

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006 年 4 月 13 日 (13.04.2006)

PCT

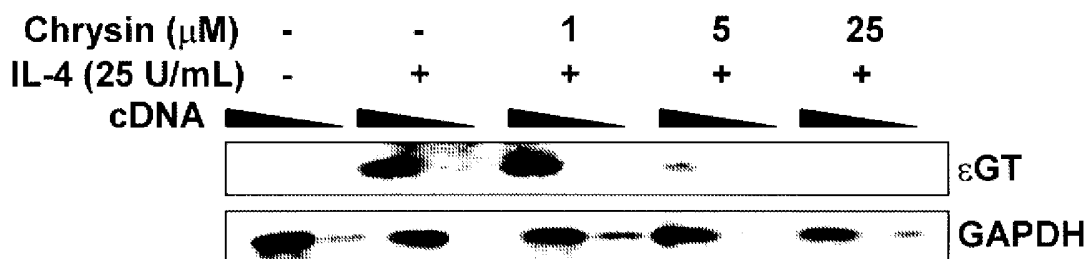
(10) 国際公開番号
WO 2006/038656 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/352 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) C07D 311/30 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/018451
- (22) 国際出願日: 2005 年 10 月 5 日 (05.10.2005)
- (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2004-292500 2004 年 10 月 5 日 (05.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人 九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY) [JP/JP];
〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目 1 0 番 1 号
Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 立花 宏文
(TACHIBANA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県
福岡市東区箱崎六丁目 1 0 番 1 号 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, ICHIO et al.); 〒
1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大
手町ビル 2 0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所 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, 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, 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),
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
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

[続葉有]

(54) Title: ALLERGY SUPPRESSANT

(54) 発明の名称: アレルギー抑制剤



(57) **Abstract:** It is intended to provide a novel agent/composition wherein a bioregulatory function of a food component is utilized. Namely, an allergy suppressant containing chrysin, more specifically speaking, a histamine release inhibitor containing chrysin; a composition containing chrysin which is to be used in treating a disease or conditions relating to IgE production; a composition containing chrysin which is to be used in treating a disease or conditions relating to an IgE receptor with a high affinity; and a composition containing chrysin which is to be used in treating a disease or conditions relating to the overproduction of IL-4. It is preferable that the allergy suppressant, the histamine inhibitor or the composition as described above further contains apigenin.

(57) 要約: 食品成分の生体調節機能を利用した新たな剤・組成物を提供する。 クリシンを含むアレルギー抑制剤、詳細には、クリシンを含むヒスタミン放出阻害剤; クリシンを含む組成物であって、IgE産生に関連する疾患又は状態を処置するための組成物; クリシンを含む組成物であって、高親和性IgE受容体に関連する疾患又は状態を処置するための組成物; 及びクリシンを含む組成物であって、IL-4の過剰産生に関連する疾患又は状態を処置するための組成物を提供する。本発明のアレルギー抑制剤、ヒスタミン阻害剤又は組成物は、さらにアピゲニンを含むことが好ましい。



WO 2006/038656 A1



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。

明 細 書

アレルギー抑制剤

技術分野

- [0001] 本発明は、クリシンを含むアレルギー抑制剤に関する。本発明の剤は、飲料を含む食品、又は医薬品の形態とすることができる。

背景技術

- [0002] アレルギーの介在している疾患は数多い。主なものとしては、花粉症、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、じんましん、膠原病、過敏性肺臓炎、免疫不全などがある。日本人の1/3が何らかのアレルギー症状に悩んでいるとも言われ、効果的な治療方法が切望されている。
- [0003] 近年、アレルギー症状の改善に役立つとされる天然物由来の有効成分を含む食品等が続々と登場してきている。例えば、特定の乳酸菌を使ったヨーグルト、ペパーミントに含まれるミントポリフェノールを配合した飲料、トマトの果皮に含まれるポリフェノール、ナリンゲニカルコンを配合した錠剤タイプの健康食品やドリンク剤などである。天然物由来の有効成分は、合成薬に比較して自然で安心感がある点で、日常的に利用する際に抵抗が少なく、また、繰り返し摂取することによって、不快な症状を対処的に和らげるのみならずアレルギー体質自体を改善する効果が期待できるなどの理由から、注目を集めている。
- [0004] 天然物由来のフラボノイドやポリフェノールの抗アレルギー効果に関しては、いくつかの報告がある。
- [0005] 特許文献1は、摘果作業が行われる時期に採取される未熟果実由来のポリフェノール混合物を開示する。この果実ポリフェノール混合物は、単純ポリフェノール化合物としてカフェー酸誘導体、p-クマル酸誘導体、フラバン-3-オール類(カテキン類)、フラボノール類(ケルセチン配糖体類)、ジヒドロカルコン類(フロレチン配糖体類)など、また高分子ポリフェノール化合物として縮合型タンニン類などによりその組成の大部分が占められており、よって、酸化防止剤、血圧降下剤、抗変異原性作用剤、アレルギー抑制剤、抗う触剤、消臭剤として有効であるとされている。

- [0006] 特許文献2は、茶葉由来のテアフラビンモノガレートA、テアフラビンモノガレートB及びテアフラビンジガレートの中から選ばれた少なくとも1種の物質を有効成分として含むヒアルロニダーゼ活性阻害剤を開示する。ヒアルロニダーゼは起炎症剤としての作用を有し、また抗炎症剤や抗アレルギー剤により活性が阻害されることから、これらの有効成分によりヒアルロニダーゼ活性を阻害して、各種炎症やアレルギーを軽減できるとされている。同様に茶葉由来の物質に関するものとして、特許文献3は、茶葉の水系溶剤抽出物のポリフェノール画分から分離・採取された3-O-メチルガロイルエピガロカテキン及び／又は4-O-メチルガロイルエピガロカテキンを有効成分として含有する抗アレルギー剤を開示する。これらのカテキン類は、I型及びIV型アレルギー反応を抑制するとされている。また、特許文献4は、茶葉を水系溶剤で抽出して得られるポリフェノール画分から分離、採取することができるストリクチニン及びそのメチル化誘導体の中から選ばれた少なくとも1種のポリフェノールを有効成分として含有することを特徴とする抗アレルギー剤を開示する。この有効成分は、IgE産生抑制効果を指標にスクリーニングを行うことにより見いだされたものである。
- [0007] さらに、特許文献5は、アカメガシワの果皮の抽出成分であるフロログルシノール誘導体を含む、抗アレルギー剤及び抗炎症剤を開示する。この有効成分は、ヒスタミン遊離抑制効果及びプロスタグランジンE2産生抑制効果があるとされている。
- [0008] 特許文献6は、シソ科植物から抽出された抽出物がTNF産生を特異的に抑制するとの知見をもとに、シソ科植物の有機溶剤による抽出物を配合したことを特徴とする抗アレルギー化粧料組成物を開示する。この組成物は、免疫機能抑制作用、I型疾患モデルに対する抗アレルギー効果及びアトピー性皮膚炎に対して効果を奏するとされている。同様に、シソ由来の物質に関するものとして、特許文献7は、シソ沸騰水抽出物から得られ、肥満細胞脱顆粒阻害活性を有し、糖及びアミノ酸を構成要素として含む分子量13,500、比旋光度 $[\alpha]_D^{25} (0.25, H_2O) = -0.4$ 、褐色の物質であることを特徴とする抗アレルギー物質を開示する。さらに特許文献8は、シソ種子のアルコール抽出物由来の、アピゲニン、クリソエリオール、ルテオリン及びロスマリン酸から選ばれる1種又は2種以上を含むヒスタミン遊離抑制剤を開示する。このヒスタミン遊離抑制剤は、I型アレルギーの発症過程において、感作細胞からヒスタミンを遊離させにくくするこ

とから、アレルギー性疾患を効果的に治療及び予防することができるとされている。

[0009] アピゲニン、ルテオリンは、他の植物にも見いだされている。特許文献9は、有効成分として、ルテオリン、アピゲニン及びアピゲニン-7-O-グルコシドよりなる群より選ばれる少なくとも1種の化合物を含有するツリフネソウの花弁の抽出エキスを含有する抗アレルギー組成物を開示する。この組成物は、アトピー性皮膚疾患、花粉症、食物アレルギー、じんましん等の炎症性及びアレルギー性の皮膚疾患等における激しい痒みを抑制する効果があるとされている。また、ここでは有効成分が、肥満細胞からのヒスタミン遊離剤による痒みの惹起に対して顕著な抑制効果を示したことから、有効成分の抗痒み作用のメカニズムの一つは脱顆粒抑制であると考察されている。

[0010] 一方、ハチミツやプロポリスに含まれるフラボノイドに関する報告がいくつかある。ハチミツは、p-ヒドロキシ安息香酸、p-クマル酸、シス, トランス-アブシス酸、桂皮酸、ピノバンクシン、ピノセンブリン及びクリシン等を含んでおり、また抗酸化作用等を有することが報告されている(例えば、非特許文献1～4参照)。また、クリシンに関しては、アンドロステジオンやテストステロン等をエストロゲンに変換するアロマターゼの働きを抑える作用があることが分かっており、ホルモンバランスを改善するためのサプリメントとして市販されている。

[0011] しかしながら、ハチミツは、アレルギーとの関連ではハチミツアレルギーに関する研究が中心であり、症状の改善を指向する研究としては、ハチミツと蜜ろうとオリーブ油との混合物が局所投与した際にアトピー性皮膚炎及び尋常性乾癬に有用であったとの報告(非特許文献5)が認められるにすぎず、又はハチミツの特定の成分に抗アレルギー作用が認められたとの報告はない。

特許文献1: 特開平7-285876号公報(特許第3521155号公報)又は特開2002-47196号公報

特許文献2: 特許第3242997号公報

特許文献3: 特開2000-159670号公報

特許文献4: 特開2002-12545

特許文献5: 特開2003-73265

特許文献6: 特開平6-293652号公報

特許文献7:特開平9-20672号公報(特許第3071669号公報)

特許文献8:特開平2000-86510号公報

特許文献9:特開2001-278796号公報

非特許文献1:Nele Gheldof et al: J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 5870-5877

非特許文献2:Jed W. Fahey et al: J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 7472-7476

非特許文献3:Lihu Yao et al: J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 210-214

非特許文献4:Jed W. Fahey et al: J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 7472-7476

非特許文献5:Al-Waili NS.: Complement Ther Med. 2003 Dec; 11(4): 226-34

発明の概要

- [0012] 本発明者は、食品成分の生体調節機能に関する研究を行ってきた。そしてハチミツに抗アレルギー作用があるとの知見を得、更に詳細な研究を行った結果、抗アレルギー剤として有効な成分クリシンを特定し、本発明を完成するに至った。

図面の簡単な説明

- [0013] [図1]図1は、IgE重鎖胚型転写(ϵ GT)に対するクリシンの抑制効果を示す。ヒト成熟B細胞株DND39細胞にIL-4(25 U/ml)及び各濃度のクリシンを添加し、48時間培養した。細胞からmRNAを回収してcDNAを合成し、RT-PCRで増幅した産物をアガロースゲル電気泳動により分離し、膜に転写して ϵ GTを検出した。GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)をコントロールとした。各濃度、コントロールとも、右側のプロットは1/10量についてのものである。

[図2]図2は、STAT6のリン酸化に対するクリシンの抑制効果を示す。DND39細胞をIL-4 (100 U/ml)及び各濃度のクリシンで処理した後、細胞を溶解した。細胞溶解物を抗STAT6抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降物を8% SDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜に転写してリン酸化STAT6を検出した。

[図3]図3は、高親和性IgE受容体($Fc \epsilon$ RI)発現のクリシンによる低下を示す。抗ヒト $Fc \epsilon$ RI抗体(CRA1)を用いて、ヒト好塩基球様細胞株KU812細胞表面上の $Fc \epsilon$ RI発現量をフローサイトメトリーにより解析した。DMSOのみを添加して培養したものと、クリシンを添加して培養したものとを比較した。 $Fc \epsilon$ RI強発現細胞の割合を%で表示した。

[図4]図4は、高親和性IgE受容体($Fc \epsilon$ RI)を構成するタンパク質の発現に対するクリ

シンの抑制効果を示す。Fc ϵ RI α 、 γ 鎖のそれぞれのタンパク質発現を、クリシンを添加して培養した細胞を回収して溶解し、抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降物をSDS-PAGE後、ブロッティングすることにより検出した。 β -アクチンをコントロールとした。

[図5]図5は、高親和性IgE受容体(Fc ϵ RI)構成タンパク質のmRNA転写に対するクリシンの抑制効果を示す。タンパク質発現量Fc ϵ RI α 及び γ 鎖のmRNA発現は、RT-PCR及び特異的プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションにより検出した。G3PDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)をコントロールとした。

[図6]図6は、クリシンの経口投与STAT6のリン酸化抑制効果を示す。クリシンを連続的に経口投与したマウスの脾臓から回収した脾臓リンパ球を、LPS又はLPS + IL-4(500 U/mL)で刺激し、抗STAT6 抗体を用いた免疫沈降及びimmunoblot法によりリン酸化STAT6を検出した。

[図7]図7は、ヒト末梢血好塩基球のFc ϵ RI構成鎖のmRNA発現レベルに対するクリシンの影響を示す。ドナーの静脈から採取した末梢血好塩基球(1×10^6 cells/mL)を、25 M クリシン又はジメチルスルフォキシド(DMSO)を添加した培地で24時間培養後、RNAを抽出し、Fc ϵ RI α 、 γ 鎖のmRNA発現レベルをRT-PCR法により検討した。

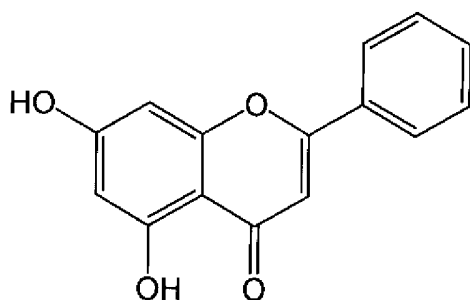
[図8]図8は、ヒト好塩基球のヒスタミン放出に及ぼすクリシンの影響を示す。ヒト好塩基球細胞株KU812細胞(5×10^5 cells/mL)を25 μ M クリシン添加1 mM CaCl_2 含有Tyrode bufferでインキュベート後、A23187で刺激した。細胞外に放出されたヒスタミン、及び細胞内ヒスタミン蓄積量を測定し、ヒスタミン放出率を求め、クリシンを添加しないコントロールの系と比較した。

発明の開示

[0014] 本発明は、クリシンを含有する、アレルギー抑制剤、特にI型アレルギーの抑制剤を提供する。

[0015] クリシン(5, 7-ジヒドロキシフラボン)は、以下の構造を有する。

[0016] [化1]



- [0017] 本発明に用いるクリシンは、ハチミツ、ニンジン種子、ある種の樹木等のクリシンを含む天然物から調製することができる。
- [0018] 本明細書で「アレルギー」というときは、特別な場合を除き、本発明の分野における通常の意味で用いている。すなわち、本明細書でいう「アレルギー」は、特別な場合を除き、免疫反応に基づく生体に対する全身的又は局所的な傷害と定義することができる。これには、血中抗体による液性免疫反応に基づくアレルギー（I、II、III型アレルギー）と感作リンパ球による細胞性免疫に基づくアレルギー（IV型アレルギー）とを含む。「アレルギー」又は「アレルギー疾患」には、アトピー性皮膚炎、花粉症、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、気管支喘息、じんましん、膠原病、過敏性肺臓炎、アナフィラキシー、食物アレルギー、薬物アレルギー、ダニアレルギー、金属アレルギー、動物アレルギーが含まれる。
- [0019] アレルギー疾患が発症する機序は、液性免疫反応では、(1)アレルギーと免疫担当細胞（抗原提示細胞）との接触、(2)抗原提示細胞、T、B細胞協調作用によるサイトカイン等を介した抗体産生、(3)抗原・抗体反応によるエフェクター細胞の活性化、(4)エフェクター細胞からのヒスタミン等のケミカルメディエーター、サイトカイン等の放出、(5)臓器でのアレルギー反応の出現、の順に進む。また、細胞性免疫反応では、(1)抗原によるT細胞の感作、(2)感作T細胞と抗原との結合、(3)感作T細胞からのサイトカイン、ケモカインの産生、それらによる他の細胞の活性化とさらなるサイトカインの産生、(4)臓器でのアレルギー反応の出現、の順に進む。いずれの段階を調節するかにかかわらず、クリシンをアレルギーの抑制用途に用いている限り、本発明のクリシンを含むアレルギー抑制剤の範囲に含まれる。
- [0020] 本発明者の詳細な検討によると、クリシンにより、液性免疫反応に基づくアレルギー

反応の初期的な段階、具体的には、クリシンにより、少なくとも、IL-4誘導性IgE重鎖胚型転写段階、STAT6リン酸化段階、細胞表面上の高親和性IgE受容体発現段階、高親和性IgE受容体を構成する α 鎖又は γ 鎖発現段階、高親和性IgE受容体の転写段階が調節されることがわかった。したがって、本発明のアレルギー抑制剤は、特に液性免疫反応に基づくアレルギー(I、II、III型アレルギー)に対して、とりわけI型アレルギーに対して有効に用いる。さらに、クリシンは、ヒスタミン放出抑制阻害剤の有効成分として用いるほか、上述のいずれかの段階を調節することが効果的な様々な疾患又は状態の処置のためにも有効に用いる。

[0021] したがって、本発明はまた、以下のものを提供する：

- 1) クリシンを含むヒスタミン放出阻害剤；
- 2) クリシンを含む組成物であって、IgE産生に関連する疾患又は状態を処置するための(より詳細には、IL-4誘導性IgE重鎖胚型転写に関連する疾患又は状態を処置するための、そしてSTAT6リン酸化に関連する疾患又は状態を処置するための)組成物；
- 3) クリシンを含む組成物であって、高親和性IgE受容体に関連する疾患又は状態を処置するための(より詳細には、細胞表面上の高親和性IgE受容体に関連する疾患又は状態を処置するための、高親和性IgE受容体を構成する α 鎖又は γ 鎖に関連する疾患又は状態を処置するための、そして高親和性IgE受容体の転写に関連する疾患又は状態を処置するための)組成物；及び
- 4) クリシンを含む組成物であって、IL-4の過剰産生に関連する疾患又は状態を処置するための組成物。

[0022] 本明細書において、本発明の剤又は組成物に関し、アレルギーを「抑制(する)」というとき、及びある疾患又は状態を「処置(する)」というときは、そのアレルギー又はその疾患若しくは状態(以下、単に「アレルギー等」という。)を予防若しくは治療すること、アレルギー等を軽度を抑えること、又はアレルギー等の進行を抑えることを意味する。「抑制」及び「処置」には、症状を抑える対症的治療と、過敏性の低減又は体質改善などの根本的な治療とが含まれ、また即時的な治療と長期的な予防及び／又は治療とが含まれ、さらにアレルギー等が現れた後にそれ以降の新たな関連症状を予

防することが含まれる。

- [0023] 本発明の剤又は組成物は、アレルギー等を抑制又は処置するため、対象者、疾患等の状態、目的等に応じて適宜用いる。クリシンのIgE産生抑制作用により、本発明の剤又は組成物には、アレルギー等の予防効果と長期的な治療効果とを期待しうるから、このような目的で用いる場合は、本発明の剤又は組成物を、アレルギー等の発症前又は低い時期に、継続的に用いることが好ましいであろう。
- [0024] そして、IgEには高親和性IgE受容体の発現を増大・維持させる働きがあることから、IgEレベルの低下は高親和性IgE受容体発現レベルの抑制に寄与しうる。高親和性IgE受容体発現の抑制作用により、本発明の剤又は組成物には、即時的なアレルギー抑制効果と長期的なアレルギー予防効果を期待しうる。即時的なアレルギー抑制効果を目的とする場合には、本発明の剤又は組成物は、アレルギー等の発症時又はその後を用いることができる。この場合、本発明の剤又は組成物は、それ以降の新たなアレルギー等の発症を防ぐ作用を発揮しうる。長期的な予防効果を目的とする場合には、本発明の剤又は組成物を、アレルギー等の発症前又は低い時期に、継続的に用いることができる。継続的に用いることにより、対象者において常に高親和性IgE受容体の発現を低レベルに維持することができ、対象者のアレルゲンに対する感受性を低下させることが期待できる。
- [0025] 本明細書で本発明の剤又は組成物の用い方に関し、「継続的」というときは、一定期間(例えば、数日間、数週間、数ヶ月間、数年間)に複数回用いることを指し、連続する日に用いる場合のほか、特定の間隔毎に又は不特定の間隔で不連続的に用いる場合をも含む。クリシンは、本発明者の検討によれば、不連続に低用量で用いる場合であっても、IL-4誘導性のSTAT6リン酸化に対する抑制効果を発揮しうる(実施例3参照)。
- [0026] 本明細書でいう「剤」又は「組成物」は、医薬の形態とすることができる。クリシンは、上述したように、不連続に低用量で用いる場合であっても、IL-4誘導性のSTAT6リン酸化に対する阻害効果を発揮しうるものであるから、本発明の剤又は組成物は、比較的自由に摂取することができる。したがって、本発明の剤又は組成物は、医薬以外の形態(例えば、食品又は飲料等)とすることができる。

- [0027] 本発明の剤又は組成物には、その具体的な用途(例えば、予防のため、アレルギーに対する過敏性改善のため、体質改善のため、長期的な治療のため、等。あるいは、ヒスタミン放出阻害のため、IgE産生抑制のため、IL-4誘導性IgE重鎖胚型転写を抑制するため、STAT6リン酸化を抑制するため、高親和性IgE受容体発現を抑制するため、細胞表面上の高親和性IgE受容体の発現を抑制するため、高親和性IgE受容体を構成する α 鎖又は γ 鎖の発現を抑制するため、高親和性IgE受容体の転写を抑制するため、等)、及び/又はその具体的な使い方(例えば、量、回数、継続的に使用すべき旨、期間、等。)を表示することができる。
- [0028] 本発明の剤又は組成物が医薬品である場合、有効成分であるクリシンの量は、目的、症状、対象者の年齢、体重等に応じて適宜とすることができるが、例えば、1日あたり約0.001~1000mg/kg、好ましくは約0.01~100mg/kg、1回~数回に分割して投与することができるように、製剤化することができる。
- [0029] 本発明者の検討によると、抗アレルギー剤としては、クリシンの1.68g/日(成人男性平均体重60kgの場合)以上の経口摂取で効果があることが示された。このような観点からは、本発明の剤又は組成物は、一日当たり約1.68g以上のクリシンの経口投与又は摂取を可能とする剤又は組成物とするといふ。具体的には、一日当たりの経口投与量又は摂取量中に、1.68g以上のクリシンを含む、剤又は組成物とすることができ、また一日当たりの経口投与量又は摂取量中に、28mg/kg以上のクリシンを含む、剤又は組成物とすることができる。より具体的には、一日3回投与する抗アレルギー経口製剤としては、1回分の投与量当たり560mg以上のクリシンを含むものとすることができる。また、一日3個程度の摂取を推奨する抗アレルギー機能を有する食品(飲料も含む)としては、560mg以上のクリシンを含む食品とすることができる。
- [0030] 投与経路、剤形も適宜設計することができ、例えば、全身的な投与のため、又は局所投与のために製剤化することができ、内服剤、外用剤、固形剤、液状製剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、軟膏剤、硬膏剤、ハップ剤、ローション剤、リニメント剤、又は坐剤とすることができる。また、除放化製剤、放出制御型製剤とすることもできる。製剤は、従来の方法にしたがって行うことができ、医薬として許容できる種々の添加物、例えば、附形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、懸濁化剤、乳化剤

、安定剤、保存剤、緩衝剤を用いることができる。

[0031] 本発明の剤又は組成物は、医療用具、医療品部外品の形態とすることができる。また、軟膏、化粧水、ローション、石けん、シャンプー、ウェットティッシュ等に添加し、使用することができる。

[0032] 本発明の剤又は組成物は、化粧品、食品又は飲料の形態とすることができる。有効成分であるクリシンの量は、医薬品である場合に準じて適宜とすることができる。本発明のアレルギー抑制剤を配合された食品又は飲料は、栄養機能食品、特定保健用食品、健康食品、栄養補助食品、インスタント食品、冷凍食品、ドリンク剤等とすることができ、カプセルに封入し、若しくは打錠し、又は菓子類、麺類、スープ類、調味料(マヨネーズ、味噌、醤油、ドレッシング、ソース等)、その他発酵食品、缶詰、動物性食品(ハム・ソーセージ等)、乳製品(ヨーグルト等)、漬け物類、清涼飲料、炭酸飲料、果汁飲料、乳飲料、乳酸飲料、スポーツドリンク等の形態とすることができる。

[0033] 本発明は、また、以下のものを提供する。

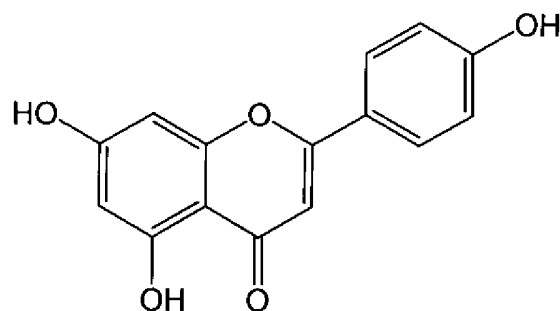
5) アレルギー抑制剤、ヒスタミン放出阻害剤、IgE産生に関連する疾患若しくは状態を処置するための組成物、高親和性IgE受容体に関連する疾患若しくは状態を処置するための組成物、又はIL-4の過剰産生に関連する疾患若しくは状態を処置するための組成物の製造における、クリシンの使用;並びに

6) アレルギーに関連する疾患若しくは状態、ヒスタミン放出に関連する疾患若しくは状態、IgE産生に関連する疾患若しくは状態、高親和性IgE受容体に関連する疾患若しくは状態、又はIL-4の過剰産生に関連する疾患若しくは状態を処置するための方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に対して、処置上有効量のクリシンを投与することを含む、前記方法。

[0034] 本発明の好ましい実施態様では、クリシンはアピゲニンと組み合わせて用いられる。すなわち、本発明は、クリシン及びアピゲニンを含む、医薬又は食品用組成物を提供する。

[0035] アピゲニンは以下の構造を有する。

[0036] [化2]



[0037] 本発明者の詳細な検討によると、ある量のクリシンはKU812細胞のFc ϵ RI発現を抑制しないが、アピゲニンのFc ϵ RI発現抑制作用を増強させた。また、モル比で、クリシン:アピゲニンが1:5であるとき、併用により相乗的なFc ϵ RI発現抑制効果がみられた(実施例8参照)。

[0038] なお、本明細書においては、有効成分としてクリシン及びアピゲニンをを用いた発明について説明してきたが、本発明は、それらの誘導体(例えば、メチル化体、配糖体、グルクロン酸包合体、硫酸包合体)にも適用可能であろう。したがって、そのようなものを本発明と同様の目的で利用した場合も、本発明の範囲に含まれると理解されるべきである。

実施例

[0039] <実施例1:IgE産生に対する抑制(IgE重鎖胚型転写(ϵ GT)の抑制、及びSTAT6のリン酸化の抑制)>

1. 目的

われわれの体は免疫反応により体外から侵入する異物の攻撃から守られているが、時として免疫反応はわれわれの体に対して傷害的に作用する。このような免疫機能に基づく傷害反応はアレルギーと呼ばれるが、近年のアレルギー患者数の増加及び症状の重篤化が著しい。国民の約1/3は花粉症、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎など、なんらかの形でアレルギー疾患に罹患しているといわれるほどである。生体内で起こる免疫反応には、抗体が関与する液性免疫と抗体が関与しない細胞性免疫があり、I型からIII型アレルギー反応は前者に、IV型アレルギー反応は後者に属する。花粉アレルギーなどの環境アレルギーはI型アレルギーにより発症

するが、食物アレルギーではI型アレルギーに加え、II型及びIV型アレルギーの関与が疑われている。アレルゲンが生体内に侵入すると、アレルゲン特異的抗体の産生が誘導されるが、I型アレルギーの発症には特にIgE型の抗体が重要な役割を果たす。B細胞により産生されたIgEはマスト細胞や好塩基球の細胞膜上に存在する高親和性IgE受容体に結合する。そこに、アレルゲン物質が再び侵入してマスト細胞や好塩基球上のIgEを架橋すると、ヒスタミン等のメディエーターが放出され、アレルギーの発症に至る。

- [0040] そこで、アレルギー発症に関与するIgE型抗体、IgE受容体の二つにターゲットを定め、これらの産生や発現に対するクリシンの効果を検討した。
- [0041] IgEは免疫グロブリンの一種であり、即時型アレルギーの発症の鍵となる生体分子である。健常人血清中のIgEの産生(300ng/ml)は、同じ免疫グロブリンであるIgG(15mg/ml)と比較するとごくわずかであるが、アレルギー患者では過剰な産生が観察され、IgEの過剰産生は花粉症や食物アレルギーをはじめとする様々なアレルギー性疾患の発症原因の一つとされている。アレルゲンへの感作により産生されたIgEは、肥満細胞や好塩基球の表面に存在する高親和性のIgEレセプターに結合するが、この状態のもとに再び侵入したアレルゲンがこのIgEに結合するとIgEが架橋されてレセプターが凝集し、細胞内へカルシウムが動員され、細胞膜を介した情報伝達機構が作動し、細胞が活性化されて脱顆粒を起こし、ヒスタミン、好酸球遊走因子及び好中球遊走因子などの薬理学的活性物質が遊離される。これと同時に細胞膜のアラキドン酸カスケードも活性化され、ロイコトリエンやプロスタグランジン、トロンボキサンなどの脂質メディエーターやインターロイキンなどのサイトカインが産生分泌され、これらにより即時型アレルギーが引き起こされる。このようにアレルギー発症において非常に重要な役割を演じるIgE産生を阻害することは、アレルギーの予防や治療の観点において非常に有効である。抗体は重鎖の違いからIgM、IgD、IgG、IgE、IgAの5種類が存在する。重鎖定常領域は免疫グロブリンの生物学的活性(細胞への結合や補体結合能)を発現するための重要な領域である。成熟B細胞にまで分化した直後のB細胞はIgM型の免疫グロブリン分子を産生している。その後、サイトカインに応答可能な状態へと活性化されたB細胞は、サイトカインの刺激に応じて重鎖の可変領域の配列を変

化させることなく、他のクラスの重鎖定常領域に遺伝子を組み換える。この現象はクラススイッチと呼ばれ、IgE型抗体もこの組み換えによってはじめて産生される。IgEクラススイッチではDNAの組み換えに先立ち、IgE重鎖定常領域(C_{ϵ})の上流に存在するI領域から定常領域に至る一次転写物が転写され、スプライシングによりI領域と C_{ϵ} からなるgermline転写物(ϵ GT)が産生される。その後、IgM重鎖定常領域のS領域(C_{μ})と C_{ϵ} のS領域の間のDNA配列は染色体から除かれ、可変領域のすぐ上流に引き寄せられて可変領域のプロモーターから成熟型の C_{ϵ} 転写が起こる。タンパク質に翻訳されることのない ϵ GT発現の役割として、この転写により組み換えの標的となる定常領域付近の染色体構造が開かれ、組み換えが容易になることが考えられている。IgE産生に必須である ϵ GTの発現は、IL-4によって誘導される。このサイトカインはB細胞の膜表面上に発現するそれぞれの受容体に結合し、その受容体を架橋することにより受容体の細胞質側に結合するJAKキナーゼが相互リン酸化され活性化する。活性化されたJAKは受容体をチロシンリン酸化し、そこへ転写因子STAT6がこのチロシンリン酸化残基に結合する。受容体に会合したSTAT6はJAKによりリン酸化され、リン酸化STAT6はホモ二量体を形成し、核内に移行してgermline C_{ϵ} のプロモーター領域に結合し、 ϵ GT発現が誘導される。

[0042] 以上のように、 ϵ GT発現を阻害することはIgE産生の根本的な抑制につながる。ヒト成熟B細胞株DND39はIL-4の刺激により ϵ GTを発現することが知られている。そこで、DND39細胞をIL-4及びクリシン存在下で培養し、 ϵ GT発現に対するクリシンの効果を検討した。

[0043] 2. 材料及び方法:

クリシン:

クリシンはSigma Chemical Co.(St. Louis, MO)より購入した。クリシンはdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、エタノールで10% DMSOとなるように希釈した。

[0044] 細胞及び細胞培養:

ヒト成熟B細胞株DND39は5% FBS (Intergen) 添加RPMI 1640培地(Nissui)にて、37℃、水蒸気飽和した5% CO_2 条件下で継代、維持した。RPMI 1640培地は、100 U/mL ペニシリン (Meiji Seika)、100 mg/mL ストレプトマイシン(Meiji Seika)、12.5 mM Na

HCO₃ (Wako)、10 mM HEPES(Wako)を添加したものを用いた。

[0045] IgE重鎖胚型転写物(ϵ GT)の検出:

DND39細胞を 2×10^5 cells/mLに調整し、IL-4 (25 U/mL)及び各濃度のクリシン存在下で48時間培養した。 1×10^7 cellsを超えない細胞培養液を15 mLポリプロピレン製の遠心管に回収し、300 x gで遠心、上清除去し、PBSにて一度洗浄した。遠心、上清除去した細胞はRNaseによるRNAの分解を極力抑えるため、次の操作まで氷中で保管した。この細胞にTrizol(Invitrogen, Carlsbad, CA)を1 mL加え、ピペッティングにより塊が見えなくなるまで良く懸濁し、懸濁液を1.5 mLチューブに移して、このチューブを5分間静置した。200 μ Lのクロロホルム(和光純薬)を加えて強く攪拌し、室温で3分間静置したのちに12,000 x g、15分間遠心した。上層450 μ Lを別の1.5 mLチューブに移し、500 μ Lのイソプロパノール(和光純薬)を加えて強く攪拌した後、室温で10分間静置した。12,000 x gで10分間遠心した後、チューブを傾けて上清を除去し、1 mLの75%エタノールを加えて強く攪拌後、12,000 x gで5分間遠心して上清を除いた。回収したtotal RNAはDEPC水 10 μ Lに溶解し、100倍希釈したものを分光光度計Ultrospec3000(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)を用いてRNA濃度を測定した。

[0046] 600 μ Lチューブに10 μ g RNA、0.5 μ gオリゴdT₂₀、20 pmol ϵ GT reverse primer(5'-gAC gCT gAA ggT TTT gTT gTC g-3')を総容量 13.8 μ L となるように添加して70°Cで10分間保温した後、10分間冷却した。10 mM dNTP(Amersham)を2 μ L、5 x bufferを4 μ L、Rnase inhibitor(TAKARA)を0.1 μ L及び25 kU MMLV-逆転写酵素(Amersham)を0.1 μ L、上記の600 μ Lチューブに添加して、37°Cで1時間保温した後、5分間煮沸して酵素を失活させた。合成したcDNAは-20°Cで保存した。GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)をコントロールとして、同様の操作を行った。

[0047] PCRは10 μ L容量で0.5 UのTaq DNA polymerase(Fermentas)を用いて行った。

[0048] PCR反応液中に含まれる試薬は以下通りである。

10 x PCR buffer (1 μ L)、
 25 mM MgCl₂ (1 μ L)、
 2.5 mM dNTPs (0.8 μ L)、
 Taq DNA polymerase (0.1 μ L)、

20 μ M sense primer (0.5 μ L)、
 20 μ M anti-sense primer (0.5 μ L)、
 上記で調製した cDNA (1 μ L)、
 dH₂O (5.1 μ L)。

[0049] また、PCRに使用したプライマーの配列は下記の通りである。

ϵ GT-F : 5'-Agg CTC CAC TgC CCg gCA Cag AAA T-3'、

ϵ GT-R : 5'-Acg gAg gTg gCA TTg gAg ggA Atg T-3'、

G3PDH-F : 5'-gCT Cag ACA CCA Tgg ggA Agg T-3'、

G3PDH-R : 5'-gTg gTg Cag gAg gCA TTg CTg A-3'。

[0050] サーマルサイクラー(Whtman Bometra GmbH, Germany)を用いて94℃で2分の初期変性を行った後、94℃で1分間の変性、60℃で1分間のアニール、72℃で1分間の伸長反応を ϵ GTでは20サイクル、G3PDHでは13サイクル行うことによりcDNAを増幅した。増幅したPCR産物は1.5%アガロースゲル電気泳動により分離し(各濃度、コントロールとも、1/10量についても同様の操作を行った。)、アルカリ変性したのち、キャピラリーブロット法によりHybond-N⁺ 膜(Amersham)に転写した。転写した膜はランダムバッファー(組成: 5 x SSC (SSC; 0.3M Sodium citrate, 3M NaCl, pH7.0) 3 M NaCl, 33mM C₆H₅O₇Na₃·2H₂O, 0.1% SDS, 5% (w/v) Dextran sulfate sodium salt)を用いて2時間、60℃にてプレハイブリし、その後同バッファー 5 mLに対し、事前にオリゴベリング法により調製した ϵ GT-P(1/40)、及びGAPDH-Pを3 μ L ずつ添加し、同じく60℃にて一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーションが終了した膜を取り出し、以下の試薬を加え、超純水でtotal 100mLとなるように調製した洗浄液を用いて下記に示す順序で洗浄した。

1回目; 20 x SSC (5mL)+10% SDS (1mL) : 30min : 60℃、

2回目; 20 x SSC (2mL)+10% SDS (1mL) : 30min : 60℃、

3回目; 20 x SSC (1mL)+10% SDS (1mL) : 60min : 60℃。

[0051] 洗浄が終了したら、膜を bufferA(組成: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 300 mM NaCl)でリンスし、抗体ブロック用ブロッキング試薬(Amersham #1059304)を 1 x bufferAで10倍希釈したものを3 mL加え、室温で2時間振とうし、ブロッキングを行った。その後、0.5

% BSA-bufferAで5000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗フルオレセイン抗体5 mLを加え、同じく室温で1時間振とうして抗体と反応させた。抗体反応終了後、膜を室温で0.67% Tween-bufferAで20 分間ずつ3回振とう洗浄し、最後にbufferAにて軽く洗浄した。この膜をビニールシートにはさみ、CDP-Starを膜1枚あたり200 μ L ずつまんべんなくふりかけて、1分間室温で放置したのちにイメージアナライザーにて ϵ GTの検出を行った。

[0052] リン酸化STAT6の検出:

DND39 細胞を 2×10^6 cells/mLとなるように調整し、IL-4 (100 U/ml)及び各濃度のクリシンを添加し、30 分間処理して細胞を溶解した。細胞溶解物を抗STAT6抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降物を8% SDS-PAGEに供し、ニトロセルロース膜にブロット後、抗チロシンリン酸化抗体 (PY20) にてリン酸化STAT6検出した。

[0053] 3. 結果:

結果を図1及び図2に示した。クリシンは濃度依存的に ϵ GTの発現を抑制し、またSTAT6のリン酸化を抑制した。クリシンは ϵ GT発現をSTAT6のリン酸化レベルで阻害することにより、IgEの産生を根本的に抑制することが分かった。

[0054] <実施例2:ヒト高親和性IgE受容体(Fc ϵ RI)発現の抑制>

1. 目的:

アレルゲンが生体内に侵入すると、アレルゲン特異的抗体の産生が誘導されるが、即時型アレルギーの発症には特にIgE型の抗体が重要な役割を果たす。B細胞により産生されたIgEは肥満細胞及び好塩基球の細胞膜上に存在する高親和性IgE受容体に結合する。そこに、アレルゲン物質が再び侵入して肥満細胞上のIgEを架橋すると、ヒスタミンやロイコトリエン等のメディエーターが放出され、アレルギーの発症に至る。

[0055] Fc ϵ RIは、IgEの関与するアレルギー反応開始段階において鍵となる分子であり、抗原/抗体複合体を介してFc ϵ RIを発現している肥満細胞や好塩基球を活性化するシグナルを駆動する。Fc ϵ RIの活性化はFc ϵ RIの凝集によって惹起される。すなわちFc ϵ RIに結合したIgEが多価抗原などによって架橋され、Fc ϵ RIが凝集することによってシグナル伝達機構が作動することになるが、凝集が可能になるためには、多価

抗原によって架橋可能な距離の範囲内に複数のFc ϵ RIが存在する必要がある。つまり、Fc ϵ RIの数によって細胞のアレルゲンに対する感受性が決まってくる。実際にアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜肥満細胞などでは、Fc ϵ RIの発現が亢進している。

[0056] Fc ϵ RI発現を抑制することは、IgE/Fc ϵ RI複合体により惹起される脱顆粒反応を抑制することにつながり、後に生じるアレルギー炎症等を軽減することが期待できる。ヒト好塩基球細胞株として知られるKU812細胞は、炎症物質ヒスタミン産生細胞であり、細胞表面上に高親和性IgE受容体Fc ϵ RIを発現している。そこで、このKU812細胞を用い、クリシンのFc ϵ RI発現に対する効果を検討した。

[0057] 2. 材料及び方法:

細胞及び細胞培養:

細胞の培養にはRPMI 1640(Nissui, Japan)培地に、100 U/mLペニシリン(Meiji Pharmaceutical Company, Tokyo, Japan)、100mg/mLストレプトマイシン(Meiji Pharmaceutical Company)、12.5mM NaHCO₃(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、10 mM HEPES(Wako Pure Chemical Industries)を添加したものを基本培地として使用した。Fetal bovine serum(FBS)はBio Source Internationalより購入し、基本培地に5 - 10%となるように添加して用いた。本実験に用いたヒト好塩基球様細胞株KU812はJapan Collection of Research Bioresources(JCRB)より分譲されたもので、5 - 10% FBS添加RPMI 1640培地で37(C、5%炭酸ガス加湿下で継代、維持した。

[0058] クリシン:

クリシン(Sigma)はdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、エタノールで10% DMSOとなるように希釈した。

[0059] 細胞表面上Fc ϵ RI発現量の解析:

KU812細胞(1×10^6 cells/mL)を、DMSOに溶解したクリシンを添加したRPMI 1640培地で0 - 24時間培養した。DMSOのみを添加して培養した系をコントロールとした。培養後、細胞を回収し、抗ヒトFc ϵ RI α 鎖マウスモノクローナル抗体CRA-1(Kyokuto Pharmaceutical)を10 μ g/mLとなるように添加した5% FBS-PBS中で4(C、40 - 60分間インキュベートした。ネガティブコントロールとしてマウスコントロールIgG2b抗体(DAKO)を10 μ g/mLで用いた。その後、氷冷PBSで一度洗浄し、抗マウスIgG2b FITC標識

抗体(Protos Immunoresearch)を $10 \mu\text{g/mL}$ となるよう添加した5% FBS-PBS中で4(C、40 - 60分間インキュベートした。インキュベート後、PBSで洗浄し、PBSで再懸濁した細胞懸濁液をフローサイトメトリー解析に共した。フローサイトメトリー解析にはFACSCalibur(Becton Dickinson, Sunnyvale, CA)を使用した。なお、二次抗体反応以降は遮光条件で行い、解析まで氷上で保存した。

[0060] Fc ϵ RIを構成するタンパク質の発現レベルの検討:

KU812細胞(1×10^6 cells/mL)を、クリシンを添加したRPMI 1640培地で6時間無血清培養を行った。培養後、細胞を一度PBSで洗浄後、Lysis buffer(組成:50mM Tris-HCl pH 7.5、1% Triton X-100、150mM NaCl、1mM EDTA、50mM NaF、30mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、1mM PMSF、 $2 \mu\text{g/mL}$ aprotinin、1mM pervanadate)を加え、4(Cで30分間振とうして溶解した。その後、 $12,000 \times g$ 、4(Cで10分間遠心し不溶物を沈殿させ、上清を回収してタンパク定量を行いそれぞれのサンプルのタンパク濃度が等濃度となるようにLysis bufferで希釈し、細胞溶解サンプルとした。

[0061] Protein A Sepharose beads(Amersham Pharmacia Biotech)を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ となるようにCRA-1抗体を添加したLysis buffer(50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 50mM NaF, 30mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1mM PMSF, $2 \mu\text{g/mL}$ aprotinin)で2 - 4時間、4(Cで振とうしてCRA-1抗体を吸着させた。回収後、Lysis bufferで3回洗浄した後、細胞溶解サンプルを加えて4(Cで一晩振とうして免疫沈降を行った。免疫沈降後、Protein A Sepharose beadsを回収し、Lysis buffer及びPBSで3回ずつ洗浄を行った。洗浄後、Protein A Sepharose beadsにSodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer(0.057 M Tris-HCl pH 6.8, 1.8% (w/v) SDS, 0.65 M β -mercaptoethanol, 9.1% glycerol, 0.02% bromophenol blue)を20 - $30 \mu\text{L}$ 加えて、ボルテックスで10分間攪拌して免疫沈降物を溶離し、95(Cで5分間熱変性を行った。また、Fc ϵ RI γ 鎖の検出に使用したサンプルは、細胞溶解物とSodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample bufferが1 : 1となるように調製し、95(Cで5分間熱変性を行った。Fc ϵ RI α 鎖については10% polyacrylamide gelに免疫沈降サンプルを、Fc ϵ RI γ 鎖については15% polyacrylamide gelに細胞溶解サンプルをアプライして、SDS-PAGEを行った。

[0062] SDS-PAGE後、gelは100 V(α 鎖については60分間、 γ 鎖については30分間)でエレクトロブロッティングを行い、タンパク質をニトロセルロース膜に転写した。この膜を終濃度が2%となるようにスキムミルクを添加した0.05% Tween 20-TBS(TTBS)で振とうさせ、室温で30 - 60分間ブロッキング反応を行った。TTBSで洗浄後、0.05 μ g/mL CRA-1及び抗Fc ϵ RI γ 鎖抗体(Upstate biotechnology)を加えて4(Cで一晩反応させた。TTBSで洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体及びHRP標識抗ラットIgG抗体を10000倍希釈して加えて室温で1時間反応させた。抗体を希釈する際は全てブロッキングで使用した2%スキムミルク-TTBSを用いた。TTBSで洗浄後、高感度ECL(ECL Advance Western Blotting Detection Kit)を用いて発色反応を行い、ポラロイドフィルムに感光させて検出を行った。なお、 β -アクチンをコントロールとした。

[0063] mRNA転写レベルの検討:

クリシンを添加したRPMI 1640培地でKU812細胞(1×10^6 cells/mL)を6時間無血清培養した。培養後、細胞を一度PBSで洗浄後、 1×10^7 個の細胞に対し1mLのTrizol(Invitrogen)を加えて速やかに懸濁して完全に溶解させた。室温で5分間静置後、0.2mLのChloroformを添加して激しく転倒攪拌した。室温で3分間静置後、12,000 x g、4(Cで15分間遠心後、上清を450 μ L回収し0.5mLの2-Propanolを添加して激しく転倒攪拌し、室温で10分間静置した。12,000 x g、4(Cで10分間遠心後、上清を除去し、1mLの75% Ethanolで沈殿をリンスした。12,000 x g、4(Cで5分間遠心後、上清をできる限り除去し、沈殿したRNAを10 - 20 μ LのDEPC水に溶解させた。水で50倍希釈した全RNA濃度を260nmの波長を用いて測定し、全てのサンプルの全RNA濃度が10 μ gになるように0.1%ジエチルピロカーボネート(DEPC)水(Sigma)で希釈を行った。

[0064] Complementary DNA(cDNA)合成は10 μ gの全RNAに対し、0.5 μ g/ μ Lの(dT)₂₀プライマーを1.0 μ L加え、70(Cで10分間インキュベートした後直ちに氷冷しアニーリング反応を行った。次に 10mM dNTPを2.0 μ L、RNase inhibitor(Takara)を0.1 μ L、MMLV-逆転写酵素(Amersham Pharmacia Biotech)を0.1 μ L、MMLV-逆転写酵素に添付された5 x bufferを4.0 μ L加え、DEPC水で全量が20 μ Lとなるようにした。この混合液を37(C、1時間インキュベートしcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型にFc ϵ RI α 、 γ 鎖及びグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(G3PDH)特異的プライマー

を用いてPCRを行った。それぞれのセンス並びにアンチセンスプライマーの配列は以下のとおりである。

ヒトFc ϵ RI α 鎖センスプライマー: 5'-CTTAGGATGTGGGTTTCAGAAGT-3'、

アンチセンスプライマー: 5'-GACAGTGGAGAATACAAATGTCA-3'。

ヒトFc ϵ RI γ 鎖センスプライマー: 5'-TAGGGCCAGCTGGTGTTAATGGCA-3'、

アンチセンスプライマー: 5'-GATGATTCCAGCAGTGGTCTTGCT-3'。

ヒトG3PDHセンスプライマー: 5'-GCTCAGACACCATGGGGAAGGT-3'、

アンチセンスプライマー: 5'-GTGGTGCAGGAGGCATTGCTGA-3'。

[0065] PCRの反応液はcDNA 1 μ L、2mM dNTP 0.8 μ L、MgCl₂ 0.6 μ L、20 μ M センスプライマー 0.5 μ L、20 μ M アンチセンスプライマー 0.5 μ L、Taq DNA polymerase (Fermentas) 0.1 μ L、Taq DNA polymeraseに添付された10 x Taq bufferを1 μ L加え、蒸留水で全量10 μ Lとし、この混合液をPCRに供した。PCR反応はGeneAmp PCR System 2400(Parkin-Elmer)を用いて行った。PCRは初期変性を94(Cで2分間行った後、95(Cで1分間、60(Cで1分間、72(Cで1分間を1サイクルとして13-15サイクルで増幅させた。PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動を行い、Southern blot法により増幅DNAの検出を行った。

[0066] まず、電気泳動を行ったゲルを9% NaClを含む0.5 N NaOH溶液中で室温1時間振とうさせた後、0.4 N NaOHを用い5時間以上キャピラリーブロッティングによりDNAをHybond-N⁺メンブレンにブロットした。ブロット後のメンブレンは2 x Saline sodium citrate (SSC; 0.3 M Sodium citrate, 3 M NaCl, pH7.0) で洗浄した。Fc ϵ RI α 、 γ 鎖及びG3PDHのプローブはランダムラベリング法により作製した。まず、RT-PCRにより増幅された目的とするDNAのサブクローニングを行い、DNAシーケンサーにより塩基配列を解析し、サブクローニングしたDNAがそれぞれFc ϵ RI α 、 γ 鎖及びG3PDHに特異的であることを確認した。次に、これらDNAを鋳型としてそれぞれに特異的なプライマーでPCRを行った後、その増幅産物の標識はGene Images random labeling moduleを用い添付のプロトコルに従って行った。PCR産物をブロットしたメンブレンはGene Images random labeling moduleに添付されてあるプレハイブリダイゼーション緩衝液に浸し、60°Cで60分間振とうした後、プレハイブリダイゼーション緩衝液で1000倍希釈した

プローブ溶液に交換し、60℃で一晩インキュベーションした。その後、メンブレンを0.1 % SDS-1 x SSC中で60℃、20分間、0.1% SDS-0.4 x SSC中で60℃、20分間、0.1% SDS-0.2 x SSC中で60℃、20分間の順に振とう洗浄を行った。CDP-Star検出モジュールキット(Amersham Pharmacia Biotech)添付のbuffer Aでメンブレンを1回洗浄後、キット添付のブロッキング溶液中でメンブレンを室温で1時間振とうした。キット添付のアルカリホスファターゼ標識抗フルオレセイン抗体を0.5% Bovine serum albumin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 含有buffer Aで5000倍希釈し、この抗体溶液にメンブレンを浸して室温で60分間振とうを行った。0.3% Tween 20含有buffer Aで15分間の洗浄を3回行った後、さらにbuffer Aで1回洗浄した。キット添付のアルカリホスファターゼ基質であるCDP-Starをメンブレンに滴下して発色を行った後、ポラロイドフィルムに感光させて検出を行った。

[0067] 3. 結果:

結果を図3～5に示した。クリシンはFc ε RIの発現をmRNAレベルで抑制した。Fc ε RI発現を抑制することから、クリシンは、IgE/Fc ε RI複合体により惹起される脱顆粒反応を抑制し、後に生じるアレルギー炎症等を軽減しうることが分かった。

[0068] <実施例3:クリシンの摂食実験>

投与サンプル:

0.4 mg/mLのクリシンを200 μLずつ、又はコントロールとして1% DMSO 1% EtOHを200 μLずつを、各群(n=8)に、次項の投与スケジュールにしたがって投与した。

[0069] 投与スケジュール:

1週間予備摂食(MF食)させた5週齢のC57BL/6N雄マウスに、2週間にわたり、2日に1回サンプルを投与した。(計7回投与。合計投与量は、一匹あたり0.56mg(28mg/kg)。)

IL-4応答性の検討:

屠殺後のマウスの脾臓から回収した脾臓リンパ球を 2×10^7 cells/mLに調整し、リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (25 μg/mL)又は LPS + IL-4(500 U/mL)にて30分間刺激した。その後細胞を溶解し、抗STAT6 抗体を用いた免疫沈降及びimmunoblot法によりリン酸化STAT6を検出することで、IL-4に対する応答性を検討した。

[0070] 結果:

結果を図6に示した。クリシンを投与した系では、コントロールに比較し、LPS + IL-4 刺激によるSTAT6のリン酸化を抑制した。

[0071] <実施例4:ヒト末梢血好塩基球のFc ϵ RI mRNA発現に及ぼすクリシンの影響>1. 方法:

ドナーの前腕肘部より静脈採血を行い、Lymphocyte Separation Medium (ICN Biomedical Inc.) により末梢血リンパ球を、Percoll (Amersham Biosciences) 密度勾配遠心法により末梢血好塩基球を分離精製した。好塩基球 (1×10^6 cells/mL) を、25 M クリシン若しくは溶媒であるジメチルスルフォキシド(DMSO)を添加した5% FCS-RPMI 1640培地で24時間培養後、RNAを抽出し、Fc ϵ RI α 、 γ 鎖のmRNA発現レベルを、実施例1と同様に、RT-PCR法により検討した。

[0072] 2. 結果:

結果を図7に示した。クリシンは、いずれのドナーにおいても、末梢血好塩基球のFc ϵ RI α 及び γ 鎖のmRNA発現レベルを減少させたが、特に、Fc ϵ RI α 鎖の発現を強力に低下させた。ヒト末梢血細胞に対してもクリシンが高親和性IgE受容体Fc ϵ RIの発現を強力に抑制することが分かった。

[0073] <実施例5:ヒト好塩基球のヒスタミン放出に及ぼすクリシンの影響>

1. 方法:

ヒト好塩基球細胞株KU812細胞 (5×10^5 cells/mL) を25 μ M クリシン添加1 mM CaCl₂ 含有Tyrode buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.1 mM MgCl₂, 1.9 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) で37°C、20分間インキュベートし、さらに5 μ M A23187 (Sigma Chemical Co.) を加えて37°C、20分間インキュベートした。インキュベート後、氷中に5分間静置して反応を停止させ、上清1 mLを回収した。また、細胞内ヒスタミン蓄積量を測定するサンプルについては、細胞を300 x gで5分間遠心した後超音波破碎を約1分間行い、12,000 x gで5分間遠心後上清を1 mL回収した。次に、アルカリ条件下でヒスタミンをo-Phtaldehyde (Wako) により蛍光化して定量を行うため、部分抽出を行った。サンプル1 mL、Tyrode buffer 1 mL、NaCl 0.75-0.78 gそして5 N NaOH 0.5 mLを混合して攪拌した。さらに、5 mLのn-Butanol : Chloroform =

3 : 2の混合液(v/v)を加えてボルテックスミキサーで攪拌後、300 x gで5分間遠心した。次に上層を4 mL採取し、0.1 N HCl 1.5 mLとn-Heputan 2 mLを加えてボルテックスミキサーで攪拌後、300 x gで5分間遠心した。1 N NaOH 0.15 mLに下層1 mL添加し、0.2% OPA (Methanolに溶解して調製) 0.1 mLを加えて蛍光化学反応を開始した。室温で5分間反応させた後、 $0.5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ 0.14 mLを加えて反応を停止させた。蛍光強度は蛍光光度計RF-1500を用いて励起波長360 nm、蛍光波長450 nmで測定を行った。

[0074] 2. 結果:

結果を図8に示した。

[0075] クリシンは、A23187によって誘導されるヒスタミン放出を有意に低下させた。抗原刺激によって誘導される炎症物質ヒスタミンの放出をクリシンが阻害することが分かった。

[0076] <実施例6:卵白アルブミン(OVA)で抗原感作したマウスの血中抗体量に及ぼすクリシン摂食の影響>

1. 方法:

8週齢BALB/c雄マウスをAIN-93M摂食群(Control群)と0.025% クリシン添加AIN-93M摂食群に分け、3週間各食餌を与えた後、両群ともAIN-93M食を2週間摂食させた。1匹あたり5 g/dayとなるように摂食させ、自由飲水で飼育した。

[0077] OVA感作は、100 μ g OVA/水酸化アルミニウムゲルを各食餌摂食開始1週間後と2週間後の計2回にわたりマウス腹腔に注入した。

[0078] 35日目に採血し、血清総IgM、IgG、IgA、IgEレベルをELISAにて測定した。

[0079] 抗体量測定のELISAの使用した試薬は以下の通りである。ブロッキングには1% bovine serum albumin (Roche) 含有PBS (BSA-PBS)を用いた。固相抗体には、F(ab')₂ goat anti-mouse IgG(H(L)抗体(Zymed Laboratories, Inc.)、F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgM抗体(Zymed Laboratories, Inc.)、rabbit anti-mouse IgA(Zymed Laboratories, Inc.)を用いた。二次抗体には、HRP標識F(ab')₂ goat anti-mouse IgG(H(L)抗体(Zymed Laboratories, Inc.)、HRP標識rabbit anti-mouse IgM抗体(Zymed Laboratories, Inc.)、HRP標識goat anti-mouse IgA抗体(Zymed Laboratories, Inc.)を用いた。発色基質に

用いた2,2'-Anizo-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)は和光純薬より購入し、シュウ酸はNacalai tesque (Kyoto, Japan)より購入した。

[0080] 方法は、固相抗体溶液(1000倍に50 mM炭酸緩衝液で希釈)をイムノプレートに100 μ L/wellで分注し、4°Cで一晩静置した。0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Nacalai tesque) 含有PBS (TPBS) で3回洗浄後、BSA-PBSを300 μ L/wellで分注し、37°Cで2時間インキュベートした。TPBSで3回洗浄後、サンプル及びスタンダード溶液をBSA-PBSで適宜希釈し、50 μ L/wellで添加後4°C、一晩静置した。TPBSで3回洗浄後、二次抗体希釈液(2000倍にBSA-PBSで希釈)を100 μ L/wellで分注し37°C、1時間インキュベートした。TPBSで3回洗浄後、発色基質溶液を100 μ L/wellで分注し、発色を行い、1.5%シュウ酸溶液を100 μ L/well分注して反応を停止させ、415-490 nmで吸光度を測定した。発色基質液には0.006% H_2O_2 添加0.2 Mクエン酸緩衝液(pH 4.0)、脱イオン水、10.94 mM ABTS溶液の10 : 9 : 1混合液を使用した。

[0081] IgEについては、マウスIgE測定キット(森永生化学研究所)に添付された取扱説明書通りに行った。吸光度の測定には、Immuno Mini NJ-2300(日本インターメッド株式会社)を用いた。

[0082] 2. 結果:

結果を下表に示した。

[0083] [表1]

表1. 卵白アルブミン (OVA) で抗原感作したマウスの血中抗体量に及ぼすクリシン摂食の影響

Ig	Control	Chrysin
IgM (mg/mL)	5.2 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2
IgG (mg/mL)	27.7 $\pm$ 2.4	23.5 $\pm$ 3.0
IgA (mg/mL)	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0
IgE (ng/mL)	87.5 $\pm$ 6.9	68.2 $\pm$ 4.2 *

[0084] 摂食終了時点における血中IgM、IgG、IgAレベルについてはクリシン摂食による影響はみられなかった。これに対し、血中IgEレベルについては、Control群に比べてクリシン群で有意に低下しており、クリシン摂食はOVA感作による血中IgEレベルの増加を抑制させることが示された。

[0085] <実施例7:血中サイトカインレベルに及ぼすクリシン摂食の影響>

1. 方法:

実施例6と同様に採血を行い、血清中の32種類(6Ckine, CTACK, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN- γ , KC, Leptin, MCP-1, MCP-5, MIP-1 α , MIP-2, MIP-3 β , RANTES, SCF, sTNFR, TARC, TIMP-1, TNF- α , Tpo, VEGF)をRay BioTM Mouse Cytokine Array(Ray Biotech, Inc.)を用いて検出した。

[0086] なお、略字の意味は、次のとおりである:CTACK, cutaneous T-cell-attracting chemokine; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; KC, CXC ligand 1; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage inflammatory protein; RANTES, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted; SCF, stem cell factor; sTNFR, soluble tumor necrosis factor receptor; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloprotease; TNF, tumor necrosis factor; Tpo, thrombopoietin; VEGF, vascular endothelial growth factor。

[0087] 2. 結果:

結果を下表に示した。なお、表中の数値は非摂食群の値を1とした場合の相対値である。

[0088] [表2]

表2. 卵白アルブミン（OVA）で抗原感作したマウスの血中サイトカインレベルに及ぼすクリシン摂食の影響

Cytokines	Chrysin
G-CSF	2.43
GM-CSF	1.68
IL-4	0
Leptin	1.25
MCP-1	0.49
TNF- α	2.17

[0089] 32種類のサイトカインの中で、26種類のサイトカインレベルには変動が見られなかった。これに対し、IL-4レベルはクリシン摂食によって顕著に低下していた（検出限界以下）。一方、G-CSFやGM-CSF、leptin、TNF- α の血中レベルは増大傾向を示した。

[0090] <実施例8: 高親和性IgE受容体(Fc ϵ RI)細胞表面発現に対するクリシンとアピゲニンの共存効果>

1. 方法:

KU812細胞 (5×10^5 cells/mL)を、クリシン(0, 1, 5, 10 μ M)及びアピゲニン(Aldrich Chem. Co. (St. Louis, MO) から購入) (0, 1, 5, 10 μ M)を添加した5%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地で24時間培養を行った。培養後、フローサイトメリー解析により細胞表面Fc ϵ RI発現レベルを測定した(実験方法は0047参照)。

[0091] 2. 結果:

結果を下表に示した。

[0092] [表3]

表3. 高親和性IgE受容体 (FcεRI) 発現に対する
クリシンとアピゲニンの共存効果

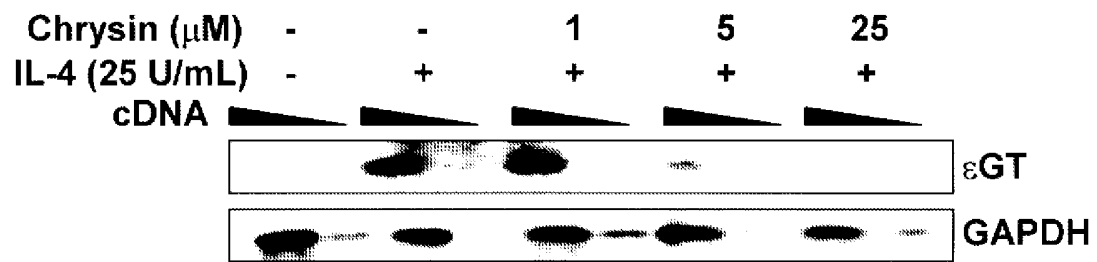
ChrisinとApigeninの組合せ	FcεRI発現抑制率(%)
--	0.0
Apigenin 1 μM	5.0
Apigenin 5 μM	17.1
Apigenin 10 μM	36.1
Chrisin 1 μM	0.0
Chrisin 1 μM + Apigenin 1 μM	5.4
Chrisin 1 μM + Apigenin 5 μM	26.0
Chrisin 1 μM + Apigenin 10 μM	40.8
Chrisin 5 μM	11.5
Chrisin 5 μM + Apigenin 1 μM	13.9
Chrisin 5 μM + Apigenin 5 μM	31.4
Chrisin 5 μM + Apigenin 10 μM	51.4
Chrisin 10 μM	19.8
Chrisin 10 μM + Apigenin 1 μM	22.2
Chrisin 10 μM + Apigenin 5 μM	39.8
Chrisin 10 μM + Apigenin 10 μM	58.0

[0093] 1 μM クリシンはKU812細胞のFcεRI発現を抑制しないが、アピゲニンのFcεRI発現抑制作用を増強させた。特に、1 μM クリシン(抑制率0%)と5 μM アピゲニン(抑制率17.1%)の共培養(1 μM クリシン + 5 μM アピゲニン)において相乗的なFcεRI発現抑制効果(抑制率26%)がみられた。

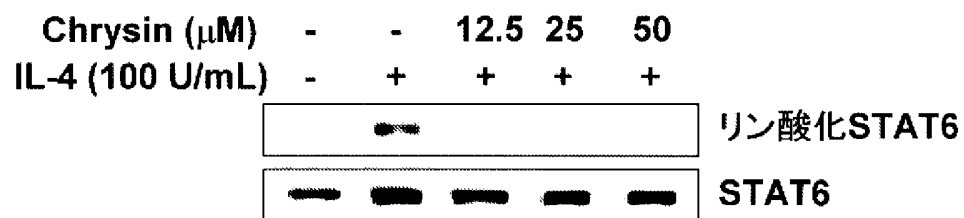
請求の範囲

- [1] クリシンを含む、アレルギー抑制剤。
- [2] クリシンを含む、ヒスタミン放出阻害剤。
- [3] IgE産生に関連する疾患又は状態を処置するための、クリシンを含む組成物。
- [4] 高親和性IgE受容体に関連する疾患又は状態を処置するための、クリシンを含む組成物。
- [5] IL-4の過剰産生に関連する疾患又は状態を処置するための、クリシンを含む組成物。
- [6] 1日当たりの経口投与量又は摂取量中に、1.68g以上のクリシンを含む、医薬又は食品用組成物。
- [7] さらにアピゲニンを含む、請求項1に記載のアレルギー抑制剤、請求項2に記載のヒスタミン阻害剤、又は請求項3～5のいずれか1項に記載の組成物。
- [8] クリシン及びアピゲニンを含む、医薬、食品又は化粧用組成物。
- [9] アレルギー抑制剤、ヒスタミン放出阻害剤、IgE産生に関連する疾患若しくは状態を処置するための組成物、高親和性IgE受容体に関連する疾患若しくは状態を処置するための組成物、又はIL-4の過剰産生に関連する疾患若しくは状態を処置するための組成物の製造における、クリシンの使用。
- [10] アレルギーに関連する疾患若しくは状態、ヒスタミン放出に関連する疾患若しくは状態、IgE産生に関連する疾患若しくは状態、高親和性IgE受容体に関連する疾患若しくは状態、又はIL-4の過剰産生に関連する疾患若しくは状態を処置するための方法であって、そのような処置を必要とする哺乳動物に対して、処置上有効量のクリシンを投与することを含む、前記方法。

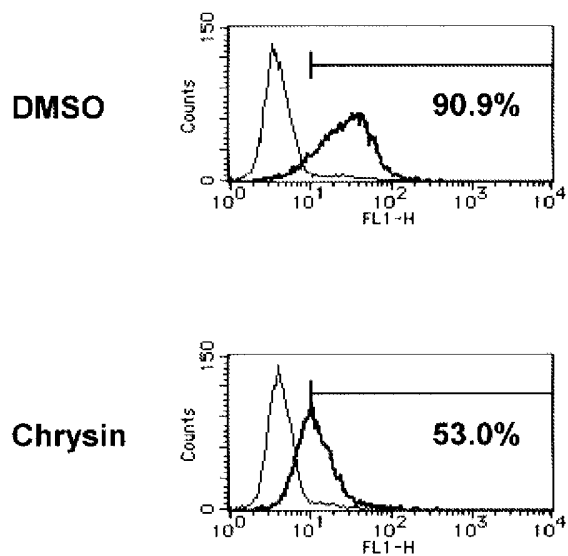
[図1]



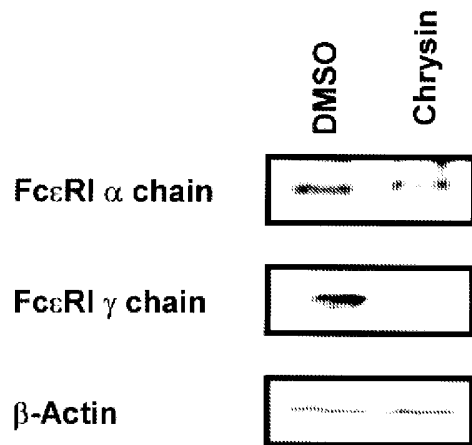
[図2]



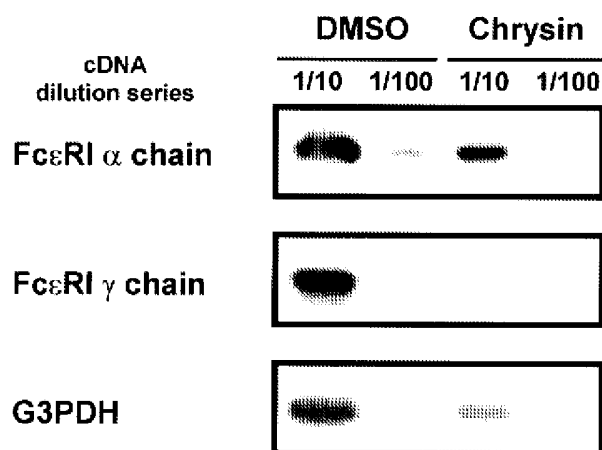
[図3]



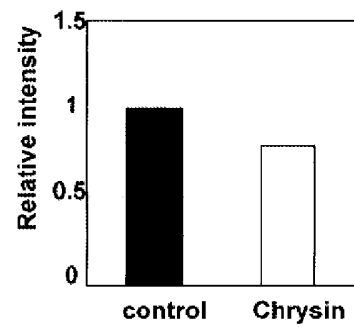
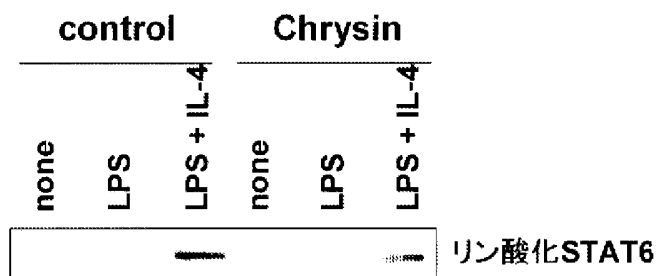
[図4]



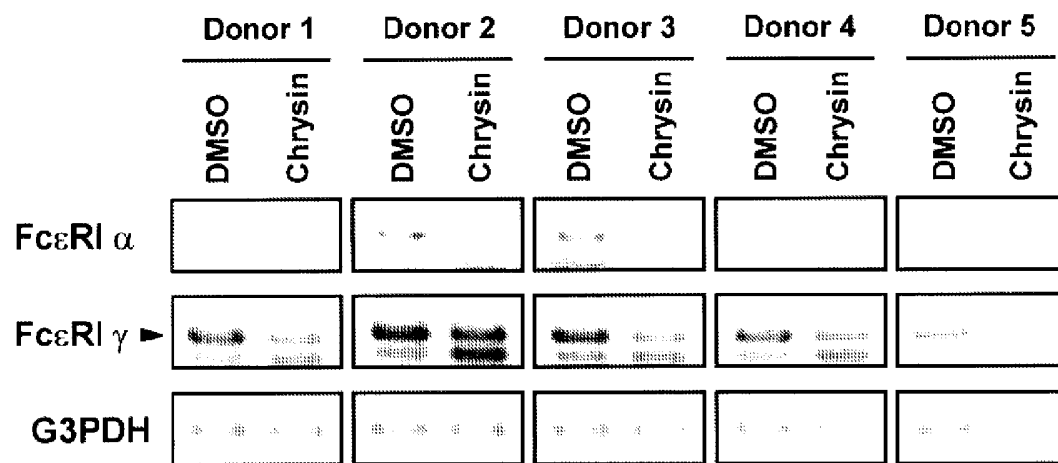
[図5]



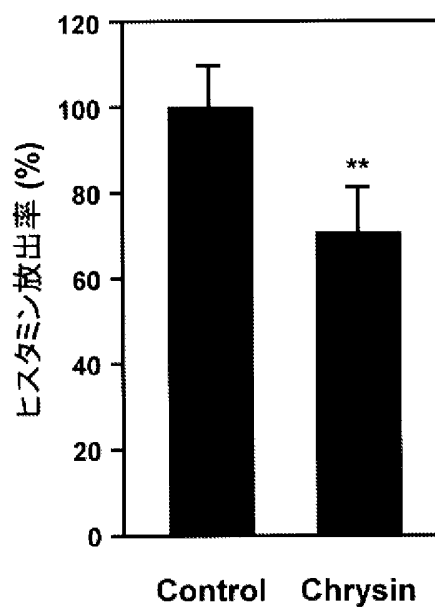
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018451

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/352 (2006.01), **A61P37/08** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **A61K8/49** (2006.01), **A23L1/30** (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), **A61P37/08** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **A61K8/49** (2006.01), **A23L1/30** (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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), FSTA (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PEARCE, Frederick L. et al., Mucosal mast cells. III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1984, 73(6), 819-823, particularly, 821-823	1-9
X	JP 2001-114686 A (SUNSTAR CHEM IND CO., LTD.), 24 April, 2001 (24.04.01), Particularly, Claims; Par. Nos. [0002], [0050] (Family: none)	1-9
X	JP 10-510803 A (BEIERSDORF AG.), 20 October, 1998 (20.10.98), Particularly, Claims; page 32 & WO 1996/018382 A1	1, 9

☒ 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
12 January, 2006 (12.01.06)

Date of mailing of the international search report
24 January, 2006 (24.01.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018451

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 2004-161664 A (FANKERU KABUSHIKI KAISHA), 10 June, 2004 (10.06.04), Particularly, Claims; table 2; Par. No. [0021] (Family: none)	1, 3-6, 9
X	JP 7-118151 A (KUREHA CHEM IND CO., LTD.), 09 May, 1995 (09.05.95), Particularly, Claims; Par. No. [0013] (Family: none)	1, 9
A	JP 2000-86510 A (ORIZA YUKA KABUSHIKI KAISHA), 28 March, 2000 (28.03.00), Claims (Family: none)	7
A	MATSUDA, Hisashi et al., Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10(10), 3123-3128, abstract; tables 1, 7	2
A	CHEONG, Ho et al., Studies of structure activity relationship of flavonoids for the anti-allergic actions, Archives of Pharmacal Research, 1998, 21(4), 478-480	2
P, X	YANO, Satomi et al., Flavones Suppress the Expression of the High-Affinity IgE Receptor Fc ϵ in Human Basophilic KU812 Cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5), 1812-1817	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018451

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
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
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/JP2005/018451

1) In paragraph 38 of the description, it is stated that using a derivative of chrysin or apigenin also falls within the scope of the present invention. However, this statement contradicts the statement in claims.

2) The meaning of the term "conditions" as set forth in claims 3 to 5 cannot be clearly understood.

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), A61P37/08 (2006.01), A61P43/00 (2006.01), A61K8/49 (2006.01), A23L1/30 (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), A61P37/08 (2006.01), A61P43/00 (2006.01), A61K8/49 (2006.01), A23L1/30 (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 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006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)			
CAplus (STN), BIOSIS (STN), FSTA (STN), MEDLINE (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 請求の範囲の番号	
X	PEARCE, Frederick L. et al., Mucosal mast cells. III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1984, 73(6), 819-823 特に 821-823	1-9	
X	JP 2001-114686 A (SUNSTAR CHEM IND CO LTD) 2001.04.24 (ファミリーなし) 特に、クレーム、段落 2、段落 50	1-9	
X	JP 10-510803 A (BEIERSDORF AG) 1998.10.20 特に、クレーム及	1, 9	
☒ 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 12.01.2006		国際調査報告の発送日 24.01.2006	
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) 洲野 留香	4 P 9048
		電話番号 03-3581-1101 内線	3492

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 請求の範囲の番号
	び 3 2 頁 & WO 1996/018382 A1	
X	JP 2004-161664 A (FANKERU KK) 2004.06.10 (ファミリーなし) 特に、クレーム、表 2、段落 21	1, 3-6, 9
X	JP 7-118151 A (KUREHA CHEM IND CO LTD) 1995.05.09 (ファミリーなし) 特に、クレーム、段落 13	1, 9
A	JP 2000-86510 A (ORIZA YUKA KK) 2000.03.28 クレーム (ファミリーなし)	7
A	MASTUDA, Hisashi et al., Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10(10), 3123-3128 要約、表 1, 7	2
A	CHEONG, Ho et al., Studies of structure activity relationship of flavonoids for the anti-allergic actions, Archives of Pharmacal Research, 1998, 21(4), 478-480	2
PX	YANO, Satomi et al., Flavones Suppress the Expression of the High-Affinity IgE Receptor Fc ϵ in Human Basophilic KU812 Cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5), 1812-1817	1-9

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（P C T 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 1 0 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 1 0 は、手術または治療による人体の処置方法に関するものである。
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 P C T 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ろ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。

- 1) 明細書の38段落には、本発明の範囲にクリシン或いはアピゲニンの誘導体を使用する場合が包含される旨記載されており、このような記載は、特許請求の範囲の記載と矛盾している。
- 2) 請求の範囲3-5の「状態」の意味するところが、明確に把握できない。