

(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
2020年7月16日(16.07.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/145041 A1

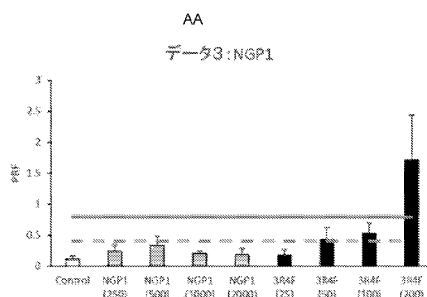
- (51) 国際特許分類:
A24F 47/00 (2020.01) C12Q 1/6851 (2018.01)
C12Q 1/06 (2006.01) C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6837 (2018.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2019/049086
- (22) 国際出願日: 2019年12月16日(16.12.2019)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2019-003076 2019年1月11日(11.01.2019) JP
- (71) 出願人: 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP]; 〒1058422 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松村 一史 (MATSUMURA, Kazushi); 〒1308603 東京都墨田区横川一丁目17番7号 日本たばこ産業株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外 (ONO, Shinjiro 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206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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

(54) Title: IN VITRO EVALUATION METHOD FOR RISK OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE ASSOCIATED WITH SMOKING OR INHALATION

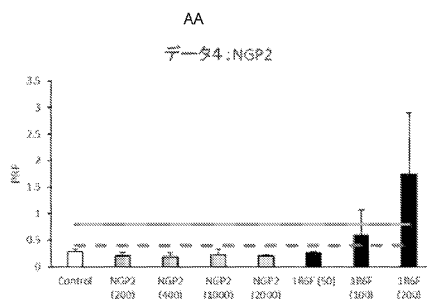
(54) 発明の名称: 喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法

【図5】

A



B



AA Data

(57) Abstract: The present invention relates to an in vitro evaluation method for the risk of chronic obstructive pulmonary disease associated with smoking or inhalation. This method comprises: (1) calculating the probability P_{SMK} on the basis of data relating to the expression of 11 or more genes including at least 11 specific genes from among the following 15 genes from airway epithelial cells exposed to a sample solution containing an aerosol of a

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

tobacco product or particulate matter in the aerosol using an intercept and a coefficient preliminarily calculated by logistic regression analysis using public data, the 15 genes being TXNIP, EFNA1, CYP1 B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, and FBXO32; (2) calculating the probability P_{COPD} on the basis of data relating to the expression of 4 or more genes including at least 4 specific genes from among the following 15 genes from the airway epithelial cells exposed to a sample solution containing an aerosol of a tobacco product or particulate matter in the aerosol using the coefficient preliminarily calculated by logistic regression analysis using the public data; and (3) calculating the risk of chronic obstructive pulmonary disease associated with smoking or inhalation of the aerosol of the tobacco product or an aerosol from the probability P_{SMK} and the probability P_{COPD} .

(57) 要約: 本発明は、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法に関する。本発明の方法は、(1) たばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子: TXNIP, EFNA1, CYP1 B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32のうちの少なくとも特定の11個の遺伝子を含む11以上の遺伝子の発現に関するデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、確率 P_{SMK} を算出し; (2) たばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子のうちの少なくとも特定の4個の遺伝子を含む4以上の遺伝子の発現に関するに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された係数を用いて、確率 P_{COPD} を算出し; (3) 確率 P_{SMK} および確率 P_{COPD} から、前記たばこ製品のエアロゾルまたはエアロゾルの喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクをとして算出する、ことを含む。

明 細 書

発明の名称：

喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法、及び、加熱式たばこに関する。

背景技術

[0002] 慢性閉塞性肺疾患（Chronic Obstructive Pulmonary Disease，以下、本明細書において、「COPD」と呼称する場合がある）は大気中の汚染物質や粉じん、微生物などの有害物質を長期間吸入曝露されることで生じる炎症性呼吸器疾患である。たばこ煙はCOPDの主たるリスク要因の一つとして考えられていることから、たばこ煙のCOPD発症リスクを評価する手法の確立は急務である。この点、喫煙曝露試験に関する動物モデルも報告されているが、ヒトへの影響について評価を外挿することについては種差の問題が懸念される。

[0003] このような背景から、たばこ業界においてヒト由来細胞を用いたインビトロ試験によるヒトへの疾病リスク予測の重要性が高まっている。特に気道上皮組織は吸入される有害物質に対して最初の防御機構として働く組織であることから、気道上皮細胞を用いたたばこ煙の生物影響評価は積極的に行われている。近年は従来の単層培養細胞を用いた単回曝露試験に加え、より生体に近い組織構造を有する三次元培養モデルを用いた頻回曝露試験といった、ヒトへの外挿性の高い試験系を用いた評価も積極的に行われてきている。

[0004] 近年、電子たばこや加熱式たばこなどの従来とは異なるたばこ製品が開発・上市されている。これらの製品は燃焼を伴わずにエアロゾルを発生させる点が特徴的であり、従来の燃焼性たばこではみられるような燃焼および高温の燃焼ガスが刻みたばこ内の成分を化学反応させることに伴い生成される化学物質の発生が抑制され得ると考えられている。実際にこれらのたばこ製品

を用いた成分分析の結果から、生物活性を持ついくつかの化学成分が燃烧性たばこと比較して量的に少ないことが報告されている。

[0005] 喫煙物品の煙やエアロゾルに含まれる化学物質へ反応する複雑な生体応答を網羅的に解析する手法として、各種オミクス技術の活用が注目されている。特に qPCR アレイやマイクロアレイを用いた遺伝子発現量測定は、技術の大きな進歩によりデータ品質が他のオミクス技術と比較して非常に高く、公共データベースへの登録数も豊富である。そのため、アレイデータ情報を利用したメタ解析も盛んに行われている。燃烧性たばこ煙の曝露に比べ、生物活性を持つ化学物質含有量の低い電子たばこや加熱式たばこなどの煙は、気道上皮細胞中の遺伝子発現変動が抑えられていることは報告されている。しかしながら、これら生物活性を持つ化学物質が引き起こす遺伝子発現量の変動から具体的な疾病リスクを予測する手法に関しては、未だ具体的な評価手法が定まっていないのが現状である。

[0006] WO2013/190092 は、COPD のリスクに用いる一群の遺伝子を記載している。Am. J. Respir Crit Care Med. 2007, 175 (6) : 577-586 は、COPD 患者特徴的な遺伝子を報告している。しかしながら、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを統計的に定量評価するのに有効な方法は未だに提供されていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1 : WO2013/190092

特許文献2 : WO2016/075748

特許文献3 : WO2016/075749

非特許文献

[0008] 非特許文献1 : Am. J. Respir Crit Care Med. 2007, 175 (6) : 577-586

非特許文献2 : ISO 3308

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法、及び、加熱式たばこを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、マイクロアレイデータを用いたインビトロ評価系からのたばこ製品のCOPDリスクポテンシャル評価手法を新規に構築し、三次元培養細胞モデルを用いた加熱式たばこのエアロゾル曝露による生体影響を評価したところ、本加熱式たばこのCOPDポテンシャルリスクが低いことを見出し、本発明を想到した。

[0011] 非限定的に、本発明は以下の態様を含む。

[態様1]

吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法であって、

(1) 加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32を含む11以上の遺伝子の発現に関するデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、以下の確率 P_{SMK}

[化1]

$$\text{logit}(P_{SMK}) = \ln\left(\frac{P_{SMK}}{1 - P_{SMK}}\right) = C_{NS/SMK} + \beta_1 a_1 + \beta_2 a_2 + \dots + \beta_x a_x$$

[上記式において、 $C_{NS|SMK}$ は切片を、 β_i は各々の遺伝子に対する係数を、 a_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 x は11-15のいずれかの整数を示す。]

を算出し；

(2) 加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

を含む4以上の遺伝子の発現に関するに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、以下の確率 P_{COPD}

[化2]

$$\text{logit}(P_{COPD}) = \ln\left(\frac{P_{COPD}}{1 - P_{COPD}}\right) = C_{SMK/COPD} + \gamma_1 b_1 + \gamma_2 b_2 + \dots + \gamma_y b_y$$

[上記式において、 $C_{SMK|COPD}$ は切片を、 γ_i は各々の遺伝子に対する係数を、 b_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 y は4-10のいずれかの整数を示す。]

を算出し；

(3) 確率 P_{SMK} および確率 P_{COPD} から、前記加熱式たばこの吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを、以下のPRF

[化3]

$$PRF = \frac{p_{SMK} \times p_{COPD}}{1 - (p_{SMK} \times p_{COPD})}$$

として算出する、

ことを含む、前記インビトロ評価方法。

[態様2]

工程(1)において、11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32
のすべての遺伝子の発現に関するデータに基づくロジスティック回帰分析により、確率 P_{SMK} を算出する、態様1に記載のインビトロ評価方法。

[態様3]

工程(2)において、4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

のすべての遺伝子の発現に関するデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された係数を用いて、確率 P_{COPD} を算出する、態様1または2に記載のインビトロ評価方法。

[態様4]

気道上皮細胞が、哺乳類の気道上皮細胞である、態様1-3のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法。

[態様5]

気道上皮細胞がヒト気道上皮細胞、マウス気道上皮細胞、またはラット気道上皮細胞である、態様1-4のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法。

[態様6]

気道上皮細胞が三次元培養細胞である、態様1-5のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法。

〔態様 7〕

気道上皮細胞が気液界面培養下である、態様 1－6 のいずれか 1 項に記載のインビトロ評価方法。

〔態様 8〕

加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む溶液を、最大濃度 2000 パフ/L で 24 時間曝露した気道上皮細胞において、PRF が 0.8 以下の範囲である場合に、当該加熱式たばこの吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクは低いまたはない、と判断する、態様 1－7 のいずれか 1 項に記載の方法。

〔態様 9〕

2 種類の加熱式たばこについて PRF を比較し、PRF がより低い加熱式たばこの方を、吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクがより低い、と判断する、態様 1－8 のいずれか 1 項に記載の方法。

〔態様 10〕

(1) 以下の 15 個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の 11 個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32 を含む 11 以上の遺伝子の発現に関するデータ、並びに、

(2) 以下の 15 個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の 4 個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

を含む4以上の遺伝子の発現に関するデータ

の、吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法への利用。

[態様11]

加熱式たばこであって、

再構成たばこからなるエアロゾル源を、直接または間接に電氣的に加熱する、という構造的特徴を有し、

当該加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液を用いて態様1-6のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法を行った場合に、加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む溶液を、最大濃度2000パフ/Lで24時間曝露した気道上皮細胞における、PRFが0.8以下の範囲である、前記加熱式たばこ。

[態様12]

再構成たばこが、平均粒径0.2mm以下の再構成たばこ顆粒であって、そして、

多孔性物質または繊維からなる担体の全て又はその一部が電気ヒーターで加熱されて生ずるプロピレングリコールとグリセリンの混合蒸気により再構成たばこ顆粒が加熱される、

態様11に記載の加熱式たばこ。

[態様13]

再構成たばこが、平均短辺長1mm以上、平均長辺長5mm以下の再構成たばこシートであって、巻紙にくるまれ、たばこロッドを構成し、そして、

前記たばこロッドが、巻紙の外周と接するから電気ヒーターにより加熱される、

態様11に記載の加熱式たばこ。

[態様14]

態様11-13いずれか1項に記載の加熱式たばこであって、発生するエアロゾルが1.4μg/本以下のアセトルデヒドを含む、加熱式たばこ。

[態様15]

態様 1 1 - 1 3 いずれか 1 項に記載の加熱式たばこであって、発生するエアロゾルが $1.2 \mu\text{g}$ / 本以下のアクロレインを含む、加熱式たばこ。

[態様 1 6]

態様 1 1 - 1 3 いずれか 1 項に記載の加熱式たばこであって、発生するエアロゾルが $68.4 \mu\text{g}$ / 本以下のホルムアルデヒドを含む、加熱式たばこ。

発明の効果

[0012] 本発明の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法により、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを、統計的に定量評価し、比較することが可能になった。喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを統計的に定量評価する方法は従来知られていなかったものであり、本発明によりはじめて可能になったことで、比較可能になることは科学的にも産業的にも意義が大きい。本発明の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法により、リスク低減製品（喫煙または吸引を含む製品の使用に伴う健康リスクを低減させる可能性のある製品）の研究・開発が可能になった。

図面の簡単な説明

[0013] [図1] 図 1 は、加熱式たばこにおける被加熱による温度変化の一例を示す。

[図2] 図 2 は、加熱式たばこにおける被加熱による温度変化の一例を示す。

[図3] 図 3 は、マイクロアレイデータの分析の結果を示す。（A）は、COPD 発症への関与が示唆されている生体応答に関連する陽性対照試薬曝露による遺伝子発現特性の階層的クラスタリングを示す。（b）は、燃焼性たばこの全煙バブリング曝露による発現変動遺伝子のベン図である。

[図4] 公共データベースを用いた COPD ポテンシャルリスク値の計算結果を示す。

[図5] 曝露 24 時間後の加熱式たばこ（NGP 1、NGP 2）及び試験用標準巻たばこ（3R4F、1R6F）の全煙バブリング曝露を用いた COPD ポテンシャルリスク値の計算結果を平均値±標準偏差で示す。

発明を実施するための形態

[0014] 1. 喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法

本発明は、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法に関する。上記評価方法は、

(1) たばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32を含む11以上の遺伝子の発現に関するデータ、具体的には、マイクロアレイデータ又はqPCR法による遺伝子発現データ、に基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、以下の確率 P_{SMK} を算出し；

[化4]

$$\text{logit}(P_{SMK}) = \ln\left(\frac{P_{SMK}}{1 - P_{SMK}}\right) = C_{NS/SMK} + \beta_1 a_1 + \beta_2 a_2 + \dots + \beta_x a_x$$

[上記式において、 $C_{NS/SMK}$ は切片を、 β_i は各々の遺伝子に対する係数を示す。また、 a_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 x は11-15のいずれかの整数を示す。]

[0015] (2) たばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1 B1, ADM, AREG, DUSP

6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

を含む4以上の遺伝子の発現に関するデータ、具体的には、マイクロアレイデータ又はqPCR法による遺伝子発現データに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、以下の確率 P_{COPD} を算出し；

[化5]

$$\text{logit}(P_{COPD}) = \ln\left(\frac{P_{COPD}}{1 - P_{COPD}}\right) = C_{SMK/COPD} + \gamma_1 b_1 + \gamma_2 b_2 + \dots + \gamma_y b_y$$

[上記式において、 $C_{SMK/COPD}$ は切片を、 γ_i は各々の遺伝子に対する係数を示す。また、 b_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのGCRMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 y は4-10のいずれかの整数を示す。]

[0016] (3) 確率 P_{SMK} および確率 P_{COPD} から、前記たばこ製品の煙またはエアロゾルの喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを、以下のポテンシャルリスク値(Potential Risk Factor: PRF)

[化6]

$$PRF = \frac{p_{SMK} \times p_{COPD}}{1 - (p_{SMK} \times p_{COPD})}$$

として算出する、
ことを含む。

[0017] 「慢性閉塞肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)は大気中の汚染物質や粉じん、微生物などの有害物質を長期間吸入曝露されることで生じる炎症性呼吸器疾患

である。COPDは、喫煙と関係が深いと考えられている。本発明は、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクをインビトロでの統計的な定量評価方法に関する。

[0018] 「たばこ製品」の種類は特に限定されない。紙巻たばこなどの可燃性喫煙物品も、エアロゾル源が燃焼ではなく加熱により発生する「加熱式たばこ」も含む。加熱式たばこは、たばこロッド部を含む香味吸引器であり、たばこを燃焼させることなく、電氣的熱源または化学反応による熱源で、アルコール・エタノール・グリセリン・プロピレングリコールまたはそれらの混合溶液を含浸させた多孔質または繊維質の物体を直接的にまたは間接的に加熱して発生させた蒸気と粒子状物質が混合した気体が、香味吸引器を通して引き込まれた空気中に混入される。さらに蒸気と粒子状物質と空気の混合気体が、上述のたばこに加え葉タバコ・再構成たばこ・再構成たばこシート・再構成たばこ顆粒に通過されて、たばこ・葉タバコ・再構成たばこ類が含む香喫味成分、ニコチンや各種の天然香料からなる揮発性化合物を含む気体が混入される。加熱式たばこにおいては、当該揮発性化合物を含む気体を含む混合気体、即ち、エアロゾル（全煙）とガス相成分との混合気体が、消費者によって吸引される。通常、消費者は、加熱式たばこの端（口側の端またはフィルター端、マウスピース端）で引き込むことによって、当該混合気体を吸引する。

[0019] 加熱式たばこは、エアロゾルの発生方式別に3つの態様として、直接加熱式香味吸引器と間接加熱式（空気加熱）香味吸引器と間接加熱式（ペーパー加熱）香味吸引器が有る。直接加熱式香味吸引器とは、以下の特徴を備えるたばこロッドを含む香味吸引器である。たばこ葉や再構成たばこ又は再構成たばこシートを含むたばこロッド部が、主に電気加熱により直接加熱され、葉たばこ由来のニコチンやフレーバーを含んだエアロゾルを発生させる。間接加熱式（空気加熱）香味吸引器とは以下の特徴を備えるたばこロッドを含む香味吸引器である。たばこ葉や再構成たばこ又は再構成たばこシートを含むたばこロッド部が、電気加熱などの熱源を使用して加熱された空気により

、間接的に加熱されることで葉たばこ由来のニコチンやフレーバーを含んだエアロゾルを発生させる。これらは、吸引中、たばこ葉や再構成たばこ又は再構成たばこシートから揮発性化合物が放出され、香味吸引器を通して引き込まれた空気中に混入される。放出された化合物が冷めるにつれて凝結してエアロゾルを形成し、これが消費者によって吸い込まれる。間接加熱式（ペーパー加熱）香味吸引器とは、以下の特徴を備えるたばこロッドを含む香味吸引器である。電気加熱によりエアロゾル源（液体）を加熱してエアロゾルを発生させ、そのエアロゾルが、葉たばこ由来のニコチンやフレーバーを含んだエアロゾルを発生させる。

[0020] たばこ製品のエアロゾル」とは、例えば、紙巻きタバコの煙、あるいは、香味吸引器から発生するエアロゾルすなわちガス状の物質、揮発性の物質と、粒子状物質の混合気であるエアロゾルが含む全ての成分を意味する。

[0021] 「たばこ製品のエアロゾル中の粒子状物質」とは、例えば、紙巻きタバコの煙、あるいは、香味吸引器から発生するエアロゾル中のガス状、揮発性の物質を除く全ての物質を意味し、総粒子状物質（TPM、total particle matter）と呼称される場合もある。総粒子状物質は、たばこ業界では紙巻たばこの煙あるいは香味吸引器から発生するエアロゾルをガラスフィルターに通し、ガラスフィルターに捕集される物質を称する。一態様において、加熱式たばこのエアロゾル中の粒子状物質には、水蒸気、ニコチン、プロピレングリコール、グリセリン、メントール等を含む。

[0022] 「エアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露」とは、総粒子状物質を適宜の溶媒ないし適宜の細胞の液体培地に溶かした試料溶液へ細胞を暴露する場合の他、たばこ製品のエアロゾルすなわちガス状の物質、揮発性の物質と、粒子状物質の混合気を通過させてガス状の物質、揮発性の物質と粒子状物質を溶解させた適宜の溶媒ないし適宜の液体培地を得る全煙バブリング法により得られた試料溶液へ細胞を曝露する場合も含む。

[0023] 試料溶液の「溶液」は、たばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を溶解できる溶液であれば特に限定されない。一態様において、

溶液として、両親媒性溶媒を用いる。両親媒性溶媒は、非限定的に、ジメチルスルホキシド（DMSO）、エタノール、メタノール、イソプロパノール、アセトン等を含む。

[0024] 喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法は、たばこ製品から発生したエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞を利用する。試料溶液の中のたばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質の濃度、気道上皮細胞への曝露時間は、たばこ製品の種類等に応じて適宜調整可能である。本明細書において、たばこ製品を嗜む行為は、「喫煙」を以って、「吸引」を含むたばこ製品の喫煙または吸引という使用行為の総称として使用する場合がある。

[0025] 「気道上皮細胞」は、呼気・吸気の運搬経路である気管－気管支－細気管支（「気道」と総称される場合がある）の上皮組織由来の細胞である。非限定的に、気道上皮細胞は、哺乳類の気道上皮細胞であってもよい。非限定的に、気道上皮細胞は、ヒト気道上皮細胞、マウス気道上皮細胞、モルモット気道上皮細胞またはラット気道上皮細胞であってもよい。

[0026] 一態様において、気道上皮細胞は三次元培養細胞である。三次元培養細胞は、二次元培養細胞と比較して生体の環境により近い環境でのインビトロ評価を可能にする。例えば、Epithelix社から販売されているMucilAir（登録商標）は、立体細胞培養プレートに再構成されたヒト気道上皮インビトロ3D再構成モデルであり、前記インビトロ評価方法に利用可能である。

[0027] 一態様において、気道上皮細胞は気液界面培養下である。気道上皮細胞が気液界面培養下であることにより気道上皮細胞を繊毛細胞へ分化誘導が可能であり、また粒子状物質が気道上皮細胞に直接的に接するという実際の曝露形態を再現できる利点が見られる。

[0028] 喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法は、

(1) たばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32を含む11以上の遺伝子の発現に関するデータ、具体的には、マイクロアレイデータ又はqPCR法による遺伝子発現データに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、喫煙者と判断される確率として、以下の確率 P_{SMK}

[化7]

$$\text{logit}(P_{SMK}) = \ln\left(\frac{P_{SMK}}{1 - P_{SMK}}\right) = C_{NS/SMK} + \beta_1 a_1 + \beta_2 a_2 + \dots + \beta_x a_x$$

[上記式において、 $C_{NS/SMK}$ は切片を、 β_i は各々の遺伝子に対する係数を示す。また、 a_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 x は11-15のいずれかの整数を示す。]

を算出することを含む。

[0029] 以下の15個の遺伝子は、本発明において、喫煙との関連性が見出された遺伝子である。

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

これらのうち、以下の11個の遺伝子は、変数減少法により喫煙との関連性が特に高いことが見出された遺伝子である。

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32

公共データベースのマイクロアレイデータは、非限定的に、例えば、EMBL-EBIに登録されたマイクロアレイデータ：E-MTAB-1690, E-GEOD-20257, E-GEOD-8545を利用することができる。

[0030] 公共データを用いたロジスティック回帰分析は、例えば、公共データベースに登録されたマイクロアレイデータに付与された属性情報から、目的変数として健常人（HLT）および喫煙者（SMK）の区分を利用し、説明変数としてTXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32の11遺伝子を含む遺伝子のGC-RMAによる正規化遺伝子発現データ a_i を外挿して、非限定的に、例えば、統計分析フリーソフト「R」によるロジスティック回帰分析を行い、得られた回帰式から切片 $C_{NS|SMK}$ および係数 β_i を得ることができる。

[0031] 一態様において、「少なくとも以下の11個の遺伝子：TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32を含む11以上の遺伝子」は、11個、12個、13個、14個又は15個の遺伝子である。好ましくは、11個の遺伝子である。

[0032] 前記インビトロ評価方法は、また、（2）たばこ製品のエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

を含む4以上の遺伝子の発現に関するデータ、具体的には、マイクロアレイデータ又はqPCR法による遺伝子発現データに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、喫煙者のうちCOPD患者と判断される確率として、以下の確率 P_{COPD}

[化8]

$$\text{logit}(P_{COPD}) = \ln\left(\frac{P_{COPD}}{1 - P_{COPD}}\right) = C_{SMK/COPD} + \gamma_1 b_1 + \gamma_2 b_2 + \dots + \gamma_y b_y$$

[上記式において、 $C_{SMK/COPD}$ は切片を、 γ_i は各々の遺伝子に対する係数を示す。また、 b_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 y は4-10のいずれかの整数を示す。]

を算出する、ことを含む。

[0033] EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREGの4個の遺伝子は、変数減少法によりCOPDとの関連性が高いことが見出された遺伝子である。DUSP6は、喫煙との関連性が特に高い11個の遺伝子には含まれないが、喫煙との関連性が見出された15個の遺伝子のうちには含まれる。

[0034] 公共データベースのマイクロアレイデータは、非限定的に、例えば、EMBL-EBIに登録されたマイクロアレイデータ：E-MTAB-1690, E-GEOD-20257, E-GEOD-8545を利用することができる。

[0035] 公共データを用いたロジスティック回帰式は、例えば、公共データベースに登録されたマイクロアレイデータに付与された属性情報から、目的変数として喫煙者(SMK)およびCOPD患者(COPD)の区分を利用し、説明変数としてEFNA1, TXNIP, DUSP6, AREGの4遺伝子を含む遺伝子のGC-RMAによる正規化遺伝子発現データ b_i を外挿して、非限定的に、例えば、統計分析フリーソフト「R」によるロジスティック回帰

分析を行い、得られた回帰式から切片 $C_{SMK|COPD}$ および係数 γ_i を得ることができる。

[0036] 一態様において、「EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREGを含む4以上の遺伝子」は、4個、5個、6個、7個、8個、9個、又は10個である。好ましくは4個である。

[0037] そして、前記インビトロ評価方法は、(1)、(2)の結果に基づき、(3) 確率 P_{SMK} および確率 P_{COPD} から、前記の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを、以下のポテンシャルリスク値 (PRF)

[化9]

$$PRF = \frac{P_{SMK} \times P_{COPD}}{1 - (P_{SMK} \times P_{COPD})}$$

として算出する、ことを含む。

[0038] 一態様において、工程(1)において、11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32
のすべての遺伝子の発現に関するマイクロアレイデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、確率 P_{SMK} を算出する。

[0039] 一態様において、工程(2)において、4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

のすべての遺伝子の発現に関するマイクロアレイデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、確率 P_{COPD} を算出する。

[0040] 本明細書の実施例において、NGP (NEXT GENERATION PRODUCT) (NGP1、NGP2) で、最大濃度2000パフ/Lの濃度で24時間曝露した場合、PRFは、非喫煙者で0.07、喫煙者で0.46、COPD患者で0.83であり、非喫煙の健常者と比較してPRF

の増加が認められた。なお、実施例で使用したNGP 1、NGP 2は各々、本明細書の「加熱式たばこの実施態様」の項目で後述する、「第3の態様」にかかる加熱式たばこ、「第2の態様」に係る加熱式たばこ、に相当する。NGP 2の詳細については、特願2018-213498（未公開）にも記載されている。

[0041] 前記インビトロ評価方法の一態様において、加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む溶液を、最大濃度2000パフ/Lで24時間曝露した気道上皮細胞において、PRFが0.8以下の範囲（実施例のCOPD患者のPRFより低い）である場合に、当該加熱式たばこの吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクは低いまたはない、と判断する。非限定的に、最小濃度200パフ/Lで24時間曝露の条件下で同様の実験を行った場合も、同様にPRFを算出をすることができる。

[0042] 一態様において、加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む溶液を、最大濃度2000パフ/Lで24時間曝露した気道上皮細胞において、PRFが0.4以下の範囲（実施例の喫煙者のPRFより低い）である場合に、当該加熱式たばこの吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクは低いまたはない、と判断する。

[0043] 前記インビトロ評価方法の一態様において、2種類の加熱式たばこについてPRFを比較し、PRFがより低い加熱式たばこの方を、吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクがより低い、と判断する。

[0044] 本発明はまた、(1)以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6,
SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1,
HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32
を含む11以上の遺伝子の発現に関するマイクロアレイデータ、並びに、

(2) 以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6,
SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1,
HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

を含む4以上の遺伝子の発現に関するマイクロアレイデータ

の、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法への利用、に関する。

[0045] 2. 加熱式たばこ

本発明は、加熱式たばこに関する。前記加熱式たばこは、再構成たばこからなるエアロゾル源を、直接または間接に電氣的に加熱する、という構造的特徴を有する。

[0046] 当該加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液を用いて本発明のインビトロ評価方法を行った場合に、加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む溶液を、最大濃度2000パフ/Lで24時間曝露した気道上皮細胞における、PRFが0.8以下の範囲、あるいは、PRFが0.4以下の範囲である。PRFは、発明の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法によって、初めて明らかにされたものである。このような低いPRFを有する加熱式たばこは、本発明の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法によって初めて想到された。

[0047] 「加熱式たばこ」の態様は、「1. 喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法」の項目に記載した通りである。前記加熱式たばこは、再構成たばこからなるエアロゾル源を、直接または間接に電氣的に加熱する、という構造的特徴を有する。

[0048] 一態様において、当該加熱式たばこの再構成たばこは、平均粒径0.2mm以上、1.2mm以下の再構成たばこ顆粒である。一態様において、多孔

性物質または繊維からなる担体の全て又はその一部が電気ヒーターで加熱されて生ずるプロピレングリコールとグリセリンの混合蒸気により再構成たばこ顆粒が加熱される。一態様において、当該加熱式たばこの再構成たばこは、平均粒径0.2 mm以上、平均粒径1.2 mm以下である再構成たばこ顆粒であって、そして、多孔性物質または繊維からなる担体の全て又はその一部が電気ヒーターで加熱されて生ずるプロピレングリコールとグリセリンの混合蒸気により再構成たばこ顆粒が加熱される。

[0049] 一態様において、再構成たばこが、平均短辺長1 mm以上、平均長辺長5 mm以下の再構成たばこシートである。一態様において、再構成たばこシートは、巻紙にくるまれ、たばこロッドを構成し、そして、前記たばこロッドが、巻紙の外周と接するから電気ヒーターにより加熱される。一態様において、再構成たばこが、平均短辺長1 mm以上、平均長辺長5 mm以下の再構成たばこシートであって、巻紙にくるまれ、たばこロッドを構成し、そして、前記たばこロッドが、巻紙の外周と接するから電気ヒーターにより加熱される。

[0050] 加熱式たばこの実施態様

以下、非限定的に、加熱式たばこの実施態様を説明する。

加熱式たばこは、電気ヒーターを備える吸引器具へ挿入された状態でエアロゾルとガスの混合気を発生させ、消費者の口腔・気道・鼻腔を経由した吸引に供される物品である。形状は棒状であり全長は20 mm以上100 mm以下、50 mm以上85 mm以下であってよい。

[0051] 第1の態様として、形状は棒状であり、全長は20 mm以上、30 mm以上、40 mm以上、50 mm以上、60 mm以上、70 mm以上、80 mm以上、83 mm、50 mm以下、60 mm以下、70 mm以下、80 mm以下、90 mm以下、100 mm以下であってよい。

[0052] 第2の態様として、形状は棒状であり、全長は20 mm以上、30 mm以上、40 mm以上、50 mm以上、60 mm以上、70 mm以上、80 mm以上、55 mm、50 mm以下、60 mm以下、70 mm以下、80 mm以

下、90 mm以下、100 mm以下であってよい。外周長さは15 mm以上、20 mm以上、25 mm以下、30 mm以下、22 mmであってよい。

[0053] 第3の態様として、再構成たばこ顆粒を含むポリプロピレン製のプラスチックカプセルであって、プラスチックカプセルの形状は略円筒であり、全長は10 mm以上、20 mm以上、30 mm以上、40 mm以上、50 mm以上、60 mm以上、70 mm以上、40 mm以下、50 mm以下、60 mm以下、70 mm以下、80 mm以下、90 mm以下であってよい。

[0054] 第1、第2の態様ともに、加熱式たばこは、たばこロッド部・空洞部・紙管・フィルター部からなり、フィルター部は繊維セクション又は空洞セクション又は中空紙管セクションからなる。

[0055] 第1の態様に係る加熱式たばこについて説明する。

たばこロッド部：たばこロッド部は、棒状であり、その長さは加熱式たばこの長軸方向に30 mm以上50 mm以下、42 mmが好ましい。たばこロッド部は、再構成たばこシートの小片が巻紙で包まれてなる。

[0056] 再構成たばこ：再構成たばこシートを裁刻した小片は、短辺1 mm以上、長辺15 mm以下であってよい。好ましくは長辺は10 mm以下、さらに好ましくは5 mm以下であってよい。再構成たばこシートは、香味成分としてニコチンを0.80%以上0.90%以下で含んでよい。再構成たばこシートは、香味成分としてメンソールを含んでよい。その場合、メンソールはたばこロッド部1本あたり0.3 mg以上5.3 mg以下で含んでよい。再構成たばこシートは、保湿剤としてアルコールを含んでよくプロピレングリコールを0.04%以上で0.58%以下、グリセリンを12.4%以上14.3%以下で含んでよい。再構成たばこシートは、保湿剤として糖類・単糖・二糖を含んでよく、単糖・二糖を合計3.7%以下含んでよく、フルクトースを2.1%以上2.7%以下、グルコースを1.3%以上1.8%以下、スクロースを0.2%以上0.4%以下で含んでよい。再構成たばこシートは、pH調整剤として有機酸を含んでよく、クエン酸を4.1 mg/g以上4.6 mg/g以下、リンゴ酸を30.9 mg/g以上34.4 mg/g

以下、 30.9 mg/g 以上 34.4 mg/g 以下、コハク酸を 0.2 mg/g 以上 0.3 mg/g 以下で、ギ酸を 0.1 mg/g 以上 0.2 mg/g 以下で含んでよい。

[0057] 巻紙：巻紙は、通気度 64.0 (Corresta Unit) 以上 67.0 (Corresta Unit) 以下であってよく、坪量 26.2 (g/m^2) 以上 26.4 (g/m^2) 以下であってよく、炭酸カルシウム含有量は 25.2% 以上 25.5% 以下であってよく、助燃剤は 0.7% であってよい。

[0058] フィルター部：フィルター部は、棒状であり、その長さは加熱式たばこの長軸方向に 5 mm 以上 18 mm 以下が好ましい。フィルター部はアセテート繊維フィルターと中空紙管からなる。アセテート繊維フィルターの長さは長軸方向に 5 mm 以上 18 mm 以下であって良く、望ましくは 8 mm である。アセテート繊維フィルターを構成するアセテート繊維は、任意の断面形状であってよく、丸断面形状、Y字型断面形状、X字型断面形状であってよい。中空紙管の長さは長軸方向に 5 mm 以上 18 mm 以下であって良く、望ましくは 8 mm である。

[0059] 空洞部：空洞部は、空洞部のフィルター部側の端部からフィルター部へ 5 mm 以上 16 mm 以下延伸しかつたばこロッド部側の端部からたばこロッド部へ 5 mm 以下延伸するチップペーパー内面と、フィルター部の端面、たばこロッドを構成する再構成たばこシート刻みの端面で画分される。空洞部は、棒状であり、その長さは加熱式たばこの長軸方向に 20 mm 以上 30 mm 以下であってよく、望ましくは 25 mm である。

[0060] チップペーパー：チップペーパーは、空洞部を構成し、円周方向に整列した開孔が2以上の複数個所設けられてよい。開孔の列は1列であってよく、2以上の複数列設けられてよい。チップペーパーは、テープ状の紙片を螺旋状に成型し定長に切断された紙管で内貼りされてよい。

[0061] 第2の態様に係る加熱式たばこについて説明する。

たばこロッド部：たばこロッド部は、棒状であり、その長さは加熱式たば

この長軸方向に15 mm以上25 mm以下、22 mmが好ましい。たばこロッド部は、再構成たばこシートの小片が巻紙で包まれてなる。再構成たばこシートを裁刻した小片は、短辺1 mm以上、長辺15 mm以下であってよく、好ましくは長辺は10 mm以下、さらに好ましくは5 mm以下であってよい。

[0062] 再構成たばこ：再構成たばこシートの小片は、たばこロッド部に200 mg以上300 mg、220 mg以上280 mg以下、240 mg以上260 mg以下、250 mg以上260 mg、255 mg又は260 mg含まれてよい。

[0063] 巻紙：巻紙は、通気度64.0 (Corresta Unit) 以上67.0 (Corresta Unit) 以下であってよく、坪量26.2 (g/m²) 以上26.4 (g/m²) 以下であってよく、炭酸カルシウム含有量は25.2%以上25.5%以下であってよく、助燃剤は0.7%であってよい。

[0064] フィルター部：フィルター部は、棒状であり、その長さは加熱式たばこの長軸方向に5 mm、20 mm、30 mm以上40 mm以下、35 mmが好ましい。フィルター部はアセテート繊維フィルターと中空紙管と中空アセテート管からなる。

[0065] アセテート繊維フィルターの長さは長軸方向に5 mm以上35 mm以下であってよく、望ましくは7 mmである。アセテート繊維フィルターを構成するアセテート繊維は、任意の断面形状であってよく、丸断面形状、Y字型断面形状、X字型断面形状であってよい。

[0066] 中空紙管の長さは長軸方向に5 mm以上35 mm以下であってよく、望ましくは20 mmである。中空紙管は、外気取入孔として、円周方向に整列した開孔が、2以上の複数個所、望ましくは15箇所設けられてよい。外気取入孔の開孔の列は1列であってよく、2以上の複数列設けられてもよい。

[0067] 中空アセテート管は、アセテート繊維からなる壁厚1.2 mmのアセテート管であり、中空アセテート管の長さは長軸方向に5 mm以上35 mm以下

であって良く、望ましくは8 mmである。

- [0068] 第3の態様に係る加熱式たばこは、例えばWO 2016/075748、WO 2016/075749に記載されている非燃焼型香味吸引器を含む。非燃焼型香味吸引器は、電源ユニットと、エアロゾル源と霧化部を含む第1カートリッジと、第2カートリッジとを有する。第2カートリッジは、霧化部によって霧化されたエアロゾルを通すことによってエアロゾルに香味を付与する。ここで、香味源を加熱せずにエアロゾルに香味を付与することができることに留意すべきである。また、香味源から実質的にエアロゾルが発生しないことに留意すべきである。霧化部は燃焼を伴わずにエアロゾル源を霧化する。第2カートリッジは前記エアロゾルに香味を付与する香味源を収容する。香味源は、非燃焼型香味吸引器が発生するエアロゾルに香味を付与する再構成たばこからなる顆粒によって構成される。再構成たばこ顆粒のサイズは、0.2 mm以上1.2 mm以下であることが好ましい。さらには、再構成たばこ顆粒のサイズは、0.2 mm以上0.7 mm以下であることが好ましい。香味源を構成する再構成たばこ顆粒のサイズが小さいほど、比表面積が増大するため、香味源を構成する顆粒から香気成分が揮散し易い。

[0069] 被加熱の実施態様

以下、非限定的に、加熱式たばこにおける被加熱の実施態様を説明する。

第1の態様に係る加熱式たばこは、2本で1組の発熱線を備え樹脂で被覆された1枚のフィルム状ヒーターにより加熱されエアロゾルとガスの混合気が発生させる。加熱式たばこは、ヒーターによる外周からの加熱と、吸引動作に伴いたばこロッド部の反吸口端から再構成たばこシート小片の集合体内へ導入される外気により冷却される。従って、加熱式たばこがエアロゾルとガスの混合気が発生させる際の再構成たばこシート小片の集合体の温度分布は一様ではなく、次の3か所：反吸口側端から1 mmの位置（Top）・中央位置（Middle）・吸口側端から1 mmの位置（End）に挿入した熱電対は、互いに異なる温度変化を示し、同じ位置であっても外周部（Peripheral）と中心部（Center）では異なる温度変化の態様を

示す。さらに、End以外の位置では、吸引動作に伴いたばこロッド部内へ導入される外気により冷却され、短時間の温度下降がある。

[0070] Peripheral-Topにおいて、加熱式たばこの温度変化は、概ね5相に分かれる。第1相は、加熱開始から40秒までである。温度は、40秒以内に75℃へ上昇する。第2相は、40秒以降から135秒までである。温度は、75℃から150℃まで上昇し、それを維持する。第3相は、135秒以降から150秒までである。温度は、150℃から200℃まで上昇する。第4相は、150秒以降から220秒までである。温度は、200℃から230℃まで上昇する。終相は、220秒以降である。温度は、230℃から室温へ下降する。

[0071] Peripheral-Middleにおいて、加熱式たばこの温度変化は、概ね5相に分かれる。第1相は、加熱開始から25秒までである。温度は、150℃へ上昇する。第2相は、25秒以降から135秒までである。温度は、150℃から200℃まで上昇する。第3相は、135秒以降から150秒までである。温度は、200℃から230℃まで上昇する。第4相は、150秒以降から220秒までである。温度は、230℃から240℃まで上昇する。終相は、220秒以降である。温度は、240℃から室温へ下降する。

[0072] Peripheral-Endにおいて、加熱式たばこの温度変化は、概ね4相に分かれる。第1相は、加熱開始から25秒までである。温度は、25秒以内に200℃へ上昇する。第2相は、25秒以降から150秒までである。温度は、200℃から240℃まで上昇し、それを維持する。第3相は、150秒以降から220秒までである。温度は、240℃から200℃まで下降する。終相は、220秒以降である。温度は、200℃から室温へ下降する。

[0073] Center-Topにおいて、加熱式たばこの温度変化は、概ね5相に分かれる。第1相は、加熱開始から40秒までである。温度は、50℃へ上昇する。第2相は、40秒以降から135秒までである。温度は、50℃か

ら125℃まで上昇する。第3相は、135秒以降から150秒までである。温度は、150℃から180℃まで上昇する。第4相は、150秒以降から220秒までである。温度は、200℃から210℃まで上昇する。終相は、220秒以降である。温度は、210℃から室温へ下降する。

[0074] Center-Middleにおいて、加熱式たばこの温度変化は、概ね5相に分かれる。第1相は、加熱開始から25秒までである。温度は、100℃へ上昇する。第2相は、25秒以降から135秒までである。温度は、100℃から180℃まで上昇する。第3相は、135秒以降から150秒までである。温度は、180℃から200℃まで上昇する。第4相は、150秒以降から220秒までである。温度は、200℃から240℃まで上昇する。終相は、220秒以降である。温度は、240℃から室温へ下降する。

[0075] Center-Endにおいて、加熱式たばこの温度変化は、概ね4相に分かれる。1相は、加熱開始から25秒までである。温度は、100℃へ上昇する。第2相は、25秒以降から45秒までである。温度は、100℃から150℃まで上昇する。第3相は、45秒以降から135秒までである。温度は、150℃から230℃まで上昇する。第4相は、135秒以降から220秒までである。温度は、230℃から200℃まで下降する。終相は、220秒以降である。温度は、200℃から室温へ下降する。

上記の温度変化は、各相の遷移に伴い連続的である。

[0076] 第2の態様に係る加熱式たばこの被加熱も第1の加熱式たばこの被加熱と同様に行うことができる。

[0077] 一例として、第1および第2の態様の加熱式たばこに、上記の温度変化をもたらすヒーターは、図1、図2に示すような温度変化の態様を示してよい。

[0078] 第1箇所におけるヒーターの温度変化は、概ね4相に分かれてよい。第1相は、加熱開始から25秒までである。ヒーターの温度は、吸引開始から25秒以内に200℃へ上昇する。第2相は、25秒から150秒までである

。ヒーターの温度は、30秒から45秒までで230℃へ上昇し、以降150秒まで約230℃を維持する。第3相は、150秒以降から220秒までである。ヒーターの温度は、150秒以降は220℃へ下降し220秒まで220℃を維持する。終相は、220秒以降である。ヒーターの温度は、220℃から常温へ下降する。

[0079] 第2箇所におけるヒーターの温度変化は、概ね4相に分かれてよい。第1相は、吸引開始から75秒までである。ヒーターの温度は、吸引開始から75秒以内に100℃まで上昇する。第2相は、75秒から135秒までである。ヒーターの温度は、75秒から80秒までで140℃へ上昇し、以降135秒までで150℃へ上昇する。第3相は、135秒から220秒までである。ヒーターの温度は、135秒から150秒までで230℃へ上昇し、150秒から220秒まで230℃を維持する。終相は、220秒以降である。ヒーターの温度は、230℃から常温へ下降する。第1・第2箇所における温度変化は、各相の遷移に伴い連続的である。

[0080] 第3の態様に係る加熱式たばこの被加熱は、例えば、以下のように行う。霧化部は電熱線、電磁誘導型加熱機構または超音波発振子を含み、使用者による吸引動作の際に電源ユニットから電流が供給されて発熱または動作し、第1カートリッジが含むエアロゾル源を霧化させる。霧化部によって霧化されたエアロゾルを通すことによってエアロゾルに香味を付与する。霧化されたエアロゾルが第2カートリッジを通過する際の、第2カートリッジ内の雰囲気温度は、常温以上、26℃以上、40℃以下、好ましくは30℃以下である。ここで、香味源は加熱されずにエアロゾルに香味を付与することができることに留意すべきである。

[0081] 加熱式たばこのエアロゾルとガスの混合気成分

以下、被限定的に、加熱式たばこのエアロゾルとガスの混合気成分の実施態様を説明する。

[0082] カナダ保健省が定める喫煙条件（C I R条件）、ただし加熱式たばこのフィルター部に設けられた開孔部は塞がない条件で、6回又は8回の喫煙動作

により発生させたエアロゾルとガスの混合気において、たばこロッド1本あたりのカルボニル化合物の量は以下の態様であって良い。

- [0083] 第1の態様において、ホルムアルデヒドは、100.00 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。望ましくは70.00 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。さらに望ましくは、50.00 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以上、70.00 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。最も望ましくは57.60 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以上、68.40 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下であってよい。
- [0084] 第2の態様として、ホルムアルデヒドは、40.00 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。さらに望ましくは37.00 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下である。
- [0085] 第1の態様において、アセトアルデヒドは、3.000 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。望ましくは2.000 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。さらに望ましくは、0.750 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以上、2.000 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。最も望ましくは0.800 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以上、1.400 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下であってよい。
- [0086] 第2の態様として、アセトアルデヒドは、1.000 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。さらに望ましくは0.940 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。
- [0087] 第1の態様において、アクロレインは、3.000 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。望ましくは2.000 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。さらに望ましくは、0.750 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以上、1.500 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。最も望ましくは0.800 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以上、1.200 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下であってよい。
- [0088] 第2の態様として、アクロレインは、0.300 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。さらに望ましくは0.265 ($\mu\text{g}/\text{本}$) 以下が好ましい。
- [0089] 第3の態様において、ホルムアルデヒド、アクロレイン、アセトアルデヒドは、検出限界以下であり、現在の分析技術において0.000 ($\mu\text{g}/\text{本}$) である。
- [0090] カナダ保健省が定める喫煙条件 (C I R 条件)、ただし加熱式たばこのフィルター部に設けられた開孔部は塞がない条件で、8回の喫煙動作により発

生させたエアロゾルとガスの混合気において、たばこロッド1本あたりのTSNAsの量は、カナダ保健省が定める喫煙条件（CIR条件）で喫煙した3R4F紙巻たばこの10%以下であって良い。ホルムアルデヒドは、0%以上、0.80%以上、1.30%以下であってよい。アセトアルデヒドは、0%以上、3.30%以上、3.80%以下であってよい。アクロレインは、0%以上、0.40%以上、0.70%以下であってよい。

[0091] 一態様において、加熱式たばこは、発生するエアロゾルが $1.4\mu\text{g}/\text{本}$ 以下のアセトアルデヒドを含む。

[0092] 一態様において、加熱式たばこは、発生するエアロゾルが $1.2\mu\text{g}/\text{本}$ 以下のアクロレインを含む。

[0093] 一態様において。加熱式たばこは、発生するエアロゾルが $68.4\mu\text{g}/\text{本}$ 以下のホルムアルデヒドを含む。

[0094] カナダ保健省が定める喫煙条件（CIR条件）、ただし加熱式たばこのフィルター部に設けられた開孔部は塞がない条件で、6回又は8回の喫煙動作により発生させたエアロゾルとガスの混合気において、たばこロッド1本あたりのニコチン、グリセリン、プロピレングリコールの量は、以下の態様であって良い。

[0095] 第1の態様において、ニコチンは $0.240\text{mg}/\text{本}$ 以上 $0.510\text{mg}/\text{本}$ 以下、グリセリンは $0.700\text{mg}/\text{本}$ 以上 $2.900\text{mg}/\text{本}$ 以下、プロピレングリコールは $0.020\text{mg}/\text{本}$ 以上 $0.270\text{mg}/\text{本}$ 以下であってよい。

[0096] 第2の態様において、ニコチンは $0.400\text{mg}/\text{本}$ 以上 $0.500\text{mg}/\text{本}$ 以下、グリセリンは $2.000\text{mg}/\text{本}$ 以上 $2.500\text{mg}/\text{本}$ 以下、プロピレングリコールは $0.400\text{mg}/\text{本}$ 以上 $0.500\text{mg}/\text{本}$ 以下であってよい。

[0097] CRM法（CORRESTA RECOMMENDED METHOD No. 81）条件に準拠し、第3の態様において、50回の吸煙動作で発生させたエアロゾルとガスの混合気において、ニコチンは $1.000\text{mg}/\text{本}$

以上 1.500mg/本以下、グリセリンは 20.00mg/本以上 30.00mg/本以下、プロピレングリコールは 40.00mg/本以上 60.00mg/本以下であってよい。

[0098] 本発明は、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法であり、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患を、従来知られていなかった喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを統計的に定量評価する方法を提供するものである。本発明の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを統計的に定量評価する方法の利用により、上記のような、リスク低減製品（喫煙または吸引に伴う健康リスクを低減させる可能性のある加熱式たばこ）を提供するものである。

実施例

[0099] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0100] 実施例 1 細胞培養

ヒト気道上皮細胞 MucilAir（登録商標）は Epithelix 社より購入した。試験には 37℃、5% CO₂ 環境下で 10 日間培養したものを使用し、培養時は 2-3 日ごとに培地交換を行った。

[0101] 実施例 2 マイクロアレイ試験

COPD の発症は、活性酸素由来の酸化ストレス、長期的な酸化ストレスに伴う炎症応答、DNA 損傷に起因する、と仮定し、これら生体応答を誘起する物質を陽性対照試薬とした曝露実験を行った。

[0102] 具体的には、まず、単回曝露試験として、MucilAir（登録商標）に対し、任意の濃度で NaClO、tBHQ、TNF α 、IL-1 β 、シスプラチン、ブレオマイシンの各物質を陽性対照試薬として添加した。NaClO 及び tBHQ は酸化ストレス、TNF α 及び IL-1 β は炎症応答、シスプラチン及びブレオマイシンは DNA 損傷の各応答を誘起する。各物質の

添加の4時間後にmRNAを抽出した。mRNA抽出にはキアゲン社のRNeasyを使用した。mRNA抽出後、Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix社)を用いてマイクロアレイデータを取得した(データ1:陽性対照試薬曝露データ)。

[0103] 同様に、参照シガレットとして試験用標準紙巻たばこ3R4Fを使用し、ISO(国際標準化機構)方式(ISO:3308)に準拠した方法で発生させた主流煙を培地中に通して回収した(全煙バブリング溶液)。3R4Fを0.5本/L、1.0本/L、2.0本/Lの濃度で調整した全煙バブリング溶液を作製し、上記同様の手法により細胞に添加、mRNA抽出、マイクロアレイデータの取得を行った(データ2:3R4Fリファレンスシガレット曝露データ)。

[0104] 次に、頻回曝露試験として、3R4Fおよび第3の態様に係る加熱式たばこの主流煙からそれぞれISO方式、CRM法(CORRESTA RECOMMENDED METHOD No. 81)で発生させた主流煙を回収し、取得した全煙バブリング溶液を希釈することで複数濃度の試験液を調整した(3R4F:25-200パフ/L、1R6F:50-200パフ/L、NGP1:250-2000パフ/L、NGP2:200-2000パフ/L)。

[0105] 加熱式たばこについては、3R4F及び1R6Fの対照試料よりも10倍多い回数を捕集することで細胞に曝露されるニコチン量が3R4F及び1R6Fと同程度かそれ以上になるように調整した。即ち、細胞に曝露される総粒子状物質が、3R4F及び1R6Fの対照試料と比較して10倍多い換算となる試料を調製した。

[0106] これらの試験液をMucilAir(登録商標)に添加し、24時間曝露を行った。曝露後、mRNAの抽出を行い、マイクロアレイデータの取得を行った(データ3:3R4Fリファレンスシガレット&NGP1曝露データ、データ4:1R6Fリファレンスシガレット&NGP2曝露データ)。

[0107] 実施例3 マイクロアレイデータ解析

実施例2で得られたデータ1：陽性対照試薬曝露データ、データ2：3R4Fリファレンスシガレットデータ、データ3：3R4Fリファレンスシガレット&NGP1曝露データ、データ4：1R6Fリファレンスシガレット&NGP2曝露データ、および公共データベースのマイクロアレイデータ（E-MTAB-1690，E-GEOD-20257，E-GEOD-8545）のCELファイルに関し、試験ごとにGeneSpring ver. 14.9（Agilent Technologies社）による正規化を行った。正規化のアルゴリズムとしてはGC-Robust Multiarray Average（GC-RMA）を用い、全サンプルの平均値を用いたベースライン補正を行った。正規化後のデータに対し、統計分析フリーソフト「R」を使用して遺伝子名のアノテーションを行った。

[0108] 実施例4 データ分析

本実施例では、実施例3で得られたマイクロアレイデータの分析を行った。GeneSpringのアルゴリズムを用い、ユークリッド距離を用いたウォード法によりクラスター解析を行った。ロジスティック回帰分析に関しては統計分析フリーソフト「R」を使用し、ライブラリーとしてMASS，caret，data.tableを用い、ロジスティック回帰分析を行った。

データ1：陽性対照試薬曝露データに関しては、GeneSpringを用いてクラスター解析を行い、共通した変動特徴を有する遺伝子群を抽出した。

データ2：3R4Fリファレンスシガレット曝露データに関しては、各たばこ煙濃度曝露時に共通して変動する遺伝子群を抽出した。

[0109] データ1：陽性対照試薬曝露データとデータ2：3R4Fリファレンスシガレット曝露データで抽出された遺伝子群を比較したところ、共通する遺伝子15個（TXNIP，EFNA1，CYP1B1，ADM，AREG，DUSP6，SLC7A11，IGFBP3，WNT5A，CXCR4，PHLDA1，HILPDA，ZBED2，EGLN3，FBXO32）が抽出

された(図3)。これら遺伝子の機能、および閉塞性肺疾患との関連性について既報が存在するかどうかを調査した結果を表1に示す。

[0110] [表1]

本発明において慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価に用いる遺伝子とその機能

遺伝子	遺伝子産物の公知の機能
ADM	血管拡張、ホルモン分泌、血管申請及び抗微生物活性を含む、複数の機能を有するプレプロホルモン。
AREG	EGFファミリーのメンバー、EGF/TGF- α 受容体と相互作用し、正常な上記細胞の成長を促進する。
CXCR4	間質細胞由来因子-1に特異的なCXCケモカイン受容体。
CYP1B1	シトクロムP450スーパーファミリー酵素のメンバー。たばこ喫煙曝露によって、高発現が観察される。
DUSP6	ホスファターゼサブファミリーの二重特異性タンパク質。細胞の増殖及び分化に関与するMAPKスーパーファミリーを負に制御する。
EFNA1	エフリンファミリーのメンバー。その標的受容体は、タンパク質チロシンキナーゼを含み、発生事象の仲介に関与している。
EGLN3	低酸素誘導因子。好中球炎症の低酸素制御に必須であり、そして、DNA損傷応答に重要な役割を有する。
FBXO32	リン酸化依存性ユビキチン化、及び続くプロテアソーム分解において機能する、F boxタンパク質。
HILPDA	低酸素誘導脂質液滴関連タンパク質。サイトカインの発現を刺激し、そして、細胞成長及び増殖を促進する。
IGFBP3	インスリン様増殖因子結合タンパク質ファミリー。IGF類の半減期を延ばし、それらの細胞表面受容体との相互作用を変化させる。
PHLDA1	プロリン-ヒスチジンリッチ各タンパク質。インスリン様増殖因子-1の抗アポトーシス性効果において重要な機能を果たしうる。
SLC7A11	アニオン性アミノ酸と、システイン及びグルタミンのアニオン性型とを高特異的に交換する、ナトリウム依存性、高親和性のアンチポーター。
TXNIP	チオレドキシンの抗酸化機能を阻害し、活性酸素の蓄積及び細胞ストレスを生じさせる、チオレドキシ結合タンパク質。
WNT5A	Wntファミリーメンバー5A。7膜貫通受容体のFrizzledファミリーのメンバーのリガンド。
ZBED2	ZincフィンガーBED型含有2。

[0111] 上記15個の遺伝子の遺伝子群を用いて、マイクロアレイデータベースに存在する健常人とCOPD患者（それぞれNS群、COPD群と称す）の肺のマイクロアレイデータ（E-MTAB-1690, E-GEOD-20257, E-MTAB-8545）を用いたロジスティック回帰による判別分析を行った。結果を表2に示す。

[0112] [表2]

本発明において抽出された15遺伝子を用いた慢性閉塞性肺疾患患者の判別結果

Truth/Predicted	NS	COPD	True rate
NS	33.8	7.1	0.826
COPD	7.6	51.5	0.871
Accuracy	0.8531		

[0113] ロジスティック回帰モデルからの交差検証結果（5重の交差検証を独立に100回繰り返した。統計分析フリーソフト「R」を用いた統計解析の結果から、本発明のモデルによるNS群をNS群と判別する精度が0.826、COPD群をCOPD群と判別する精度が0.871、総合的な精度が0.8531と、いずれにおいても非常に高い精度であった。このことは、ヒト気道上皮細胞のインビトロの3DモデルにおいてCOPDリスク評価が可能な遺伝子が抽出できたことを意味する。

[0114] 実施例5 ロジスティック回帰分析によるリスク評価

本実施例では、実施例4で見出された15個の遺伝子（TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32）の遺伝子群を用いて、実際の健常人、喫煙者、およびCOPD患者の公共マイクロアレイデータを使用したロジスティック回帰分析による判別を行った。

[0115] 変数減少法（寄与度の高い遺伝子をAIC（赤池情報量基準）ないしBI

C（ベイズ情報基準）を基に算出する方法）によりAICないしBICが最も少なくなる遺伝子群についてそれぞれ探索した。その結果、健常人と喫煙者の判別に関しては11遺伝子（TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, HILPDA, EGLN3, AREG, FBXO32）、喫煙者とCOPD患者の判別に関しては4遺伝子（EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG）が判別における寄与の高い遺伝子として抽出された。変数減少後の遺伝子を用いたロジスティック回帰式の切片および係数の値（Estimate）、またそれらの統計値（Std. Error、Z value、Pr(>|Z|)）について、結果を以下の表3に示す。

[0116] [表3]

変数減少法により選択された遺伝子を用いたロジスティック回帰式の切片および係数の値、およびそれらの統計値の結果

	Estimate	Std. Error	Z value	Pr(> Z)
(Intercept)	1.6715	0.4229	3.953	7.73E-05
HLT SMK				
ADM	-2.2568	1.0247	-2.202	0.027641
AREG	2.0152	1.0407	1.936	0.05282
CXCR4	-3.1177	1.4308	-2.179	0.029336
EFNA1	3.7889	1.9572	1.936	0.052882
EGLN3	-4.0571	1.7627	-2.302	0.021357
FBXO32	-3.8824	2.4113	-1.610	0.107376
HILPDA	3.2193	0.8100	3.974	7.06E-05
IGFBP3	-8.2992	2.3747	-3.495	0.000474
SLC7A11	-3.5355	1.2516	-2.825	0.00473
TXNIP	-5.6745	1.4851	-3.821	1.33E-04
WNT5A	2.7391	0.8231	3.328	8.75E-04
				AIC 105.3177
				BIC 141.9099

	Estimate	Std. Error	Z value	Pr(> Z)
(Intercept)	-0.8555	0.2144	-3.990	6.61E-05
SMK COPD				
AREG	-1.3039	0.7058	-1.847	0.06469
DUSP6	1.4688	0.6254	2.349	0.01885
EFNA1	2.3861	0.9058	2.634	0.00843
TXNIP	-0.8847	0.5167	-1.712	0.08687
				AIC 166.2157
				BIC 180.7789

[0117] 各ロジスティック回帰式で算出される確率からポテンシャルリスク値（Potential Risk Factor, PRF）を算出した。発症確率およびポテンシャルリスク値は下記のように算出した。

[0118] (i) 11個の遺伝子（TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, HILPDA, EGLN3, AREG, FBXO32）の発現に関するマイクロアレイデータに基づき、

あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、以下の確率を算出した。

[化10]

$$\text{logit}(P_{SMK}) = \ln\left(\frac{P_{SMK}}{1 - P_{SMK}}\right) = C_{NS/SMK} + \beta_1 a_1 + \beta_2 a_2 + \dots + \beta_{11} a_{11}$$

[上記式において、 $C_{NS|SMK}$ は切片を、 β_i は各々の遺伝子に対する係数を、 a_i はマイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値を示す。切片、係数の値は表3に示す。]

[0119] (i i) 4個の遺伝子(EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG)の発現に関するマイクロアレイデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された係数を用いて、以下の確率を算出した。

[化11]

$$\text{logit}(P_{COPD}) = \ln\left(\frac{P_{COPD}}{1 - P_{COPD}}\right) = C_{SMK/COPD} + \gamma_1 b_1 + \gamma_2 b_2 + \dots + \gamma_5 b_5$$

[上記式において、 $C_{SMK|COPD}$ は切片を、 γ_i は各々の遺伝子に対する係数、 b_i はマイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値を示す。切片、係数の値は表3に示す。]

(i i i) 確率 P_{SMK} および確率 P_{COPD} から、前記紙巻たばこの煙の吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを、以下のPRF

[化12]

$$PRF = \frac{p_{SMK} \times p_{COPD}}{1 - (p_{SMK} \times p_{COPD})}$$

として算出した。

[0120] 上記計算式を用いて健常人(NS)、健常な喫煙者(SMK)、COPD患者(COPD)のPRFを算出した。結果を、図4に示す。図4に示され

る通り、PRFは、非喫煙者で0.06、喫煙者で0.46、COPD患者で0.83であり、非喫煙の健常者と比較して、PRFの増加が認められた。

[0121] 実施例6 種々の濃度、種々の曝露期間の香味吸引器に対するリスク評価

実施例5に記載の回帰式を用いて、各種たばこ製品の種々の濃度、種々の曝露期間について、頻回曝露試験のPRFを算出した。結果を図5に示す。NGP曝露群のPRFの平均値はいずれの濃度、曝露期間においても上記で設定した範囲に収まることが明らかとなった。

[0122] 喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法によりリスク評価を行ったところ、既存の紙巻きたばこと比べてNGPのPRFが非常に低いことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0123] 本発明の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法は、喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患を従来知られていなかった喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを統計的に定量評価するために利用できる。本発明の喫煙または吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法により、リスク低減製品（喫煙または吸引に伴う健康リスクを低減させる可能性のある製品）の研究・開発に利用できる。

請求の範囲

[請求項1] 吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法であって、

(1) 加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32

を含む11以上の遺伝子の発現に関するデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、以下の確率 P_{SMK}

[化1]

$$\text{logit}(P_{SMK}) = \ln\left(\frac{P_{SMK}}{1 - P_{SMK}}\right) = C_{NS/SMK} + \beta_1 a_1 + \beta_2 a_2 + \dots + \beta_x a_x$$

[上記式において、 $C_{NS/SMK}$ は切片を、 β_i は各々の遺伝子に対する係数を、 a_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのG-C-RMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 x は11－15のいずれかの整数を示す。]

を算出し；

(2) 加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液に曝露した気道上皮細胞における以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

を含む4以上の遺伝子の発現に関するに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された切片および係数を用いて、以下の確率 P_{COPD}

[化2]

$$\text{logit}(P_{COPD}) = \ln\left(\frac{P_{COPD}}{1 - P_{COPD}}\right) = C_{SMK/COPD} + \gamma_1 b_1 + \gamma_2 b_2 + \dots + \gamma_y b_y$$

[上記式において、 $C_{SMK/COPD}$ は切片を、 γ_i は各々の遺伝子に対する係数を、 b_i は遺伝子発現データであり、マイクロアレイデータのGC-RMAによる正規化後の値またはqPCR法による遺伝子発現の定量値を示す。 y は4-10のいずれかの整数を示す。]

を算出し；

(3) 確率 P_{SMK} および 確率 P_{COPD} から、前記加熱式たばこの吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクを、以下のPRF

[化3]

$$PRF = \frac{p_{SMK} \times p_{COPD}}{1 - (p_{SMK} \times p_{COPD})}$$

として算出する、

ことを含む、前記インビトロ評価方法。

[請求項2]

工程(1)において、11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG,

F B X O 3 2

のすべての遺伝子の発現に関するデータに基づくロジスティック回帰分析により、確率 P_{SMK} を算出する、請求項1に記載のインビトロ評価方法。

[請求項3] 工程(2)において、4個の遺伝子：

E F N A 1, T X N I P, D U S P 6, A R E G

のすべての遺伝子の発現に関するデータに基づき、あらかじめ公共データを用いたロジスティック回帰分析により算出された係数を用いて、確率 P_{COPD} を算出する、請求項1または2に記載のインビトロ評価方法。

[請求項4] 気道上皮細胞が、哺乳類の気道上皮細胞である、請求項1-3のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法。

[請求項5] 気道上皮細胞がヒト気道上皮細胞、マウス気道上皮細胞、またはラット気道上皮細胞である、請求項1-4のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法。

[請求項6] 気道上皮細胞が三次元培養細胞である、請求項1-5のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法。

[請求項7] 気道上皮細胞が気液界面培養下である、請求項1-6のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法。

[請求項8] 加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む溶液を、最大濃度2000パフ/Lで24時間曝露した気道上皮細胞において、PRFが0.8以下の範囲である場合に、当該加熱式たばこの吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクは低いまたはない、と判断する、請求項1-7のいずれか1項に記載の方法。

[請求項9] 2種類の加熱式たばこについてPRFを比較し、PRFがより低い加熱式たばこの方を、吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクがより低い、と判断する、請求項1-8のいずれか1項に記載の方法。

[請求項10] (1)以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の11個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, ADM, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, HILPDA, EGLN3, CXCR4, AREG, FBXO32

を含む11以上の遺伝子の発現に関するデータ、並びに、

(2) 以下の15個の遺伝子：

TXNIP, EFNA1, CYP1B1, ADM, AREG, DUSP6, SLC7A11, IGFBP3, WNT5A, CXCR4, PHLDA1, HILPDA, ZBED2, EGLN3, FBXO32

のうちの少なくとも以下の4個の遺伝子：

EFNA1, TXNIP, DUSP6, AREG

を含む4以上の遺伝子の発現に関するデータ

の、吸引による慢性閉塞性肺疾患のリスクのインビトロ評価方法への利用。

[請求項11]

加熱式たばこであって、

再構成たばこからなるエアロゾル源を、直接または間接に電氣的に加熱する、という構造的特徴を有し、

当該加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む試料溶液を用いて請求項1－6のいずれか1項に記載のインビトロ評価方法を行った場合に、加熱式たばこのエアロゾルあるいはエアロゾル中の粒子状物質を含む溶液を、最大濃度2000パフ/Lで24時間曝露した気道上皮細胞における、PRFが0.8以下の範囲である、前記加熱式たばこ。

[請求項12]

再構成たばこが、平均粒径0.2mm以下の再構成たばこ顆粒であ

って、そして、

多孔性物質または繊維からなる担体の全て又はその一部が電気ヒーターで加熱されて生ずるプロピレングリコールとグリセリンの混合蒸気により再構成たばこ顆粒が加熱される、
請求項 1 1 に記載の加熱式たばこ。

[請求項13] 再構成たばこが、平均短辺長1mm以上、平均長辺長5mm以下の再構成たばこシートであって、巻紙にくるまれ、たばこロッドを構成し、そして、

前記たばこロッドが、巻紙の外周と接するから電気ヒーターにより加熱される、

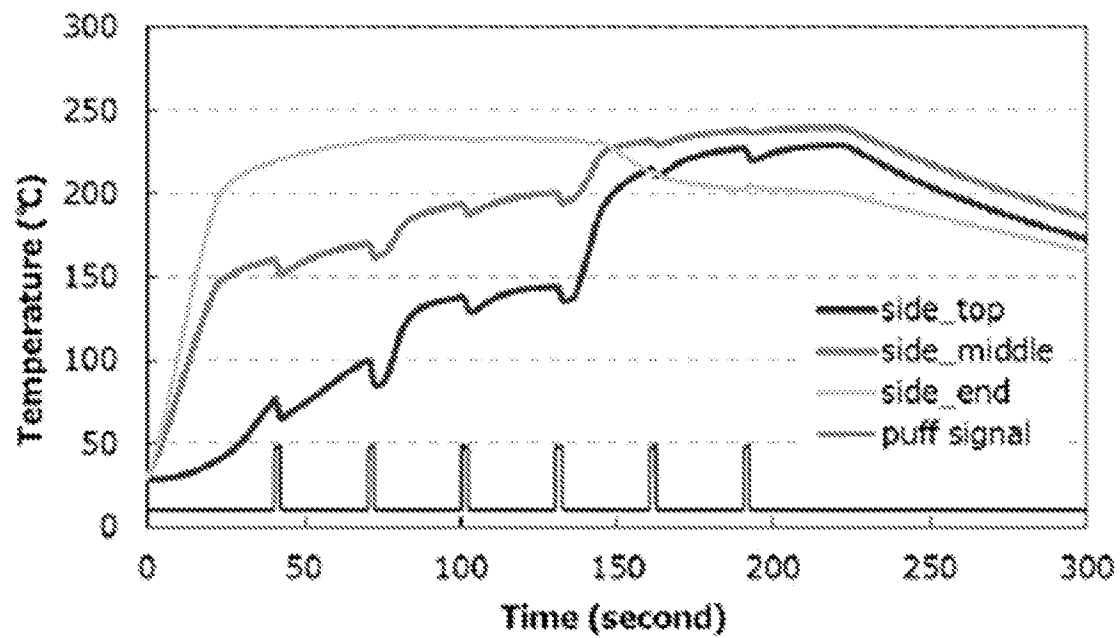
請求項 1 1 記載の加熱式たばこ。

[請求項14] 請求項 1 1 - 1 3 いずれか 1 項に記載の加熱式たばこであって、発生するエアロゾルが1.4 μg / 本以下のアセトルデヒドを含む、加熱式たばこ。

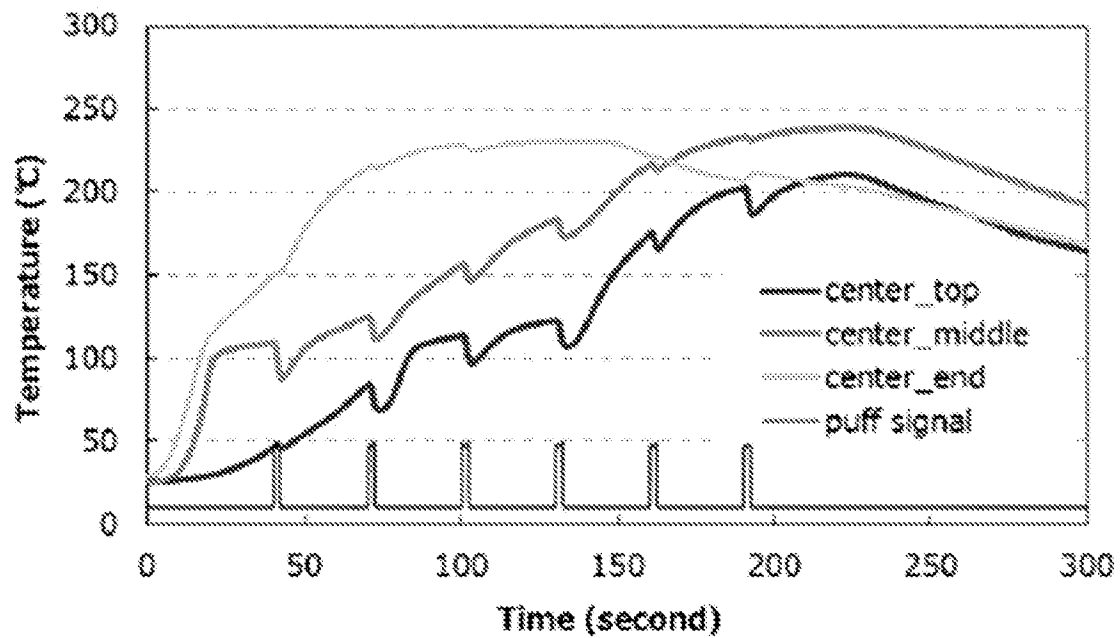
[請求項15] 請求項 1 1 - 1 3 いずれか 1 項に記載の加熱式たばこであって、発生するエアロゾルが1.2 μg / 本以下のアクロレインを含む、加熱式たばこ。

[請求項16] 請求項 1 1 - 1 3 いずれか 1 項に記載の加熱式たばこであって、発生するエアロゾルが68.4 μg / 本以下のホルムアルデヒドを含む、加熱式たばこ。

[図1]

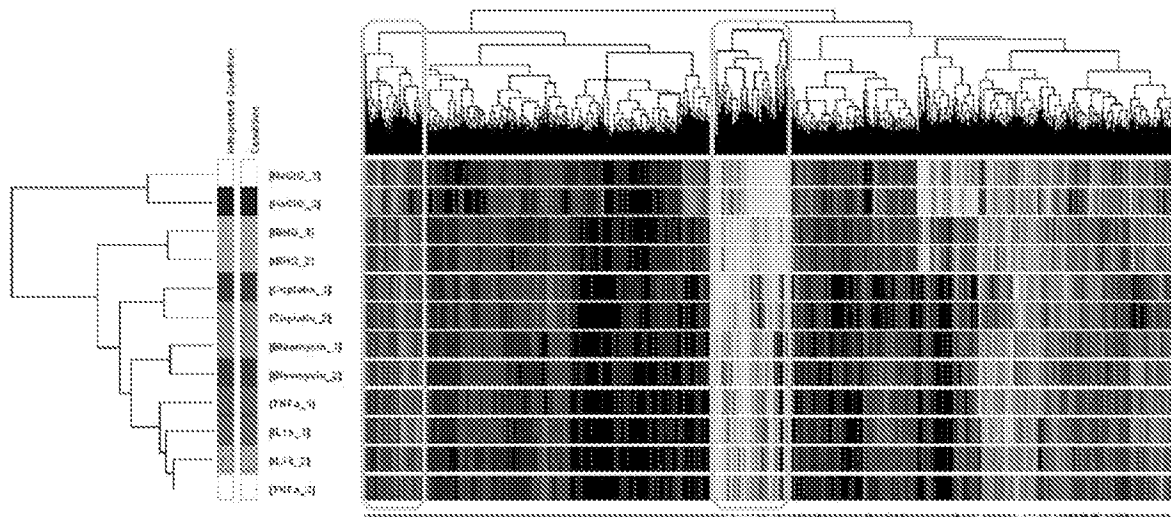


[図2]

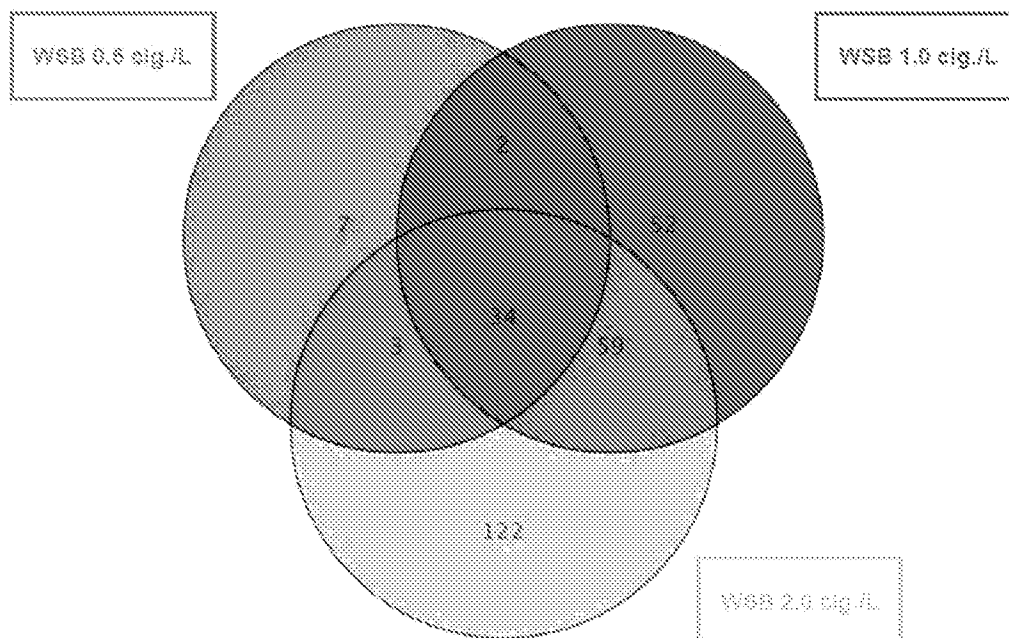


[図3]

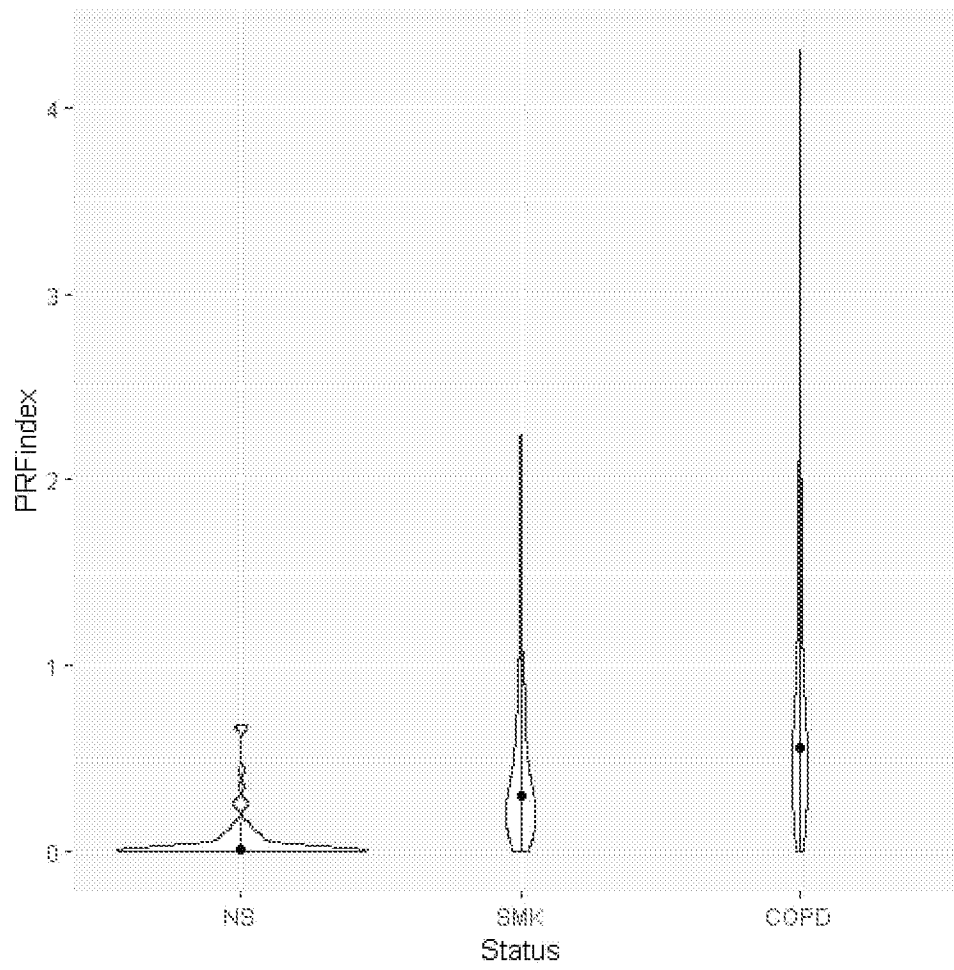
A



B



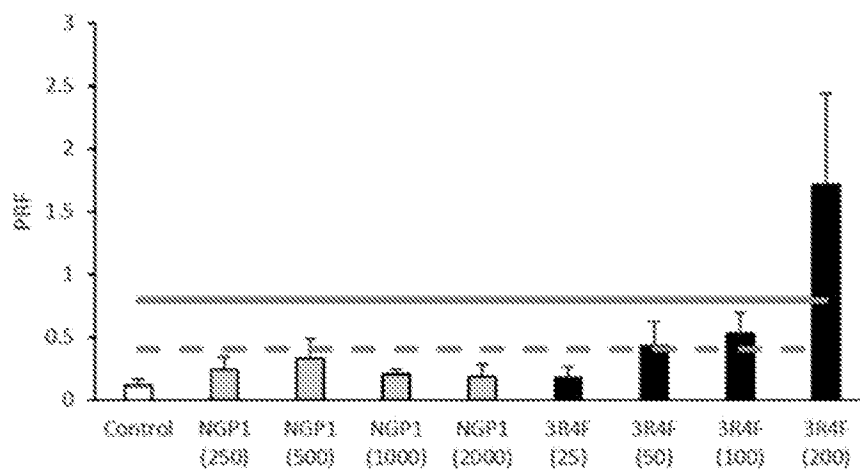
[図4]



[図5]

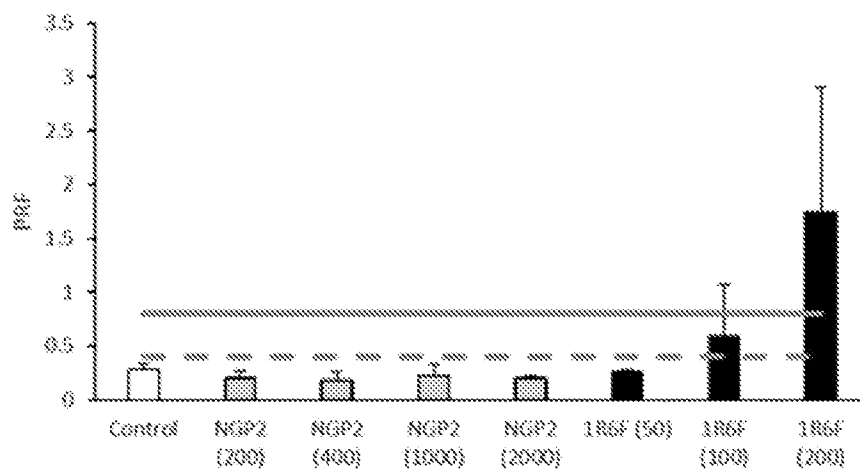
A

データ3:NGP1



B

データ4:NGP2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/049086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A24F47/00 (2020.01) i, C12Q1/06 (2006.01) i, C12Q1/6837 (2018.01) i,
C12Q1/6851 (2018.01) i, C12Q1/686 (2018.01) i, C01N33/50 (2006.01) i
FI: C12Q1/6837 Z, G01N33/50 P, C12Q1/6851 Z, C12Q1/686 Z, C12Q1/06, A24F47/00

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)

Int. Cl. A24F47/00, C12Q1/06, C12Q1/6837, C12Q1/6851, C12Q1/686,
G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

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

WPI; JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2016-528234 A (VOERMAN, Gerard) 15 September	11-13
Y	2016, claims 1, 12, 14, 15, paragraph [0044]	14-16
X	WO 2018/045174 A1 (BAYBUTT, RICHARD) 08 March	11-13
Y	2018, claims 1, 12, 19, 30	14-16
Y	JP 2018-78902 A (ALTRIA CLIENT SERVICES LLC) 24 May 2018, claims, paragraph [0064]	14-16
Y	JP 2018-78805 A (TRADE WORKS CO., LTD.) 24 May 2018, claim 1, paragraph [0014], examples	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
21.02.2020

Date of mailing of the international search report
03.03.2020

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/049086

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2017-519521 A (TRANSGENION-INTERNATIONAL INSTITUTE FOR REGENERATIVE TRANSLATIONAL MEDICINE GMBH) 20 July 2017, entire text, all drawings	1-16
A	US 2006/0211026 A1 (BELLONI, P. N. et al.) 21 September 2006, entire text, all drawings	1-16
A	US 2014/0135302 A1 (SOMALOGIC, INC.) 15 May 2014, entire text, all drawings	1-16
A	US 2016/0024583 A1 (ALLEGRO DIAGNOSTICS CORP.) 28 January 2016, entire text, all drawings	1-16
A	WO 2006/105252 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO) 05 October 2006, entire text, all drawings	1-16
A	US 2010/0119474 A1 (CRYSTAL, R. G. et al.) 13 May 2010, entire text, all drawings	1-16
A	WO 2013/190092 A1 (PHILIP MORRIS PRODUCTS S.A.) 27 December 2013, entire text, all drawings	1-16
A	STEILING, K. et al., A Dynamic Bronchial Airway Gene Expression Signature of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Function Impairment, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, 01 May 2013., vol. 187, iss. 9, pp. 933 - 942, entire text, all drawings	1-16
A	GOSSELINK, J. V. et al., Differential Expression of Tissue Repair Genes in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, 14 January 2010, vol. 181, pp. 1329-1335, entire text, all drawings	1-16
A	SAVARIMUTHU FRANCIS, S. M. et al., Genes and Gene Ontologies Common to Airflow Obstruction and Emphysema in the Lungs of Patients with COPD, PLOS one, 15 March 2011, vol. 6, Issue 3, e17442, pp. 1-7, entire text, all drawings	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/049086

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BHATTACHARYA, S. et al., Molecular Biomarkers for Quantitative and Discrete COPD Phenotypes, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 10 October 2008, vol. 40, pp. 359-367, entire text, all drawings	1-16
A	JP 2004-121218 A (JENOKKUSU SOYAKU KENKYUSHO KK) 22 April 2004, entire text, all drawings	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2019/049086

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2016-528234 A	15.09.2016	US 2016/0177285 A1 claims 1, 12, 14, 15, paragraph [0051] WO 2016/020070 A1 EP 3030254 A1 CA 2920452 A AU 2014304578 A CN 105592854 A KR 10-2016-0054475 A EA 201690335 A	
WO 2018/045174 A1	08.03.2018	US 2019/0192449 A1	
JP 2018-78902 A	24.05.2018	US 2013/0192615 A1 claims, paragraph [0083] WO 2013/116558 A1 EP 2809180 A1 AU 2013214987 A CA 2862105 A IL 233851 A CA 2867620 A KR 10-2014-0125822 A CN 104219973 A MX 2014009396 A MA 20150056 A NZ 628058 A RU 2014135386 A UA 111988 C ES 2612531 T PL 2809186 T BR 112014018881 A PL 2809182 T	
JP 2018-78805 A	24.05.2018	(Family: none)	
JP 2017-519521 A	20.07.2017	US 2017/0349947 A1 entire text, all drawings WO 2015/185653 A2 EP 3152328 A1 CA 2953209 A	
US 2006/0211026 A1	21.09.2006	WO 2006/097244 A2	
US 2014/0135302 A1	15.05.2014	WO 2014/074682 A1 CN 104812913 A HK 1211991 A	
US 2016/0024583 A1	28.01.2016	WO 2014/186036 A1 EP 2968988 A1	
WO 2006/105252 A2	05.10.2006	(Family: none)	
US 2010/0119474 A1	13.05.2010	WO 2008/109773 A2	
WO 2013/190092 A1	27.12.2013	(Family: none)	
JP 2004-121218 A	22.04.2004	US 2005/0208496 A1 entire text, all drawings EP 1394274 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A24F 47/00(2020.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; C12Q 1/6837(2018.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; C12Q 1/686(2018.01)i; G01N 33/50(2006.01)i FI: C12Q1/6837 Z; G01N33/50 P; C12Q1/6851 Z; C12Q1/686 Z; C12Q1/06; A24F47/00		
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）） A24F47/00; C12Q1/06; C12Q1/6837; C12Q1/6851; C12Q1/686; G01N33/50 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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） WPI; JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); 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
X	JP 2016-528234 A (フォールマン、ジェラルド) 15.09.2016 (2016-09-15)	11-13
Y	請求項1, 12, 14, 15, 段落[0044]	14-16
X	WO 2018/045174 A1 (BAYBUTT, RICHARD) 08.03.2018 (2018-03-08)	11-13
Y	請求項1, 12, 19, 30	14-16
Y	JP 2018-78902 A (アルトリア クライアント サービスズ エルエルシー) 24.05.2018 (2018-05-24) 特許請求の範囲、段落[0064]	14-16
Y	JP 2018-78805 A (株式会社トレードワークス) 24.05.2018 (2018-05-24) 請求項1, 段落[0014], 実施例	14-16
A	JP 2017-519521 A (トランスゲニオンインターナショナル インスティテュート フォー リジェネレイティブ トランスレイショナル メディシン ゲーエムペー ハー) 20.07.2017 (2017-07-20) 全文、全図	1-16
☒ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 21.02.2020		国際調査報告の発送日 03.03.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 牧野 晃久 4N 4438 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	US 2006/0211026 A1 (BELLONI, P. N et al.) 21.09.2006 (2006 - 09 - 21) 全文、全図	1-16
A	US 2014/0135302 A1 (SOMALOGIC, INC.) 15.05.2014 (2014 - 05 - 15) 全文、全図	1-16
A	US 2016/0024583 A1 (ALLEGRO DIAGNOSTICS CORP.) 28.01.2016 (2016 - 01 - 28) 全文、全図	1-16
A	WO 2006/105252 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO) 05.10.2006 (2006 - 10 - 05) 全文、全図	1-16
A	US 2010/0119474 A1 (CRYSTAL, R. G. et al.) 13.05.2010 (2010 - 05 - 13) 全文、全図	1-16
A	WO 2013/190092 A1 (PHILIP MORRIS PRODUCTS S. A.) 27.12.2013 (2013 - 12 - 27) 全文、全図	1-16
A	STEILING, K. et al., A Dynamic Bronchial Airway Gene Expression Signature of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Function Impairment, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, 2013.05.01, Vol. 187, Iss. 9, pp. 933- 942 全文、全図	1-16
A	GOSSELINK, J. V. et al., Differential Expression of Tissue Repair Genes in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, 2010.01.14, Vol. 181, pp.1329-1335 全文、全図	1-16
A	SAVARIMUTHU FRANCIS, S. M. et al., Genes and Gene Ontologies Common to Airflow Obstruction and Emphysema in the Lungs of Patients with COPD, PLOS one, 2011.03.15, Vol.6, Issue 3, e17442, pp.1-7 全文、全図	1-16
A	BHATTACHARYA, S. et al., Molecular Biomarkers for Quantitative and Discrete COPD Phenotypes, AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 2008.10.10, Vol.40, pp.359-367 全文、全図	1-16
A	JP 2004-121218 A (株式会社ジェノックス創薬研究所) 22.04.2004 (2004 - 04 - 22) 全文、全図	1-16

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2019/049086

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2016-528234	A	15.09.2016	US 2016/0177285 A1 請求項1, 12, 14, 15, 段落 [0051] WO 2016/020070 A1 EP 3030254 A1 CA 2920452 A AU 2014304578 A CN 105592854 A KR 10-2016-0054475 A EA 201690335 A	
WO	2018/045174	A1	08.03.2018	US 2019/0192449 A1	
JP	2018-78902	A	24.05.2018	US 2013/0192615 A1 請求の範囲、段落[0083] WO 2013/116558 A1 EP 2809180 A1 AU 2013214987 A CA 2862105 A IL 233851 A CA 2867620 A KR 10-2014-0125822 A CN 104219973 A MX 2014009396 A MA 20150056 A NZ 628058 A RU 2014135386 A UA 111988 C ES 2612531 T PL 2809186 T BR 112014018881 A PL 2809182 T	
JP	2018-78805	A	24.05.2018	(ファミリーなし)	
JP	2017-519521	A	20.07.2017	US 2017/0349947 A1 全文、全図 WO 2015/185653 A2 EP 3152328 A1 CA 2953209 A	
US	2006/0211026	A1	21.09.2006	WO 2006/097244 A2	
US	2014/0135302	A1	15.05.2014	WO 2014/074682 A1 CN 104812913 A HK 1211991 A	
US	2016/0024583	A1	28.01.2016	WO 2014/186036 A1 EP 2968988 A1	
WO	2006/105252	A2	05.10.2006	(ファミリーなし)	
US	2010/0119474	A1	13.05.2010	WO 2008/109773 A2	
WO	2013/190092	A1	27.12.2013	(ファミリーなし)	
JP	2004-121218	A	22.04.2004	US 2005/0208496 A1 全文、全図	

国際出願番号
PCT/JP2019/049086

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
EP 1394274 A2			