

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5420238号
(P5420238)

(45) 発行日 平成26年2月19日 (2014. 2. 19)

(24) 登録日 平成25年11月29日 (2013. 11. 29)

(51) Int. Cl.	F I
A 2 3 L 1/30 (2006. 01)	A 2 3 L 1/30 B
A 2 3 L 2/52 (2006. 01)	A 2 3 L 1/30 A
	A 2 3 L 1/30 Z
	A 2 3 L 2/00 F

請求項の数 31 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2008-510197 (P2008-510197)	(73) 特許権者	507363923
(86) (22) 出願日	平成18年5月2日 (2006. 5. 2)		4 ライフ・パテント・エルエルシー
(65) 公表番号	特表2008-539732 (P2008-539732A)		アメリカ合衆国ユタ州84070-326
(43) 公表日	平成20年11月20日 (2008. 11. 20)		2, サンディ, サウス 300 ウエスト
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/017118		9890
(87) 国際公開番号	W02006/119408	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成18年11月9日 (2006. 11. 9)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成21年4月15日 (2009. 4. 15)	(74) 代理人	100075270
審査番号	不服2012-5890 (P2012-5890/J1)		弁理士 小林 泰
審査請求日	平成24年4月2日 (2012. 4. 2)	(74) 代理人	100096013
(31) 優先権主張番号	60/677, 226		弁理士 富田 博行
(32) 優先日	平成17年5月2日 (2005. 5. 2)	(74) 代理人	100092967
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 星野 修
		(74) 代理人	100106080
			弁理士 山口 晶子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスファーファクター製剤及び関連する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

オリゴプロアンソシアニジン含有果汁；及び
トランスファーファクターを含む、
免疫応答を刺激するための栄養補助剤。

【請求項 2】

前記オリゴプロアンソシアニジン含有果汁が液体形状である、請求項 1 記載の栄養補助剤。

【請求項 3】

リゾチーム及びラクトペルオキシダーゼの少なくとも 1 つを含む防腐剤成分を更に含む、請求項 1 記載の栄養補助剤。

【請求項 4】

前記オリゴプロアンソシアニジン含有果汁が固体形状である、請求項 1 記載の栄養補助剤。

【請求項 5】

チュアブル基材を更に含む、請求項 4 記載の栄養補助剤。

【請求項 6】

前記オリゴプロアンソシアニジン含有果汁がアサイー果汁を含む、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の栄養補助剤。

【請求項 7】

前記オリゴプロアンソシアニジン含有果汁がニワトコ果汁、ブドウ果汁及びザクロ果汁の1以上を更に含む、請求項6記載の栄養補助剤。

【請求項8】

前記トランスファーファクターが、鳥トランスファーファクター及びウシトランスファーファクターの少なくとも1つを含む、請求項1から5のいずれかに記載の栄養補助剤。

【請求項9】

少なくとも1つの防腐剤を更に含む、請求項1から5のいずれかに記載の栄養補助剤。

【請求項10】

前記少なくとも1つの防腐剤が、リゾチーム及びラクトペルオキシダーゼの少なくとも1つを含む、請求項9記載の栄養補助剤。

10

【請求項11】

ラクトフェリンを更に含む、請求項1から5のいずれかに記載の栄養補助剤。

【請求項12】

前記栄養補助剤が保存状態である、請求項1から5のいずれかに記載の栄養補助剤。

【請求項13】

前記栄養補助剤が保存状態において滅菌されている、請求項12記載の栄養補助剤。

【請求項14】

前記栄養補助剤が保存状態において低温殺菌されている、請求項12記載の栄養補助剤。

【請求項15】

前記栄養補助剤が保存状態において4℃以下の温度に保たれるように製剤化される、請求項12記載の栄養補助剤。

20

【請求項16】

トランスファーファクターと、オリゴプロアンソシアニジン含有果汁とを含む混合物を形成することを含む、免疫応答を刺激するための栄養補助剤を製造する方法。

【請求項17】

前記混合物において微生物が成長することを防止することを更に含む、請求項16記載の方法。

【請求項18】

防止が前記混合物を殺菌することを含む、請求項17記載の方法。

30

【請求項19】

防止が前記混合物を低温殺菌することを含む、請求項17記載の方法。

【請求項20】

防止が前記混合物を冷却することを含む、請求項17から19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】

前記混合物を形成することが、少なくとも1つの防腐剤を更に含む混合物を形成することを含む、請求項17から19のいずれかに記載の方法。

【請求項22】

前記混合物を形成することが、リゾチーム及びラクトペルオキシダーゼの少なくとも1つを含む混合物を形成することを含む、請求項21記載の方法。

40

【請求項23】

前記混合物を形成することが、ラクトフェリンをさらに含む混合物を形成することを含む、請求項17から19のいずれかに記載の方法。

【請求項24】

前記混合物を形成することが、液体混合物を形成することを含む、請求項16から19のいずれかに記載の方法。

【請求項25】

前記混合物を少なくとも部分的に乾燥させることを更に含む、請求項24記載の方法。

【請求項26】

50

前記混合物を形成することが、乾燥混合物を形成することを含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 27】

オリゴプロアンソシアニジン含有果汁を含む食用調製物；及びトランスファーファクターを含む、免疫応答を刺激するための食用液体。

【請求項 28】

前記オリゴプロアンソシアニジン含有果汁がアサイー果汁を含む、請求項 27 記載の食用液体。

【請求項 29】

前記トランスファーファクターが鳥トランスファーファクターを含む、請求項 27 または 28 に記載の食用液体。

10

【請求項 30】

前記トランスファーファクターがウシトランスファーファクターを含む、請求項 27 または 28 に記載の食用液体。

【請求項 31】

前記トランスファーファクターが更に鳥トランスファーファクターを含む、請求項 30 記載の食用液体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は全般的には、トランスファーファクターを含む製剤に関し、より具体的には、トランスファーファクターを含む飲料及び固体のような、食用製剤に関する。さらに本発明は、食用のトランスラーファクターを含む製剤の製造方法、及びこのような製剤の投与を含む方法に関する。

【発明の開示】

【0002】

1つの局面において、本発明はトランスファーファクターを含む飲料を含む。該飲料は食用の液体又は半固体成分及びトランスファーファクターを含む。該液体又は半固体成分は、果汁、ゼラチン、乳製品、又はトランスファーファクターと相溶性の成分を持つ飲用可能な適切な他のいかなる組成物を含んでもよい。該液体成分と混合した場合、該トランスファーファクターは実質的にその1つ以上の機能を保ち（例えば、該液体成分の成分は1つ以上のトランスファーファクターの機能を妨げない）、又は、トランスファーファクターの1つ以上の機能が、事実上、該飲料の液体成分の1つ以上の成分により強化されてもよい。

30

【0003】

別の局面において、本発明は果実成分及びトランスファーファクターを有する組成物を含む。該果実成分は、少なくとも1つのオリゴプロアンソシアニジン「OPC」含有果実又はその抽出物を含んでもよい。「抽出物」という用語は本明細書では広く定義され、果実のいずれのOPC含有部分をも包含する。抽出物の限定されない例として、果汁（希釈果汁、通常濃度の果汁、濃縮果汁）、脱水した果実、及び、1以上の果実の成分を含む粉末が

40

【0004】

本発明の別の局面として、トランスファーファクターを含む食用製剤を作製する工程が含まれる。該工程は、トランスファーファクターと果実成分を混合することを含む。防腐剤もまた該混合物に含まれていてよい。該混合物は、細菌の増殖を防ぐため、冷却してもよい。細菌の増殖を更に防ぐため、冷却の前に該混合物の低温殺菌を行なってもよい。また、該混合物を殺菌してもよい。

【0005】

50

本発明の他の特徴及び利点は、以下の記載及び添付の特許請求の範囲を考慮することにより当業者に明らかとなるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

トランスファーファクターを含む飲料の形態の典型例として、液体又は半固体が挙げられる。このような飲料はトランスファーファクターと共に、食用液体又は半固体の成分を含んでよい。該液体又は半固体の成分は、限定しない例として、果汁、ゼラチン、乳製品、又はトランスファーファクターと相溶性の成分を有する飲用可能な適切な他のいかなる組成物をも含んでいてよい。該液体成分と混合した場合、該トランスファーファクターは実質的にその1つ以上の機能を保ち（例えば、該液体成分中の成分は1つ以上のトランスファーファクターの機能を妨げない）、又は、トランスファーファクターの1つ以上の機能が、事実上、該飲料の該液体成分の1つ以上の成分により強化されてもよい。このような飲料はまた、1つ以上の防腐剤を含んでいてもよい。代わりに、また、追加的に、ラクトフェリンがトランスファーファクターを含む飲料に含まれていてもよい。

10

【0007】

トランスファーファクターを含む食用製剤の別の実施形態は、果実成分もまた含有する。該食用製剤はまた、1つ以上の防腐剤を含んでいてよい。代わりに、また、追加的に、ラクトフェリンがこのような食用組成物に含まれていてもよい。

【0008】

前記果実成分は、OPCを天然に含む少なくとも1つの果実又は、このような果実の果汁又は他の抽出物を含む。限定されない例として、該果実成分は1つ以上のアサイー、ニワトコ、ブドウ、ザクロ又はその抽出液を含んでよい。OPCは酸化防止剤として知られており、それゆえ、生物において、細胞膜に悪影響を及ぼし、細胞の老化を加速する原因となる可能性があり、少なくとも間接的に、易感染性の免疫だけでなく種々の病状の原因となると知られているか若しくは考えられているような遊離基及び他の酸化剤を中和したり、又中和しない場合はそれらに対して作用する際に有用でありうる。

20

【0009】

該トランスファーファクター成分は、いかなる種類のトランスファーファクターを含んでいてもよいし、また2種以上のトランスファーファクターの組み合わせを含んでいてもよい。例えば、トランスファーファクター成分に、鳥トランスファーファクター、ウシトランスファーファクター、又、他のいかなる種類のトランスファーファクターが含まれていてもよい。トランスファーファクター成分のトランスファーファクターは適切な許容可能ないかなる供給源からも誘導することができる。例えば、鳥トランスファーファクターは例えば米国特許6,468,534号におけるHennenら（以下、「Hennen」）によって開示された工程により卵から得られる。ウシトランスファーファクターを得ることのできる方法の一つの例が米国特許4,816,563号においてWilsonら（以下、「Wilson」）によって開示されている。2種類以上のトランスファーファクターを含む組成物並びに、2種類以上のトランスファーファクターを組み合わせ及び処理する工程が米国特許6,866,868においてLisonbeeら（以下、「Lisonbee」）によって開示されている。

30

【0010】

トランスファーファクターは、PCTにより出願され国際出願番号がW02004/041071 A2（以下、「Dadali」）である国際特許出願の開示によって示されるように、生物の酸性化バランスを向上させ、同時に酸化防止剤の効果を強化することが知られているか又は考えられている。

40

【0011】

本発明の食用製剤は、1つ以上の防腐剤もまた含んでよい。食料や飲料において利用される際に許容されるような、適切な防腐剤を使用してよい。本発明の食用製剤に含まれてよい防腐剤の限定されない例として、安息香酸ナトリウム、及びパラベン族の化学物質から選ばれる防腐剤が挙げられる。

【0012】

50

リゾチームは、本発明の教示を具体化した食用製剤において用いられる際、防腐剤としての役割を果たす。リゾチームはチーズの防腐剤として使用されてきたが、果実又はその抽出物を含む食用製剤においてはこの機能が使われてこなかったと考えられてる。

【0013】

ラクトペルオキシダーゼもまた、あるいは代替的に、本発明の教示を具体化した食用製剤に含まれていてよい。ラクトペルオキシダーゼは乳製品において使用されてきた別の防腐剤であるが、果実又は果実の抽出物を含む食用組成物を保存するために使われてこなかったと考えられている。

【0014】

ラクトフェリンは免疫系を刺激すると知られ、又は考えられており、トランスファーファクターと共同して働くことができ、本発明の教示を具体化した食用製剤を与えられた対象の免疫を改善することができる。ラクトフェリンはまた、本発明の教示を具体化する食用製剤に含まれていることによって、細菌を餓死させ、これにより防腐剤としての役割を果たし得ることが知られている。

10

【0015】

本発明の実施の典型的な形態において、食用製剤は、液体、半固体、又は固体であってよい。液体形態の食用製剤は果汁の形態であってもよい。固体形態の食用製剤は、固体として（例えば、チュアブル錠、発泡錠、溶解可能なウエハー、溶解可能なゲルスリップ等として）消費されるように、液体として再構成されるように、又は他の適切な形で構成されてよい。

20

【0016】

本発明の教示を具体化した液体の食用製剤は、以下の実施例に記載されている。

【実施例1】

【0017】

トランスファーファクターを含む液体の食用製剤の配合表の例は以下の通りである。

【0018】

【表1】

表1

成分	総量% (w/v)	濃度 (g/ml)	総果汁% (v/v)
水	76.681	1.000	
リンゴジュース	5.146	1.346	19
紫ブドウジュース	5.100	1.330	19
グリセリン	3.980	1.249	
ブルーベリージュース	3.772	1.315	18
トランスファーファクターE-XF	1.912		
ザクロジュース	1.480	1.315	15
ブドウ色濃縮物 (例えば、カリフォルニアマデラカナンデーグア・ワイン社支社カナンデーグアコンセントレート&カラーズ (Canandaigua Concentrates & Colors, a Division of Canandaigua Wine Company of Madera, California) の、MEGANATURAL™紫)	0.500	1.306	
ビタミンC	0.498		
ニワトコジュース	0.419	1.315	15
香料			
液果風味 (BE-01407)	0.198	1.000	
液果風味 (BE-01271)	0.055	1.000	
天然バニラ (VA-01239)	0.165	1.000	
アサイー粉末	0.318		14
ラクトフェリン	0.191		
リゾチーム	0.014		
ラクトペルオキシダーゼ	0.003		

【0019】

トランスファーファクターE-XFはウシの初乳から得たウシトランスファーファクター及び鶏卵の黄身から得られた鳥トランスファーファクターを含む。

【0020】

表1に列挙された香料はフレーバー社 (Flavors Inc) から入手できる。

【0021】

表1に列挙された割合で成分を有する組成物を1日服用量の約1液量オンス (約30 mL) 以上を対象に投与又は消費されてよい。OPC及びアサイーのようなOPC含有果実の利点を含む、抗酸化剤の数多くの知られ考えられている利点に加えて、本発明の教示を具体化した食用組成物の投与又は消費により、対象は、トランスファーファクターの追加的な、また、時に相乗的な有益な影響を受け、その影響はDadali、Hennen、Lisonbee及びWilsonによる開示によって証明されているように、当該分野において公知である。

【0022】

食用製剤はトランスファーファクターを含む食材成分を当該分野において公知の工程で混合することによって製造される。更に、ラクトフェリン又は防腐剤 (限定されない例として、リゾチーム、ラクトペルオキシダーゼ及び他の食品防腐剤が挙げられる) を前記食材に混合してもよい。

【0023】

もちろん、使用される工程の種類及びおそらくある成分が含まれる順番は、お互いに混合される種々の成分の形態又は状態 (例えば、液体、固体、半固体等) に、溶解度に、及び結果として得られる食用製剤の所望の形態又は状態 (つまり、該食用製剤が液体か、半固体か、固体か、炭酸化作用を含むかどうか等) に一部依存してよい。種々の異なる形態の食用製剤を製造するために用いることのできる適切な工程は周知であり、当該関連技術

10

20

30

40

50

分野の当業者の技術範囲内にある。

【0024】

液体の食用製剤は液体成分又は液体及び溶解可能な固体（例えば、粉末、結晶等）又は半固体（例えば、ゲル、ペースト等）の成分により製造することができる。また、乾燥成分を互いに混合し、次いで製造者、流通業者、又は消費者のいずれかによって液体形態に再構成（例えば水、ジュース等において）することができる。

【0025】

"Principles and Practices of Small- and Medium-Scale Fruit Juice Processing," Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) Services Bulletin 146 (Rome, 2001)において開示されているような公知の技術は、本発明の教示を具体化する液体の食用製剤の製造工程の1又はそれ以上の部分において利用することができる。

10

【0026】

固体又は半固体の食用製剤は、乾燥した半固体、又は液体成分により、又はそれらの組み合わせによって製造され、望まれるときは、乾燥（例えば、脱水工程等によって）して望ましい状態にしてよい。固体の食用製剤は当該技術分野において周知の工程によって、いかなる形態（例えば、チュアブル錠、溶解可能なウエハー又はゲル、チューイングガム、再構成可能な粉末等）に製造してもよい。もちろん、種々の追加成分（例えば、賦形剤、甘味料、ウィッキング剤等）を所望の固体形態に食用製剤を製造するのを容易にするために用いてよい。固体又は半固体の食用製剤に含まれてよい追加の成分の限定されない例として、以下の1以上を挙げることができる：プルラン、コーンスターチ、ゼラチン、デキストリン、グリセリン、カラギーナン、キサンタンガム、デキストロース、コーンシロップ及び蜜蝋。食用組成物に追加の成分を組み込むことは十分当該技術分野における当業者の技術の範囲内にある。

20

【0027】

本発明の範囲を限定することなく、種々の固体食用組成物を公知の工程（限定されない例として、「Tablets」（<http://pharmlabs.unc.edu/tablets/text.htm>）において開示されている工程、米国特許6,326,028号においてNivaggioliらによって開示されている工程、米国特許6,733,781号においてAbu-Izzaらによって開示されている工程及び米国特許6,811,795号においてWehlingによって開示されている工程が挙げられる）によって形成することができる。

30

【0028】

液体又は半固体状態のように、完全な乾燥状態でない形態の食用製剤を製造するのに使用される工程は、冷蔵庫に於けるような低温（例えば、約0 から約10 の間、約4 等）において達成でき、次いで、このような温度で輸送され貯蔵されることができ、製剤内で細菌が成長又は増殖する可能性を減じることができる。

【0029】

また、完全な乾燥状態でない形態の食用製剤の低温殺菌又は殺菌を行なってよい。存在する微生物の数を減らすのが、完全には微生物を除去することのない低温殺菌により、下げられた温度下で（例えば、冷凍又は冷蔵、又は「冷却された」状態）貯蔵される製品の安定性を向上させることができる。食用製剤を殺菌すると、製剤内の全て、又は実質的に全ての微生物を死滅させ又は不活化させ、室温又はより高い温度においても、食用製剤の長期の保存を容易にする。

40

【0030】

例として、トランスファーファクターを含む食用製剤は、公知の強熱蒸気注入法で殺菌することができる。このような工程の温度及び期間は、当然殺菌する該組成物の形態及び成分に依存する。液体製剤を作製する際、結果として得られる食用製剤を特定の温度（例えば、120 ）まで、対応する期間（例えば、2秒間）、「瞬間」加熱することができる。また、以下の式を利用するような、当該分野において認められてきた実施と実質的に一致する限り、期間及び温度の異なる殺菌又は低温殺菌を行なうことができる。

【0031】

50

【数1】

$$t_p = 5 \cdot 10^{14} \cdot e^{-0.4353 \cdot T_{m0}}$$

【0032】

(ここで、 t_p は該工程の最低期間、及び T_{m0} は該工程が達成される温度)。

【0033】

もちろん、本発明の食用製剤への細菌負荷を減じる工程は熱処理技術を含む必要はない。別の方法(例えば、濾過、抗細菌成分等)を使った、殺菌又は細菌量を減じる他の技術もまた、食用製剤を製造する際に用いてもよい。適切な工程の例はHughes, D. E.、及びNyborg, W.による"Minimally Processed Fruits and Vegetables: Reducing Microbial Load by Nonthermal Physical Treatments," Food Technology 52(6): 66-71 (1997)に開示されている。

10

【0034】

低温殺菌又は殺菌の後、該トランスファーファクターが、実質的に全て又は全てではないにしても、その活性をいくらか保っていることが望ましい。種々の低温殺菌又は殺菌の工程を用いることができ、この工程は、食品から殺菌の数を減らしたり、完全に微生物を死滅させたりするのに用いることのできる低温殺菌又は殺菌を含む。多くの殺菌工程が抗体を含むある種のタンパク質の活性を有意に減少させると知られているが、トランスファーファクターが殺菌後に少なくともいくらかの活性を保つかどうかを測定するためにアッセイを行なった。

20

【0035】

この試験では、J. Natl. Cancer Inst. 55(5): 1089-95 (Nov. 1975)において開示されたものと類似した、マウス足蹠アッセイ技術が用いられ、トランスファーファクターを含んだ食用製剤に対して加熱低温殺菌又は殺菌工程(特に、過熱蒸気注入工程)が及ぼす影響が測定された。2つの殺菌したサンプルを、殺菌していないサンプル、並びにネガティブコントロール及びポジティブコントロールと比較した。

【0036】

6匹のマウスの独立した集団が、5つのサンプル及びコントロールのそれぞれについてテストされた。該テストは2つの段階で行なわれ、第1の段階は該サンプルの加熱殺菌の直後に行なわれ、第2の段階は該2つの加熱殺菌したサンプルを、当該技術分野において室温で約1年間保存したことに相当すると十分見なされる、約40℃で約3ヶ月間保存した後に行なわれた。30の異なるマウスを該アッセイのそれぞれの段階で用いた。以下の手続を該アッセイのそれぞれの段階において行なった。

30

【0037】

ポジティブコントロール(即ち5番目の群)において、テストの14日前、約9週齢から約10週齢の6匹のBALB/cマウスの右後足の足蹠にイソフルランで麻酔をかけた。次に、フロイントのアジュバント及びウシ鼻気管支炎ウイルスワクチンの50/50 (wt/wt)混合物0.02 mlを、マウスの尾のそれぞれの側面の基部に2回の注射により筋注投与した。このように抗原を早い段階で注射することにより、ポジティブコントロール群のマウスにおいて、自身の該抗原に対する1次免疫反応及び2次免疫反応又は遅延型過敏反応が誘発される。他の5つの群のマウスは該抗原をこのような方法で事前に接触させなかった。

40

【0038】

前記マウスの後足蹠を調べる約24時間前に、ポジティブコントロール群のマウスと同程度の齢の、それぞれの群の6匹のBALB/cマウスにイソフルランで麻酔をかけた。次に、サンプル溶液又はコントロール溶液約0.5 mlをそれぞれのマウスの首の後に皮下注した。

【0039】

ネガティブコントロールである第1の群(下記実施例2参照)において、それぞれのマウスの首の後に約0.5 mlの滅菌生理食塩溶液を注射した。

【0040】

第2の群(下記実施例3参照)において、前記サンプル溶液は、トランスファーファク

50

ターを含んだ再構成（蒸留した、脱イオン水において）した凍結乾燥初乳分画物に16%の固形物(w/v)を含んでいた。果汁製剤のpH（実際のpHは約3.6から約3.7）を見積もることを目的として、該溶液をpH4.0に設定した。再構成及びpHの調整の後、該溶液を約120 まで約2秒間加熱することで殺菌した。

【0041】

第3の群（下記実施例4参照）において、前記サンプル溶液は、トランスファーファクターを含んだ再構成（蒸留した、脱イオン水において）した凍結乾燥初乳分画物に16%の固形物(w/v)を含んでいた。結果として得られる溶液のpHは調整せず、従って、中性（すなわち、7.0）又はわずかに塩基性（すなわち、7.0より大きい）であった。再構成の後、該溶液を約120 まで約2秒間加熱することで殺菌した。

10

【0042】

第4の群（下記実施例5参照）において、前記サンプル溶液は、トランスファーファクターを含む初乳分画物を濃縮したものであり、蒸留した脱イオン水で固形物が約16パーセント(w/v)となるように希釈したものであった。この溶液は加熱殺菌を行わず、また、pHの調整も行なわなかった。

【0043】

ポジティブコントロール群である第5の群のマウス（下記実施例6参照）のそれぞれに、滅菌生理食塩溶液を与えた。

【0044】

マウスの足蹠アッセイを始める際、それぞれのマウスの右後足蹠及び左後足蹠を、例えばスタリットゲージを用いて測定した。次に、上記アッセイの各段階の間、30匹のマウスそれぞれの右後足の足蹠に抗原含有溶液を皮下注射した。各段階で、コントロールとして用いられる、30匹のマウスそれぞれの左後足の足蹠に、右足の足蹠に注射された抗原含有溶液とおよそ同じ量の滅菌生理食塩水希釈液のようなコントロール溶液を注射した。

20

【0045】

それぞれのマウスの免疫系の2次免疫応答要素にとって十分な時間（例えば24時間）の後、それぞれのマウスに再び麻酔をかけ、再び左右の後足の足蹠の直径を計測した。マウスの右の後足の足蹠の直径が初めの計測と2度目の計測とで増加することによって決定される有意な量の腫れが、その足蹠での遅延型過敏反応の発生の指標となる。

【0046】

マウスの足蹠アッセイの結果及び付随するいくつかの分析が、実施例2から5、及び7において述べられている：

30

【実施例2】

【0047】

前記アッセイの第1の段階において、ネガティブコントロール、つまり第1のグループの6匹のマウスの右後足の足蹠は、前記抗原を注射した約24時間後、単に生理食塩水を接種しただけのこれらのマウスの左後足の足蹠で計測したよりも、平均して約6.35マイクロメートル多くの腫れを示した。

【0048】

前記アッセイの第2の段階の間のネガティブコントロール群の結果を以下の表に示した：

40

【0049】

【表 2】

表 2

マウス	足 (左/右)	足蹠 (未処置) (マイクロメ ートル)	足蹠 (最終) (マイクロメ ートル)	足蹠 (差) (マイクロメ ートル)
1	左 (コントロール)	1930.40	1955.80	25.40
	右 (試験)	1905.00	1930.40	25.40
2	左 (コントロール)	1981.20	2006.60	25.40
	右 (試験)	2006.60	2057.40	50.80
3	左 (コントロール)	2057.40	2057.40	0.00
	右 (試験)	2032.00	2057.40	25.40
4	左 (コントロール)	2006.60	2032.00	25.40
	右 (試験)	2032.00	2057.40	25.40
5	左 (コントロール)	1955.80	2006.60	50.80
	右 (試験)	1930.40	1955.80	25.40
6	左 (コントロール)	1905.00	1930.40	25.40
	右 (試験)	1876.60	1955.80	76.20

10

【 0 0 5 0 】

20

第 1 段階の結果と同様、ネガティブコントロール群のマウスの右後足の足蹠は、同じマウスの左後足の足蹠が滅菌生理食塩水を注射して24時間後に示した腫れより、平均して、僅か12.70マイクロメートル大きい腫れを抗原を注射してから約24時間後に示したのみだった。マウスが該抗原に対する一次（すなわち、抗体媒介の）免疫反応を備えるのに、24時間は十分な期間ではないので、腫れのこれらの僅かな違いは、該マウスが該抗原に対する有意な2次免疫反応を表していないことを示している。

【 実施例 3 】

【 0 0 5 1 】

前記アッセイの第 1 の段階において、前記抗原溶液を注射して約24時間後、第 2 の群の 6 匹のマウスの右の後足の足蹠（該マウスは事前に16%の固形物（w/v）初乳を含む溶液をpH=4.0で接種した。）は、これらのマウスの左の後足の足蹠で測った腫れよりも、平均して50.80マイクロメートル大きく腫れた。これらの結果は、抗原が注射されず、おそらく単に注射針を刺されたことによって腫れた足蹠よりも、抗原が注射された足蹠で、より大きな2次免疫反応又は遅延型過敏反応があったことを示している。

30

【 0 0 5 2 】

前記アッセイの第2の段階において、以下の表に示すように、同様の結果を得た：

【 0 0 5 3 】

【表3】

表3

マウス	足 (左/右)	足蹠 (未処置) (マイクロメ ートル)	足蹠 (最終) (マイクロメ ートル)	足蹠 (差) (マイクロメ ートル)
1	左 (コントロール)	1955.80	2006.60	50.80
	右 (試験)	1981.20	2057.40	76.20
2	左 (コントロール)	1930.40	2006.60	76.20
	右 (試験)	1955.80	2108.20	152.40
3	左 (コントロール)	1955.80	2006.60	50.80
	右 (試験)	1981.20	2082.80	101.60
4	左 (コントロール)	2032.00	2057.40	25.40
	右 (試験)	2057.40	2108.20	50.80
5	左 (コントロール)	1930.40	2006.60	76.20
	右 (試験)	1955.80	2032.00	76.20
6	左 (コントロール)	2057.40	2108.20	50.80
	右 (試験)	2032.00	2159.00	127.00

10

20

【0054】

より具体的には、第2の群の6匹のマウスの右後足の足蹠は、抗原溶液を接種する前後で測ったこれらのマウスの左後足の足蹠で腫れよりも、平均42.33マイクロメートル大きく腫れた。前記アッセイの第1と第2の段階での同様の結果が、いったんトランスファクターを含む液体溶液を加熱殺菌すると、該溶液を長期保存した後のトランスファクターの活性には、ほぼ又は全く変化がないということを示している。

【実施例4】

【0055】

第3の群のマウス（該マウスは事前に16%の固形物(w/v)を含む初乳を標準のpHで含む溶液を接種した）の結果は第2の群の前記アッセイの第1の段階及び第2の段階での結果と同様であった。

30

【0056】

該アッセイの第1の段階において、前記足蹠の注射の約24時間後、前記抗原溶液を接種した第3の群の6匹のマウスの右後足の足蹠は、滅菌生理食塩水を接種したこれらのマウスの左後足の足蹠で計測した腫れよりも、平均して35.98マイクロメートル大きく腫れた。これらの結果は、抗原が注射された足蹠での2次免疫反応又は遅延型過敏反応が、おそらく単に注射針を刺すことによって腫れたであろう、抗原の注射されていない足蹠におけるものより大きかった事を示す。

【0057】

前記アッセイの第2の段階において、下表に記載のような同様の結果を得た：

40

【0058】

【表4】

表4

マウス	足 (左/右)	足蹠 (未処置) (マイクロメー トル)	足蹠 (最終) (マイクロメー トル)	足蹠 (差) (マイクロメー トル)
1	左 (コントロール)	2006.60	2032.00	25.40
	右 (試験)	2032.00	2082.80	50.80
2	左 (コントロール)	2057.40	2057.40	0.00
	右 (試験)	2006.60	2108.20	101.60
3	左 (コントロール)	1981.20	2006.60	25.40
	右 (試験)	2057.40	2082.80	25.40
4	左 (コントロール)	2006.60	2057.40	50.80
	右 (試験)	2032.00	2082.80	50.80
5	左 (コントロール)	2057.40	2082.80	25.40
	右 (試験)	2082.80	2159.00	76.20
6	左 (コントロール)	2082.80	2108.20	25.40
	右 (試験)	2108.20	2159.00	50.80

10

【0059】

20

これらの結果が示すように、第3の群の6匹のマウスの右後足の足蹠は、抗原溶液を足蹠に接種する前後で測ったこれらのマウスの左後足の足蹠で腫れよりも、平均33.87マイクロメートル大きく腫れた。前記試験の第1と第2の段階での同様の結果が、該溶液を長期保存した後の加熱殺菌した溶液のトランスファーファクターの活性には、ほぼ又は全く変化がなかったということを示している。

【実施例5】

【0060】

これらの結果は、第4の群のマウスから得た結果によって確認した。特に、前記試験の第1の段階の間、第4の群（加熱殺菌していない希釈した液体初乳分画物を接種したマウスを含む）のマウスの右後足の足蹠は、抗原溶液及び滅菌生理食塩水を足蹠にそれぞれ接種して約24時間後のこれらのマウスの左後足の足蹠よりも、平均して約35.98マイクロメートル大きく腫れていることを示した。

30

【0061】

以下のデータによって明示されるように、平均の差が42.33マイクロメートルであるような前記試験の第2段階における、同様の結果を得た：

【0062】

【表 5】

表 5

マウス	足 (左/右)	足蹠 (未処置) (マイクロメ ートル)	足蹠 (最終) (マイクロメ ートル)	足蹠 (差) (マイクロメ ートル)
1	左 (コントロール)	1955.80	2032.00	76.20
	右 (試験)	1981.20	2082.80	101.60
2	左 (コントロール)	2006.60	2057.40	50.80
	右 (試験)	2032.00	2108.20	76.20
3	左 (コントロール)	1955.80	2006.60	50.80
	右 (試験)	1930.40	2057.40	127.00
4	左 (コントロール)	1955.80	2082.80	127.00
	右 (試験)	1905.00	2032.00	127.00
5	左 (コントロール)	2032.00	2082.80	50.80
	右 (試験)	2057.40	2184.40	127.00
6	左 (コントロール)	1955.80	1955.80	0.00
	右 (試験)	2006.60	2057.40	50.80

10

【 0 0 6 3 】

20

これらの結果は、加熱殺菌した溶液から得た結果（実施例 3 及び実施例 4 の結果を参照）と同程度（すなわち、有意に大きくない）であるので、トランスファーファクターを含んだ溶液の加熱殺菌がトランスファーファクターの活性を有意に弱めない又は減じないことは明らかである。

【実施例 6】

【 0 0 6 4 】

この結論は、6匹のBALB/cマウスが首の後に、蒸留した脱イオン水で再構成した16%の固形物(w/v)を含むスプレードライした初乳分画物を含む溶液0.5 mlの接種を受けている、マウス足蹠の別のアッセイより得たデータによって確認した。約24時間後、該マウスにイソフルランで麻酔をかけ、次に上述の方法で後足の足蹠の計測し、上述の方法で（すなわち、左足蹠に滅菌生理食塩水、右足蹠に前記抗原溶液）接種を行なった。更に約24時間後、該足蹠を計測した。これらのマウスの右の足蹠は、左の後足の足蹠よりも、平均して約42.33マイクロメートル大きく腫れた。この値は、実施例2から5、及び7において詳述された試験の、第1及び第2の両方の段階における、第2、第3、及び第4の群のマウスに関して上記した違いと同程度であり（つまり、有意な差がない）、第2及び第3の群のマウスにおいて試験された溶液（実施例3及び4）のようなトランスファーファクターを含む溶液の加熱殺菌が、トランスファーファクターの活性に有意な悪影響を及ぼさないという結論を更に支持する。

30

【実施例 7】

【 0 0 6 5 】

40

前記マウスが接種を受けたトランスファーファクターが2次免疫反応を増加させた原因であったという事実は、下表で説明されるように、前記試験の第2の段階の間、マウスの第5の群、つまりポジティブコントロール群から得た結果によって支持される：

【 0 0 6 6 】

【表 6】

表 6

マウス	足 (左/右)	足蹠 (未処置) (マイクロメー トル)	足蹠 (最終) (マイクロメー トル)	足蹠 (差) (マイクロメー トル)
1	左 (コントロール)	1981.20	2006.60	25.40
	右 (試験)	2006.60	2082.80	76.20
2	左 (コントロール)	1828.80	1854.20	25.40
	右 (試験)	1879.60	2082.80	203.20
3	左 (コントロール)	1905.00	1930.40	25.40
	右 (試験)	1981.20	2082.80	101.60
4	左 (コントロール)	2006.60	2057.40	50.80
	右 (試験)	2032.00	2184.40	152.40
5	左 (コントロール)	2032.00	2057.40	25.40
	右 (試験)	2057.40	2184.40	127.00
6	左 (コントロール)	2108.20	2108.20	0.00
	右 (試験)	2082.80	2184.40	101.60

10

【 0 0 6 7 】

20

抗原溶液を接種した足蹠での腫れは滅菌生理食塩水を接種した足蹠での腫れより平均して約101.60マイクロメートル大きいことを示すこれらの結果は、前記マウスの足蹠試験の第1の段階においてポジティブコントロール群のマウスにおいて見られる124.88マイクロメートルの違いと同様である。ポジティブコントロール群のマウスは自身のトランスファーファクターを生成し、これにより該抗原に対する2次免疫反応を備えるのに十分な期間（つまり、2週間）を経たので、前記抗原溶液を接種したポジティブコントロール群のマウスの足蹠での腫れがより大きいということは、2次免疫反応が、トランスファーファクターの投与によって人工的に誘起されたものよりも大きいことを示す。

【 0 0 6 8 】

いったん、本発明の食用製剤を製造したら、後に輸送し及び貯蔵するために、清潔で滅菌した容器に入れてよい。

30

【実施例 8】

【 0 0 6 9 】

別の試験において、マウスの足蹠アッセイは、1年間保存したトランスファーファクターを含む液体溶液の加熱処理したサンプルにおけるトランスファーファクターの有効性を確認するために行なわれた。全部で4つのサンプルが用意された。2つはそれぞれ、pH約4であり、及び別の2つはそれぞれpH約7であった。全てのサンプルを約120 で、約2秒から約4秒間瞬間殺菌した。次に、該サンプルを約1年間保存した。pH4およびpH7のサンプルの一つをそれぞれ室温（約18 から約25 まで変化する）で保存し、またpH4およびpH7のサンプルの別の一つを冷蔵（約4 ）した。1年後、該サンプルを凍結乾燥した。試験の前、凍結乾燥したサンプルを所望の濃度に再構成し、次いで、上述のように投与した。

40

【 0 0 7 0 】

室温で保存されたpH約4の液体を含む第1のサンプルにおいて、抗原を注射した足蹠における腫れは、単に生理食塩水を注射した足蹠に対して、平均して50.80マイクロメートル大きかった。第2のサンプル（室温で保存されたpH約7の液体）、第3のサンプル（pH約4の冷蔵された液体）、第4のサンプル（pH約7の冷蔵された液体）における結果は同様となり、抗原が注射された後足の足蹠に於ける腫れが、単に生理食塩水を注射された後足の足蹠の腫れに比べて、それぞれ59.27マイクロメートル、67.73マイクロメートル及び63.50マイクロメートルだけ大きかった。

【 0 0 7 1 】

50

加えて、ポジティブコントロール及びネガティブコントロールを上記で論じられているように用意した。ポジティブコントロールにおいて、抗原を注射した足蹠と生理食塩水を注射した足蹠での平均の腫れの大きさの違いは、114.30マイクロメートルであった。ネガティブコントロールにおいては、抗原を注射した足蹠と生理食塩水を注射した足蹠での平均の腫れの大きさの違いは、わずか38.10マイクロメートルであった。

【0072】

総合すると、これらのデータは、腫れの増加がマウスの抗原を導入した領域（後足の足蹠）に於けるトランスファーファクターの存在による、ということを示している。加えて、これらのデータは、トランスファーファクターが加熱処理及び長期の貯蔵の後、その有効性をほとんど又は全く失っていないということを示している。冷蔵されたサンプル内のトランスファーファクターの活性は、室温におけるサンプル内のトランスファーファクターの活性より、僅かに高いと考えられる。

10

【0073】

更に、上述によれば、トランスファーファクターが保っていたpH（約4又は約7）は、その長期生存能力に、ほとんど又は全く影響がないようである。

【0074】

上述の記載は多くの具体例を含むが、本発明の範囲を限定するように構成するものではなく、単に、現在好ましい実施形態のいくつかの実例を提供するものである。同様に、本発明の精神又は範囲から逸脱しない本発明の他の実施形態を考案することができる。また、異なる実施形態の特徴を組み合わせて利用することができる。従って本発明の範囲は、上述の明細書よりむしろ、添付の特許請求の範囲及びその法的均等物によってのみ示され、限定される。本明細書で開示された本発明の、特許請求の範囲内にあるすべての追加、削除及び修正は、本発明に包含される。

20

フロントページの続き

- (72)発明者 マックカウスランド, カルヴィン・ダブリュー
アメリカ合衆国ユタ州84663, スプリングヴィル, ウェスト 200 サウス 270
- (72)発明者 ヴォーン, プレント
アメリカ合衆国ユタ州84118, ケアンズ, ウェスト 6095 サウス 4398
- (72)発明者 リゾンビー, デイヴィッド
アメリカ合衆国アイダホ州83703, ボイジー, ウェスト・エスターブルック・プレイス 87
25
- (72)発明者 ヘンネン, ウィリアム, ジェイ
アメリカ合衆国ユタ州84043, イーグル・マウンテン, ケネック・レーン 3453

合議体

審判長 郡山 順
審判官 小川 慶子
審判官 齊藤 真由美

- (56)参考文献 国際公開第2004/017916(WO, A2)
国際公開第2004/041071(WO, A2)
国際公開第2004/080995(WO, A1)
特開2005-82497(JP, A)
特表2006-520804(JP, A)
特表2005-527234(JP, A)
特開2005-68060(JP, A)
特表2007-505913(JP, A)
特開2001-340069(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23L1/27-1/308