

(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
2010年5月14日(14.05.2010)

PCT

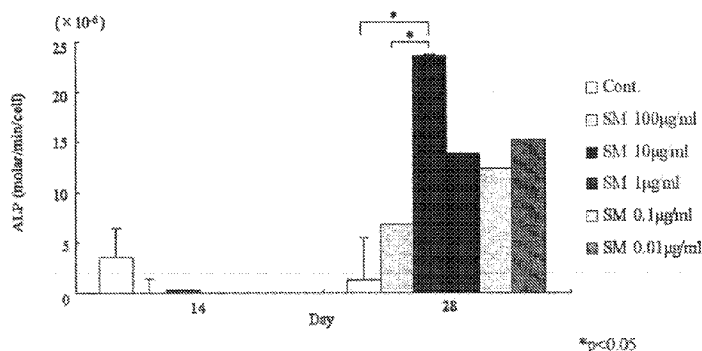
(10) 国際公開番号
WO 2010/052814 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/74 (2006.01) A61L 27/00 (2006.01)
A61K 6/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/003530
- (22) 国際出願日: 2009年7月27日(27.07.2009)
- (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 2008-285437 2008年11月6日(06.11.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本大学(NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 本田雅規 (HONDA, Masaki) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目8番24号学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 石原和幸 (ISHIHARA, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒2900142 千葉県市原市ちはら台南6-9サウスビル中央9-301 Chiba (JP). 阿部修 (ABE, Shu) [JP/JP]; 〒1770054 東京都練馬区立野町10-33-702 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所 (MOEGI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), 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 (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))

(54) Title: COMPOSITION FOR HARD TISSUE REGENERATIVE THERAPY

(54) 発明の名称: 硬組織再生治療用組成物

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a composition for hard tissue regenerative therapy, which comprises *S. mutans* and/or *P. gingivalis*. The composition for hard tissue regenerative therapy contains *S. mutans* and/or *P. gingivalis* at a low concentration.

(57) 要約: 【課題】 *S. mutans* および/または *P. gingivalis* を含む硬組織再生治療用組成物を提供する。 【解決手段】 *S. mutans* および/または *P. gingivalis* を低濃度含ませることで、硬組織再生治療用組成物の提供を可能とした。

WO 2010/052814 A1

明 細 書

発明の名称：硬組織再生治療用組成物

技術分野

- [0001] 本発明は*S. mutans* (*Streptococcus mutans*) および／または*P. gingivalis* (*Porphyromonas gingivalis*) を含む硬組織再生治療用組成物に関する。さらに詳しくは、象牙質および／または歯周組織の再生や、骨組織の再生用治療剤に有効成分として含まれる当該硬組織再生治療用組成物に関する。

背景技術

- [0002] 従来から、*S. mutans* はカリエス（虫歯）の原因菌、*P. gingivalis* は歯周病の原因菌とされてきた。そのため、カリエスや歯周病の治療や予防等のために、*S. mutans* に対する殺菌活性を有し、かつ間葉系幹細胞の細胞増殖効果を有する塩基性抗菌ペプチド（例えば、特許文献1参照）や、ポリフェノールを有効成分として含有する*P. gingivalis* の歯周組織への付着阻害剤（例えば、特許文献2参照）、*P. gingivalis* より引き起こされる疾病および感染を治療または予防するための特定のアミノ酸を含む免疫原性ポリペプチド（例えば、特許文献3参照）等が開発されてきた。
- [0003] しかし、*S. mutans* や*P. gingivalis* は、口腔内に常在する菌であり、存在しているからといって必ずしもカリエスや歯周病になるわけではなく、これらの細菌が低濃度感染することで、カリエスや歯周病が惹起されと考えられた。

臨床の現場において、カリエスが惹起された段階で、カリエスの進行とは逆に、象牙質が再生することが観察されている。これは、カリエスによって象牙質が融解され、象牙質のマトリックスに存在する増殖因子が象牙細管を通して象牙芽細胞に刺激を与えたことによって起こるものと考えられている。

このことから、本発明者らは、低濃度の細菌の感染によって、歯髓細胞、歯根膜細胞等の細胞の増殖が活発化され、これによって象牙質や歯周組織の再生が促進される可能性があると考え、これらの細菌を含む硬組織再生治療用組成物について検討を行った。

[0004] 象牙質や歯周組織の再生剤としては、水酸化カルシウムによる歯髓覆罩剤や、増殖因子による歯周組織再生剤が提供されているが、いずれにおいても100%の成功率を得ることは難しく、まだ、改良すべき点が残されているのが現状である。そこで、新たな硬組織再生治療用組成物が提供されることが期待されている。

〔先行文献〕

特許文献1：特開2005-281225号公報

特許文献2：特許第3837172号公報

特許文献3：特表2007-529195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、*S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む硬組織再生治療用組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、*S. mutans* および／または *P. gingivalis* が高濃度で存在する場合には、カリエスや歯周病の原因菌として作用をするが、低濃度で存在する場合には、歯髓細胞の象牙芽細胞または骨芽細胞への分化を促進することを見出した。そこで、*S. mutans* および／または *P. gingivalis* を低濃度含む硬組織再生治療用組成物を得て、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、次の(1)～(8)の硬組織再生治療用組成物等に関する。

(1) *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む硬

組織再生治療用組成物。

(2) *S. mutans* および／または *P. gingivalis* が菌体破砕物である上記 (1) に記載の硬組織再生治療用組成物。

(3) *S. mutans* および／または *P. gingivalis* の菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ 未満である上記 (1) または (2) に記載の硬組織再生治療用組成物。

(4) 象牙質および／または歯周組織の再生に用いる上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の硬組織再生治療用組成物。

(5) 上記 (1) ~ (4) のいずれかに記載の硬組織再生治療用組成物を有効成分として含む歯髄覆罩剤。

(6) 上記 (1) ~ (4) のいずれかに記載の硬組織再生治療用組成物を有効成分として含む骨組織の再生用治療剤。

(7) *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む細胞の分化促進用組成物。

(8) *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む細胞のアルカリフォスファターゼ（以下、ALPとする）活性向上用組成物。

発明の効果

[0008] 本発明の硬組織再生治療用組成物によって象牙質および／または歯周組織の再生を行うことで、カリエスや歯周病等の *S. mutans* および／または *P. gingivalis* によって引き起こされる疾病や感染を治療または予防することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] *S. mutans* を含む硬組織再生治療用組成物のALP活性を示した図である（試験例1）。

[図2] *P. gingivalis* を含む硬組織再生治療用組成物のALP活性を示した図である（試験例1）。

[図3] 硬組織再生治療用組成物によるhDPFのBSP発現を示した図である（試験例1）。

発明を実施するための最良の形態

- [0010] 本発明の「硬組織再生治療用組成物」は、*S. mutans*、*P. gingivalis*またはこれらを組合せて含む組成物であり、骨、歯、毛髪、爪等の硬組織の再生に利用できるものであればいずれのものも含まれる。象牙質や歯周組織等の再生に利用できるものであることが特に好ましい。
- [0011] 本発明の「硬組織再生治療用組成物」に含まれる*S. mutans*、*P. gingivalis*は、「硬組織再生治療用組成物」として人体等に投与した場合に安全なものであれば、細菌の寄託機関等に保管されているものや市販されているもの等、いずれのものも用いることができる。また、患者由来の*S. mutans*、*P. gingivalis*を採取して、それ自体を含ませることもできる。
- [0012] 本発明の「硬組織再生治療用組成物」に含まれるこれらの細菌は、「硬組織再生治療用組成物」として効果があるものであれば、生菌でも、破碎等した死菌であっても良いが、安全面において死菌の方がより好ましい。
- [0013] 本発明の「硬組織再生治療用組成物」に含まれるこれらの細菌は、菌体破碎物に含まれるタンパク質の濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満となるように含まれることが好ましく、特に $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の低濃度で含まれることが好ましい。
- [0014] 本発明の「硬組織再生治療用組成物」は、骨、歯、毛髪、爪等の硬組織の再生に用いることができるものであることが好ましく、特に歯髓細胞、歯根膜細胞等に作用し得る、象牙質、歯周組織またはこれらのいずれの再生にも用いることができるものであることが好ましい。
- [0015] 本発明の「硬組織再生治療用組成物」は、歯髓覆罩剤や骨組織の再生用治療剤の有効成分として用いることができる。

この「歯髓覆罩剤」としては、本発明の「硬組織再生治療用組成物」をそのまま用いたもの、または水酸化カルシウム等と組み合わせたもの等が挙げられる。また、「骨組織の再生用治療剤」としては、本発明の「硬組織再生治療用組成物」をそのまま用いたもの、またはコラーゲン、BMPやFGF

などの増殖因子等と組み合わせたもの等が挙げられる。この「骨組織の再生用治療剤」は、骨組織の再生のために、ゲル状にして骨欠損部にシリンジにて注入する方法や、コラーゲンのスポンジなどに浸み込ませて骨欠損部に移植する方法等に用いることができる。

さらに、本発明の「硬組織再生治療用組成物」は、増殖因子等と組合せて、歯周組織再生剤とすることもできる。

これらの「歯髄覆罩剤」や「骨組織の再生用治療剤」等は薬剤としての形態は特に問わないが、一般に知られているゲル剤、保湿剤、増粘剤等と組合せて、軟膏剤、塗布剤として提供することもできる。

[0016] 本発明の「分化促進用組成物」とは、*S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含むものであり、細胞の分化を誘導し、または促進するものであればいずれのものも含まれる。例えば、歯髄細胞の象牙芽細胞または骨芽細胞への分化を促進する *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む組成物が挙げられる。

[0017] 本発明の「ALP活性向上用組成物」とは、*S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含むものであり、細胞のALP活性を向上するものであればいずれのものも含まれる。例えばヒト歯髄由来線維芽細胞（*Human dental pulp-derived fibroblasts*：以下、hDPFとする）のALP活性を向上する *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む組成物が挙げられる。

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

[0018] <硬組織再生治療用組成物の調製>

1. *S. mutans* を含む硬組織再生治療用組成物

以下のa.～d.の工程により *S. mutans* を含む硬組織再生治療用組成物を調製した。

a. Todd Hewit broth (Becton Dickinson

n and Company) に接種した *S. mutans* MT8148 R を、10%CO₂、10%H₂ および 80%N₂ の嫌気条件下で、37℃で 2 日間培養した。

b. 菌体を遠心分離 (10,000×g、20 分間、4℃) によって回収し、PBS (pH7.4) で 2 回洗浄した。

c. 超音波破砕機 (Bioruptor UCD-200T, 株式会社コスモバイオ) を用いて 30 秒の超音波破砕と 1 分のインターバルで 60 分間繰り返し菌体を破砕した。

d. 破砕抽出物を遠心分離 (10,000×g、20 分間、4℃) し、上清を *S. mutans* (菌体破砕物) を含む硬組織再生治療用組成物として用いた。

[0019] 2. *P. gingivalis* を含む硬組織再生治療用組成物

以下の a. ~ d. の工程により *P. gingivalis* を含む硬組織再生治療用組成物を調製した。

a. *P. gingivalis* ATCC 33277 を、ヘミン (5mg/ml)、メナジオン (0.5mg/ml) および 10% 脱線維素ウマ血液を添加したトリプティックソイ培地 (Tryptic Soy broth) に接種し、10%CO₂、10%H₂ および 80%N₂ の嫌気条件下で、37℃で 2 日間培養した。

b. 菌体を遠心分離 (10,000×g、20 分間、4℃) によって回収し、PBS (pH7.4) で 2 回洗浄した。

c. 超音波破砕機 (Branson, Danbury, CT, USA) を用いて出力 100W、30 秒の超音波破砕と 1 分間のインターバルで 5 分間繰り返し菌体を破砕した。

d. 破砕抽出物を遠心分離 (10,000×g、20 分間、4℃) し、上清を *P. gingivalis* (菌体破砕物) を含む硬組織再生治療用組成物として用いた。

[0020] [試験例 1]

<硬組織再生治療用組成物の検討>

1. 試料

1) 硬組織再生治療用組成物

実施例1において調製した各硬組織再生治療用組成物における菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度をプロテインアッセイキット (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて調べ、菌体破砕物に含まれるタンパク質の最終濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ または $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製して用いた。

2) リポポリサッカリド (Lipopolysaccharide: LPS)

比較試料として大腸菌 O55 が産生した LPS を用いた。LPS 濃度が $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ または $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製して用いた。

[0021] 3) hDPF 以下の a. ~ e. の工程により hDPF を調製した。

a. 歯列矯正術を受けている3人の患者から、矯正治療中に hDPF が含まれている下顎の3番目の臼歯を抜歯し hDPF を採取した。

b. 歯髓組織を歯から分離し、 1mm^3 以下の小片に細分化した。それから、 $60\text{U}/\text{ml}$ のディスパーゼ II (合同酒精株式会社) および $2\text{mg}/\text{ml}$ のコラゲナーゼ (和光純薬工業株式会社) を含む HBS 溶液 (Hank's Balanced Salt Solution) で、 37°C で20分間酵素処理した。

c. 少量の組織を 10cm 培養皿に入れ、 10% FCS 血清 (JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA)、グルタミン (Gibco, Invitrogen)、 $100\text{U}/\text{ml}$ のペニシリン・ストレプトマイシン (Gibco, Invitrogen) および $100\mu\text{M}$ アスコルビン酸を添加した α -MEM 培地 (和光純薬工業株式会社) を含む増殖培地で培養した。

d. 組織から這い出した細胞を培養し、3日ごとに培地を交換し、継代培養

されたhDPFの形態を位相差顕微鏡で観察した。

e. コンフレントになった細胞を0.05%のトリプシンおよび0.02% EDTAで剥離し、継代培養を行い、2代目のhDPFを試験に用いた。

[0022] 2. 試験および結果

1) 細胞増殖

細胞カウントキット-8 (WST-8; Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて細胞増殖を測定した。即ち継代2代目のhDPFを $1 \times 10^3 \text{ cells/well}$ (12well) となるように培養皿に播種し、本発明の硬組織再生治療用組成物またはLPSをそれぞれ添加した完全培地で培養を行った。また、硬組織再生治療用組成物またはLPSを添加しないhDPFをコントロールとして、培養を行った。培養14日目、28日目の細胞数をWST-8 kit (キシダ化学株式会社) を用い、吸光度450nm (SmartSpec™ 3000, BIO-RAD) で測定後、細胞数を算定することで調べた。

その結果、S. Mutans またはP. gingivalisを含む硬組織再生治療用組成物では、コントロールに比べて細胞の増殖が少なかった。特に、P. gingivalisを含む硬組織再生治療用組成物では、菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ と高濃度のものにおいて、有意に細胞の増殖が少なかった。

LPSを用いた場合にはいずれもコントロールと同様に細胞が増殖したことから、本発明のS. Mutans またはP. gingivalisを含む硬組織再生治療用組成物においてhDPFの増殖が抑制されたのは、菌体破砕液中のLPSの関与によるものではないことが示唆された。

[0023] 2) ALP活性

継代2代目のhDPFを $3 \times 10^3 \text{ cells/well}$ (12well) となるように培養皿に播種し、本発明の硬組織再生治療用組成物またはLPSをそれぞれ添加した増殖培地で培養を行った。また、硬組織再生治療用組成物またはLPSを添加しないhDPFをコントロールとして、培養を行っ

た。培養14日目、28日目のALP活性を、SIGMA-FADTr-nitrophenyl Phosphate tablet sets (Sigma, St. Louis, Mo, USA)を用いて吸光度405nm (SmartSpeck™ 3000, BIO-RAD)で酵素反応を調べることによって定量した。

[0024] その結果、図1に示したように、S. mutansを含む硬組織再生治療用組成物では、菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が10 μ g/mlのものが、コントロールまたは菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が100 μ g/mlと高濃度であるものと比べて有意にALP活性が高かった。菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が1 μ g/ml、0.1 μ g/mlまたは0.01 μ g/mlのものもこれらに比べてALP活性が高いことから、低濃度のS. mutansを含む硬組織再生治療用組成物がhDPFに作用することで象牙芽細胞または骨芽細胞への分化を促進し、象牙質の再生に働くことが示唆された。

また、図2に示したように、P. gingivalisを含む硬組織再生治療用組成物を用いた場合には、菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が0.01 μ g/mlのものが、コントロールまたは菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が100 μ g/mlと高濃度であるものと比べて有意にALP活性が高かった。菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が10 μ g/ml、1 μ g/mlまたは0.1 μ g/mlのものもこれらに比べてALP活性が高いことから、低濃度のP. gingivalisを含む硬組織再生治療用組成物も、hDPFに作用することで象牙芽細胞または骨芽細胞への分化を促進し、象牙質の再生に働くことが示唆された。

[0025] 3) 硬組織形成細胞マーカー遺伝子の発現確認

上記2. 2)において、ALP活性の増加がみられた菌体破砕物に含まれるタンパクの最終濃度が1 μ g/mlとなるように調製したS. mutansを含む硬組織再生治療用組成物、菌体破砕物に含まれるタンパクの最終濃度が0.01 μ g/mlとなるように調製したP. gingivalisを

含む硬組織再生治療用組成物をそれぞれ添加した増殖培地で、継代2代目のhDPFを10日間培養し、硬組織形成細胞マーカーであるbone sialoprotein (BSP) のmRNAの発現を調べた。硬組織再生治療用組成物を添加しないhDPFをコントロールとした。

培養後の各細胞からRNAを、トライゾール溶液 (invitrogen) を用いて抽出し、SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) によってcDNAに変換した。その後、Ex Taq DNA polymerase (Takara), と20mM primers (配列表配列番号1、2) によって増幅し、BSPのmRNAの発現量を比較解析した。

[0026] その結果、菌体破砕液を添加していない細胞においては、BSPの発現がみられなかったが、菌体破砕物に含まれるタンパクの最終濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製したS. mutansを含む硬組織再生治療用組成物、または菌体破砕物に含まれるタンパクの最終濃度が $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調製したP. gingivalisを含む硬組織再生治療用組成物を用いた場合には、図3に示すようにBSPの発現が増加することが示された。

従って、この結果より、本発明のS. mutansを含む硬組織再生治療用組成物およびP. gingivalisを含む硬組織再生治療用組成物がhDPFに作用することで象牙芽細胞または骨芽細胞への分化を促進し、象牙質の再生に働くことが示唆された。

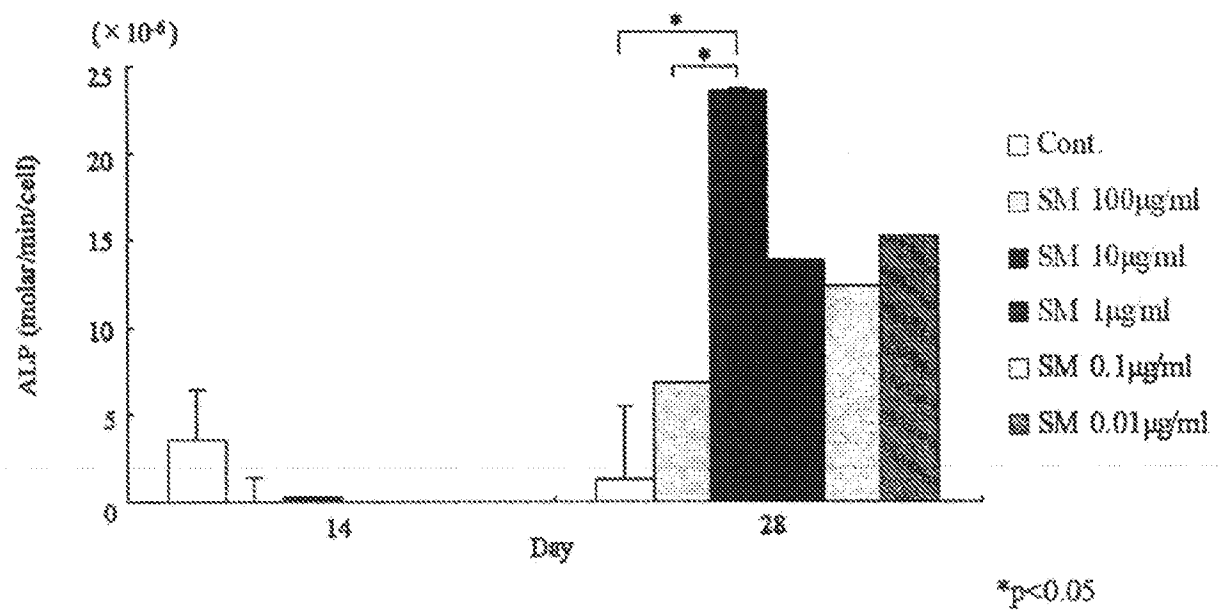
産業上の利用可能性

[0027] 本発明の硬組織再生治療用組成物は象牙質および／または歯周組織の再生に働くことから、歯髄覆罩剤や骨組織の再生用治療剤の有効成分として利用することができる。

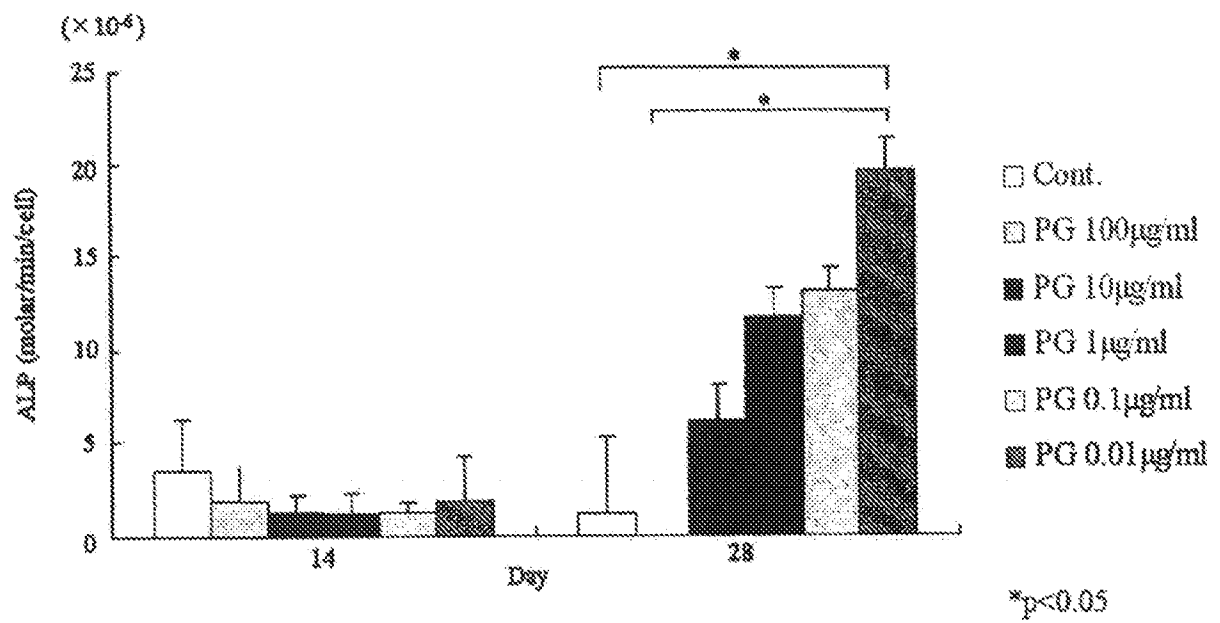
請求の範囲

- [請求項1] *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む硬組織再生治療用組成物。
- [請求項2] *S. mutans* および／または *P. gingivalis* が菌体破砕物である請求項1に記載の硬組織再生治療用組成物。
- [請求項3] *S. mutans* および／または *P. gingivalis* の菌体破砕物に含まれるタンパク質の濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満である請求項1または2に記載の硬組織再生治療用組成物。
- [請求項4] 象牙質および／または歯周組織の再生に用いる請求項1～3のいずれかに記載の硬組織再生治療用組成物。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれかに記載の硬組織再生治療用組成物を有効成分として含む歯髄覆罩剤。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれかに記載の硬組織再生治療用組成物を有効成分として含む骨組織の再生用治療剤。
- [請求項7] *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む細胞の分化促進用組成物。
- [請求項8] *S. mutans* および／または *P. gingivalis* を含む細胞のアルカリフォスファターゼ（ALP）活性向上用組成物。

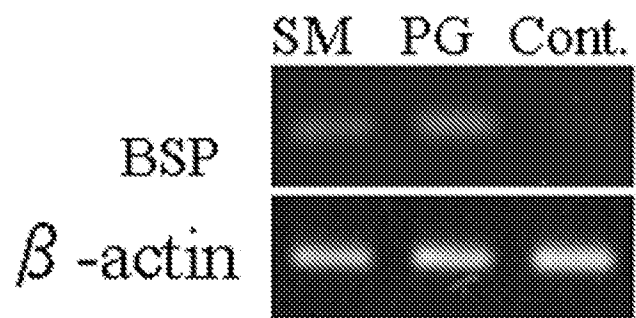
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/003530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/74(2006.01)i, A61K6/00(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P43/00(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)

A61K35/74, A61K6/00, A61L27/00, A61P43/00

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus (JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ROBERTS, H.C. et al, Lipopolysaccharide alters decorin and biglycan synthesis in rat alveolar bone osteoblasts: consequences for bone repair during periodontal disease, Eur J Oral Sci, 2008.06, Vol.116, No.3, p.207-16	1-8
A	KADONO, H. et al, Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from Porphyromonas gingivalis, Infect Immun, 1999, Vol.67, No.6, p.2841-6	1-8
A	LOOMER, P.M. et al, Direct effects of metabolic products and sonicated extracts of Porphyromonas gingivalis 2561 on osteogenesis in vitro, Infect Immun, 1994, Vol.62, No.4, p.1289-97	1-8

☒ 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
04 September, 2009 (04.09.09)

Date of mailing of the international search report
15 September, 2009 (15.09.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/003530

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MURATA, T. et al, Extracts of Prevotella intermedia and Actinobacillus actinomycetemcomitans inhibit alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro, Oral Dis, 1997, Vol.3, No.2, p.106-12	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/74(2006.01)i, A61K6/00(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P43/00(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 (I P C))

Int.Cl. A61K35/74, A61K6/00, A61L27/00, A61P43/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 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)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)
PubMed

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
A	ROBERTS, H. C. et al, Lipopolysaccharide alters decorin and biglycan synthesis in rat alveolar bone osteoblasts: consequences for bone repair during periodontal disease, Eur J Oral Sci, 2008.06, Vol.116, No.3, p.207-16	1-8
A	KADONO, H. et al, Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from Porphyromonas gingivalis, Infect Immun, 1999, Vol.67, No.6, p.2841-6	1-8

☒ 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

0 4 . 0 9 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

1 5 . 0 9 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

川口 裕美子

4 C

9 8 2 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

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
A	LOOMER, P. M. et al, Direct effects of metabolic products and sonicated extracts of <i>Porphyromonas gingivalis</i> 2561 on osteogenesis in vitro, <i>Infect Immun</i> , 1994, Vol.62, No.4, p.1289-97	1-8
A	MURATA, T. et al, Extracts of <i>Prevotella intermedia</i> and <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> inhibit alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro, <i>Oral Dis</i> , 1997, Vol.3, No.2, p.106-12	1-8