

(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2025-63007  
(P2025-63007A)

(43)公開日

令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 08 B 37/00 (2006.01)	C 08 B 37/00	G 4 B 0 1 8
A 61 K 31/736 (2006.01)	A 61 K 31/736	4 C 0 8 3
A 61 K 8/73 (2006.01)	A 61 K 8/73	4 C 0 8 6
A 61 Q 19/00 (2006.01)	A 61 Q 19/00	4 C 0 9 0
A 61 P 11/00 (2006.01)	A 61 P 11/00	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 31 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-168405(P2024-168405)	(71)出願人	523429209 デゾン バイオテック シーオー エルテ ィーディー DAZZEON BIOTECH. CO . , L T D.
(22)出願日	令和6年9月27日(2024.9.27)		
(31)優先権主張番号	63/542,119		
(32)優先日	令和5年10月3日(2023.10.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(特許庁注:以下のものは登録商標)			
1. TRITON		(74)代理人	100223239 弁理士 布施 卓哉
2. TWEEN		(72)発明者	陳 宏棟 台湾、新北市新莊區五權一路1號5樓之二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アセマンナンを含む組成物およびその使用方法

## (57)【要約】

【課題】 分子量の小さいアセマンナンは、効能向上の可能性がある。しかし、一般に市販されているアセマンナンの分子量は、1,000-2,000 kDaである。

【解決手段】 本発明の組成物は、アセチル化マンナンベースの多糖化合物であるアセマンナンを含む組成物である。前記アセマンナンの分子量は、853 kDa (キロダルトン)以下である。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アセチル化マンナンベースの多糖化合物であるアセマンナンを含む組成物であって、前記アセマンナンの分子量は、853 kDa (キロダルトン) 以下である組成物。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の組成物において、前記アセマンナンの分子量は、853 kDa (キロダルトン) 以下であり、かつ、5 kDa (キロダルトン) 以上である組成物。

10

**【請求項 3】**

請求項 2 に記載の組成物において、前記アセマンナンにおける全てのヒドロキシル基の数に対して、前記ヒドロキシル基のうちアセチル化された数の割合を表すアセチル化度は、30 % 以上であり、かつ、78 % 以下である組成物。

20

**【請求項 4】**

請求項 3 に記載の組成物において、前記アセチル化度は、30 % 以上ありかつ40 % 以下、または、60 % 以上ありかつ78 % 以下である組成物。

**【請求項 5】**

請求項 1 乃至請求項 4 の何れか一項に記載の組成物を腸の健康のために使用する組成物の使用方法。

30

**【請求項 6】**

請求項 1 乃至請求項 4 の何れか一項に記載の組成物をスキンケアのために使用する組成物の使用方法。

**【請求項 7】**

請求項 1 乃至請求項 4 の何れか一項に記載の組成物を肺のケアのために使用する組成物の使用方法。

40

**【請求項 8】**

請求項 1 乃至請求項 4 の何れか一項に記載の組成物を眼のケアのために使用する組成物の使用方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、アセマンナンを含む組成物およびその使用に関し、特に腸の健康、スキンケア、肺のケア、および目のケアのための組成物の使用に関する。

**【背景技術】****【0002】**

アセマンナンは、アセチル化マンナンベースの多糖化合物で、主にアロエベラの葉の粘液質ゲルに含まれる。アセマンナンは、主に -(1,4)結合のマンノース残基からなり、C-2およびC-3の位置で、部分的にアセチル化され、さらにガラクトースのようなC-6に結合

50

した側鎖を含むことがある。アセマンナンのほとんどは、 $\alpha$ -(1,4)グルコースが骨格に挿入された $\alpha$ -(1,4)マンノースの一本鎖骨格を含み、さらに骨格から分岐した $\alpha$ -(1,6)ガラクトースを含むことがある。

### 【0003】

アセマンナンの製造には、アロエベラの葉の粘液質ゲルから抽出されるものが関与し、アセマンナンを含む組成物は、U.S. 11654177 B2 に記載されているように調製することができる。組成物中のアセマンナンの純度は、異なる適応症に対するその効力に影響を及ぼす可能性がある。アロエベラ植物からアセマンナンを抽出する方法を調整して、適切な純度のアセマンナンを含む組成物を得るために加えて、任意の種類の賦形剤と共に抽出物を製剤化することも、組成物中のアセマンナンの純度を制御するための代替手段となり得る。

10

### 【先行技術文献】

### 【特許文献】

### 【0004】

#### 【特許文献1】米国特許第11654177号公報

### 【発明の概要】

### 【発明が解決しようとする課題】

### 【0005】

さらに、アセマンナンまたはアセマンナンを含む組成物のアセチル化度（例えば、アセチル化の程度）は、異なる適応症に対するその有効性のもう一つの要因であり得る。一般に、組成物中のアセチル化の程度は、アセマンナンの含有量と正の相関があるが、異なる組成物中のアセチル化の程度は、多様である可能性がある。

20

### 【0006】

さらに、アセマンナンの分子量も、効能効果に影響する。分子量の小さいアセマンナンは、上皮組織による吸収を高め、細胞間のタイトジャンクションの効率的な修復を促進する可能性がある。しかし、一般に市販されているアセマンナンの分子量は、1,000-2,000 kDaである。

### 【課題を解決するための手段】

### 【0007】

本発明の組成物は、アセチル化マンナンベースの多糖化合物であるアセマンナンを含む組成物である。前記アセマンナンの分子量は、853 kDa（キロダルトン）以下である。

30

### 【0008】

本発明の組成物において、前記アセマンナンの分子量は、853 kDa（キロダルトン）以下であり、かつ、5 kDa（キロダルトン）以上である。

### 【0009】

本発明の組成物において、前記アセマンナンにおける全てのヒドロキシル基の数に対して、前記ヒドロキシル基のうちアセチル化された数の割合を表すアセチル化度は、30%以上であり且つ78%以下である。

40

### 【0010】

本発明の組成物において、前記アセチル化度は、30%以上であり且つ40%以下、又は、60%以上であり且つ78%以下である。

### 【0011】

本発明の組成物の使用方法は、アセチル化マンナンベースの多糖化合物であるアセマンナンを含む前記組成物を、腸の健康のために使用する方法である。

### 【0012】

本発明の組成物の使用方法は、アセチル化マンナンベースの多糖化合物であるアセマンナンを含む前記組成物を、スキンケアのために使用する方法である。

### 【0013】

本発明の組成物の使用方法は、アセチル化マンナンベースの多糖化合物であるアセマン

50

ナンを含む前記組成物を、肺のケアのために使用する方法である。

【0014】

本発明の組成物の使用方法は、アセチル化マンナンベースの多糖化合物であるアセマンナンを含む前記組成物を、眼のケアのために使用する方法である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50のATR-FTIRスペクトルである。

【図2】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルである。

【図3】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルである。

【図4】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50のHPSEC-RI分析の結果を示す図である。

【図5】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50のHPLC分析の結果を示す図である。

【図6】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50のO-アセチル含量の定量分析(UV-Vis分光分析)の結果を示す図である。

【図7】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物I50の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルである。

【図8】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物I50のHPSEC-RI分析の結果を示す図である。

【図9】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物I50のHPLC分析の結果を示す図である。

【図10】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物I50のO-アセチル含量の定量分析(UV-Vis分光分析)の結果を示す図である。

【図11A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における濃度と、細胞生存能力との関係を示すグラフである(24時間処理)。

【図11B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における濃度と、細胞での細胞生存能力との関係を示すグラフである(48時間処理)。

【図12A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における濃度と、RGM1細胞での細胞生存能力との関係を示すグラフである(24時間処理)。

【図12B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における濃度と、RGM1細胞での細胞生存能力との関係を示すグラフである(48時間処理)。

【図12C】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における濃度と、RGM1細胞での細胞生存能力との関係を示すグラフである(24、48時間処理)。

【図13A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における濃度と、RGM1細胞での細胞生存能力との関係を示すグラフである(24、48時間処理)。

【図13B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における濃度と、RGM1細胞での細胞生存能力との関係を示すグラフである(24、48時間処理)。

【図14】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50における、RGM1細胞での細胞毒性と、インキュベーション時間との関係を示すグラフである。

【図15】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50における、インドメタシンによる細胞障害に対する保護効果を示すグラフである。

【図16】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50における、インドメタシンによる細胞障害に対する保護効果を示すグラフである。

【図17A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50における、インドメタシンによる細胞障害に対する保護効果を示すグラフである。

【図17B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50における、インドメタシンによる細胞障害に対する保護効果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図18】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50における、インドメタシンによる細胞障害に対する保護効果を示すグラフである。

【図19A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、各群での胃液重量の有意差を示すグラフである。

【図19B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、各群でのpHの有意差を示すグラフである。

【図19C】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、各群での総酸度の有意差を示すグラフである。

【図20A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物を投与した場合における、pHレベルの結果を示す図である。

【図20B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物を投与した場合における、総胃酸値の結果を示す図である。

【図20C】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物を投与した場合における、胃損傷面積の結果を示す図である。

【図20D】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物を投与した場合における、胃病変指數の結果を示す図である。

【図20E】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、胃粘膜に対する胃保護作用を示す図である。

【図21A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞での細胞毒性試験の結果を示す図である（滅菌水溶解）。

【図21B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞での細胞毒性試験の結果を示す図である（0.2%エタノール溶解）。

【図22A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、細胞生存率のフローサイトメトリー分析の結果を示す図である。

【図22B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、細胞生存率のフローサイトメトリー分析の結果を示す図である。

【図23A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞でのUVB誘発細胞毒性に対する保護効果を示すグラフである。

【図23B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞でのUVB誘発細胞毒性に対する保護効果の結果を示す図である。

【図24】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞でのUVB誘発炎症遺伝子の発現の時間依存的効果を示すグラフである。

【図25】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞でのUVB誘発炎症遺伝子の発現の異なる照射量での効果を示すグラフである。

【図26】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞での炎症性遺伝子発現に対するACE、EGF、LPS、およびpoly(I:C)で処理した場合の効果を示すグラフである。

【図27】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、MMP-1遺伝子発現を変化させない効果を示すグラフである。

【図28A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞の増殖を促進する効果を示すグラフである。

【図28B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞の増殖を促進する効果を示すグラフである。

【図29A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞の移動を加速する効果を示すグラフである。

【図29B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞の移動を加速する効果を示すグラフである。

【図29C】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞の移動を加速する効果を示す図である。

【図29D】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、HaCaT細胞

10

20

30

40

50

の移動を加速する効果を示すグラフである。

【図30A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、ケラチノサイトの分化を誘導し、PKCおよびEGFRを活性化する効果を示す図である。

【図30B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、ケラチノサイトの分化を誘導し、PKCおよびEGFRを活性化する効果を示す図である。

【図30C】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、ケラチノサイトの分化を誘導し、PKCおよびEGFRを活性化する効果を示す図である。

【図31】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、ケラチノサイトの分化を誘導し、PKCおよびEGFRを活性化する効果を示す図である。

【図32】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、ケラチノサイトの分化を誘導し、PKCおよびEGFRを活性化する効果を示す図である。

【図33】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、ケラチノサイトの分化を誘導し、PKCおよびEGFRを活性化する効果を示す図である。

【図34】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、ヒト気管支上皮細胞（NHBE）を処理した場合の細胞毒性の結果を示す図である。

【図35】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物を利用した、経上皮電気抵抗（TEER）を測定するための実験デザインを示す図である。

【図36A】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、TEER測定の結果を示すグラフである。

【図36B】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、TEER測定の結果を示すグラフである。

【図36C】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、TEER測定の結果を示すグラフである。

【図36D】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、TEER測定の結果を示すグラフである。

【図36E】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、TEER測定の結果を示すグラフである。

【図37】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物における、NHBE細胞に放出されたウイルスを定量するリアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

【図38】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物A50における、眼に対する影響の分析結果を示すグラフである。

【図39】本発明の実施形態におけるアセマンナンを含む組成物I50における、眼に対する影響の分析結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

添付図面に関連して以下に提供される詳細な説明は、本実施例の説明として意図されたものであり、本実施例が構築または利用され得る唯一の形態を表すことを意図したものではない。本明細書は、本実施例の機能、および本実施例を構築および操作するための一連のステップを規定するものである。しかしながら、同一または同等の機能およびシーケンスが、異なる実施例によって達成されてもよい。

【0017】

便宜上、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される特定の用語をここに集める。本明細書において使用される科学用語および技術用語は、特に定義されない限り、当業者によって一般的に理解され使用される意味を有するものとする。また、文脈上別段の要求がない限り、単数形の用語は同じものの複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものと理解されるであろう。具体的には、本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」および「an」は、文脈上明らかにそうでないことが示されない限り、複数形の参照を含む。また、本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、用語「少なくとも1つ」および「1つ以上」は同じ意味を有し、1つ、2つ、3つ、またはそれ以上を含む。

10

20

30

40

50

**【0018】**

「少なくとも1つの実施形態」、「1つの実施形態」、「複数の実施形態」、「異なる実施形態」、「いくつかの実施形態」、「本実施形態」などの用語は、そのように記載された本開示の実施形態が特定の特徴、構造、または特性を含み得ることを示し得るが、本開示のすべての可能な実施形態が特定の特徴、構造、または特性を含まなければならないわけではない。さらに、「一実施形態において」、「実施形態において」などの語句の繰り返し使用は、同一である可能性はあるが、必ずしも同一の実施形態を指すものではない。さらに、「本開示」に関連して「実施形態」などの語句を使用することは、本開示のすべての実施形態が必ずしも特定の特徴、構造、または特性を含むことを意味するものではなく、「本開示の少なくともいくつかの実施形態」が記載された特定の特徴、構造、または特性を含むと理解されるべきである。10

**【0019】**

さらに、説明および非限定を目的として、機能エンティティ、技術、プロトコル、標準などの特定の詳細が、記載された技術の理解を提供するために規定される。他の例では、周知の方法、技術、システム、アーキテクチャなどの詳細な開示は、不必要的詳細で開示が不明瞭にならないように省略されている。

**【0020】**

本開示の説明および上述の図面における「第1」、「第2」および「第3」という用語は、特定の順序を説明するためではなく、異なる対象を区別するために使用される。

**【0021】**

さらに、用語「含む」およびその変形は、非排他的な包含をカバーすることを意図しており、「含むが必ずしも限定されない」を指すことがあり、これは、そのように記載された組み合わせ、グループ、シリーズ、および同等のものにおけるオープンエンドの包含またはメンバーシップを具体的に示す。例えば、一連のステップまたはモジュールを含むプロセス、方法、システム、製品、または装置は、列挙されたステップまたはモジュールに限定されず、任意に、列挙されていないステップまたはモジュールも含み、または任意に、それらのプロセス、方法、製品、または装置に固有の他のステップまたはモジュールも含む。20

**【0022】**

本明細書は、添付図面に照らして読むことで、以下の詳細な説明からよりよく理解される。30

**【0023】**

1.アセマンナンを含有する組成物

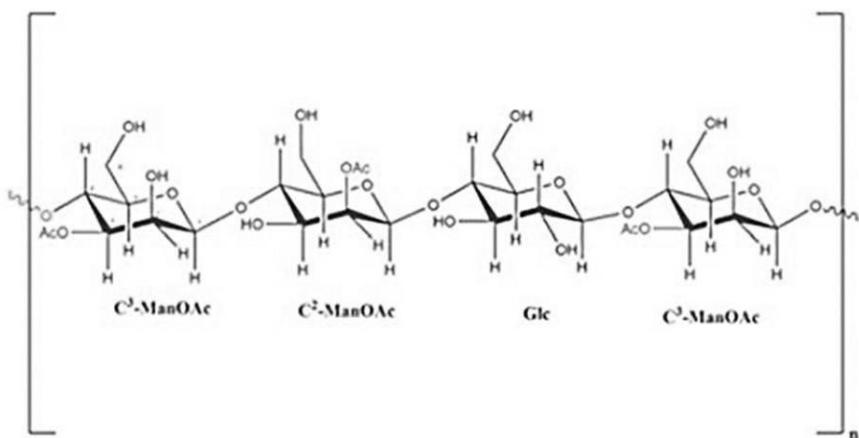
1.1 組成 A50

**【0024】**

組成物A50は、-(1,4)マンノースの単鎖骨格に-(1,4)グルコースが挿入され、-(1,4)マンノースがC-2および/またはC-3位で部分的にアセチル化されたアセマンナンを含有する。アセマンナンの構造単位を以下に示す。

**【0025】**

## 【化1】



## 【0026】

組成物A50は、アロエベラの葉のようなアセマンナンを含む植物を抽出することによって調製することができる。アセマンナンを含む組成物A50の構造研究を、ATR-FTIRによって行われた。4つの主要な官能基(OH、CO、CH<sub>3</sub>、COO)が優勢であることが観察され、観察条件は以下の通りであった：3000-3676 Cm<sup>-1</sup> (水酸基の伸縮振動); ~2924 Cm<sup>-1</sup> (脂肪族基(-CH<sub>2</sub>と-CH<sub>3</sub>)); ~1734 Cm<sup>-1</sup> (多糖類のカルボニル基のC=O伸縮振動); 1236 Cm<sup>-1</sup> (多糖類のアセチル基のC-O伸縮振動)。結果を図1に示す。

20

## 【0027】

アセマンナンを含む組成物A50の別の構造研究を<sup>1</sup>H-NMRで行った。結果を図2に示す。<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは、2.10、2.06、2.02 ppmにメチル基に対応する3つのシグナルを示し、アセチル基が異なる位置にあることを示した。2.0 ppmの位置は、0-アセチルを示し、本図における下部の数値は、組成物A50中の0-アセチルの量が0.75であることを表している。

30

## 【0028】

アセマンナンを含む組成物A50の別の構造研究を、<sup>13</sup>C-NMRで行った。結果を図3に示す。<sup>13</sup>C-NMRスペクトルから、20.54、20.27、20.06に対応するメチル炭素のシグナル、およびアセチル基のカルボキシル炭素(173.93、173.42、12.58)が検出され、組成物A50が、アセチル化マンナン(例えば、アセマンナン)を含有していることが示された。

30

## 【0029】

HPSEC-RI分析：アセマンナンを含む組成物A50を、高性能サイズ排除クロマトグラフィー-屈折率検出(HPSEC-RI)を用いて、その相対サイズを分析した。プルラン標準物質を用いてトレンドラインをプロットし、トレンドライン範囲内で検出された最高ピーク点に基づいて、試料の相対分子量を求めた。結果を図4に示す。組成物A50は、180 kDaの相対分子量(これは、図4の最初のピークによって示される範囲内の平均を表す)、および45~50分のトレンドラインの外側に、5 kDaより小さい成分の存在を示す第2のピークを示した。

40

## 【0030】

アセマンナンを含む組成物A50もHPLCで分析した。その結果を図5に示す。

## 【0031】

アセマンナンを含む組成物A50の0-アセチル含量の定量は、UV-Vis分光法の原理に基づいて行われた。1,4-アセチル化ポリマンノースからのアセチル基は、ヒドロキシルアミンと反応してアセトヒドロキサム酸を形成した。生成した化合物は、次に塩化鉄と反応し、540 nmで吸収ピークを持つ赤みがかったフェリック-アセトヒドロキサム複合体を形成し、その0-アセチル含量はその吸光度によって決定される。540 nmでの複合体の吸光度が検出され、標準参照物質として塩化アセチルコリン >=99% (TLC) を使用した検量線と比較した。

50

## 【0032】

詳細な方法は以下の通りである。標準直線溶液、希釈試料、水（ブランク群）をそれぞれ0.5 mLずつ20 mLガラスバイアルに採取した。ブランク群に4 M塩酸0.5mLを加え、よく振とうした。その後、アルカリ性塩酸ヒドロキシルアミン溶液1 mLを加えてよく振り混ぜ、4分間静置した。ブランク群以外は、pH 1.2±0.2となるように4 M塩酸を0.5 mL加え、よく振とうした。0.5 mLの0.62 M塩化第二鉄を加え、5秒間攪拌した。この時点で溶液は赤みがかったオレンジ色に変わる。出来上がった試料を超音波洗浄器に入れ、気泡を取り除いた。標準液とサンプルの吸光度を540 nmで測定し、標準線溶液の吸光度値からサンプルの0-アセチル含量を算出した。その結果を図6に示す。

## 【0033】

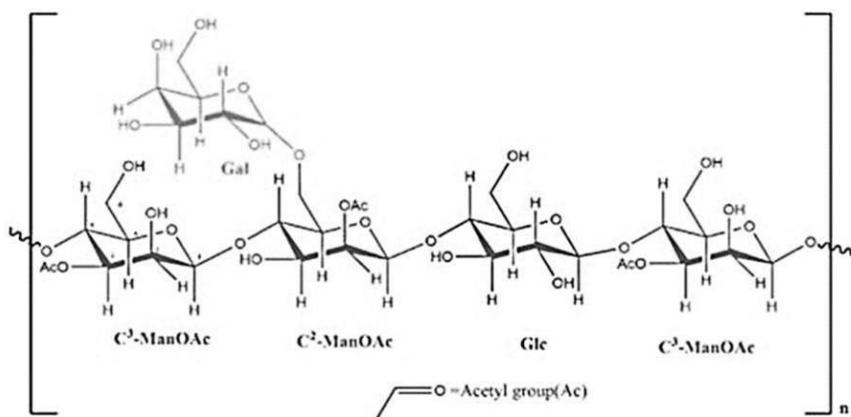
1.2 組成 I50

## 【0034】

組成物I50は、アセマンナンを含んでおり、これは -(1,4)マンノースの単鎖バックボーンに -(1,4)グルコースが挿入され、さらにバックボーンのC-6から分岐する -(1,6)ガラクトースを含む。 -(1,4)マンノースのバックボーンは、部分的にC-2および/またはC-3位置でアセチル化されている。アセマンナンの構造単位は以下の通りである。

## 【0035】

## 【化2】



## 【0036】

組成物I50は、アロエベラの葉のようなアセマンナンを含有する植物を抽出することによって調製することができる。アセマンナンを含有する組成物I50の構造研究を<sup>1</sup>H-NMRにより行った。その結果を図7に示す。2.0 ppmの位置は0-アセチルを示し、本図における下部の数値は、組成物I50中の0-アセチルの量が1.62であることを表した。

## 【0037】

HPSEC-RI分析：アセマンナンを含む組成物I50を、高性能サイズ排除クロマトグラフィー-屈折率検出（HPSEC-RI）を用いてその相対サイズを分析した。フルラン標準物質を用いてトレンドラインをプロットし、トレンドライン範囲内で検出された最高ピーク点に基づいて、試料の相対分子量を求めた。結果を図8に示す。組成物I50は、37 kDaの相対分子量（これは、図8の最初のピークによって示される範囲内の平均を表す）を示し、また48分でトレンドライン外に第二のピークが現れ、これは5 kDa未満の成分が存在することを示している。

## 【0038】

アセマンナンを含む組成物I50もHPLCで分析した。その結果を図9に示す。

## 【0039】

アセマンナンを含有する組成物I50の0-アセチル含量の定量を上記のように行った。その結果を図10に示す。

## 【0040】

## 2. アセマンナンを含む組成物の腸内健康への使用

### 2.1 IBD治療および/または予防（試験管内実験）

#### 【0041】

RGM1（ラット胃粘膜）細胞を、10%(v/v)のウシ胎児血清（FBS, HyClone, USA）と1%(v/v)の抗生物質-抗真菌剤（Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA）を添加したDMEM/F12（Corning, USA）で培養した。細胞を5% CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃で培養した。各実験の前に、培養液をリン酸緩衝生理食塩水（PBS, pH 7.4, PROTECH, Taiwan）で洗浄し、0.05%トリプシン-EDTA溶液（Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA）で剥離した後、1700 rpmで5分間遠心（Hermle Z 36 HK, Germany）し、その後完全培地に再懸濁した。

10

#### 【0042】

in vitro細胞毒性評価の詳細な方法を以下に示す。96ウェルプレートに1×10<sup>4</sup>個/ウェルの細胞を播種し、12時間培養して細胞を接着させた。アセチル化度の異なるアセマンナン（アセチル化度42%をA42、アセチル化度50%をA50、アセチル化度10%をA10、アセチル化度10%をExcpと呼ぶ）の原液（50 mg/mL）を培地中に直接調製した。賦形剤の濃度を、A10の製剤に対応して計算した。細胞を異なる濃度のアセマンナン（1000、500、200、100、50 mg/mL）で処理し、24時間および48時間インキュベートした。処理後、10 mLのCCK-8溶液（同仁堂研究所、日本）を各ウェルに加え、プレートをさらに1時間インキュベートした。マイクロプレートリーダー（EPOCH2, BioTek Instruments社、米国）を用いて460 nmの吸光度を測定した。データを平均値±SDで示し、統計的有意性をStudent's t-testで解析した。p値0.05を統計的に有意とみなした。異なる濃度のアセマンナンで処理した細胞の顕微鏡写真を、ドイツZeiss Axio Vert.A1を用いて10倍と20倍の倍率で撮影した。

20

#### 【0043】

サンプルA42、A50、A10を秤量し（必要に応じて）、無血清培地に直接溶解し、使用前に十分に混合した。試料A10は、~40%のアセマンナンまたはA50（50%アセチル化されている）と、~60%の純粋な賦形剤（コーンスターーチ）とからなり、賦形剤を加えてA50を希釈するだけで調製できる。したがって、A10のアセチル化度は約10-12%であった。細胞毒性試験用の試料A10は粉末（錠剤ではない）であったが、A10錠剤の推奨摂取量は成人で1~2錠/日であり、1錠あたり100 mgの製品（A10+賦形剤=100 mg錠剤）が含まれている。結果を図11Aおよび図11Bに示す。

30

#### 【0044】

その結果、48時間後にA10と賦形剤で細胞を処理した場合、有意な細胞増殖が認められた。しかし、A42とA50では、24時間インキュベートした場合（用量依存的に）細胞増殖が抑制されたが、48時間インキュベートした場合（500 mg/mLまで）細胞増殖が促進された。異なる処理下でのRGM1細胞の形態と生存率も、顕微鏡で評価した（結果はここには示していない）。顕微鏡写真では、すべての処理条件において細胞の形態に顕著な変化は見られなかった。さらなる結果を図12A、図12B、図12C、図13A、および図13Bに示す。

40

#### 【0045】

組成物A50のLDH放出も分析し、結果を図14に示した。前処理は、RGM1をマンナンプロ（すなわち、組成物A50）で1時間処理した後、洗浄し、新鮮な完全培地で補充したことを表す。同時培養は、RGM1をマンナンプロで24時間または48時間処理したことを表す。その結果、マンナンプロ（1 μg/mL）で処理したRGM1細胞からは、48時間ではLDHの漏出はなく、細胞毒性がないことが示された。

#### 【0046】

インドメタシンによる細胞障害に対するマンナンプロ（すなわち、組成物A50）の保護効果を実施し、その結果を図15、図16、図17A、図17B、および図18として示した。

50

#### 【0047】

腸の健康における食事性アセマンナンの利点には、消化プロセスの減衰、満腹感の増大、デンプンからの糖の放出を遅らせることなどがある。大腸では、アセマンナンは微生物によって短鎖脂肪酸に消化され、吸収されて宿主にプレバイオティクス効果を与える。水溶性食物繊維としてのアセマンナンはまた、ミネラルの吸収を高め、肥満を抑制し、炎症

性腸疾患とそれに関連する合併症（大腸がんやIBD）を抑制し、緩下（便通）を改善し、慢性的な全身性炎症を抑えるなどの作用がある。

【0048】

2.2 粘膜保護改善（*in vivo*実験）

【0049】

粘膜保護機能を評価するため、政府告示の胃腸機能改善評価法を参考に小規模予備試験を実施し、評価モデルと予備的有効量を設定した。

【0050】

体重19～22 gの6週齢雄性BALB/cAnNCrlBlwマウス11匹を用いた。うち3匹は偽薬群、3匹はビークル群、5匹はアセマンナン群であった。

10

【0051】

マウスを温度 $22 \pm 3$ ℃、相対湿度 $50 \pm 20$  %、明期12時間、暗期12時間で飼育した。マウスを個別換気ケージ（IVC）で飼育し、吸水性コーンコブ敷料（10054, Andersons, USA）、滅菌飼料（MFG, オリエンタル酵母工業株式会社、日本）、および無制限に利用可能な滅菌RO水と共に保管された。

【0052】

実験は、健康食品の胃腸機能改善評価法（厚生省告示第0920401629号）を参考にした。経口投与とし、投与量は500 mg/kg（BID）とした。実験デザインは表1の通りである。

【0053】

【表1】

20

Group	Substance	Dose <sup>a</sup> (mg/kg)	Concentration (mg/mL)	Volume <sup>b</sup> (mL/kg)	Number
G1	Sham	NA	NA	NA	3
G2	Vehicle	0 (BID)	-	10	3
G3	Acemannan	500 (BID)	50	10	5

a: the substance was administered twice daily with a 6-hour interval, continuously for 7 days. On the morning of the 8th day, after the final administration, the measurement of gastric acid secretion was conducted.

b: oral administration.

【0054】

調製には、滅菌注射用水で調製した均質溶液を用いた。投与経路および投与方法は、「検体投与標準操作手順書」（SHGLP-SOP-IA-020）に従った。投与当日、滅菌注射器を用いてマウスの体重に応じた量の物質を抜き取り、プラスチック製の給餌針から経口投与した。各マウスに投与する量を、初日に物質を投与する前のマウスの体重に基づいて計算した。物質を初めて投与した日を1日目と定義した。「実験動物飼育の標準操作手順」（SHGLP-SOP-IA-003）に従い、1日目と8日目に動物の体重を測定した。

30

【0055】

投与開始後、「動物病棟ラウンドの標準操作手順」（SHGLP-SOP-IA-009）に従った。試験期間中、マウスの臨床症状を少なくとも毎日1回観察し、記録した。マウスの生存状態を、観察間隔を少なくとも6時間空けて、1日2回モニターした。

【0056】

シェイ潰瘍法：シャム群、アセマンナン群、ビークル群のマウスを24時間絶食させた。胃幽門を結紮し、縫合して回復させた。4時間後、マウスを犠牲にし、胃を摘出した。胃液を採取し、定量し、0.01 NaOH溶液で滴定した。実験群と対照群間の総酸度の変化を計算した。p<0.05であれば、アセマンナンには胃粘膜保護機能があることが示された。

40

【0057】

データを平均値（Mean）±標準偏差（S.D.）で示した。データを、有意差の基準として0.05とし、シャム群と比較して統計的に有意な差があるかどうかを判断するためにt検定を使用して分析した。

【0058】

その結果、実験中に動物の死亡はなかった。1日目と8日目の動物の体重、臨床症状、剖

50

検所見を表2にまとめた。投与前後で体重に有意差は認められなかった。試験期間中（1日目～8日目）、有害な臨床症状は観察されなかった。剖検においても異常所見は認められなかった。以上の結果から、アセマンナン（500 mg/kg、BID）を8日間連続投与しても、マウスの体重減少や観察される臨床的副作用は認められなかった。また、臓器に巨視的な異常は観察されなかった。

## 【0059】

【表2】

Group	Mice No.	Day 1 Weight (g)	Day 8 Weight (g)	Day 1-8 Symptoms	Necropsy
G1 (Sham)	6	20.52	21.00	No adverse reactions	No abnormal findings
	11	19.90	20.48	No adverse reactions	No abnormal findings
	12	21.28	21.85	No adverse reactions	No abnormal findings
	Mean	20.567	21.110		
	SD	0.691	0.692		
G2 (Vehicle)	1	20.85	20.80	No adverse reactions	No abnormal findings
	5	21.60	21.38	No adverse reactions	No abnormal findings
	10	19.95	20.03	No adverse reactions	No abnormal findings
	Mean	20.800	20.737		
	SD	0.826	0.677		
G3 Acemannan (500 mg/kg, BID)	P (vs G1)	0.727	0.541		
	2	20.38	21.09	No adverse reactions	No abnormal findings
	4	19.76	19.50	No adverse reactions	No abnormal findings
	7	22.48	22.02	No adverse reactions	No abnormal findings
	8	21.86	21.12	No adverse reactions	No abnormal findings
	9	20.42	21.52	No adverse reactions	No abnormal findings
	Mean	20.980	21.050		
	SD	1.139	0.945		
	P (vs G1)	0.596	0.928		

## 【0060】

8日目の朝にアセマンナンとピークルを投与した後、シェイ潰瘍法を行った。24時間の絶食後、胃を幽門-噴門接合部で結紮した。4時間後、マウスを犠牲にして胃液を採取し、体重測定、pH測定、総酸度測定を行った。結果を表3、図19A、図19B、および図19Cに示す。

30

## 【0061】

【表3】

Group	Mice No.	Gastric juice weight	pH	Total acidity (mEq/mL)
G1 (Sham)	6	0.1827	1.72	0.64
	11	0.4446	1.72	0.85
	12	0.2162	4.99	0.49
	Mean	0.28117	2.810	0.660
	SD	0.14253	1.888	0.181
G2 (Vehicle)	1	0.3330	5.30	0.65
	5	0.1880	2.29	0.44
	10	0.2411	1.65	0.77
	Mean	0.25403	3.080	0.620
	SD	0.07336	1.949	0.167
G3 Acemannan (500 mg/kg, BID)	P (vs G1)	0.78396	0.872	0.792
	2	0.2086	2.16	0.55
	4	0.2240	3.52	0.40
	7	0.1923	3.00	0.34
	8	0.1460	2.31	0.44
	9	0.2293	2.61	0.22
	Mean	0.20022	2.720	0.390
	SD	0.03312	0.550	0.122
	P (vs G1)	0.24791	0.920	0.043*

\* means  $p < 0.05$ , compared with G1

## 【0062】

50

胃液重量およびpHは各群 (G1: シャム、G2: 滅菌水注射、G3: アセマンナン 500 mg/kg、BID) で有意差はなかった。しかし、G3の総酸度 ( $0.390 \pm 0.122$ ) は、G1 ( $0.660 \pm 0.181$ ) より有意に低かった。無菌水を給与したG2 ( $0.620 \pm 0.167$ ) の総酸度は、G1と有意差を示さなかった。これらのデータから、シェイ潰瘍法を用いてアセマンナン (500 mg/kg、BID) を8日間連続投与した結果、胃液重量およびpHは、シェイ対照群と比較して、統計学的に有意な差は認められなかったと結論された。しかし、総酸度は有意な減少を示した。

#### 【 0 0 6 3 】

雄性スプーラー・ドーリーラット (合計50匹、8週齢) を用いて、A10およびA50組成物の胃粘膜保護効果を試験した。適応期間の後、ラットを無作為に10群に分けた (n=5/群) : (1) NC1群 (偽手術を受け、10 mL/kg BW/日蒸留水を与える) ; (2) NC2群 (10 mL/kg BW/日蒸留水を与える) ; (3) NC3群 (335 mg賦形剤) ; (4) PC群 (臨床薬5-アミノサリチル酸) ; (5) L-A10群 (A10、100 mg/ヒト1日用量) ; (6) M-A10群 (A10、300 mg/ヒト1日用量) ; (7) H-A10群 (A10、500 mg/ヒト1日用量) ; (8) L-A50群 (A50、33 mg/ヒト1日用量) ; (9) M-A50群 (A50、100 mg/ヒト1日用量) ; (10) H-A50群 (A50、167 mg/ヒト1日用量)。

10

#### 【 0 0 6 4 】

すべての動物を1週間予備飼育し、50匹のSDラットを環境に慣らした後群分けした。ラットをプラスチック製ケージに入れ、1ケージあたり1匹または2匹とした。動物には最初に仮の識別番号をつけ、体重を測定し、体重バランスのとれた順序に従って群分けした。実験期間中、飲料水として逆浸透精製水を供給し、ラットは自由に水を飲むことができた。ラットは標準的な動物用飼料 (チャウ5001) と水を自由に摂取できた。この実験では、動物の体重を定期的に測定し、動物の健康を監視し、体重に基づいて各動物に対する試験サンプルの投与量を決定した。被験試料を、各群に必要な投与量に従って毎日秤量した。その後、被験試料を滅菌水に溶解し、7日間経口投与した。実験期間中、毎日臨床観察を行い、異常な臨床症状や死亡例を記録した。ラットの体重を2日ごとに記録し、変化を観察した。さらに3日に一度ラットの食事摂取量も記録し、水分摂取量については毎日記録した。

20

#### 【 0 0 6 5 】

A10およびA50サプリメントを7日間連続投与した後、ラットを24時間絶食させた。腹部を正中線に沿って剣状突起まで剃毛し、正中線に沿って1 cm切開して幽門結紮を行った。その後、回復のために切開部を縫合した。4時間後、正中線に沿って開腹し、大弯に沿って切開して胃を露出させた。犠牲となった胃を摘出し、胃液を収集し、その体積を測定した。採取した胃液を0.1 N NaOH溶液を用いて滴定した。総胃酸量 (mEq/L) を、以下のように計算した：総胃酸量 = 胃酸量 (L) × 添加した水酸化ナトリウム (NaOH) 量 (L) × 0.1 N (NaOH溶液滴定) × 1000。

30

#### 【 0 0 6 6 】

生理的食塩水で洗浄後、胃を平らにして撮影し、画像解析ソフトImageJを用いて解析した。画像を白黒に変換し、適切で一貫性のある画像閾値に調整することにより、胃粘膜を定量化した。損傷部位をmm<sup>2</sup>単位で測定し、胃病変指數を以下の式で算出した：胃病変指數 = 胃損傷面積 (mm<sup>2</sup>) /全胃粘膜面積 (mm<sup>2</sup>) × 100。結果を図20A、図20B、図20C、図20Dおよび図20Eとして示した。

40

#### 【 0 0 6 7 】

すべての値を平均値 ± SDで表示し、サンプルサイズを各群5匹とした。一元配置分散分析(ANOVA)を、SAS統計ソフトウェアパッケージを用いて行った。群間差の事後比較にはダントン検定を行い、有意水準p < 0.05を統計的に有意とみなした。

#### 【 0 0 6 8 】

その結果、体重、摂餌量、摂水量に各群間で有意差は認められなかった。この結果から、高用量、中用量、低用量の「A10サプリメント」および「A50サプリメント」を7日間連続投与することにより、総胃酸値、胃損傷面積、胃病変指數が有意に減少することが示された (p < 0.05)。したがって、本実験により、試験物質である「A10サプリメント」お

50

および「A50サプリメント」の胃粘膜に対する胃保護作用が確認された。

【0069】

3. アセマンナンを含む組成物のスキンケアへの使用

【0070】

UVBによって誘発されたケラチノサイトの炎症と死滅を含む細胞ストレス反応に対するアセマンナンの効果、ケラチノサイトの成長と分化に対するアセマンナンの効果、皮膚の老化に対するアセマンナンの効果を分析した。その結果、アセマンナンはHaCaT細胞の増殖を促進すること、アセマンナンはHaCaT細胞の移動を促進すること、アセマンナンはHaCaT細胞とNHEK細胞の分化マーカー（インボルクリン、ロリクリン、TGase1）の発現を誘導すること、アセマンナンはEGFRとPKCの活性化を促進することが、明らかになった。

10

【0071】

詳細な材料と方法を以下に示す。細胞培養、抗体、試薬、試験化合物：ヒトケラチノサイト細胞株HaCaTを、10 %ウシ胎児血清（FBS）と10 %ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を添加したDMEMで培養し、37 °C、5 %CO<sub>2</sub>でインキュベートした。-アクチン、インボルクリン、ケラチン10（K10）、TGase 1およびPKC IIに対する一次抗体を、Santa Cruz Biotechnology社（米国）から購入した。p63-、phospho-EGFR Y1068、phospho-PKC II S660に対する一次抗体、およびペルオキシダーゼ標識抗ウサギ/マウスIgG二次抗体を、Cell Signaling Technology社（米国）から購入した。EGFRに対する一次抗体を、EMD Millipore Corp.から購入した。ロリクリンに対する一次抗体を、GeneTex社（米国カリフォルニア州アーバイン）から購入した。PMA（Phorbol-12-myristate-13-acetate）、LPS（lipopolysaccharides）、EGF（epidermal growth factor）、ボリ（I:C）を、Sigma-Aldrich（Burlington, MA, USA）から購入した。ACE脱水物およびGP 5-1-1を、Dazzeon Biotech Co.Ltdにより準備供給した。使用前に、ACE（すなわち、組成物A50のようなAcemannanを含む組成物）脱水物を、滅菌したH<sub>2</sub>O（50 mg/mL）または0.2 %エタノールに溶解し、4 °Cで保存し、一方、GP 5-1-1はH<sub>2</sub>Oに不溶であり、DMSOに10 mg/mL懸濁し、室温で保存した。

20

【0072】

3.1 細胞生存率のMTT評価

【0073】

OECD化学物質試験ガイドライン（試験番号439：In Vitro皮膚刺激：再構築ヒト表皮試験法）の手順に従ったin vitro皮膚刺激試験による皮膚刺激。本実施形態の目的は、アセマンナン試料に暴露した際の、再構築ヒト表皮（RhE）モデルに対する被験物質の細胞毒性効果を測定することである。EpiDerm<sup>TM</sup>組織（表面0.6 cm<sup>2</sup>）を試料試験に使用した。

30

【0074】

方法：エピダーム組織を受け取った当日、無菌条件下で、表皮組織を含む24ウェルプレートを注意深く検査し、各組織の挿入物を、増殖培地をあらかじめ充填した6ウェルプレートに移した。プレートをインキュベーター（37 °C、5 %CO<sub>2</sub>、90 %RH）に60±5分間置いた。60分間の予備培養後、インサートを新しい培地に移し、さらに18±3時間一晩培養した。化学物質曝露の当日、試験物質、陰性対照（NC、滅菌DPBS）、陽性対照（PC、5%SDS in H<sub>2</sub>O溶液）の濃度の異なる30 μLを、3つの単一組織インサートに添加した。最後の組織を投与した後、すべてのプレートを加湿インキュベーター（37 °C、5% CO<sub>2</sub>、90% RH）に35±1分間移した。35分後、プレートはインキュベーターから取り出され、無菌フードに入れられ、最初に投与された組織に対して60分間の期間を置いた。60分間の被験物質曝露の後、組織インサートを滅菌DPBSですすぎ、残留する被験物質を除去するため、組織インサートを15回満たし、空にした。DPBSの一定流量を組織表面から1.5 cmの距離から流した。すべてのインサートを洗浄した後、各組織の表面を滅菌綿棒で注意深く乾燥させた。その後、組織をインキュベーター内で24時間培養した。24時間の培養後、培地を新しい培地に交換し、さらに18時間培養した。その後、MTT培地（1 mg/mL）を入れた24ウェルプレートに組織を移し、MTT評価を行った。3時間のMTTインキュベーション後、細胞ミトコンドリアにより形成された青色ホルマザン塩を2.0 mL/組織のイソプロパノールで抽出し

40

50

(抽出液、品番MTT-100-EXT)、抽出されたホルマサンの光学濃度を分光光度計を用いて570 nmで測定した。各組織について、陰性対照組織の平均値に対する相対細胞生存率を算出した。EUとGHSの分類 (R38/カテゴリー2またはラベルなし)によると、物質に暴露された3つの組織の平均相対組織生存率が、陰性対照の平均生存率の50%以下に低下した場合、刺激性が予測された。

#### 【0075】

細胞を24ウェルプレートに播種し、500  $\mu$ LのDMEM中、37 °C、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。細胞コンフルエンスが60%に達した時点で、細胞をピークルおよび異なる濃度のACEで指示された時間処理した。1 mg/mLのMTT溶液 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, St.培地を除去し、150  $\mu$ LのDMSOで置換して紫色の結晶を溶解した。細胞生存率を、結晶生成物を含むDMSO溶液のOD値 (OD550 nm-OD630 nm) によって決定した。

10

#### 【0076】

ACEの溶解性および細胞毒性：まず、ACEのH<sub>2</sub>Oおよび2%エタノールに対する溶解性をそれぞれ分析したところ、ACE脱水物は50 mg/mLの濃度でこれら2つのピークル溶液に完全に溶解し、液体の外観は透明で淡黄色であった。100 mg/mLの濃度でも完全に溶解したが、粘度が高くなった。最終的に50 mg/mLをACEのストック濃度とし、使用前に4 °Cで保存した。次に、ACEがHaCaT細胞に対して細胞毒性を示すかどうかを分析した。細胞を、2%エタノール (図21A) およびH<sub>2</sub>O (図21B) に溶解した異なる濃度のACEで処理し、次いでMTT評価を行って細胞生存率を分析した。結果は、両方のピークル中の1 mg/mLまでの濃度のACEは、48時間のインキュベーション後に細胞毒性を引き起こさないことを示した。さらに、H<sub>2</sub>Oに溶解した5 mg/mLのACEで24時間および48時間処理した細胞もまた、MTT評価によって指標化される細胞毒性を引き起こさなかった (図21B)。ACE濃度が10 mg/mLである場合、細胞生存率は、処理の24時間後に約40%まで減少した (図21B)。細胞死から生じる不必要的干渉を避けるため、以後の実験では、5 mg/mLを超えない濃度でH<sub>2</sub>Oに溶解したACEを分析に用いた。

20

#### 【0077】

図21Aおよび図21Bに示すように、HaCaT細胞におけるACEの細胞毒性試験を行った。ACE脱水物を (図21A) 滅菌水または (図21B) 0.2%エタノールに50 mg/mLの濃度で溶解してから使用した。細胞 ( $2 \times 10^4$ 個) を24ウェルプレートに播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートし、様々な濃度のACEまたはピークルを添加し、その後24時間または48時間インキュベートした。

30

#### 【0078】

##### 3.2 細胞生存率のフローサイトメトリー分析

#### 【0079】

細胞を回収し、製造元のプロトコル (BioLegend, San Diego, CA, USA) に従って、Annexin V-FITC/PIを含む染色バッファーに再懸濁した。データ解析にはFlowJoソフトウェアを用いた。37 °Cで20分間インキュベートした後、細胞はフローサイトメトリー (FACSCalibur, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) によって測定された。細胞生存率を、5 mg/mL ACE (すなわち、アセマンナン含有組成物) で48時間処理した後、アネキシンV-FITC/PI染色によるフローサイトメトリーで測定した。結果を図22Aおよび図22Bに示す。

40

#### 【0080】

##### 3.3 UVB照射

#### 【0081】

UVBは5本のT-8M UVチューブを間隔をあけて配列したものから供給された。UVBのエネルギー出力 (312 nm) を、UV Bio-Link (BLX-312; Vilber Lourmat, France)で測定した。培地またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の細胞に、異なる線量のUVBを照射した。UVB照射後、細胞は新鮮な培地を与え、指示された期間培養を続けた。

#### 【0082】

ACEは、HaCaT細胞におけるUVB誘発細胞毒性に対して保護効果を示さない。ACE (すなわ

50

ちアセマンナンを含む組成物)がUVB照射後の細胞を死滅から保護できるかどうかを調べるために、ACEをそれぞれ1 mg/mLと5 mg/mLの濃度で30分間処理した後、90 mJ/cm<sup>2</sup>のUVBを照射し、24時間培養後にフローサイトメトリーで細胞生存率を解析した。その結果、FBSを含むDMEMで培養した細胞は、照射により細胞生存率が約60 %低下したのに対し、PBSでUV照射した後の細胞生存率は15 %に低下したことから、血清がUVBに対する細胞の感受性を低下させることが示唆された。しかしながら、ACEで細胞を前処理すると、FBSの有無にかかわらず、UVB照射に対する防御効果は認められなかった(図23A)。さらに、DMEM中でACEにて前処理した細胞が低線量UVB(25および30 mJ/cm<sup>2</sup>)照射に対して保護効果を有するかどうかを調べた。図23Bに示すように、ACEは、やはりUVB照射に対して細胞保護効果を示さなかった。

10

## 【0083】

その結果、試料の皮膚刺激性を評価するため、60分間暴露in vitro試験(OECD, TG 439)を実施した。この試験方法において、プランクのODは0.035±0.0003であった。陰性コントロールの細胞生存率は100±2.115 %であり、陽性コントロール(5 % SDS)の細胞生存率は3.406±0.270 %であった。一方、被験物質10 mg/mLと1 mg/mLの細胞生存率は、それぞれ107.975 ± 1.788 %と121.320 ± 5.635 %であった(表4)。EUとGHSの分類(R38/カテゴリー2またはラベルなし)によれば、被験物質に暴露した3つの個々の組織の平均相対組織生存率が、陰性対照の平均生存率の50 %以下に低下した場合、刺激性が予測される。このプロジェクトの実験結果に基づくと、1 mg/mLと10 mg/mLの試料では、平均細胞生存率は100 %以上となる。EUおよびGHSの分類(R38/カテゴリー2またはラベルなし)によると、試験品は皮膚に対して非刺激性と分類される。

20

## 【0084】

## 【表4】

Optical density (OD) and viability of EpiDerm <sup>TM</sup> tissue					
Test group	OD		Percentage of viability (%)		
	Mean	SD	Mean	SD	CV % [%]
Negative control	1.977	0.042	100.0	2.115	2.115
Positive control	0.067	0.005	3.406	0.270	7.940
Test article (10 mg/mL)	2.135	0.036	107.975	1.788	1.656
Test article (1 mg/mL)	2.399	0.111	121.320	5.635	4.645

The classification category of test article (OECD TG 491)			
Test substance	Cell viability (%)		UN GHS Classification
	10 mg/mL	1 mg/mL	
Test article (DAZZEON BIOTECH CO., LTD.)	107.975 ± 1.788	121.320 ± 5.635	Non-irritant

## 【0085】

図23Aおよび図23Bに示すように、ACEは、UVB誘導細胞死からHaCaT細胞を保護することができない。(図23A)細胞(1×10<sup>5</sup>)を12ウェルプレートに播種し、ACE(1および5 mg/mL)で30分間処理した。その後、完全培地またはPBSの条件下で、UVBを90 mJ/cm<sup>2</sup>の線量で照射した。UVB照射後、細胞は完全培地で24時間培養を続けた。細胞生存率は、アネキシンV-FITC/PI染色によるフローサイトメトリーで決定した。(図23B)細胞は、ACE(3 mg/mL)の前処理の有無にかかわらず、それぞれ25および30 mJ/cm<sup>2</sup>の線量でUVB照射された。24時間培養後、顕微鏡下で写真を撮ることにより細胞死の程度を記録した。

40

## 【0086】

## 3.4 RNA抽出、cDNA作製、定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)

## 【0087】

トータルRNA抽出試薬(ReZol<sup>TM</sup> C&T, Protech Technology Enterprise Co., Ltd)を

50

用いて、HaCaT細胞からトータルRNAを抽出した。RNA (1 μg) を鋳型として、Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT、Promega Corporation、米国) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作成した。qPCRには、FastStart universal SYBR&reg; Green Master (Roche Diagnostics GmbH、ドイツ) を用い、qRT-PCR装置 (QuantStudio™ 5、Applied Biosystems™) で、標的遺伝子の転写レベルを定量的に測定した。すべての遺伝子の転写レベルを、b-アクチンのレベルに対して正規化した。mRNA発現の変化を、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法を用いて計算した。このプロジェクトで使用したプライマーセットの配列を表5に示す。

## 【0088】

【表5】

10

Sequences of primer sets.

Name	Sequences (5' to 3')
IL-6	F: GGTACATCCTCGACGGCATCT R: GTGCCTCTTGCTGCTTCAC
IL-8	F: ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC R: AACCCCTCTGCACCCACTTTTC
TNF- $\alpha$	F: CGAGAAAGGGTGAAGACTCA R: CTGCCAGACTCCGGCAA
COX-2	F: AGCCTCGGCCAGATGGC R: AGGGACACGCCCTTCACG
IL-1 $\alpha$	F: CGTTCACTTTAACCCAAATCCA R: TCCTCACCTAACCTCTCATCA
IL-1 $\beta$	F: CACCATGCCACCTCTACCGATCA R: CTTGCTCCATATCCCTCTCCCT
MMP-1	F: CTGGCCACAACCTGCCAAATC R: CTGTCCCTGAAACAGCCCACTACTTA
$\beta$ -actin	F: CGGGGACCTGACTGACTACC R: AGGAAGGCTGGAAAGACTCC

IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; COX-2, cyclooxygenase-2; MMP-1, matrix metalloproteinase-1.

## 【0089】

30

その結果、ACEはIL-1、IL-1、IL-6、IL-8、COX-2、TNF- $\alpha$ 遺伝子の発現を誘導することが示された。ACE (すなわちアセマンナンを含む組成物) が炎症を制御できるかどうかを理解するために、細胞をACE (1および5 mg/mL) で30分間処理した後、60 mJ/cm<sup>2</sup>のUVBを照射した。4時間後と8時間後に細胞を回収し、qPCR解析を行った。図24に示すように、UVBはIL-6、TNF- $\alpha$ 、およびCOX-2遺伝子発現の顕著なアップレギュレーションを引き起こしたが、IL-8、IL-1、およびIL-1については約2倍の増加という弱い影響しか及ぼさなかつた。ACE (5 mg/mL) 処理は、IL-8とTNF- $\alpha$ の発現に対するUVBの効果を増強することができる。次に、ACE処理の有無にかかわらず、異なる照射量のUVB (30および60 mJ/cm<sup>2</sup>) を細胞に照射した。図25では、8時間培養後、ACE (5および10 mg/mL) 単独でこれらの炎症因子の遺伝子発現を増加させ、TNF- $\alpha$ の増加は少ないことがわかった。UVBと比較して、ACEはIL-8、IL-1、IL-1遺伝子発現に対してUVBよりも高い効果を示し、TNF- $\alpha$ 、COX-2に対してはUVBと同程度の効果を示した。UVB照射に加えて、ACEとEGF (EGFRアゴニスト)、LPS (TLR4アゴニスト)、ポリ (I:C) (TLR3アゴニスト) の併用による炎症因子の遺伝子発現への影響も測定した。図26では、EGFがCOX-2遺伝子発現を顕著に亢進し、IL-1およびIL-1遺伝子発現をわずかに亢進することが見出された。COX-2発現に対する相加効果は、ACEとEGFの間で観察された。対照的に、EGFはACE誘導性のIL-6およびTNF- $\alpha$ 遺伝子発現を抑制した。LPSとポリ (I:C) そのものは、これらの遺伝子発現には影響を及ぼさなかつたが、ACE誘導性のIL-6、TNF- $\alpha$ 、およびCOX-2遺伝子発現を抑制した。なお、ACEがIL-1遺伝子の発現を促進するかどうかについては、本研究では実験結果に一貫性がなかつたため (図25 vs. 図26)、今後さらなる確認が必要である。さらに、ACEが皮膚のしわ形成プロセス18の指標とされるMMP-1遺伝子の発現を制御できるかどうかを調べた。その結果、UVBとEGFR

40

50

はMMP-1遺伝子の発現を増加させたが、ACE、LPS、poly (I:C)は増加させず、8時間後のそれらの作用はACEによって変化しなかった（図27）。

#### 【0090】

図24は、HaCaT細胞におけるUVB誘発炎症遺伝子の発現に対するACEの時間依存的効果を示している。細胞をピークルまたはACE（1および5 mg/mL）で30分間処理した後、UVBを60 mJ/cm<sup>2</sup>の線量で照射した。4時間後と8時間後に細胞を回収し、溶解して全RNA抽出、cDNA作成、その後のqPCR解析を行った。

#### 【0091】

図25は、HaCaT細胞において、異なる照射量のUVBによって誘導される炎症性遺伝子の発現に対するACEの効果を示している。細胞をピークルまたはACE（5および10 mg/mL）で30分間処理した後、30または60 mJ/cm<sup>2</sup>のUVB照射を行った。8時間後、前述の方法でqPCRを行い、標的遺伝子のmRNA発現レベルを解析した。

10

#### 【0092】

図26は、HaCaT細胞における炎症性遺伝子発現に対するACE、EGF、LPS、およびポリ（I:C）の効果を示している。細胞をピークルまたはACE（5および10 mg/mL）で30分間処理した後、EGF（50 ng/mL）、LPS（1 mg/mL）およびポリ（I:C）（10 mg/mL）でそれぞれ8時間処理した。標的遺伝子のmRNA発現レベルを解析するために、前述のようにqPCRを行った。

#### 【0093】

図27は、ACEがMMP-1遺伝子発現を変化させないことを示している。細胞をピークルまたは異なる濃度のACE（1、5、10 mg/mL）で30分間処理した後、60 mJ/cm<sup>2</sup>のUVB照射を4時間と8時間（A）、またはEGF（50 ng/mL）、LPS（1 mg/mL）、poly（I:C）（10 mg/mL）で8時間処理した（B）。MMP-1遺伝子のmRNA発現レベルを解析するために、qPCRを前述のように行なった。

20

#### 【0094】

##### 3.5 細胞増殖評価

#### 【0095】

細胞（ $2 \times 10^4$ 個）をFBS無添加のDMEMで12ウェルプレートに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで24時間培養した。培地を除去し、ACE（0.5、1、3 mg/mL）の存在下または非存在下で、10% FBSを含む新鮮なDMEMを加えた。細胞増殖は、トリパンブルー染色で24時間ごとに細胞数をカウントすることにより決定した。BrdU組込み評価では、細胞（ $1 \times 10^4$ ）を底が透明で平らな黒色96ウェルプレートに播種し、FBSを含まないDMEM中で24時間培養した。培地を除去し、ACE（1および3 mg/mL）の存在下または非存在下で10% FBSを含む新鮮なDMEMを46時間添加した。細胞を固定し、抗BrdU-ペルオキシダーゼと90分間インキュベートし、洗浄した後、製造元のプロトコルに従って基質反応を行った（細胞増殖ELISA、BrdU、Roche、スイス）。化学発光は、Synergy H1マイクロプレートリーダー（BioTek, Winooski, VT, USA）を用いて測定した。

30

#### 【0096】

その結果、ACEがHaCaT細胞の増殖を促進することが示された。ACEが細胞増殖に影響を及ぼすかどうかを検討した。24時間の飢餓状態の後、細胞を10% FBSを含むDMEMに置換し、異なる濃度のACEを添加または非添加した。我々は、細胞増殖がACEによって濃度依存的に促進されることを見出した（図28A）。BrdU評価のデータからも、ACEはより高いBrdU取り込みを示したことから、ACEは細胞周期のS期にある細胞のDNA合成を促進することが示された（図28B）。

40

#### 【0097】

図28Aおよび図28Bは、ACEが濃度依存的にHaCaT細胞の増殖を促進することを示している。細胞を播種し、トリパンブルー染色による細胞計数のために12ウェルプレート上で24時間飢餓状態にした（図28A）、または細胞をBrdU組込み評価のために96ウェルプレート上に播種した（図28B）。その後、10% FBSと指示濃度のACEを含む新鮮なDMEMに交換した。細胞数は24時間ごとにカウントした。BrdU取り込み評価では、48時間培養後に細胞を回収

50

し、製造元のプロトコルに従ってBrdUシグナル強度を測定した。\* p<0.05を、ピークル処理細胞と比較した。

【0098】

### 3.6 細胞遊走試験

【0099】

24ウェルプレートの各ウェルに2ウェルのシリコン培養インサートを置き、シリコン培養インサートのウェルに $2 \times 10^4$ 個の細胞を一晩播種した。細胞遊走を観察する前に、細胞を様々な濃度のACEで処理した。指示された時点で、細胞の移動を顕微鏡で観察し、写真を撮って記録した。ギャップ回復領域のパーセンテージを、Image Jソフトウェアを用いて分析し、定量化した。

10

【0100】

その結果、ACEがHaCaT細胞の遊走を促進することが示された。次に、ケラチノサイトの遊走に対するACEの効果を調べた。創傷治癒モデルを用いて、2ウェルシリコン培養インサートに細胞を播種し、細胞間に隙間を作った。図28Aおよび図28Bに示すように、ACEは細胞増殖を増加させることができるので、細胞増殖が細胞遊走の結果を妨げるのを避けるために、細胞をマイトマイシンCで処理した。図29Aに示すように、2  $\mu\text{g/mL}$  および 5  $\mu\text{g/mL}$  のマイトマイシンCは確かに細胞増殖を阻害し、細胞数を減少させた。細胞数の減少は、それぞれ2  $\mu\text{g/mL}$  および 5  $\mu\text{g/mL}$  のマイトマイシンC処理によって、48時間および24時間に生じた。この所見は、2  $\mu\text{g/mL}$  のマイトマイシンCが24時間以内の遊走評価において適切である可能性を示している。この問題をさらに確認するために、マイトマイシンC (2  $\mu\text{g/mL}$ ) とACEの併用効果を試験した。その結果、図28Aに見られるようなACE (1 および 3  $\text{mg/mL}$ ) 誘発細胞増殖は、マイトマイシンC (2  $\mu\text{g/mL}$ ) によって阻害されることがわかつた (図29B)。これらの知見の下で、マイトマイシンC (2  $\mu\text{g/mL}$ ) およびACE (0.5 および 5  $\text{mg/mL}$ ) を共処理した条件下で細胞遊走を測定した。図29Cおよび図29Dに示すように、ACE (5  $\text{mg/mL}$ ) の存在下では、ピークル処理よりも細胞の移動が速く、細胞の移動を促進するACEの効果が明らかになった。

20

【0101】

図29A、図29B、図29C、および図29Dは、ACEがHaCaT細胞の移動を加速することを示す。(図29Aおよび図29B) 細胞を、ACE (1  $\text{mg/mL}$  または 3  $\text{mg/mL}$ ) の非存在下 (図29A) または存在下 (図29B)、示された濃度のマイトマイシンCで処理した。細胞数をトリパンブルー染色によって計数した。(図29C) マイトマイシンC (2  $\mu\text{g/mL}$ ) 含有培地内で培養した細胞を、ピークルまたはACE (0.5 および 5  $\text{mg/mL}$ ) 処理し、細胞移動を顕微鏡下で指示された時点で決定した。(図29D) 細胞移動に対するACEの効果を、図29Cに示すように、ギャップ回復領域を定量化するためにImage Jソフトウェアを用いて評価した。

30

【0102】

### 3.7 ウエスタンプロット

【0103】

RIPAバッファー (50 mM Tris at pH 7.6、150 mM NaCl、0.1% SDS、0.1% NaD0c、1% Triton X-100、2 mM NaF、2 mM EDTA、2 mM Na3V04、1 mM PMSF) を用いて細胞を溶解した。ソニケーターでホモジナイズした後、細胞抽出液を5Xサンプルバッファー (50 mM Tris at pH 6.8、5% SDS、37.5%グリセロール、36 mM -メルカプトエタノール、0.25%ブロモフェノールブルー) で希釈し、95 °Cで10-15分間加熱した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にかけた。ゲル上のタンパク質をポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF, GE Healthcare Life Sciences, USA) に移し、5%スキムミルクを含むTBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で30分間ブロッキングした。メンブレンをTBS-Tバッファーで15分間3回洗浄した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヤギIgG (1:10000) または抗ウサギ/マウスIgG二次抗体 (1:10000) とTBS-Tバッファーで1時間インキュベートした。現像を、強化化学発光溶液 (Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer, Inc.マサチューセッツ州、米国) を用いて行った。タンパク質のシグナルを、ChemiDocTM MP Image System (Bio-Rad) を用いて取得し、Image Labソフトウェア (Bi

40

50

o-Rad) を用いて解析した。

【 0 1 0 4 】

その結果、ACEがHaCat細胞のケラチノサイト分化マーカーの発現を誘導することが示された。また、ACEがHaCaT細胞の分化に影響を及ぼすかどうかについても検討した。この目的のため、異なる濃度のACE(すなわち、アセマンナンを含む組成物)で処理した細胞を、特定の分化マーカータンパク質の発現レベルについて、指定された時点で分析した。さらに、分化誘導試薬PMA(100 nM)で処理した細胞を標準反応として用いた。その結果、PMAの効果と同様に、ACE(3 mg/mL)はインボルクリン、ロリクリン、TGase1を増加させたが、K10は増加させなかった(図30Aおよび図30B)。p63-aはケラチノサイト分化の重要な調節因子であり、そのダウンリギュレーションが前提条件であることが示されている。我々は、PMAとACEの両方がp63-aを一過性にダウンリギュレートし、その発現はPMAで12~24時間、ACEで0~12時間であることを見出した。これらの結果は、ACEがHaCaTの分化を制御するために機能している可能性を示唆している。EGFRとPKCはケラチノサイト分化の重要な制御因子であることから、両経路に対するACEの作用機序を解読した。PMAの作用と同様に、ACEはEGFRおよびPKC bIIのリン酸化を促進することによって活性化することができる(図30C)。しかしながら、ACEが誘導するEGFRリン酸化は、PMAよりも反応が弱く、持続時間が短い。特筆すべきは、ACEはPMAよりもPKC bIIのより明らかな活性化を誘導したことである。これらの所見はすべて、ACEがPKC活性化を介してケラチノサイト分化を誘導する可能性を示している。

10

【 0 1 0 5 】

20

図30A、図30Bおよび図30Cは、ACEがPMAと同様にケラチノサイトの分化を誘導し、PKCおよびEGFRを活性化することを示している。(図30A)細胞を、PMA(100 nM)またはACE(3 mg/mL)で、それぞれ6、12、24、および36時間処理した。(図30B)細胞を、PMA(100 nM)またはACE(1、3、または5 mg/mL)で36時間処理した。(図30C)細胞を、PMA(100 nM)またはACE(3 mg/mL)で、それぞれ0.5、1、2、および6時間処理した。細胞溶解液を回収し、標的タンパク質に対する一次抗体を用いた免疫プロッティング評価用に調製した。PMAは、phorbol-12-myristate-13-acetateを意味する。さらなる結果を図31、図32、図33に示す。

30

【 0 1 0 6 】

4.肺のケアのためのアセマンナン含有組成物の使用

4.1 抗ウイルス(疾病の治療または予防)

【 0 1 0 7 】

40

ヒト気管支上皮細胞(NHBE)をアセマンナン含有組成物の異なる量で処理し、その細胞毒性を確認した。結果を図34に示す。気道上皮細胞の完全性は、病原体などに対する障壁を形成することにより、自然免疫系の重要な構成要素である。上皮の完全性は、隣接する細胞間のタイトジャンクション(TJ)と接着結合(AJ)に依存している。従って、3D正常ヒト気管支上皮細胞(NHBE)培養物において、処理によって上皮の完全性が維持されるかどうかをモニターするために、野生型SARS-CoV-2およびBQ1.1の感染に先立ち、アセマンナン(例えは、アロエエキス、本明細書では組成物I50を使用)を含む組成物を上皮の先端側に添加した。経上皮電気抵抗(TEER)を感染の1-2-3日後に測定し、実験デザインを図35に示した。TEERの測定は、フィルター支持体上の細胞層の均一性、および極性細胞間に形成されたタイトジャンクションの完全性に関する情報を提供する便利な技術である。したがって、TEER測定はしばしば上皮バリア機能の研究に用いられる。TEER分析では、SO<sub>P</sub>TEERに従って3回の独立した実験を繰り返す(Zaderer, V., Dichtl, S., Posch, W. et al. GlyPerA<sup>TM</sup>は、SARS-CoV-2感染や炎症事象から気道上皮を効果的に保護する。Respir Res 24, 88 (2023); Zaderer, V., Dichtl, S., Bellmann Weiler, R. 他ColdZyme<sup>TM</sup>は、BA.4/5による感染から気道上皮を保護する。Respir Res 23, 300 (2022).)。結果を図36A、図36B、図36C、図36Dおよび図36Eに示す。

【 0 1 0 8 】

50

リアルタイムRT-PCR: 非感染または感染および未処理または処理NHBE細胞の上清中に放

出されたウイルスは、標準化されたSARS-CoV-2リアルタイムRT-PCRを用いて絶対定量される。結果を図37に示す。

【0109】

5. アセマンナンを含む組成物の眼のケアへの使用

【0110】

組成物A50およびI50の眼に対する影響を分析するため、眼刺激性試験（ITRIによる）を実施した。5000個の網膜色素上皮細胞を、グルタミン酸と10 %FBSを含むDMEM+F12に一晩播種した。異なる濃度のアセマンナン、ITRI、Acyl-50（50%アセチル化アセマンナン、例えば組成物A50）を48時間添加した。1/10 MTTを30分間添加し、OD460を検出した。結果は図38のように示された。同様の実験による組成物I50のさらなる結果を図39として示した。

10

【0111】

SIRC（Statens Serum Institut Rabbit Cornea）細胞をATCC（CCL60<sup>TM</sup>）から購入し、10 %ウシ胎児血清（Thermo Fisher、Cat.No.16000044）、2 mM Lglutamin e、50-100 unit s/mL penicillin、および50-100 µg/mL strep tomycin（Thermo Fisher、Cat.No.151401 22）を添加したEagle's minimum essential medium（ATCC、Cat.No.30-2003）中で、5 % CO<sub>2</sub>下、37 °Cで培養した。細胞を $6 \times 10^3$ /ウェルで96ウェルに接種し、コンフルエントになるまで4日間培養した。96ウェルに培養した細胞を、5 %および0.05%濃度の試験薬液200 µL/ウェルに室温で5分間曝露した。曝露後、細胞を200 µLのPBSで2回洗浄し、0.5 mg/mL MTT溶液（Thermo Fisher社、商品番号M6494）を200 µL添加した。5 %CO<sub>2</sub>、37 °Cで2時間インキュベートした後、MTT溶液をデカントし、0.04 N塩酸-イソプロパノール200 µLを加え、暗所、室温で1時間MTTホルマザンを抽出し、プレートリーダー（Thermo Fisher, Varioskan LUX）で570 nmの吸光度を測定した。各試験薬で得られた光学密度（OD）値を用いて、100%とした溶媒対照に対する細胞生存率を算出した。実験を3反復ウェルで、3回独立に繰り返した。

20

【0112】

重篤な眼障害を引き起こす試験化学物質（UN GHSカテゴリー1）および眼刺激性または重篤な眼障害について、分類を要しない試験化学物質（UN GHSカテゴリーなし）を特定するための細胞生存率カットオフ値を表6にまとめた。

【0113】

30

【表6】

Prediction model of the STE test method		
Cell viability		UN GHS
At 5 %	At 0.05%	Classification
>70%	>70%	No Category
<70%	>70%	No stand-alone prediction can be made
<70%	<70%	Category 1

【0114】

40

その結果、短時間暴露 in vitro 試験（OECD, TG 491）を実施し、DAZZEON BIOTECH CO., LTD.が提供する試験品の眼刺激性を評価した。試験結果は以下の基準を満たしている：(1)培地対照のODは、ブランクODを差し引いた後、0.3以上であること。(2)溶媒対照の細胞生存率は、培地対照に対して80 %以上であること。(3)陽性対照(0.01 % SLS)の細胞生存率は、過去の実験の2標準偏差以内であること。(4)3つの独立した細胞生存率の標準偏差(SD)は、試験品の5 %濃度と0.05 %濃度の両方で15 %以下であること。この試験手順では、培地対照のODは $0.538 \pm 0.048$ である。溶媒対照の細胞生存率は $93.935 \pm 07.140\%$ 、陽性対照(0.01 % SLS)の細胞生存率は $36.540 \pm 08.854\%$ 、そして乳頭条の細胞生存率のSDは15 %以下である（表7）。3つの独立した試験で、すべての合格基準を満たしている。試験品はPBSで0.05 %と5 %の2つの濃度で調製され、細胞生存率はそれぞれ97.07

50

6 ± 08.439 %と102.988 ± 07.420 %である。OECD TG 491の予測モデルによれば、いずれの試験濃度においても細胞生存率は70 %を超えており、眼刺激性は「カテゴリーなし」に分類される（表8）。

【0115】

【表7】

Test group	Optical density (OD) and cell viability of SIRC cells			
	OD		Cell viability (%)	
	Mean	SD	Mean	SD
Medium control	0.538	0.048	100.000	2.007
Solvent control	0.504	0.052	93.935	7.140
Positive control	0.197	0.053	36.540	8.854
Test article (5%)	0.555	0.071	102.988	7.420
Test article (0.05%)	0.521	0.054	97.076	8.439

【0116】

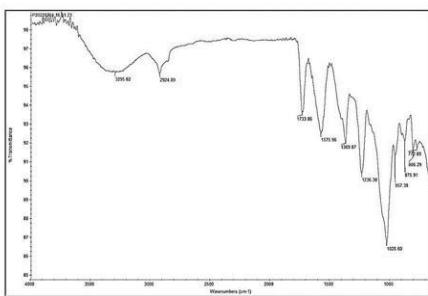
【表8】

Test substance	The classification category of test article (OECD TG 491)		
	Cell viability (%)		UN GHS Classification
	5% concentration	0.05% concentration	
Test article (DAZZEON BIOTECH CO., LTD.)	109.834 ± 9.039	103.407 ± 8.388	No Category

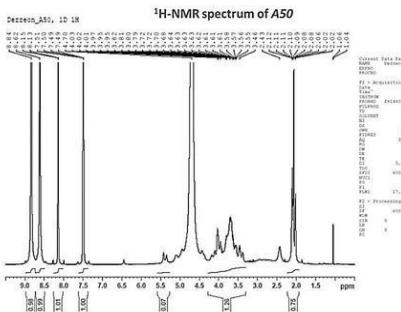
【0117】

上述および後述する実施形態は例示に過ぎない。多くの詳細は、当該技術分野においてしばしば見出される。従って、そのような多くの詳細は、簡潔にするために、本明細書では示さず、説明もしない。本開示の多数の特徴および利点が、本開示の構造および機能の詳細とともに、前述の説明で示されたとしても、本開示は例示に過ぎず、詳細において変更がなされ得る。したがって、上述および後述する実施形態は、特許請求の範囲内で変更され得ることが理解される。

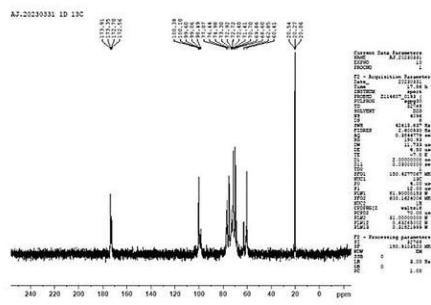
【 図 1 】



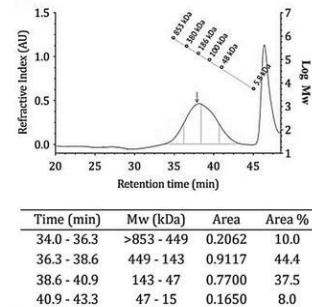
【図2】



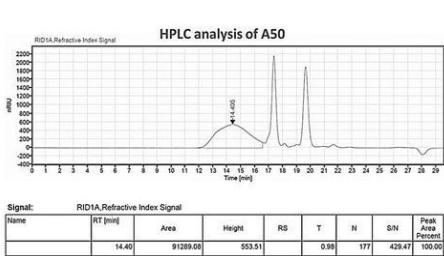
【 図 3 】



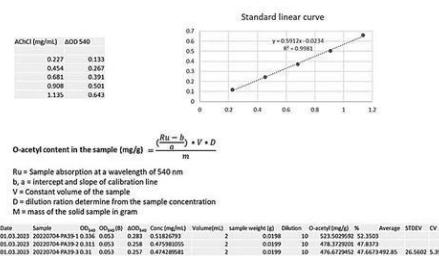
【 図 4 】



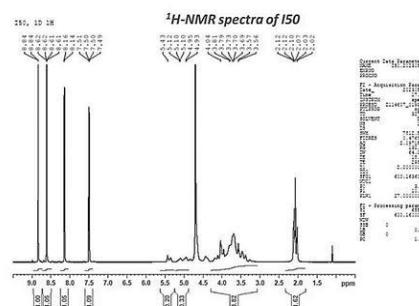
【 図 5 】



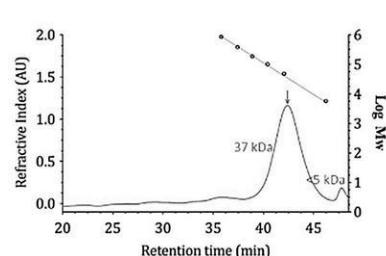
〔 义 6 〕



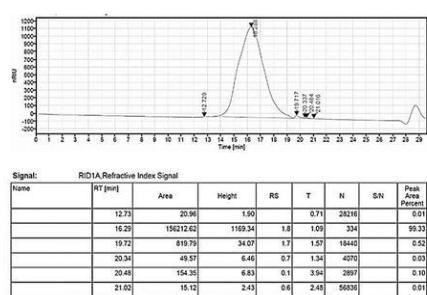
【圖 7】



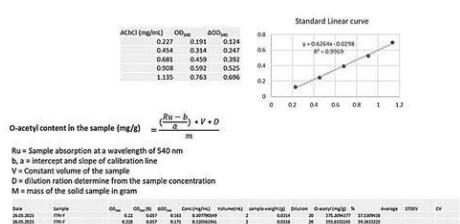
〔 四 8 〕



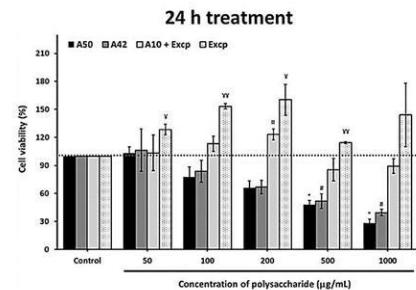
【図9】



【図10】

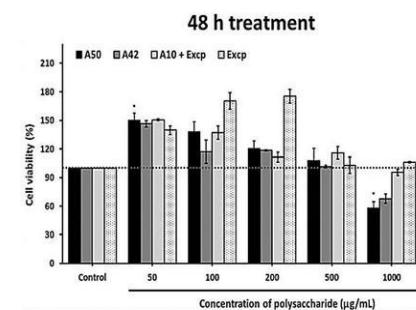


【図11A】

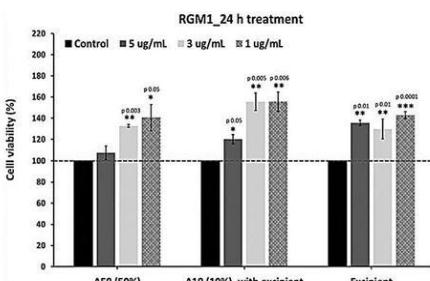


10

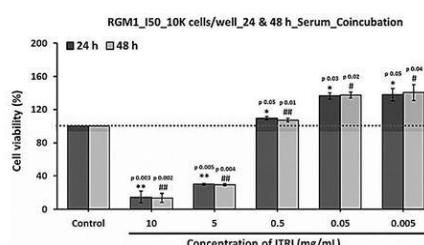
【図11B】



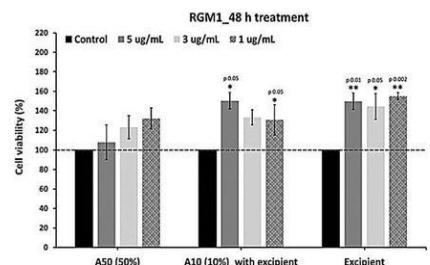
【図12A】



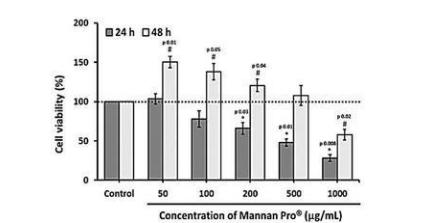
【図12C】



【図12B】

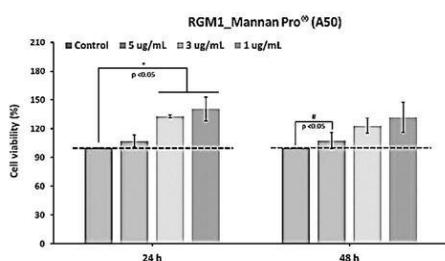


【図13A】

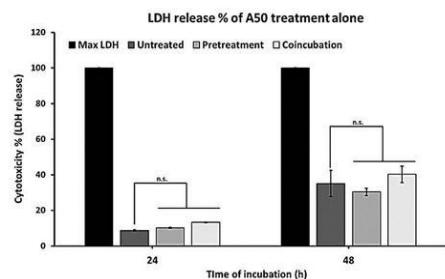


Mannan Pro® showed cellular cytotoxicity above 100 μg/mL (24 h) and 500 μg/mL (48 h)

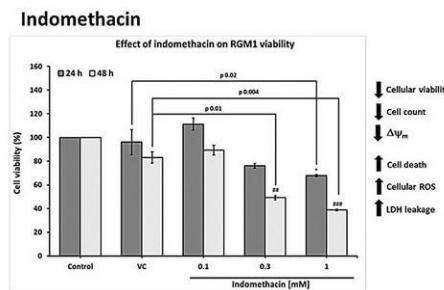
【図13B】



【図14】

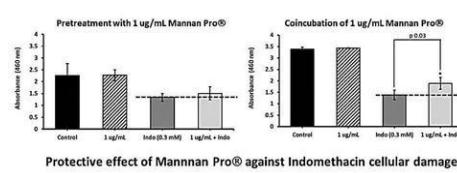


【図15】

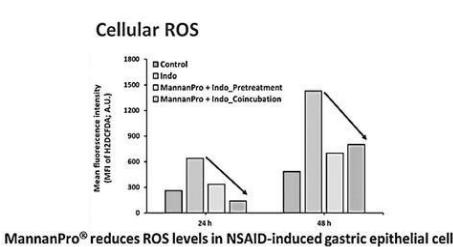


10

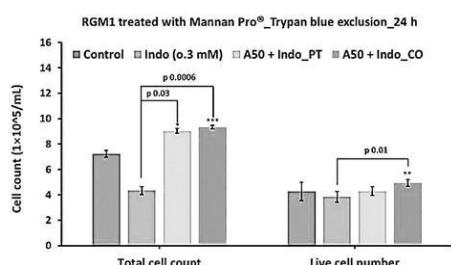
【図16】



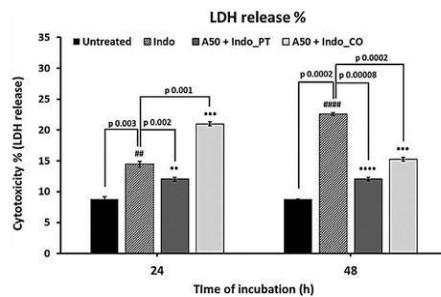
【図17A】



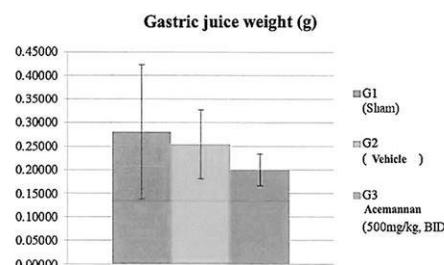
【図17B】



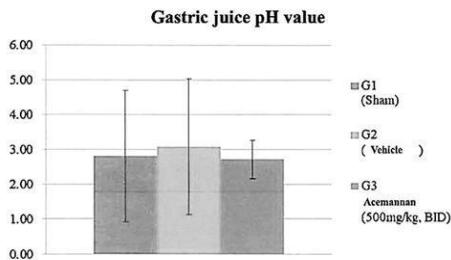
【図18】



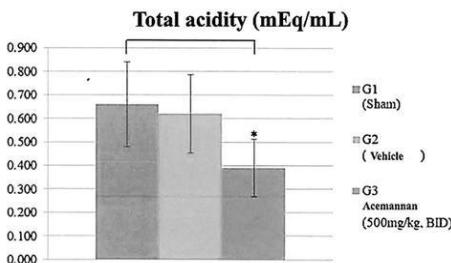
【図19A】



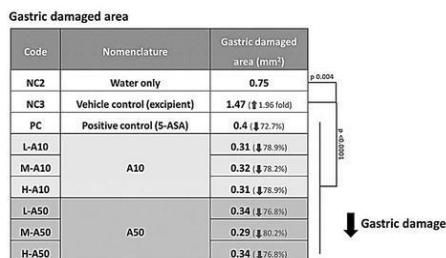
【 図 1 9 B 】



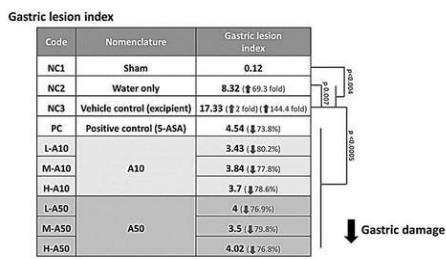
【 囮 1 9 C 】



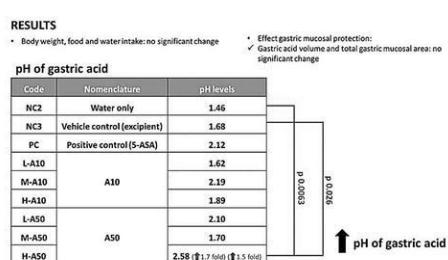
〔 20C 〕



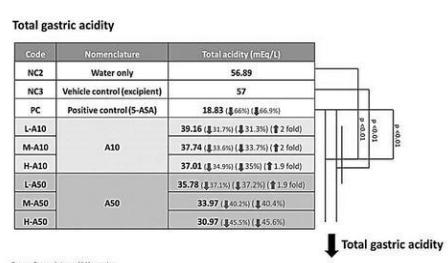
【図20D】



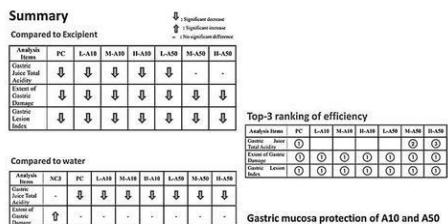
## 【図20A】



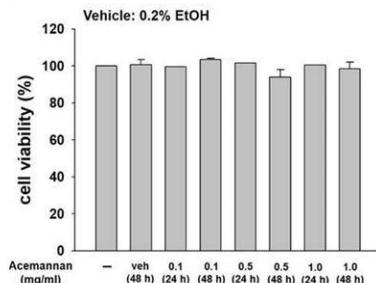
【 図 2 0 B 】



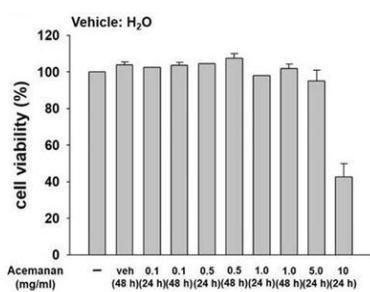
( 2 0 E )



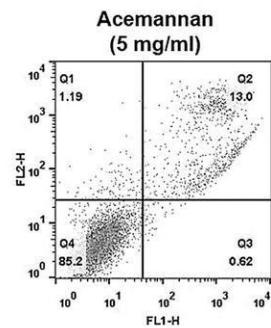
【図21A】



【図 2 1 B】

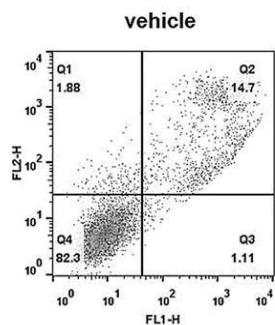


【図 2 2 B】

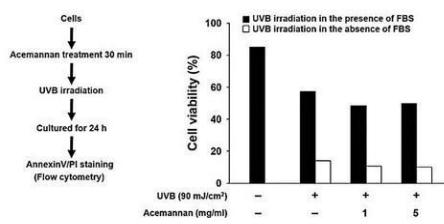


10

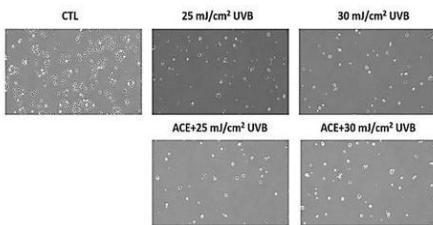
【図 2 2 A】



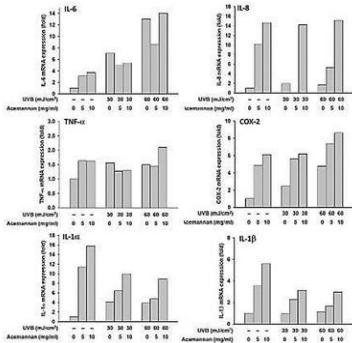
【図 2 3 A】



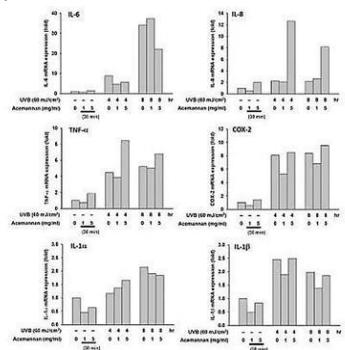
【図 2 3 B】



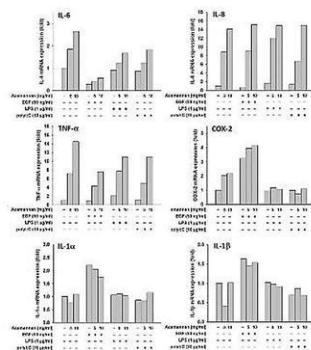
【図 2 5】



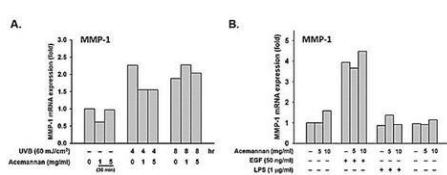
【図 2 4】



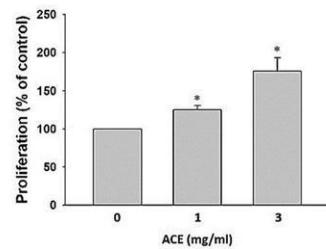
【図 2 6】



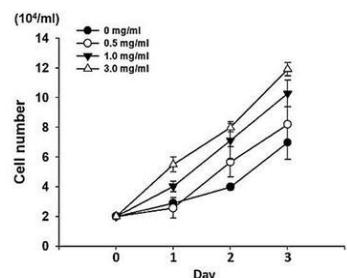
【図27】



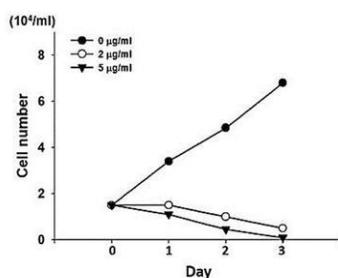
【 図 2 8 B 】



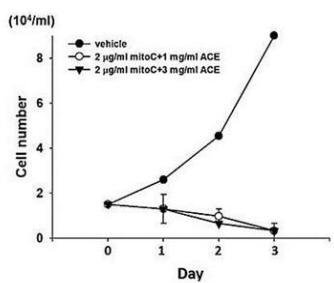
【図28A】



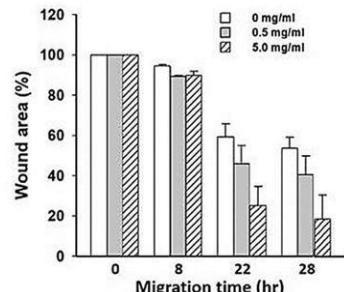
【図29A】



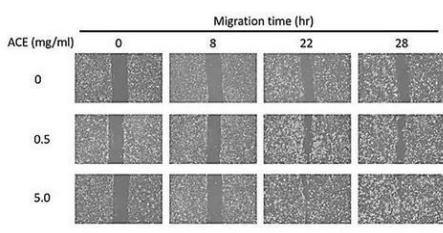
【図29B】



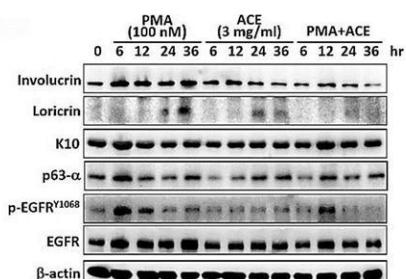
【図29D】



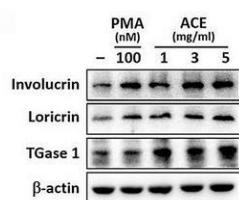
〔四二九〇〕



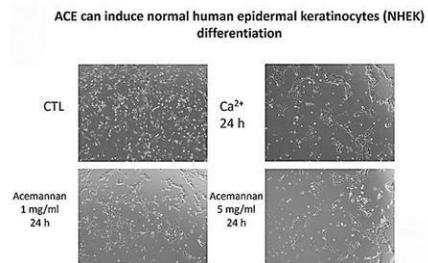
【 30A 】



【図30B】

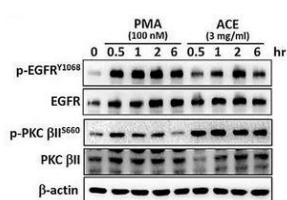


【図31】



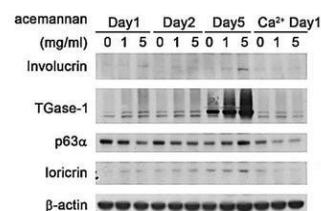
10

【図30C】



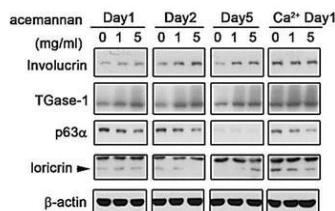
【図32】

➤ Acemannan can induce NHEK differentiation markers dose-dependently and also enhance Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation.

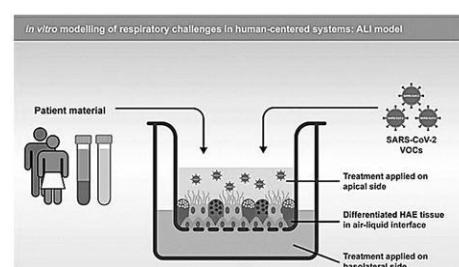


【図33】

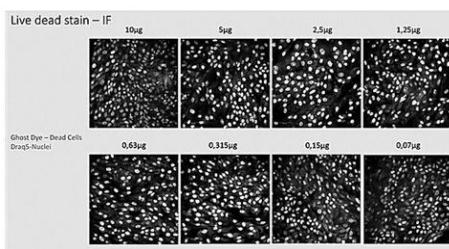
➤ Acemannan can induce NHEK differentiation markers dose-dependently and also enhance Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation.



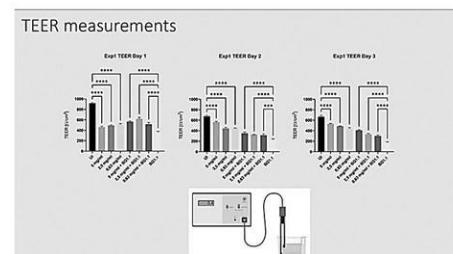
【図35】



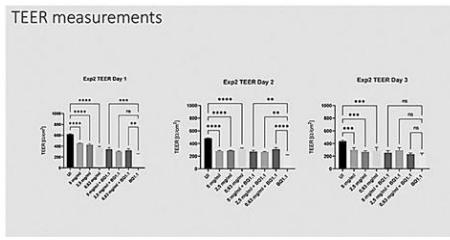
【図34】



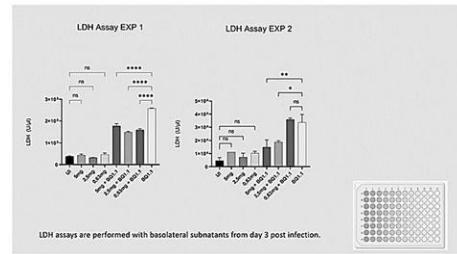
【図36A】



【図36B】

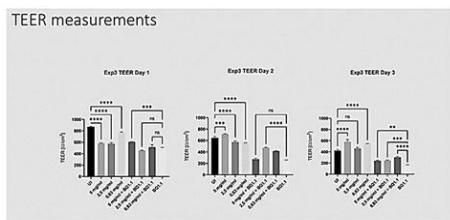


【図36D】

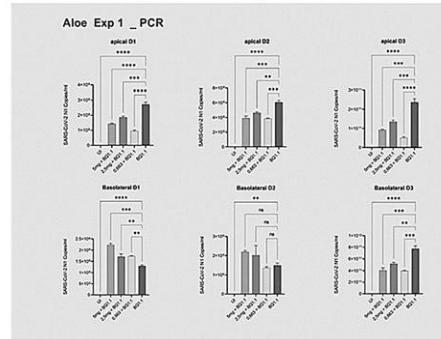


10

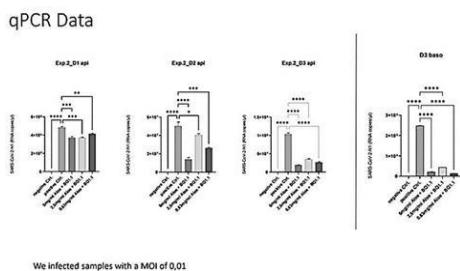
【図36C】



【図36E】



【図37】



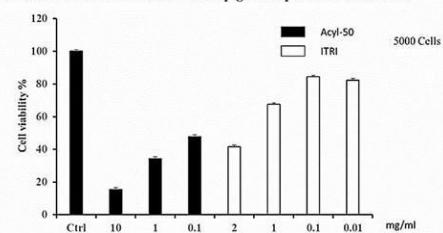
【図39】

#### ITRI-2 provides effects on preventing ARPE19 cells from undergoing UVA-induced cell death



【図38】

#### The effect of Acemannan on Retina pigment epithelium after 48 hr



---

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 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 2 3 L 29/206 (2016.01)	A 2 3 L 29/206	
A 2 3 L 33/105 (2016.01)	A 2 3 L 33/105	
A 2 3 L 33/125 (2016.01)	A 2 3 L 33/125	

(72)発明者 高 錦男

台湾、新北市新莊區五權一路1號5樓之二

(72)発明者 江夏 偉鵬

台湾、新北市新莊區五權一路1號5樓之二

F ターム(参考) 4B018 MD40 MD61 ME14 MF01

4C083 AD211 AD212 CC03 EE12

4C086 AA01 AA02 EA21 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA59 ZA68 ZA89 ZB08 ZB11 ZB33

4C090 AA08 AA09 BA70 BB02 BB12 BB13 BB14 BB33 BB36 BB38 BB52 BB72 BB97 BC10

BD37 CA09 DA09 DA23 DA26 DA27