

(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  
2016年10月13日(13.10.2016)



(10) 国際公開番号  
WO 2016/163454 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 35/68 (2006.01) A61K 31/716 (2006.01)  
A23L 33/10 (2016.01) A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061386
- (22) 国際出願日: 2016年4月7日(07.04.2016)
- (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 2015-079525 2015年4月8日(08.04.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社ユーグレナ (EUGLENA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1080014 東京都港区芝五丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 中島 綾香 (NAKASHIMA, Ayaka); 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユーグレナ内 Kanagawa (JP). 朝山 雄太 (ASAYAMA, Yuta); 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユーグレナ内 Kanagawa (JP). 岩田 修 (IWATA, Osamu); 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階

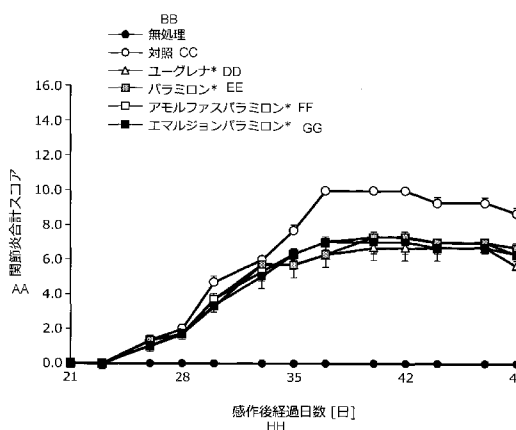
株式会社ユーグレナ内 Kanagawa (JP). 鈴木 健吾 (SUZUKI, Kengo); 〒2300046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75番1号 リーディングベンチャープラザ1号館4階 株式会社ユーグレナ内 Kanagawa (JP).

- (74) 代理人: 秋山 敦, 外 (AKIYAMA, Atsushi et al.); 〒1076033 東京都港区赤坂1丁目12番32号 アーク森ビル33階 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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,

[続葉有]

(54) Title: SUPPRESSIVE AGENT FOR RHEUMATOID ARTHRITIS, PROPHYLACTIC AGENT FOR RHEUMATOID ARTHRITIS, THERAPEUTIC AGENT FOR RHEUMATOID ARTHRITIS, AND FOOD FOR SUPPRESSING RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 関節リウマチ抑制剤, 関節リウマチ予防剤, 関節リウマチ治療剤及び関節リウマチ抑制用食品



(57) Abstract: Provided are a suppressive agent, a prophylactic agent and a therapeutic agent for rheumatoid arthritis, each of which has little adverse side effects and can normalize immune abnormality in rheumatoid arthritis. A suppressing agent, a prophylactic agent or a therapeutic agent for rheumatoid arthritis, which contains a euglena-derived substance as an active ingredient. The agent can remedy immune abnormality in rheumatoid arthritis, and therefore can be used as an antirheumatic drug capable of controlling the activity of rheumatoid arthritis. The agent can also be used for a living body which does not receive a definitive diagnosis for rheumatoid arthritis yet. The agent is administered to the living body continuously for a period before the definitive diagnosis for rheumatoid arthritis till an arbitrary time point elapsed after the definitive diagnosis. The euglena-derived substance is at least one substance selected from the group consisting of an alga body of euglena, paramylon which is originated from the euglena, water-soluble amorphous paramylon which is produced by subjecting the aforementioned paramylon to an alkali treatment and a neutralization treatment, and emulsion paramylon which is produced by subjecting the aqueous paramylon solution to such a treatment that the aqueous solution is ejected through a microhole nozzle under a super-high pressure to bombard the aqueous solution against an object to be bombarded.

(57) 要約:

[続葉有]

AA Rheumatoid arthritis total score  
 BB Untreated  
 CC Control  
 DD Euglena  
 EE Paramylon  
 FF Amorphous paramylon  
 GG Emulsion paramylon  
 HH Days elapsed after sensitization [days]  
 II vs control  
 JJ Mann-Whitney U test

WO 2016/163454 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 添付公開書類:  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))  
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

---

副作用がなく、関節リウマチの免疫異常を正常化可能な関節リウマチ抑制剤、予防剤及び治療剤を提供する。ユーグレナ由来物質を有効成分として含有する関節リウマチ抑制剤、予防剤又は治療剤である。関節リウマチにおける免疫異常を改善することによって関節リウマチの活動性をコントロールする抗リウマチ薬として用いられる。また、関節リウマチの確定診断を受けていない生体用に用いられる。生体に、関節リウマチの確定診断前から、確定診断を受けた後の任意の時点まで、継続して投与される。ユーグレナ由来物質は、ユーグレナの藻体、前記ユーグレナ由来のパラミロン、該パラミロンにアルカリ処理及び中和処理を施した水溶性のアモルファスパラミロン、及び前記パラミロン水溶液を超高圧で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる処理を施したエマルジョンパラミロンを含む群から選択された少なくとも一つの物質である。

## 明 細 書

発明の名称：

関節リウマチ抑制剤，関節リウマチ予防剤，関節リウマチ治療剤及び関節リウマチ抑制用食品

### 技術分野

[0001] 本発明は、関節リウマチ抑制剤，関節リウマチ予防剤，関節リウマチ治療剤及び関節リウマチ抑制用食品に関する。

### 背景技術

[0002] 関節リウマチとは、自己の免疫が手足の関節を侵すことにより、手足の関節が腫れたり傷んだりする病気である。進行すると、骨や軟骨が壊れて関節が動かせなくなり、日常生活が大きく制限される。

かつて、関節リウマチは、病因も病態も不明であり、予防することも完治することもできない難治性の病気であった。しかし、近年、病態の解明が進んで、T細胞や炎症性サイトカインを抑制することで大きな改善が得られることが明らかになり、治療薬をうまく組み合わせて使用すれば、関節破壊を少しでも食い止め、症状を押さえ込む寛解を具体的な治療目標とできるようになった。

[0003] 関節リウマチの薬物療法で用いられる薬剤は、大きく分類して、鎮痛、解熱、消炎作用を有し、非特異的に炎症反応を抑制する非ステロイド系消炎鎮痛薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) 、関節リウマチの炎症を迅速かつ効果的に抑制し、活動性の病変を有する関節リウマチ患者のQOLを著名に改善するステロイド薬、炎症自体を押える作用はもたないが関節リウマチの免疫異常を改善することによって関節リウマチの活動性をコントロールする抗リウマチ薬 (disease modifying antirheumatic drugs : DMARDs) 、関節リウマチの病態に深く関与するサイトカインなどを選択的に抑制することを目的として遺伝子工学的技術を駆使して開発された抗体又は融合蛋白である生物学的製剤が挙げられる。

関節リウマチの薬剤では、リウマチ炎症の寛解、関節破壊の経過の抑制、即効性を併せ持つものがなく、また、副作用の強いものも弱いものもあるため、薬物療法では、これらの薬剤が相補的に併用されている。

- [0004] 上記薬剤のうち、抗リウマチ薬には、その作用機序から、正常の免疫能には影響せず異常な免疫機能を正常化する免疫調節薬（例えば、特許文献1）と、全ての免疫機能を非特異的に抑制する免疫抑制薬（例えば、特許文献2）とがある。

### 先行技術文献

### 特許文献

- [0005] 特許文献1：特開平8-301875号公報  
特許文献2：特許第3839836号公報

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] しかし、従来の抗リウマチ薬は、一般的に、効果に個体差が大きく、ある症例に有効でも、他の症例には無効な場合がある。

また、副作用発現率が高く、かつ、効果発現に2週間～3か月程度かかる効果発現の遅効性がある。抗リウマチ薬は、副作用発現率が高いために関節リウマチの確定診断までは投与できない。しかも、関節リウマチの患者のうち、確定診断までに3か月以上を要している人が5割超、自覚症状発現から抗リウマチ薬投与開始までに半年以上を要している人が8割超であるとの実態調査結果も発行されており（ファイザー株式会社「関節リウマチ患者さん500名を対象とした実態調査」，2011年11月24日）、自覚症状発現から抗リウマチ薬の効果発現までに、半年～1年以上を要する場合が少なくない。

また、抗リウマチ薬は、少量の投与から始めて、効果や副作用の有無を確認することも、抗リウマチ薬の効果発現を遅らせる要因となっている。

副作用が殆どなく、症例による効果の差が少ない抗リウマチ薬は知られていない。

[0007] 本発明は、上記の課題に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、副作用がなく、関節リウマチの免疫異常を正常化可能な関節リウマチ抑制剤、関節リウマチ予防剤、関節リウマチ治療剤及び関節リウマチ抑制用食品を提供することにある。

本発明の他の目的は、関節リウマチの罹患又は診断の前でも投与可能な関節リウマチ抑制剤、関節リウマチ予防剤、関節リウマチ治療剤及び関節リウマチ抑制用食品を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0008] 前記課題は、本発明によれば、ユーグレナ由来物質を有効成分として含有する関節リウマチ抑制剤、予防剤及び治療剤により解決される。

このように、関節リウマチの抑制機能を備えたユーグレナ由来物質を有効成分とするため、関節リウマチを、有効に、抑制、予防、治療できる。また、副作用がなく、食品として用いられるのに十分な安全性を備えたユーグレナ由来物質を有効成分とするため、遺伝的又は生活環境面から関節リウマチを罹患する可能性の高い人や、関節リウマチの自覚症状を発現したが、検査や確定診断を経ていない人などにも、投与することができる。

[0009] 関節リウマチにおける免疫異常を改善することによって関節リウマチの活動性をコントロールする抗リウマチ薬として用いられてもよい。

このように構成しているため、関節リウマチ患者の個々の症状や改善状況を見ながら、他のステロイド薬、非ステロイド系消炎鎮痛薬、抗リウマチ薬などと組み合わせて併用することにより、関節リウマチの寛解、ひいては治癒を目指すことができる。

[0010] また、関節リウマチの確定診断を受けていない生体用に用いられてもよい。

生体に、関節リウマチの確定診断前から、確定診断を受けた後の任意の時点まで、継続して投与されてもよい。

このように、生体に対して、関節リウマチの確定診断前から継続して投与できるため、確定診断を待って投与する必要がなく、迅速に関節リウマチの

活動性を抑えることができる。本発明の関節リウマチ抑制剤、予防剤又は治療剤によれば、自覚症状発現後、民間の調査結果において確定診断までに要すると報告されている3か月～6か月が経過するころには、関節リウマチの活動性のコントロール効果が発現するため、関節リウマチの早期寛解及び治癒を目指すことが可能となる。

[0011] 前記ユーグレナ由来物質は、ユーグレナの藻体、前記ユーグレナ由来のパラミロン、該パラミロンにアルカリ処理及び中和処理を施した水溶性のアモルファスパラミロン、及び前記パラミロン水溶液を超高圧で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる処理を施したエマルジョンパラミロンを含む群から選択された少なくとも一つの物質であってもよい。

[0012] また、前記課題は、本発明によれば、ユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、関節リウマチの予防又は改善に用いられることを特徴とする関節リウマチ抑制用食品により解決される。

このように構成するため、遺伝的又は生活環境面から関節リウマチを罹患する可能性の高い人や、関節リウマチの自覚症状を発現したが、検査や確定診断を経ていない人なども、摂取して、リウマチの予防又は改善効果を得ることができる。

### 発明の効果

[0013] 本発明によれば、関節リウマチの抑制機能を備えたユーグレナ由来物質を有効成分とするため、関節リウマチを、有効に、抑制、予防、治療、改善できる。また、副作用がなく、食品として用いられるのに十分な安全性を備えたユーグレナ由来物質を有効成分とするため、遺伝的又は生活環境面から関節リウマチを罹患する可能性の高い人や、関節リウマチの自覚症状を発現したが、検査や確定診断を経ていない人などにも、投与又は摂取させることができる。

### 図面の簡単な説明

[0014] [図1]試験例1のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価における関節炎スコアの測定結果を示すグラフである。

[図2]試験例1のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるサイトカイン(IL-6)の測定結果を示すグラフである。

[図3]試験例1のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるサイトカイン(IL-17A)の測定結果を示すグラフである。

[図4]試験例1のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるサイトカイン(IFN- $\gamma$ )の測定結果を示すグラフである。

[図5]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価における関節炎スコアの測定結果を示すグラフである。

[図6]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価における抗コラーゲンIgGの測定結果を示すグラフである。

[図7]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるサイトカイン(IL-17)の測定結果を示すグラフである。

[図8]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるサイトカイン(IFN- $\gamma$ )の測定結果を示すグラフである。

[図9]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価における膝関節組織の評価のための、膝関節の病理標本作製方法を示す説明図である。

[図10]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価における無処置群の左膝関節組織の病理標本を示す写真である。

[図11]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価における対照群の左膝関節組織の病理標本を示す写真である。

[図12]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるユーグレナ群の左膝関節組織の病理標本を示す写真である。

[図13]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるパラミロン群の左膝関節組織の病理標本を示す写真である。

[図14]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるアモルファスパラミロン群の左膝関節組織の病理標本を示す写真である。

[図15]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるエマルジョンパラミロン群の左膝関節組織の病理標本を示す写真である。

[図16]試験例2のマウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価におけるCD4陽性T細胞中のIL-17産生細胞数の割合を示すグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明の一実施形態に係る関節リウマチ抑制剤、関節リウマチ予防剤及び関節リウマチ治療剤について、図1～図16を参照しながら説明する。

本明細書において、「生体」には、人のほか、家畜やペットなどの哺乳類の動物など、関節リウマチを罹患するすべての生体を含む。

本実施形態は、ユーグレナ由来物質を有効成分として含有する関節リウマチ抑制剤、関節リウマチ予防剤及び関節リウマチ治療剤である。

ユーグレナ由来物質としては、パラミロンを含むものが好ましく、ユーグレナ又はユーグレナの乾燥品のほか、パラミロン、パラミロン粉末や、パラミロンの加工品等が含まれる。また、ユーグレナ又はユーグレナの乾燥品に、パラミロン又はパラミロン加工品が添加されたものでもよい。

[0016] 本明細書において、「ユーグレナ」とは、動物学や植物学の分類でユーグレナ属 (*Euglena*) に分類される微生物、その変種、その変異種のすべてを含む。

ここで、ユーグレナ属 (*Euglena*) の微生物とは、動物学では原生動物門 (Protozoa) の鞭毛虫綱 (Mastigophorea)、植物鞭毛虫亜綱 (Phytomastigophorea) に属するミドリムシ目 (Euglenida) のユーグレノイディナ亜目 (Euglenoidina) に属する微生物である。一方、ユーグレナ属の微生物は、植物学ではミドリムシ植物門 (Euglenophyta) のミドリムシ藻類綱 (Euglenophyceae) に属するミドリムシ目 (Euglenales) に属している。

[0017] ユーグレナ属の微生物としては、具体的には、*Euglena acus*、*Euglena caudata*、*Euglena chadefaudii*、*Euglena deses*、*Euglena gracilis*、*Euglena granulata*、*Euglena intermedia*、*Euglena mutabilis*、*Euglena oxyuris*、*Euglena proxima*、*Euglena spirogyra*、*Euglena viridis*、*Euglena vermiformis*、*Euglena intermedia*、*Euglena piride*などが挙げられる。ユーグレナ細胞

としては、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*) , 特に、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*) Z株を用いることができるが、そのほか、ユーグレナ・グラシリス (*E. gracilis*) Z株の変異株SM-ZK株 (葉緑体欠損株) や変種のvar. bacillaris、これらの種の葉緑体の変異株等の遺伝子変異株由来の $\beta$ -1, 3-グルカナーゼ、*Euglena intermedia*, *Euglena piride*、及びその他のユーグレナ類、例えば*Astaia longa*であってもよい。

[0018] ユーグレナ属は、池や沼などの淡水中に広く分布しており、これらから分離して使用してもよく、また、すでに単離されている任意のユーグレナ属を使用してもよい。

本発明のユーグレナ属は、その全ての変異株を包含する。また、これらの変異株の中には、遺伝的方法、たとえば組換え、形質導入、形質転換等により得られたものも含有される。

[0019] ユーグレナ細胞の培養において、培養液としては、例えば、窒素源、リン源、ミネラルなどの栄養塩類を添加した培養液、例えば、改変Cramer-Myers培地 ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1.0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.02g/L,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3mg/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.8mg/L,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4mg/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2mg/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.02g/L, チアミン塩酸塩 (ビタミン $\text{B}_1$ ) 0.1mg/L, シアノコバラミン (ビタミン $\text{B}_{12}$ )、(pH3.5))を用いることができる。なお、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ や $\text{NH}_3\text{aq}$ に変換することも可能である。また、そのほか、ユーグレナ 生理と生化学 (北岡正三郎編、株式会社学会出版センター) の記載に基づき調製される公知のHutner培地, Kor-en-Hutner培地を用いてもよい。

[0020] 培養液のpHは好ましくは2以上、また、その上限は、好ましくは6以下、より好ましくは4.5以下である。pHを酸性側にするにより、光合成微生物は他の微生物よりも優勢に生育することができるため、コンタミネ

ーションを抑制することができる。

ユーグレナ細胞の培養は、太陽光を直接利用するオープンポンド方式、集光装置で集光した太陽光を光ファイバー等で送り、培養槽で照射させ光合成に利用する集光方式等により行ってもよい。

また、ユーグレナ細胞の培養は、例えば供給バッチ法を用いて行われ得るが、フラスコ培養や発酵槽を用いた培養、回分培養法、半回分培養法（流加培養法）、連続培養法（灌流培養法）等、いずれの液体培養法により行ってもよい。

[0021] 培養は、オープンポンド型、レースウェイ型、チューブ型等の公知の培養装置や、坂口フラスコ、三角フラスコ、試薬ビンなどの実験用の培養容器を用いて行うことができる。ユーグレナはCO<sub>2</sub>を資化するため、独立栄養培地であるCramer-Myers培地を用いて培養する場合は1～5%CO<sub>2</sub>を含む空気を培地中に通過させることが好ましい。また、さらに、葉緑体を十分に発達させるために、培地1リットルあたり1～5g程度のリン酸アンモニウムを加えるとよい。培養温度は、通常20～34℃で、特に28～30℃が好適である。また、培養条件にもよるが、ユーグレナは通常、培養開始後2～3日で対数増殖期となり、4～5日程度で定常期に到達する。

ユーグレナは、光照射下で培養（明培養）されてもよく、無照射で培養（暗培養）されてもよい。

[0022] ユーグレナ細胞の分離は、例えば、培養液の遠心分離または単純な沈降によって行われ得る。

パラミロン(Paramylon)は、約700個のグルコースがβ-1,3-結合により重合した高分子体（β-1,3-グルカン）であり、ユーグレナ属が含有する貯蔵多糖である。パラミロン粒子は、扁平な回轉楕円体粒子であり、β-1,3-グルカン鎖がらせん状に絡まりあって形成されている。

[0023] パラミロンは、すべての種、変種のユーグレナ細胞内に顆粒として存在し、その個数、形状、粒子の均一性は、種により特徴がある。

パラミロンは、グルコースのみからなり、*E. gracilis* Zの野生株と葉緑体

欠損株SM-ZKから得られたパラミロンの平均重合度は、グルコース単位で約700である。

パラミロンは、水、熱水には不溶性であるが、希アルカリ、濃い酸、ジメチルスルホキシド、ホルムアルデヒド、ギ酸に溶ける。

パラミロンの平均密度は、*E. gracilis* Zでは、1.53、*E. gracilis* var. *b. acillaris* SM-L1では、1.63である。

[0024] パラミロンは、粉末図形法を用いたX線解析によれば、3本の直鎖状 $\beta$ -グルカンが右巻きの縄のように捻じれあつたゆるやかならせん構造をとっている。このグルカン分子がいくつか集まってパラミロン顆粒を形成する。パラミロン顆粒は、結晶構造部分が非常に多く約90%を占め、多糖類の中で最も結晶構造率の高い化合物である。また、パラミロンは、水を含みにくい（ユーグレナ 生理と生化学（北岡正三郎編、株式会社学会出版センター））。

[0025] パラミロン粒子は、培養されたユーグレナ属から任意の適切な方法で単離および微粒子状に精製され、通常粉末体として提供されている。

例えば、パラミロン粒子は、（1）任意の適切な培地中でのユーグレナ細胞の培養；（2）当該培地からのユーグレナ細胞の分離；（3）分離されたユーグレナ細胞からのパラミロンの単離；（4）単離されたパラミロンの精製；および必要に応じて（5）冷却およびその後の凍結乾燥により得ることができる。

パラミロンの単離は、例えば、大部分が生物分解される種類の非イオン性または陰イオン性の界面活性剤を用いて行われ得る。パラミロンの精製は、実質的には単離と同時に行われ得る。

[0026] なお、ユーグレナからのパラミロンの単離および精製は周知であり、例えば、E. Ziegler, "Die natuerlichen und kunstlichen Aromen" Heidelberg, Germany, 1982, Chapter 4.3 "Gefriertrocken", DE 43 28 329、または特表2003-529538号公報に記載されている。

[0027] パラミロンの加工品としては、例えば、アモルファスパラミロン、エマルジョンパラミロンが挙げられる。

アモルファスパラミロンとは、ユーグレナ由来の結晶性パラミロンをアモルファス化した物質である。

本実施形態で用いるアモルファスパラミロンは、ユーグレナから公知の方法で生成された結晶性のパラミロンに対する相対結晶度が、1～20%である。

但し、この相対結晶度は、特許第5612875号公報記載の方法により求めたものである。

つまり、アモルファスパラミロン及びパラミロンを、それぞれ、粉砕機（Retsh社製ボールミルMM400）にて、振動数20回/秒で5分間粉砕後、X線回折装置（スペクトリス社製H' PertPRO）を用い、管電圧45KV、管電流40mAにて、 $2\theta$ が $5^\circ$ 乃至 $30^\circ$ の範囲でスキャンを行い、パラミロンとアモルファスパラミロンの $2\theta = 20^\circ$ の付近の回折ピーク $P_c$ 、 $P_a$ を得る。

この $P_c$ 、 $P_a$ の値を用い、アモルファスパラミロンの相対結晶度を、  
アモルファスパラミロンの相対結晶度 $= P_a / P_c \times 100$  (%)  
により算出する。

[0028] 本実施形態で用いるアモルファスパラミロンは、特許第5612875号公報記載の方法に従い、結晶性のパラミロン粉末を、アルカリ処理した後に酸で中和し、その後洗浄、水分除去工程を経て、乾燥を行うことにより調製される。

パラミロンの加工品には、その他、公知の種々の方法によりパラミロンを化学的又は物理的に処理して得た水溶性パラミロン、硫酸化パラミロン等や、パラミロン誘導体も含まれる。

[0029] エマルジョンパラミロンとは、その加工方法及び物性が乳化物に類似していることから、エマルジョンパラミロンとも呼ばれる物質であって、パラミロンに水を加えて得た流体を超高圧で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる衝突処理を行うことにより得られ、4倍以上の水と結合して膨潤した加工パラミロンである。

エマルジョンパラミロンは、粉体等の固体に水溶性溶媒を加えたスラリーを、細孔ノズルから超高压で噴出させて被衝突物に衝突させる公知の物性改質装置（例えば、特開2011-88108号公報、特開平6-47264号公報記載の装置）で、噴出時のノズル圧力245MPaで、1回以上衝突処理を行うことにより得ることができる。

エマルジョンパラミロンは、レーザ回折／散乱式粒度分布測定装置で粒度を測定したときのメジアン径が、パラミロンの5倍以上であり、7 $\mu$ m以上であって、光学電子顕微鏡により、粒子が、隣接する粒子と付着していることが観察され、パラミロンに対して4倍以上の水と結合して膨潤している。

原料パラミロンと水を混合したスラリーは、さらさらした流体であるが、エマルジョンパラミロンは、パラミロンが水分子中に分散して、粘度が増加して粘性を有し、触ったときに手に付着するような粘着性と、弾力性を有し、糊のような触感を備えている。

なお、その処理方法と物性から、得られた加工パラミロンを本明細書においてエマルジョンパラミロンと呼んでいるが、エマルジョン化しているか否かは不明であり、パラミロンが水と結合して膨潤している状態である。

[0030] 本実施形態の関節リウマチ抑制剤、関節リウマチ予防剤及び関節リウマチ治療剤は、関節リウマチ抑制剤、関節リウマチ予防剤又は関節リウマチ治療剤を含有する医薬組成物、食品組成物、化粧品組成物等の組成物等として利用できる。

本実施形態の関節リウマチ治療剤は、関節リウマチの確定診断を受けた患者に、抗リウマチ薬として投与される。

本実施形態の関節リウマチ抑制剤及び関節リウマチ予防剤は、医薬組成物、健康食品等として構成され、関節リウマチの自覚症状を発現した者や、遺伝的に又は生活環境から考慮して関節リウマチに罹患する可能性の高い者などに、予防的に投与される。

[0031] ユーグレナ由来物質は、食品としても摂取可能で副作用がないため、関節リウマチの確定診断を受ける前であっても、投与可能である。また、確定診

断を受ける前から、確定診断を受けた後の任意の時点、例えば、寛解に至った時点、治癒に至った時点や、他の抗リウマチ薬等の関節リウマチ治療薬に切り替える時点などまで、継続して投与可能である。

また、本実施形態の関節リウマチ抑制剤及び関節リウマチ予防剤は、関節リウマチの患者が治療により寛解に至った後、寛解に至った患者に対して、症状の再発を抑制することを目的として、投与される。

ここで、「寛解」とは、治療によって関節リウマチの病状が制御され、関節リウマチの諸症状がおさまった状態をいい、永続的な寛解が得られた状態を意味する「治癒」に至る前の状態である。

#### [0032] <<医薬組成物>>

医薬の分野では、リウマチ抑制、予防、治療作用を有効に発揮できる量のユーグレナ由来物質とともに、薬学的に許容される担体や添加剤を配合することにより、リウマチ抑制、予防、治療作用を有する医薬組成物が提供される。当該医薬組成物は、医薬品であっても、医薬部外品であってもよい。

当該医薬組成物は、内用的に適用されても、また、外用的に適用されてもよい。したがって、当該医薬組成物は、内服剤、静脈注射、皮下注射、皮内注射、筋肉注射及び／または腹腔内注射等の注射剤、経粘膜適用剤、経皮適用剤等の製剤形態で使用することができる。

当該医薬組成物の剤型としては、適用の形態により、適当に設定できるが、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、粉末剤、散剤、等の固形製剤；液剤、懸濁剤等の液状製剤、軟膏剤、ゲル剤等の半固形剤があげられる。

#### [0033] <<食品組成物>>

食品の分野では、リウマチ抑制、予防、治療作用を生体内で発揮できる有効な量のユーグレナ由来物質を食品素材として、各種食品に配合することにより、リウマチ抑制、予防、治療作用を有する食品組成物を提供することができる。すなわち、本発明は、食品の分野において、リウマチ抑制、予防、治療用と表示された食品組成物を提供することができる。当該食品組成物としては、一般の食品の他、特定保健用食品、栄養補助食品、機能性食品、病

院患者用食品、サプリメント等をあげることができる。また、食品添加物として用いることもできる。

[0034] ここで、特定保健用食品とは、生理学的機能などに影響を与える保健機能成分を含む食品であって、消費者庁長官の許可を得て特定の保健の用途に適する旨を表示可能なものである。本発明においては、特定の保健の用途として、腎不全進行の抑制、腎不全の予防、改善、尿毒症の予防、改善、そして生体内におけるインドキシル硫酸の産生阻害などと表示して販売される食品となる。

また栄養機能食品とは、栄養成分（ビタミン、ミネラル）の補給のために利用される食品であって、栄養成分の機能を表示するものである。栄養機能食品として販売するためには、一日当たりの摂取目安量に含まれる栄養分量が定められた上限値、下限値の範囲内にある必要があり、栄養機能表示だけでなく注意喚起表示等もする必要がある。

また機能性表示食品とは、事業者の責任において、科学的根拠に基づいた機能性を表示した食品である。販売前に安全性及び機能性の根拠に関する情報などが消費者庁長官へ届け出られたものである。

当該食品組成物としては、例えば、調味料、畜肉加工品、農産加工品、飲料（清涼飲料、アルコール飲料、炭酸飲料、乳飲料、果汁飲料、茶、コーヒー、栄養ドリンク等）、粉末飲料（粉末ジュース、粉末スープ等）、濃縮飲料、菓子類（キャンディ、クッキー、ビスケット、ガム、グミ、チョコレート等）、パン、シリアル等をあげることができる。また、特定保健用食品、栄養補助食品、機能性食品等の場合、カプセル、トローチ、シロップ、顆粒、粉末等の形状であってもよい。

## 実施例

[0035] 以下、本発明を具体的実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は、以下の具体的実施例により限定されるものではない。

（実施例1）

ユーグレナグラシリス粉末（株式会社ユーグレナ製）を、実施例1のユー

グレナとした。

(実施例 2)

結晶性のパラミロン粉末を、以下の手順により調製した。

つまり、実施例 1 のユーグレナグラシリス粉末（株式会社ユーグレナ製）を蒸留水に入れ、室温で 2 日間攪拌した。これを超音波処理して細胞膜を破壊し、遠心分離により粗製パラミロン粒子を回収した。回収したパラミロン粒子を 1% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液に分散し、95℃で 2 時間処理し、再度遠心分離により回収したパラミロン粒子を 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液に分散して 50℃で 30 分間処理した。当該操作により脂質やタンパク質を除去し、その後アセトンおよびエーテルで洗浄した後、50℃で乾燥して、精製パラミロン粒子を得た。

調製したパラミロン 1 g を、公知のカプセルに格納して、実施例 2 のパラミロンを調製した。

[0036] (実施例 3)

実施例 2 で調製したパラミロンを用いて、特許第 5612875 号公報記載の方法に従い、アモルファスパラミロンを調製した。

つまり、実施例 2 で調製した結晶性のパラミロン粉末を、1 N の水酸化ナトリウム水溶液に、パラミロン粉末を 5% (w/v) 添加して溶解させ、1~2 時間スターラで攪拌して、アルカリ処理した。その後、1 N の塩酸を、パラミロン粉末が溶解した 1 N 水酸化ナトリウム水溶液に滴下して中和した。遠心分離の後上澄みを捨て、沈殿を蒸留水で洗浄する工程を繰り返した後、沈殿したゲルを回収し、凍結させた後凍結乾燥機で凍結乾燥し、実施例 3 のアモルファスパラミロンを得た。

[0037] (実施例 4)

実施例 2 で調製したパラミロンを用いて、以下の手順により、エマルジョンパラミロンを調製した。

結晶性のパラミロン粉末（株式会社ユーグレナ製）にイオン交換水を加え、パラミロン濃度が 10 wt% のパラミロンスラリーを得た。

湿式微粒化装置（スターバースト18KW中型機，株式会社スギノマシン製，斜向衝突チャンバー）の装置回路内をイオン交換水に置換した。装置のノズルを加圧して、パラミロンスラリーを回路内に供給し、初期吐出液を、回路内デッドボリュームとして廃棄した。その後、相互に角度を持って対向する一对のノズルからパラミロンスラリーの噴流をそれぞれ噴出させて、相互に衝突させる斜向衝突による噴流衝突を行った。流出路からスラリー処理物を回収して、1パスとした。このときの処理圧力は、245 MPa，スラリー処理量は、240 mL，ノズル径は、0.17 mmとした。

この処理を3回繰り返して3パスの処理を行い、実施例4のエマルジョンパラミロンを得た。

実施例4のエマルジョンパラミロンは、スラリー調製時に加えたイオン交換水と分離せず、水と結合して膨潤していた。

[0038] （試験例1 マウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価1）

本試験例では、実施例1及び2の被験物質の関節リウマチに対する作用について、マウスのコラーゲン関節炎モデルについて評価を行った。

[0039] ニワトリII型コラーゲン（SIGMA）を0.01 M 酢酸水溶液に2 mg/mLとなるように溶解し、これに等量のFreund' s complete adjuvant (Difco) を加えて作製したエマルジョン（コラーゲン1 mg/mL）を、イソフルランによる吸入麻酔下で、マウスの尾根部に0.1 mL（コラーゲン量として0.1 mg）皮内投与し、コラーゲンに感作させた。また、3週間後、同様に投与を行い、ブーストとした。また、無処置動物には、感作及びブーストは行わなかった。

[0040] マウスを、無処置動物群、対照群、ユーグレナ群、パラミロン群に群分けした（各群n = 5）。固型飼料CE-2（日本クレア株式会社）に実施例1、2の被験物質をそれぞれ2%混餌し、それぞれ、ユーグレナ群、パラミロン群のマウスに、ブースト5日後から毎日経口で自由摂取させた。

◎ 関節炎スコアの測定

コラーゲンに感作させた日（以下、「感作日」という。）より、四肢における関節炎の症状について、肉眼観察によりスコア付を行い、四肢のスコア

の合計値を算出した。

スコア付は、垣本ら（新生化学実験講座12，分子免疫学II，東京化学同人：360-372，1989.）のスコアに準じて、表1の関節炎スコアに従って、3回/週（月・水・金）の頻度で評価を行い、四肢のスコアの合計値を算出した。

[0041] [表1]

#### 関節炎スコア

スコア	症状
0	症状なし
1	指など小関節 1 本の軽度発赤腫脹
2	小関節が 2 本以上，あるいは大きな関節の発赤腫脹
3	1 肢の発赤腫脹
4	1 肢の全体が最大限に発赤腫脹

[0042] 一肢あたりのスコアは0点～4点であるため、四肢を合計したときの最低点は0点（四肢すべてに症状がない場合）であり、最高点は16点（四肢すべての全体が最大限に発赤腫脹する場合）である。

[0043] 関節炎スコアの測定結果を図1に示す。

スコア測定最終日において、対照群と比較してユーグレナ群、パラミロン群において、有意に低値となり（ $p < 0.05$ ）、被験物質を継続摂取することによる関節炎症状の抑制が認められた。

対照群のスコア平均値は、8（一肢あたり2）を超える時期があったのに対し、ユーグレナ群、パラミロン群のスコア平均値は、測定期間内の全体において6未満（一肢あたり1.5未満）に抑えられていた。特に、スコア測定35日から最終日（49日）の間、ユーグレナ群のスコア平均値は4（一肢あたり1）以下、パラミロン群のスコア平均値は4.2（一肢あたり1.05）以下であり、関節炎の症状は、軽度発赤腫脹に抑えられていた。

[0044] ◎ サイトカインの測定

感作日の7週間後に、放血安楽致死をさせ、鼠径部リンパ節（無処置を除く

全群)、膝関節(全群・両側)の順に摘出した。

鼠径部リンパ節については、リンパ球を分画後3等分し、ニワトリII型コラーゲン(SIGMA)を添加した培地でそれぞれ培養を行った。培養開始後約48時間後に培養上清を採取し、培養上清のサイトカイン(IL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ )分泌量を、マルチプレックス サスペンションアレイにて測定した。

測定結果を、図2～図4に示す。

図2～図4に示すように、サイトカインIL-6, IL-17A, IFN- $\gamma$ について、ユーグレナ群及びパラミロン群のいずれも、対照群と比較して、有意に低値を示していた( $p < 0.05$ )。

[0045] (試験例2 マウスのコラーゲン関節炎モデルを用いた評価2)

本試験例では、上記試験例1で評価を行った実施例1, 2の被験物質に加え、実施例3, 4の被験物質も併せて、関節リウマチに対する作用について、マウスのコラーゲン関節炎モデルを用いて評価を行った。

マウスを、無処置動物群、対照群、ユーグレナ群、パラミロン群、アモルフアスパラミロン群、エマルジョンパラミロン群(各群 $n = 5$ )に群分けしたことを除いては、試験例1と同様の動物、手順で、各群のマウスに、コラーゲン感作処理及び飼料摂取させる処理を行った。

つまり、実験用の動物には、マウス(DBA/1J Jms Slc (SPF), 6週齢雄, 日本エスエルシー株式会社)を使用した。

ニワトリII型コラーゲン(SIGMA)を0.01 M 酢酸水溶液に2 mg/mLとなるように溶解し、これに等量のFreund' s complete adjuvant (Difco)を加えて作製したエマルジョン(コラーゲン1 mg/mL)を、イソフルランによる吸入麻酔下で、マウスの尾根部に0.1 mL(コラーゲン量として0.1 mg)皮内投与し、コラーゲンに感作させた。また、3週間後、同様に投与を行い、ブーストとした。また、無処置動物には、感作及びブーストは行わなかった。

[0046] マウスを、無処置動物群、対照群、ユーグレナ群、パラミロン群、アモルフアスパラミロン群、エマルジョンパラミロン群に群分けした(各群 $n = 5$ )。固型飼料CE-2(日本クレア株式会社)に実施例1～4の被験物質をそれ

ぞれ2%混餌し、それぞれ、ユーグレナ群、パラミロン群、アモルファスパラミロン群、エマルジョンパラミロン群のマウスに、ブースト5日後から毎日経口で自由摂取させた。

[0047] ◎ 関節炎スコアの測定

コラーゲンに感作させた日（以下、「感作日」という。）より、四肢における関節炎の症状について、肉眼観察によりスコア付を行い、試験例1と同様の方法で、四肢のスコアの合計値を算出した。

[0048] 関節炎スコアの測定結果を図5に示す。

スコア測定最終日において、対照群と比較してユーグレナ群、パラミロン群、アモルファスパラミロン群、エマルジョンパラミロン群すべての群において、有意に低値となり、被験物質を継続摂取することによる関節炎症状の抑制が認められた。

[0049] ◎ 抗コラーゲンIgGの測定

感作日の7週間後に、動物をイソフルランによる吸入麻酔下で開腹し、腹部後大静脈から採血を行った。得られた血液は、遠心分離して血清を分取し、血清中のコラーゲンIgGの定量（ELISA法）を行った。

抗コラーゲンIgGの測定結果を、図6に示す。

ユーグレナ群、パラミロン群、アモルファスパラミロン群、エマルジョンパラミロン群ともに対照群と比較して変化がなく、コラーゲン関節炎を誘導できていることが確認された。つまり、本抗コラーゲン関節炎モデルの実験系が有効に機能していることが確認できた。

[0050] ◎ サイトカインの測定

感作日の7週間後に、採血を行った動物は、採血後、放血安楽致死をさせ、鼠径部リンパ節（無処置を除く全群）、膝関節（全群・両側）の順に摘出した。

鼠径部リンパ節については、リンパ球を分画後3等分し、抗CD3抗体を添加した培地でそれぞれ培養を行った。培養開始後約48時間後に培養上清を採取し、培養上清のサイトカイン（IL-17A, IFN- $\gamma$ ）分泌量を、マルチプレック

ス サスペンションアレイにて測定した。

[0051] 測定結果を、図7, 図8に示す。

サイトカインIL-17A, IFN- $\gamma$ について、ユーグレナ群、パラミロン群、アモルファスパラミロン群、エマルジョンパラミロン群いずれも、対照群と比較して、低値を示していた。

[0052] ◎ 関節組織の観察

摘出後の左膝関節を、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、10%ギ酸ホルマリン脱灰液にて脱灰後、図9(A)の大腿骨滑車溝で、断面Aで切り出し、パラフィン切片を作製後にH.E.染色を行った。

評価は、次の膝関節組織の評価法に従った。即ち、滑膜の組織については、浮腫、炎症性細胞浸潤、滑膜細胞増生、肉芽組織形成、線維化、関節腔内滲出物、大腿骨滑車溝の組織については、パンヌス形成、関節軟骨の破壊(変性・線維化)、骨破壊(吸収)、骨棘形成(反応性類骨形成)について、認められた所見を、変化なし(評点0)、軽微(評点1)、軽度(評点2)、中等度(評点3)、高度(評点4)の5段階で評価した。

なお、各群の代表例の選択については、四肢の合計スコアの平均値に近い動物を指標に選択した。無処置群と対照群は2例、被験物質摂取群は3例を選択した。

結果を、表2, 表3に示す。

[0053]

[表2]

器官・組織	所見	性別	雄											
		群	無処置				対照				ユーグレナ			
		投与量(%、混餌)	0				0				2			
		動物数	2				2				3			
		程度(評点)	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
滑膜	浮腫	2				1	1			3				
	炎症細胞湿潤	2					1		1	3				
	滑膜細胞増生	2				1		1		3				
	肉芽組織形成	2					2			2	1			
	線維化	2				1		1		3				
	関節腔内滲出物	2				1			1	3				
大腿骨 滑車溝	パ Nusantara 形成	2				1		1		3				
	関節軟骨の破壊(変性・線維化)	2				1		1		3				
	骨破壊(吸収)	2				2				3				
	骨棘形成(反応性類骨形成)	2				2				3				

病理組織学的所見の程度(評点)

0: 著変なし, 1: 軽微, 2: 軽度, 3: 中等度

[0054] [表3]

器官・組織	所見	性別	雄											
		群	パラミロン				アモルファス パラミロン				エマルジョン パラミロン			
		投与量(%、混餌)	2				2				2			
		動物数	3				3				3			
		程度(評点)	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
滑膜	浮腫	3				3				2	1			
	炎症細胞湿潤	2	1			3					2	1		
	滑膜細胞増生	1	2			3				1	1		1	
	肉芽組織形成	2	1			2	1				2	1		
	線維化	1	1	1		3					3			
	関節腔内滲出物	3				3				3				
大腿骨 滑車溝	パ Nusantara 形成	2	1			3				2	1			
	関節軟骨の破壊(変性・線維化)	1	1	1		3				2	1			
	骨破壊(吸収)	3				3				3				
	骨棘形成(反応性類骨形成)	3				3				3				

病理組織学的所見の程度(評点)

0: 著変なし, 1: 軽微, 2: 軽度, 3: 中等度

[0055] 各群の代表例の左膝関節組織の病理標本の写真を、図10~図15に示す

。

図10に示すように、無処置群では、滑膜及び大腿骨滑車溝に、関節炎に起因すると考えられる所見は認められなかった。

図11の対照群では、滑膜の浮腫、炎症、肉芽組織形成、線維化、滲出物が軽微（評点1）から中等度（評点2）に認められた。大腿骨滑車溝については、パンヌス形成及び軟骨破壊が軽度（評点2）に認められた。

図12のユーグレナ群及び図14のアモルファスパラミロン群については、滑膜の肉芽組織形成が軽微（評点1）に認められた以外は、所見は認められなかった。

図13のパラミロン群では、滑膜の炎症、肉芽組織形成、線維化及び大腿骨滑車溝のパンヌス形成、軟骨破壊が、軽微（評点1）から軽度（評点2）に認められた。

図15のエマルジョンパラミロン群については、滑膜の浮腫・炎症、肉芽組織形成、線維化、滲出物が軽微（評点1）に認められた。大腿骨滑車溝については、パンヌス形成及び軟骨破壊が軽度（評点2）に認められた。

[0056] ◎ 抑制性T細胞：Th17/Tregの測定

感作日の7週間後に摘出した鼠径部リンパ節について、フローサイトメーターを用いて細胞集団の分布解析を行った。抑制性T細胞の測定には、Mouse Th17/Treg Phenotyping Kit (BD pharmingen)を用いた。

フローサイトメーターを用いた解析で得られたCD4陽性T細胞中のIL-17産生細胞数を、図16に示す。

図16のIL-17A産生細胞数について、パラミロン群、アモルファスパラミロン群については、対照群よりも減少していた。エマルジョンパラミロン群では、対照群と比較して有意に減少していた。

[0057] ◎ 試験例1及び試験例2の結果のまとめ

対照群では、関節炎スコアの経日的な増加、血清IgG濃度の増加が認められた。膝関節の病理組織学的検査では、滑膜の炎症、肉芽組織形成、線維化、滲出物、大腿骨滑車溝については、パンヌス形成及び軟骨破壊が、それぞれ軽微から中等度に認められた。

[0058] 以上の病態に対して、ユーグレナ群、パラミロン群、アモルファスパラミロン群及びエマルジョンパラミロン群については、肉眼的スコアが対照群と比較して低値に推移し、統計学的な有意差も認められた。病理組織学的検査では、ユーグレナ群及びアモルファスパラミロン群で、滑膜の肉芽組織形成が軽微に認められた以外は、所見は認められなかった。パラミロン群については、滑膜の炎症、肉芽組織形成、線維化及び大腿骨滑車溝のパンヌス形成、軟骨破壊が認められたものの、その程度は、対照群と比較して顕著ではなかった。

リンパの培養上清中のサイトカインについては、Anti-CD3により、ユーグレナ群、パラミロン群、アモルファスパラミロン群及びエマルジョンパラミロン群で、いずれも対照群と比較して分泌の低下が認められた。特に、ユーグレナ群及びアモルファスパラミロン群で、その低下は顕著であった。

以上より、マウスのコラーゲン関節炎モデルを用いてユーグレナ由来物質の自己免疫疾患に対する作用について検討を行った結果、ユーグレナ群、パラミロン群、アモルファスパラミロン群及びエマルジョンパラミロン群で、関節炎の発症抑制作用が認められた。特に、ユーグレナ群及びアモルファスパラミロン群では、その作用が顕著であり、組織学的にも顕著な抑制が認められた。

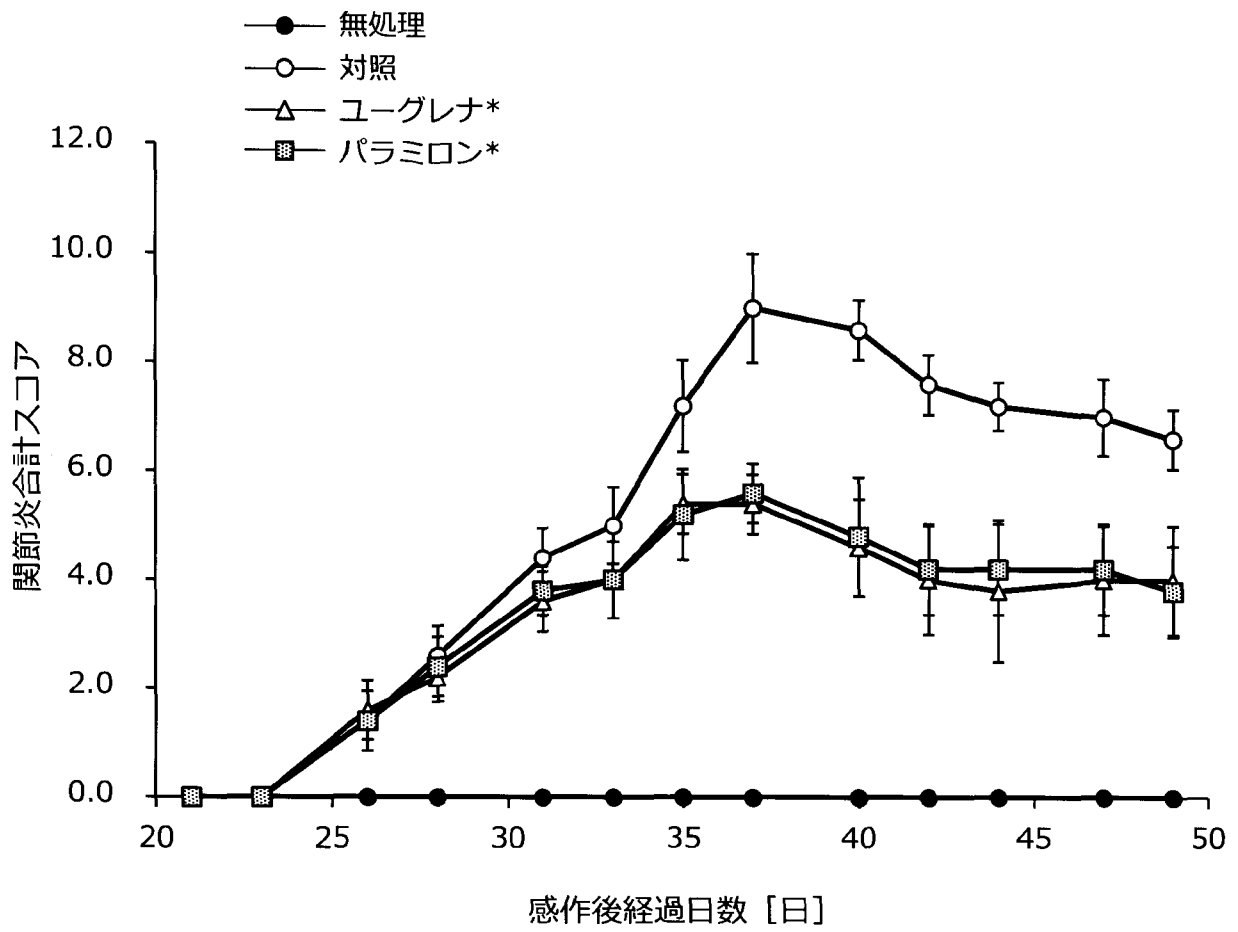
### 符号の説明

- [0059] a 大腿骨  
b 脛骨  
c 膝蓋骨  
d 後十字靭帯  
e 半月板  
f 前十字靭帯

## 請求の範囲

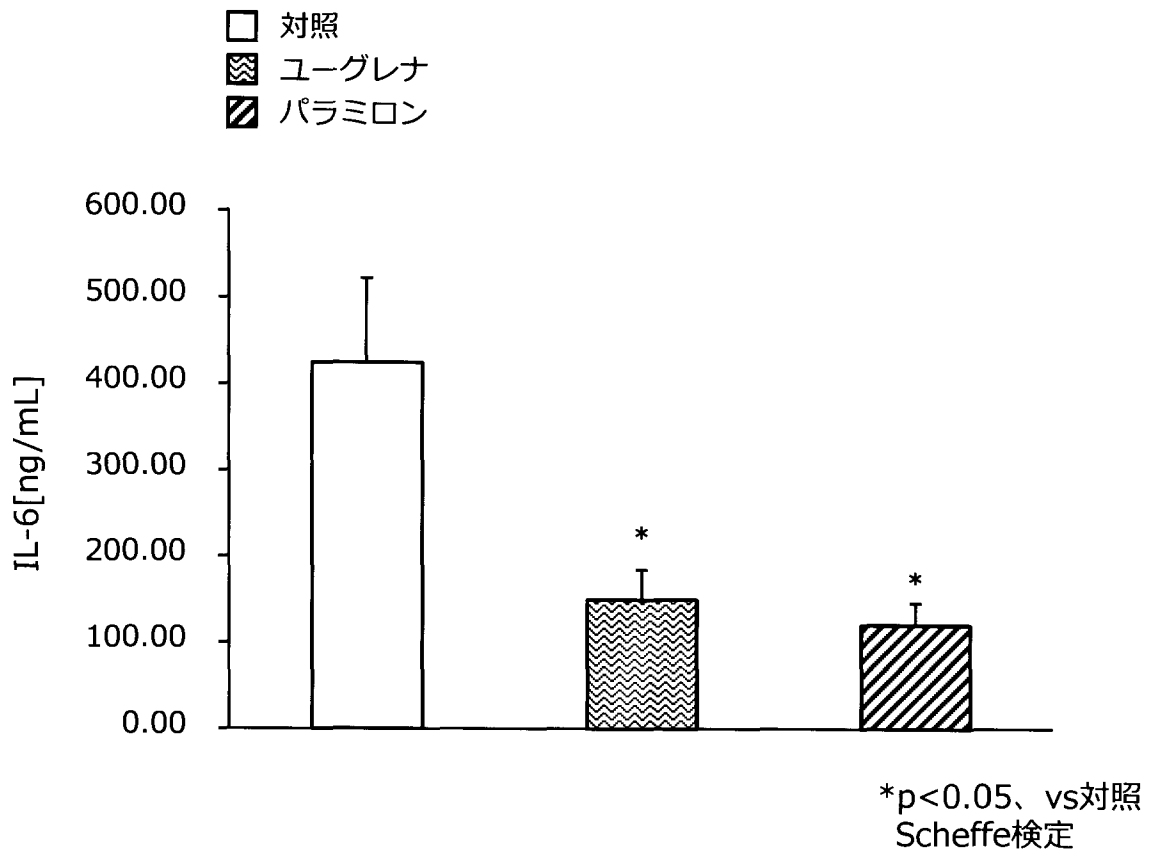
- [請求項1] ユーグレナ由来物質を有効成分として含有することを特徴とする関節リウマチ抑制剤。
- [請求項2] 関節リウマチにおける免疫異常を改善することによって関節リウマチの活動性をコントロールする抗リウマチ薬として用いられることを特徴とする請求項1記載の関節リウマチ抑制剤。
- [請求項3] 関節リウマチの確定診断を受けていない生体用に用いられることを特徴とする請求項1記載の関節リウマチ抑制剤。
- [請求項4] 生体に、関節リウマチの確定診断前から、確定診断を受けた後の任意の時点まで、継続して投与されることを特徴とする請求項1記載の関節リウマチ抑制剤。
- [請求項5] 前記ユーグレナ由来物質は、ユーグレナの藻体、前記ユーグレナ由来のパラミロン、該パラミロンにアルカリ処理及び中和処理を施した水溶性のアモルファスパラミロン、及び前記パラミロン水溶液を超高压で細孔ノズルから噴出させて被衝突物に衝突させる処理を施したエマルジョンパラミロンを含む群から選択された少なくとも一つの物質であることを特徴とする請求項1記載の関節リウマチ抑制剤。
- [請求項6] ユーグレナ由来物質を有効成分として含有することを特徴とする関節リウマチ予防剤。
- [請求項7] ユーグレナ由来物質を有効成分として含有することを特徴とする関節リウマチ治療剤。
- [請求項8] ユーグレナ由来物質を有効成分として含有し、  
関節リウマチの予防又は改善に用いられることを特徴とする関節リウマチ抑制用食品。

[図1]

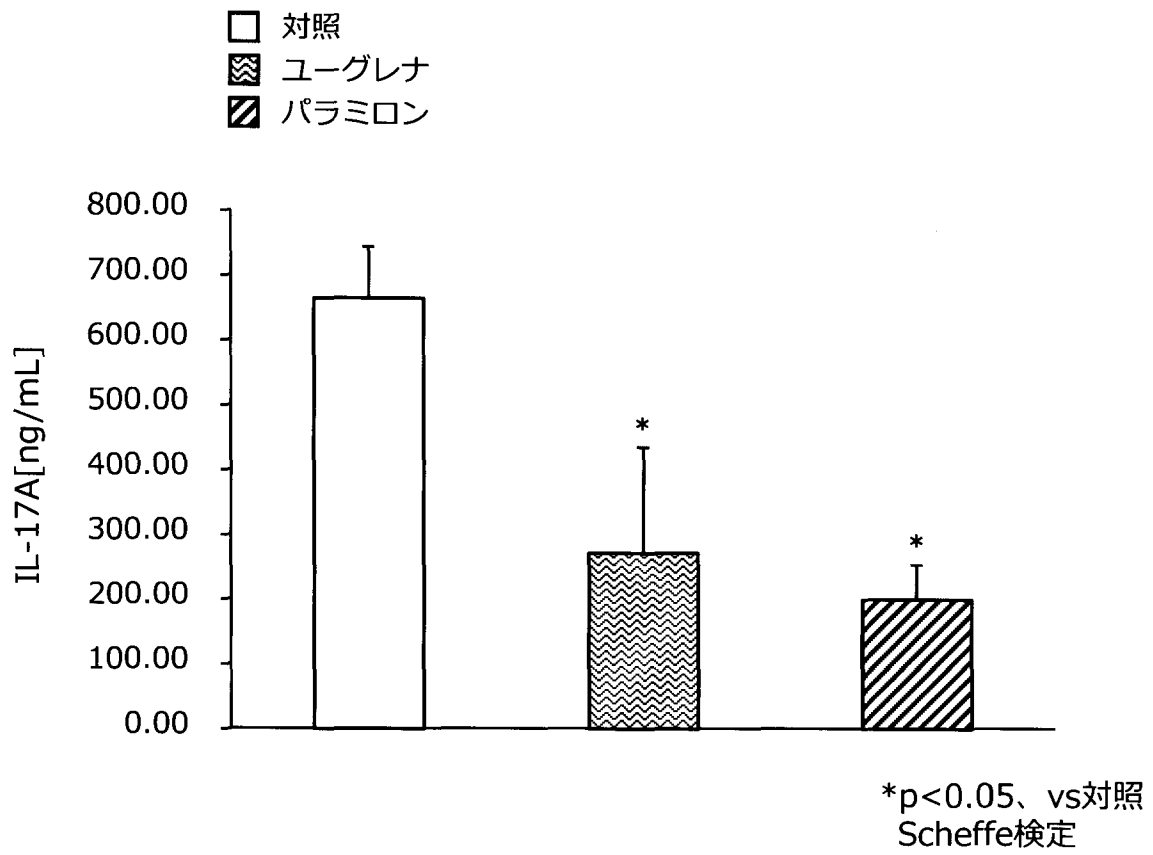


\*p<0.05、vs対照、  
Mann-WhitneyのU検定

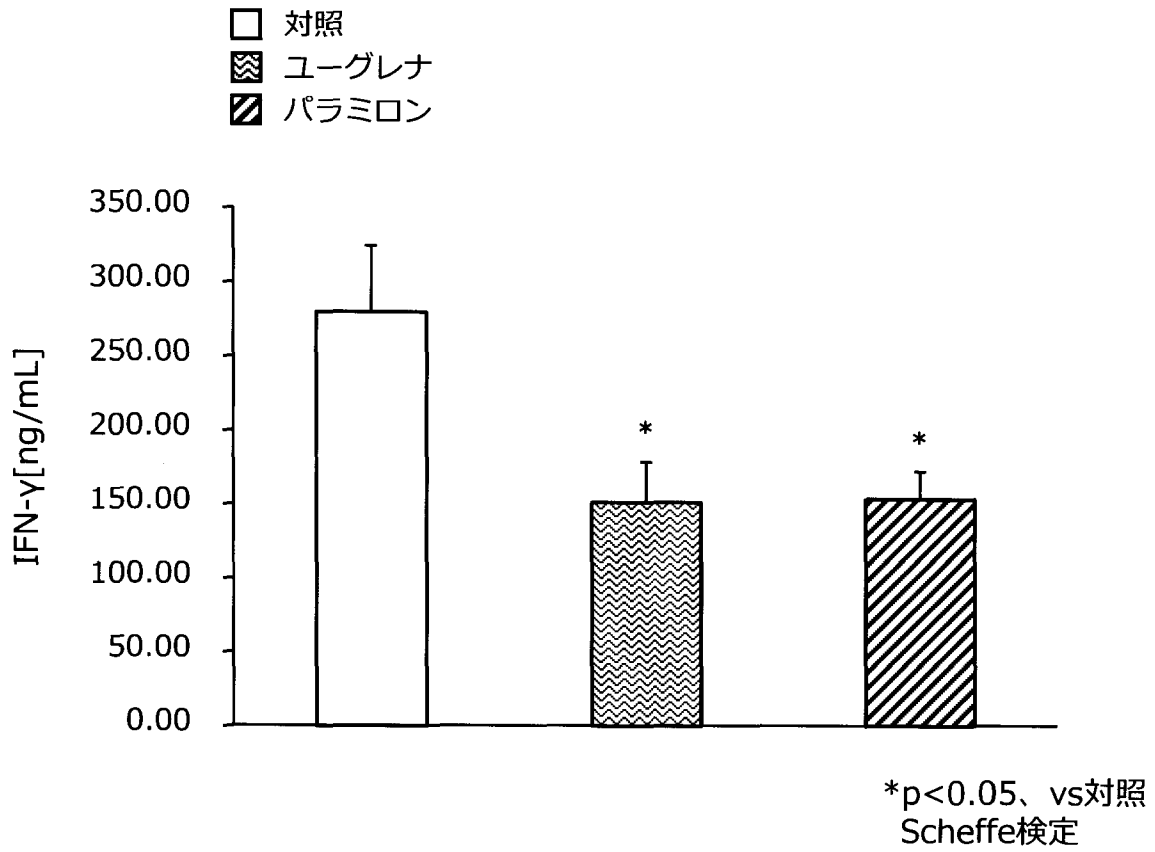
[図2]



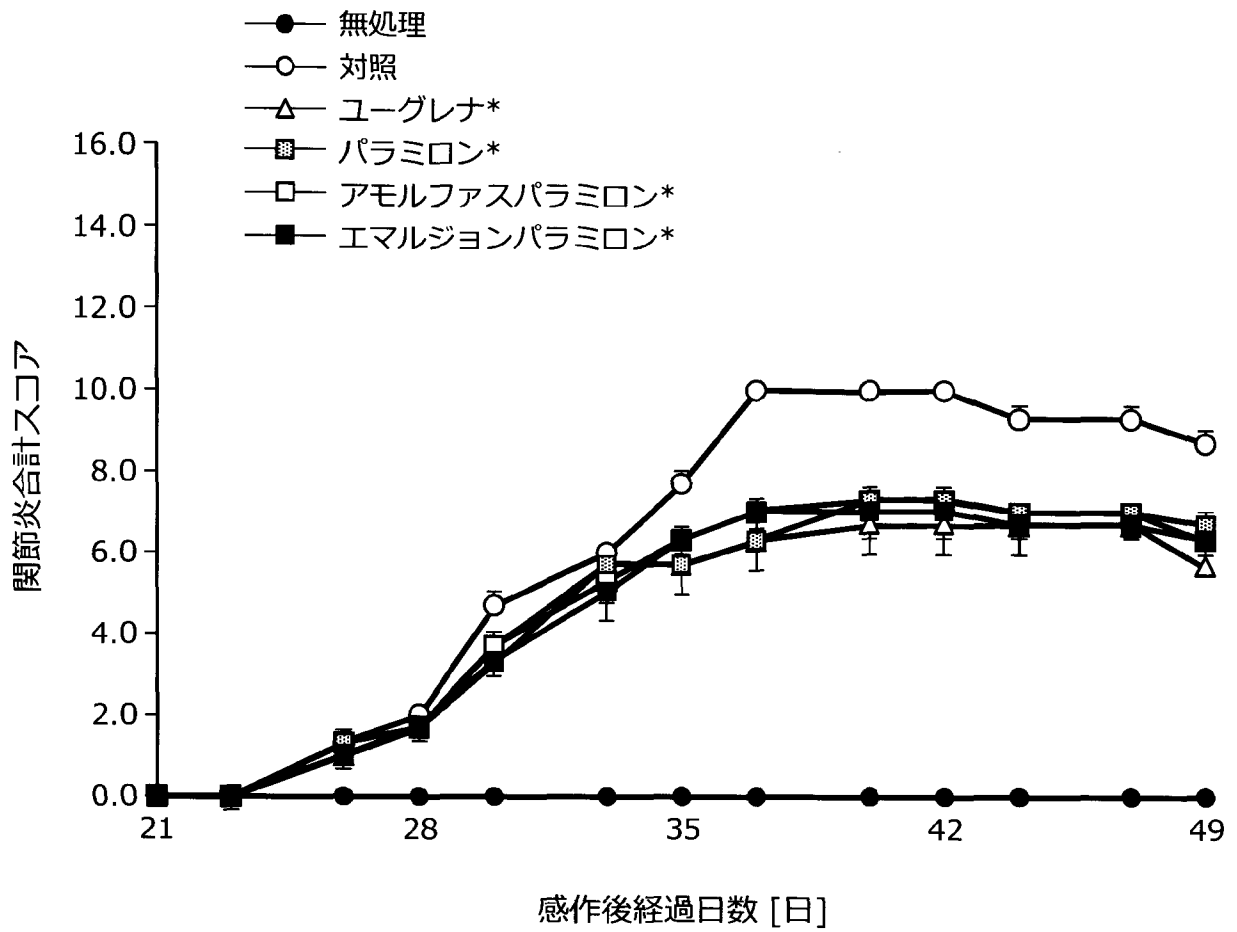
[図3]



[図4]

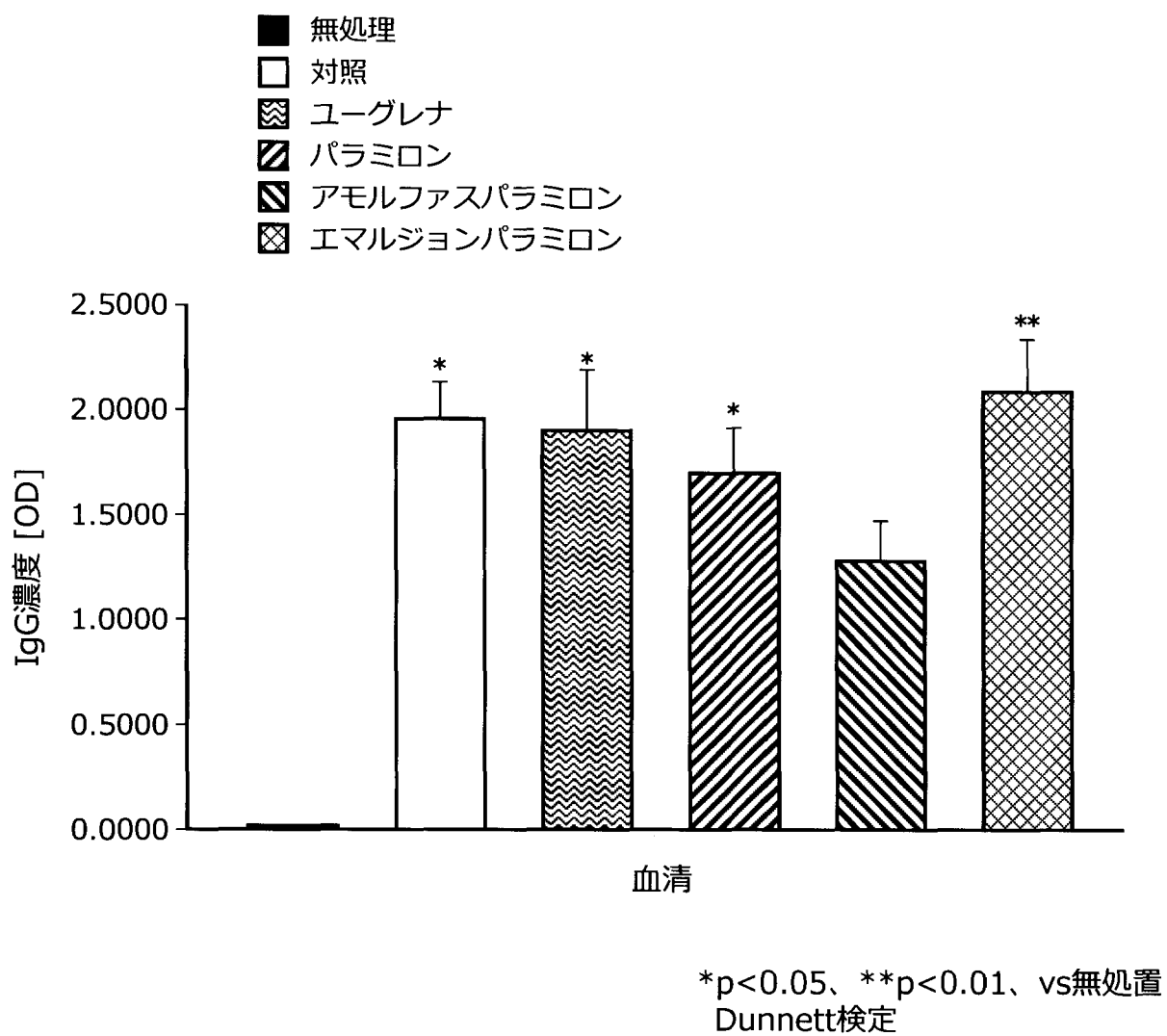


[図5]

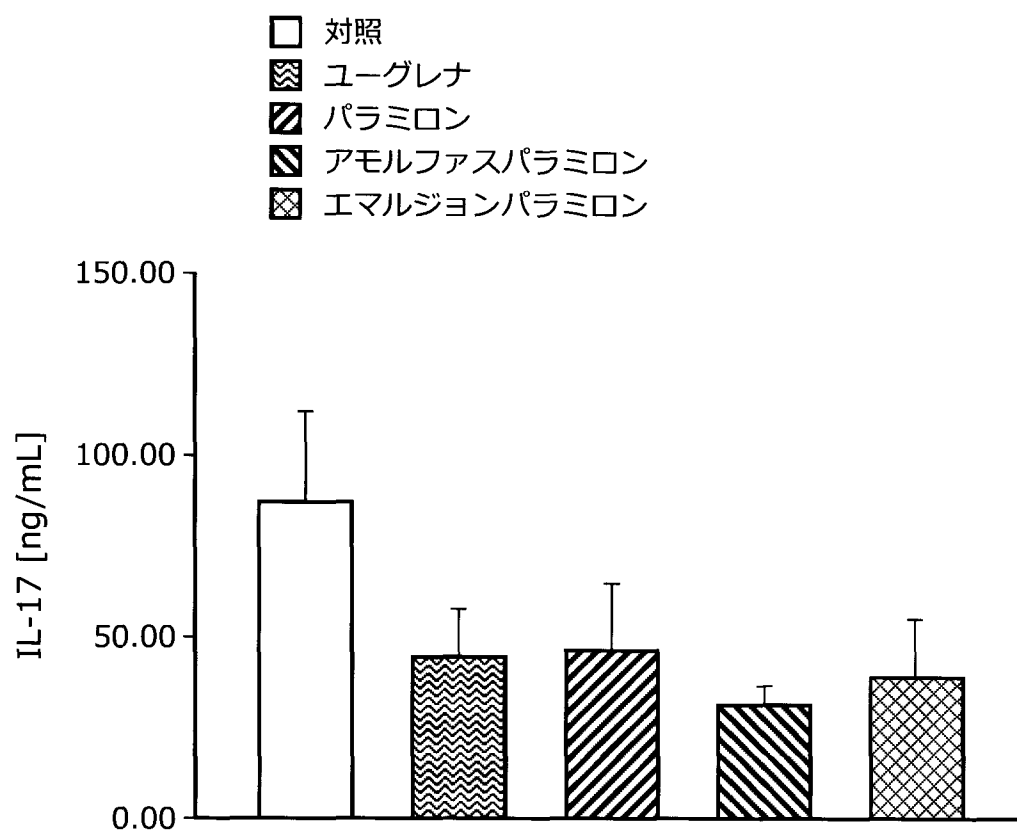


\*p<0.05、vs対照、  
Mann-WhitneyのU検定

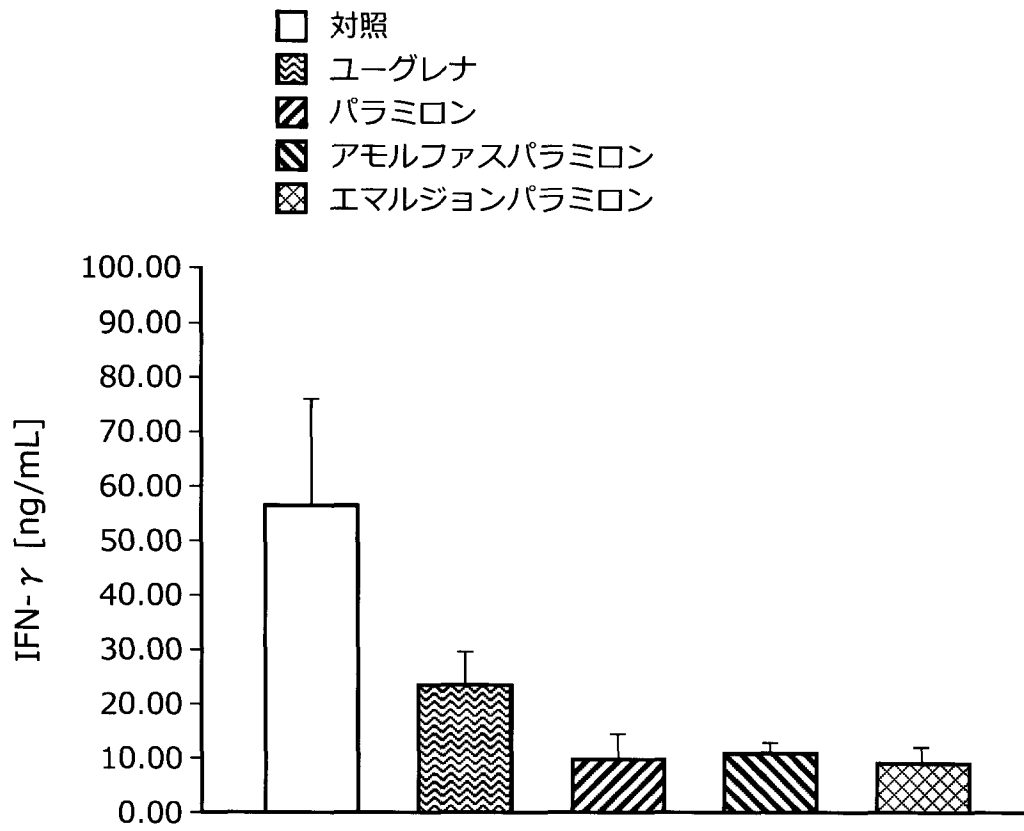
[図6]



[図7]



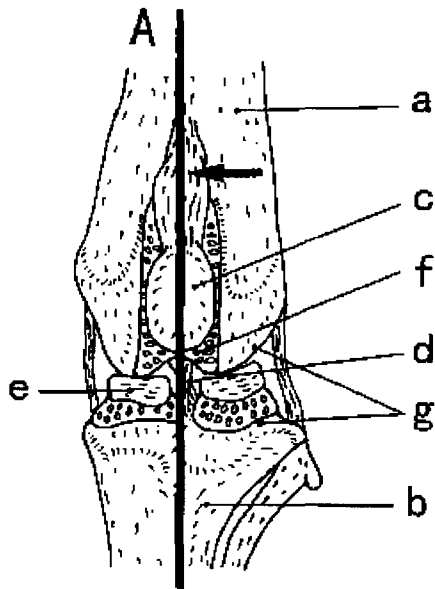
[図8]



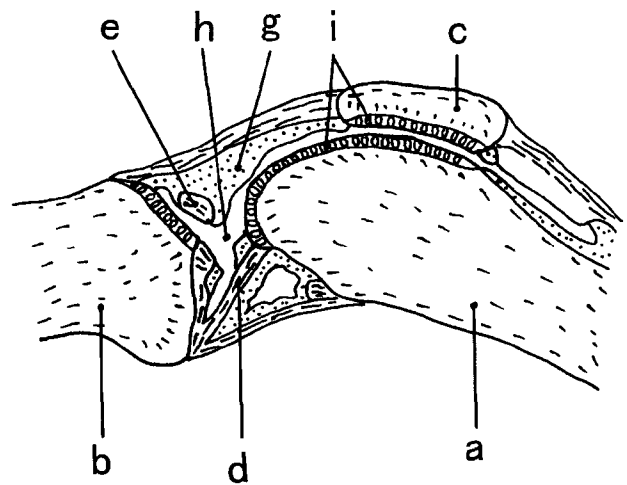
[図9]

## &lt;膝関節の病理標本作製部位&gt;

(A)



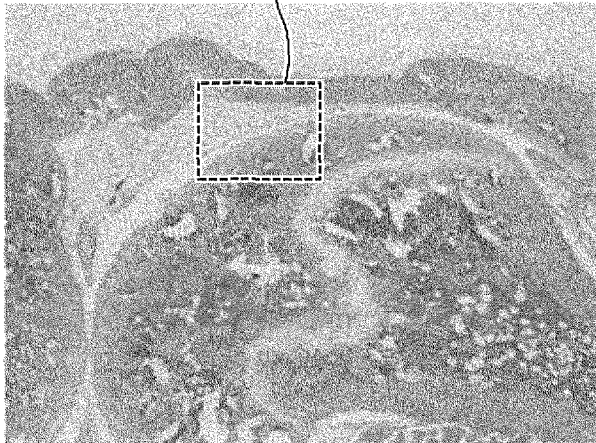
(B)



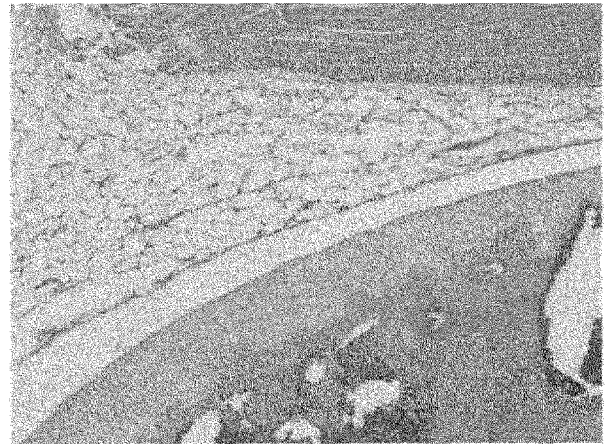
[図10]

<無処置群>

(A)

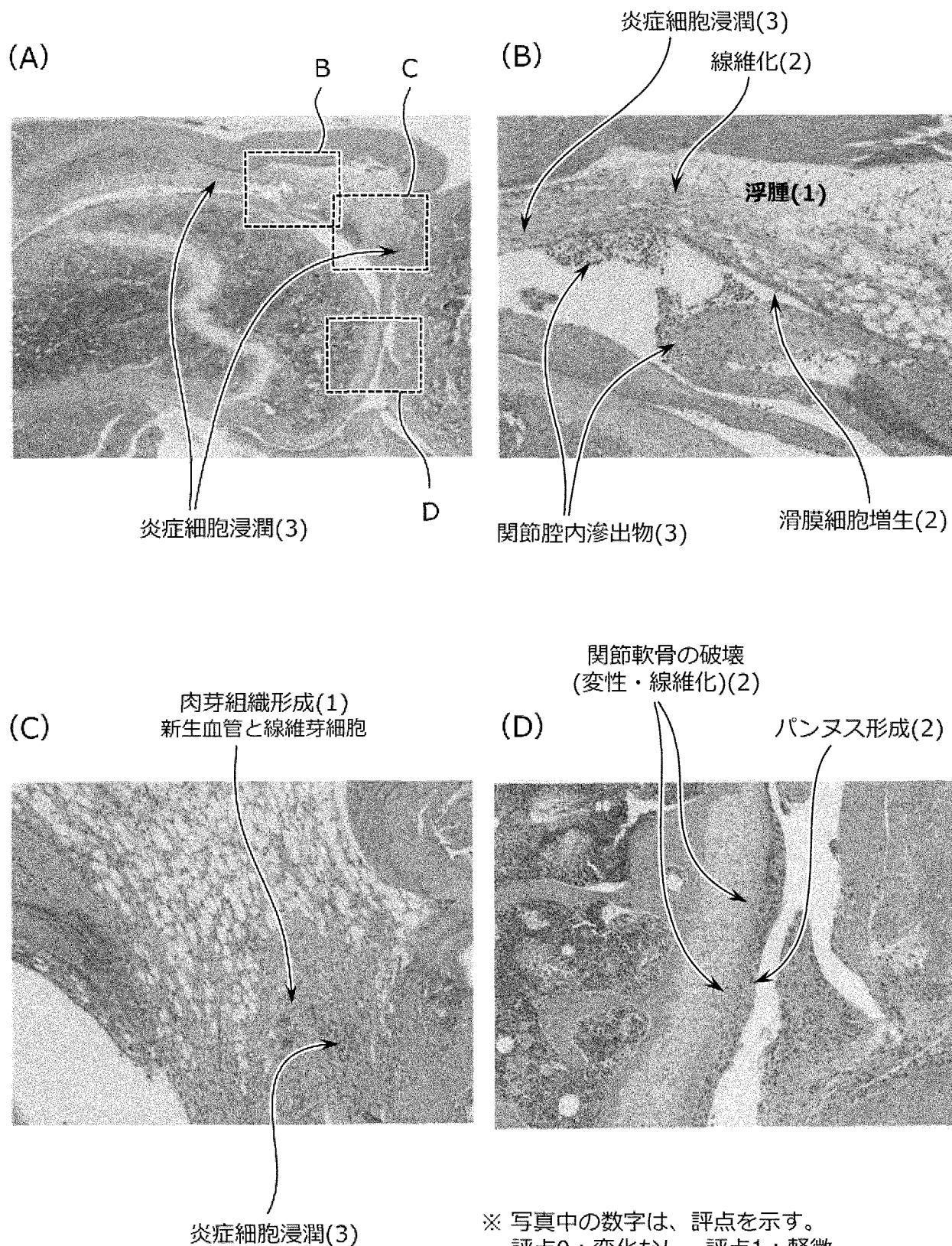


(B)



[図11]

<対照群>

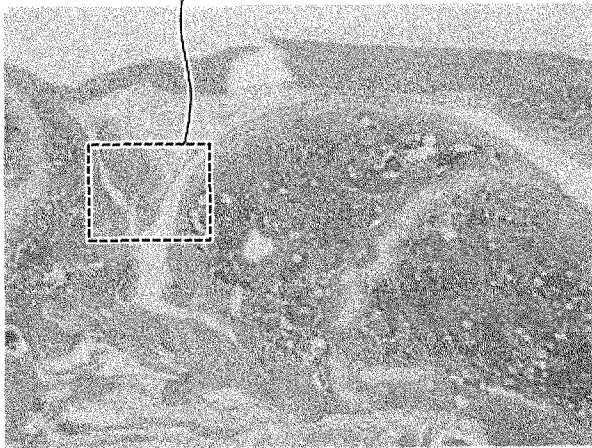


※ 写真中の数字は、評点を示す。  
評点0：変化なし，評点1：軽微，  
評点2：軽度，評点3：中等度，評点4：高度

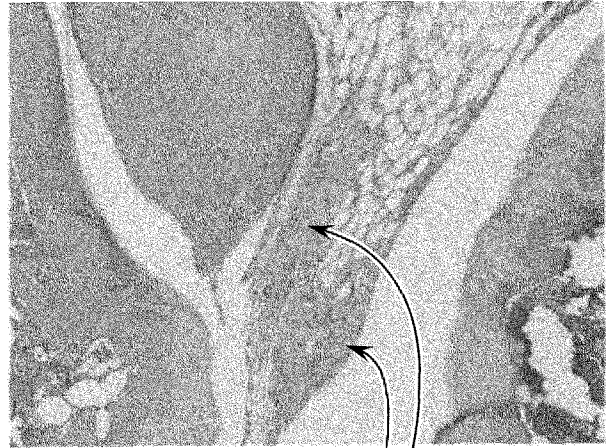
[図12]

## &lt;ユーグレナ群&gt;

(A)



(B)

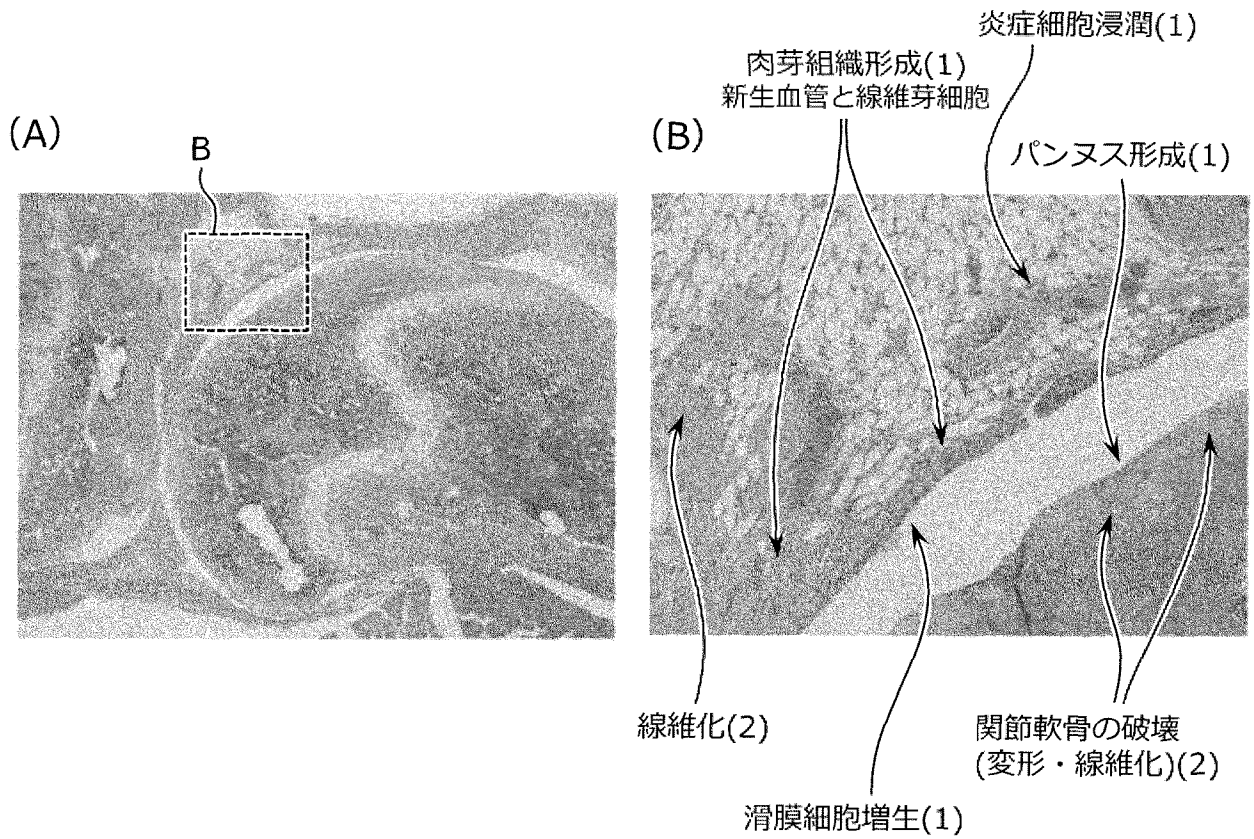


肉芽組織形成(1)  
新生血管と線維芽細胞

※ 写真中の数字は、評点を示す。  
評点0：変化なし，評点1：軽微，  
評点2：軽度，評点3：中等度，評点4：高度

[図13]

### <パラミロン群>

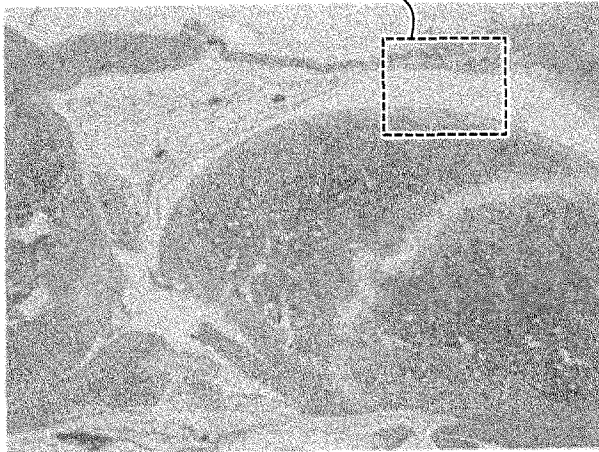


※ 写真中の数字は、評点を示す。  
 評点0：変化なし，評点1：軽微，  
 評点2：軽度，評点3：中等度，評点4：高度

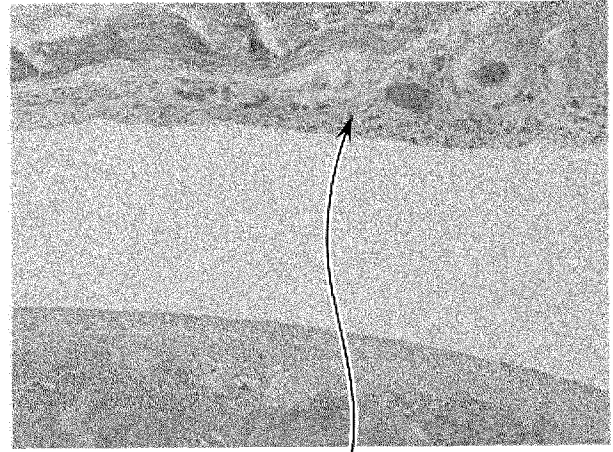
[図14]

## &lt;アモルファスパラミロン群&gt;

(A)



(B)

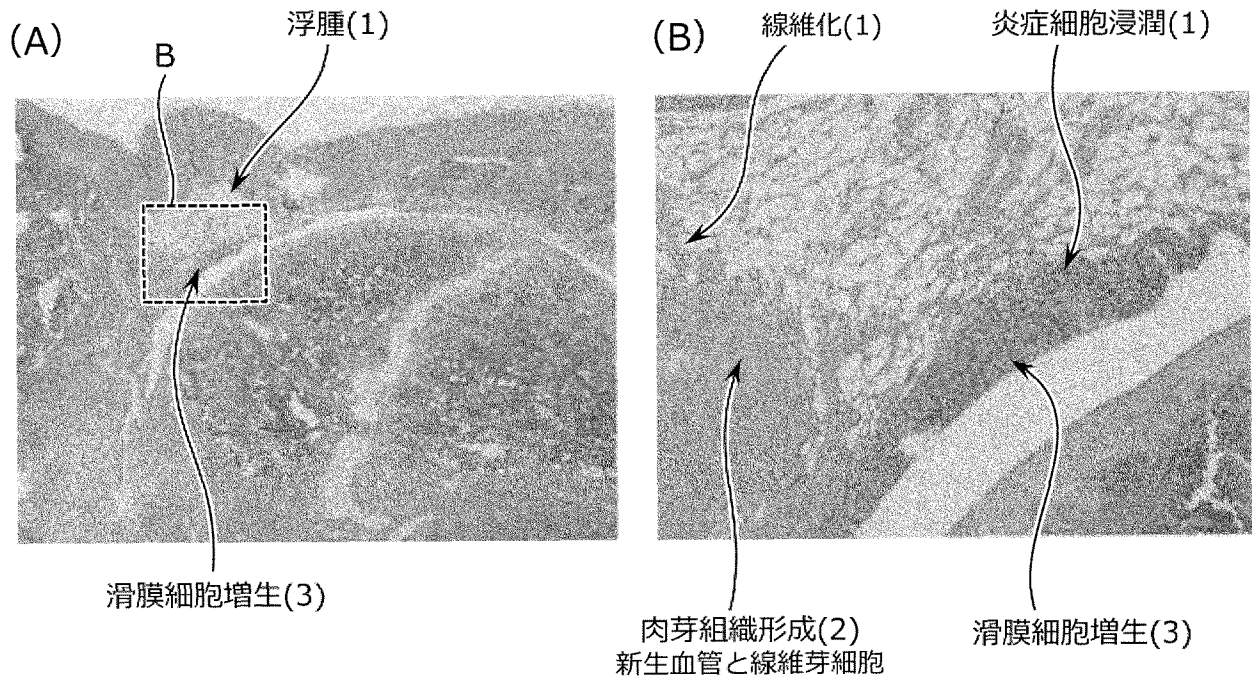


肉芽組織形成(1)  
新生血管と線維芽細胞

※ 写真中の数字は、評点を示す。  
評点0：変化なし，評点1：軽微，  
評点2：軽度，評点3：中等度，評点4：高度

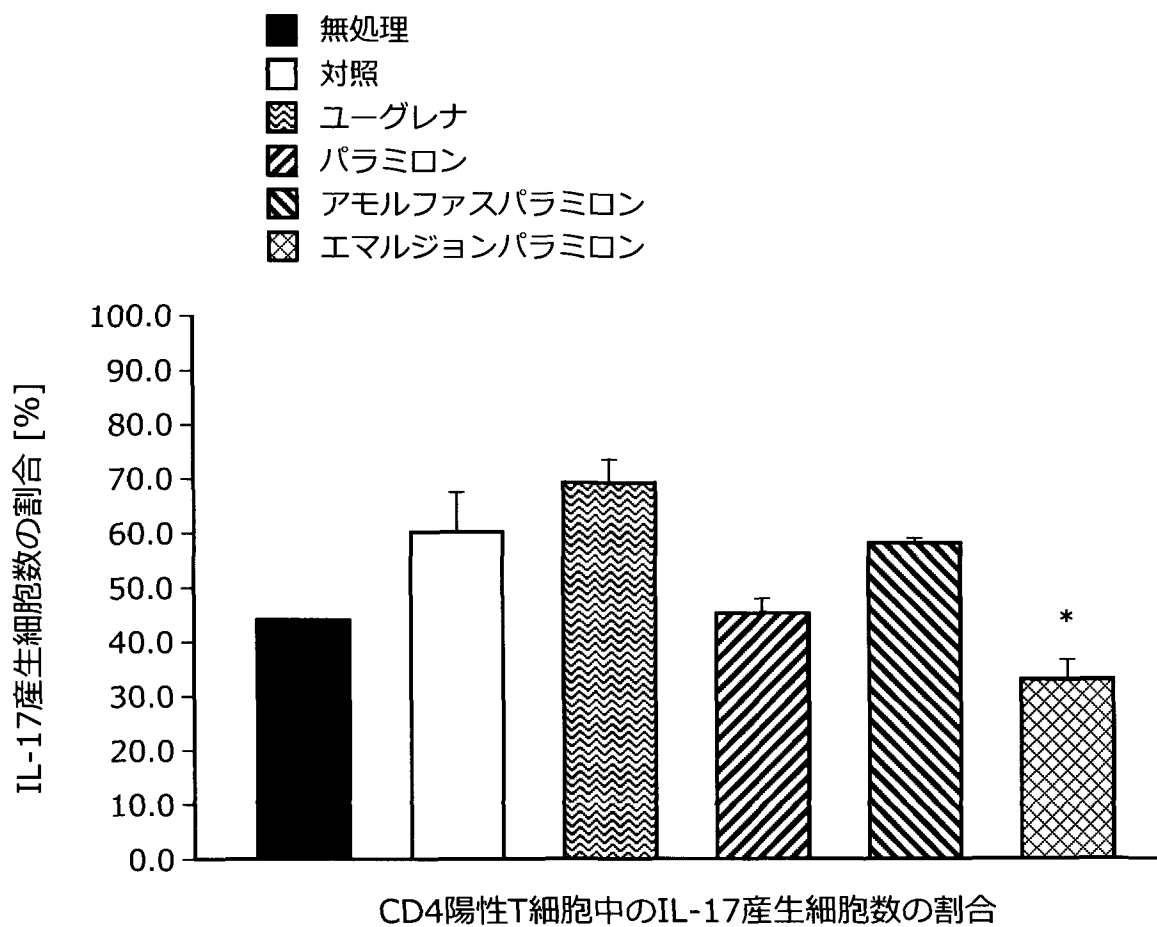
[図15]

＜エマルジョンパラミロン群＞



※ 写真中の数字は、評点を示す。  
 評点0：変化なし，評点1：軽微，  
 評点2：軽度，評点3：中等度，評点4：高度

[図16]



\*p<0.05、vs対照  
Dunnett検定

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2016/061386

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
A61K35/68(2006.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K31/716(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A61K35/68, A23L33/10, A61K31/716, A61P29/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), Japio-GPG/FX

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2015/156339 A1 (Euglena Co., Ltd.), 15 October 2015 (15.10.2015), claim 13 (Family: none)	1-8
A	JP 2012-533303 A (Abbot Laboratories), 27 December 2012 (27.12.2012), & US 2011/0016585 A1 & WO 2011/008803 A2 & EP 2454365 A1 & CA 2768318 A & AU 2010273508 A & MX 2012000825 A & CN 102782124 A & NZ 597679 A & RU 2012103248 A	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 12 May 2016 (12.05.16)	Date of mailing of the international search report 24 May 2016 (24.05.16)
---	--

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/JP2016/061386

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 2012-504960 A (Abbot Laboratories), 01 March 2012 (01.03.2012), & US 2010/0154080 A1 & WO 2010/042510 A1 & AU 2009302522 A & CA 2739836 A & CN 102239254 A & MX 2011003700 A & NZ 592147 A & RU 2011114558 A & ES 2466365 T	1-8
A	JP 2006-511233 A (The University of Bristol), 06 April 2006 (06.04.2006), & JP 4781817 B2 & US 2006/0246556 A1 & WO 2004/057001 A2 & EP 1576166 A1 & CA 2510462 A & CN 1729293 A & CL 26672003 A & AR 42538 A & AU 2003296638 A & IL 168783 A & IL 218358 D & ES 2525212 T	1-8
A	WO 2011/81024 A1 (Kabushiki Kaisha Fujimi Yohoen), 07 July 2011 (07.07.2011), (Family: none)	1-8
A	JP 2011-184371 A (Euglena Co., Ltd.), 22 September 2011 (22.09.2011), & US 2012/0329752 A1 & WO 2011/111707 A1 & CN 102812048 A & KR 10-2013-0016212 A	1-8
A	JP 2010-95460 A (Morinaga & Co., Ltd.), 30 April 2010 (30.04.2010), & JP 4305785 B2	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K35/68(2006.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K31/716(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K35/68, A23L33/10, A61K31/716, A61P29/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), Japio-GPG/FX

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
P, X	WO 2015/156339 A1 (株式会社ユーグレナ) 2015.10.15, 請求項 13 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2012-533303 A (アボット・ラボラトリーズ) 2012.12.27, & US 2011/0016585 A1 & WO 2011/008803 A2 & EP 2454365 A1 & CA 2768318 A & AU 2010273508 A & MX 2012000825 A & CN 102782124 A & NZ 597679 A & RU 2012103248 A	1-8

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- |  |   |
|--|---|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                                 | 「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     |
| 「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                         | 「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                     |
| 「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) | 「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 |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                                      | 「&」 同一パテントファミリー文献   |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願                                   |   |

国際調査を完了した日

12.05.2016

国際調査報告の発送日

24.05.2016

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)

六笠 紀子

4U

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2012-504960 A (アボット・ラボラトリーズ) 2012. 03. 01, & US 2010/0154080 A1 & WO 2010/042510 A1 & AU 2009302522 A & CA 2739836 A & CN 102239254 A & MX 2011003700 A & NZ 592147 A & RU 2011114558 A & ES 2466365 T	1-8
A	JP 2006-511233 A (ユニバーシティ オブ ブリストル) 2006. 04. 06, & JP 4781817 B2 & US 2006/0246556 A1 & WO 2004/057001 A2 & EP 1576166 A1 & CA 2510462 A & CN 1729293 A & CL 26672003 A & AR 42538 A & AU 2003296638 A & IL 168783 A & IL 218358 D & ES 2525212 T	1-8
A	WO 2011/81024 A1 (株式会社富士見養蜂園) 2011. 07. 07, (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2011-184371 A (株式会社ユーグレナ) 2011. 09. 22, & US 2012/0329752 A1 & WO 2011/111707 A1 & CN 102812048 A & KR 10-2013-0016212 A	1-8
A	JP 2010-95460 A (森永製菓株式会社) 2010. 04. 30, & JP 4305785 B2	1-8