓶に入れるか、瓶をアルミホイルのシートで包み、暗所に保管する。

【 0 0 8 3 】

NaOH = 30グラムのNaOHを1.0リットルの超純水に溶かす (0.75N)。

【 0 0 8 4 】

クレアチニン = 0.2645gのクレアチニンHClを10.0mlの1N HClと90.0mlの超純水に溶かす (2.0mg/mlのクレアチニン)。2.0mg/mlのクレアチニン1.0mlを99.0mlの超純水に溶かす

50

(0.020mg/mlのクレアチニン)。冷蔵庫の中に保管する。希釈して、0.0mg/ml、0.005mg/ml、0.010mg/ml、0.015mg/ml、0.020mg/mlのクレアチニン標準液を作る。標準液を小体積に分割し、別々のバイアルに入れて冷蔵庫の中に保管する。

【0085】

さらなる調製物を、ラベリングしたクリーンなセミマイクロキュベット（各サンプルについて2通り）に含めた。1485 μ lの超純水を各キュベットに添加し、15.0 μ lのサンプルを各キュベットに添加し、キャップをし、1/100xに希釈した尿サンプルの溶液を混合した。サンプルの520nmでの吸光度が校正範囲外である場合には希釈因子を調節し、アッセイを繰り返した。この手続きには、1.5mlの超純水（3通り、試薬ブランク）、または1.5mlの1/100x尿サンプル、または1.5mlの標準液をセミマイクロキュベットに添加する操作が含まれていた。次に、0.5mlの0.75N NaOHを各キュベットに添加し、次いで0.5mlの0.04Mピクリン酸を添加し、次いでサンプルをよく混合して室温で30分間インキュベートした。各標準液とサンプルの520nmでのUV-Vis吸光度を測定した。結果は、標準液とサンプルについて520nmでの吸光度の値を読み取り、試薬ブランクの吸光度を差し引くことによって計算した。標準液から標準曲線を構成し、サンプル中のクレアチニン濃度を直線回帰公式によって計算した。次に、希釈因子を適用した（100、またはそれ以外の調節した値）。

10

【0086】

スーパーオキシドディスムターゼ（“SOD”）は、酸素に曝された細胞にとって重要な抗酸化酵素である。SODは、損傷を与えるスーパーオキシドを害がより少ない酸素と過酸化水素に変換する。SODは、eBioscience社（サンディエゴ、カリフォルニア）からのヒトCu/Zn SOD白金ELISA BMS222/BMS222TENを用いて測定した。

20

【0087】

グルタチオンペルオキシダーゼ（“GSH-Px”）は、生体を過酸化物によって起こる酸化ダメージから保護する酵素である。より具体的には、この酵素は、脂質ヒドロ過酸化物や自由な水素過酸化物の有害な効果を減らし、害がより少ない化合物（例えばアルコールや水）にする。この酵素は、Bioxytech（登録商標）GPx-340（登録商標）比色アッセイ（カタログ番号21017、Oxis Research社、ポートランド、オレゴン州）で測定した。

【0088】

ヘムオキシゲナーゼ-1（“HMOX-1”）は、ヘムが酸化ストレスを引き起こすのを阻止する触媒となる重要な酵素である。この酵素はヘムを開裂させて害がより少ないビリベリジン形成させる。HMOX-1は、HO-1（ヒト）、EIAキット（カタログ番号ADI-EKS-800、Enzo Life Sciences International社、プリマス・ミーティング、ペンシルベニア州）を用いて求めた。

30

【0089】

最後に、カタラーゼは、酸素に曝された細胞にとって重要な酵素である。なぜならこの酵素は細胞をROSによって生じる酸化ダメージから保護してくれるからである。カタラーゼは、反応性のある過酸化水素を無害な水と酸素にする触媒である。カタラーゼは、Abcam社（ケンブリッジ、マサチューセッツ州）から入手できるカタラーゼ・ヒトELISAキットに従って分析した。

【実施例6】

40

【0090】

ローズマリーとケルセチンとターメリックを5:3:1の比率で含むブレンドAを順番に2通りの用量レベル（300mg/日と600mg/日）でA群に与えた。ベースラインとなる血液サンプルと尿サンプルを回収した後、15人の参加者に、ブレンドAがそれぞれ150mg含まれた低用量サンプル・補助食品を与えた。A群の参加者は、その補助食品を一日に2回消費するよう指示され、一日分の用量の第1の部分は朝食とともに、一日分の用量の第2の部分は夕食とともに消費することで、合計で300mg/日のブレンドAを14日間消費することが推奨された。15日目、一晚（少なくとも10時間）絶食した後、血液サンプルと尿サンプルを回収した。次に、同じ参加者に、ブレンドAがそれぞれ300mg含まれた高用量サンプル・補助食品を14日間供給し、15日目から始めてこの補助食品を一日に2回消費するよう推奨した。そ

50

のとき、一日分の用量の第1の部分は朝食とともに、一日分の用量の第2の部分は夕食とともに消費することで、合計で600mg/日のブレンドAが14日間消費されるようにした。

【 0 0 9 1 】

29日目、一晩（少なくとも10時間）絶食した後、血液サンプルと尿サンプルを再び回収した。A群の参加者には、以前に推奨したように、1日に2回消費する高用量の補助食品を再び14日間与えた。それに加え、A群の参加者には、以下の表2に示した諸成分を含むビタミンとミネラルと色ブレンドを与えた。A群は、高用量の補助食品とともに、ビタミンとミネラルと色ブレンドの補助食品を14日間にわたって消費し続けた。ほぼ43日目、一晩（少なくとも10時間）絶食した後、A群の参加者から血液サンプルと尿サンプルを再び回収した。

【 0 0 9 2 】

【表 2】

表2. ビタミン、ミネラル、色ブレンドの成分

ビタミン (単位)	一日の用量	単位	注
全レチノール	8333	IU	
ビタミンA	7083	IU	
β-カロテン	7083	IU	カロテノイド・ブレンドから
B1 (チアミン)	4.5	mg	
B2 (リボフラビン)	5.1	mg	
B3 (ナイアシン)	20	mg	
B5 (パントテン酸)	10	mg	
B6 (ピリドキシン)	6	mg	
B7 (ビオチン)	300	mcg	
B9 (葉酸)	800	mcg	
B12 (シアノコバラミン)	12	mcg	
ビタミンC	250	mg	
アセロラ・チェリー	20	mg	100mgのアセロラ・チェリー抽出液から
ビタミンD	1000	IU	
ビタミンE (トコフェロール)	30	IU	
トコトリエノール	4	mg	
ビタミンK	20	mcg	
コリン	55	mg	
ミネラル (単位)	一日の用量	単位	
カルシウム	250	mg	
クロム	120	mcg	
ヨウ素	150	mcg	
マグネシウム	250	mg	
マンガン	2.0	mg	
モリブデン	50	mcg	
セレン	100	mcg	
亜鉛	15	mg	
色ブレンド*	一日の用量	単位	供給源
カロテノイド・ブレンド	15.6	mg	β-カロテン、α-カロテン、ゼアキサンチン、リコペン、アスタキサンチン、ルテインの混合物を含む
アスタキサンチン小ビーズ (4%)	1.5	mg	
黄色/オレンジ色としての柑橘類 バイオフィラボノイド複合体	40	mg	スイートオレンジ、グレープフルーツ、レモン、マンダリンの混合物を含む
アセロラ・チェリー濃縮液 (20%ビタミンC) - 赤色として	200	mg	マルピギア・グラブラ
ベリー・ブレンド - 紫/青色として	50	mg	ブルーベリー (バクキニウム・コリンボスム)、クロフサフグリ (リベス・ニグルム)、アメリカニワトコ (サムブクス・ニグラ)、ブドウ (ピティス・ピニフェラ) の混合物を含む
セイヨウワサビ - 白色として	10	mg	アルモラキア・ルスティカナ
AWPS複合体 - 緑色として	50	mg	アルファルファ (メディカゴ・サティバ)、オランダガラシ (ナスツルティウム・オフィキナーレ)、パセリ (ペトロセリナム・クリスプム)、ハウレンソウ (スピナキア・オレラケア) の混合物を含む
ペパーミント - 緑色として	30	mg	メンタxピペリタ

*最近のアメリカの「植物栄養素報告書：ギャップの定量化」には、平均してアメリカ人10人中の8人 (76%) が“植物栄養素ギャップ”を有することが示されている。“ギャップ”は、つましい量の果実と野菜を含むと考えられる食事に合致した植物栄養素の摂取の典型的なレベルを基準にした植物栄養素の摂取不足を表わす。ブレンドの“色”部分が存在しているのは、報告書による5色のカテゴリー (緑、赤、白、紫/青、黄/オレンジ) から果実と野菜を提供することによってギャップをより小さくするためである。

【実施例 7】

【0093】

ホーリー・バジルとワサビとブロッコリ種子エキスを5:5:1の比率で含むブレンドBを順番に2通りの用量レベル (300mg/日と600mg/日) でB群に与えた。ベースラインとなる血

10

20

30

40

50

液サンプルと尿サンプルを回収した後、15人の参加者に、それぞれがブレンドBを150mg含む低用量サンプル・補助食品を与えた。B群の参加者は、その補助食品を一日に2回消費するよう指示され、一日分の用量の第1の部分は朝食とともに、一日分の用量の第2の部分は夕食とともに消費することで、合計で300mg/日を14日間消費することが推奨された。15日目、一晚（少なくとも10時間）絶食した後、血液サンプルと尿サンプルを回収した。次に、同じ参加者に、それぞれがブレンドBを300mg含む高用量サンプル・補助食品を14日間与え、15日目から始めてこの補助食品を一日に2回消費するよう推奨した。そのとき、一日分の用量の第1の部分は朝食とともに、一日分の用量の第2の部分は夕食とともに消費することで、合計で600mg/日のブレンドBが14日間消費されるようにした。29日目、一晚（少なくとも10時間）絶食した後、血液サンプルと尿サンプルを再び回収した。

10

【0094】

臨床結果

患者から回収したサンプルで検出されたバイオマーカー／遺伝子発現レベルの差をベースライン測定値から計算した。ベースラインから、低用量補助食品を14日間消費した後に得られたサンプルへの変化を“L-BL”で表わす。低用量相の後に採取したサンプルから、高用量補助食品を14日間消費した後に採取したサンプルへの検出値の差は、“H-L”で表わす。A群に関しては、14日間の期間にわたる高用量消費の後のサンプルと、高用量補助食品にビタミンとミネラルと色ブレンドの組み合わせを14日間の期間続けた後のサンプルの差を求めることによって測定した別のデルタが存在している。このデルタを“C-H”で表わす。

20

【0095】

デルタを計算し、対応のあるt検定を適用して、ベースラインと低用量（L-BL）の間、低用量と高用量（H-L）の間、組み合わせ方式と高用量（C-H）の間（A群に関して）のバイオマーカーの変化を比較した。それに加え、酸化ストレス・バイオマーカー間の相関を検討し、一変量統計を評価した（p値、ヒート・マップ）。統計分析ソフトウェアJMP（SAS Institute）を用いてデータを分析した。非常に好ましい効果があった処理を灰色で強調してある。

【0096】

【表3】

表3. 結果のまとめ

バイオマーカー	製品コード	群	N	平均値 (デルタMDA スペック)	標準偏差 (デルタMDA スペック)	p値
MDA 比色測定、 μM	A	L-BL	15	1.333×10^{-5}	0.032	
	A	H-L	15	0.012	0.045	
	A	C-H	15	0.012	0.035	
	B	L-BL	15	0.006	0.049	
	B	H-L	15	0.002	0.035	
MDA 分光測定、 μM	A	L-BL	15	0.0054	0.024	
	A	H-L	15	-0.0064	0.041	
	A	C-H	15	0.0104	0.032	
	B	L-BL	15	0.0144	0.029	
	B	H-L	15	-0.0114	0.027	
8-イソプロスタン、 ng/ml	A	L-BL	15	-1.800	2.255	0.004
	A	H-L	15	1.287	1.843	
	A	C-H	15	-0.830	2.141	0.077
	B	L-BL	15	-0.892	3.351	0.160
	B	H-L	15	0.008	2.303	
スーパーオキシドディスムターゼ、 mg SOD/mg Hb	A	L-BL	15	0.007	0.036	0.233
	A	H-L	15	-0.0260	0.063	
	A	C-H	15	0.041	0.120	0.104
	B	L-BL	15	0.001	0.055	0.4724
	B	H-L	15	-0.051	0.065	
グルタチオンペルオキシダーゼ、 mU GPx/mg Hb	A	L-BL	15	-0.378	2.922	
	A	H-L	15	-0.411	1.174	
	A	C-H	15	0.216	1.068	0.223
	B	L-BL	15	-0.170	0.949	
	B	H-L	15	-0.770	1.274	
ヘムオキシゲナーゼ-1、 ng/ml	A	L-BL	15	-0.209	0.403	
	A	H-L	15	-0.004	0.3107	
	A	C-H	15	0.093	0.238	0.076
	B	L-BL	15	0.187	0.537	0.100
	B	H-L	15	-0.074	0.244	
カタラーゼ、 mg CAT/mg Hb	A	L-BL	14	-0.079	0.227	0.2958
	A	H-L	14	-0.041	0.120	0.2412
	A	C-H	15	-0.035	0.169	0.5416

【0097】

比色測定法と分光法によって測定されたMDAはよく相関していなかったため、それ以上は検討しなかった。

【0098】

群Aからの参加者でデルタL-BLを得るために分析した尿サンプルは、8-イソプロスタンのレベルが統計的に有意な低下を示した(-0.834 ng/ml、 $p=0.004$)。これは好ましい効果である。低用量(300mg/日)から高用量(600mg/日)へと用量を増大させると、8-イソ

10

20

30

40

50

プロスタンが増加した ($H-L = 1.287$)。これは、系内の酸化ストレスが増大していることを示す。興味深いことに、高用量のブレンドAにビタミンとミネラルと色ブレンドを組み合わせると、高用量のブレンドAだけを摂取したときに検出された酸化ストレスの増大が補正された。これらの好ましい結果 ($C-H = -0.830$ 、 $p = 0.077$) も統計的有意性に到達した。

【0099】

低用量のブレンドBの補助食品は、尿中の8-イソプロスタンに関して8-イソプロスタンの低下を示した ($L-BL = -0.892\text{ng/ml}$ 、 $p = 0.077$)。これは好ましい効果である。それに対して高用量は、尿中の8-イソプロスタンに対する効果がなかった ($H-L = 0.008$ 、 $p = 0.160$)。

10

【0100】

これら実施例では、ブレンドAとBは、SODに関してプラスの応答を示した。低用量のブレンドA ($L-BL = 0.007$) については、好ましいことに酵素の産生が増大することが示されている。高用量のブレンドA ($H-L = -0.026$) では、SODが減少したため、好ましい方向の応答ではなかった。高用量のブレンドAにビタミンとミネラルと色ブレンドを組み合わせるとSODの産生が増大したため、高用量単独での好ましくない傾向が補正されている ($C-H = 0.041$ 、 $p = 0.104$)。低用量のブレンドBを含む補助食品では、好ましいことにSODの産生が増加した ($L-BL = 0.001$ 、 $p = 0.472$)。

【0101】

高用量のブレンドAにビタミンとミネラルと色ブレンドを組み合わせると、GSH-Pxの産生に関して最も好ましい性能を示した。C-Hデルタは0.216であり、p値は0.223である。低用量と高用量のブレンドAに関しては、GSH-Pxの産生がわずかに減少した。

20

【0102】

高用量のブレンドAにビタミンとミネラルと色ブレンドを組み合わせると、HMOX-1の産生を誘導する好ましい傾向が見られた ($C-H = 0.093$ 、 $p = 0.0762$)。低用量のブレンドAでは、HMOX-1の産生がわずかに減少し、高用量を補給すると、HMOX-1の産生は変化しなかった。低用量のブレンドBの補給も、この酵素の好ましい増加を示した ($L-BL = 0.187$ 、 $p = 0.100$)。

【0103】

ブレンドAを補給した被験対象でカタラーゼ活性を測定した。低用量のブレンドA ($L-BL$) は、カタラーゼの産生に関して非常に顕著な低下を示した。これは、高用量 ($H-L$) または組み合わせ用量 ($C-H$) と比べて強い効果であることを示唆している。

30

【0104】

この明細書で引用したすべての特許、特許出願、参考文献は、その全体が参考としてこの明細書に組み込まれている。矛盾する場合には、本明細書の記述が、定義を含め、優先する。

【0105】

上記の記述は、本発明の実施態様の記述である。均等論を含めて特許法の原理に従って解釈されるべき添付の請求項に定義されている本発明の精神と本発明のより広い側面を逸脱することなく、さまざまな改変や変更が可能である。この開示は、説明を目的として提示したものであり、本発明のあらゆる実施態様の完全な記述と解釈されてはならず、請求項の範囲がこれら実施態様に関して図示または記載されている具体的な要素に制限されると解釈されてもならない。例えば、そして制限なしに、記載した本発明のどの個々の要素も、実質的に同様の機能を提供するか十分な動作を提供する代替要素で置き換えることができる。その中には、例えば、現在知られている代替要素（当業者に現在知られている可能性があるものなど）や、将来開発される可能性がある代替要素（開発されたときに当業者が代替物であると認識するものなど）が含まれる。さらに、開示した実施態様には、協働状態で記述してあって協働して一連の利点を提供する可能性がある複数の特徴が含まれる。本発明は、これらの特徴をすべて含んでいる実施態様や、記述したすべての利点を提供する実施態様に限定されないが、提示した請求項にそうでないことが明示的に記載され

40

50

ている場合は別である。請求項で例えば冠詞“1つの”、“その”、“前記”を用いた単数形の要素に言及されているいかなる場合にも、その要素が単数形に限定されると見なしはならない。請求項で“X、Y、Zのうちの少なくとも1つ”として要素に言及されているいかなる場合にも、個別のX、Y、Zの任意のものと、X、Y、Zの任意の組み合わせが含まれることを意味する（例えば、XとYとZ；XとY；XとZ；YとZ）。

【 図 1 】

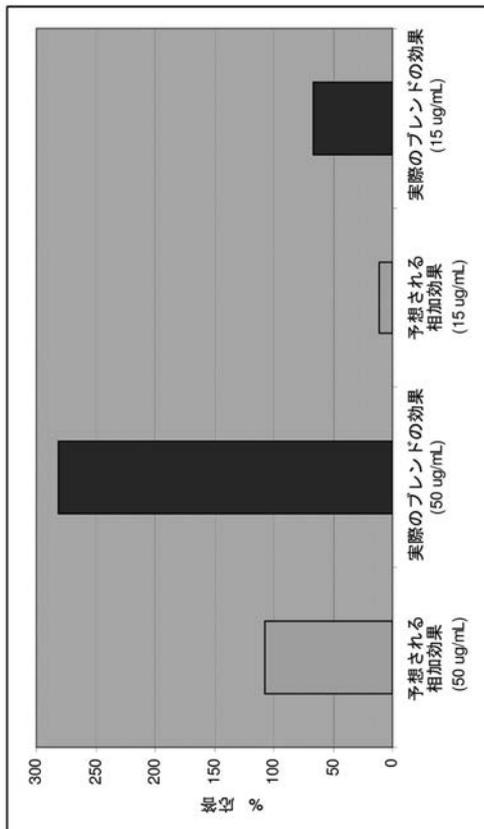


Fig. 1

【 図 2 】

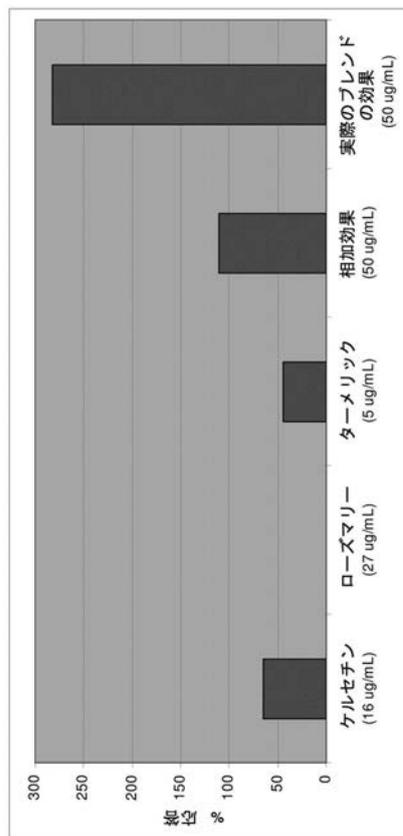


Fig. 2

【 図 3 】

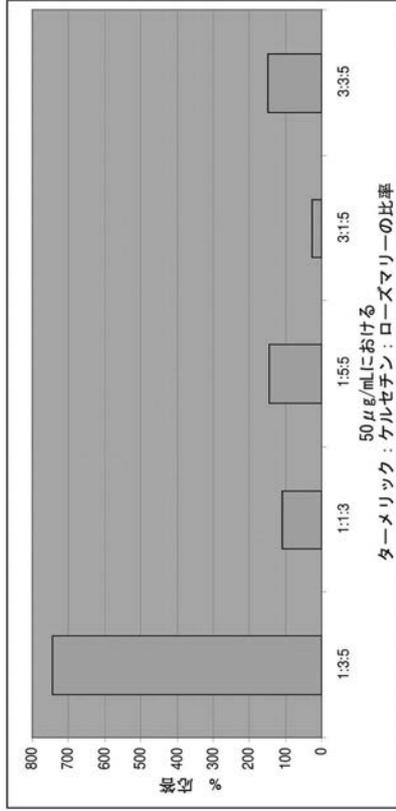


Fig. 3

【 図 4 】

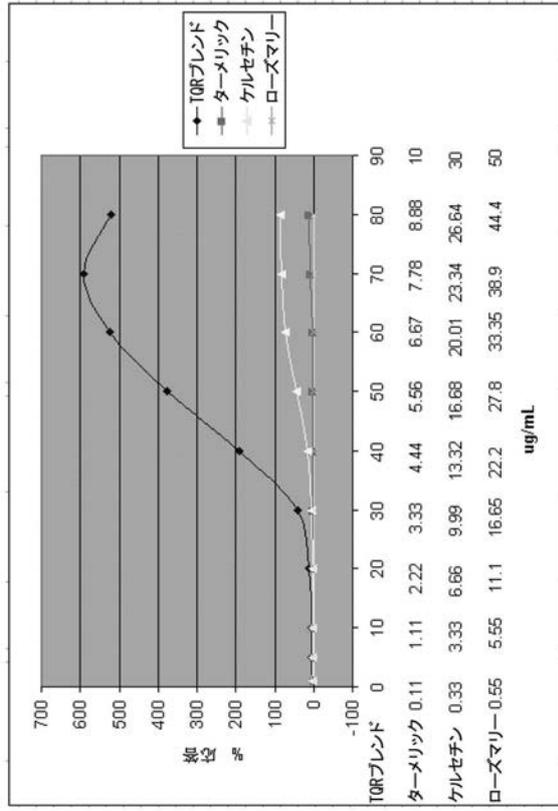


Fig. 4

【 図 5 】

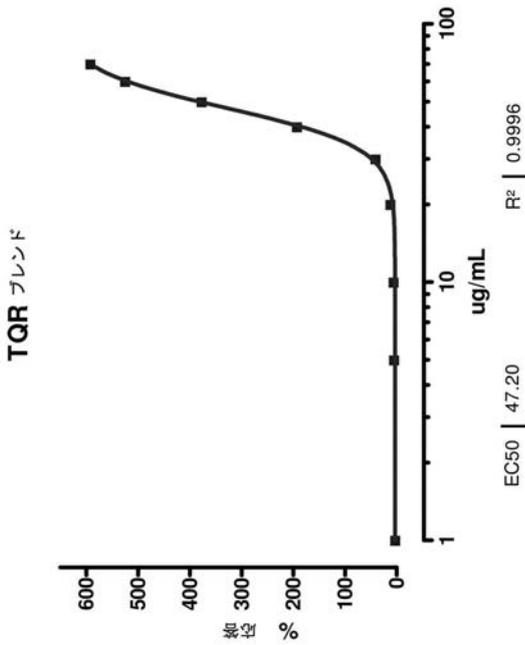


Fig. 5

【 図 6 】

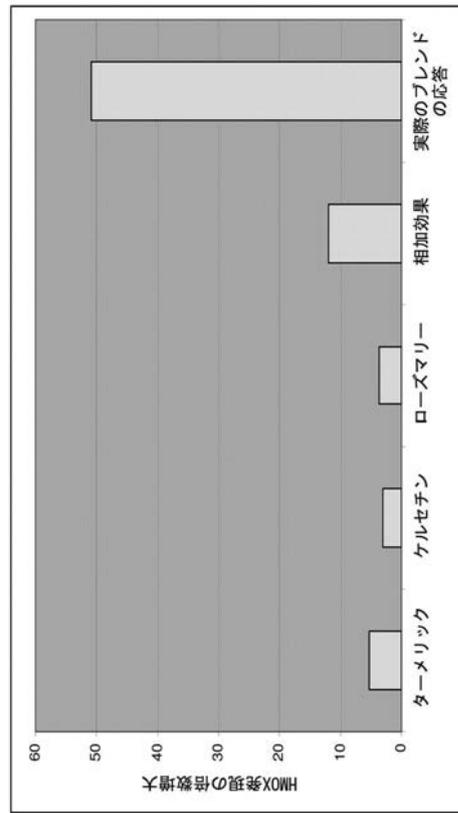


Fig. 6

【配列表】

2019068825000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成31年1月11日(2019.1.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

栄養補助食品であって、以下：ホーリー・バジル；ワサビ；及びブロッコリ種子エキス；を含有し、ここで：前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが、この補助食品の中にそれぞれ1：1：0.2の比率で存在し；かつこの補助食品が被験対象に投与されたとき、前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが協働して、キノンレダクターゼの産生刺激、及びヘムオキシゲナーゼ-1(HMOX-1)の発現誘導の1つ以上を引き起こす栄養補助食品。

【請求項2】

前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが、それぞれ136mg、136mg、28mgの量で中に存在している、請求項1に記載の栄養補助食品。

【請求項3】

前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが、それぞれ273mg、273mg、54mgの量で中に存在している、請求項1に記載の栄養補助食品。

【請求項4】

栄養補助食品に含めるためのブレンドであって、このブレンドは、ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスからなり、そのホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスのそれぞれが、前記補助食品が被験対象に投与されたとき、キノンレダクターゼ活性刺激、及びヘムオキシゲナーゼ-1(HMOX-1)の発現誘導の1つ以上を引き起こすのに十分な量かつ比率で前記補助食品の中に存在するブレンド。

【請求項5】

前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが、前記補助食品の中にそれぞれ1：1：0.2の比率で存在している、請求項4に記載のブレンド。

【請求項6】

前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスのそれぞれが、ヒトで尿中の8-イソプロスタンのレベルを低下させるのに十分な比率で存在している、請求項4に記載のブレンド。

【請求項7】

前記ホーリー・バジル、ワサビ及びブロッコリ種子エキスが、ヒトでスーパーオキシドディスムターゼの生産増大に十分な比率で存在している、請求項4に記載のブレンド。

【請求項8】

以下：i)前記ホーリー・バジルが、オキムム・サンクトゥム(Ocimum sanctum)に由来し、これから抽出されたものの少なくとも1つであり；及び/又はii)前記ワサビがワサビア・ジャポニカ(Wasabia japonica)に由来するものであり；及び/又はiii)前記ブロッコリ種子エキスがブラシカ・オレラケア・イタリカ(Brassica oleracea i

talica)から抽出されたものである；
請求項1に記載の栄養補助食品。

【請求項9】

更に、以下：

i)1つ以上のビタミン及びミネラル；及び/又は

ii)1つ以上の香料、賦形剤、結合剤、タンパク質、炭水化物複合体、保存剤及びキレート
剤

を含有する、請求項1に記載の栄養補助食品。

【請求項10】

カプセル、錠剤、粉末、ゲル又は液体の形態である、請求項1に記載の栄養補助食品。

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 K	36/31 (2006.01)	A 6 1 K	36/31	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 Q	1/66 (2006.01)	C 1 2 Q	1/66	
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100182730
弁理士 大島 浩明
- (72)発明者 デイビッド ジェイ・ファスト
アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 5 4 6, グランド ラピッズ, サウスイースト, プレストウィック 5 3 1
- (72)発明者 ジェニファー パターソン
アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 5 0 5, グランド ラピッズ, ノースイースト, ダイヤモンド アベニュー 2 1 4 3
- (72)発明者 アルン ラジゴバル
アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 5 4 6, グランド ラピッズ, サウスイースト, ウッドブルック 6 8 8 2
- (72)発明者 ドナルド ジェイ・プサテリ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 5 4 4, ヘミト, ジェニファー アベニュー 4 1 8 9 0
- (72)発明者 ケビン ダブリュ・ゲレンベック
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 6 4, パウエイ, ローレルウッド ストリート 1 4 7 4 3
- (72)発明者 ジェフリー ショルテン
アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 5 2 5, グランド ラピッズ, ノースイースト, クラエン アベニュー 4 7 6
- (72)発明者 スティーブン アール・ミスラー
アメリカ合衆国, ミシガン 4 9 5 0 3, グランド ラピッズ, ノースイースト, プリマス アベニュー 2 0 2
- (72)発明者 キース ランドルフ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 4 2 8 0 7, アナハイム, イースト ショアクレスト ドライブ 6 9 0 9
- (72)発明者 ジェニファー チュアン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 0 7 0, サラトガ, カーウィン ランチ コート 1 9 3 1 3
- (72)発明者 ユメイ リン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 0 8 1 4, ロング ビーチ, イースト フィフス ストリート 4 1 1 6
- (72)発明者 バリエーション カズロバ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 0 6 8 0, スタントン, ファーndeール サークル 7 7 3 7 アpartment ディー

F ターム(参考) 4B018 LE01 LE02 LE03 LE04 LE05 MD01 MD23 MD53 MD61 ME06
MF01 MF02
4B063 QA18 QQ08 QQ61 QQ79 QR41 QR48 QR77 QS02 QS38 QX02

4C086	AA01	AA02	BA08	MA03	MA04	MA17	MA35	MA37	MA52	NA14
	ZC19	ZC21								
4C088	AB15	AB38	AB81	MA07	MA08	MA17	MA35	MA37	MA52	NA14
	ZC19	ZC21								

【外国語明細書】

2019068825000001.pdf