(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 12 月 22 日(22.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/204271 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01)　*A61P 3/00* (2006.01)
A23C 3/00 (2006.01)　*A61P 5/00* (2006.01)
A23L 33/19 (2016.01)　*C07K 14/52* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/068098

(22) 国際出願日: 2016 年 6 月 17 日(17.06.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-123682 2015 年 6 月 19 日(19.06.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人静岡大学(**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION SHIZUOKA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷８３６ Shizuoka (JP).

(72) 発明者: 茶山　和敏(**SAYAMA Kazutoshi**); 〒4228529 静岡県静岡市駿河区大谷８３６　国立大学法人静岡大学農学部内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 長谷川　芳樹，外(**HASEGAWA Yoshiki** et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番１号丸の内　ＭＹ　ＰＬＡＺＡ（明治安田生命ビル）　９階　創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

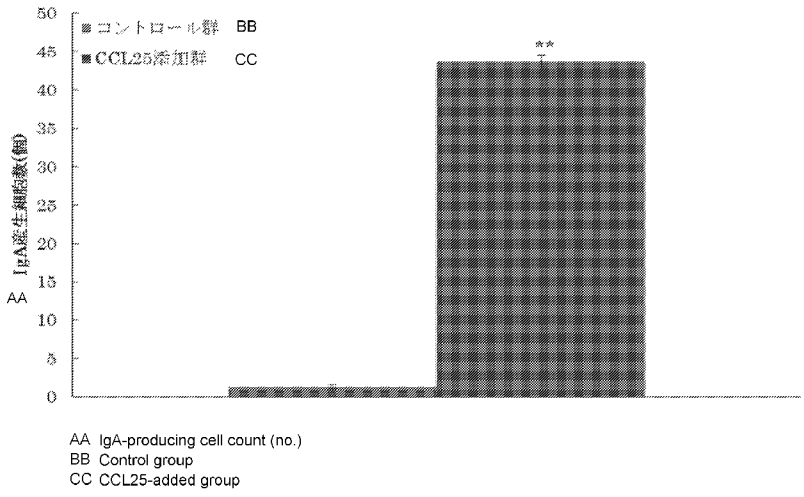
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) **Title**: IMMUNE FUNCTION DEVELOPMENT PROMOTER AND GROWTH PROMOTER

(54) 発明の名称 : 免疫機能発達促進剤及び成長促進剤

[図3]



AA IgA-producing cell count (no.)
BB Control group
CC CCL25-added group

(57) **Abstract**: The present invention discloses an immune function development promoter and growth promoter containing CCL25. Taking this immune function development promoter can promote the development of the immune function of a subject. Additionally, taking this growth promoter can promote the growth of a subject.

(57) 要約: 本発明は、ＣＣＬ２５を含有する免疫機能発達促進剤及び成長促進剤を開示する。本発明の免疫機能発達促進剤を摂取することで、対象の免疫機能の発達を促進することができる。また、本発明の成長促進剤を摂取することで、対象の成長を促進することができる。

WO 2016/204271 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： 免疫機能発達促進剤及び成長促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、免疫機能発達促進剤及び成長促進剤に関する。

背景技術

[0002] 新生児の初期免疫機能獲得には母乳摂取が重要な役割を果たしている。特に、出産直後に分泌される初乳には、ＩｇＡ抗体や免疫機能に関与する物質が多く含まれており、新生児の感染防御に重要な役割を果たしている。その免疫機能関与物質の一つにケモカインと呼ばれるタンパク質があり、ＣＸＣＬ８（ＩＬ－８）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）及びＣＣＬ２８が母乳に含まれるケモカインとして知られている。しかしながら、例えば、初乳の製造・分泌時期には乳腺組織内でＣＣＬ２８の発現がほとんど見られないことが報告されている。このように、初乳の摂取による新生児の免疫獲得において、ケモカインがどのように関与しているかについては依然として不明である。

[0003] 上記のケモカインの他、マウス、ヒトの胸腺で発見され、腸管免疫に関与するケモカインの一種に、Ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ（Ｃ－Ｃ　ｍｏｔｉｆ）ｌｉｇａｎｄ２５（ＣＣＬ２５）がある。これまでに、母体におけるＣＣＬ２５の働きとして、乳腺組織内での初乳へのＩｇＡの移行にＣＣＬ２５が関わっている可能性が報告されている（非特許文献１）。しかしながら、ＣＣＬ２５についても初乳の摂取による新生児の免疫獲得における働きは明らかにされていない。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：竹中正樹、茶山和敏、“妊娠および必乳中のマウス乳腺内におけるＣＣＬ２５ケモカインの発現”、２０１０年３月５日、第１１回静岡ライフサイエンスシンポジウム要旨集、ｐ．１９

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、ＣＣＬ２５の新たな機能を同定することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、驚くべきことに、これまで母体で発現することによって乳汁へのＩｇＡの移行に関与していると考えられていたＣＣＬ２５が、乳汁自体に含まれており、乳汁を摂取する対象へ直接働きかけることで免疫機能の発達を促進する機能及び成長を促進する機能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下の［１］～［６］を提供する。

［１］ＣＣＬ２５を含有する免疫機能発達促進剤。

［２］乳児用である［１］の免疫機能発達促進剤。

［３］経口摂取用である［１］又は［２］の免疫機能発達促進剤。

［４］ＣＣＬ２５を含有する成長促進剤。

［５］乳児用である［４］の成長促進剤。

［６］経口摂取用である［４］又は［５］の成長促進剤。

さらに、本発明は、以下の［７］～［２４］も提供する。

［７］免疫機能発達促進剤の製造のためのＣＣＬ２５の使用。

［８］免疫機能発達促進剤が乳児用である［７］の使用。

［９］免疫機能発達促進剤が経口摂取用である［７］又は［８］の使用。

［１０］成長促進剤の製造のためのＣＣＬ２５の使用。

［１１］成長促進剤が乳児用である［１０］の使用。

［１２］成長促進剤が経口摂取用である［１０］又は［１１］の使用。

［１３］対象の免疫機能発達促進に使用するためのＣＣＬ２５。

［１４］対象が乳児である［１３］のＣＣＬ２５。

［１５］対象がＣＣＬ２５を経口摂取する［１３］又は［１４］のＣＣＬ２５。

［１６］対象の成長促進に使用するためのＣＣＬ２５。

［１７］対象が乳児である［１６］のＣＣＬ２５。

［１８］対象がＣＣＬ２５を経口摂取する［１６］又は［１７］のＣＣＬ２５。

［１９］必要とする対象にＣＣＬ２５を投与する、対象の免疫機能発達を促進する方法。

［２０］対象が乳児である［１９］の方法。

［２１］ＣＣＬ２５を経口投与する［１９］又は［２０］の方法。

［２２］必要とする対象にＣＣＬ２５を投与する、対象の成長を促進する方法。

［２３］対象が乳児である［２２］の方法。

［２４］ＣＣＬ２５を経口投与する［２２］又は［２３］の方法。

発明の効果

[0007] 本発明の免疫機能発達促進剤を摂取することで、対象の免疫機能の発達を促進することができる。また、本発明の成長促進剤を摂取することで、対象の成長を促進することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]ＣＣＬ２５を添加した人工乳を与えて人工哺育した新生仔マウス群（ＣＣＬ２５添加群）と、ＣＣＬ２５を添加していない人工乳を与えて人工哺育した新生仔マウス群（コントロール群）の体重増加を経時的に比較したグラフである。＊はコントロール群と比較して有意差があったことを示す（Ｐ＞０．０５）。

[図2]ＣＣＬ２５添加群とコントロール群における体重当たりの臓器重量を比較したグラフである。＊及び＊＊はコントロール群と比較して有意差があったことを示す（＊：Ｐ＞０．０５、＊＊：Ｐ＞０．０１）。

[図3]ＣＣＬ２５添加群とコントロール群の腸管におけるＩｇＡ産生細胞数を比較したグラフである。＊はコントロール群と比較して有意差があったことを示す（Ｐ＞０．０１）。

[図4]ＣＣＬ２５添加群とコントロール群の胸腺中の総細胞数及び総細胞数あたりのリンパ球数を比較したグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] 本実施形態における免疫機能発達促進剤及び成長促進剤は、ヒト及び非ヒト動物を含む哺乳類を対象としており、ヒトを対象とすることが好ましい。

[0010] 本実施形態において、免疫機能発達促進剤及び成長促進剤は、好ましくは乳児用であり、より好ましくは新生児用である。乳児とは、母乳又は人工乳で生育されている子供を意味する。出生からの経過期間に特に拘るものではないが、ヒトの場合、例えば乳児は出生後１年未満の子供を意味することができ、新生児は出生後２８日未満の子供を意味することができる。非ヒト動物においては、それぞれヒトの乳児及び新生児に対応する期間の個体を意味する。

[0011] 本実施形態におけるＣＣＬ２５を含有する免疫機能発達促進剤及び成長促進剤は、ＣＣＬ２５が活性を有する状態で含まれている組成物であれば特に限定されないが、母体から得られた乳汁そのものは含まれない。

[0012] ＣＣＬ２５は、公知の方法により製造したものを用いてもよく、市販のものを用いてもよい。

[0013] 本実施形態における免疫機能発達促進剤及び成長促進剤を対象に与える形式は、特に限定されず、経口摂取用、経腸摂取用、経静脈投与用等とすることができるが、経口摂取用とすることが好ましい。

[0014] 本実施形態における免疫機能発達促進剤及び成長促進剤を対象の経口摂取用とする形態は、特に限定されず、対象が経口摂取するのに適当な媒体に添加して用いることができるが、人工乳に添加して用いることが好ましい。

[0015] 人工乳は、母体から得られた乳汁をそのまま用いたものではなく、人工的に製造、加工された乳汁を意味し、例えば乳児用、未熟児用、医薬用の調製粉乳及び液体調製乳等が挙げられる。

[0016] 免疫機能発達促進剤とは、その組成物を摂取した場合又は投与された場合に、対象の免疫機能の発達が、摂取していない対象又は投与されていない対象と比較して促進していると認められるものを意味する。促進しているか否かについて判断するための指標としては、例えば免疫系に関与する遺伝子及

び／又はタンパク質の発現量、腸管（大腸及び小腸）、脾臓、胸腺等の免疫系器官である臓器の体重あたりの重量、ＩｇＡ産生細胞、リンパ球（キラーＴ細胞及びヘルパーＴ細胞等のＴ細胞、Ｂ細胞及びナチュラルキラー細胞）、ダブルネガティブ細胞及びダブルポジティブ細胞等の免疫系に関与する細胞の数、小腸内のパイエル板の個数及び大きさ等を用いることができる。すなわち、その組成物を摂取していない対象又は投与されていない対象と比較して、免疫機能が働いている際に発現量が増加する遺伝子及び／又はタンパク質の発現量、腸管、脾臓、胸腺の体重あたりの重量が有意に高い場合、ＩｇＡ産生細胞数、リンパ球数、パイエル板の個数が有意に多い場合、及びパイエル板の大きさが有意に大きい場合等には、その組成物の摂取又は投与により、免疫機能の発達が促進されていると判断することができる。

[0017] 免疫機能が働いている際に発現量が増加する遺伝子及び／又はタンパク質としては、例えば各種免疫細胞の表面マーカー類、各種サイトカイン類及びＩｇＡを含む免疫グロブリン等が挙げられる。免疫系器官としては、腸管、脾臓、胸腺の他にも、リンパ節、骨髄等が挙げられ、免疫系に関与する細胞としては、ＩｇＡ産生細胞の他にも、リンパ球（キラーＴ細胞及びヘルパーＴ細胞等のＴ細胞、Ｂ細胞及びナチュラルキラー細胞）、ダブルネガティブ細胞、ダブルポジティブ細胞、マクロファージ及び白血球等が挙げられる。

[0018] 成長促進剤とは、その組成物を摂取した場合又は投与された場合に、対象の成長が、摂取していない対象又は投与されていない対象と比較して促進していると認められるものを意味する。促進しているか否かについて判断するための指標としては、成長に関与する遺伝子及び／又はタンパク質の発現量、対象の体重、筋量、臓器重量等を用いることができる。すなわち、その組成物を摂取していない対象又は投与されていない対象と比較して、成長が促進される際に発現量が増加する遺伝子及び／又はタンパク質の発現量、対象の体重、筋量、臓器重量等が有意に高い場合には、その組成物の摂取又は投与により、成長が促進されている判断することができる。

[0019] 成長が促進される際に発現量が増加する遺伝子及び／又はタンパク質とし

ては、例えば成長ホルモン、甲状腺ホルモン及び糖質コルチコイド等が挙げられる。

実施例

[0020] 本発明を以下の実施例に基づいてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0021] （新生仔マウス実験群）

交尾が確認できた日を妊娠０日目とし、出産する前日（妊娠１９日目）にメスを１匹に隔離した。そして、出産した日を０日目とし、生後０日目（親を帝王切開）、生後１日目、生後２日目、生後５日目、生後１０日目、生後２１日目（離乳後）の６群を作成し、各時期の新生仔から腸管（小腸及び大腸）を摘出した。

[0022] （腸管試料の作製）

マウス新生仔を、毒物の使用基準に従ってジエチルエーテル過剰吸入によって安楽死させ、腸管（小腸及び大腸）を摘出した。大腸はＲＮＡｌａｔｅｒ（ＴａＫａＲａ社）に漬けて一晩４℃で浸透させた後、－８０℃で保存した。小腸は３等分にし、それぞれを、（１）リアルタイムＰＣＲに用いるサンプルとして、ＲＮＡｌａｔｅｒ（ＴａＫａＲａ社）に漬けて一晩４℃で浸透させた後、－８０℃で保存し、（２）免疫染色に用いるサンプルとして、プラスチック製のクリオモルド（角型１号；Ｓａｋｕｒａ　Ｆｉｎｅｔｅｋ社）に封入剤であるティシューテックＯ．Ｃ．Ｔ．コンパウンド（Ｓａｋｕｒａ　Ｆｉｎｅｔｅｋ社）と共に入れ、ドライアイス上で速やかに凍結させ、凍結切片用のブロックを作製し、－８０℃で保存し、（３）ヘマトキシリン・エオジン（Ｈｅｍａｔｏｘｙｌｉｎ　ａｎｄ　Ｅｏｓｉｎ　Ｓｔａｉｎ；ＨＥ　Ｓｔａｉｎ）組織染色に用いるサンプルとして、４％パラホルムアルデヒド固定液に２４～３６時間浸漬させ、固定処理を行った。組織染色用サンプルは固定処理後に１×ＰＢＳで３～４回洗浄し、組織標本の作製のために７０％エタノール溶液中で保存した。

[0023] （リアルタイムＰＣＲ法）

トータルＲＮＡは、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ社）を用いて、プロトコルに従って調製した。ｃＤＮＡの合成にはＳｕｐｅｒ　Ｓｃｒｉｐｔ（商標）Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を使用した。リアルタイムＰＣＲ用チューブにＦａｓｔ　Ｓｔａｒｔ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ＤＮＡ　Ｇｒｅｅｎ　Ｍａｓｔｅｒ　２ｘｃｏｎｃ．（Ｒｏｃｈｅ社）１０μｌ、Ｓｅｎｓｅ　ｐｒｉｍｅｒ（１０μＭ）１μｌ、Ａｎｔｉ－ｓｅｎｓｅ　ｐｒｉｍｅｒ（１０μＭ）１μｌ、ｃＤＮＡ１μｌ、Ｆａｓｔ　Ｓｔａｒｔ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　ＤＮＡ　Ｇｒｅｅｎ　Ｍａｓｔｅｒ　H_2O（Ｒｏｃｈｅ社）７μｌを加えて全反応量を２０μｌとした。そして、Ｌｉｇｈｔ　Ｃｙｃｌｅｒ（商標）Ｎａｎｏ（Ｒｏｃｈｅ社）を使用してリアルタイムＰＣＲを行った。リアルタイムＰＣＲに用いたプライマー（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）は、ＧＡＰＤＨ（ＰＣＲ産物のサイズ　１３６ｂｐ）：５’－ＧＧＧＴＧＴＧＡＡＣＣＡＴＧＡＧＡＡＧＴ－３’（配列番号１；フォワード）、５’－ＧＡＣＴＧＴＧＧＴＣＡＴＧＡＧＴＣＣＴ－３’（配列番号２；リバース）、ＣＣＬ２５（ＰＣＲ産物のサイズ　１３１ｂｐ）：５’－ＣＣＡＴＣＡＧＣＡＧＣＡＧＴＡＡＧＡＧＧ－３’（配列番号３；フォワード）、５’－ＣＴＧＴＡＧＧＧＣＧＡＣＧＧＴＴＴＴＡＴ－３’（配列番号４；リバース）、ＣＣＲ９（ＰＣＲ産物のサイズ　１１０ｂｐ）：５’－ＧＣＣＴＧＡＧＣＡＧＧＧＡＧＡＴＴＡＴ－３’（配列番号５；フォワード）、５’－ＧＡＧＣＡＧＡＣＡＧＡＧＴＧ－３’（配列番号６；リバース）である。解析する遺伝子としては、ＣＣＬ２５、ＣＣＲ９及び内部標準としてＧＡＰＤＨを用いた。それぞれ遺伝子の反応条件は、初期変性を９５℃で３分間行った後、ＣＣＬ２５：熱変性（９５℃、６０秒）、アニーリング（５５℃、５０秒）、伸長反応（７２℃、６０秒）を全４０サイクル、ＣＣＲ９：熱変性（９５℃、６０秒）、アニーリング（５８℃、５０秒）、伸長反応（７２℃、６０秒）を全４５サイクル、ＧＡＰＤＨ：熱変性（９５℃、６０秒）、アニーリング（５５℃、５０秒）、伸長反応（７２℃、６０秒）を全４５サイクル

、の各条件で増幅を行った。

[0024] （免疫組織化学的染色）

－８０℃で保存した腸管組織を、切片作製の前に、－２０℃で約２０分間平衡化（切片作製時の粗砕を防止）した後、腸管組織ブロックをクリオスタットで８μｍの厚さに薄切し、シランコートした無蛍光スライドガラス（ＦＲＣ－１１；Ｍａｔｓｕｎａｍｉ社）に貼り付けた。切片がスライド上で乾いた後、冷アセトンで－２０℃で１０分間浸漬し、風乾した。洗浄バッファー（１ＸＰＢＳ）で切片を各５分間、３回洗浄した後、免疫染色を行った。免疫染色には、ＣＣＬ２５及びＩｇＡそれぞれについて一次抗体及び二次抗体を用いた。１％ＢＳＡ含有ＰＢＳブロッキング液で、各切片を室温で１時間ブロッキング処理した。ブロッキング液を除去し、ブロッキング液で希釈した一次抗体を各切片に添加し、４℃で一晩インキュベートした。一次抗体液を除去し、１ＸＰＢＳで切片を各５分間、３回洗浄した。１％ＢＳＡ含有ＰＢＳブロッキング液で希釈した二次抗体を各切片に添加し、室温で２時間インキュベートした後、二次抗体を除去し、１ＸＰＢＳで切片を各５分間、３回洗浄した。その後、水溶性封入剤（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社）にてスライドグラス上で封入し、実体蛍光顕微鏡（ＭＺ１０Ｆ；Ｌｅｉｃａ社）にて観察を行った。免疫組織化学的染色に使用した抗体は、ＣＣＬ２５：Ｇｏａｔ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＣＣＬ２５／ＴＥＣＫ ａｎｔｉｂｏｄｙ（一次抗体；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社）、Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ（ＦＩＴＣ）－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ Ｒａｂｂｉｔ Ａｎｔｉ－Ｇｏａｔ$^{++}$ ＩｇＧ （Ｈ＋Ｌ）（二次抗体；Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社）、ＩｇＡ：Ｇｏａｔ ａｎｔｉ－ｍｏｕｓｅ ＩｇＡ ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｐｕｒｉｆｉｅｄ（一次抗体；Ｂｅｔｈｙｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社）、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ（ＴＲＩＴＣ）－ｃｏｎｊｕｇａｔｅｄ ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ Ｄｏｎｋｅｙ Ａｎｔｉ－Ｇｏａｔ$^{++}$ ＩｇＧ （Ｈ＋Ｌ）（二次抗体；Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ社）であり、それぞれ１：１００の希釈

倍率で用いた。

[0025] （統計学的解析）

実験結果に関するすべての統計処理は、ｔ－検定を用いて行い、統計学的有意水準は特に明示のない場合については５％（Ｐ＞０．０５）とした。

[0026] （人工乳汁の作製）

マウス用人工乳汁を用いた人工哺乳法に関する文献（Biosci. Biotechnol. Biochem.,2007, 71(10), 2420-2427及びExperimentalanimals, 2006, 55(4), 391-397）を参考に、脂肪の含有量を１６％から１８％に修正して、マウス用人工乳汁を作製した。以下に人工乳汁の作成方法を示す。初めに、Ｃａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅを作製した。

（ａ）セリン（０．２８７５ｇ）、システイン（０．２２５ｇ）及びトリプトファン（０．２７ｇ）の３種類のアミノ酸を、ＮａＯＨ（０．２５ｇ）及びＫＯＨ（１．５ｇ）を含む２００ｍｌのアルカリ水溶液に加えた（常にスターラーで撹拌、６０～７０℃）。

（ｂ）カゼイン（４０．０ｇ）をアルカリ水溶液に加え、溶解した。このＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅを、沸騰しているお湯の入ったバス中で３０分間滅菌した。次に、カゼイン塩のミセルを作製した。

（ｃ）Ｃａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅにカルシウム及びマグネシウムを加えた。$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（１．７ｇ）、ＧｌｙＣａＰＯ$_4$（８ｇ）及び$MgCl_2 \cdot 6H_2O$（１．９ｇ）を５０ｍｌの蒸留水（１２１℃で１０分間オートクレーブ）に溶かし、ポリトロン様ミキサーでホモジナイズした。これをＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅにゆっくりと加えた（ホモジナイザーで混ぜ続ける）。

（ｄ）$CaCO_3 \cdot 2H_2O$（２．５ｇ）及びＣａ－ｃｉｔｒａｔｅ（１．２ｇ）を２５ｍｌの蒸留水に溶かし、オートクレーブした後、Ｃａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅにゆっくりと加えた。

（ｅ）Na_2HPO_4（０．８ｇ）及びKH_2PO_4（０．０８ｇ）を１２．５ｍｌの蒸留水に溶かし、オートクレーブで滅菌した後Ｃａｓｅｉｎ　ｍｉｘ

ｔｕｒｅに加えた。

（ｆ）ラクトース水溶液（ラクトース１８．９１ｇを５５ｍｌの蒸留水に溶かしたもの）をオートクレーブで滅菌した後、ゆっくりとＣａｓｅｉｎ ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｇ）$FeSO_4 \cdot 7H_2O$（０．４８ｇ）及び$Citrate-H_2O$（０．０１ｇ）を５ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの２．５ｍｌ、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$（０．３ｇ）、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$（０．０７５ｇ）及び$MnSO_4 \cdot 5H_2O$（０．０１２５ｇ）を６．２５ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの１．２５ｍｌ、ＮａＦ（０．００７７５ｇ）及びＫＩ（０．０１２５ｇ）を６．２５ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの１．２５ｍｌをＣａｓｅｉｎ ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。この操作は、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ（０．４５μｍ）で滅菌した後に、常に撹拌しながら行った。

（ｈ）その後、Ｗｈｅｙ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｉｓｏｌａｔｅ（４０ｇ）及びＷｈｅｙ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｈｙｄｒｏｌｙｓａｔｅ（５０ｇ）を２５０ｍｌの滅菌蒸留水に溶かした。この溶液を、撹拌しながら４０℃以下に冷ましたＣａｓｅｉｎ ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｉ）カルニチン（０．０８ｇ）、ピコリン酸（０．０４ｇ）、エタノールアミン（０．０６８ｇ）及びタウリン（０．３ｇ）を５ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの２．５ｍｌを Ｃａｓｅｉｎ ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｊ）クエン酸二水素コリン（１．４７ｇ）を１８．３７５ｍｌの蒸留水に溶かした中和溶液（５Ｎ ＮａＯＨでｐＨ７．０に中和）に、水溶性ビタミンｍｉｘｔｕｒｅ（シアノコバラミン（０．０１１９ｍｇ）、ビオチン（０．１８ｍｇ）、葉酸（０．７８ｍｇ）、チアミン塩酸塩（８．８１ｍｇ）、ピリドキシン塩酸塩（１．２５ｍｇ）、リン酸リボフラビンナトリウム（１２．１５ｍｇ）、パントテン酸カルシウム（２６．４３ｍｇ）、ｐ－アミノ安息香酸（４４．０４ｍｇ）、ニコチン酸（４９．８８ｍｇ）、アスコルビン酸ナトリウム（６７４ｍｇ）、及び４－イノシトール（４８７．２５ｍｇ））を溶かした。そのうちの１７．５ｍｌをＣａｓｅｉｎ ｍｉｘｔｕｒｅ

に加えた。

（ｋ）脂溶性ビタミン（ビタミンK_3（１９．８２５ｍｇ）、ビタミンＥ：α－トコフェロール（２３．４５ｍｇ）及びビタミンＡとＤを含む混合物）並びに６種類の食用油（パーム油（５３．８５ｇ）、ココナッツ油（４４．９ｇ）、コーン油（１７．９５５ｇ）、中鎖脂肪酸油（２６．９３２５ｇ）、大豆油（３５．９１ｇ）及びコレステロール（０．４ｇ））を沸騰しているお湯の入ったバス中で３０分間滅菌した。この油性溶液を４０～５０℃まで冷ました後、撹拌しながらＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｌ）この最終混合物を、高圧条件下（１８０ｋｇ／ｃｍ^2）で３回ホモジナイズした。

（ｍ）ホモジナイズの後、人工乳汁は無菌的に５０ｍｌ滅菌ポリプロピレンボトルに分注し、－２０℃で凍結させた。

（ｎ）冷凍した人工乳汁はガンマ線照射処理（３０ｋＧｙ）による滅菌をし、哺乳実験まで－２０℃で保存した。

[0027]　（人工哺育実験に用いたマウス）

１０～１２週齢のｄｄＹ系マウス（ＪａｐａｎＳＬＣ社）及びｄｄＹ系マウスの新生仔を用いた。

[0028]　（人工哺育実験）

予備実験として、帝王切開して３時間以内に人工乳汁で人工哺育を開始した。３２匹の帝王切開による新生仔に人工哺育を行ったところ、３日目には約４３％(１４匹)の新生仔マウスが死亡した。そして、９日目までに全数の新生仔マウスが死亡した。このことから、本実施例においては、生後２日齢まで母乳哺育させた新生仔に、生後３日齢から、３時間に１回、人工乳汁を与えることとした。

[0029]　（ヘマトキシン染色）

人工哺育したマウスの小腸を摘出し、小腸（十二指腸から空腸まで）をピンでとめて、１０％ホルマリン液中で３時間以上浸漬固定処理を行った。固定処理後に蒸留水で数回洗浄し、Ｍａｙｅｒ’ｓ　Ｈｅｍａｔｏｘｙｌｉｎ

Ｓｏｌｕｔｉｏｎで７分間染色した。その後、蒸留水で一回洗浄した後、一時間流水洗した。

[0030] （実施例１　新生仔腸管内のＣＣＬ２５及びＣＣＲ９の発現とＩｇＡ産生細胞の経時的変化の観察）

リアルタイムＰＣＲにより、腸管組織のＣＣＬ２５ｍＲＮＡの発現について解析した。その結果、離乳時期である生後２１日目群の発現量を１とした時、小腸でのＣＣＬ２５ｍＲＮＡ発現量は、生後０日目群で０．１２±０．０７、生後１日目群で０．０９±０．０６、生後２日目群で０．３９±０．０４、生後５日目群で０．６２±０．００３及び生後１０日目群で０．７０±０．０５であった。すなわち、ＣＣＬ２５ｍＲＮＡの発現量は、生後２日目から増加し始めて、その量は経時的に増加し、生後５日目群から生後２１日目群まで、その発現量は０日目群に比べて、有意に増加した。また、大腸での発現量は、生後０日目群で０．４１±０．０４、生後１日目群で０．３３±０．０１、生後２日目群で０．２７±０．０２、生後５日目群で０．０８±０．００６及び生後１０日目群で０．０９±０．００６であり、生後２１日目群が最も高かった。

[0031] ＣＣＬ２５の唯一のレセプターであるＣＣＲ９について、リアルタイムＰＣＲにより、腸管組織におけるｍＲＮＡの発現について解析した。その結果、小腸では、生後２１日目群を１とした時、生後０日目群で０．１５±０．０４、生後１日目群で０．２５±０．００６、生後２日目群で０．０２±０．０１、生後５日目群で０．５０±０．０１及び生後１０日目群で０．７±０．０１であった。すなわち、ＣＣＲ９ｍＲＮＡの発現量は、生後０日目に比較して、生後５日目から有意に増加し始め、その量は経時的に増加していた。そして、生後２１日目群のＣＣＲ９ｍＲＮＡ量が最も高い値を示した。大腸での発現量は、生後０日目群で０．００６±０．０００５、生後１日目群で０．０３６±０．００８、生後２日目群で０．００５±０．００１、生後５日目群で０．００５±０．０００３及び生後１０日目群で０．００４±０．０００４であり、ＣＣＲ９ｍＲＮＡの発現量は、生後１日目群、生後２

日目群、生後５日目群及び生後１０日目群では低い値を示しており、生後２１日目群がピークになることが分かった。

[0032] 次に、生後１０日目の大腸及び小腸におけるＣＣＬ２５及びＣＣＲ９のｍＲＮＡ発現量を比較した。その結果、小腸の発現量を１とした時、大腸のＣＣＬ２５ｍＲＮＡ発現量は０．０７±０．００９であった。また、ＣＣＲ９ｍＲＮＡ発現量は、小腸の発現量を１とした時、大腸のＣＣＲ９ｍＲＮＡ発現量は０．０６±０．００３であった。大腸のＣＣＬ２５ｍＲＮＡ及びＣＣＲ９ｍＲＮＡの発現量は小腸に対して有意に低い値を示した。この結果から、新生仔腸管におけるＣＣＬ２５の発現も、腸管機能が確立されている離乳後と同様に、主に小腸で発現していることが確認された。

[0033] 次に、ＣＣＬ２５抗体を用いた免疫組織化学的染色法により、小腸組織のＣＣＬ２５の経時的変化を確認した。ＣＣＬ２５－ＦＩＴＣ抗体を用いて小腸組織においてＣＣＬ２５の発現に免疫組織化学染色法を行った。蛍光実体顕微鏡で蛍光染色の陽性部位を観察した結果、生後０日目群、生後２日目群及び生後５日目群において小腸の絨毛上皮にＣＣＬ２５の発現はほとんど確認できなかったが、生後１日目群、生後１０日目群及び生後２１日目群では、絨毛上皮にＣＣＬ２５の発現が確認できた。

[0034] 次に、免疫組織化学的染色法によるＩｇＡ抗体を用いて、小腸組織のＩｇＡ産生細胞の経時的変化を確認した。ＩｇＡ－ＲＩＴＣ抗体を用いて小腸組織においてＩｇＡ産生細胞の発現に免疫組織化学染色法を行った。蛍光実体顕微鏡で蛍光染色後に観察を行った結果、生後０日目群、生後２日目群及び生後５日目群では小腸の絨毛上皮にＩｇＡ産生細胞の発現はほとんど確認できなかったが、生後１０日目群では、ほとんどの、生後２１日目群ではすべての絨毛上皮にＩｇＡ産生細胞の存在が確認できた。

[0035] （実施例２　ＣＣＬ２５が体重増加に与える影響）

新生仔マウスを、Yajima et al.の文献（Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71(10),2420-2427及びExperimental animals, 2006, 55(4),391-397）に記載の方法に準じて、生後２日齢まで母乳哺育させた後に、３日齢から各

人工乳汁を用いて人工哺育を開始した。新生仔マウスを（１）人工乳汁にＣＣＬ２５（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｍｏｕｓｅ　ＣＣＬ２５（ＴＥＣＫ）、Ｂｉｏ－Ｌｅｇｅｎｄ社）を０．５μｇ／ｍｌ添加した群（ＣＣＬ２５添加群）及び（２）人工乳汁ＣＣＬ２５抗原の無添加群（コントロール群）の２群に分けた。

[0036] 人工哺育した新生仔マウスの体重変化を調べた結果、ＣＣＬ２５添加群の新生仔マウスの体重は、生後４日齢まではコントロール群とほぼ同等の体重だったが、５日齢以降は、コントロール群に比べて有意に増加した（図１）。

[0037]（実施例３　ＣＣＬ２５が免疫器官の重量及びパイエル板に与える影響）

実施例２と同様に新生仔マウスをＣＣＬ２５添加群及びコントロール群に分け、１０日齢まで７日間人工保育した後に解剖し、腸管(小腸及び大腸)、脾臓及び胸腺を摘出し、各重量をＣＣＬ２５添加群及びコントロール群で比較した。免疫系器官である脾臓、胸腺、及び腸管の体重当たりの重量で比較した結果、コントロール群の脾臓（ＳＰ）が３．９５％±０．０５、胸腺（Ｔｈｙ）が４．００％±０．０６、大腸（ＬＩ）が７．０２％±０．０８及び小腸（ＳＩ）が５．４６％±０．１０であったのに対して、ＣＣＬ２５添加群の脾臓重量（ＳＰ）は４．９９％±０．０５８、胸腺重量（Ｔｈｙ）は４．９５％±０．０５９、大腸重量（ＬＩ）は６．９９％±０．０４及び小腸重量（ＳＩ）は６．４４％±０．０６であった。ＣＣＬ２５添加群では、コントロール群に対して、小腸の重量が高い傾向が見られ、さらに、脾臓及び胸腺の重さが有意に高かった（図２）。これに対して、体重あたりの大腸の重量はコントロール群とＣＣＬ２５添加群でほぼ同じ値を示した。

[0038] また、ヘマトキシン染色した小腸を顕微鏡で観察して、小腸内のパイエル板の数を数え、一匹当たりのパイエル板の数を算出した。さらに、一つ一つのパイエル板の長径及び短径を測定して、その平均を一つのパイエル板の大きさとし、一匹当たりのパイエル板の大きさを算出した。コントロール群及びＣＣＬ２５添加群について、パイエル板の個数及び大きさを比較した結果

、個々のパイエル板の大きさには差がみられなかったが、パイエル板の個数はＣＣＬ２５添加群の方がコントロール群よりも多い傾向がみられた。

[0039]（実施例４　ＣＣＬ２５が腸管組織のＣＣＬ２５ｍＲＮＡ及びＣＣＲ９ｍＲＮＡの発現に与える影響）

腸管組織のＣＣＬ２５ｍＲＮＡの発現について調べた結果、コントロール群の小腸ＣＣＬ２５ｍＲＮＡ発現量を１とした時、ＣＣＬ２５添加群での発現量は０．７９±０．１１であった。有意差はなかったが、コントロール群で発現量がより高い傾向が見られた。また、腸管組織のＣＣＲ９ｍＲＮＡの発現量について調べた結果、コントロール群の小腸ＣＣＲ９ｍＲＮＡ発現量を１とした時、ＣＣＬ２５添加群での発現量は１．２９±０．１６であった。有意差はなかったが、ＣＣＬ２５添加群で発現量がより高い傾向が見られた。

[0040]（実施例５　ＣＣＬ２５が小腸の腸絨毛におけるＩｇＡ産生細胞数に与える影響）

ＩｇＡ－ＲＩＴＣ抗体を用いて小腸組織のＩｇＡ産生細胞の免疫組織化学染色を行った。一つの腸管（小腸）の絨毛を７本選び、その中で陽性を示したＩｇＡ産生細胞の数を数え、コントロール群及びＣＣＬ２５添加群で比較した。７本の絨毛内に確認できたＩｇＡ産生細胞数は、コントロール群では１．３３±０．２とほとんど見られなかったのに対し、ＣＣＬ２５添加群では４３．７５±１．２４と有意に大きかった（図３）。この結果から、乳汁中のＣＣＬ２５が出産後１０日目までのＩｇＡの誘引に必須であることが明らかとなった。

[0041]（実施例６　ＣＣＬ２５が胸腺中の細胞数に与える影響）

実験動物は、１０～２０週齢のｄｄＹ系マウス（ＪａｐａｎＳＬＣ社）及びｄｄＹ系マウスの新生仔を用いた。

新生仔マウスを、Yajima et al.の文献（Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71(10), 2420-2427及びExperimental animals, 2006, 55(4), 391-397）に記載の方法に準じて、生後２日齢まで母乳哺育させた後に、２日齢から10

日齢までの８日間、各人工乳汁を用いて人工哺育を行った。新生仔マウスを(１)人工乳汁にＣＣＬ２５（Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｍｏｕｓｅ　ＣＣＬ２５（ＴＥＣＫ）、　Ｂｉｏ－Ｌｅｇｅｎｄ社）を０．５μｇ／ｍＬ添加した群(ＣＣＬ２５添加群)及び(２)ＣＣＬ２５抗原の無添加群(コントロール群)の２つの実験群に分けた。

[0042] マウス用人工乳汁を用いた人工哺乳法に関する文献(Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71(10), 2420-2427及びExperimental animals, 2006, 55(4), 391-397)を参考に、脂肪の含有量を１６％から１８％に修正してマウス用人工乳汁を作製した。以下に人工乳汁の作成方法を示す。

（ａ）ＮａＯＨ（１ｇ）、ＫＯＨ（６ｇ）を８００ｍｌの蒸留水に溶かした（アルカリ水溶液）。セリン（１．１５ｇ）、システイン（０．９ｇ）及びトリプトファン（１．０８ｇ）の３種類のアミノ酸をアルカリ水溶液に加えた（常にスターラーで撹拌、６０～７０℃）。

（ｂ）カゼイン（１６０．０ｇ）をアルカリ水溶液に加え、溶解した。このＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅを、沸騰しているお湯の入ったバス中で３０分間滅菌した。

（ｃ）$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（６．８ｇ）、ＧｌｙＣａPO_4（３２ｇ）、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$（７．６ｇ）を２００ｍｌの蒸留水に溶かし、ポリトロン様ミキサーでホモジナイズした。これを、Ｃａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅにゆっくりと加えた（ホモジナイザーで混ぜ続ける）。

（ｄ）$CaCO_3 \cdot 2H_2O$（１０ｇ）、Ｃａ－ｃｉｔｒａｔｅ（４．８ｇ）を１００ｍｌの蒸留水に溶かし、オートクレーブした後、Ｃａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅにゆっくりと加えた。

（ｅ）Na_2HPO_4（３．２ｇ）、KH_2PO_4（０．３２ｇ）を５０ｍｌの蒸留水に溶かし、オートクレーブでした後Ｃａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｆ）ラクトース水溶液（ラクトース７５．６４ｇを２２０ｍｌの蒸留水に溶かしたもの）をオートクレーブで滅菌した後、ゆっくりとＣａｓｅｉｎ

ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｇ）$FeSO_4 \cdot 7H_2O$（１．９２ｇ）、ｃｉｔｒａｔｅ－H_2O（０．０４ｇ）を２０ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの１０ｍｌ、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$（１．２ｇ）、$CuSO_4 \cdot 5H_2O$（０．３ｇ）、$MnSO_4 \cdot 5H_2O$（０．０５ｇ）を２５ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの５ｍｌ、ＮａＦ（０．０３１ｇ）、ＫＩ（０．０５ｇ）を２５ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの５ｍｌをＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。この操作は、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ（０．４５μｍ）で滅菌した後に、常に撹拌しながら行った。

（ｈ）ガンマ線照射による滅菌（３０ＫＧｙ）を行った、Ｗｈｅｙ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｉｓｏｌａｔｅ（１６０ｇ）及びＷｈｅｙ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｈｙｄｒｏｌｙｓａｔｅ（２００ｇ）を１０００ｍｌの滅菌蒸留水に溶かし、この溶液を撹拌しながら４０℃以下に冷ましたＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｉ）カルニチン（０．３２ｇ）、ピコリン酸（０．１６ｇ）、エタノールアミン（０．２７２ｇ）及びタウリン（１．２ｇ）を２０ｍｌの蒸留水に溶かした。そのうちの１０ｍｌをＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｊ）クエン酸二水素コリン（５．８８ｇ）を７３．５ｍｌの蒸留水に溶かした（６５℃のｗａｔｅｒ　ｂａｔｈ中で）中和溶液（１Ｎ　ＮａＯＨでｐＨ７．０に中和）に、水溶性ビタミンｍｉｘｔｕｒｅ（シアノコバラミン（０．０４７６ｍｇ）、ビオチン（０．７２ｍｇ）、葉酸（３．１６ｍｇ）、チアミン塩酸塩（３５．２４ｍｇ）、ピリドキシン塩酸塩（５０．０ｍｇ）、リン酸リボフラビンナトリウム（５６．６ｍｇ）、パントテン酸カルシウム（１０５．７２ｍｇ）、ｐ－アミノ安息香酸（１７６．１６ｍｇ）、ニコチン酸（１９９．５２ｍｇ）、アスコルビン酸ナトリウム（２．６９６ｇ）、及び４－イノシトール（１．９８９ｇ））を溶かした。そのうちの７０ｍｌをＣａｓｅｉｎ　ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｋ）脂溶性ビタミン（ビタミンK_3（７９．３ｍｇ）、ビタミンＥ：α－ト

コフェロール（９３．８ｍｇ）、ビタミンＡとＤを含む混合物）と６種類の食用油（パーム油（１９１．５ｇ）、ココナッツ油（１５９．６ｇ）、コーン油（６３．８４ｇ）、中鎖脂肪酸油（９５．７６ｇ）、大豆油（１２７．６８ｇ）、コレステロール（１．６ｇ））を沸騰しているお湯の入ったバス中で３０分間滅菌した。この油性溶液を４０～５０℃まで冷ました後、撹拌しながらＣａｓｅｉｎ　Ｍｉｘｔｕｒｅに加えた。

（ｌ）ホモジナイズの後、人工ミルクは無菌的に５０ｍｌ滅菌ポリプロピレンボトルに分注し、－８０℃で保存した。冷凍した人工ミルクはガンマ線照射（３０ＫＧｙ）による滅菌をし、－８０℃で保存した。

[0043] 生まれた日を生後０日目として、生後０日目から２日目まで母乳哺育したマウス新生仔を親から離し、生後２日目から３時間に１回、哺乳器を用いて経口投与によって人工乳汁を授乳した。人工哺育期間中、哺乳量と体重を継時的に測定し、１０日目まで８日間人工哺育した後に、ジエチルエーテル過剰吸入によって安楽死させ、解剖して胸腺を摘出した。

[0044] 摘出した胸腺の重量を測定し、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）入りｐｈｏｓｐｈａｔｅ－ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｂａｌａｎｃｅｄ　ｓａｌｔ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＰＢＢＳ）の入ったシャーレへ取り出した。摘出した胸腺は、シャーレ内にて、ハサミで組織をある程度細切した後、スライドグラスのフロスト部分ですりつぶし、ピペットを用いて浮遊液を４２Ｋのメッシュで濾して、コニカルチューブに移した。８００ｒｐｍで５分間の遠心分離を行い、上清をデカンテーションによって除去した。残った胸腺細胞に、赤血球除去用塩化アンモニウム溶液（Ｔｒｉｓ－ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ａｍｍｏｎｉｕｍ　ｃｈｌｏｒｉｄｅ：ＡＣＴＢ）を加えてピペッティングし、室温で５分放置して溶血処理を行った。その後、冷ＰＢＢＳを加え、８００ｒｐｍで５分間の遠心分離を行い、上清をデカンテーションにより除去した。洗浄のため、冷ＰＢＢＳを加えて、８００ｒｐｍで５分間の遠心分離及び上清除去の操作を２回行った後、エッペンチューブへ移した。得られた溶液を適宜希釈し、総細胞数及びリンパ球数を数え、コントロール群及びＣＣＬ２５

添加群で比較した。実験結果に関するすべての統計処理は、ｔ－検定を用いて行った。

[0045] 胸腺中の総細胞数は、コントロール群よりもＣＣＬ２５添加群で多い傾向にあった。また、総細胞数あたりもリンパ球数も、コントロール群よりもＣＣＬ２５添加群で多い傾向にあった（図４）。

[0046] 以上の結果より、ＣＣＬ２５の添加による、免疫機能発達促進効果及び成長促進効果が確認された。

請求の範囲

[請求項1] ＣＣＬ２５を含有する免疫機能発達促進剤。

[請求項2] 乳児用である請求項１に記載の免疫機能発達促進剤。

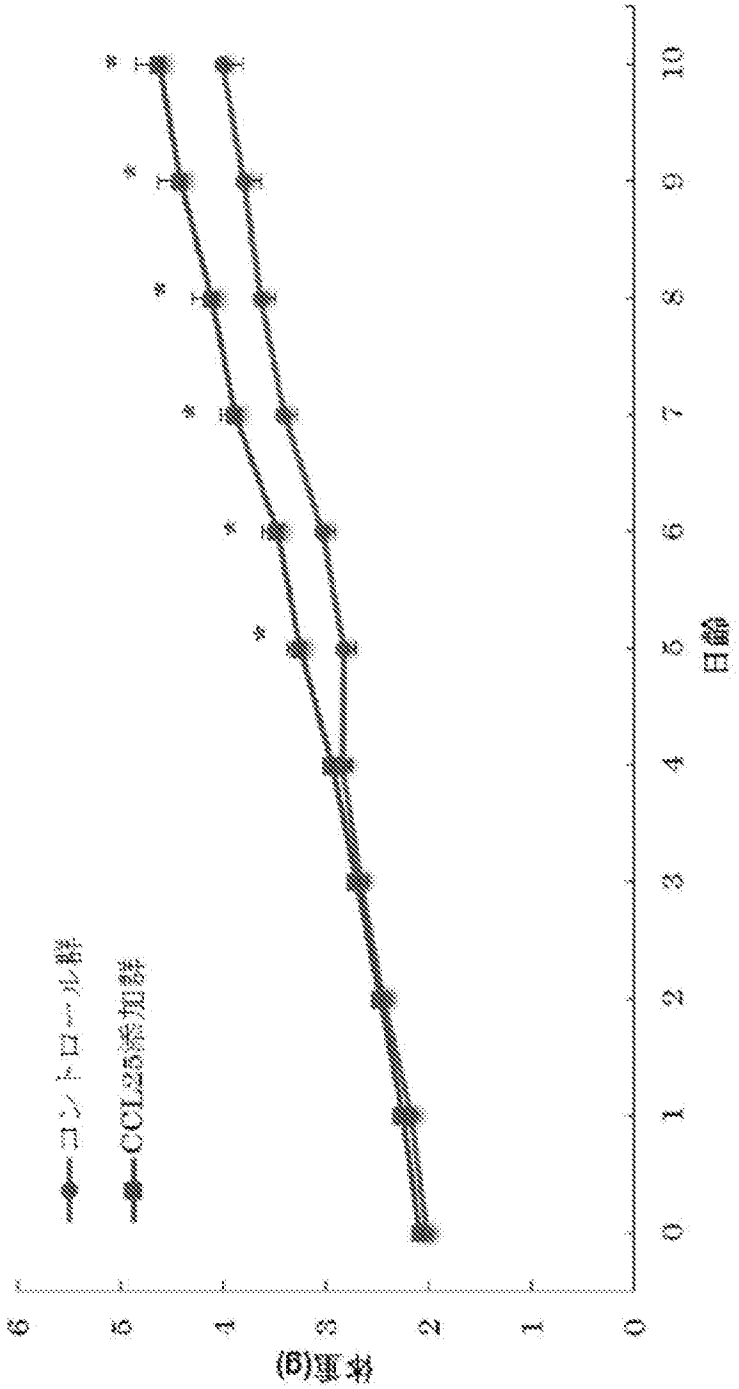
[請求項3] 経口摂取用である請求項１又は２に記載の免疫機能発達促進剤。

[請求項4] ＣＣＬ２５を含有する成長促進剤。

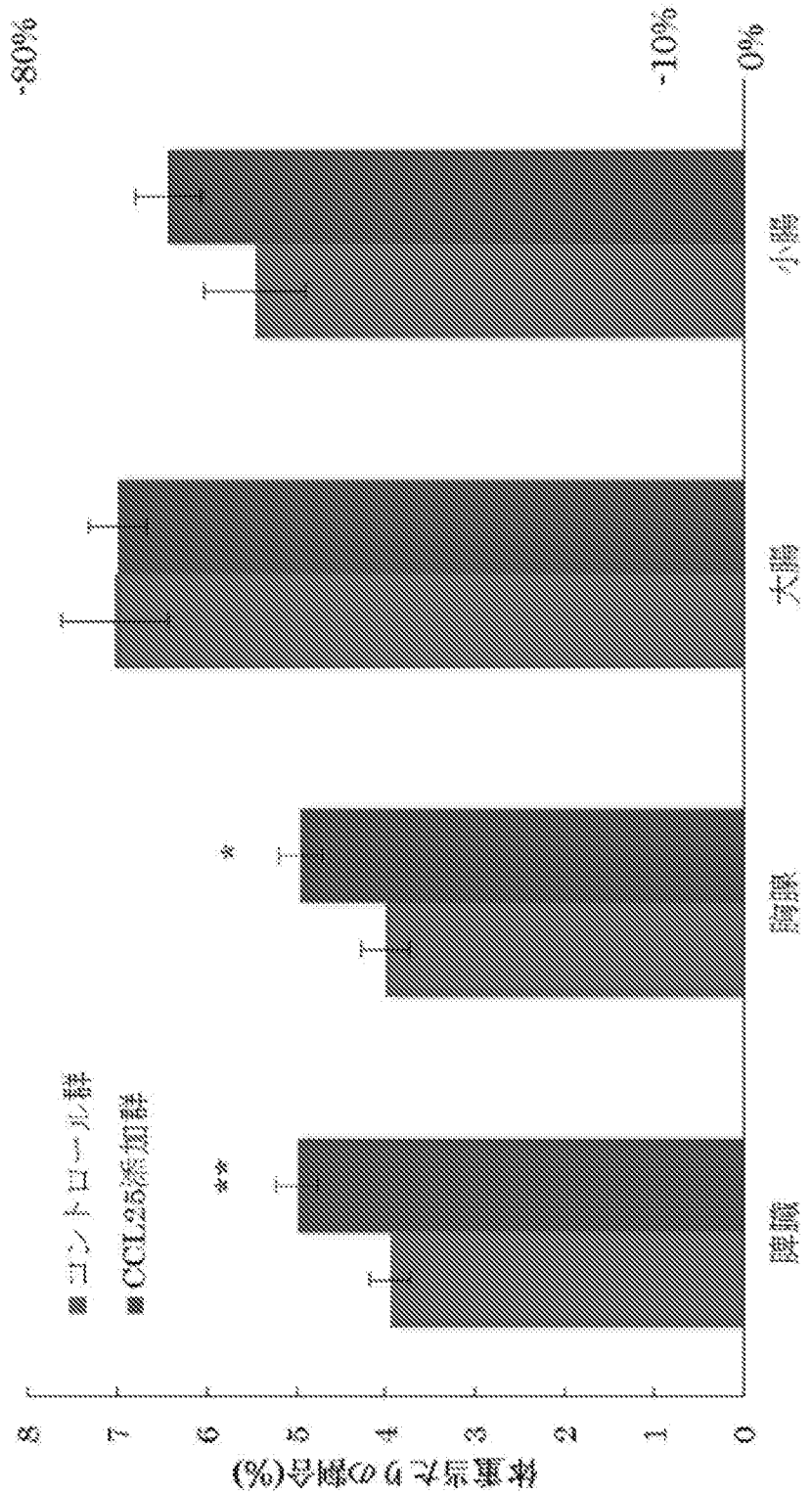
[請求項5] 乳児用である請求項４に記載の成長促進剤。

[請求項6] 経口摂取用である請求項４又は５に記載の成長促進剤。

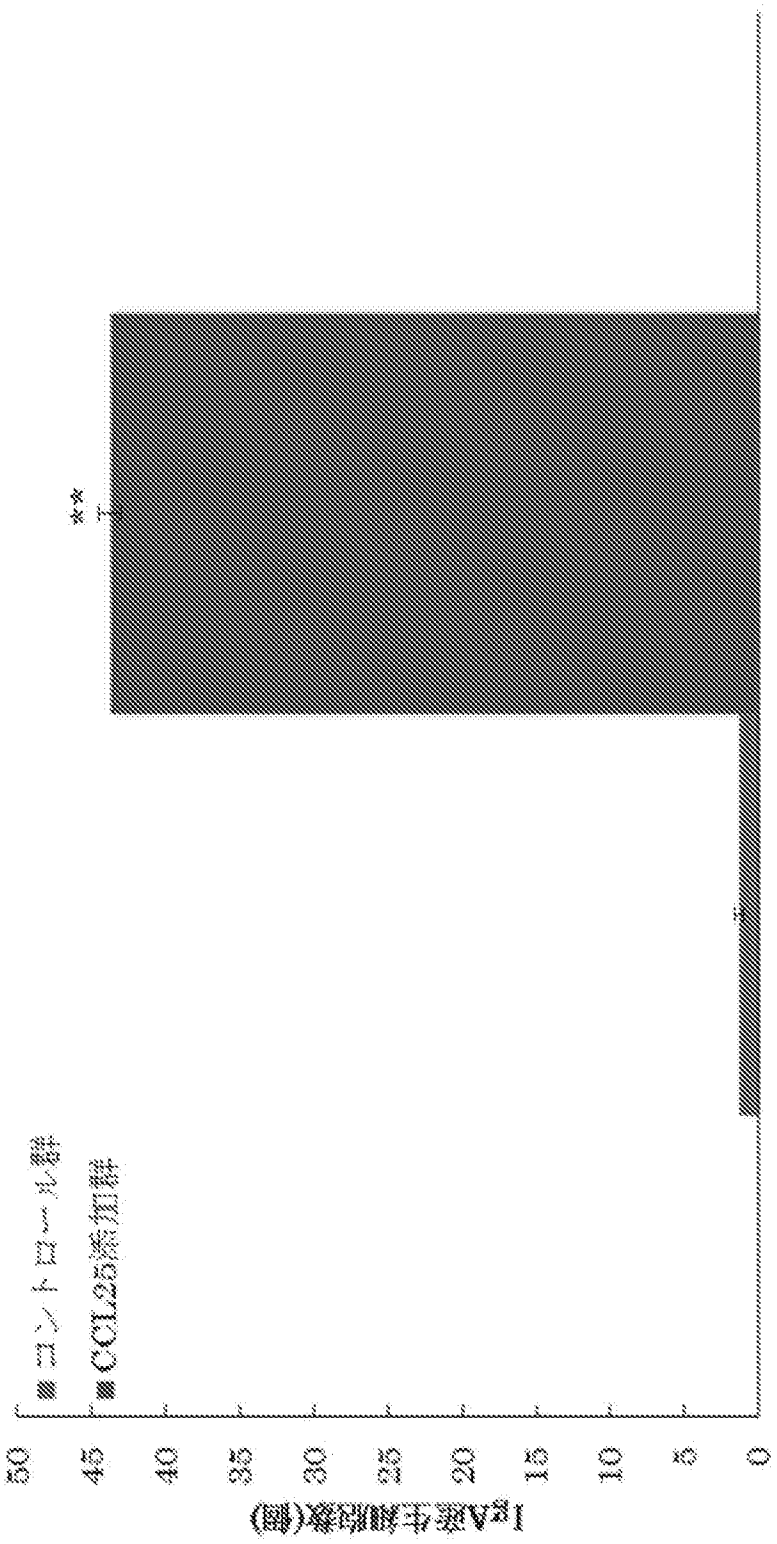
[図1]



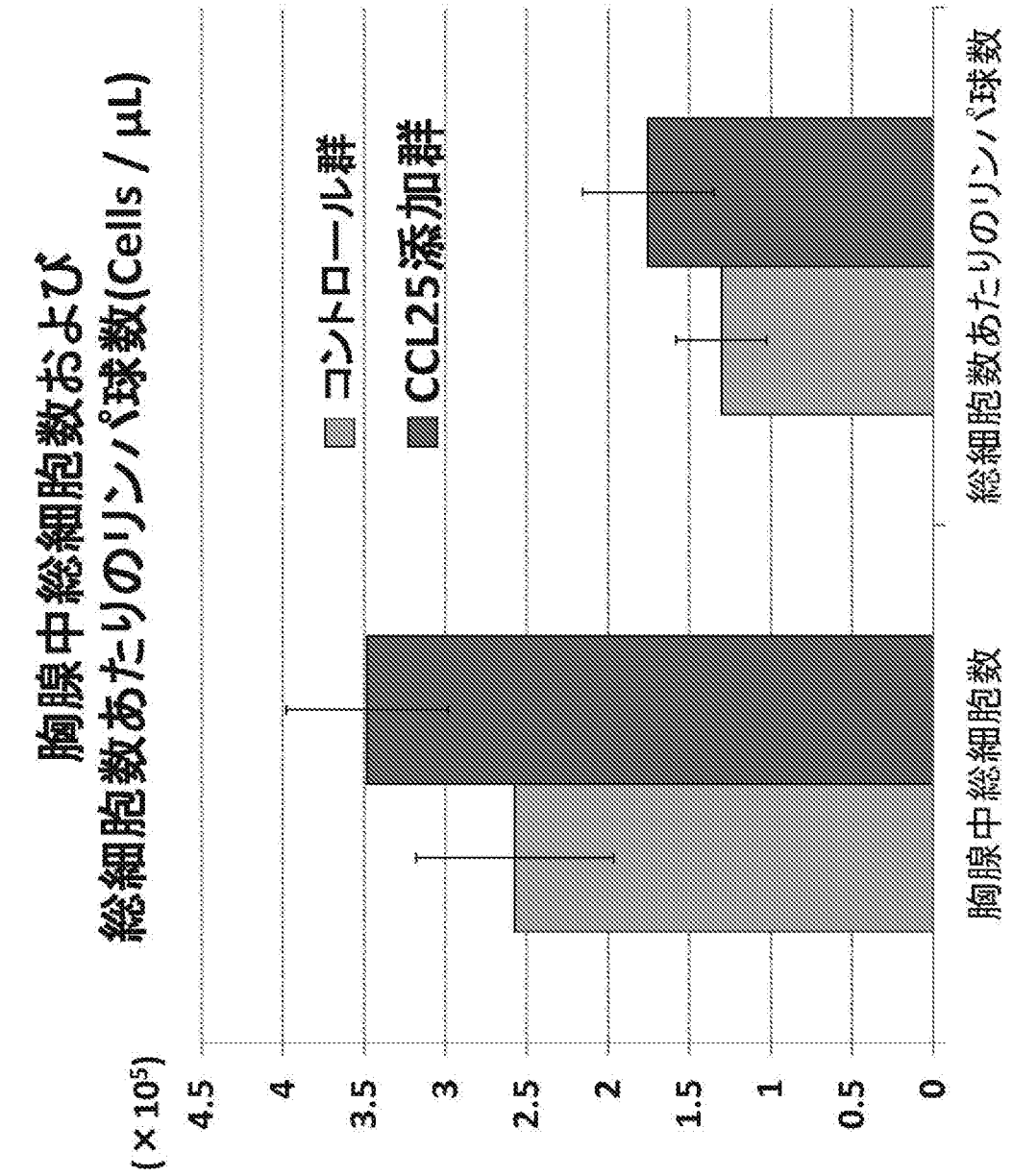
[図2]



[図3]



[図4]


胸腺中総細胞数および
総細胞数あたりのリンパ球数(Cells / μL)
(×10⁵)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
コントロール群
CCL25添加群
胸腺中総細胞数
総細胞数あたりのリンパ球数

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K38/00(2006.01)i, *A23C3/00*(2006.01)i, *A23L33/19*(2016.01)i, *A61P3/00*(2006.01)i, *A61P5/00*(2006.01)i, *C07K14/52*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K38/00, A23C3/00, A23L33/19, A61P3/00, A61P5/00, C07K14/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazutoshi SAYAMA, "Elucidation of physiological functionality of CCL25 in milk for the enhancement of gut immunity in neonate", [online], 25 July 2014 (25.07.2014), [retrieval date 05 September 2016 (05.09.2016)], Internet: <URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25560048/>, entire text, particularly, column of 'Kenkyu Seika no Gaiyo'	1-6
X	LEVAST, B. et al.; "Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL17 mRNA expression", 2010, Veterinary Immunology and Immunopathology, vol.137, pp.261-268, entire text, particularly, ABSTRACT	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 September 2016 (06.09.16)	20 September 2016 (20.09.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/068098

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-508647 A (Mars, Inc.), 07 April 2005 (07.04.2005), entire text; particularly, paragraphs [0008] to [0010] & WO 2003/041512 A1 page 2, line 19 to page 3, line 11 & US 2005/0079244 A1 & US 2008/0260893 A1 & EP 1446023 A1	1-6
X	KATHURIA, N. et al.; "Generation of antigen-specific immunity following systemic immunization with DNA vaccine encoding CCL25 chemokine immunoadjuvant", 2012, Human Vaccines & Immunotherapeutics, vol.8, No.11, pp.1607-1619, entire text, particularly, summary, column of Discussion	1,2
P,X	Kazutoshi SAYAMA et al., "Mouse Bonyuchu CCL25 wa Shinseiji no Seicho Oyobi Men'eki Kino no Hattatsu o Sokushin suru", 25 April 2016 (25.04.2016), The Japanese Society of Nutrition and Food Science Dai 70 Kai Taikai Ippan Koen Topics-shu, pages 37 to 40	1-6
A	Kunio HIESHIMA, "CCL25, CCL28 wa IgA Kotai Sansei Saibo no Chokan eno Homing ni Kan'yo suru", 2005, Clinical Immunology, vol.43, no.5, pages 584 to 588	1-6
A	MEURENS, F. et al.; "Expression of mucosal chemokines TECK/CCL25 and MEC/CCL28 during fetal development of the ovine mucosal immune system", 2007, Immunology, vol.120, pp.544-555	1-6
A	Masaki TAKENAKA et al., "Ninshin Oyobi Hitsunyuchu no Mouse Nyusen Soshikinai ni Okeru CCL25 no Hatsugen", 2010, Proceedings of the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, page 227	1-6

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６８０９８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K38/00(2006.01)i, A23C3/00(2006.01)i, A23L33/19(2016.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P5/00(2006.01)i, C07K14/52(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K38/00, A23C3/00, A23L33/19, A61P3/00, A61P5/00, C07K14/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	茶山　和敏；「乳児の腸管免疫機能の向上を目的とした乳汁中 CCL25 の生理学的機能性の解明」, [online], 2014.07.25, [検索日　2016.09.05], インターネット:<URL: https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-25560048/>, 全文、特に、「研究成果の概要」欄	1-6

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０６．０９．２０１６	２０．０９．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｕ　５２７７
長岡　真
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	LEVAST, B. et al.； “Ultra-early weaning in piglets results in low serum IgA concentration and IL17 mRNA expression”, 2010, Veterinary Immunology and Immunopathology, vol.137, pp.261-268 全文、特にABSTRACT	1-6
X	JP 2005-508647 A（マーズ　インコーポレイテッド）2005.04.07, 全文、特に、[0008]－[0010] & WO 2003/041512 A1 第2頁第19行－第3頁第11行 & US 2005/0079244 A1 & US 2008/0260893 A1 & EP 1446023 A1	1-6
X	KATHURIA, N. et al.； “Generation of antigen-specific immunity following systemic immunization with DNA vaccine encoding CCL25 chemokine immunoadjuvant”, 2012, Human Vaccines & Immunotherapeutics, vol.8, No.11, pp.1607-1619 全文、特に、要旨、Discussion欄	1,2
P,X	茶山　和敏ら； 「マウス母乳中CCL25は新生仔の成長及び免疫機能の発達を促進する」, 2016.04.25, 日本栄養・食糧学会第70回大会一般講演トピックス集, p.37-40	1-6
A	稗島　州雄； 「CCL25, CCL28はIgA抗体産生細胞の腸管へのホーミングに関与する」, 2005, 臨床免疫, vol.43, No.5, pp.584-588	1-6
A	MEURENS, F. et al.； “Expression of mucosal chemokines TECK/CCL25 and MEC/CCL28 during fetal development of the ovine mucosal immune system”, 2007, Immunology, vol.120, pp.544-555	1-6
A	竹中　正樹ら； 「妊娠および泌乳中のマウス乳腺組織内におけるＣＣＬ25の発現」, 2010, 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.227	1-6