

(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
2011 年 10 月 6 日(06.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/122041 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 36/18 (2006.01) A61K 36/73 (2006.01)
A61K 31/025 (2006.01) A61K 36/75 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 36/53 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/001941

(22) 国際出願日: 2011 年 3 月 30 日(30.03.2011)

(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 2010-083017 2010 年 3 月 31 日(31.03.2010) JP
特願 2010-083016 2010 年 3 月 31 日(31.03.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.)
[JP/JP]; 〒1048010 東京都中央区銀座 7 丁目 5-5 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 合津陽子 (GOZU, Yoko) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市

都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP). 土師信一郎 (HAZE, Shinichiro) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP). 森圭子 (MORI, Keiko) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP). 海塩健一 (UMISHIO, Kenichi) [JP/JP]; 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 柳田征史, 外 (YANAGIDA, Masashi et al.); 〒2220033 神奈川県横浜市港北区新横浜 3-1-8 新横浜 K S ビル 7 階 柳田国際特許事務所 Kanagawa (JP).

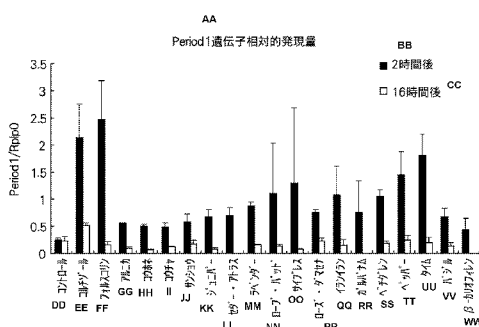
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,

[続葉有]

(54) Title: EXPRESSION MODULATOR FOR CLOCK GENE PERIOD

(54) 発明の名称: 時計遺伝子 Period の発現調節剤

[図3]



AA RELATIVE PERIOD GENE EXPRESSION
BB AFTER 2 HOURS
CC AFTER 16 HOURS
DO CONTROL
EE CORTISOL
FF FORSKOLIN
GG ARNICA
HH JAPANESE SPATTERDOCK
II TEA
JJ JAPANESE PEPPER
KK JUNIPER
LL CEDAR ATLAS
MM LAVENDER
NN CLOVE BUD
OO CYPRESS
PP ROSE DAMASCENA
QQ YLANG YLANG
RR GALBANUM
SS PETITGRAIN
TT PEPPER
UU THYME
VV BASIL
WW BETA CARYOPHYLLENE

(57) Abstract: Provided is a material that modulates Period gene expression effectively and can be used in a wide range of applications. The Period gene expression modulator contains as an active ingredient at least one ingredient selected from a group comprising arnica extract, Japanese spatterdock extract, tea extract, Japanese pepper extract, juniper oil, cedar oil, lavender oil, clove bud oil, cypress oil, rose oil, ylang ylang oil, galbanum oil, petitgrain oil, pepper oil, thyme oil, basil oil, and beta caryophyllene.

(57) 要約: 【課題】幅広い用途に活用できかつ効果的に Period 遺伝子発現を調節する物質を提供する。【解決手段】アルニカエキス、コウホネエキス、コウチャエキス、サンショウエキス、ジュニパーオイル、セダーオイル、ラベンダーオイル、クローブパッドオイル、サイプレスオイル、ローズオイル、イランイランオイル、ガルバナムオイル、ペチグレンオイル、ペッパーオイル、タイムオイル、バジルオイルおよびβ-カリオフィレンより成る群から選択される1以上を有効成分として含む Period 遺伝子発現調節剤。

WO 2011/122041 A1



MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, 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.

(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).

- (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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

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：時計遺伝子Periodの発現調節剤

技術分野

[0001] 本発明は、時計遺伝子の発現調節剤に関するものであり、より詳しくは、時計遺伝子Periodの発現調節剤、ならびにそれを含む概日リズム調整剤に関する。

背景技術

[0002] 地球上の殆ど全ての生物は体内に約24時間周期で自律振動する「生体時計」を持っている。生体時計は、概日リズム（サーカディアンリズム）という生物学的な日周変動を引き起こし、生物の睡眠・覚醒サイクルをはじめ、体温、血圧、ホルモン分泌、代謝、さらには、心身の活動、摂食などの、様々な生体现象（活動）の日周変動を支配すると考えられている。近年、概日リズムの乱れが、睡眠障害、皮膚疾患、生活習慣病、さらには鬱病等の精神神経疾患など、様々な心身の症状または疾患の発症要因として指摘されている。

[0003] 図1に示すように、生体時計は、「時計遺伝子（クロックジーン）」と呼ばれる遺伝子群を含むリズム発生システムにより制御されており、哺乳類の場合、CLOCK, BMAL1, PERIOD, CRYPTOCHROMEの4つのコアとなるタンパク質をコードする遺伝子の転写の促進/抑制により形成されるフィードバックループが時計分子機構の中核（コア）をなし、このフィードバックループが約24時間のリズムを刻むことにより、概日リズムが形成される。

[0004] 概日リズムの制御中枢（中枢時計）は視床下部の視交叉上核に存在しているが、肝臓、腎臓、皮膚など末梢組織においても時計遺伝子が発現し、同様のシステムで概日リズムを形成することが明らかになっている。末梢の時計遺伝子は、視交叉上核からのシグナルによりその発現が調節されているが、さらに、グルココルチコイド、カテコラミン、アンジオテンシンIIなどのシグナル刺激因子が、末梢組織や細胞の時計遺伝子の発現を直接制御して生理

リズムを作り出していることもわかってきた。近年、線維芽細胞などの培養細胞において、グルコルチコイド、フォスコリンまたは血清等の刺激因子を加えて発現リズムを同調させて時計遺伝子発現の概日リズムをin vitroで誘導し、その発現を指標として概日リズムを評価することが行われている（非特許文献1－3）。

[0005] 時計遺伝子は、転写因子として他の遺伝子の発現リズムを直接制御し、さらに、ホルモン分泌の調節等を介して間接的により多くの遺伝子の日周発現を制御しており、生体における時計遺伝子の発現リズムが乱れると、生体器官の働きや内分泌系に障害があらわれ、高血圧などの生活習慣病をはじめ様々な疾病を引き起こすことが明らかとなっている（非特許文献4）。例えば、肥満の人は時計遺伝子の発現に異常があることが報告されており、また鬱病や癌などとの関連性も報告されている。さらに、時計遺伝子が皮膚の様々な生理機能の概日リズムを調節していることもわかってきており、正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いた実験において、タイプIコラーゲン遺伝子が、時計遺伝子Period2と同様の発現パターンで概日リズムをもって発現されていることが報告されている（非特許文献5）。

[0006] 従って、時計遺伝子の発現を調節することにより、それにより制御されている生体の様々な行動リズムや生理機能の概日リズムを調整することが可能であり、時計遺伝子の発現を調節できる薬剤の開発が強く望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Okamura H., (2004) Clock genes in cell clocks: Roles, Actions, and Mysteries. Journal of Biological Rhythms, 19 (5); 388-399

非特許文献2: Balsalobre A., Damiola F., and Schibler U., (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell, 93; 929-937

非特許文献3: Yagita K., Tamanini F., van der Horst G., and Okamura H., (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibro

blasts. Science, 292: 278-281

非特許文献4: Hastings M., O' Neill J.S., and Maywood E.S., (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. Journal of Endocrinology, 195: 187-198

非特許文献5: 泉香津代ほか、概日リズムを持つ皮膚生理遺伝子の探索、日本分子生物学会 第32回年会 要旨2P-0009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、上記のような事情に鑑み、生体時計のコア遺伝子であるPeriodの発現を調節できる薬剤を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者は、培養細胞において、特定の植物のエキスまたは精油が、時計遺伝子Periodの発現リズムを誘導しさらにその発現を促進させ得ることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0010] 本発明のPeriod遺伝子発現調節剤は、アルニカエキス、コウホネエキス、コウチャエキス、サンショウエキス、ジュニパーオイル、セダーオイル、ラベンダーオイル、クローブバッドオイル、サイプレスオイル、ローズオイル、イランイランオイル、ガルバナムオイル、ペチグレンオイル、ペッパーオイル、タイムオイル、バジルオイルおよび β -カリオフィレンより成る群から選択される1以上を有効成分として含むことを特徴とする。これら特定の植物のエキスまたは精油が時計遺伝子の発現を調節できることは今まで全く知られていなかった。
- [0011] 本発明において、遺伝子発現調節とは、遺伝子の発現を促進させることに加え、遺伝子の発現リズム（位相または周期）を調節することを含む。
- [0012] 本発明の概日リズム調整剤は、上記のPeriod遺伝子発現調節剤を含む。上述したように、時計遺伝子は、直接または間接的に、生体器官の働きや内分泌系に関与する様々な遺伝子の日周発現を制御しており、生体時計のコア遺伝子であるPeriod遺伝子の発現を調節することにより、それにより制御され

ている生体の様々な行動リズムや生理機能の概日リズムを調整することができる。

発明の効果

[0013] 本発明のPeriod遺伝子発現調節剤はいずれも生薬または香料であり、経皮、経口、吸入など様々な投与方法に応用することが可能で、かつ医薬、医薬部外品、化粧品、食品、雑貨、衣料等様々な態様で使用でき、効果的にPeriod遺伝子の発現を調節して、概日リズムの不調に起因する様々な心身及び皮膚の症状または疾患を改善することが可能である。

[0014] さらに、本発明のPeriod遺伝子発現調節剤のうち、ヒアルロン酸合成酵素（Has）遺伝子の発現リズムを調節するものについては、その発現を促進できるため、皮膚のヒアルロン酸産生の概日リズムを調整すると共に、その産生量を高めて皮膚機能を改善できると考えられる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]時計遺伝子による概日リズム発生システムのコアループ部分を示す概略図

[図2]培養ヒト皮膚線維芽細胞における、コルチゾールおよびフォルスコリンによる時計遺伝子発現の概日リズムの誘導を示すグラフ

[図3]培養ヒト皮膚線維芽細胞における、試験物質によるPeriod1遺伝子発現調節を示すグラフ

発明を実施するための形態

[0016] 本発明のPeriod遺伝子発現調節剤は、特定の植物のエキスまたは精油を有効成分とする。

[0017] Period遺伝子発現を調節できる植物のエキスとして、アルニカ、コウホネ、コウチャおよびサンショウから選択される生薬エキスが挙げられる。それら生薬の詳細については、日本汎用化粧品原料集第4版（薬事日報）を参照されたい。

[0018] 上記生薬エキスは常法により得ることができ、例えば各エキスの起源となる植物を抽出溶媒とともに浸漬または加熱還流した後、濾過し、濃縮して得

ることができる。抽出溶媒としては、通常抽出に用いられる溶媒であれば任意に用いることができ、例えば、水、メタノール、エタノール、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、グリセリン等のアルコール類、含水アルコール類、クロロホルム、ジクロルエタン、四塩化炭素、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン等の有機溶媒等を、それぞれ単独あるいは組み合わせて用いることができる。上記溶媒で抽出して得られたエキスをそのまま、あるいは濃縮したエキスを吸着法、例えばイオン交換樹脂を用いて不純物を除去したものや、ポーラスポリマー（例えばアンバーライトXAD-2）のカラムにて吸着させた後、メタノールまたはエタノールで溶出し、濃縮したものも使用することができる。また分配法、例えば水／酢酸エチルで抽出したエキス等も用いられる。

[0019] これら生薬エキスはいずれも市販されているが、各生薬エキスについて以下に簡単に説明する。

[0020] アルニカエキスは、キク科 (Compositae) のアルニカ (*Arnica montana*) の抽出エキスであり、アルニカの花を50%エタノール等で抽出して得られるものが好適である。

[0021] コウホネエキスは、スイレン科 (Nymphaeaceae) のコウホネ (*Nuphar japonicum*) の抽出エキスであり、コウホネの根茎を50%エタノール等で抽出して得られるものが好適である。

[0022] コウチャエキスは、ツバキ科 (Theaceae) のコウチャ (*Thea sinensis* L. var. *assamica*) の抽出エキスであり、コウチャの葉を30%エタノール等で抽出して得られるものが好適である。

[0023] サンショウエキスは、ミカン科 (Rutaceae) サンショウ属のサンショウ (*Zanthoxylum piperitum*) の抽出エキスであり、サンショウの果皮を70%エタノール等で抽出して得られるものが好適である。

[0024] Period遺伝子発現を調節できる植物の精油（香料）として、ジュニパーオイル、セダーオイル、ラベンダーオイル、クローブバッドオイル、サイプレスオイル、ローズオイル、イランイランオイル、ガルバナムオイル、ペチグ

レンオイル、ペッパーオイル、タイムオイル、バジルオイルおよび β -カリオフィレンが挙げられる。これら香料はいずれも市販されているが、以下に簡単に説明する。

- [0025] ジュニパーオイルは、ヒノキ科の常緑樹であるジュニパー (*Juniperus communis* L) の枝葉などを水蒸気蒸留して得られる精油である。
- [0026] セダーオイルはヒマラヤスギ (セイヨウスギ) 属の木材から水蒸気蒸留によって得られる精油である。
- [0027] ラベンダーオイルは、シソ科に属する小灌木であるラベンダー (*Lavandula officinalis*) の刈り取った花を水蒸気蒸留して得られる精油である。
- [0028] クローブバッドオイルは、フトモモ科クローブ (*Eugenia caryophyllata*) の開花前の花蕾を乾燥し、水蒸気蒸留することにより得られる精油である。
- [0029] サypressオイルは、サイプレス (*Cupressus sempervirene*) の枝葉などを水蒸気蒸留法して得られる精油である。
- [0030] ローズオイルは、キャベッジ・ローズ (*Rosa centifolia* L) やダマスク・ローズ (*Rosa damascena* Mill.) などのバラの花を水蒸気蒸留して得られる精油である。
- [0031] イランイランオイルは、バンレイシ科 (*Anonaceae*) に属する植物 (*Cannig odorata*) の花をそのままの状態の水蒸気蒸留、もしくは生花を石油エーテルなどで溶媒抽出することにより得られる精油である。
- [0032] ガルバナムオイルは、セリ科の *Ferula galbaniflua* および近縁種植物の葉や芽から浸出するゴム状の浸出物を水蒸気蒸留して得られる精油である。
- [0033] ペチグレンオイルは、ミカン科のビターオレンジ (*Citrus aurantium*) の葉などを水蒸気蒸留して得られる精油である。
- [0034] ペッパーオイルは、コショウ科に属する多年生植物であるペッパー (*Piper nigrum* L.) の漿果を水蒸気蒸留して得られる精油である。
- [0035] タイムオイルは、シソ科の多年草であるタイム (*Thymus vulgaris* L.) の全草を水蒸気蒸留して得られる精油である。
- [0036] バジルオイルは、シソ科の一年草であるバジル (*Ocimum basilicum* L.) の

地上部全草を水蒸気蒸留して採取される精油である。

[0037] β -カリオフィレンは、主に、チョウジなどのフトモモ科植物、ラベンダーオイル等の植物および精油中に存在する天然のセスキテルペン類である。

[0038] 本発明のPeriod遺伝子発現調節剤は、上記の植物のエキス（生薬）または精油（香料）の1種または2種以上を含んでいてよい。例えば、上記生薬の1種または2種以上と、香料の1種または2種以上とを組み合わせる配合してもよい。

[0039] 本発明の概日リズム調整剤は、Period遺伝子発現調節剤としての上記の植物のエキスまたは精油の1または2種以上を含む。

[0040] 本発明のPeriod遺伝子発現調節剤は、単独で用いてもよいが、他の時計遺伝子の発現調節作用を有する薬剤と組み合わせて使用してもよい。

[0041] 他の時計遺伝子として、例えば、Bmal遺伝子（Bmal1, Bmal2）、Clock遺伝子、Cryptochrome遺伝子、albumin site D-binding protein (Dbp) 遺伝子、E4BP4遺伝子、Npas2遺伝子、Rev-erb遺伝子などが挙げられるが、中でも、生体時計の他のコア遺伝子であるBmal、Clockおよび／またはCryptochrome遺伝子、特にBmal遺伝子の発現調節剤と組み合わせて使用することが好ましい。

[0042] 図1に示すように、概日リズム発生システムにおいて、Bmal遺伝子の発現産物であるBMAL1はCLOCKとヘテロ二量体を形成してPeriod遺伝子の転写を促進し、一方、発現されたPERIOD (PER)はCRYPTOCHROME (CRY) とヘテロ二量体を形成してBMALおよびCLOCKの活性を抑制し、24時間周期で振動するフィードバックループを形成する。哺乳類では、Bmal遺伝子とPeriod遺伝子はほぼ12時間ずれた位相でそれぞれ概日リズムを刻んで発現されており、Bmalの発現は夜中増加し、一方Periodの発現は昼間増加する。従って、Period遺伝子とBmal遺伝子の発現を共に調節して、生体時計のコアループを調節することにより、より効果的に概日リズムを調整できると考えられる。

[0043] Bmal遺伝子発現調節剤として、限定はされないが、例えば、生薬であるヒノキ、クロレラ、ホップおよびサンショウ等のエキス、ならびに香料であるジュニパー、ラベンダー、ユーカリ、オリバナム、サイプレス、パルマロー

ザ、パインニードル、ローズ、イランイラン、エレミ、ペチグレン、ペッパー、タイムおよびカモミール等の精油が挙げられる。培養皮膚線維芽細胞において、これら生薬または香料がBmal遺伝子の発現リズムを誘導し、またその発現を促進できることが確認されている。

[0044] さらに、本発明のPeriod遺伝子発現調節剤および概日リズム調整剤は、それらを単独で用いてもよいが、様々な対象物に含めることができる。その対象物の種類に応じて、上記の必須成分の他に、任意の構成要素をさらに含めることができる。

[0045] 例えば、対象物が皮膚外用剤である場合には、その剤形（例えば、液剤、粉末剤、顆粒剤、エアゾール剤、固形剤、ジェル剤、パッチ剤、坐剤等）や、製品形態（例えば化粧料、医薬品、医薬部外品等）に応じて、通常そのような皮膚外用剤に含まれる任意の成分を、上記のPeriod遺伝子発現調節剤と共に含んでいてよい。皮膚外用剤は、皮膚（頭皮、頭髮、爪も含む）に対して適用する組成物全般を包括する概念であり、例えば、基礎化粧料、メーキャップ化粧料、毛髪化粧料、皮膚もしくは毛髪洗浄料等の化粧料や、軟膏剤、パッチ剤、坐剤、歯磨等の種々の医薬品ないし医薬部外品等を含む。その剤形も特に限定されず、例えば、水溶液系、可溶化系、乳化系、油液系、ゲル系、ペースト系、軟膏系、エアゾール系、水－油2層系、水－油－粉末3層など、任意の剤型を含む。皮膚外用剤が化粧料である場合、例えば、香水、オードトワレ、オーデコロン、クリーム、乳液類、化粧水、ファンデーション類、粉白粉、口紅、石鹸、シャンプー・リンス類、ボディーシャンプー、ボディーリンス、ボディーパウダー類、浴剤類等が挙げられる。

[0046] また、例えば、芳香剤、消臭剤、アロマキャンドル、インセンス、文房具、財布、バッグ、靴等の任意の雑貨類や、例えば下着、洋服、帽子、ストッキング、靴下等の任意の衣類、あるいは例えば散剤、顆粒、錠剤、カプセル剤等様々な形態のサプリメント（栄養補助食品）、菓子、飲料等の任意の食品等に、本発明のPeriod遺伝子発現調節剤を含めることができる。さらに、Period遺伝子発現調節剤が上記の精油（香料）を含む場合、本発明の効果が得

られる限り、吸入医薬品や空中散布剤のような吸入製品において用いてもよい。

[0047] 尚、本発明のPeriod遺伝子発現調節剤の使用態様を例示したが、これらに限定されるものではなく、本発明の効果を達成できる限り、任意の態様で用いることができる。また、本発明のPeriod遺伝子発現調節剤の他に、具体的な態様に応じて、他の概日リズム調整作用を有する薬剤を、本発明の効果を損なわない限り配合することができる。

[0048] 対象物中における本発明のPeriod遺伝子発現調節剤の配合量は、用いる生薬または香料の種類や形態、対象物等によって適宜選択することができ、特に限定されないが、例えば、対象物の全質量に対して、0.00001～100質量%であり、より好適には、0.0001～50質量%であり、さらに好適には、0.0001～20質量%である。

[0049] 尚、本発明のPeriod遺伝子発現調節剤または概日リズム調整剤やそれを配合した対象物の具体的な適用は、概日リズムの調整に関連するものであれば特に限定されない。例えば、時差ぼけ症候群、交代勤務症候群、睡眠相遅延症候群、非24時間型睡眠・覚醒症候群、概日リズム睡眠障害を有する鬱状態など、さらにはそれら概日リズム障害に付随する不眠、体調不調、注意欠損、意欲低下、肌荒れなどの諸症状の予防、改善または治療等に適用できる。

実施例

[0050] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。尚、培養細胞として、皮膚線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、色素細胞、脂肪細胞、神経細胞など各種細胞を用いることができるが、本実施例ではヒト皮膚線維芽細胞を用いて評価を行なった。いずれの生物種および細胞種においても時計遺伝子のコアシステムは共通であるため、ヒト皮膚線維芽細胞での評価結果は、他の生物種および細胞種にも反映できると考えられる。また、ヒトでは、Period遺伝子としてPeriod1、Period2およびPeriod3の3種類の存在が知られているが、同じ遺伝子群で同様

の挙動を示すと考えられており、本実施例では代表としてPeriod1の発現を測定した。

[0051] 培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いた時計遺伝子発現リズム評価系の検討

培養ヒト皮膚線維芽細胞を用いた系で時計遺伝子発現の概日リズムを評価できることを確認した。

[0052] 培養ヒト皮膚線維芽細胞は、正常成人皮膚由来線維芽細胞を購入し（Cell Application, Inc）、実験に用いた。10%FBS、20mM HEPES、Glutamax、抗菌剤を添加したDMEM培地に播種し、37°C、5%CO₂にて培養した。培養6日目に、コルチゾールまたはフォルスコリンをそれぞれ50ng/ml、10 μMとなるように各ウェルに添加して、添加直後を0時間とし、経時的に細胞をサンプリングした。市販のRNA抽出キットを使用して細胞からRNAを抽出し、市販のPCRプライマー（Perfect Real Time Primer、タカラバイオ社）を用い、RT-PCR法により目的とする遺伝子の発現量を測定した。時計遺伝子としては、コアシステムに関わるPeriod1およびBmal1の発現量を定量した。同様に、ハウスキーピング遺伝子であるRPLP0の発現量を定量して内部標準として用い、RPLP0の発現量に対する目的遺伝子の相対的発現量を算出した。

[0053] 生体内で、コルチゾール等のグルココルチコイドは末梢組織等の生体時計の調節に関与し、朝起床時にコルチゾールの血中濃度が上昇して生体時計をリセットすると考えられている。培養細胞では通常、個々の細胞がばらばらのタイミングでリズムを刻んでいるが、コルチゾールやフォルスコリンのようなシグナル刺激因子で刺激することにより、時計遺伝子発現リズムを同調させて概日リズムを誘導することができる。

[0054] 結果を図2に示す。コルチゾールまたはフォルスコリンで刺激することにより、Period1の発現は刺激後約2時間でピークとなり、またBmal1の発現は刺激後約16時間でピークとなり、いずれも約24時間周期の概日リズムを刻んで発現されることを確認できた。

[0055] Period遺伝子発現調節効果に関する試験物質の評価

上記の結果から、培養ヒト皮膚線維芽細胞評価系において、Period1は薬

剤による刺激の約2時間後に発現量がピークとなる概日リズムを刻むことが認められ、刺激の2時間後のPeriod1遺伝子発現量を指標として、試験物質のPeriod遺伝子発現調節効果について評価した。尚、Period遺伝子発現リズムの誘導を確認するため、刺激の16時間後のPeriod1遺伝子発現量もあわせて測定した。

[0056] 上記と同様の方法により、正常成人皮膚由来線維芽細胞（Cell Application, Inc）を播種し、培養6日目に、各薬剤を100ppmとなるように添加して、2時間後および16時間後に細胞をサンプリングした。市販のRNA抽出キットを使用して細胞からRNAを抽出し、市販のPCRプライマー（Perfect Real Time Primer、タカラバイオ社）を用い、RT-PCR法にPeriod1遺伝子の発現量を測定した。

[0057] さらに、一部の試験物質について、皮膚の水分保持に重要な役割を果たすヒアルロン酸の合成に関わるヒアルロン酸合成酵素（HAS）の遺伝子発現についても同様に測定した。HASとしてはHAS1、HAS2、HAS3が知られているが、ここではHAS2を代表として調べた。

[0058] ハウスキーピング遺伝子であるRPLP0の発現量を定量して内部標準として用い、RPLP0の発現量に対する目的遺伝子の相対的発現量を算出した。得られた値について、Dunnettの多重比較検定を行い、コントロールと比較して片側5%の危険率で有意差があるものを効果有りと判定した。

[0059] 図3に、各種試験薬剤、あるいは陽性対照としてのコルチゾールまたはフォルスコリンを添加後2時間および16時間後のPeriod1遺伝子の相対的発現量を示す。

[0060] また、下記の表1に、2時間後のPeriod1遺伝子の相対的発現量を示す。一部の試験物質については、16時間後のHas2遺伝子の相対的発現量を併せて表1に示す。

[表1]

試験物質	Period1 相対的発現量 (2 時間後)	Has2 相対的発現量 (16 時間後)
コントロール	0.23	4.6
生薬		
アルニカ	0.56**	
コウチャ	0.48*	
コウホネ	0.51**	
サンショウ	0.42*	
香料		
ジュニパー	0.67*	163**
セダー	0.7*	
ラベンダー	0.88**	
クローブ	1.11**	
サイプレス	1.29**	
ローズ	0.75*	
イランイラン	1.08**	66**
ガルバナム	0.76*	
ペチグレン	1.06**	
ペッパー	1.44**	78.8**
タイム	1.81**	
バジル	0.68*	
β -カリオフィレン	0.44*	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

[0061] アルニカエキス、コウホネエキス、コウチャエキス、サンショウエキス、ジュニパーオイル、セダーオイル、ラベンダーオイル、クローブバッドオイル、サイプレスオイル、ローズオイル、イランイランオイル、ガルバナムオイル、ペチグレンオイル、ペッパーオイル、タイムオイル、バジルオイルおよび β -カリオフィレンは、陽性対照であるコルチゾールおよびフォルスコリンと同様に、刺激後約2時間でピークとなる発現リズムを誘導し、さらにコントロールと比較してPeriod1遺伝子の発現量を有意に高め、それら生薬または香料がPeriod遺伝子発現を調節し得ることが示された。

[0062] さらに、ジュニパー、イランイラン、およびペッパーは、16時間後のHas

2遺伝子発現を促進することから、皮膚のヒアルロン酸産生を高めて皮膚機能を改善または向上させ得ることが示唆された。

[0063] 尚、本発明のPeriod遺伝子発現調節剤は、Bmal遺伝子発現調節剤と組み合わせて使用することができるが、そのようなBmal遺伝子発現調節剤として、限定はされないが、生薬であるヒノキエキス、クロレラエキス、ホップエキス、サンショウエキス、ならびに香料であるジュニパーオイル、ラベンダーオイル、ユーカリオイル、オリバナム、サイプレスオイル、パルマローザオイル、パインニードルオイル、ローズオイル、イランイランオイル、エレミオイル、ペチグレンオイル、ペッパーオイル、タイムオイルおよびカモミールオイルが挙げられる。それら生薬または香料は、上記と同様の方法により、培養ヒト皮膚線維芽細胞において、Bmal遺伝子の発現リズムについてBmal1を代表として調べた結果、Bmal遺伝子発現リズムを誘導しまたその発現を促進させ得ることが確認されている。下記表2に、刺激16時間後のBmal1遺伝子の相対的発現量を示す。

[表2]

試験物質	Bmal1 相対的発現量 (16 時間後)
コントロール	0.41
生薬	
ヒノキ	0.64**
クロレラ	0.63**
ホップ	0.55*
サンショウ	0.6**
香料	
ジュニパー	2.69**
ラベンダー	1.2**
ユーカリ	1.73**
オリバナム	1.09*
サイプレス	1.13**
パルマローサ	1.07*
パインニードル	1.26**
ローズ	1.01*
イランイラン	4.25**
エレミ	1.3**
ペチグレン	1.13*
ペッパー	1.98**
タイム	1.5**
カモミール	2.25**

*p<0.05; **p<0.01

[0064] (配合例)

以下、本発明のPeriod発現調整剤の配合例を示すが、本発明の実施は以下に限定されるものではない。尚、下記の配合例では本発明のPeriod 発現調整剤としてタイムオイルを用いているが、それに限定されるものではなく、上記のPeriod遺伝子発現を調節し得る生薬および／または香料の1種または2種以上の混合物を同様に配合することができる。配合量は全て製品全量に対する質量%で表す。

[0065] フレグランス

(1) アルコール	75.0
(2) 精製水	残余
(3) ジプロピレングリコール	5.0
(4) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	10.0
(5) 酸化防止剤	8.0
(6) 色素	適量
(7) 紫外線吸収剤	適量

[0066] ルームフレグランス

(1) アルコール	80.0
(2) 精製水	残余
(3) 酸化防止剤	5.0
(4) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	3.0
(5) 3-メチルー3-メトキシブタノール	5.0
(6) ジベンジリデンソルビトール	5.0

[0067] インセンス

(1) タブ粉	75.5
(2) 安息香酸ナトリウム	15.5
(3) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	5.0
(4) ユーカリオイル	1.0
(5) 精製水	残余

[0068] 入浴剤

(1) 硫酸ナトリウム	45.0
(2) 炭酸水素ナトリウム	45.0
(3) ラベンダーオイル	9.0
(4) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	1.0

[0069] マッサージ用ジェル

(1) エリスリトール	2. 0
(2) カフェイン	5. 0
(3) オウバク抽出物	3. 0
(4) グリセリン	50. 0
(5) カルボキシビニルポリマー	0. 4
(6) ポリエチレングリコール400	30. 0
(7) エデト3ナトリウム	0. 1
(8) ポリオキシレン(10)メチルポリシロキサン共重合体	2. 0
(9) スクワラン	1. 0
(10) 水酸化カリウム	0. 15
(11) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	1. 0

[0070] マッサージクリーム

(1) 固形パラフィン	5. 0
(2) ミツロウ	10. 0
(3) ワセリン	15. 0
(4) 流動パラフィン	41. 0
(5) 1, 3-ブチレングリコール	4. 0
(6) モノステアリン酸グリセリン	2. 0
(7) POE(20)ソルビタンモノ라우リン酸エステル	2. 0
(8) ホウ砂	0. 2
(9) カフェイン	2. 0
(10) 防腐剤	適量
(11) 酸化防止剤	適量
(12) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	1. 0
(13) 精製水	残余

[0071] 芳香性繊維

キュプロアンモニウムセルローズ溶液（セルローズ濃度 10 重量%、アンモニウム濃度 7 重量%、銅濃度 3.6 重量%）に、本発明のPeriod発現調整剤を内包したマイクロカプセル（粒子径 50 μ m 以下、マイクロカプセルに占める精油の割合は 50 重量%）をセルローズ重量に対して 0.1 ~ 20 重量%の範囲内で添加、混和した後、通常の湿式紡糸方法に従って紡糸し、精錬工程、乾燥工程を経て、芳香性繊維を得た。

[0072] 顆粒

(1) スクラローズ	0.1
(2) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	0.1
(3) 香味料	5.0
(4) 賦形剤（セオラス）	10.0
(5) マルチトール	残余

[0073] 錠剤（チュアブルタイプ）

(1) イノシトール	11.0
(2) マルチトール	21.0
(3) スクロース	0.5
(4) 鮭白子抽出物（DNA Na）	0.1
(5) 酵母抽出物	0.1
(6) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	0.1
(7) 香味料	5.0
(8) 賦形剤	残余

[0074] タブレット

(1) 潤沢剤（ショ糖脂肪酸エステル等）	1.0
----------------------	-----

(2) アラビアガム水溶液 (5%)	2. 0
(3) 酸味料	1. 0
(4) 着色料	適量
(5) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	0. 1
(6) 糖質 (粉糖またはソルビトール等)	残余

[0075] キャンディー

(1) 砂糖	50. 0
(2) 水飴	47. 95
(3) 有機酸	2. 0
(4) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	0. 05

[0076] ガム

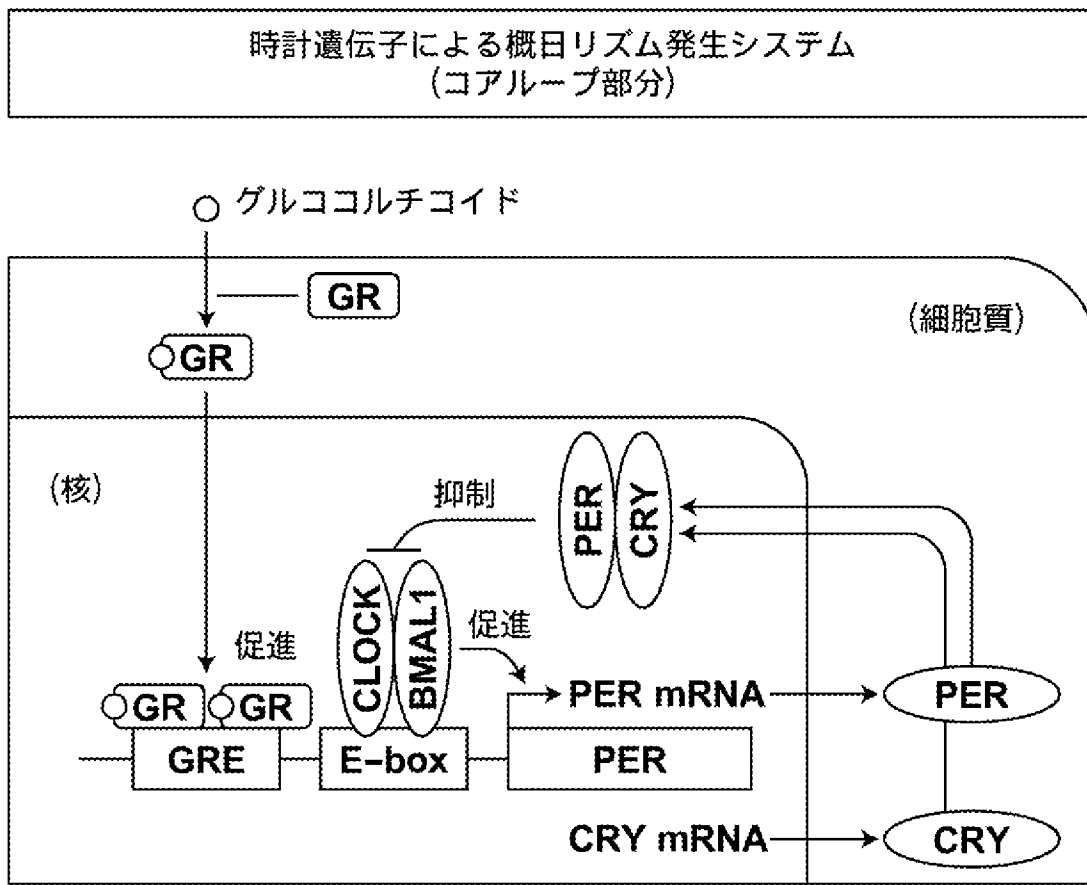
(1) 砂糖	43. 0
(2) ガムベース	30. 95
(3) グルコース	10. 0
(4) 水飴	16. 0
(5) 本発明のPeriod発現調整剤：タイムオイル	0. 05

[0077] これら配合例の製品は、それぞれの製品形態の典型的な使用態様における使用テストにより、Period遺伝子の発現を調節して、生体の概日リズムを調整することができる。

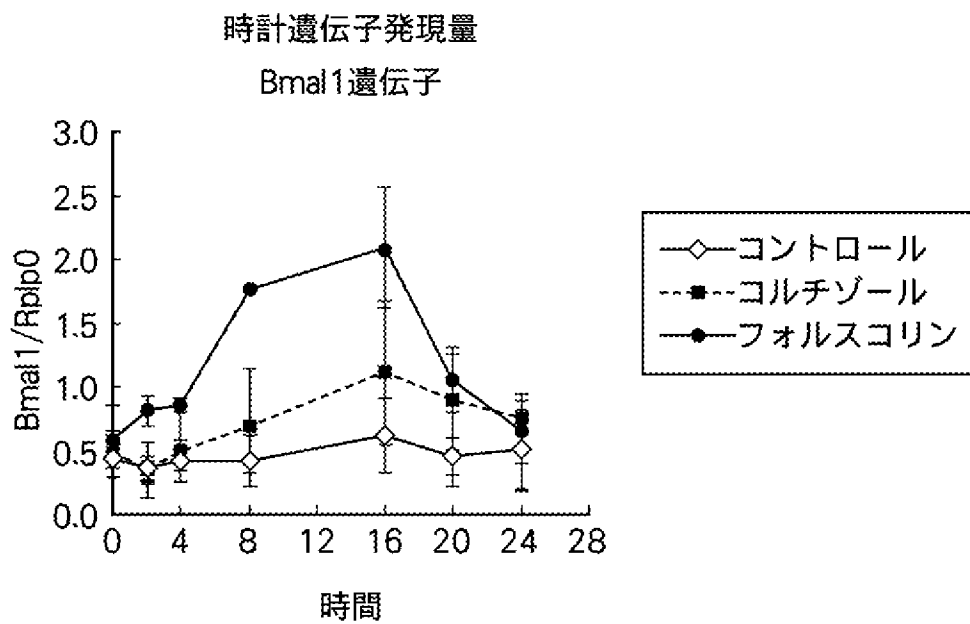
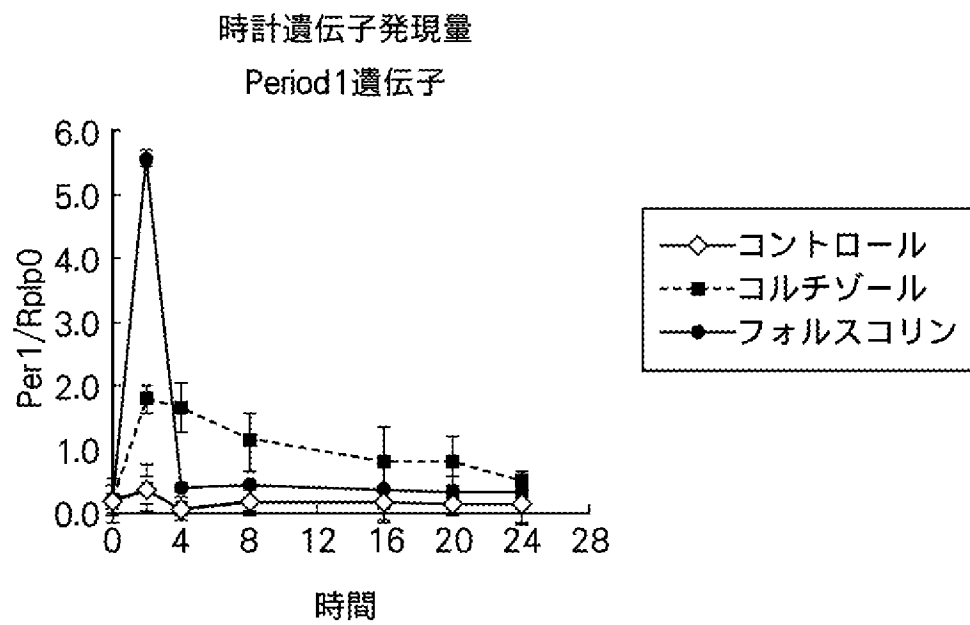
請求の範囲

- [請求項1] アルニカエキス、コウホネエキス、コウチャエキス、サンショウエキス、ジュニパーオイル、セダーオイル、ラベンダーオイル、クローブバッドオイル、サイプレスオイル、ローズオイル、イランイランオイル、ガルバナムオイル、ペチグレンオイル、ペッパーオイル、タイムオイル、バジルオイルおよび β -カリオフィレンより成る群から選択される1以上を有効成分として含む概日リズム調整剤。
- [請求項2] アルニカエキス、コウホネエキス、コウチャエキス、サンショウエキス、ジュニパーオイル、セダーオイル、ラベンダーオイル、クローブバッドオイル、サイプレスオイル、ローズオイル、イランイランオイル、ガルバナムオイル、ペチグレンオイル、ペッパーオイル、タイムオイル、バジルオイルおよび β -カリオフィレンより成る群から選択される1以上を有効成分として含むPeriod遺伝子発現調節剤。

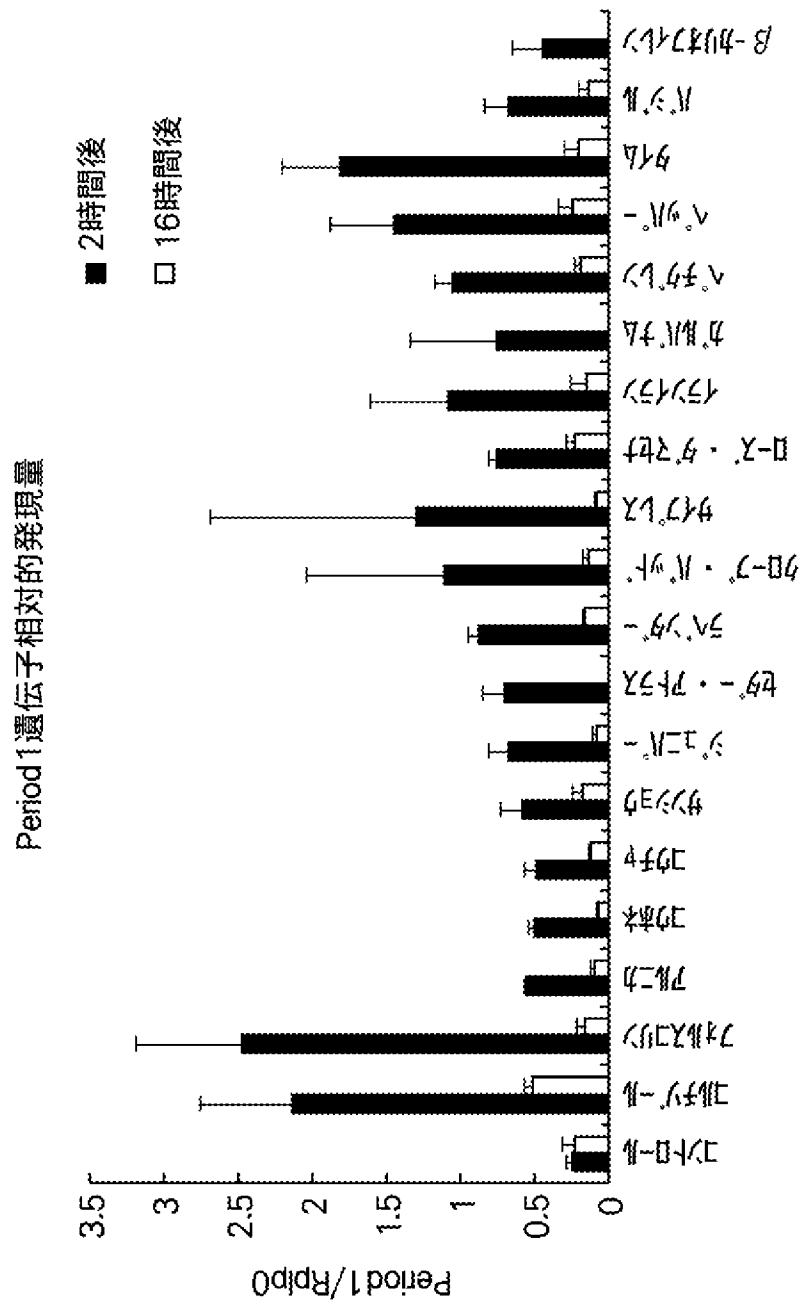
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/18(2006.01)i, A61K31/025(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i, A61K36/05(2006.01)i, A61K36/53(2006.01)i, A61K36/73(2006.01)i, A61K36/75(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P43/00(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)

A61K36/18, A61K31/025, A61K36/00, A61K36/05, A61K36/53, A61K36/73, A61K36/75, A61P25/00, A61P43/00

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-132662 A (Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.), 18 June 2009 (18.06.2009), claim 1; table 2 (sample 10) (Family: none)	1, 2
Y	GANZERA Markus et al, Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in Arnica montana L. by micellar electrokinetic capillary chromatography, Anal Chim Acta, 2008, Vol.614, No.2, Page.196-200, abstract, Fig.1	1, 2
Y	JP 2008-266319 A (Ezaki Glico Co., Ltd.), 06 November 2008 (06.11.2008), claim 2(i-1)(iii-1); examples 5, 13 (Family: none)	1, 2



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
07 June, 2011 (07.06.11)

Date of mailing of the international search report
21 June, 2011 (21.06.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001941

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Satoko WATANABE et al., "Daitai Iryo o Kagaku suru 8 Aroma Therapy, Anti-ageing Igaku, 2009, vol.5, no.3, pages 375 to 379, abstract, page 379, left column	1, 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/001941

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

As disclosed in document 1 shown below, a circadian rhythm regulator comprising a plant-derived substance as an active ingredient is known before the filing of the present application. Further, as shown in table 1, it is known that substances derived from different plants have greatly different activities. Therefore, a special technical feature of claims 1 and 2 is the use of each of 17 components recited in claims 1 and 2 as an active ingredient for a circadian rhythm regulator. Consequently, it is considered that claims 1 and 2 include 17 inventions which share no common special technical feature.

Document 1: JP 2008-266319 A (Ezaki Glico Co., Ltd.) 06 November 2008 (06.11.2008)

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.:
Parts of 1-2 which relate to an extract from a plant *Arnica montana*.

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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K36/18(2006.01)i, A61K31/025(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i, A61K36/05(2006.01)i, A61K36/53(2006.01)i, A61K36/73(2006.01)i, A61K36/75(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P43/00(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 (I P C))

Int.Cl. A61K36/18, A61K31/025, A61K36/00, A61K36/05, A61K36/53, A61K36/73, A61K36/75, A61P25/00, A61P43/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2009-132662 A (丸善製薬株式会社) 2009.06.18, 請求項 1, 表 2 (試料 10) (ファミリーなし)	1, 2
Y	GANZERA Markus et al, Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in Arnica montana L. by micellar electrokinetic capillary chromatography, Anal Chim Acta, 2008, Vol.614, No.2, Page.196-200, abstract, Fig.1	1, 2

☒ 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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 7 . 0 6 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 6 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

鶴見 秀紀

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

8 4 1 5

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
Y	JP 2008-266319 A (江崎グリコ株式会社) 2008.11.06, 請求項 2 (i-1) (iii-1), 実施例 5, 13 (ファミリーなし)	1, 2
A	渡邊聡子 他, 代替医療を科学する 8 アロマセラピー-, アンチ・エイジング医学, 2009, Vol. 5, No. 3, Page. 375-379, abstract, 第 379 頁 左欄	1, 2

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 _____ 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、
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ころの国際調査機関は認めた。

下記文献1に記載されているように、植物由来の物資を有効成分とする概日リズム調整剤は、本出願前既に知られている。また、表1の記載にも有るように、植物も種類が異なればその活性も大きく異なることも知られている。したがって、請求項1, 2の特別な技術的特徴は、請求項1, 2に記載された17の成分それぞれを、概日リズム調整剤の有効成分として用いたことである。よって、請求項1, 2には、互いに共通の特別な技術的を有しない17の発明が存在するものと認める

文献1：JP 2008-266319 A（江崎グリコ株式会社）2008.11.06

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。

請求項1, 2のアルニカエキスに関する部分

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。