

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年5月11日 (11.05.2006)

PCT

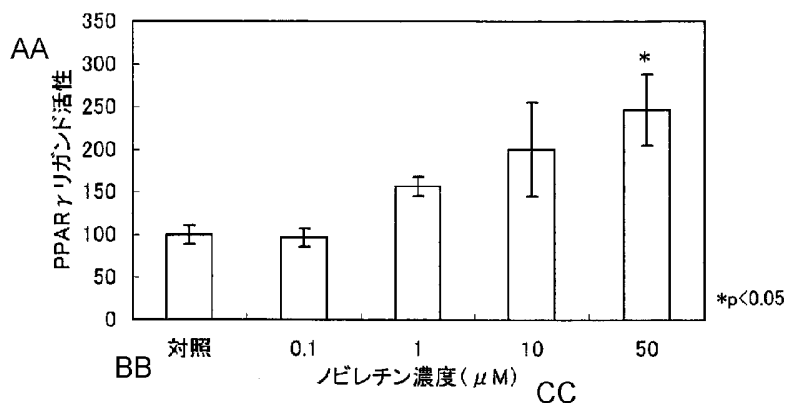
(10) 国際公開番号
WO 2006/049234 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/352 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) C07D 311/30 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/020268
- (22) 国際出願日: 2005年11月4日 (04.11.2005)
- (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2004-324015 2004年11月8日 (08.11.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木貴生 (SASAKI, Takao).
- (74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ (IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

/ 続葉有 /

(54) Title: PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR (PPAR) ACTIVATOR AND DRUG, SUPPLEMENT, FUNCTIONAL FOOD AND FOOD ADDITIVE USING THE SAME

(54) 発明の名称: ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) 活性化剤、ならびにそれを用いた医薬、サプリメント、機能性食品および食品添加物

AA... PPAR γ LIGAND ACTIVITY

BB... CONTROL

CC... NOBILETIN CONCENTRATION (μ M)

(57) Abstract: It is intended to provide a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activator which is free from the problem of side effects, can be taken over a long period of time and has no characteristic flavor. Nobiletin is used as a PPAR activator. Nobiletin, which has an excellent PPAR activity and an excellent effect of promoting adiponectin secretion, is contained in a large amount in citrus fruits, in particular, *Citrus depressa* HAYATA indigenous to Okinawa. Because of having been taken over many years, citrus fruits are free from any problem in safety and have low caloric values. Thus, they can be taken over a long period of time. Nobiletin is tasteless and odorless and therefore it can be added to a food without damaging the characteristic taste of the food. Owing to these characteristics, nobiletin can be added to foods and taken.

/ 続葉有 /



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 副作用の問題がなく、長期間摂取可能であり、特有の風味がないペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) 活性化剤を提供する。ノビレチンをPPAR活性化剤として使用する。ノビレチンは、優れたPPAR活性および優れたアディポネクチン分泌促進効果を有し、柑橘類果実、特に、沖縄特産のシイクワシャー (Citrus depressa HAYATA) に多量に含まれており、柑橘類果実は長年食されてきたことから、安全性に問題がなく、しかもカロリーが低いので、長期間摂取可能である。また、ノビレチンは、無味無臭なので、食品に添加しても、その食品特有の風味を害することがないため、食品に添加して摂取可能である。

明 細 書

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)活性化剤、ならびにそれを用いた医薬、サプリメント、機能性食品および食品添加物

技術分野

[0001] 本発明は、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)活性化剤、ならびにそれを用いた医薬、サプリメント、機能性食品および食品添加物に関する。

背景技術

[0002] 糖尿病の発症には、インスリン分泌低下とインスリン抵抗性の二つが関与しているといわれている。最近、日本人において、糖尿病患者が増えているが、インスリン分泌低下は遺伝的要素が大きいと、糖尿病患者増加の主原因ではなく、インスリン抵抗性が主原因と考えられている。これは、日本人の食生活が欧米化して脂肪摂取量が増えたことや、その他、運動不足、肥満、ストレスが原因であるといわれている。インスリン抵抗性の発生のメカニズムは、脂肪細胞の肥大化に起因することが最近の研究で分かっている。すなわち、脂肪細胞が肥大化すると、TNF- α および遊離脂肪酸(FFA)が分泌され、これらが筋肉細胞や肝臓細胞での糖の取り込みを阻害すると共に、インスリンの働きを促進するアディポネクチンの分泌が抑制され、この結果、インスリン抵抗性が生じる。

[0003] 一方、インスリン抵抗性の研究において、核内受容体であるPPARを活性化すると、インスリン抵抗性の改善に効果があることが分かっている。PPARには、 α 、 σ 、 γ の3つのタイプと、いくつかのサブタイプが知られている。PPAR α は、主として肝臓細胞に発現し、その他、心筋細胞や消化管細胞にも発現が認められ、脂肪酸酸化、ケトン体生成、アポリポタンパク質の生成などに関与している。PPAR σ は、組織特異性が認められず、体全体に発現しているが、大腸がん細胞での発現が顕著である。PPAR γ は、 γ 1型と γ 2型の2つのサブタイプに分類でき、 γ 1型は、脂肪組織、免疫系組織、副腎、小腸で発現し、 γ 2型は、脂肪細胞で特異的に発現しており、脂肪細胞の分化誘導や脂肪合成に重要な役割を担っている。

[0004] このように、PPARは、インスリン抵抗性の改善に大きく関わっており、加えて、高イ

ンスリン血症、2型糖尿病、その他、肥満、高血圧、高脂血症および動脈硬化の改善にも関わっていると言われている。このような観点から、PPARを活性化する物質について研究され、例えば、フィブラート系化合物、チアゾリジン誘導体、脂肪酸、ロイコトリエンB₄、インドメタシン、イブプロフェン、フェノプロフェン、15-deoxy- Δ -12, 14-PGJ₂のような合成物質系のPPAR活性化剤が知られている。しかしながら、合成物質系のPPAR活性化剤は、長期摂取による副作用の問題があり、日常生活で摂取してインスリン抵抗性等の疾病を予防若しくは改善するのには不向きである。この他、天然成分由来のPPAR活性化剤として、ウコンに含まれるクルクミンや、油脂の一種であるモノアシルグリセロール、お茶などに含まれるカテキン類などの天然物質が、PPAR活性化剤として報告されている(例えば、特許文献1参照)。しかしながら、天然成分由来のものであっても油脂などはカロリーが高いため、継続的に摂取することには問題がある。また、日常的に摂取するためには、食品等に添加して摂取することが理想的であるが、天然成分由来のものは独特の風味を有するものも多く、このようなものは食品等に添加するには不向きである。

特許文献1:特開2002-80362号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、副作用の問題がなく、長期摂取可能であり、しかも食品等に添加しても問題のないPPAR活性化剤の提供を、その目的とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 前記目的を達成するために、本発明のPPAR活性化剤は、ノビレチンを含むことを特徴とする。

発明の効果

- [0007] 本発明者は、前記課題を解決するために、天然成分のPPAR活性化剤について一連の研究を重ねたところ、柑橘類果実、特に沖縄地方特産のシイクワシャー(学名:Citrus depressa HAYATA)に含まれるノビレチンが、PPARの活性化作用

を有することを見出し、本発明に到達した。すなわち、ノビレチンを多く含むシイクワシヤーは、長年食用されてきており、その安全性は確認されている。また、ノビレチンは、カロリーが低く、この点で糖尿病患者や肥満患者等が長期摂取しても問題がない。そして、ノビレチンは、無味無臭であるため、食品等に添加しても、その食品独特の風味を損なうことがないため、食品に添加して長期に渡って日常的に摂取することも可能となる。したがって、本発明により、ノビレチンがPPARを活性化することにより、脂肪の燃焼を促進させ、TNF- α および遊離脂肪酸の分泌を抑制し、かつアディポネクチンの分泌を促進させるから、脂肪細胞の状態を正常化でき、インスリン抵抗性を改善でき、その他、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満などの症状を改善できる。なお、これは、人に限られず、その他動物にも有効である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、本発明の一実施例において、ノビレチンのPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

[図2]図2は、本発明のその他の実施例において、ノビレチンによるアディポネクチン mRNA発現量の増加を示すグラフである。

[図3]図3は、本発明のさらにその他の実施例において、ノビレチンによる糖尿病改善効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0009] 本発明のPPAR活性化剤において、活性化されるPPARは、PPAR α およびPPAR γ のいずれかでもよいが、好ましくは双方である。なお、本発明のPPAR活性化剤は、ノビレチン以外の他の成分を含んでいてもよい。前記他の成分としては、例えば、各種添加剤があり、この他、ノビレチン以外の他のPPAR活性化剤等がある。

[0010] 前述のように、ノビレチンは、PPAR活性化作用を有するため、本発明のPPAR活性化剤は、例えば、脂肪細胞におけるTNF- α および遊離脂肪酸の分泌の抑制作用、アディポネクチンの分泌の促進作用および肝臓細胞における脂肪の β 酸化促進作用を有する。また、本発明のPPAR活性化剤は、脂肪細胞のアポトーシス、分化および小型化の少なくとも一つを誘導する。

- [0011] 本発明のPPAR活性化剤において、使用するノビレチンは、特に制限されないが、例えば、柑橘類由来のものが使用でき、好ましくは沖縄特産果実として知られるシイクワシャー由来のものである。シイクワシャーの果汁には、ノビレチンが多く含まれているので、これをそのまま使用してもよく、また、柑橘類から単離精製したものや市販品を使用してもよい。
- [0012] つぎに、本発明の医薬は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは治療のための医薬であって、前記本発明のPPAR活性化剤を含む医薬である。本発明の医薬は、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤および各種添加剤等を含んでいても良い。本発明の医薬において、具体的な剤形としては、例えば、錠剤、細粒剤（散剤を含む）、カプセルおよび液剤（シロップ剤を含む）等があげられる。本発明の医薬は、各剤形に適した添加剤や基材等を適宜使用し、日本薬局方等に記載された通常の方法に従い製造できる。また、投与経路としては、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与があげられ、前記非経口投与としては、例えば、口腔内投与、気道内投与、直腸内投与、皮下投与、筋肉内投与および静脈内投与等があげられる。本発明の医薬において、ノビレチンの1日あたりの投与量が、例えば、10mg以上となるようにノビレチンを含んでいればよく、好ましくは20mg以上である。
- [0013] つぎに、本発明のサプリメントは、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のためのサプリメントであって、前記本発明のPPAR活性化剤を含むサプリメントである。本発明のサプリメントは、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤、各種添加剤およびその他のサプリメント等を含んでいてもよく、前記その他のサプリメントとしては、例えば、ビタミンCなどの各種ビタミン類、アミノ酸およびオリゴ糖等があげられる。本発明のサプリメントの形態は、特に制限されず、例えば、錠剤、細粒剤（散剤を含む）、カプセルおよび液剤（シロップ剤を含む）等があげられる。本発明のサプリメントにおいて、ノビレチンの含有量は、前記医薬と同様である。

- [0014] つぎに、本発明の機能性食品は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のための機能性食品であって、前記本発明のPPAR活性化剤を含む機能性食品である。本発明の機能性食品は、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤および各種添加剤等を含んでもよい。なお、本発明の機能性食品の形態は、特に制限されず、例えば、麺類、菓子類および機能性飲料等があげられる。
- [0015] つぎに、本発明の食品添加剤は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のための食品添加物であって、前記本発明のPPAR活性化剤を含む食品添加物である。本発明の食品添加剤は、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤および各種添加剤等を含んでもよい。本発明の食品添加剤の形態は、特に限定されないが、例えば、液状、ペースト状、粉末状、フレーク状および顆粒状等があげられる。また、本発明の食品添加剤は、飲料用を含む。
- [0016] つぎに、本発明のPPAR活性化方法は、ノビレチンによりPPARを活性化する方法である。前記ノビレチンを、例えば、脂肪細胞等に接触させることによりPPARを活性化することがより好ましい。
- [0017] 本発明のPPAR活性化方法において、使用するノビレチンは、前記本発明のPPAR活性化剤に使用するものと同様であり、例えば、柑橘類由来のものが使用でき、好ましくは沖縄特産果実として知られるシイクワシャー由来のものである。前述のように、シイクワシャーの果汁には、ノビレチンが多く含まれているので、これをそのまま使用してもよいし、柑橘類から単離精製したものや市販品を使用してもよい。
- [0018] つぎに、本発明の疾病の予防、治療または改善方法は、哺乳動物におけるインスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防、治療または改善方法であって、ノビレチンを投与することを含む方法である。ノビレチンの一日あたりの投与量は、例えば、10mg/日以上であり、好ましくは20mg/日以上である。前記哺乳動物と

しては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタおよびサル等があげられる。

[0019] つぎに、本発明のキットは、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防または治療のためのキットであって、

a) ノビレチン、

b) インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防または治療に有用な第二の化合物を含む第二医薬組成物、および

c) 前記ノビレチンおよび前記第二医薬組成物を入れるための容器を含むキットである。

[0020] つぎに、本発明の使用は、PPAR活性化剤の製造のためのノビレチンの使用である。

[0021] また、本発明の使用は、哺乳動物における本発明のインスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防、治療または改善のためにノビレチンを投与することを含む使用である。ノビレチンの一日あたりの投与量および前記哺乳動物は、前述の通りである。

[0022] 本発明の使用において、使用するノビレチンは、前記本発明のPPAR活性化剤に使用するものと同様であり、例えば、柑橘類由来のものが使用でき、好ましくは沖縄特産果実として知られるシイクワシャー由来のものである。前述のように、シイクワシャーの果汁には、ノビレチンが多く含まれているので、これをそのまま使用してもよいし、柑橘類から単離精製したものや市販品を使用してもよい。

[0023] 本発明の使用において、ノビレチンは、例えば、脂肪細胞におけるTNF- α および遊離脂肪酸の分泌抑制、脂肪細胞におけるアディポネクチンの分泌促進、肝臓細胞における脂肪の β 酸化促進等の作用を少なくとも一つを誘導する。また、本発明の使用において、ノビレチンは、例えば、脂肪細胞のアポトーシス、分化および小型化等の少なくとも一つを誘導する。

- [0024] つぎに、本発明におけるノビレチンは、例えば、シイクワシャー等の柑橘類果実から以下のようにして製造できる。
- [0025] まず、果実を、所望のサイズに裁断または粉碎する。使用する果実は、採取直後の生のものであってもよいし、乾燥した状態のものであってもよい。つぎに、裁断等した果実を、溶媒に浸漬して抽出物を得る。浸漬に使用する溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、イソプロパノール、*t*-ブタノール等の低級アルコール類、アセトンなどのケトン類、ジエチルエーテル、石油エーテルなどのエーテル類、クロロホルム、ジクロロメタンなどの塩素系有機溶媒などがあげられ、これらは単独で使用してもよいし、2種類以上を併用してもよい。これらの中で、毒性等の観点から、水とエタノールの混合物若しくはエタノールを使用することが好ましい。溶媒の使用量は、特に制限されず、例えば、果実量100重量部に対し、200重量部～10000重量部の範囲である。抽出処理は、例えば、室温で行うことができるが、好ましくは4～120℃の範囲、より好ましくは40～100℃の温度条件である。抽出時間は、抽出温度等により適宜決定されるが、例えば、室温での抽出時間は、1～10日間であり、50℃以上では1～96時間である。
- [0026] つぎに、フィルターによるろ過等により、残渣から分離して抽出液を取り出す。この抽出液若しくはその乾燥物は、ノビレチンを含んでいるので、これをそのまま使用してもよい。また、後述のように、さらに精製してノビレチンの純度を高めて使用してもよい。
- [0027] 前記抽出物の精製は、例えば、適切な溶離液を用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより行うことができる。前記溶離液としては、例えば、酢酸エチル、メタノール、イソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ベンゼン、またはキシレンなどの溶媒と、ヘキサン、ヘプタン、クロロホルム、またはジクロロエタンなどの溶媒との、混合溶媒を使用することが好ましい。

実施例 1

- [0028] 下記に示すように、本実施例は、ノビレチンによるPPAR γ の活性化を確認した例である。
- [0029] まず、CV-1細胞(雄性アフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞)を、24穴培養プレ

ートに $0.2 \mu\text{g}/\text{well}$ となるように植え込み、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で24時間培養した。培地には、 $10\%\text{FBS}$ (ウシ胎仔血清)、 $10\text{mg}/\text{mL}$ ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium: GIBCO社) を用いた。つぎに、リポフェクトアミンシステム (Invitrogen社) を用いて、pM-hPPAR γ とp4 $\times$ UASg-tk-lucとを、培養したCV-1細胞にトランスフェクションした。なお、前記pM-hPPAR γ は、GAL4結合ドメインである1～147残基とヒトPPAR γ リガンド結合ドメインである204～505残基とを含む融合タンパク質を発現するためのベクターであり、前記p4 $\times$ UASg-tk-lucは、ルシフェラーゼ遺伝子上流に、4コピーのGAL4結合ドメインのための上流活性化配列 (UAS) とチミジンキナーゼ遺伝子プロモータとを含むレポーター・プラスミドである。前記トランスフェクションを行った細胞を約24時間培養し、ついで、前記細胞の培地を、種々濃度 (0.1、1.0、10および $50 \mu\text{M}$) のノビレチンまたは無処置対照用の培地に変え、さらに24時間培養した。前記ノビレチンを含む培地は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したノビレチンを培地に加えることにより調製し、無処置対照用の培地は、DMSOのみを培地加えることにより調製した。培養後、前記細胞を溶解し、デュアル・ルシフェラーゼレポータージーンアッセイシステム (Promega社) を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した (測定群)。

[0030] 前記測定群と同様に、コントロール群としてpM-hPPAR γ の代わりにpM (pM-hPPAR γ においてGAL4結合ドメインである1～147残基を含むが、PPAR γ リガンド結合ドメインである204～505残基を含まないベクター) を用いて測定した。各サンプルについて、測定群及びコントロール群の発光強度の平均値 ($n=4$) の比 (測定群/コントロール群) を算出し、無処置対照に対する相対ルシフェラーゼ活性をサンプルのPPAR γ リガンド結合活性とした。この結果を下記表1および図1のグラフに示す。

[0031] [表1]

	添加濃度	PPAR γ リガンド活性
無処置対照 (DMSO)	(0.1%)	100
ノビレチン	0.1 μ M	96.5 $\pm$ 10.8
	1.0 μ M	156.8 $\pm$ 11.3
	10 μ M	200.5 $\pm$ 55.1
	50 μ M	246.7 $\pm$ 41.7
(平均値 $\pm$ 標準誤差)		

[0032] 前記表1および図1から分かるように、ノビレチンによって、PPAR γ の活性が向上し、その活性は、ノビレチンの濃度が高くなるにつれて、有意に高くなった。

実施例 2

[0033] 下記に示すように、本実施例は、ノビレチンによるアディポネクチンの分泌促進効果を確認した例である。

[0034] (前駆脂肪細胞の分化誘導)

まず、以下の2種類の培地を準備した。

1. 分化誘導培地(0.25 μ M:DEX、0.5mM:MIX、10 μ g/mL:インスリン/10%FBS/DMEM)

DMEM(SIGMA製)500mLに、FBS(ウシ胎仔血清(GIBCO製))を55mL加え、10%FBS/DMEMを調製した。これに、1mM DEX(dexamethasone)/DMSO(ナカライ製)を138.75 μ L、10mg/mLインスリン/PBS(SIGMA製)を555 μ L加えた。なお、インスリン/PBSは、予めPBSに1N HClを加え、インスリンが溶ける程度に酸性にした後、インスリンを溶解させた。MIX(3-Isobutyl-1-methylxanthine)(ナカライ製)を、0.5mMとなるように、使用する直前に必要な量の前記培地に加えることにより、分化誘導培地を調製した。MIXは非常に溶けにくいので、まず少量の99.5%エタノールに溶解させた後、10%FBS/DMEMに加えた。このとき99.5%エタノールは最終濃度が、1%を越えないようにした。

2. 分化促進培地(5 μ g/mL:インスリン/10%FBS/DMEM)

10%FBS/DMEM 555mLに、10mg/mLインスリン/PBSを277.5 μ L加え、分化促進培地を調製した。

[0035] つぎに、培養前駆脂肪細胞3T3-L1を解凍し、100mmディッシュにまき、3T3-L1が、約80%コンフルエントに達するまで培養した。約80%コンフルエントに達したディッシュ1枚分の10T1/2を6ウェルプレート1枚に継代し、3T3-L1が6ウェルプレートにおいてコンフルエントに達するまでさらに培養した後、分化誘導培地に培地交換し、分化誘導させた。48時間後、分化促進培地に培地交換し、以降2日おきに分化促進培地で培地交換した。分化誘導開始7日後、セパゾールRNA I super(ナカライ製)を用いてmRNAを抽出し、Light CyclTMerを用いて、脂肪細胞分化初期の指標である36B4、aP2およびアディポネクチンのmRNA発現量の測定を行った。

[0036] (Light CyclTMerによるmRNAの定量)

total RNAの抽出と定量

前記6ウェルプレートから培地を除去し、各ウェルに1mLずつセパゾールRNA I super(ナカライ製)を加え、ピペッティングを数回繰り返すことにより細胞を分散させた。この液を1.5mLのチューブに移し、室温で5分間放置した後、クロロホルムを200 μ L加え、Vortexでよく攪拌し、室温で3分間放置した。4°Cに冷却し、12000 $\times$ gで15分間遠心した。フェノール層(下層、黄色)と水層(上層、無色)との界面を乱さないように注意しながら、水層のみを別のチューブ(容量1.5mL)へ移した。この際、中間に浮いているタンパク質を取らないようにした。前記チューブにイソプロパノールを500 μ L加えて混和し、室温で10分間放置した。4°Cに冷却し、12000 $\times$ gで10分間遠心し、上清約1mLを除去した。この沈殿に75%エタノールを1mL加えて攪拌して沈殿を十分に懸濁した後、4°Cに冷却し、12000 $\times$ gで10分間遠心し、上清を除去した。得られた沈殿(total RNA)を乾燥させた後、20 μ Lのnuclease free waterに溶かし、NanoDrop(スクラム製)によりmRNAの濃度を測定した。

[0037] 逆転写

抽出し、測定したmRNA溶液を、mRNA濃度が1 μ g/ μ Lになるように調製した。8連チューブ(容量0.2mL)に、Oligo dT プライマー1 μ Lと前記RNA溶液10 μ Lとを添加した。Thermal CyclTMerにおいて、前記混合液を70°Cで10分間インキュベートし、RNAの高次構造を破壊して氷上に移し、一分以上放置した後、以下のよ

うな試薬を順に加えた。

[0038] [表2]

RNAサンプル／プライマー混合液	11 μ L
5×逆転写緩衝液	5 μ L
RNase inhibitor	1 μ L
2.5mM dNTP Mix	5 μ L
Nuclease Free water	2 μ L
合計	24 μ L

[0039] Thermal Cyclerで、42℃で5分間プレインキュベートした後、逆転写酵素を1 μ L添加し、チューブの内容物をピペッティングでよく混合した。Thermal Cyclerで、42℃で50分間、さらに70℃で15分間インキュベートした後、氷上で冷やし、軽く遠心して反応液をチューブの底に集め、-20℃で凍結保存しておいた。なお、Light Cycler^(TM)測定に使用する場合は、その都度10倍希釈して用いた。

[0040] Light Cycler^(TM)測定

以下の操作は全てクリーンベンチ内で行った。発現量を測定する遺伝子の断片が入ったプラスミド溶液5mLを、0.65mLのチューブに加え、Light Cycler^(TM) DNA Master SYBR Greenに付属の水45mLで10倍に希釈した。この作業を繰り返し、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 および 10^8 倍の希釈溶液を作製した。Light Cycler^(TM) Centrifuge Adapterに専用キャピラリーを、ピンセットを用いてセットし、前記試薬を18 μ Lずつ分注した。さらに、ネガティブコントロールとして水、スタンダードとして7段階の希釈溶液、ならびに測定用サンプルのcDNAの10倍希釈液をそれぞれ2 μ Lずつ添加した後、ピンセットを用いて蓋をした。5000rpm、4℃で10秒間遠心した後、キャピラリーをカルーセルに装填してチャンバーにセットし、測定を行った。

[0041] Light Cycler^(TM)の定量結果を用いて、各サンプルについて、36B4のmRNAと、aP2およびアディポネクチンのそれぞれのmRNA発現量との比を算出した。その結果を、下記表3および図2のグラフに示す。

[0042] [表3]

添加濃度		a P 2	アディポネクチン
無処置対照		100 ± 16.2	100 ± 6.9
ノビレチン	1 μM	155.8 ± 21.7	164.9 ± 18.7
	5 μM	193.7 ± 41.4	265.1 ± 60.4
	10 μM	273.1 ± 13.8	352.3 ± 28.5

(平均値 ± 標準誤差)

- [0043] ノビレチンを添加した分化誘導培地で培養した脂肪細胞と、無処置対照の培地で培養した脂肪細胞とを比較した結果、ノビレチンを添加することにより、脂肪細胞におけるアディポネクチンの分泌が有意に増加した。したがって、ノビレチンは、アディポネクチン分泌促進効果を有するといえる。

実施例 3

- [0044] 本実施例は、自然発症糖尿病マウス(KKA^y)を用いて、ノビレチンの糖尿病改善効果を確認した例である。
- [0045] まず、12匹の自然発症糖尿病マウス(6週齢、雌)を、普通食で一週間予備飼育した。ついで、前記マウスを、平均体重が等しくなるように、コントロール群およびNOB群の2群に群分けした(n=6)。そして、コントロール群のマウスには、高脂肪食のみを摂取させ、NOB群のマウスには、ノビレチンを0.02%含有させた高脂肪食を摂取させた。摂取開始27又は28日後、これらのマウスから血清を採取した。なお、ノビレチンは、シイクワシャー抽出由来のものを使用した。
- [0046] (ELISAによるアディポネクチン分泌量の測定)

酵素免疫測定法(ELISA法)によるアディポネクチン分泌量の測定は、マウス/ラット アディポネクチンELISAキット(商品名)(大塚製薬株式会社製)を用いて行った。なお、前記キットの構成は、以下の通りである。

洗浄用原液

検体希釈用原液

抗体プレート(抗マウスアディポネクチンポリクローナル抗体(ウサギ)固相プレート)

標準品8.0ng/mL(リコンビナントマウスアディポネクチン)

ビオチン標識抗体液(ビオチン標識抗マウスアディポネクチン ポリクローナル抗体(

ウサギ))

酵素標識ストレプトアビジン原液 (HRP標識ストレプトアビジン)

酵素標識ストレプトアビジン希釈液

基質液A (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン)

基質液B (過酸化水素)

反応停止液

[0047] まず、以下の試薬および検体液を調製した。

洗浄液

前記洗浄用原液40mLに対して、精製水を960mLの割合で混合し、2. 8℃で保存した。

検体希釈液

前記検体希釈用原液50mLに対して、精製水を200mLの割合で混合し、2. 8℃で保存した。

標準液

前記標準品8. 0ng/mLを、前記検体希釈液で2段階希釈し、4. 0ng/mL、2. 0ng/mL、1. 0ng/mL、0. 5ng/mLおよび0. 25ng/mLの濃度の標準液を調製した。

酵素標識ストレプトアビジン液

前記酵素標識ストレプトアビジン希釈液12mLに対して、前記酵素標識ストレプトアビジン原液を60 μ Lの割合で混和した。

基質液

前記基質液B6mLに対して、前記基質液Aを6mLの割合で混和した。

検体液

前記コントロール群および前記NOB群の血清を、4万倍に希釈した。

[0048] 検査に必要な前記抗体プレートのストリップだけを取り出した。前記洗浄液を、前記抗体プレートの各ウェルに約200 μ Lずつ加えた後、プレートウォッシャーで各ウェルの液を完全に吸引除去した。この洗浄および吸引をもう一度繰り返した後、各濃度の標準液および希釈済みの各検体液を各ウェルにそれぞれ100 μ Lずつ添加し、二連

で測定した。なお、標準液は、測定およびプレートごとに必ず測定した。プレートシールで抗体をカバーし、室温で60分間静置反応させた後、抗体プレートからプレートシールを取り除き、プレートウォッシャーでウェル中の液を完全に吸引除去した。続いて、洗浄液を各ウェルに約200 μ Lずつ加え、速やかに吸引除去した。この洗浄と吸引とをさらに4回繰り返した。前記ビオチン標識抗体液を前記抗体プレートの各ウェルに100 μ Lずつ添加した後、プレートシールで抗体をカバーし、室温で60分間静置反応させた。前述と同様にして、同様にウェルの洗浄と吸引とを5回繰り返した。前記酵素標識streptavidin液を抗体プレートの各ウェルに100 μ Lずつ添加した後、プレートシールで抗体をカバーし、室温で60分間静置反応させた。前述と同様にして、同様にウェルの洗浄と吸引とを5回繰り返した。基質液を抗体プレートの各ウェルに100 μ Lずつ添加し、室温で15分間静置して反応させた後、反応停止液を抗体プレートの各ウェルに100 μ Lずつ加え、プレートリーダーにより各ウェルの450nmにおける吸光度を測定した。前記吸光度の測定によりえられたアディポネクチンの分泌量の測定結果(平均値)を、下記の表4および図3のグラフに示す。

[0049] [表4]

	ノビレチン含量	アディポネクチン分泌量
コントロール群	0 %	4. 7 8 $\pm$ 0. 0 9 6
NOB群	0. 0 2 %	7. 1 8 $\pm$ 0. 5 0
(平均値 $\pm$ 標準誤差)		

[0050] ノビレチンを摂取したNOB群の糖尿病マウスと、ノビレチンを摂取しなかったコントロール群の糖尿病マウスとにおいてアディポネクチン分泌量を比較した結果、ノビレチンの摂取により脂肪細胞におけるアディポネクチンの分泌量が有意に増加した。つまり、糖尿病罹患者がノビレチンを摂取することにより、アディポネクチンの分泌が促進されて脂肪細胞の状態が正常な状態となり、糖尿病が改善されることから、ノビレチンは、糖尿病改善効果を有するといえる。

産業上の利用可能性

[0051] 以上のように、本発明のPPAR活性化剤は、優れたPPAR活性を有し、副作用の

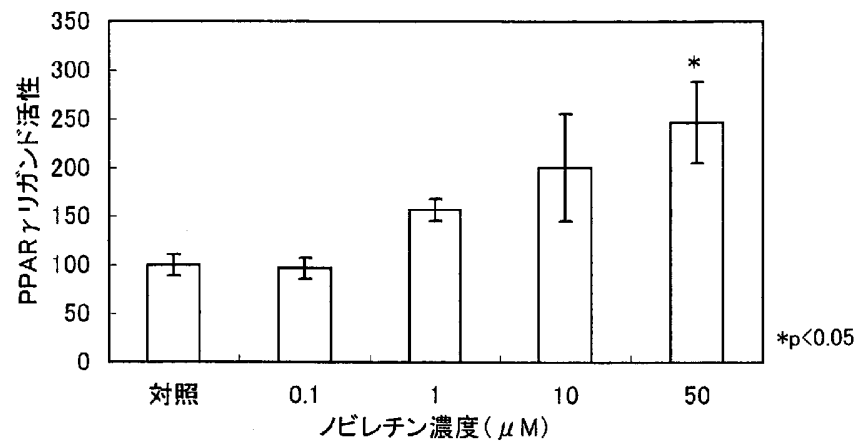
問題がなく長期間摂取することが可能であり、食品等に好ましく用いることができる。また、ノビレチンは、優れたアディポネクチン分泌促進効果等を有する。したがって、本発明のPPAR活性化剤は、例えば、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満などの疾病の予防若しくは改善のための医薬、サプリメント、機能性食品および食品添加物として使用できる。なお、これは、人に限られず、その他動物にも有効である。

請求の範囲

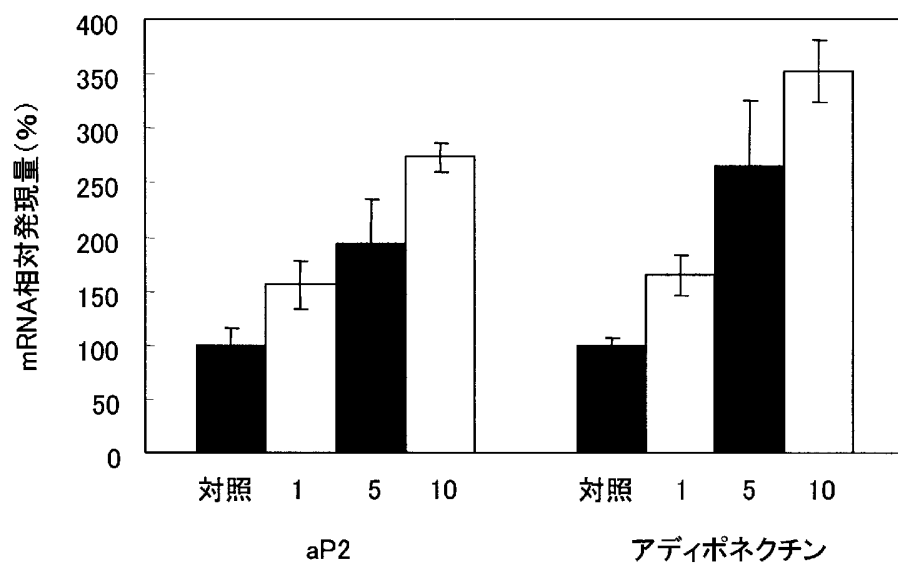
- [1] ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPAR)の活性化剤であって、ノビレチンを含むPPAR活性化剤。
- [2] 脂肪細胞において、TNF- α および遊離脂肪酸の分泌の抑制ならびにアディポネクチンの分泌促進の少なくとも一つの作用を有し、肝臓細胞において、脂肪の β 酸化を促進する作用を有する請求の範囲1記載のPPAR活性化剤。
- [3] 脂肪細胞のアポトーシス、分化および小型化からなる群から選択される少なくとも一つを誘導する請求の範囲1記載のPPAR活性化剤。
- [4] 前記ノビレチンが、柑橘類果実由来のものである請求の範囲1記載のPPAR活性化剤。
- [5] 前記柑橘類が、シイクワシャー(Citrus depressa HAYATA)である請求の範囲4記載のPPAR活性化剤。
- [6] インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは治療のための医薬であって、請求の範囲1記載のPPAR活性化剤を含む医薬。
- [7] インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のためのサプリメントであって、請求の範囲1記載のPPAR活性化剤を含むサプリメント。
- [8] インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のための機能性食品であって、請求の範囲1記載のPPAR活性化剤を含む機能性食品。
- [9] インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のための食品添加物であって、請求の範囲1記載のPPAR活性化剤を含む食品添加物。
- [10] PPAR活性化方法であって、ノビレチンによりPPARを活性化するPPAR活性化方法。
- [11] 前記ノビレチンが、柑橘類果実由来のものである請求の範囲10記載のPPAR活性化方法。

- [12] 前記柑橘類が、シイクワシャー (Citrus depressa HAYATA) である請求の範囲 11 記載の PPAR 活性化方法。
- [13] 哺乳動物におけるインスリン抵抗性、高インスリン血症、2 型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防、治療または改善方法であって、ノビレチンを投与することを含む予防、治療または改善方法。
- [14] PPAR 活性化剤の製造のためのノビレチンの使用。
- [15] 前記ノビレチンが、柑橘類果実由来のものである請求の範囲 14 記載の使用。
- [16] 前記柑橘類が、シイクワシャー (Citrus depressa HAYATA) である請求の範囲 15 記載の使用。
- [17] 哺乳動物におけるインスリン抵抗性、高インスリン血症、2 型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満からなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防、治療または改善のためにノビレチンを投与することを含む使用。
- [18] 脂肪細胞において、TNF- α および遊離脂肪酸の分泌の抑制ならびにアディポネクチンの分泌促進の少なくとも一つの作用を有し、肝臓細胞において、脂肪の β 酸化を促進する請求の範囲 17 記載の使用。
- [19] 脂肪細胞のアポトーシス、分化および小型化からなる群から選択される少なくとも一つを誘導する請求の範囲 17 記載の使用。
- [20] 前記ノビレチンが、柑橘類果実由来のものである請求の範囲 17 記載の使用。
- [21] 前記柑橘類が、シイクワシャー (Citrus depressa HAYATA) である請求の範囲 20 記載の使用。

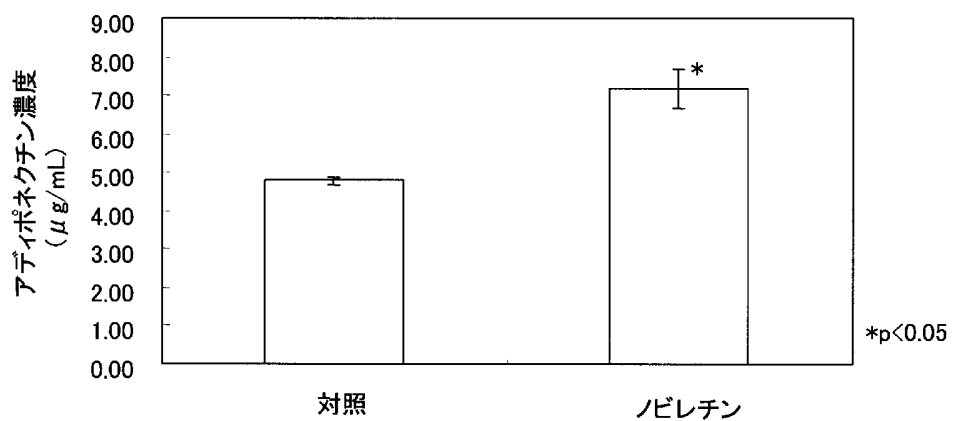
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/352 (2006.01), **A61P3/06** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P9/10** (2006.01), **A61P9/12** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **C07D311/30** (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/352 (2006.01), **A61P3/06** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P9/10** (2006.01), **A61P9/12** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **C07D311/30** (2006.01)

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	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAOLD (STN), CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), JMEDPlus (JOIS), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-240539 A (MACHIDA KK), 04 September, 2001 (04.09.01) (Family: none)	1-9, 14-16
A	JP 2002-080362 A (KAO CORP.), 19 March, 2002 (19.03.02) (Family: none)	1-9, 14-16
A	KUROWSKA, E.M., odulation of HepG2 cell net apolipoprotein B secretion by the citrus polymethoxyflavone, tangeretin, Lipids, 2004/02, Vol.39, No.2, pages 143 to 151	1-9, 14-16

☐ 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
16 November, 2005 (16.11.05)

Date of mailing of the international search report
06 December, 2005 (06.12.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020268

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10-13, 17-21

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10 to 13 and 17 to 21 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020268

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **A61K31/352** (2006.01), **A61P3/06** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P9/10** (2006.01), **A61P9/12** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **C07D311/30** (2006.01)

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. **A61K31/352** (2006.01), **A61P3/06** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P9/10** (2006.01), **A61P9/12** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **C07D311/30** (2006.01)

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	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005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)

CAOLD (STN), Cplus (STN), REGISTRY (STN), JMEDPlus (JOIS), JSTPlus (JOIS)

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 請求の範囲の番号
X	JP 2001-240539 A (MACHIDA KK) 2001.09.04 (ファミリーなし)	1-9, 14-16
A	JP 2002-080362 A (KAO CORP) 2002.03.19 (ファミリーなし)	1-9, 14-16
A	KUROWSKA, E. M., modulation of HepG2 cell net apolipoprotein B secretion by the citrus polymethoxyflavone, tangeretin, Lipids, 2004/02, Vol. 39, No. 2, pp. 143-151	1-9, 14-16

☐ 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

16. 11. 2005

国際調査報告の発送日

06. 12. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

安藤 倫世

電話番号 03-3581-1101 内線 3491

4 P

9837

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10-13, 17-21 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 10-13, 17-21 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT 規則 39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。