

(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  
2013年11月7日(07.11.2013)



(10) 国際公開番号  
WO 2013/164992 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 38/00 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)  
A23K 1/16 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)  
A23L 1/30 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/062525
- (22) 国際出願日: 2013年4月30日(30.04.2013)
- (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 2012-105509 2012年5月2日(02.05.2012) JP
- (71) 出願人: 雪印メグミルク株式会社(MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD.) [JP/JP]; 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 高野 義彦(TAKANO, Yoshihiko); 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP). 奈良 貴幸(NARA, Takayuki); 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP). 加藤 健(KATO, Ken); 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP). 森田 如一(MORITA, Yoshikazu); 〒0650043 北海

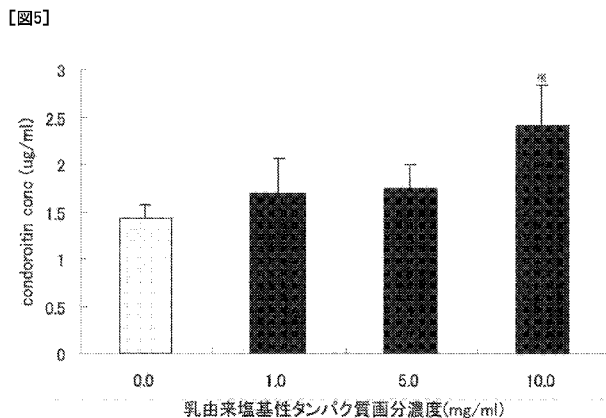
道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所(MOEGI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門2丁目7番7号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: CARTILAGE REGENERATION-PROMOTING AGENT

(54) 発明の名称: 軟骨形成促進剤



AA Concentration of milk-derived basic protein fraction (mg/ml)

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a cartilage regeneration-promoting agent which is safe and can exhibit a cartilage regeneration-promoting effect when ingested on a daily basis; and a proteoglycan synthesis-promoting agent which can exhibit a proteoglycan synthesis-promoting effect when ingested. Provided are a cartilage regeneration-promoting agent and a proteoglycan synthesis-promoting agent, each of which comprises a milk-derived basic protein fraction as an active ingredient. When the milk-derived basic protein fraction is ingested orally, the synthesis of a proteoglycan and the regeneration of a cartilage can be promoted. A digestion product produced by hydrolyzing the milk-derived basic protein fraction also has a cartilage regeneration-promoting effect.

(57) 要約: 安全で、日常的に摂取することにより、軟骨形成促進効果を示す、軟骨形成促進剤を提供することを課題とする。また、摂取することにより、プロテオグリカンの合成促進効果を示す、プロテオグリカン合成促進剤を提供することを課題とする。乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分として使用した軟骨形成促進剤、プロテオグリカン合成促進剤を提供する。乳由来塩基性タンパク質画分を経口摂取することにより、プロテオグリ

カンの合成促進、及び軟骨の形成を促進することができる。また、乳由来塩基性タンパク質画分を加水分解した分解物も同様に軟骨形成促進効果を有する。



WO 2013/164992 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

**発明の名称：軟骨形成促進剤**

### 技術分野

[0001] 本発明は、乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とする、軟骨形成を促進する軟骨形成促進剤、及びこの軟骨形成促進剤を配合した軟骨形成促進用食品又は飼料に関する。

### 背景技術

[0002] 軟骨は、関節や鼻部、耳介部などに存在するが、このうち、関節軟骨は個体の運動機能を補助する役割を有している。

2009年のROADプロジェクト調査結果によると、日本の変形性関節症（Osteoarthritis、OA）患者数は、膝については2500万人、腰椎については3800万人と報告されており、その男女の内訳は、膝は男性860万人、女性1670万人、腰椎は男性1890万人、女性1900万人であるが、この数は年々増加している。OAは骨粗鬆症と並び高齢者の日常生活動作（ADL）や生活の質（QOL）を低下させることから、根治的な治療方法の確立が望まれている。

関節軟骨組織は、軟骨細胞が産生するコラーゲンやヒアルロン酸、プロテオグリカンから構成され、網目構造を取るコラーゲン繊維間にプロテオグリカンやヒアルロン酸が存在することで、多量の水分を保持している。つまり、関節軟骨は、コラーゲンならびにプロテオグリカンによりそのクッション性を保持している。

関節周囲の血行が悪くなり酸素の供給が低下すると、軟骨細胞によるプロテオグリカンなどの産生が低下することや、死滅した軟骨細胞が滑膜を刺激、炎症を起こし、関節に痛みが生じることとなる。さらに、炎症時のサイトカインの放出により、さらに軟骨細胞死を誘導し、痛みの症状が激化する。

このため、OAの対症療法としては、痛み止めや抗炎症剤の投与、高分子ヒアルロン酸（ヒアルロン酸ナトリウム）の関節腔内への注入等があげられ、また、対症療法以外の方法としては、近年、軟骨細胞の分化促進または

軟骨細胞の肥大化の抑制、軟骨細胞によるコラーゲン、プロテオグリカンの転写、合成促進などのアプローチが取られ始めている。

[0003] 軟骨の構成成分の一つであるプロテオグリカンは、糖鎖の一種である硫酸化グリコサミノグリカン（GAG）とコアタンパクからなり、GAGとコアタンパクが共有結合した構成となっている。プロテオグリカンについては、上述したOAに対する効果のほか、軟骨細胞中のプロテオグリカン量は、前駆軟骨細胞から軟骨細胞への分化、増殖の過程において増加することが知られており（非特許文献1）、軟骨形成に重要な役割をもつことが示唆されている。また、サケ軟骨に含まれるプロテオグリカンに抗肥満剤、抗糖尿病剤としての効果（特許文献1）や、炎症性疾患や自己免疫疾患の予防治療、臓器移植時の拒絶反応の抑制、アレルギーの処置に有用であることが報告されている（特許文献2）。また、生体におけるプロテオグリカンの合成を促進することにより、抗老化用皮膚外用剤としての効果も報告されている（特許文献3）。

[0004] 一方、プロテオグリカンの生合成については、転写因子であるSox9を高発現させた細胞において、軟骨細胞分化が促進し、プロテオグリカンやII型コラーゲンの産生が増加するという報告（非特許文献2）や、硫酸化グリコサミノグリカン上のコンドロイチン4硫酸のGalNAcの四位に硫酸基を転移するコンドロイチン4-O-硫酸基転移酵素-1（C4ST-1）を変異させたマウスでは、コンドロイチン硫酸の合成量が減少し、軟骨形成不全の症状が観察されたとの報告がある（非特許文献3）。このため、プロテオグリカンの生合成に関しては、Sox9及びC4ST-1の活性促進が重要であると考えられている。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2010-126461号公報  
特許文献2：特開2007-131548号公報  
特許文献3：特開2006-028071号公報

## 非特許文献

[0006] 非特許文献1 : J. Biol. Chem., 265, 10, 5903-5909, 1990

非特許文献2 : Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, 2, 338-343, 2003

非特許文献3 : BMC Musculoskelet Disord. 26 2004

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本願発明は、新規の軟骨形成促進剤の提供を課題とする。また本願発明は、新規のプロテオグリカン合成促進剤の提供を課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明は以下の構成からなるものである。

- (1) 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とする軟骨形成促進剤。
- (2) 前記軟骨形成促進が、プロテオグリカンの合成促進によるものであることを特徴とする(1)記載の軟骨形成促進剤。
- (3) 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とするプロテオグリカン合成促進剤。
- (4) 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とする関節疾患の予防、改善、治療剤。
- (5) 前記関節疾患が変形性関節疾患である(4)記載の関節疾患の予防、改善、治療剤。
- (6) 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とする関節疾患の予防・改善用サプリメント。
- (7) 前記関節疾患が、変形性関節疾患である(6)記載の関節疾患の予防・改善用サプリメント。
- (8) (1)乃至(2)記載の軟骨形成促進剤を配合してなる軟骨形成促進用飲食品及び／または飼料。
- (9) (3)記載のプロテオグリカン合成促進剤を含有する飲食品及び／または飼料。

(10) 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とする軟骨形成促進剤。

(11) 前記軟骨形成促進剤が、プロテオグリカンの合成促進によるものであることを特徴とする(10)記載の軟骨形成促進剤。

(12) 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とするプロテオグリカン合成促進剤。

(13) 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とする関節疾患の予防、改善、治療剤。

(14) 前記関節疾患が、変形性関節疾患である(13)記載の関節疾患の予防、改善、治療剤。

(15) 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とする関節疾患の予防・改善用サプリメント。

(16) 前記関節疾患が、変形性関節疾患である(15)記載の関節疾患の予防・改善用サプリメント。

(17) (10)乃至(11)記載の軟骨形成促進剤を配合してなる軟骨形成促進用飲食品及び／または飼料。

(18) (12)記載のプロテオグリカン合成促進剤を含有する飲食品及び／または飼料。

(19) 前記乳由来塩基性タンパク質画分分解物が、乳由来塩基性タンパク質画分をタンパク質分解酵素で処理して得られるものであることを特徴とする(10)または(11)に記載の軟骨形成促進剤。

(20) 前記タンパク質分解酵素が、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パンクレアチン及びパパンよりなる群から選択される少なくとも1種以上であることを特徴とする(19)に記載の軟骨形成促進剤。

(21) 乳由来塩基性タンパク質画分及び／または乳由来塩基性タンパク質画分分解物を10mg/日以上摂取することによる関節疾患の予防、改善、治療方法。

## 発明の効果

[0009] 本発明の軟骨形成促進剤は、軟骨細胞分化制御因子である Sox9 およびコンドロイチン4-0-硫酸基転移酵素-1 (C4ST-1) の mRNA の発現を促進することにより軟骨細胞の分化やプロテオグリカンの合成を促進し、効果的に軟骨形成を促進することができる。また本発明のプロテオグリカン合成促進剤は、プロテオグリカンの合成を促進し、関節疾患に対する予防・改善・治療効果を有する。

### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]乳由来塩基性タンパク質画分による C4ST-1 mRNA 発現への濃度依存的影響を示す。

[図2]乳由来塩基性タンパク質画分による C4ST-1 mRNA 発現への時間依存的影響を示す。

[図3]乳由来塩基性タンパク質画分による軟骨分化制御因子 Sox9 mRNA 発現への濃度依存的影響を示す。

[図4]乳由来塩基性タンパク質画分による軟骨分化制御因子 Sox9 mRNA 発現への時間依存的影響を示す。

[図5]乳由来塩基性タンパク質画分によるプロテオグリカン合成量への影響を示す。

[図6]乳由来塩基性タンパク質画分による変形性膝関節症への効果を示す。

[図7]乳由来塩基性タンパク質画分分解物によるプロテオグリカン合成量への影響を示す。

[図8]乳由来塩基性タンパク質画分分解物による変形性膝関節症への効果を示す。

### 発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とすることを特徴としている。

本発明の乳由来塩基性タンパク質画分は、次の性質を有している。

1) ソジウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によると分子量 3,000~80,000 の範囲の数種のタンパク質よ

りなる。

2) 95重量%以上がタンパク質であって、その他少量の脂肪、灰分を含む。

3) タンパク質は主としてラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼよりなる。

4) タンパク質のアミノ酸組成は、リジン、ヒスチジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸を15重量%以上含有する。

[0012] この乳由来塩基性タンパク質画分は、牛乳、人乳、山羊乳、羊乳など哺乳類の乳から得ることができ、例えば、乳または乳由来の原料を陽イオン交換体に接触させて塩基性タンパク質を吸着させた後、この陽イオン交換体に吸着した塩基性タンパク質画分を、pH5を越え、イオン強度0.5を越える溶出液で溶出して得る方法（特開平5-202098号公報）、アルギン酸ゲルを用いて得る方法（特開昭61-246198号公報）、無機の多孔性粒子を用いて乳清から得る方法（特開平1-086839号公報）、硫酸化エステル化合物を用いて乳から得る方法（特開昭63-255300号公報）などが知られており、本発明では、このような方法で得られた乳由来塩基性タンパク質画分を用いることができる。また得られた乳由来塩基性タンパク質画分をさらに、タンパク質分解酵素で処理して平均分子量4,000以下の乳由来塩基性タンパク質画分分解物として用いることもできる。なお、タンパク質分解酵素としては、市販されているプロテアーゼA「アマノ」SD（商品名）、サモアーゼPC10F（商品名）、プロチンSD-AY10（商品名）等の食品・工業用プロテアーゼが使用できるほか、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パンクレアチン、パパイン等の酵素を挙げることができる。また、これらのタンパク質分解酵素を適宜組み合わせて使用してもよい。

[0013] 本発明では、上記の乳由来塩基性タンパク質画分をそのまま軟骨形成促進剤、又はプロテオグリカン合成促進剤として用いることが可能であり、また、乳由来塩基性タンパク質画分の他に、糖類や脂質、タンパク質、ビタミン

類、ミネラル類、フレーバー等、他の医薬品、飲食品や飼料に通常使用する原材料等を混合することや、さらに常法に従い粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤などに製剤化することも可能である。また、塗布剤としては、乳液、クリーム、ローション、パックなど通常の塗布形態で用いることができる。これらの塗布剤は常法により製造し、本発明の有効成分である乳由来塩基性タンパク質画分をその製造過程で適宜配合すればよい。

また、乳由来塩基性タンパク質画分に加えて、他の軟骨形成促進効果を示す成分や、関節疾患の改善効果を有する他の成分と併用することも可能である。

[0014] 本発明の軟骨形成促進剤の配合量としては、特に制限はないが、成人一人一日あたり、乳由来塩基性タンパク質画分を10mg以上摂取することにより軟骨形成促進効果、プロテオグリカン合成促進効果が期待できるので、この量を確保できるようにすればよい。

[0015] 本発明の乳由来の軟骨形成促進用飲食品、プロテオグリカン合成促進用飲食品としては、通常の飲食品、例えばヨーグルト、乳飲料、ウエハース、デザート等に乳由来塩基性タンパク質画分を配合すればよい。これらの軟骨形成促進用飲食品については、成人一人一日あたり、乳由来塩基性タンパク質画分を10mg以上摂取させるために、飲食品の形態にもよるが飲食品100gあたり塩基性タンパク質画分を1～100mg配合することが好ましい。また、本発明の軟骨形成促進剤は、通常の飼料、例えば家畜用飼料やペットフード等に乳由来塩基性タンパク質画分を配合すればよい。たとえばこれらの飼料について、乳由来塩基性タンパク質画分を配合する場合、飼料100gあたり乳由来塩基性タンパク質画分を1～100mg配合することが好ましい。

[0016] 本発明では、乳由来塩基性タンパク質画分を配合する方法に特に制限はないが、例えば、溶液中で添加、配合するには、乳由来塩基性タンパク質画分を脱イオン水に懸濁あるいは溶解し、攪拌混合した後、医薬品、飲食品や飼料の形態に調製して使用する。攪拌混合の条件としては、乳由来塩基性タン

パク質画分が均一に混合されればよく、ウルトラディスパーサーやTKホモミクサー等を使用して攪拌混合することも可能である。また、当該組成物の溶液は、医薬品、飲食品や飼料に使用しやすいように、必要に応じて、RO膜等での濃縮や、凍結乾燥して使用することができる。本発明では、医薬品、飲食品や飼料の製造に通常使用される殺菌処理が可能であり、粉末状であっては乾熱殺菌も可能である。従って、本発明の乳由来塩基性タンパク質画分を含有する液状、ゲル状、粉末状、顆粒状等様々な形態の医薬品、飲食品や飼料を製造することができる。

[0017] 以下に、実施例及び試験例を示し、本発明についてより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

### 実施例 1

[0018] 陽イオン交換樹脂のスルホン化キトパール（富士紡績社製）400gを充填したカラム（直径5cm×高さ30cm）を脱イオン水で十分洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳40l（pH6.7）を流速25ml/分で通液した。通液後、このカラムを脱イオン水で十分洗浄し、0.98M塩化ナトリウムを含む0.02M炭酸緩衝液（pH7.0）で樹脂に吸着した塩基性タンパク質画分を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透膜（RO膜）により脱塩して、濃縮した後、凍結乾燥して、乳由来塩基性タンパク質画分粉末21gを得た（実施例品1）。得られた乳由来塩基性タンパク質画分について、ソジウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により測定したところ、分子量は3,000~80,000の範囲に分布しており、成分組成は表1に示すとおりであった。また、6N塩酸で110℃、24時間加水分解した後、アミノ酸分析装置（L-8500型、日立製作所製）でそのアミノ酸組成を分析した結果、表2に示したように塩基性アミノ酸が15重量%以上含まれていた。さらに、ELISA法により、そのタンパク質組成を分析したところ、表3に示すように、40%以上のラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼが含まれていた。

## [0019] [表1]

成分分析結果	
水分	1.06 (重量%)
タンパク質	96.50
脂質	0.56
灰分	0.27
その他	1.61

## [0020] [表2]

アミノ酸分析結果	
アスパラギン酸	10.1 (重量%)
セリン	5.3
グルタミン酸	12.3
プロリン	4.7
アラニン	5.7
ロイシン	10.2
リジン	8.4
ヒスチジン	2.5
アルギニン	7.2
その他	33.6

## [0021] [表3]

タンパク質組成分析結果	
ラクトフェリン	42.5 (重量%)
ラクトパーオキシターゼ	45.6
インスリン様増殖因子-1	0.005
その他	11.895

## [0022] [試験例1]

乳由来塩基性タンパク質画分によるプロテオグリカン合成酵素のmRNA発現への影響についてリアルタイムPCR法を用いて検討を行った。乳由来塩基性タンパク質画分として実施例品1を用いた。細胞は、マウスEC由来間葉系細胞であるATDC5細胞を用いた。ATDC5細胞を24穴プレー

トに  $0.5 \times 10^5$  cells/well になる様に播種し、DMEM/F12 培地（シグマ社製）にて  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  環境下にて 1 週間培養した。

乳由来塩基性タンパク質画分及び対照区として精製したラクトフェリンをそれぞれ  $0.1\%$ 、 $0.5\%$ 、 $1\%$  (w/v) になるよう DMEM/F12 培地に溶解したものを培養した細胞に添加し、12 時間培養した。

培養した細胞から total RNA の回収および cDNA 合成を行った。すなわち、培養した細胞に RNA 抽出剤である ISOGEN（ニッポンジーオン社製）を  $0.5 \text{ ml}$  添加し 5 分間静置した後、ピペティングにて可溶化させた細胞液を  $1.5 \text{ ml}$  容チューブに回収した。細胞液に  $0.1 \text{ ml}$  のクロロホルムを添加し、十分に攪拌した後、二層に分離した上層（水層）を新たな  $1.5 \text{ ml}$  容チューブに回収した。回収液に  $0.25 \text{ ml}$  の 2-プロピルアルコールを添加し、10 分間静置後、 $15,000 \text{ rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$  にて 15 分間遠心し、total RNA の沈殿物を得た。得られた沈殿物は、 $70\%$  エタノールにて洗浄した後、DEPC 水に溶解し RNA 液とした。 $1 \mu\text{g}$  分の RNA から Takara PrimeScript™ RT reagent Kit を用いて cDNA を合成した。

得られた cDNA をテンプレートとして、SYBR Green (Takara SYBR Prime Ex Taq II) を使用したリアルタイム PCR を行った。反応条件は、 $95^\circ\text{C}$ 、30 秒の初期変性後、 $95^\circ\text{C}$ 、5 秒の変性、 $57^\circ\text{C}$ 、15 秒のアニーリング、 $72^\circ\text{C}$ 、20 秒の伸張を 40 サイクル反応させた。プライマーは表 4 に記載の C4ST1 用プライマーを使用した。結果を図 1 に示す。なお、※は対照群と比較して有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

[0023] [表4]

---

C4ST1 forward	プライマー	5'-TCCACAAGCGCTACGGCACCAAGATC-3'
reverse	プライマー	5'-AGGGCCTCCTGCGTGGCGTTCTTCC-3'

---

[0024] 図 1 より、乳由来塩基性タンパク質画分による C4ST-1 の mRNA 発現は、乳由来塩基性タンパク質画分の濃度に依存して亢進することが明らか

となった。また、乳タンパク質の一つであるラクトフェリンに比較してより高いC4ST-1のmRNA発現亢進効果を有することが明らかとなった。

[0025] [試験例2]

乳由来塩基性タンパク質画分によるプロテオグリカン合成酵素のmRNA発現への作用時間による影響についてリアルタイムPCR方法を用いて検討した。乳由来塩基性タンパク質画分として実施例品1を用いた。

方法は試験例1に記載の方法に準じた。すなわち、乳由来塩基性タンパク質画分を2時間から48時間までATDC5細胞に添加した後、total RNAを回収しcDNAを合成し、リアルタイムPCRを行った。対照区は、乳由来塩基性タンパク質画分を投与せず、2時間から48時間まで培養したATDC5細胞からtotal RNAを回収し、cDNAを合成してリアルタイムPCRを行った。結果を図2に示す。

[0026] 図2により、乳由来塩基性タンパク質画分によるC4ST-1のmRNA発現は、乳由来塩基性タンパク質画分にてATDC細胞に作用させてから4時間で有意に亢進し、12時間から24時間でピークに達し、48時間では減少した。

[0027] [試験例3]

乳由来塩基性タンパク質画分による軟骨分化制御因子のmRNA発現への影響についてリアルタイムPCR方法を用いて検討を行った。乳由来塩基性タンパク質画分として実施例品1を用いた。また、試験例1と同じく、対照区として精製したラクトフェリンを用いた。方法は試験例1に記載の方法に準じた。プライマーは表5に記載のSox9用プライマーを使用した。結果を図3に示す。

[0028] [表5]

---

SOX9	forward	プライマー	5'-GAGGCCACGGAACAGACTCA-3'
	reverse	プライマー	5'-CAGCGCCTTGAAGATAGCATT-3'

---

[0029] 図3により、乳由来塩基性タンパク質画分によるSox9のmRNA発現

は、ホエー分解物の濃度に依存して亢進することが明らかとなった。また、乳タンパク質の一つであるラクトフェリンに比較してより高い $Sox9$ のmRNA発現亢進効果を有することが明らかとなった。

[0030] [試験例4]

乳由来塩基性タンパク質画分による軟骨分化制御因子のmRNA発現への作用時間による影響についてリアルタイムPCR方法を用いて検討した。乳由来塩基性タンパク質画分として実施例品1を用いた。

方法は試験例1に記載の方法に準じた。すなわち、乳由来塩基性タンパク質画分を2時間から48時間までATDC5細胞に添加した後、total RNAを回収しcDNAを合成し、リアルタイムPCRを行った。対照区は、乳由来塩基性タンパク質画分を投与せず、2時間から48時間まで培養したATDC5細胞からtotal RNAを回収し、cDNAを合成してリアルタイムPCRを行った。結果を図4に示す。

[0031] 図4により、乳由来塩基性タンパク質画分による $Sox9$ のmRNA発現は、乳由来塩基性タンパク質画分をATDC細胞に作用させてから2時間で有意に上昇し、4時間から6時間でピークに達し、12時間以降は減少した。

[0032] [試験例5]

乳由来塩基性タンパク質画分によるプロテオグリカン合成への影響について、酸性ムコ多糖測定キット（プライマリーセル AK03）を用いて、プロテオグリカン量（コンドロイチン硫酸量）の測定を行った。乳由来塩基性タンパク質画分として実施例品1を用いた。測定は、以下の方法で行った。

ATDC5細胞を $1 \times 10^5$  cells/wellになるように12穴プレートに播種し、DMEM/F12培地にて37℃、CO<sub>2</sub>環境下で培養した。培養4日後、キット中の酵素溶液（一袋/10ml水）を200μl/wellなるよう添加し細胞可溶化させ、可溶化液を1.5ml容チューブに回収した後60℃にて1時間処理しサンプルとした。サンプルおよび標準用コンドロイチン硫酸液（1~50μg/ml）を100μlずつチューブに分注し、反応液

(発色原液0.4 ml/緩衝液12.6 ml)を1.3 ml添加し、10~20分後内にOD650 nmにて吸光値を測定した。標準用コンドロイチン硫酸液の吸光値から求めた標準曲線及びサンプルの吸光値より濃度を決定した。結果を図5に示す。

[0033] 図5より、乳由来塩基性タンパク質画分の濃度に依存して、プロテオグリカン量が有意に上昇した。

[0034] [試験例6]

乳由来塩基性タンパク質画分による軟骨形成への影響について、変形性膝関節症自然発症マウスであるSTR/ORTマウスを用いた乳由来塩基性タンパク質画分投与試験を行った。乳由来塩基性タンパク質画分として実施例品1を用いた。測定は、以下の方法で行った。15週齢のSTR/ORTマウスを10匹ずつ生理食塩水群と乳由来塩基性タンパク質画分をマウス体重1kg当たり10mg投与する群に分け、投与はそれぞれマウス用金属製胃ゾンデにより1日あたり1回の強制経口投与を行った。正常対照群として正常マウス(CBA/JN)10匹も設定した。12週間の飼育終了後、各群のマウスを屠殺し、後肢の膝関節を切除し取り出した後、骨軟骨組織を4℃のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、PBSに希釈した4%パラホルムアルデヒドで4℃、18時間の固定を行い、さらに一晩かけて70%から100%のエタノール系列にて脱脂し、10%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含むリン酸緩衝液に組織を浸潤させ、4℃にて2週間かけて脱灰した。組織をパラフィン包埋し、4μmの薄切標本作製した。組織標本は脱パラフィン、再親水化した後、Safranin-O染色を行い、関節炎の進展度のスコアであるMankinスコア(表6)に従ってスコア化した。

結果を図6に示す。

[0035]

[表6]

Mankin Score System		スコア
<b>I 構造</b>		
a.	正常	0
b.	表面の不整	1
c.	表面の不整、パンヌス形成	2
d.	中間層までの亀裂	3
e.	深層までの亀裂	4
f.	石灰化層までの亀裂	5
g.	完全な破壊	6
<b>II 細胞</b>		
a.	正常	0
b.	びまん性の細胞数増加	1
c.	クローニング	2
d.	細胞数減少	3
<b>III Safranin-Oの染色性</b>		
a.	正常	0
b.	軽度の低下	1
c.	中等度の低下	2
d.	重度の低下	3
e.	染色性の消失	4
<b>IV Tidemarkの状態</b>		
a.	正常	0
b.	血管の横断	1
総得点		0～14

[0036] 図6により、乳由来塩基性タンパク質画分投与により、生理食塩水投与と比較してSTR/OR TマウスのMankinスコアが有意に低下した。これは、乳由来塩基性タンパク質画分投与によりマウスの軟骨形成が促進されたことにより、変形性膝関節症の症状が緩和されたことを示す。

## 実施例 2

[0037] (液状栄養組成物の調製)

実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分5gを4995gの脱イオン水に溶解し、TKホモミクサー(TKROBOMICS; 特殊機化工業社製)に

て、6000rpmで30分間攪拌混合して乳由来塩基性タンパク質画分100mg/100gの乳由来塩基性タンパク質画分溶液を得た。この乳由来塩基性タンパク質画分溶液5.0kgに、カゼイン4.0kg、大豆タンパク質5.0kg、魚油1.0kg、シソ油3.0kg、デキストリン18.0kg、ミネラル混合物6.0kg、ビタミン混合物1.95kg、乳化剤2.0kg、安定剤4.0kg、香料0.05kgを配合し、200mlのレトルトパウチに充填し、レトルト殺菌機（第1種圧力容器、TYPE：RCS-4CRTGN、日阪製作所社製）で121℃、20分間殺菌して、本発明の液状栄養組成物50kgを製造した。このようにして得られた液状栄養組成物には、すべて沈殿等は認められず、風味に異常は感じられなかった。なお、この液状栄養組成物は、100gあたり、乳由来塩基性タンパク質画分を10mg含有し、軟骨形成促進及び／またはプロテオグリカン合成促進効果を有していた。

### 実施例 3

[0038]（ゲル状食品の調製）

実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分2gを708gの脱イオン水に溶解し、ウルトラディスペーサー（ULTRA-TURRAXT-25；IKAジャパン社製）にて、9500rpmで30分間攪拌混合した。この溶液に、ソルビトール40g、酸味料2g、香料2g、ペクチン5g、乳清タンパク質濃縮物5g、乳酸カルシウム1g、脱イオン水235gを添加して、攪拌混合した後、200mlのチアパックに充填し、85℃、20分間殺菌後、密栓し、本発明のゲル状食品5袋（200g入り）を調製した。このようにして得られたゲル状食品には、すべて沈殿等は認められず、風味に異常は感じられなかった。なお、このゲル状食品には、100gあたり、乳由来塩基性タンパク質画分が200mg含まれており、軟骨形成促進及び／またはプロテオグリカン合成促進効果を有していた。

### 実施例 4

[0039]（飲料の調製）

酸味料 2 g を 706 g の脱イオン水に溶解した後、実施例品 1 の乳由来塩基性タンパク質画分 4 g を溶解し、ウルトラディスペーサー (ULTRA-TURRAX T-25 ; IKA ジャパン社製) にて、9500 rpm で 30 分間攪拌混合した。マルチール 100 g、還元水飴 20 g、香料 2 g、脱イオン水 166 g を添加した後、100 ml のガラス瓶に充填し、95℃、15 秒間殺菌後、密栓し、飲料 10 本 (100 ml 入り) を調製した。このようにして得られた飲料には、すべて沈殿は認められず、風味に異常は感じられなかった。なお、この飲料には、100 g あたり、乳由来塩基性タンパク質画分が 400 mg 含まれており、軟骨形成促進及び／またはプロテオグリカン合成促進効果を有していた。

## 実施例 5

### [0040] (飼料の調製)

実施例品 1 の乳由来塩基性タンパク質画分 2 kg を 98 kg の脱イオン水に溶解し、TK ホモミクサー (MARK II 160 型 ; 特殊機化工業社製) にて、3600 rpm で 40 分間攪拌混合して乳由来塩基性タンパク質画分を 2 g / 100 g 含有する乳由来塩基性タンパク質画分溶液を得た。この乳由来塩基性タンパク質画分溶液 10 kg に大豆粕 12 kg、脱脂粉乳 14 kg、大豆油 4 kg、コーン油 2 kg、パーム油 23.2 kg、トウモロコシ澱粉 14 kg、小麦粉 9 kg、ふすま 2 kg、ビタミン混合物 5 kg、セルロース 2.8 kg、ミネラル混合物 2 kg を配合し、120℃、4 分間殺菌して、本発明のイヌ用飼育飼料 100 kg を製造した。なお、このイヌ用飼育飼料には、100 g あたり、乳由来塩基性タンパク質画分が 200 mg 含まれており、軟骨形成促進及び／またはプロテオグリカン合成促進効果を有していた。

## 実施例 6

### [0041] (錠剤の調製)

表 4 に示す配合で原料を混合後、常法 1 g に成型、打錠して本発明の錠剤を製造した。なお、この錠剤 1 g 中には、乳由来塩基性タンパク質画分が 1

00mg含まれており、軟骨形成促進及び／またはプロテオグリカン合成促進効果を有していた。

[0042] [表7]

含水結晶ぶどう糖	83.5% (重量%)
乳由来塩基性タンパク質画分 (実施例品1)	10.0%
ミネラル混合	5.0%
シュガーエステル	1.0%
香料	0.5%

## 実施例 7

[0043] 実施例1と同様の方法によって得られた乳由来塩基性タンパク質画分粉末50gを蒸留水10リットルに溶解した後、1%パンクレアチン（シグマ社製）を添加し、37℃で2時間反応させた。反応後、80℃で10分間加熱処理して酵素を失活させた後、乳由来塩基性タンパク質画分分解物48.3gを得た（実施例品7）。

## 実施例 8

[0044] 実施例1と同様の方法によって得られた乳由来塩基性タンパク質画分120gを精製水1.8リットルに溶解した後、45℃に保持してプロテアーゼA「アマノ」SD（天野エンザイム社製）を20g添加し、2時間反応させた。80℃で10分間加熱して酵素を失活させた後、凍結乾燥して乳由来塩基性タンパク質画分分解物を95g得た（実施例品8）。

[0045] [試験例7]

実施例品7および実施例品8を用いて乳由来塩基性タンパク質画分分解物によるプロテオグリカン合成への影響を検証した。試験方法は試験例5の方法にしたがって実施した。結果を図7に示す。

[0046] 図7より、乳由来塩基性タンパク質画分分解物は、プロテオグリカン量を有意に上昇した。

[0047] [試験例8]

実施例品 7 および実施例品 8 を用いて乳由来塩基性タンパク質画分分解物による軟骨形成への影響を検証した。STR/OR Tマウスへの乳由来塩基性タンパク質画分分解物の投与量はマウス体重 1 k g 当たり 1 0 m g としたほか、試験方法は試験例 6 の方法にしたがって実施した。結果を図 8 に示す。

[0048] 図 8 の結果から、乳由来塩基性タンパク質画分と同様に、乳由来塩基性タンパク質画分分解物投与により、生理食塩水投与に比較して STR/OR Tマウスの M a n k i n スコアが有意に低下した。つまり、乳由来塩基性タンパク質画分分解物投与によりマウスの軟骨形成が促進し、変形性膝関節症の症状が緩和された。

[0049] (飲料の調製)

酸味料 2 g を 7 0 6 g の脱イオン水に溶解した後、実施例品 7 の乳由来塩基性タンパク質画分分解物 4 g を溶解し、ウルトラディスペーサー (U L T R A - T U R R A X T - 2 5 ; I K A ジャパン社製) にて、9 5 0 0 r p m で 3 0 分間攪拌混合した。マルチール 1 0 0 g、還元水飴 2 0 g、香料 2 g、脱イオン水 1 6 6 g を添加した後、1 0 0 m l のガラス瓶に充填し、9 5 ° C、1 5 秒間殺菌後、密栓し、飲料 1 0 本 (1 0 0 m l 入り) を調製した。このようにして得られた飲料には、すべて沈殿は認められず、風味に異常は感じられなかった。なお、この飲料には、1 0 0 g あたり、乳由来塩基性タンパク質画分分解物が 4 0 0 m g 含まれており、軟骨形成促進及び/またはプロテオグリカン合成促進効果を有していた。

## 実施例 9

[0050] (錠剤の調製)

表 8 に示す配合で原料を混合後、常法により 1 g に成型、打錠して本発明の錠剤を製造した。なお、この錠剤 1 g 中には、乳由来塩基性タンパク質画分分解物が 1 0 0 m g 含まれており、軟骨形成促進及び/またはプロテオグリカン合成促進効果を有していた。

## 実施例 10

[0051] [表8]

---

含水結晶ぶどう糖	83.5% (重量%)
乳由来塩基性タンパク質画分分解物 (実施例品8)	10.0%
ミネラル混合	5.0%
シュガーエステル	1.0%
香料	0.5%

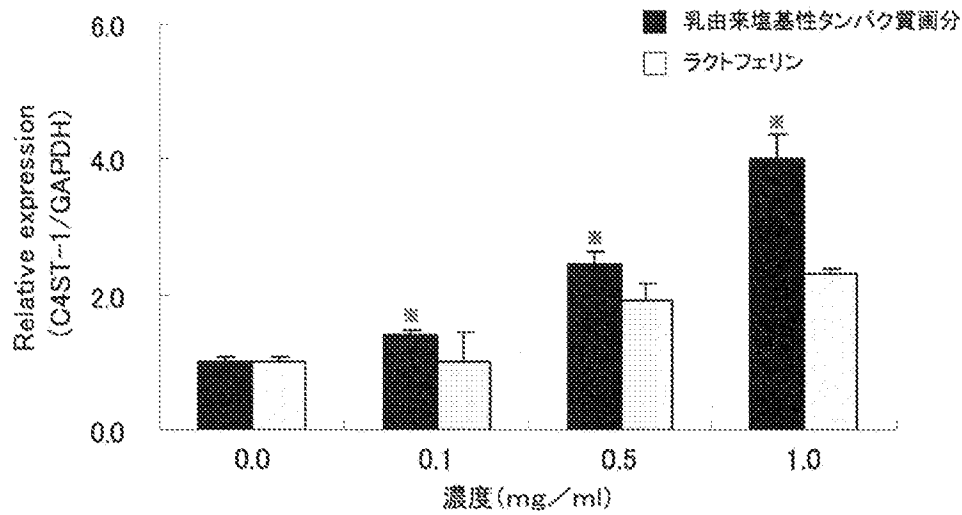
---

## 請求の範囲

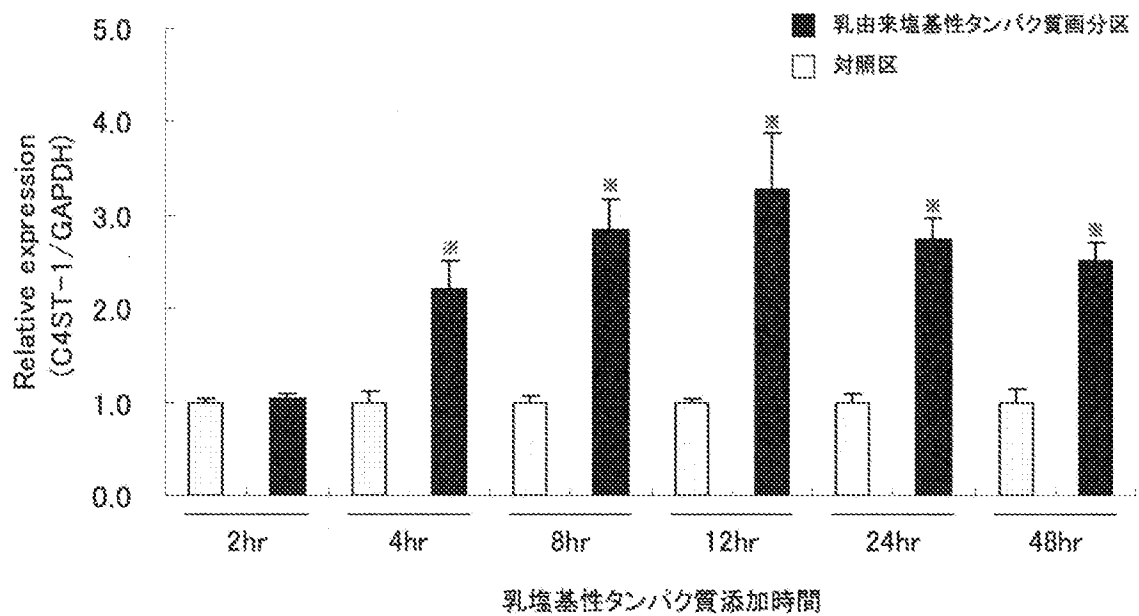
- [請求項1] 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とする軟骨形成促進剤。
- [請求項2] 前記軟骨形成促進が、プロテオグリカンの合成促進によるものであることを特徴とする請求項1記載の軟骨形成促進剤。
- [請求項3] 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とするプロテオグリカン合成促進剤。
- [請求項4] 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とする関節疾患の予防、改善、治療剤。
- [請求項5] 前記関節疾患が、変形性関節疾患である請求項4記載の関節疾患の予防、改善、治療剤。
- [請求項6] 乳由来塩基性タンパク質画分を有効成分とする関節疾患の予防・改善用サプリメント。
- [請求項7] 前記関節疾患が、変形性関節疾患である請求項6記載の関節疾患の予防・改善用サプリメント。
- [請求項8] 請求項1乃至請求項2記載の軟骨形成促進剤を配合してなる軟骨形成促進用飲食品及び／または飼料。
- [請求項9] 請求項3記載のプロテオグリカン合成促進剤を含有する飲食品及び／または飼料。
- [請求項10] 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とする軟骨形成促進剤。
- [請求項11] 前記軟骨形成促進が、プロテオグリカンの合成促進によるものであることを特徴とする請求項10記載の軟骨形成促進剤。
- [請求項12] 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とするプロテオグリカン合成促進剤。
- [請求項13] 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とする関節疾患の予防、改善、治療剤。
- [請求項14] 前記関節疾患が、変形性関節疾患である請求項13記載の関節疾患の予防、改善、治療剤。

- [請求項15] 乳由来塩基性タンパク質画分分解物を有効成分とする関節疾患の予防・改善用サプリメント。
- [請求項16] 前記関節疾患が、変形性関節疾患である請求項15記載の関節疾患の予防・改善用サプリメント。
- [請求項17] 請求項10乃至請求項11記載の軟骨形成促進剤を配合してなる軟骨形成促進用飲食品及び／または飼料。
- [請求項18] 請求項12記載のプロテオグリカン合成促進剤を含有する飲食品及び／または飼料。
- [請求項19] 前記乳由来塩基性タンパク質画分分解物が、乳由来塩基性タンパク質画分をタンパク質分解酵素で処理して得られるものであることを特徴とする請求項10または11に記載の軟骨形成促進剤。
- [請求項20] 前記タンパク質分解酵素が、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パンクレアチン及びパインよりなる群から選択される少なくとも1種以上であることを特徴とする請求項19に記載の軟骨形成促進剤。
- [請求項21] 乳由来塩基性タンパク質画分及び／または乳由来塩基性タンパク質画分分解物を10mg／日以上摂取することによる関節疾患の予防、改善、治療方法。

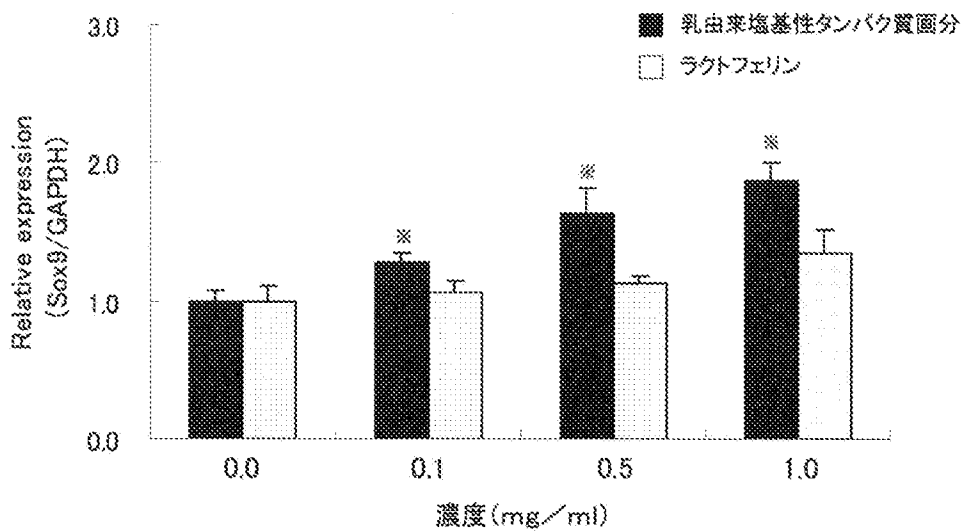
[図1]



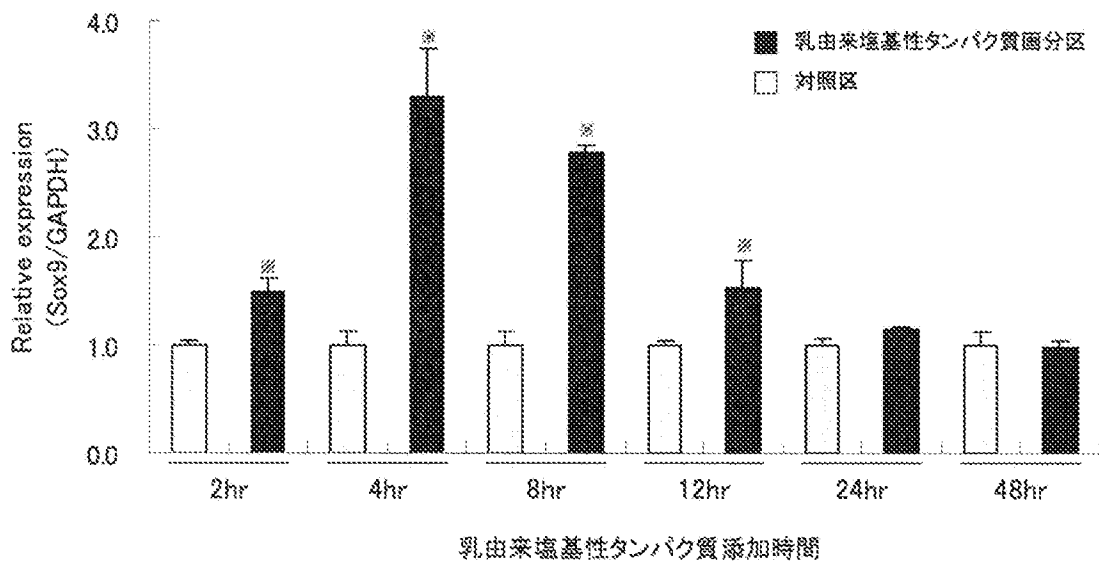
[図2]



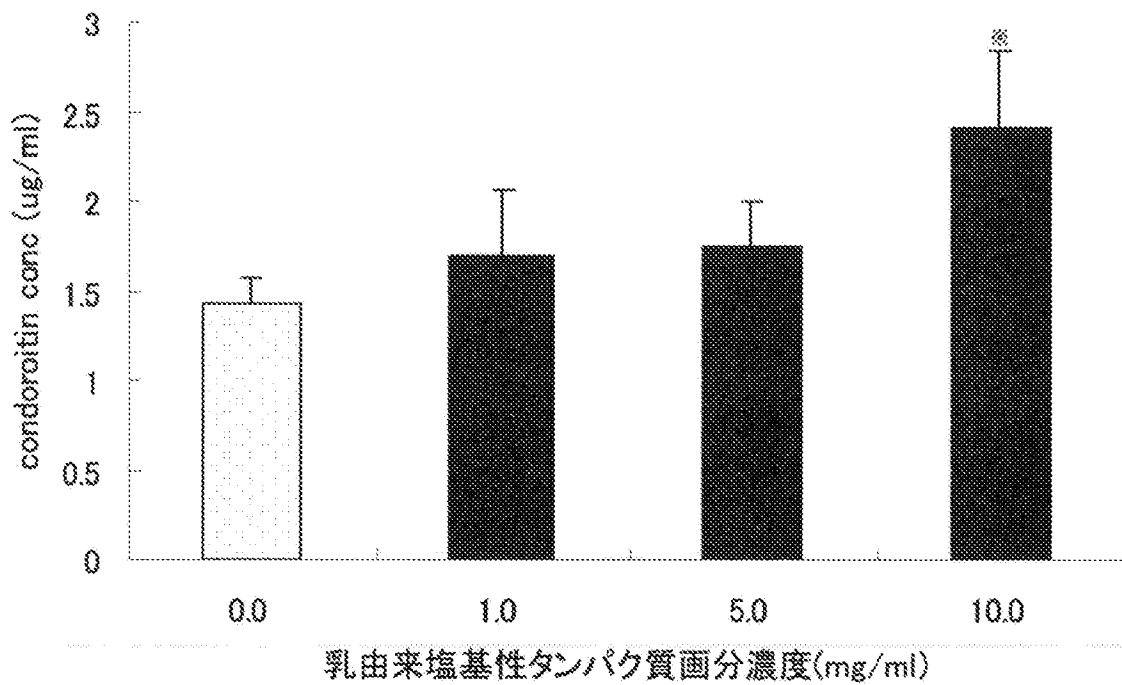
[図3]



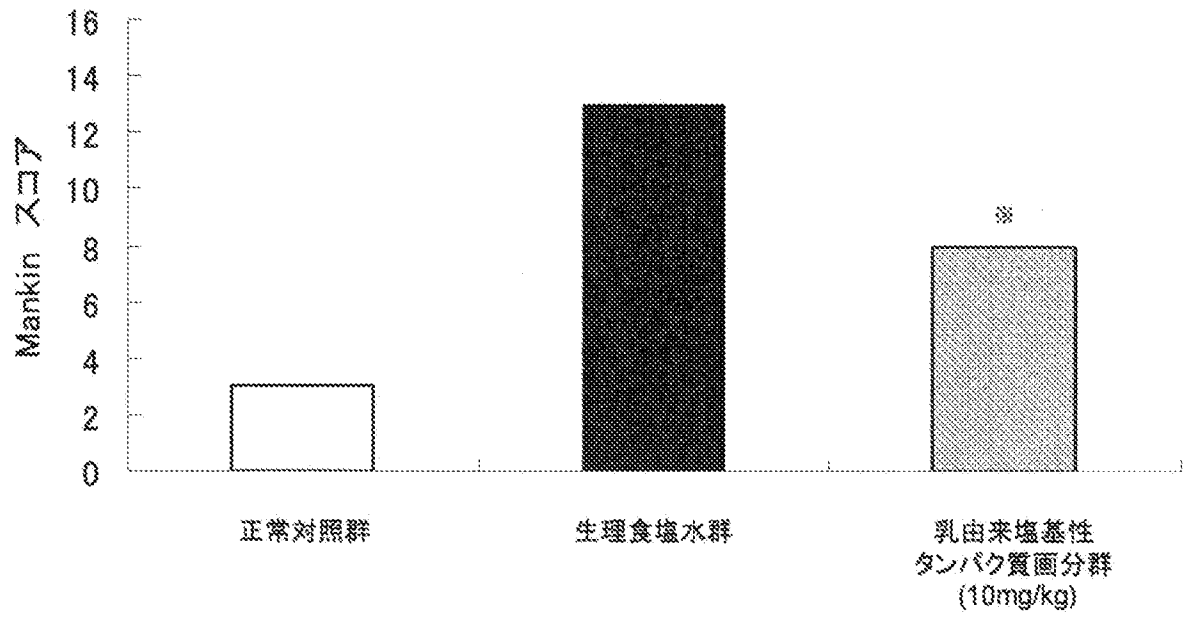
[図4]



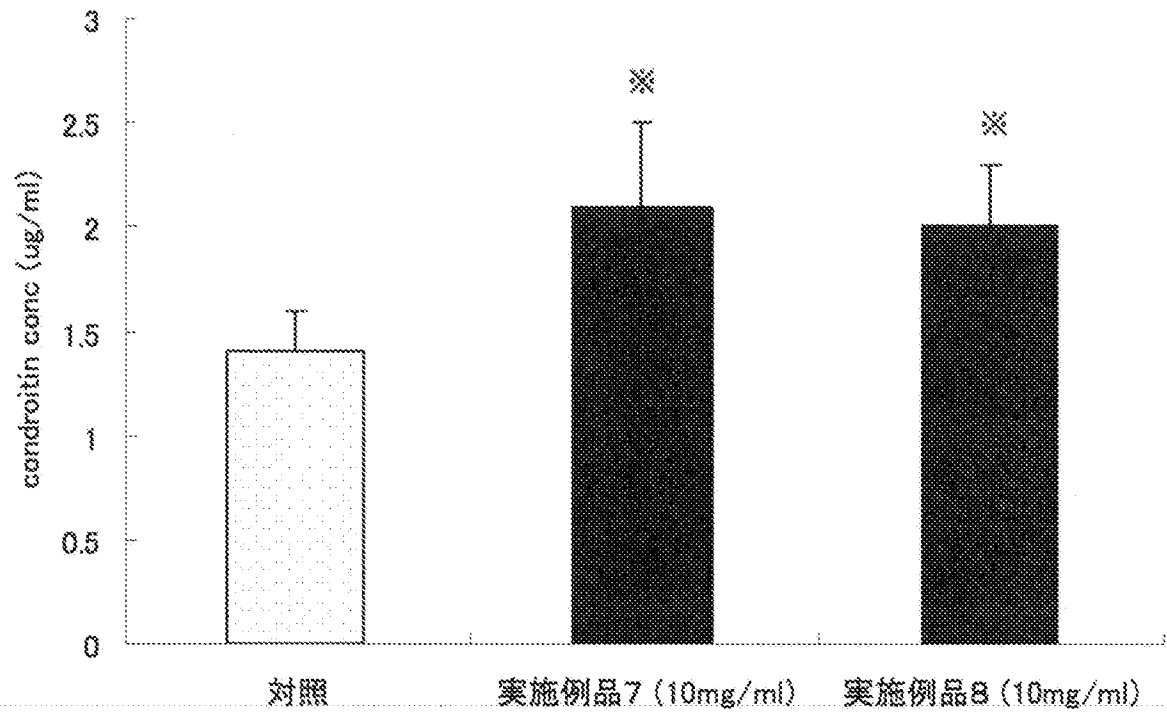
[図5]



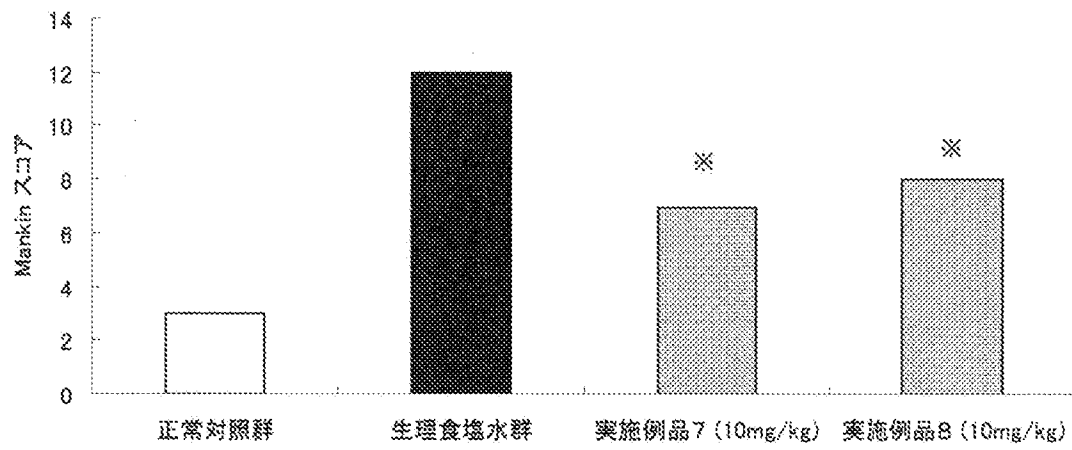
[図6]



[図7]



[図8]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/062525

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A61K38/00(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K38/00, A23K1/16, A23L1/30, A23L1/305, A61P19/02  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 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 8-151331 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 11 June 1996 (11.06.1996), claims 1, 5, 7; paragraphs [0001], [0010], [0031] & US 5932259 A & EP 704218 A2	1-20
X	Yoshikazu MORITA et al., "Nyu Enkisei Tanpakushitsu (MBP) no Kotsuseicho ni Tomonau Nankotsu Saibo Kasseika Sayo", Annual Meeting of JSBBA Koen Yoshishu, 05 March 2002 (05.03.2002), vol.2002, page 105(3-3Ca05)	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 May, 2013 (21.05.13)		Date of mailing of the international search report 04 June, 2013 (04.06.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/062525

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 21  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 21 pertains to a method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A23K1/16(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A23L1/305(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K38/00, A23K1/16, A23L1/30, A23L1/305, A61P19/02</p>											
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年                  日本国公開実用新案公報 1971-2013年                  日本国実用新案登録公報 1996-2013年                  日本国登録実用新案公報 1994-2013年</p>											
<p>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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)                  CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 8-151331 A (雪印乳業株式会社), 1996.06.11, 請求項 1, 5, 7, 【0001】, 【0010】, 【0031】 &amp; US 5932259 A &amp; EP 704218 A2</td> <td>1-20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>森田如一 外 5 名, 乳塩基性タンパク質 (MBP) の骨成長に伴う軟骨細胞活性化作用, 日本農芸化学大会講演要旨集, 2002.03.05, Vol. 2002, p. 105 (3-3Ca05)</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			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 8-151331 A (雪印乳業株式会社), 1996.06.11, 請求項 1, 5, 7, 【0001】, 【0010】, 【0031】 & US 5932259 A & EP 704218 A2	1-20	X	森田如一 外 5 名, 乳塩基性タンパク質 (MBP) の骨成長に伴う軟骨細胞活性化作用, 日本農芸化学大会講演要旨集, 2002.03.05, Vol. 2002, p. 105 (3-3Ca05)	1-9
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 8-151331 A (雪印乳業株式会社), 1996.06.11, 請求項 1, 5, 7, 【0001】, 【0010】, 【0031】 & US 5932259 A & EP 704218 A2	1-20									
X	森田如一 外 5 名, 乳塩基性タンパク質 (MBP) の骨成長に伴う軟骨細胞活性化作用, 日本農芸化学大会講演要旨集, 2002.03.05, Vol. 2002, p. 105 (3-3Ca05)	1-9									
<p>☐ 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。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献                  「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>21.05.2013</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>04.06.2013</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>平井 裕彰</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3452</p>	<p>4C 9633</p>									

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ 21 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項21は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及び[PCT規則39.1(iv)]の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。