

(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6月4日(04.06.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/111239 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/405 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/046809

(22) 国際出願日: 2019年11月29日(29.11.2019)

(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 2018-224169 2018年11月29日(29.11.2018) JP

(71) 出願人: 学校法人慶應義塾(**KEIO UNIVERSITY**)
[JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目
1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 福田 真嗣(**FUKUDA, Shinji**); 〒9970035
山形県鶴岡市馬場町 1 4 番 1 号 慶應義塾大
学先端生命科学研究室内 Yamagata (JP). 田
中 一己(**TANAKA, Kazuki**); 〒9970035 山形県
鶴岡市馬場町 1 4 番 1 号 慶應義塾大学先
端生命科学研究室内 Yamagata (JP).

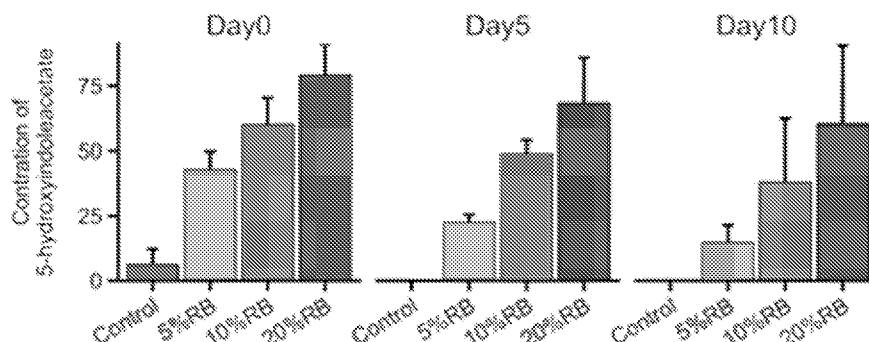
(74) 代理人: 特許業務法人酒井国際特許
事務所 (**SAKAI INTERNATIONAL PATENT**
OFFICE); 〒1000013 東京都千代田区霞が
関 3 丁目 8 番 1 号 虎の門三井ビル
ディング Tokyo (JP).

(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,

(54) **Title:** ANTI-INFLAMMATORY AGENT

(54) 発明の名称: 抗炎症剤

【図5-4】



(57) **Abstract:** The present invention provides a means and a method that are useful for inhibiting inflammation (for example, preventing and treating inflammatory bowel disease). More specifically, provided are the following inventions. [I] An anti-inflammatory agent comprising 5-hydroxyindoleacetate. [II] A method for screening an anti-inflammatory agent, said method comprising: (1) measuring the amount of 5-hydroxyindoleacetate in a sample which is collected from a mammal administered with a test substance; and (2) selecting a test substance, which causes an increase in the amount of 5-hydroxyindoleacetate in the sample, as an anti-inflammatory agent. [III] A method for screening an anti-inflammatory agent, said method comprising: (1) culturing mammal-derived cells capable of producing 5-hydroxyindoleacetate in a medium containing a test substance; (2) measuring the amount of 5-hydroxyindoleacetate in the medium; and (3) selecting



CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

a test substance, which causes an increase in the amount of 5-hydroxyindoleacetate in the medium, as an anti-inflammatory agent.

(57) 要約: 本発明は、炎症の抑制 (例、炎症性腸疾患の予防・治療) に有用な手段および方法を提供する。より具体的には、本発明は、以下の発明を提供する。〔1〕5-ヒドロキシインドール酢酸を含む抗炎症剤。〔11〕以下を含む、抗炎症剤のスクリーニング方法: (1) 被験物質が投与された哺乳動物から採取されたサンプル中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を測定すること; および (2) サンプル中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。〔111〕以下を含む、抗炎症剤のスクリーニング方法: (1) 被験物質を含む培地中で、5-ヒドロキシインドール酢酸の産生能を有する哺乳動物由来細胞を培養すること; (2) 培地中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を測定すること; (3) 培地中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。

明 細 書

発明の名称：抗炎症剤

技術分野

[0001] 本発明は、抗炎症剤などに関する。

背景技術

[0002] 近年、栄養介入による生活習慣病〔例、メタボリックシンドローム、2型糖尿病（T2D）および炎症性腸疾患（IBD）〕の予防が一般的であり、消費者は健康を維持するために栄養摂取を意識している。納豆、味噌、抹茶などの伝統的な日本食は、健康増進のために有名である。それらは腸内環境にプラスの影響を及ぼし、健全な宿主の状態を維持することによってプレバイオティクスおよび／またはプロバイオティクスとして作用する。

[0003] 例えば、玄米に含まれる米糠（RB）は、一般的に消費される日本食の一つであり、大腸炎を抑制できることが報告されている（非特許文献1～4）。RBは、食物繊維、ビタミン、遊離アミノ酸、および胃腸の健康および抗大腸炎の効果を促進する可能性のある抗酸化物質（γ-オリザノールおよびフェルラ酸）等の生物活性成分の豊富な供給源である（非特許文献2、3、5、6）。しかしながら、RBの構成成分の複雑さのために、RBによる大腸炎抑制の分子メカニズムは未だ解明されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Al-Fayez M et al., Cancer Chemother Pharmacol. 2006; 58 (6) : 816-25.

非特許文献2：Islam MS et al., Br J Pharmacol. 2008; 154 (4) : 812-24.

非特許文献3：Komiya Y et al., Scand J Gastroenterol. 2011; 46 (1) : 40-52.

非特許文献4: Shafie NH et al., Int J Mol Sci. 2013; 14 (12): 23545-58.

非特許文献5: Choi J et al., Nutr J. 2014; 13 (1): 35.

非特許文献6: Islam J et al., Nutrients. 2017; 9 (7): 747.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、炎症の抑制（例、炎症性腸疾患の予防・治療）に有用な手段および方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、鋭意検討した結果、RBによる大腸炎の抑制が腸内細菌による5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）の産生により引き起こされ得るものであり、5-HIAAが抗炎症作用を有することを見出した。

本発明者らはまた、5-HIAAが抗炎症作用を有することに照らすと、哺乳動物または哺乳動物由来細胞における5-HIAAの量を増加させる被験物質をスクリーニングすることにより、抗炎症剤を開発できることを見出した。

[0007] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 5-ヒドロキシインドール酢酸を含む抗炎症剤。

〔2〕 抗炎症剤が腸内の炎症に対する抗炎症剤である、〔1〕の抗炎症剤。

〔3〕 腸内の炎症が炎症性腸疾患である、〔2〕の抗炎症剤。

〔4〕 経口用組成物または経直腸投与用組成物である、〔1〕～〔3〕のいずれかの抗炎症剤。

〔5〕 医薬または食品である、〔1〕～〔4〕のいずれかの抗炎症剤。

〔6〕 以下を含む、抗炎症剤のスクリーニング方法：

（1）被験物質が投与された哺乳動物から採取されたサンプル中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を測定すること；および

(2) サンプル中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。

〔7〕サンプルが糞便である、〔6〕の方法。

〔8〕以下を含む、抗炎症剤のスクリーニング方法：

(1) 被験物質を含む培地中で哺乳動物由来細胞を培養すること；

(2) 培地中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を測定すること；

(3) 培地中の5-ヒドロキシインドール酢酸の量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。

〔9〕5-ヒドロキシインドール酢酸の産生能を有する哺乳動物由来細胞が腸内細菌である、〔8〕の方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、5-HIAAにより、炎症の抑制（例、炎症性腸疾患の予防・治療）を実現することができる。

また、本発明によれば、5-HIAA量を指標にすることにより、抗炎症剤をスクリーニングすることができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、動物実験の概要を示す図である。

[図2-1]図2-1は、体重減少に対する米糠（RB）食の影響を示す図である。図2-1～図2-3において、コントロールと各グループの間の有意性が示される。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

[図2-2]図2-2は、疾患活性指数（DAI）に対するRB食の影響を示す図である。有意性については図2-1を参照。

[図2-3]図2-3は、大腸長に対するRB食の影響を示す図である。有意性については図2-1を参照。

[図2-4]図2-4は、大腸形態に対するRB食の影響を示す図である。

[図2-5]図2-5は、大腸組織学に対するRB食の影響を示す図である。倍率200xであり、棒は100 μ mを示す。

[図2-6]図2-6は、遺伝子発現量に対するRB食の影響を示す図である。

[図3-1]図3-1は、体重減少に対するR B食の分画成分の影響を示す図である。図3-1～図3-3において、コントロールと各グループの間の有意性が示される。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

[図3-2]図3-2は、D A Iに対するR B食の分画成分の影響を示す図である。

[図3-3]図3-3は、大腸長に対するR B食の分画成分の影響を示す図である。

[図3-4]図3-4は、大腸形態に対するR B食の分画成分の影響を示す図である。

[図3-5]図3-5は、腸内細菌叢に対するR B食の分画成分の影響を示す図である。

[図4-1]図4-1は、D S S誘発性大腸炎マウスについて、R Bによる、糞便中細菌叢の組成の変化を示す図である。相対存在量が全配列の1%を超える上位20個で検出された糞便細菌科の相対存在量が棒グラフにより表される。

[図4-2]図4-2は、S i m p s o nの多様性の変化を示す図である。図4-2および図4-3において、コントロールと各グループの間の有意性が示される。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 。

[図4-3]図4-3は、0日目に有意に変化した細菌科の一部のボックスプロットを示す図である。

[図5-1]図5-1は、糞便中代謝物データの主成分分析（P C A）を示す図である。

[図5-2]図5-2は、糞便中代謝物データの主成分分析（P C A）のP C 2の因子負荷量の上位10個と下位10個を示す図である。

[図5-3]図5-3は、糞便中のトリプトファン代謝関連の代謝物を示す図である。

[図5-4]図5-4は、糞便中5-H I A Aの濃度を示す図である。図5-5において、コントロールと各グループの間の有意性が示される。 $*P<0.0$

5、** $P < 0.01$ 。

[図6-1]図6-1は、AhR強制発現RAW264.7を5-HIAAで処理したときのCyp1a1の相対発現量を示す図である。

[図6-2]図6-2は、各細菌群を定着させたGFマウスの糞便中の5-HIAA濃度を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 1. 抗炎症剤

本発明は、5-HIAAを含む抗炎症剤を提供する。

[0011] 5-HIAAは、セロトニンの代謝産物であり、所定の細胞（例、セロトニン産生能を有する哺乳動物細胞、腸内細菌等の常在微生物）内でセロトニンから生合成される。したがって、5-HIAAは、セロトニン産生細胞（例、天然細胞、または上記のような生合成系を組み込んだ形質転換細胞）を用いて調製することができる。5-HIAAはまた、有機化学的方法により合成することもできる。あるいは、5-HIAAとしては、市販されているものを利用してもよい。

[0012] 本発明の抗炎症剤が適用され得る炎症としては、哺乳動物において発生し得る任意の炎症である限り特に限定されない。このような炎症が発生し得る部位としては、例えば、腸内（例、小腸内、大腸内）、鼻腔内、気管支内、皮膚、口腔内が挙げられる。部位としては、腸内が好ましく、大腸内がより好ましい。

[0013] 好ましくは、炎症は、炎症性疾患における炎症である。このような炎症性疾患としては、例えば、炎症性腸疾患（例、潰瘍性大腸炎、クローン病、ベーチェット病）、口内炎、腎炎、自己免疫疾患（例、アレルギー性疾患）が挙げられる。炎症としては、炎症性腸疾患が好ましい。したがって、本発明の抗炎症剤は、このような炎症性疾患の予防または治療剤として使用することができる。

[0014] 抗炎症剤として使用される5-HIAAの量は、抗炎症作用を発揮できる限り、特に限定されないが目安として説明すると以下のとおりである。実施

例において、炎症性腸疾患モデルの哺乳動物（マウス）から採取された糞便中の5-HIAAの濃度は約100nmol/g、RB摂食哺乳動物（マウス）から採取された糞便中の5-HIAAの濃度は約800nmol/gであることが確認されている。すなわち、哺乳動物の対象部位の5-HIAAの濃度は300nmol/g以上（例、300~1500nmol/g）の範囲にあることが望ましいと考えられる。例えば哺乳動物の腸内において当該範囲の濃度を達成するためには、哺乳動物における5-HIAAの投与または摂取量は、例えば0.01~100g/kgであり、好ましくは0.5~50g/kgであり、より好ましくは1~10g/kgである。したがって、本発明の抗炎症剤は、このような量の5-HIAAを含んでいてもよい。あるいは、哺乳動物の腸内または腸内以外の部位に5-HIAAが適用される場合、例えば0.01~1000mg/mlであり、好ましくは0.1~100mg/mlであり、より好ましくは1~10mg/mlの濃度範囲において5-HIAAが適用されるように、本発明の抗炎症剤は、このような濃度範囲の5-HIAAを含んでいてもよい。

[0015] 特定の実施形態では、本発明の抗炎症剤は、組成物の形態で提供されてもよい。

[0016] 例えば、本発明の抗炎症剤は、医薬組成物の形態で提供される場合、5-HIAAに加えて、医薬上許容され得る担体を含んでいてもよい。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤

、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。医薬組成物は、固形物（例、カプセル剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤）、半固形物（例、ゲル剤）、液状物（例、経口用液剤、または経直腸用液剤、点眼剤、点耳剤、経鼻用剤等の非経口用液剤）が挙げられる。

[0017] 特定の好ましい実施形態では、医薬組成物の形態である本発明の抗炎症剤は、5-HIAAに加えて、抗炎症作用を有する他の物質、および／または抗炎症作用を有する微生物を含んでいてもよい。抗炎症作用を有する他の物質としては、例えば、ステロイド性抗炎症薬、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）等の薬物；動植物等の天然物からの抽出物；抗体医薬が挙げられる。抗炎症作用を有する微生物としては、例えば、クロストリジウム属細菌、バクテロイデス属細菌、ラクトバチルス属細菌、ビフィドバクテリウム属細菌等が挙げられる。

[0018] 本発明の抗炎症剤が食品組成物の形態で提供される場合、5-HIAAは、食品に添加された形態で提供されてもよく、あるいは、サプリメントのように主成分として用いられてもよい。食品としては、例えば、液状物（例、飲料、アルコール類）、半固形物（例、ヨーグルト、ゼリー）、固形物（例、スナック、チョコレート）が挙げられる。

[0019] 特定の好ましい実施形態では、食品組成物の形態である本発明の抗炎症剤は、5-HIAAに加えて、抗炎症作用を有する他の物質、および／または抗炎症作用を有する微生物を含んでいてもよい。このような他の物質および微生物は、上述したものと同様である。

[0020] 好ましい実施形態では、本発明の抗炎症剤は、経口用組成物または経直腸投与用組成物であってもよい。このような本発明の抗炎症剤は、哺乳動物の

腸内において、抗炎症作用を発揮することができる。経口用組成物および経直腸投与用組成物における5-HIAAの含有量は、5-HIAAの上記投与または摂取量と同様である。経口用組成物は、医薬組成物および食品組成物において上述したような固形物、半固形物、または液状物として使用することができる。経直腸投与用組成物は、半固形物、または液状物として使用することができる。

[0021] 本発明の抗炎症剤は、任意の哺乳動物に適用することができる。このような哺乳動物としては、例えば、霊長類（例、ヒト、サル、チンパンジー）、齧歯類（例、マウス、ラット、ウサギ）、家畜および使役動物（例、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギ、ヒツジ）が挙げられる。哺乳動物としては、霊長類または齧歯類が好ましく、霊長類がより好ましく、臨床応用の観点からはヒトがさらに好ましい。

[0022] 2. 抗炎症剤のスクリーニング方法

本発明は、哺乳動物から採取されたサンプル、または哺乳動物由来細胞を用いる、抗炎症剤のスクリーニング方法を提供する。哺乳動物、および抗炎症剤は、上述したものと同様である。

[0023] 一実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、以下を含む：

（1）被験物質が投与された哺乳動物から採取されたサンプル中の5-HIAAの量を測定すること；および

（2）サンプル中の5-HIAAの量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。

[0024] 工程（1）では、被験物質は、公知物質および新規物質を含む任意の物質である。このような被験物質としては、例えば、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、核酸（例、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）、糖質（例、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖）、脂質（例、飽和または不飽和の直鎖、分岐鎖および／または環を含む脂肪酸）、アミノ酸、蛋白質（例、オリゴペプチド、ポリペプチド、抗体またはその断片）、固相合成やファージディスプレイ

レイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。あるいは、被験物質としては、微生物（例、腸内細菌等の常在微生物）が利用されてもよい。

[0025] サンプルは、哺乳動物から非侵襲的に採取可能であるサンプル、または哺乳動物から侵襲的に採取可能なサンプルである。哺乳動物から非侵襲的に採取可能であるサンプルとしては、例えば、排泄物サンプル（例、糞便、尿）、液体サンプル（例、唾液、涙液、汗）、粘膜サンプル（例、鼻腔内粘膜、口腔内粘膜）が挙げられる。哺乳動物から侵襲的に採取可能であるサンプル（例、生検サンプル）としては、例えば、皮膚、気管支、血液、小腸、大腸、盲腸、腎臓から採取可能なサンプルが挙げられる。サンプルとしては、哺乳動物から非侵襲的に採取可能であるサンプルが好ましく、糞便がより好ましい。サンプルは、予備処理に付されてもよい。このような予備処理としては、例えば、液体への溶解、遠心分離、抽出、加熱、凍結、冷蔵が挙げられる。

[0026] 5-HIAAの量の測定は、任意の方法により行うことができる。このような方法としては、例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析、免疫アッセイ、比色法が挙げられる。5-HIAAの量は、サンプルの単位量あたりの5-HIAA濃度として測定されてもよい。

[0027] 本実施形態では、工程（1）の前に、哺乳動物に被験物質を投与することをさらに含むことができる。投与されるべき被験物質の量は、適宜調整することができる。例えば、効力が強い抗炎症剤のスクリーニングが特に所望される場合、投与されるべき被験物質の量は、低量（例、0.05～10 g/kg）に設定することができる。あるいは、効力が強い抗炎症剤のスクリーニングが特に所望されない場合には、投与されるべき被験物質の量は、より高量（例、10～100 g/kg）に設定されてもよい。

[0028] 別の実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、以下を含む：

（1）被験物質を含む培地中で、5-HIAAの産生能を有する哺乳動物由来細胞を培養すること；

(2) 培地中の5-HIAAの量を測定すること；

(3) 培地中の5-HIAAの量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。

[0029] 工程(1)では、被験物質を含む培地中で哺乳動物由来細胞が培養される。被験物質は、上述したものと同様である。培地中の被験物質の濃度は、適宜調整することができる。例えば、効力が強い抗炎症剤のスクリーニングが特に所望される場合、培地中の被験物質の濃度は、低濃度(例、1 nM~10 μM)に設定することができる。あるいは、効力が強い抗炎症剤のスクリーニングが特に所望されない場合には、培地中の被験物質の濃度は、より高濃度(例、100 nM~10 mM)に設定されてもよい。

[0030] 工程(1)で用いられる哺乳動物由来細胞は、5-HIAAの産生能を有する限り特に限定されない。このような哺乳動物由来細胞は、哺乳動物細胞、または哺乳動物に存在する微生物であり、好ましくは、哺乳動物に存在する微生物である。哺乳動物に存在する微生物は、哺乳動物において炎症が発生し得る部位(例、上述の部位)に存在する常在微生物であり、好ましくは、腸内細菌である。

[0031] 腸内細菌等の常在微生物は、他の微生物との混合物の形態において、または他の微生物との非混合物の形態において、培養することができる。例えば、特定の腸内細菌が他の腸内細菌との混合物の形態において培養される場合、このような混合物は、哺乳動物の糞便から上述のとおり回収することにより入手することができる。

[0032] 腸内細菌等の常在微生物の培養は、常在微生物の培養に用いられる一般的な培地と同様の培地を用いて、常在微生物の一般的な培養条件下で行うことができる。例えば、腸内細菌の一般的な培地および培養条件は、周知である(例、(1) Fukuda S. et al., J Vet Med Sci., 2002 Nov; 64 (11): 987-92、(2) Fukuda S. et al., J Gen Appl Microbiol., 2005 Apr; 51 (2): 105-13、(iii) Fukuda

S. et al., Sci Rep., 2018 Jan 11; 8 (1) : 435)。

[0033] 例えば、培地は、炭素源、窒素源、有機微量栄養源、ビタミン、無機イオン等の成分を含むことができる。炭素源としては、例えば、単糖類（例、グルコース）、二糖類、オリゴ糖類、多糖類等の炭水化物；ショ糖を加水分解した転化糖；グリセロール；メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸塩、一酸化炭素、二酸化炭素等の炭素数が1の化合物；コーン油、パーム油、大豆油等のオイル；酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸；コハク酸、乳酸などの有機酸；動物油脂；動物オイル；飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸等の脂肪酸；脂質；リン脂質；グリセロ脂質；モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド等のグリセリン脂肪酸エステル；微生物性タンパク質、植物性タンパク質等のポリペプチド；加水分解されたバイオマス炭素源等の再生可能な炭素源；酵母エキス；馬血清；糞便抽出物；肉エキス；野菜エキス；胃内容物抽出物；又はこれらを組み合わせたものが挙げられる。窒素源としては、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水が挙げられる。有機微量栄養源としては、例えば、レーホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。ビタミンとしては、例えば、ビタミンB1、B2、B3、B6、B12、C、K1が挙げられる。無機イオンとしては、例えば、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオンが挙げられる。

[0034] 培養条件について説明すると、例えば、培地における腸内細菌密度は、例えば $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ 細胞/mLであり、好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/mLであり、より好ましくは $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 細胞/mLである。培養温度は、例えば30～40℃である。培養期間は、例えば1～7日である。嫌氣的培養条件または好氣的培養条件のいずれも利用することができるが、嫌氣的培養条件が好ましい。嫌氣的培養条件下の酸素濃度は、例えば0～5%、好ましくは0～3%、より好ましくは0～2%、さらによ

り好ましくは0～1％である。

[0035] 本発明のスクリーニング方法は、例えば、抗炎症作用を有する新規医薬または食品の開発、ならびに既存の作用に加え、抗炎症作用をさらに有する複合的な作用を発揮できる医薬または食品の開発のために有用である。

実施例

[0036] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0037] (方法)

(1) マウスと飼料

5週齢の雌のC57BL/6JマウスをClea Japan, Inc. から購入した。制御された光条件下(12時間明/12時間暗サイクル)でマウスを飼育した。水道水または2.0% DSS(分子量36,000～50,000; MP Bio Japan)を与え、AIN-93G(オリエンタル酵母)または5%RB、10%RB、20%RB、 γ -オリザノール、RBオイルおよび脱脂RB(AIN-93G)を与えた。RBサンプルはRicotech Inc. によって提供され、 γ -オリザノール、RBオイルおよび脱脂RBは、Oryza Oil & Fat Chemical Inc. によって提供された。

[0038] (2) 動物実験

この研究では、2回の動物実験を行った。第1の実験では、米糠(RB)の効果を検証し、RB濃度依存性を調べた。第2の実験では、RBの成分を分画して、どの成分がRBの大腸炎抑制効果に寄与するかを調べた。両方の実験において、1週間の馴化期間の後、以下のようにマウスを無作為に4または6のグループ(各グループでn=5～7)に割り当てた: コントロール: AIN-93G食および2.0%(w/v) DSS水を10週間投与することにより大腸炎を誘発した。5%RB、10%RB、20%RB、RB、RBG(ガンマオリザノール)、RBO(RBオイル)およびRBD(脱脂RB): 5%RB、10%RB、20%RB、20%RB、 γ -オリザノー

ル、R B オイルおよび脱脂R Bを添加したA I N-9 3 G食および水道水を1週間、次いで2.0% D S S水をそれぞれ10日間間投与した。実験期間中、全てのマウスからの糞便試料を、16 S r R N A遺伝子分析のために毎日収集した。さらに、D S S投与期間中、大腸炎の重篤度は、後述のD A I評価に記載されているように評価した。D S S投与後10日目に、全てのマウスを解剖した。大腸および大腸内容物を収集し、大腸長を測定した。すべてのサンプルを-80℃で保存した。

[0039] (3) 糞便収集

糞便試料を、キャピラリー電気泳動エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析(C E T O F M S)および16 S r R N A遺伝子解析のために収集した。すべてのマウスを別々のケージに入れた。毎日マウス1匹につき5個の糞便ペレットを、オートクレーブされたピンセットでチューブに採取し、氷上に置いた。これらのサンプルは、その後分析するまで-80℃で保存した。

[0040] (4) D A I 評価

疾患活性指数(D A I)を毎日測定し、大腸炎の重篤度を評価した。D A Iは、体重変化(0: <1%; 1: 1-5%; 2: 5-10%; 3: 10-15%; 4: >15%)、糞便(0: 陰性、1: +、2: ++、3: +++、4: ++++)、および糞便の硬さ(0: 正常、2: 軟質、4: 下痢)の3つのパラメータの平均を計算することによって決定した。

[0041] (5) 組織病理学

組織病理学的分析のために、大腸の中央部からの代表的なサンプルを10%ホルマリン中に固定し、パラフィンに包埋し、切片にし、ヘマトキシリンおよびエオシン(H & E)で染色し、倍率×200で調べた。

[0042] (6) D N A 抽出

糞便D N A抽出は、いくつかの改変を伴って以前に記載された方法に従って実施された(F u r u s a w a Y e t a l. , N a t u r e. 2013; 504(7480): 446-50.)。V D-800 R凍結乾燥機

(TAITEC)を用いて糞便サンプルを24時間凍結乾燥した。凍結乾燥した糞便を、Shake Master (Biomedical Science)を用いて3.0mmジルコニアビーズ (Biomedical Science)で激しく振とう (1,500 r.p.m. 10分間)して破壊した。糞便試料 (10mg)を、1.0% (w/v) SDS/TE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) 溶液400 μ Lとフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) 400 μ Lで懸濁した。混合液中に0.1mmジルコニア/シリカビーズを加えてシェイクマスターを用いて激しく振とう (1,500 r.p.m. 5分間)してさらに破壊した。17,800 $\times$ gで5分間室温にて遠心分離した後、標準のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール法により糞便抽出物から細菌ゲノムDNAを精製した。RNAをRNase A処理によりサンプルから除去し、次いで標準的なフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール法によりDNAサンプルをもう1回精製した。

[0043] (7) 16S rRNA遺伝子シーケンシング

糞便DNAサンプル中の16S rRNA遺伝子は、いくつかの改変を伴って以前に記載された方法に従ってMiSeqシーケンサー (Illumina)を用いて分析した (Murakami Set al., Altern Med. 2015; 2015:824395.)。要約すると、16S rRNA遺伝子のV1-V2領域は、バクテリアユニバーサルプライマーセット27F mod (5'-AGRGTTTGATYMTGGCTCAG-3' (配列番号1)) (Kim SW et al., DNA Res. 2013; 20(3):241-53.) および338R (5'-TGCTGCCCTCCCGTAGGAGT-3' (配列番号2))を用いて糞便から単離されたDNAから増幅された。Tks Gflex DNA Polymerase (Takara Bio社製)を用いてPCRを行い、98℃で1分間、98℃で10秒間、55℃で15秒間、および68℃で30秒間で30サイクルの増幅を行った後、68℃で3分間最後に伸張させた。増幅

産物をアガロースゲル電気泳動で確認し、Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製し、次に各サンプルに固有の8bpのバーコード配列(Nで示される)であるP5配列を含むフォワードプライマー(5'-NNNNNNNNNTATGGTAAATTGTAGRGTTTGATYMTGGCTCAGT-3' (配列番号3))、Rd1 SP配列及び27Fmodプライマー及びユニークな8bpのバーコード配列(Nで示される)を含む、P7配列を含有するリバープライマー(5'-CAAGCAGAA-GACGGCTATACGAGATNNNNNNN-AGTCAGTCAGCCTGCTGCCTC CCGAGGAGT-3' (配列番号4))、Rd2 SP配列、および338Rプライマー。Agencourt AMPure XPを用いて精製した増幅産物を、Quant-iTPicoGreen DNAアッセイ(Invitrogen)を使用して定量化し、Agilent 2100バイオアナライザ(Agilent Technologies)で品質を制御した各サンプルからほぼ等量のPCRアンプリコンをプールすることにより混合サンプルを調製した。最後に、MiSeq配列決定をプロトコル通りに行った。この研究では、2×300bpのペアエンド配列決定が用いられた。

[0044] (8) キャピラリー電気泳動エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析計を用いたメタボローム解析

メタボローム解析は、以前に記載された方法に従って実施した〔(1) Murakami S et al., Altern Med. 2015; 2015: 824395.、および(2) Mishima E et al., J Am Soc Nephrol. 2015; 26(8): 1787-94.〕。簡潔には、糞便サンプルを凍結乾燥し、上記DNA抽出で記載されているように3.0mmジルコニアビーズで破壊した。糞便サンプルから代謝産物を抽出するために、内部標準(メチオニンスルホンおよびD-ショウノウ-10-スルホン酸(CSA)の各20μM)を含有する500μLのメタノールを10mgの糞便サンプルに添加した。シェイクマスターを用

いて激しく振とう（1, 500 r. p. m. 5分間）して100mgの0.1mmジルコニア／シリカビーズでさらに混合物を破壊した。次に、この混合物を200 μ Lの超純水および500 μ Lのクロロホルムと混合した後、激しく振盪させた（1500 r. p. m. 5分間）。4, 600 $\times$ gで4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した後、上清を遠心フィルターチューブ（Human Metabolome Technologiesのメタボローム抽出用のUltrafreeMC-PLHCC 250/pk）に移してタンパク質および脂質分子を除去した。濾液を遠心分離し、CE-TOFMS分析の直前に参照化合物（それぞれ3-アミノピロリジンおよびトリメシン酸200 μ M）を含有する100 μ Lの超純水に溶解した。

[0045] イオン性代謝産物を、陽性および陰性の両方のモードでCE-TOFMSを用いて分析した。すべてのCE-TOFMS実験は、Agilent CEキャピラリー電気泳動システム（Agilent Technologies）を用いて行った。注釈表は、標準化合物の測定から作成し、同様のm/z値および標準化された移動時間に従ってデータセットと整列させた。次いで、ピーク面積を、それぞれ、カチオン性およびアニオン性代謝産物についての内部標準メチオニンスルホンまたはCSAのピーク面積に対して正規化した。標準化合物の相対ピーク面積および濃度に基づいて、各代謝産物の濃度を算出した。ピーク注釈と定量は、社内ソフトウェア（MasterHands）によって確認された（Sugimoto M et al., Metabolomics, 2010; 6 (1) : 78-95.）。代謝物セット濃縮分析（MSEA）は、DSS投与0日目のコントロールおよび10%RBからの代謝物を用いて行った〔(1) Xia J et al., Nucleic Acids Res. 2010; 38 (SUPPL. 2) .、および(2) Xia J et al., In: Current protocols in bioinformatics, 2016. p. 14. 10. 1-14. 10. 91.〕。

[0046] (9) 統計分析

2つ以上の群間の差異は、スチューデントt検定またはダネット検定によってそれぞれ評価した。体重変化、DAIは双方向反復測定ANOVA、続いて、Holm-Bonferroni手順（これは、anovakunバージョン4.8.0を使用）によって分析した。主成分分析（PCA）は、SIMCAP 13.0.3（Umetrics）によって実施された。MeV TM4ソフトウェア4.7.4を用いて、階層的クラスタリングおよびヒートマップを描画した。

[0047] (10) AhR in vitro試験

マウス由来RAW264.7細胞（RAW/Neo）もしくはAhRを強制発現させたRAW細胞（RAW/AhR）に5-HIAAを溶媒のみ（DMSO）、2 μ M、20 μ M、200 μ M培地に添加して24時間培養した時のCyp1a1の相対発現量を測定した。

[0048] (11) ノトバイオート試験

無菌マウスに溶媒のみもしくはエンテロコッカス属細菌群、ラクトバチルス属細菌群、バクテロイデス属細菌群、クロストリジウム属細菌群を経口投与した。投与1ヶ月後に糞便を採取し、CE-TOFMSを用いて5-HIAAの濃度を測定した。

[0049] (12) FISH解析

大腸を採取し、Methacarn固定法で処理し、パラフィン切片の作成を行った。作成したパラフィン切片をキシレンで脱パラフィンさせたのち、米ぬか摂取マウスで特異的に増加するクロストリジウムをFluorescence in situ hybridization（FISH）法を用いて、16S rRNA標的に染色を行った。FISH染色にクロストリジウムクラスターXIVを特異的に染色するErec482（5'-GCTTCTTAGTCARGTACCG-3'）蛍光標識FISHプローブを用いた。クロストリジウムをFISH染色後、DAPIと蛍光標識のWheat Germ Agglutinin（WGA）レクチンでそれぞれDNAとムチンの染色を行う。

[0050] (結果と考察)

(1) R B摂取によって大腸炎が抑制される(図2)

R B摂取マウスではコントロールと比較して体重減少、D A I、大腸の短縮、大腸炎に対するR B食の効果を評価するために、D S S誘発性大腸炎マウスモデルを用いて動物実験を行った。コントロールにおいて体重は減少したが、R B摂取群では体重減少では抑制された(図2-1)。同様に、コントロール群とR B摂取群との間でD A Iに有意差があった(図2-2)。コントロール群とR B G摂取群との間の大腸長に有意差が観察された(図2-3、2-4)。さらに大腸での血液の量に差があった(図2-3)。大腸の組織切片は、R Bを与えたマウス群において、陰窩上窩のゆがみおよび白血球および好中球の粘膜および浸潤の減少を示した(図2-5)。まとめると、これらの結果は、R B食がD S S誘発大腸炎を抑制できることを示唆している。

[0051] (2) R B脱脂成分は大腸炎を抑制する(図3)

R Bの大腸炎抑制効果に寄与する有効成分を同定するために、R B G、R B DおよびR B Oの3つの成分を使用した。脂肪を含まないR BからなるR B Dは、体重、D A I、ならびに大腸の長さおよび形態に対して有意な大腸炎抑制効果を有する(図3-1~3-4)。特に、観察された大腸炎抑制効果は、R B丸ごと(R B)と同様であった。対照的に、これまでに大腸炎抑制効果を有すると考えられていたR B GおよびR B Oは、有意な大腸炎抑制効果を示さなかった。これらの結果は、R Bの大腸炎抑制効果が主にその脱脂成分に起因する可能性があることを示唆している。

[0052] (3) R B摂取による糞便細菌叢の変化(図4)

R B食餌介入による糞便微生物の組成の動態を評価するために、実験中に毎日採取した便試料を用いて16S rRNA遺伝子解析を行った。59,662個のOTU(operational taxonomic unit)が308個のサンプルから構築された(糞便収集中にいくつかの糞便サンプルが失われた)。糞便細菌叢の科レベルにおける分類学的プロファイリ

ングが示されている（図4-1）。DSS誘発大腸炎マウスの糞便細菌叢の組成は劇的に変化したことが観察された。RBを与えたマウス群における α 多様性はコントロールと比較して有意に高かったか、または遅れていた（図4-2）。糞便細菌叢の変化を調べるために、コントロール群と他の群との間で0日目の各細菌科の相対存在量を比較した。コントロールと比較してRB摂取群では20の科、特に*Bifidobacteriaceae*、*Lactobacillaceae*および*Turicibacteraceae*は有意に増加し、*Bacteroidaceae*、*Erysipelotrichaceae*および*Enterobacteriaceae*は有意な減少を示した（図4-3）。

[0053] （4）RB摂取による糞便中代謝物の変化（図5）

RB摂取による分子レベルの影響を評価するために、0日目、5日目および10日目に収集した糞便サンプルを用いてメタボローム解析を行った。CE-TOFMSおよびガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）によるメタボローム分析は、少なくとも1時点あたり1グループ1匹のマウスの糞便を用い360代謝物を同定した。これらの代謝産物の濃度をコントロールと他の群で比較した（データ示さず）。PCAにおけるコントロールおよびRBマウスの糞便代謝物プロファイルの時間的变化は異なる方向であった（図5-1）。これは、糞便メタボロームプロファイルはDSSの影響を受けたが、RB摂取がその影響を抑制したことを示している。コントロールと比較してRB摂取マウスでは*acetate*、*butyrate*のような短鎖脂肪酸を含む41代謝物が有意に変化していた（図5-2）。腸内微生物叢による食物繊維の発酵によって産生されるSCFAは、好中球におけるアポトーシスの誘導（Maslowski KM et al., GPR43. Nature. 2009; 461 (7268) : 1282-6.）および結腸調節性T細胞（Treg）の分化（Furusawa Y et al., Nature. 2013; 504 (7480) : 446-50.）を介してマウスの大腸炎を抑制する。さらに、SCFAsの濃度の増加は、p

Hの低下をもたらす。より低いpHの存在下では、病原性微生物の数および胆汁酸の溶解度が減少し、それによって二次胆汁酸の腫瘍プロモーター活性の低下をもたらす〔(1) Cook SI et al., *Aliment Pharmacol Ther.* 1998; 12 (6) : 499–507 .、(2) Grubben MJAL et al., *Dig Dis Sci.* 2001; 46 (4) : 750–6.、および(3) Wong JM et al., *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40 (3) : 235–43.〕。したがって、RBのような発酵性食物繊維の摂取量の増加は、大腸炎の抑制に有益であり得る〔(1) Daou C et al., *J Food Sci Technol.* 2014; 51 (12) : 3878–85.、および(2) Park HY et al., *Planta Med.* 2016; 82 (07) : 606–11.〕。我々の研究では、SCFAsの濃度はRB消費によって増加した。最も顕著なSCFAであるacetateは、結腸のpHを低下させるために重要であり〔(1) Duncan SH et al., *Br J Nutr.* 2004; 91 (06) : 915–23.、および(2) Ye H et al., *Sci Rep.* 2016; 6 : 20329.〕、それによって病原性微生物の数および胆汁酸の溶解度が抗炎症特性を有し、マウスの腸上皮の完全性を促進する〔(1) Fukuda S et al., *Nature.* 2011; 469 (7331) : 543–7.、および(2) Macia L et al., *Nat Commun.* 2015; 6 (August) : 6734.〕。また、0日目にコントロールおよび10%RBのメタボロームデータを用いてMSEAを実施した(表1)。ビタミンB6代謝、トリプトファン代謝およびユビキノン生合成などはコントロールと10%RBの間で有意に変化した。トリプトファン代謝関連代謝物のうち5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)がRB摂取によって増加していた(図5-3、5-4)。

[表1]

表1. MSEAの結果: 0日目のコントロールと10%RBでFDR<0.1で有意に変化した代謝パスウェイ

経路	化合物の合計* ¹	ヒット* ²	Holm's P値	FDR* ³
ビタミンB6代謝	10	4	0.001	<0.001
トリプトファン代謝	34	6	0.001	<0.001
ユビキノン整合性	10	1	0.026	0.009
イノシトール代謝	19	1	0.072	0.016
グルタメート代謝	18	4	0.076	0.016
スターチ及びスクロース代謝	14	3	0.288	0.053
タウリン及びヒポタウリン代謝	7	3	0.490	0.070
グリシン、セリン及びスレオニン代謝	26	5	0.495	0.070

*¹: 各経路に対応する代謝物の総数

*²: 各経路における所定のデータセットに由来する代謝物の観察数

*³: MSEAソフトウェアにより提供されたBenjamini及びHochberg法に従う偽発見率 (FDR: False discovery rate)

[0055] (5) 5-HIAAによる大腸炎抑制 (図6)

5-HIAAがAhRリガンドか調べるためにAhR強制発現RAW264.7細胞を5-HIAA (培地中の濃度 2、20、および200 μ M) で処理したところ、コントロールと比較してCyp1a1遺伝子発現量が増加した (図6-1)。また、クロストリジウム属細菌群をGFマウスに定着させたところ、無菌マウスや他の細菌を定着させたときよりも多くの5-HIAAが産生された (図6-2)。大腸断面のFISH解析の結果、RBの繊維質部位にClostridium属細菌群が局在していた。先行研究では、腸内微生物叢によるトリプトファン代謝が、腸ホメオスタシスによく知られた効果を有するサイトカインであるIL-22の産生を調節することにより、AhRを介した粘膜免疫応答において役割を果たすことが示唆されている [(1) Lamas B et al., Nat Med. 2016; 22 (6): 598-605.、(2) Rutz S et al., Immunol Rev. 2013; 252 (1): 116-32.、および (3) Zelante T et al., Immunity. 2013; 39 (2): 372-85.]。さらに、IBD患者では、AhRリガンドの微生物産生の障害が観察される (Lamas B et al., Nat Med. 2016; 22 (6): 598-605.)。我々の研究では、ト

リプトファン代謝はR B消費によって有意にアップレギュレートされていた。したがって、腸内細菌叢由来のトリプトファン代謝は、大腸炎患者のための新しい治療薬の開発の標的となりうる。

産業上の利用可能性

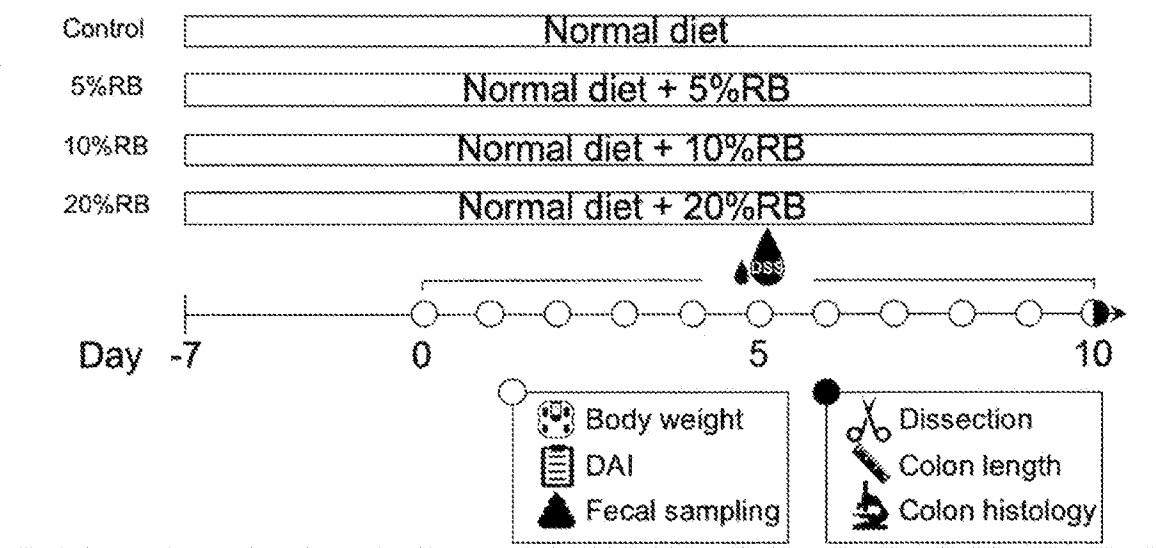
[0056] 本発明の抗炎症剤は、炎症の抑制（例、炎症性腸疾患の予防・治療）に有用である。

本発明のスクリーニング方法は、抗炎症剤の開発に有用である。

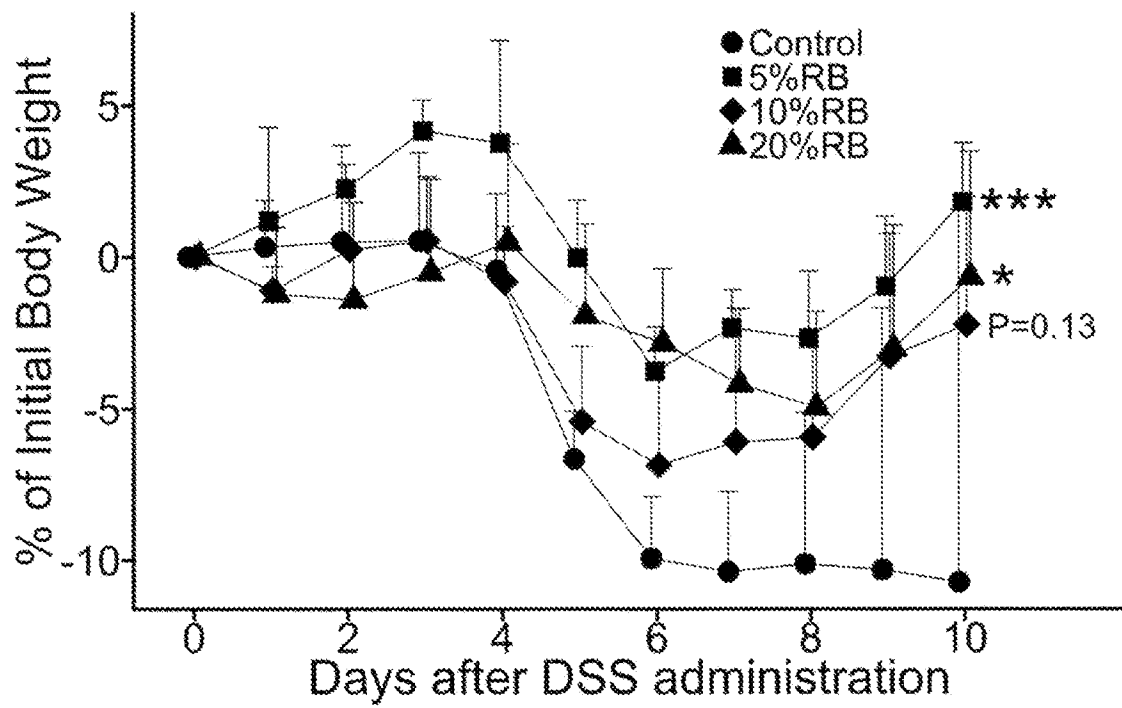
請求の範囲

- [請求項1] 5－ヒドロキシインドール酢酸を含む抗炎症剤。
- [請求項2] 抗炎症剤が腸内の炎症に対する抗炎症剤である、請求項1記載の抗炎症剤。
- [請求項3] 腸内の炎症が炎症性腸疾患である、請求項2記載の抗炎症剤。
- [請求項4] 経口用組成物または経直腸投与用組成物である、請求項1～3のいずれか一項記載の抗炎症剤。
- [請求項5] 医薬または食品である、請求項1～4のいずれか一項記載の抗炎症剤。
- [請求項6] 以下を含む、抗炎症剤のスクリーニング方法：
（1）被験物質が投与された哺乳動物から採取されたサンプル中の5－ヒドロキシインドール酢酸の量を測定すること；および
（2）サンプル中の5－ヒドロキシインドール酢酸の量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。
- [請求項7] サンプルが糞便である、請求項6記載の方法。
- [請求項8] 以下を含む、抗炎症剤のスクリーニング方法：
（1）被験物質を含む培地中で、5－ヒドロキシインドール酢酸の産生能を有する哺乳動物由来細胞を培養すること；
（2）培地中の5－ヒドロキシインドール酢酸の量を測定すること；
（3）培地中の5－ヒドロキシインドール酢酸の量を増加させる被験物質を、抗炎症剤として選択すること。
- [請求項9] 5－ヒドロキシインドール酢酸の産生能を有する哺乳動物由来細胞が腸内細菌である、請求項8記載の方法。

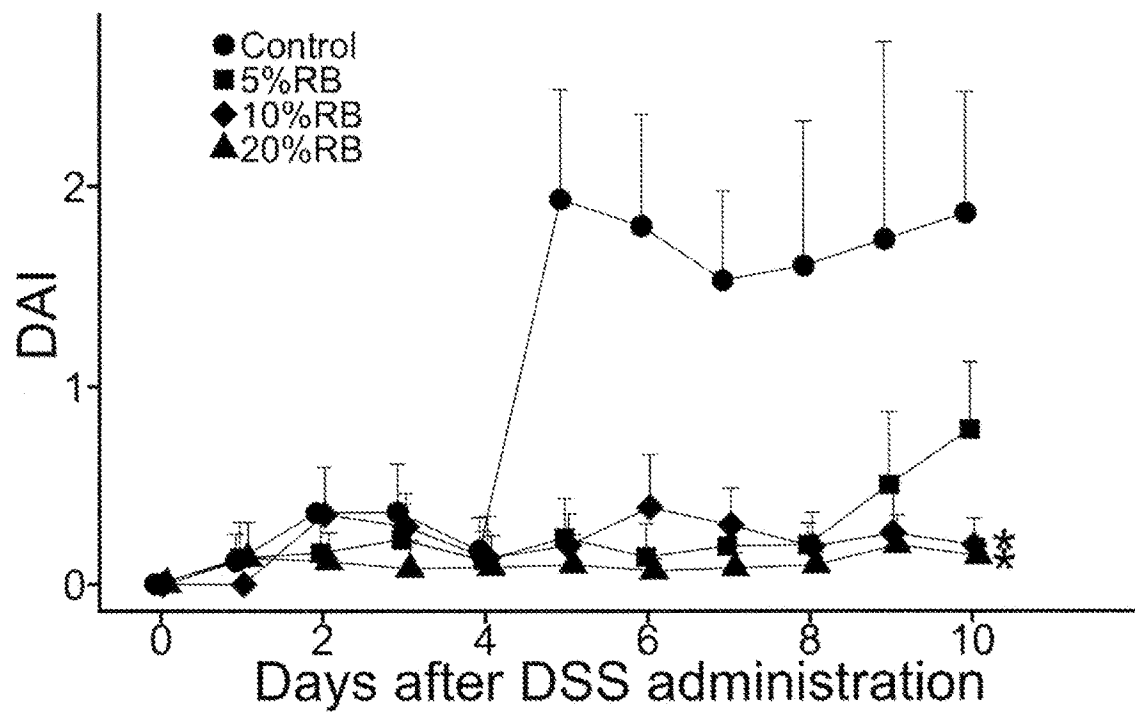
[図1]



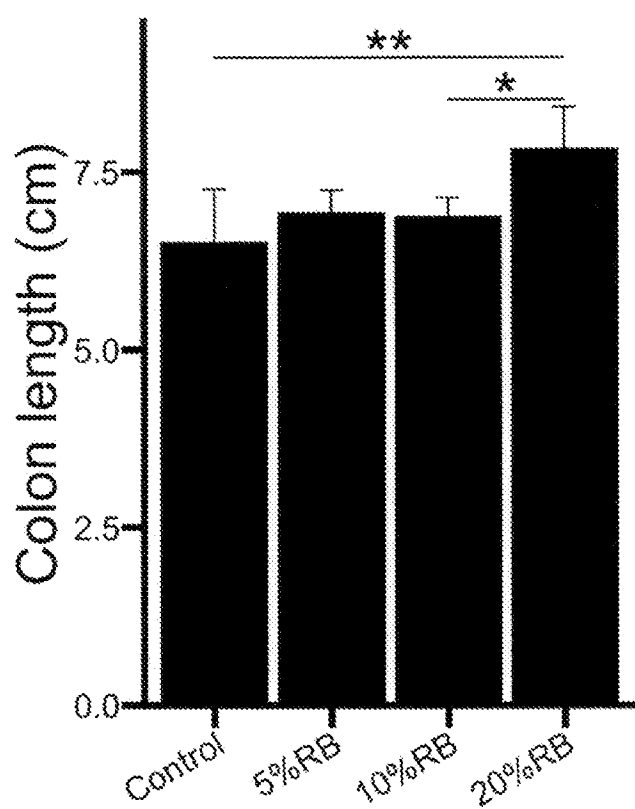
[図2-1]



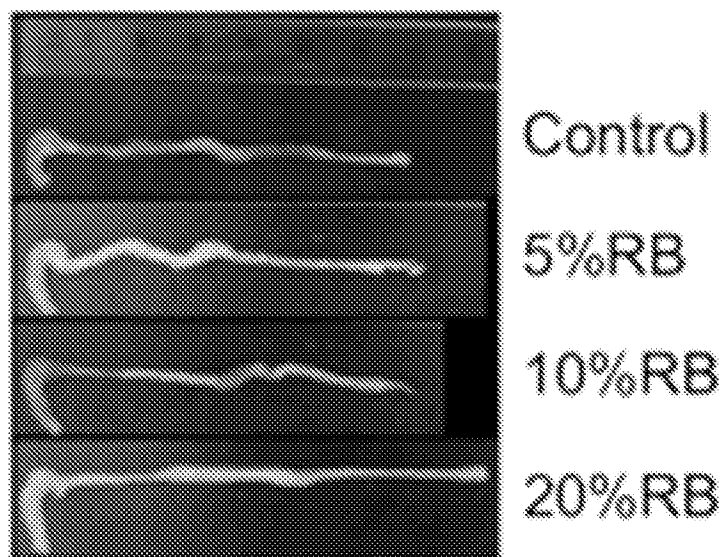
[図2-2]



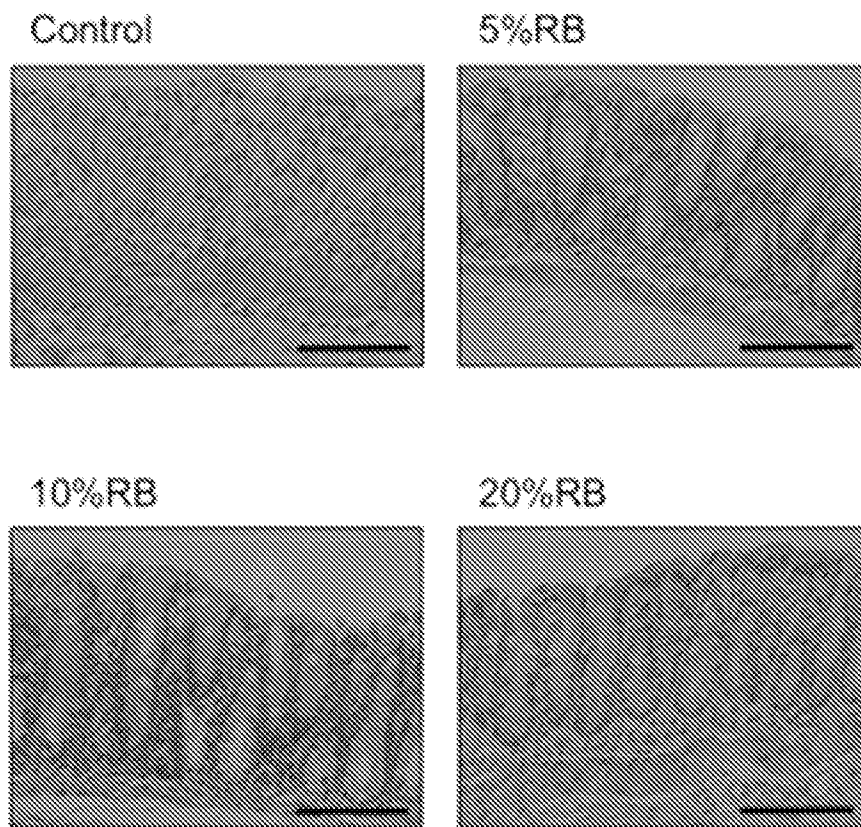
[図2-3]



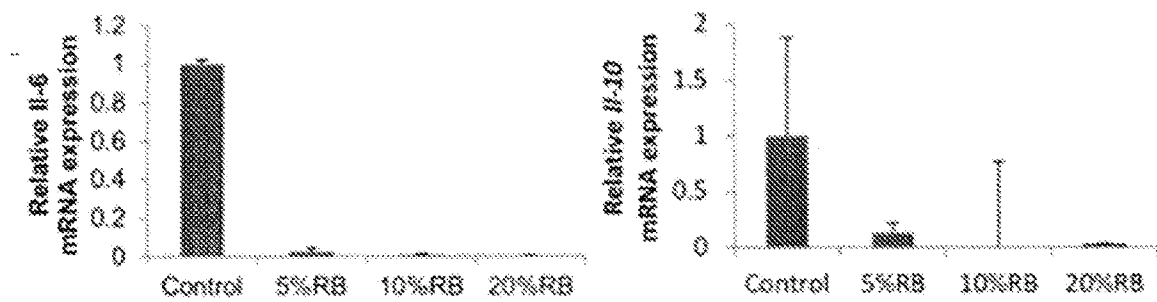
[図2-4]



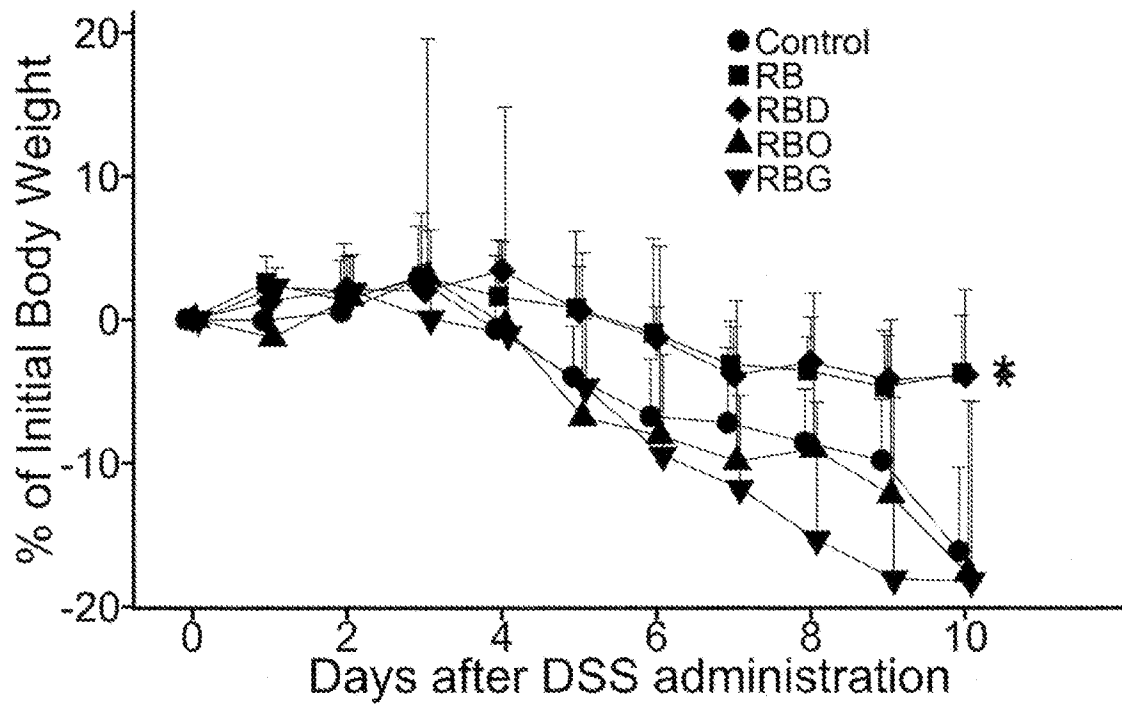
[図2-5]



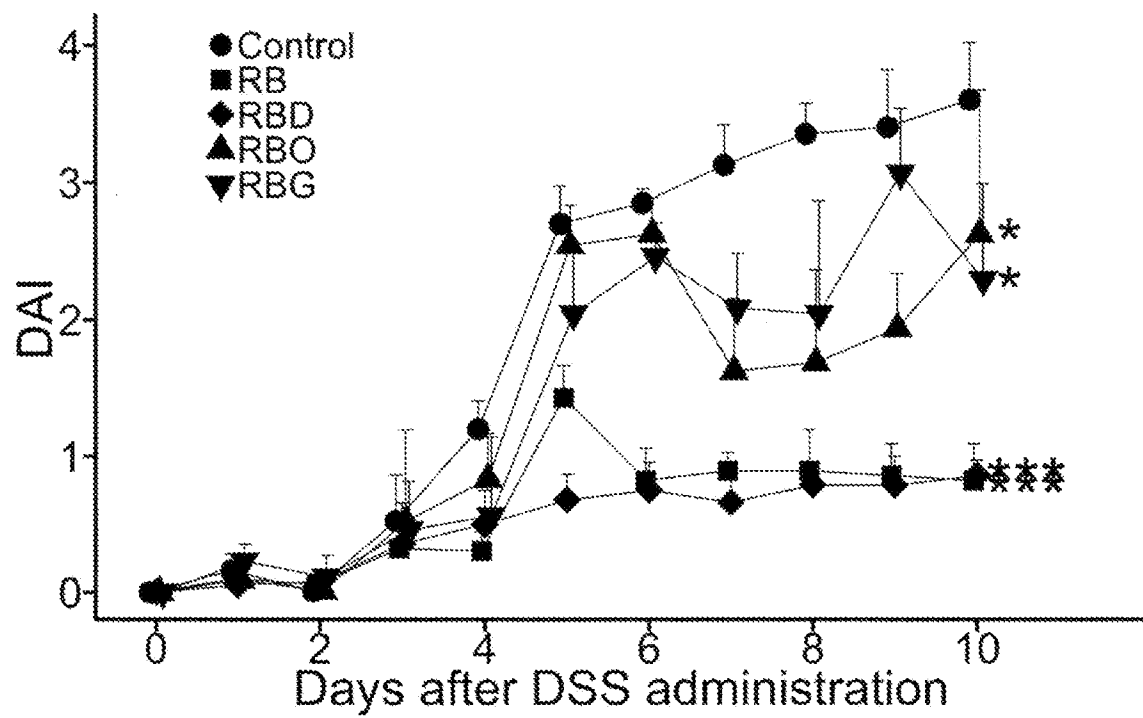
[図2-6]



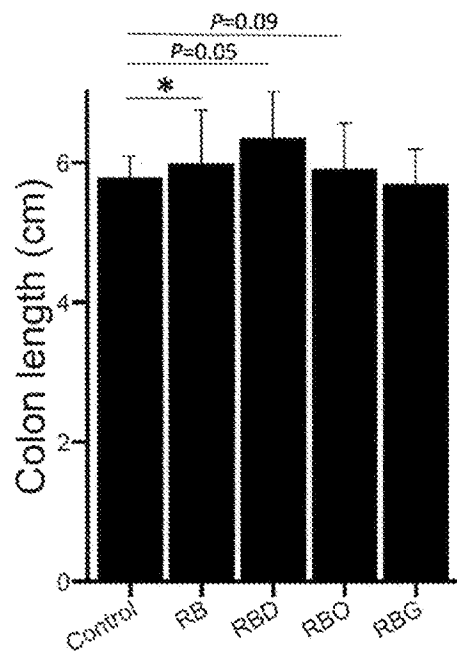
[図3-1]



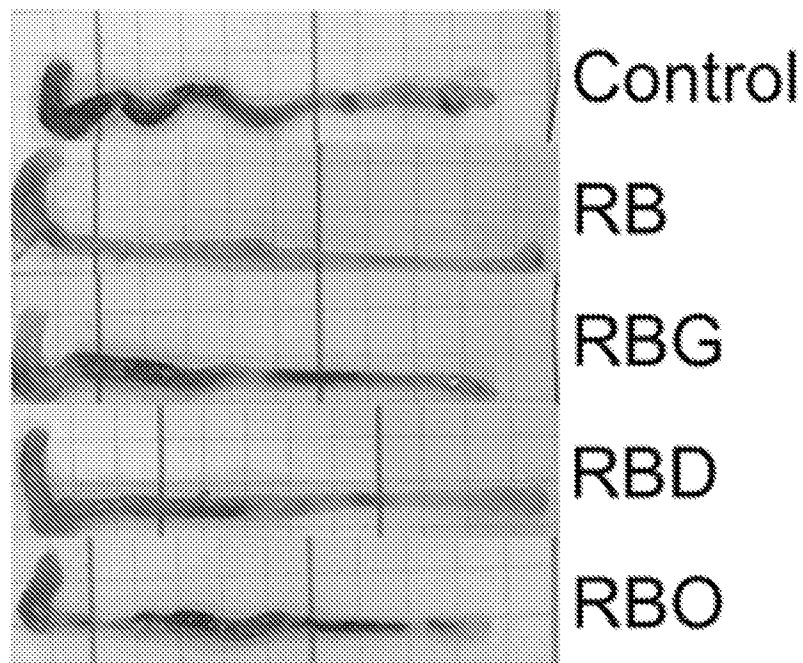
[図3-2]



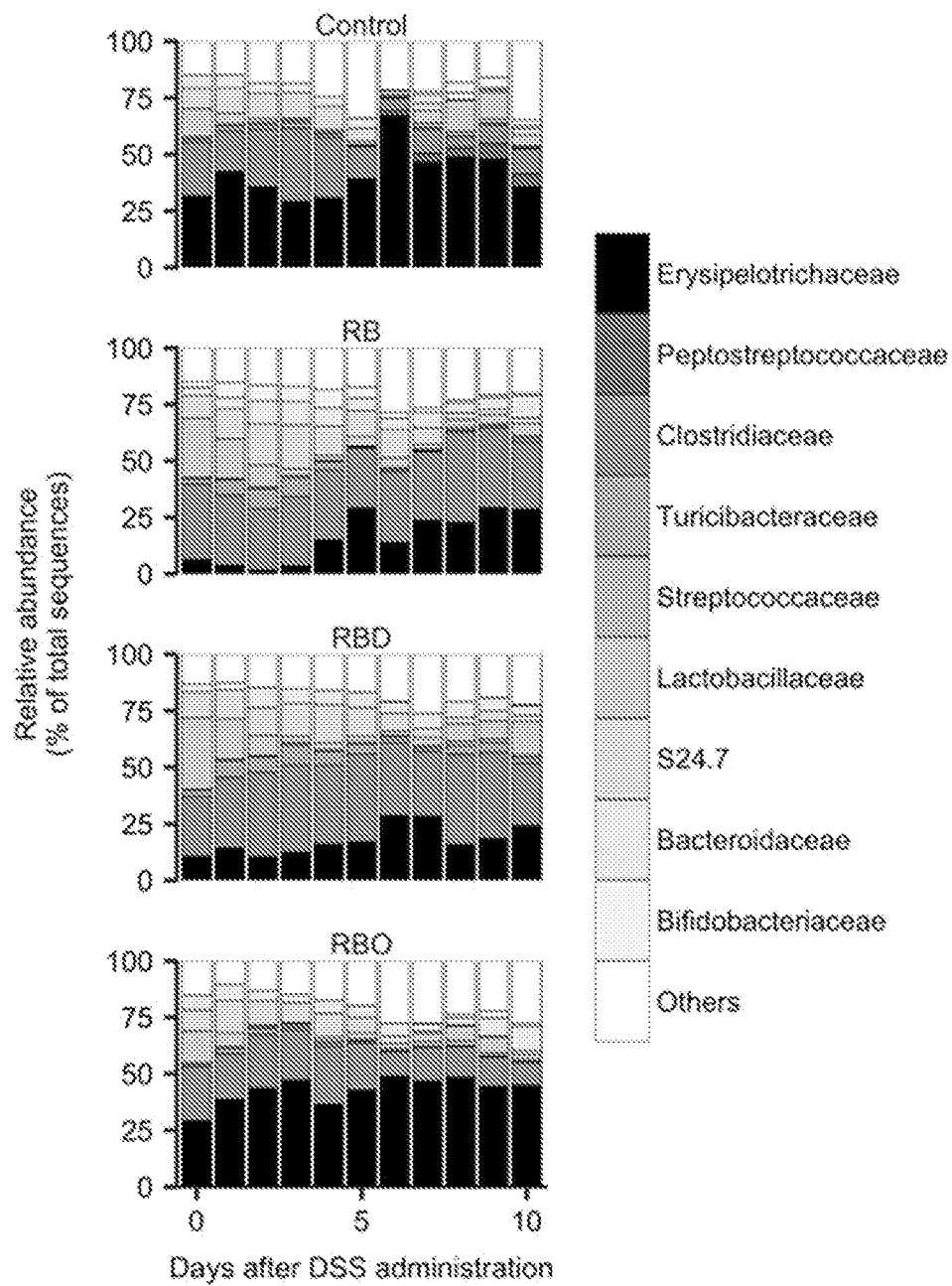
[図3-3]

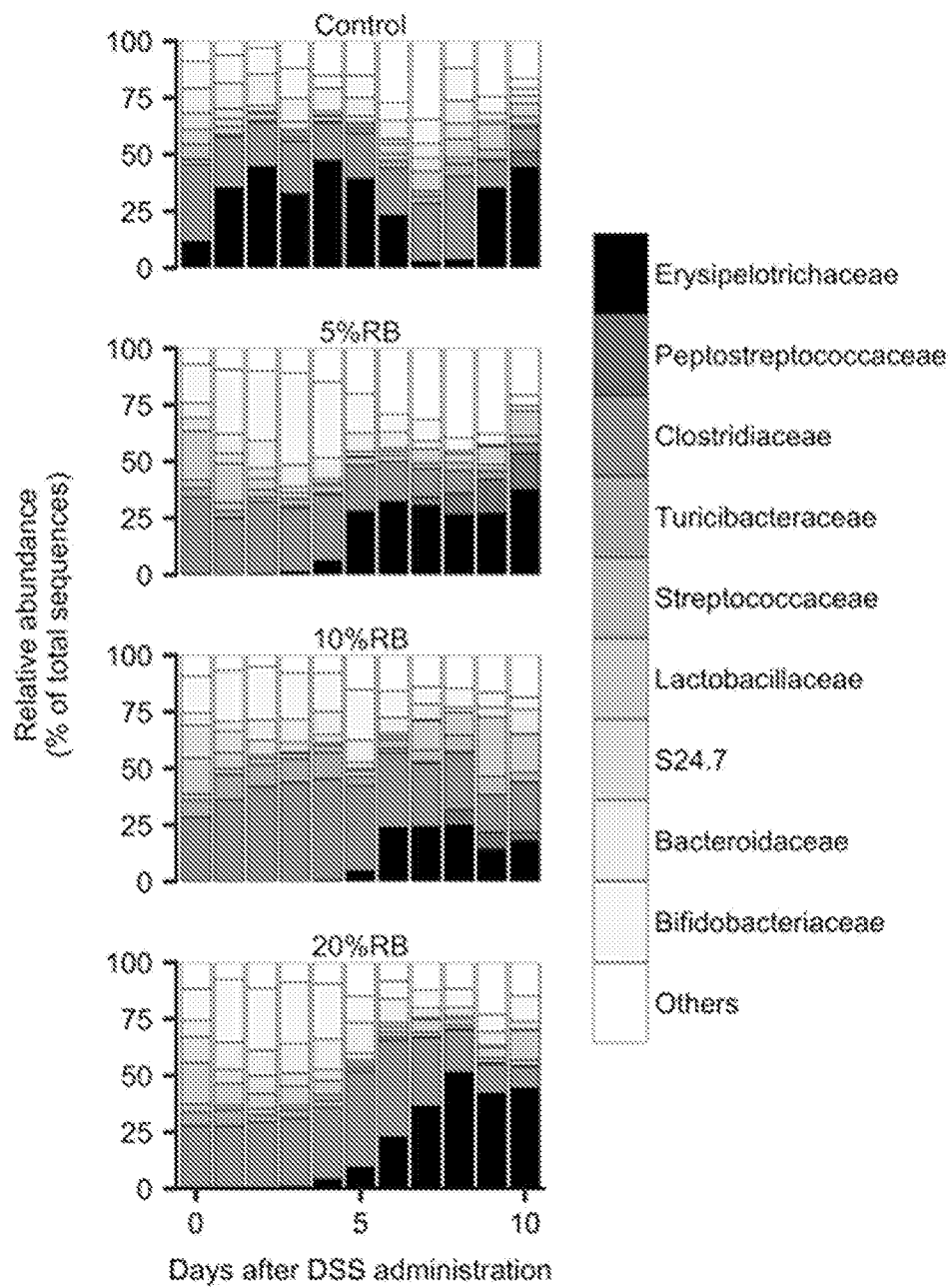


[図3-4]

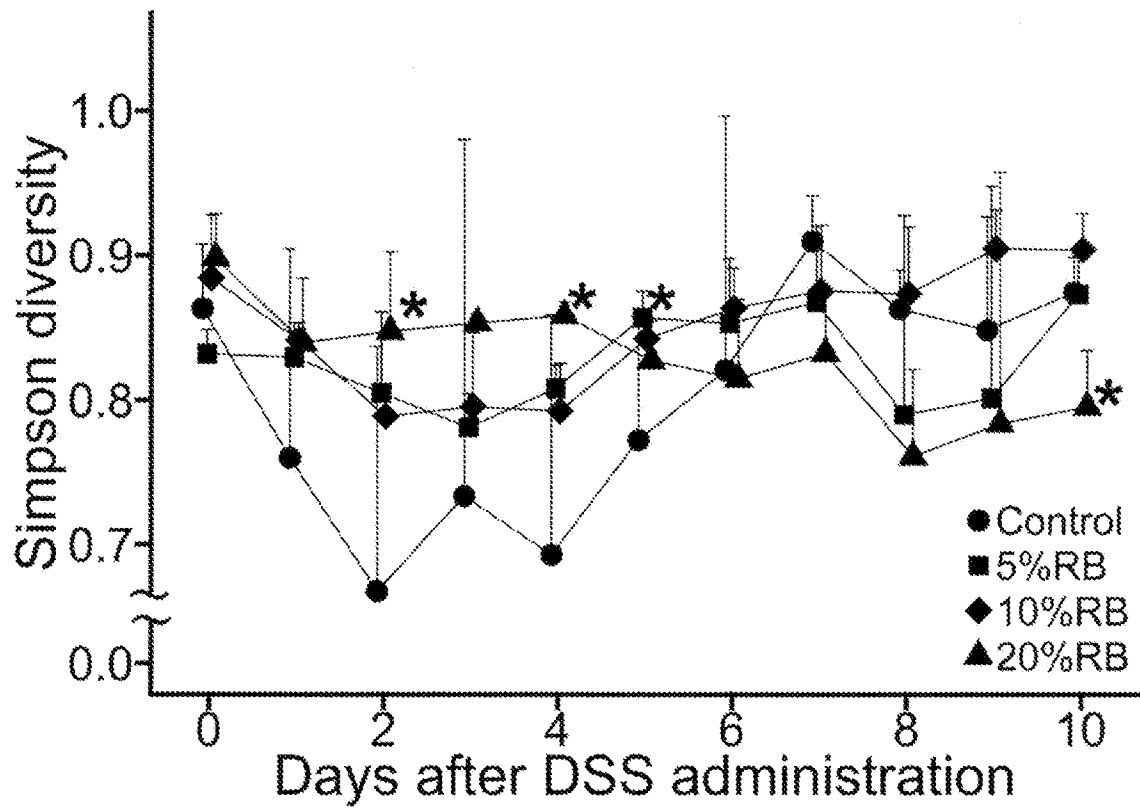


[図3-5]

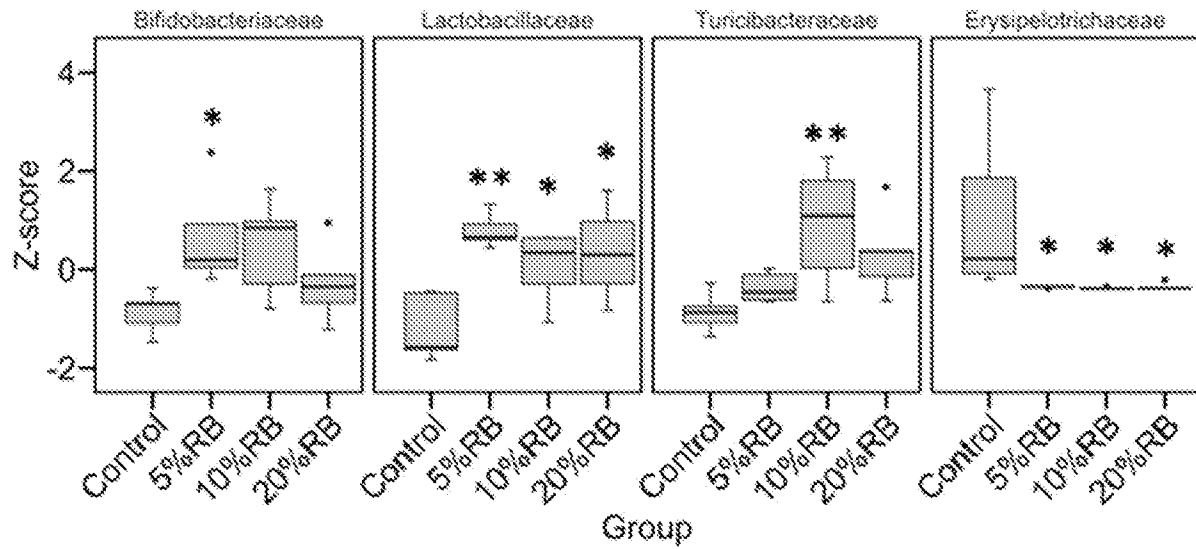




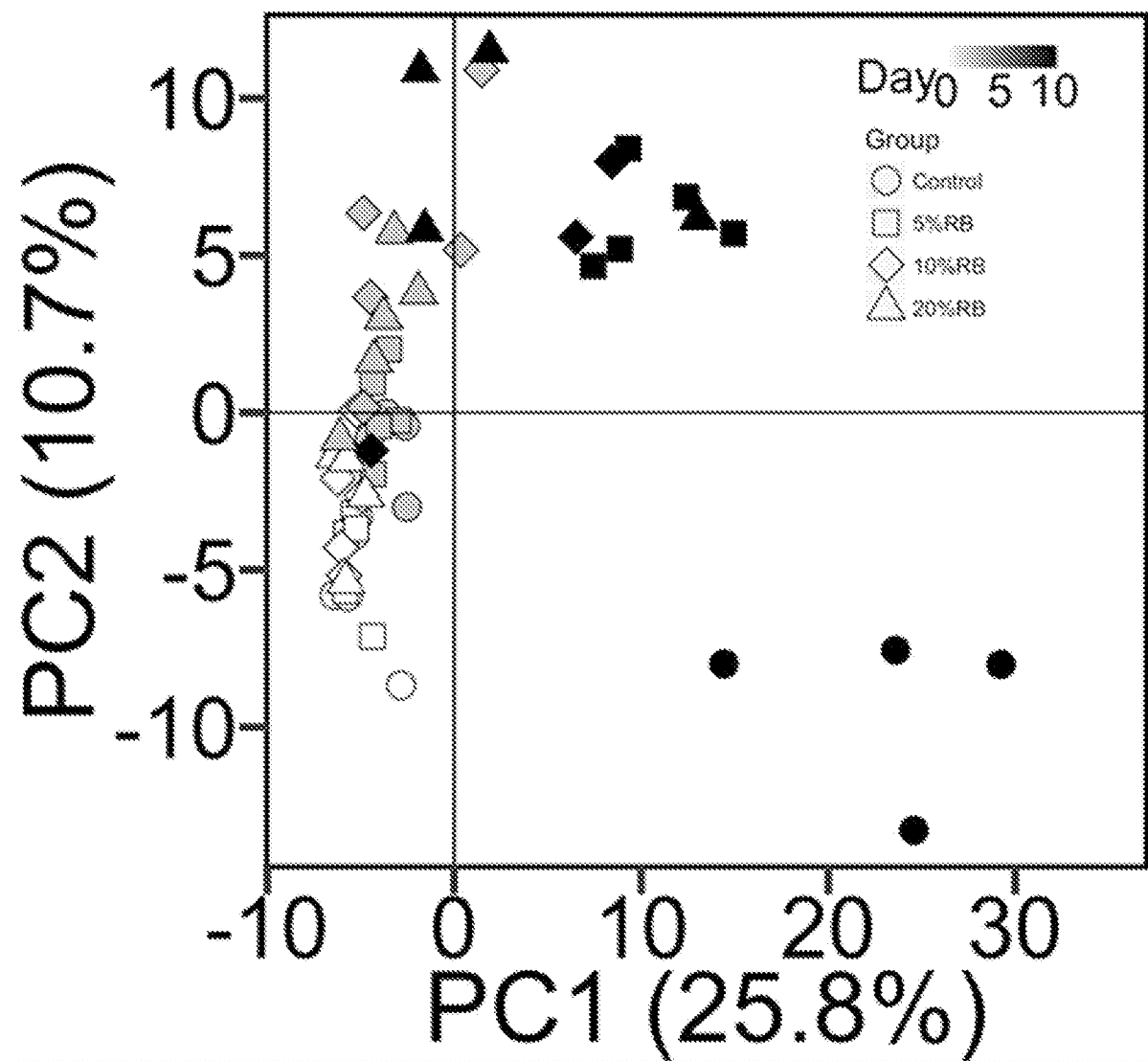
[図4-2]



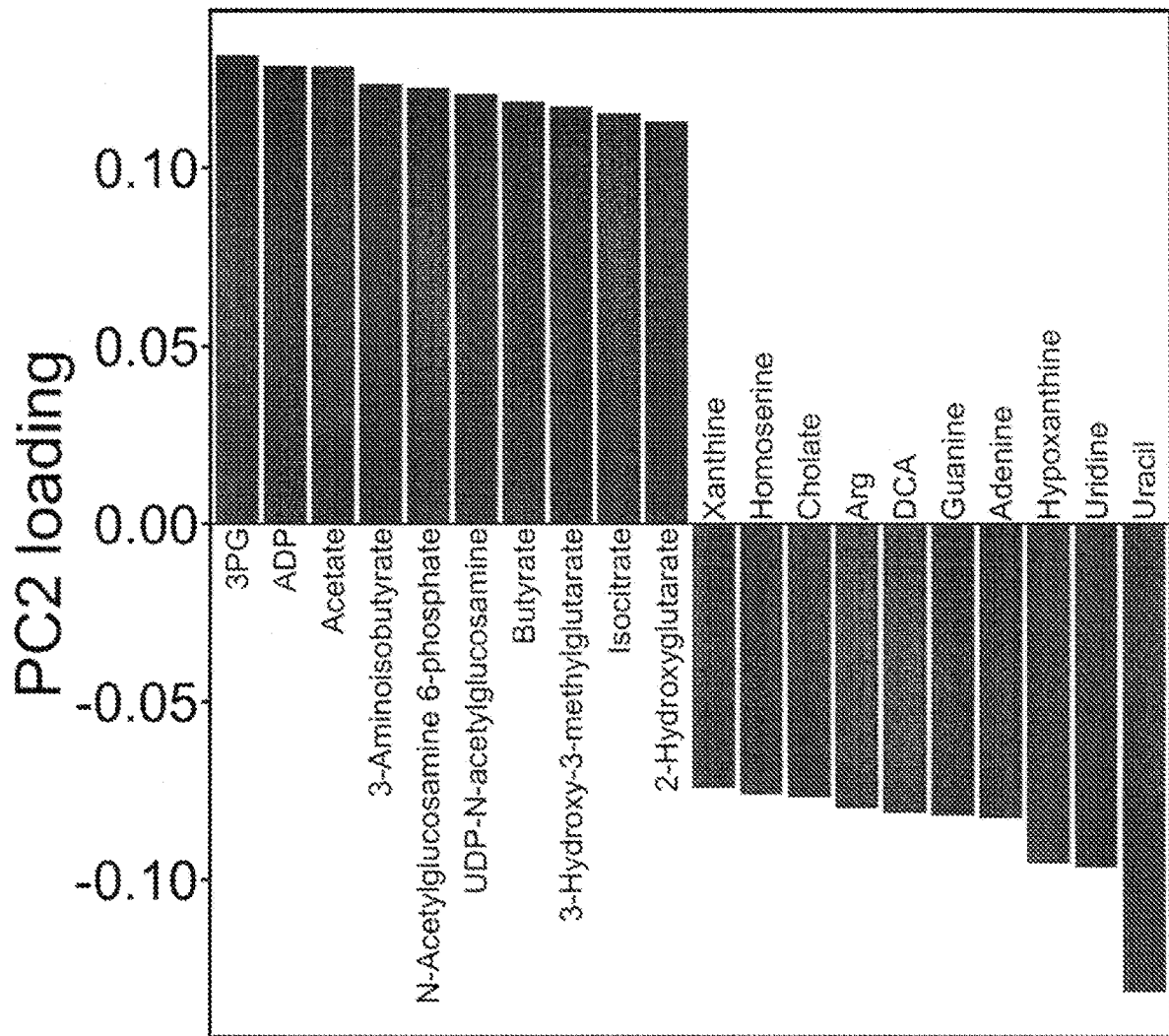
[図4-3]



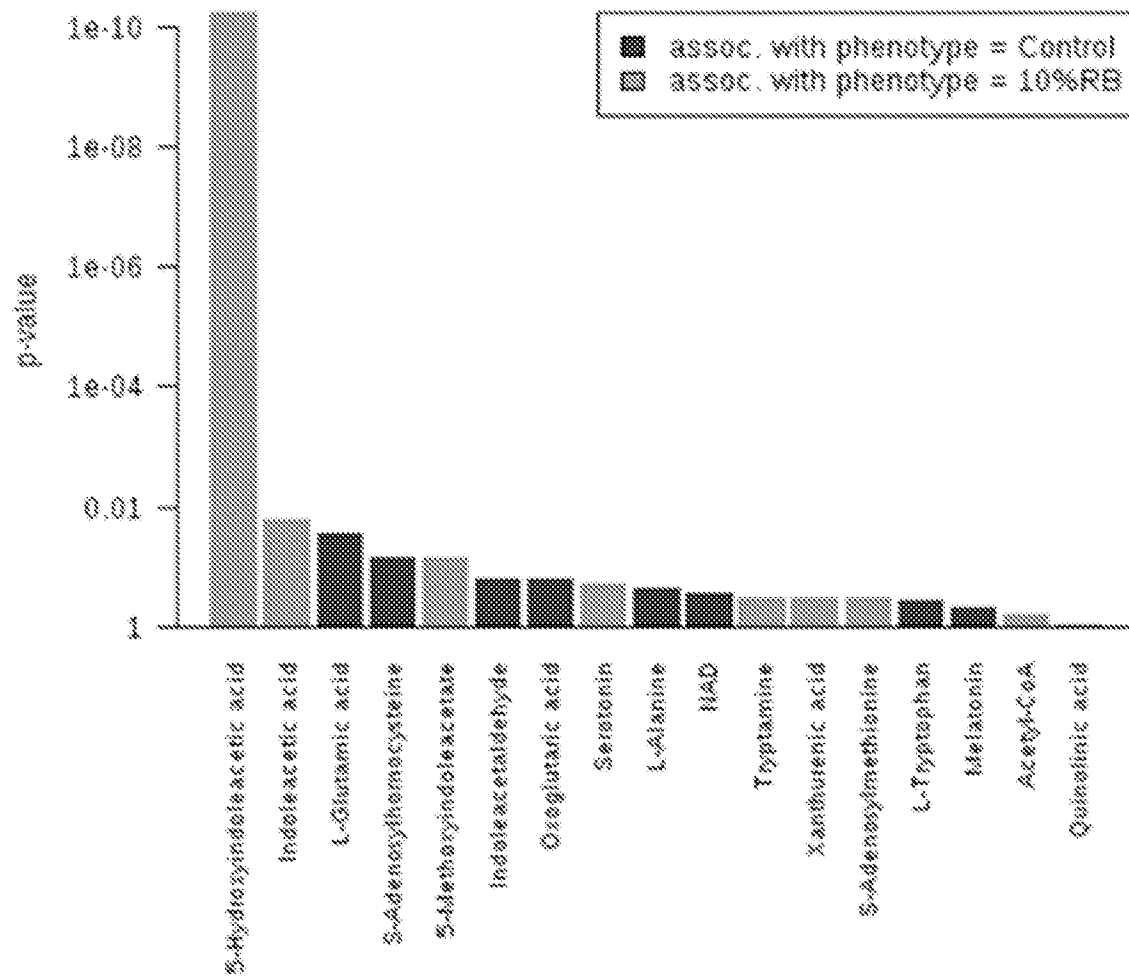
[図5-1]



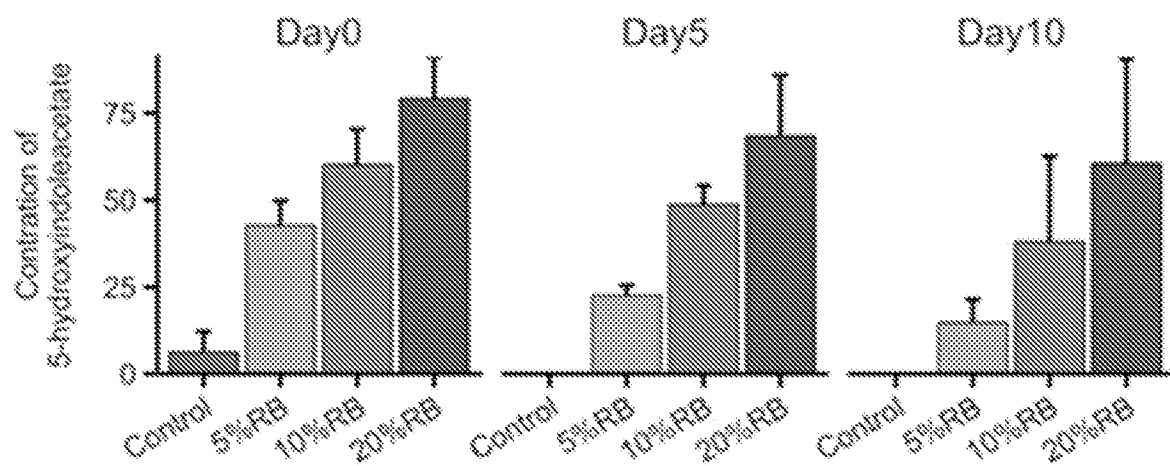
[図5-2]



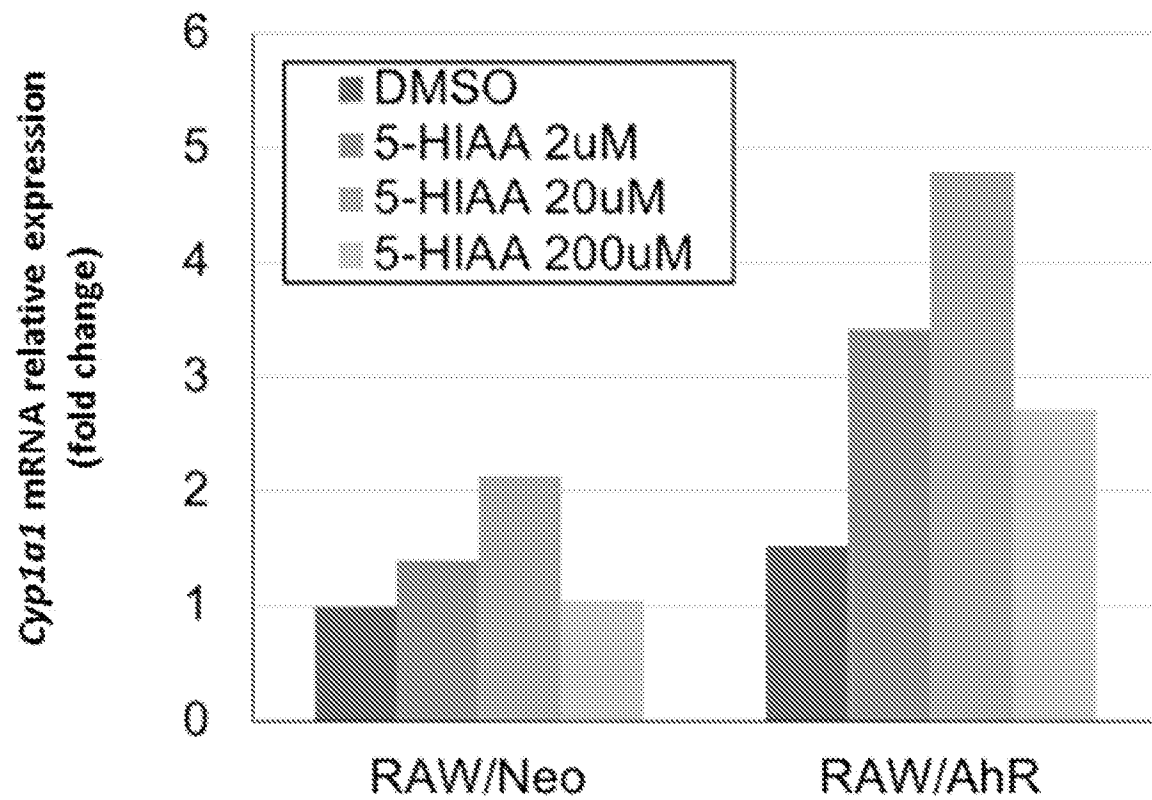
[図5-3]



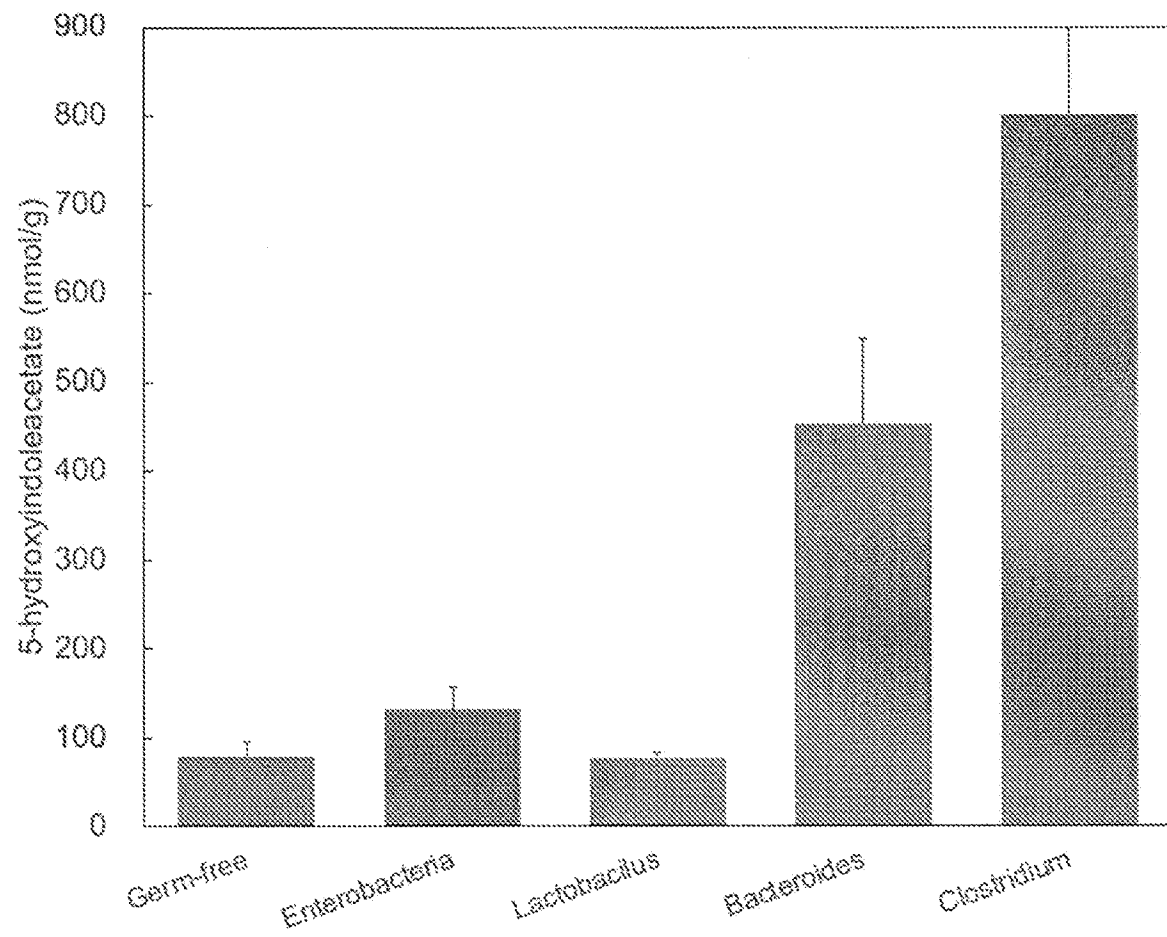
[図5-4]



[図6-1]



[図6-2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/046809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/405 (2006.01) i; A61P 1/04 (2006.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i; C12N 1/20 (2006.01) i

FI: A61K31/405 ZNA; A61P1/04; A61P29/00; C12N1/20 A

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)

A61K31/405; A61P1/04; A61P29/00; C12N1/20

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO, L. et al., "Magnolol, a natural polyphenol, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice", <i>Molecules</i> , 2017, vol. 22, no. 7, 1218 abstract, fig. 4, table 1	6-9
Y	abstract, table 2, section "3. Discussion"	1-5
Y	MONTELEONE, I. et al., "The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis", <i>Curr Opin Gastroenterol</i> , 2012, vol. 28, pp. 310-313 abstract, section "Activation of aryl hydrocarbon receptor attenuates colitis in mice"	1-5
A	YU, F. Y. et al., "Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis", <i>World J Gastroenterol</i> , 2016, vol. 22, no. 12, pp. 3451-3459 abstract	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
06 February 2020 (06.02.2020)Date of mailing of the international search report
25 February 2020 (25.02.2020)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/JP2019/046809

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAQI, Y. et al., "3-(2-carboxyethyl)indole-2-carboxylic acid derivatives: structural requirements and properties of potent agonists of the orphan G protein-coupled receptor GPR17", 27 September 2018, vol. 61, no. 18, pp. 8136-8154 abstract, table 3, compound 70, page 8144, left column, paragraph [0001]	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/405(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i FI: A61K31/405 ZNA; A61P1/04; A61P29/00; C12N1/20 A		
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）） A61K31/405; A61P1/04; A61P29/00; C12N1/20		
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		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	ZHAO, L et al., Magnolol, a natural polyphenol, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, Molecules, 2017, Vol.22, No.7, 1218 Abstract, Fig.4, Table 1	6-9
Y	Abstract, Table 2, '3. Discussion' の項	1-5
Y	MONTELEONE, I et al., The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis, Curr Opin Gastroenterol, 2012, Vol.28, p.310-313 Abstract, 'Activation of aryl hydrocarbon receptor attenuates colitis in mice' の項	1-5
A	YU, F Y et al., Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis, World J Gastroenterol, 2016, Vol.22, No.12, p.3451-3459 Abstract	1-9
A	BAQI, Y et al., 3-(2-carboxyethyl)indole-2-carboxylic acid derivatives: structural requirements and properties of potent agonists of the orphan G protein-coupled receptor GPR17, 2018.09.27, Vol.61, No.18, p.8136-8154 Abstract, Table 3, Compound 70, 第8144頁左欄第1パラグラフ	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 06.02.2020		国際調査報告の発送日 25.02.2020
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） 小堀 麻子 4C 2938 電話番号 03-3581-1101 内線 3452