

(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 1 月 31 日(31.01.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/015331 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/068878
- (22) 国際出願日: 2012 年 7 月 25 日(25.07.2012)
- (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 2011-161556 2011 年 7 月 25 日(25.07.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ヤクルト本社(KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 久保田 憲広(KUBOTA, Norihiro) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 増岡 範江(MASUOKA, Norie) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 狩野 光芳(KANO, Mitsuyoshi) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 角 将一(KADO, Shoi-ichi) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 小林 稔秀(KOBAYASHI, Toshihide) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 永田 百合子(NAGATA, Yuriko) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 宮崎 幸司(MIYAZAKI, Kouji)

[JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋 1 丁目 1 番 1 9 号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル 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, 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), ユーロシヤ (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).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

(54) Title: NASH MODEL ANIMAL

(54) 発明の名称: N A S H モデル動物

(57) Abstract: Provided are a NASH model animal in which the pathology characteristics of NASH in humans are produced, and a method for producing the NASH model animal. The NASH model animal is obtained by causing the animal to ingest a high-fat diet and administering a liver damaging agent at least four times.

(57) 要約: ヒトの N A S H 特有の病態を生じる N A S H モデル動物及びその作製方法を提供する。高脂肪食を摂取させ、肝障害剤を 4 回以上投与することにより得られる N A S H モデル動物。



WO 2013/015331 A1

明 細 書

発明の名称：NASHモデル動物

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトの非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に類似した病態を示すNASHモデル動物及びその作製方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、肥満の人で飲酒習慣がないにも関わらず、脂肪肝から肝硬変や肝がんになる患者が増えている。脂肪性肝疾患のうち、明らかな飲酒歴がないのにも関わらず、アルコール性肝障害に類似した脂肪性肝障害を認める症例をNonalcoholic fatty liver disease（NAFLD）といい、そのうち肝組織で肝細胞の風船様腫大を伴う脂肪性肝炎を認める症例を特にNASHと呼んでいる。当該NASHは、肝硬変や肝がんになるリスクが高いことから、この予防、治療手段の開発が望まれている。

[0003] NASH治療薬の開発には、その病態モデルが必要である。NASH又はNAFLDのモデル動物としては、メチオニン及び／又はコリン欠乏食モデル（非特許文献1、特許文献1）、亜硝酸塩やヒドロキシルアミンを投与してメトヘモグロビン血症を発症させ、生体内低酸素状態を形成させるモデル（特許文献2）等が知られているが、これらはいずれも組織学的にNASHの病態を反映しているとは言い難い。また、ストレプトゾトシンなどのN-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ阻害剤を投与するモデルマウス（特許文献3）、高脂肪食とテトラサイクリン系抗生物質を投与するモデルマウス（特許文献4）、高脂肪食摂取と四塩化炭素を1回投与するモデルマウス（非特許文献2）も報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2006-349457号公報

特許文献2：WO2008／018191

特許文献3：特開2009－178143号公報

特許文献4：WO2006／030792

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Journal of Gastroenterology and Hepatology 23 (2008) 1635－1648

非特許文献2：World Journal of Gastroenterology 2005；11 (9)：1392－1395

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、これらの動物モデルの病理所見では、大滴性脂肪肝のみが認められ、NASHに特有の肝細胞における小葉中心静脈周囲における炎症および肝細胞の風船様腫大は認められないことから、これらの動物モデルはヒトのNASHモデルとは言い難い。

従って、本発明の課題は、ヒトのNASH特有の病態を生じるNASHモデル動物及びその作製方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] そこで本発明者は、ヒトのNASH特有の病態を呈するモデル動物を作製すべく種々検討したところ、全く意外にも、高脂肪食を摂取させて肥満にさせるとともに、肝障害を誘発する薬剤（以下、肝障害剤という）を4回以上投与することにより、大滴性脂肪肝であり、肝臓の小葉内の中心静脈周囲に炎症があり、肝細胞が風船様に腫大しているという、ヒトのNASH特有の病態を有するモデル動物が作製できること、さらに当該モデル動物を用いれば被験物質のNASH予防治療効果が評価でき、NASH予防治療剤がスクリーニングできることを見出し、本発明を完成した。

[0008] 従って、本発明は、高脂肪食を摂取させ、肝障害剤を4回以上投与することにより得られるNASHモデル動物を提供するものである。

また、本発明は、高脂肪食を摂取させ、肝障害剤を4回以上投与することを特徴とするNASHモデル動物の作製方法を提供するものである。

また、本発明は、前記NASHモデル動物を用いることを特徴とする、NASH予防治療剤のスクリーニング方法を提供するものである。

さらに、本発明は、前記NASHモデル動物を用いることを特徴とする、被験物質のNASH予防治療効果の評価方法を提供するものである。

また、本発明は、大滴性脂肪肝であり、肝臓の小葉内の中心静脈周囲に炎症があり、肝細胞が風船様に腫大しているNASHモデル動物を提供するものである。

発明の効果

[0009] 本発明のNASHモデル動物は、大滴性脂肪肝であり、肝臓の小葉内の中心静脈周囲に炎症があり、肝細胞が風船様に腫大しているという、ヒトのNASH特有の症状を有することから、ヒトNASHモデルとして有用である。本発明のNASHモデル動物を用いれば、ヒトのNASHに有効な医薬や食品のスクリーニングが可能となる。また、被験物質のNASH予防治療効果の評価にも用いることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例1の高脂肪食及び四塩化炭素(0.1mL/kg体重)投与による肝細胞の組織学的変化を示す図である。A: Group 1(無処置対照群)。B: Group 2(高脂肪食対照群)。C: Group 3(高脂肪食+四塩化炭素1回投与群)。D~F: Group 9(高脂肪食+四塩化炭素8回投与群)。A: 正常な肝臓の組織像。B: 中心静脈周囲から小葉中間帯にかけて観察された肝細胞内の小脂肪滴。C: 高脂肪食対照群と同じく中心静脈周囲から小葉中間帯にかけて観察された小脂肪滴。D: 大滴性脂肪肝(矢頭)。E: 中心静脈周囲に観察された肝細胞の風船様腫大(矢印)。F: 中心静脈周囲におけるリンパ球主体の炎症細胞浸潤。*: 中心静脈。#: 門脈域。A~D, F: ×20。E: ×40。A~F: H-E染色。

[図2]実施例1の高脂肪食及び四塩化炭素(0.1mL/kg体重)投与によ

る線維化を示す図である。A : Group 1 (無処置対照群)。B : Group 2 (高脂肪食対照群)。C : Group 3 (高脂肪食+四塩化炭素 1 回投与群)。D : Group 9 (高脂肪食+四塩化炭素 8 回投与群)。A : 正常な肝臓の組織像。B、C : 中心静脈周囲、門脈域ともに線維化は確認されなかった。D : 中心静脈周囲において肝細胞を取り囲むように線維化が観察された。* 中心静脈。# : 門脈域。A ~ D : $\times 20$ 。M-T 染色。

[図3] A ~ C は実施例 2 の高脂肪食及び四塩化炭素 (0.25 mL/kg 体重) 8 回投与による線維化を示す図である。A : 大滴性脂肪肝 ; 小葉中心部から周辺部にかけて肝細胞内に大滴性脂肪が蓄積。B : 細胞質内の空胞は Sudan III 染色陽性 (脂肪)。C : 中心静脈周囲の軽微な線維化。* : 中心静脈。# : 門脈域。A : $\times 10$ 。B, C : $\times 20$ 。A : H-E 染色。B : Sudan III 染色 (凍結切片)。C : M-T 染色。

[図4] A ~ B は実施例 2 の高脂肪食及び四塩化炭素 (0.25 mL/kg 体重) 8 回投与による炎症症状を示す図である。A : 中心静脈周囲の炎症性細胞の浸潤。B : 中心静脈周囲に観察された肝細胞の風船様腫大 (矢印)。* : 中心静脈。A : $\times 20$ 。B : $\times 40$ 。A, B : H-E 染色。

[図5] 菌体試験群の肝臓における病理組織学的変化を示す図である。A、B : 通常食群 (正常肝)。C、D : コントロール群 (NASH)。E、F : *L. plantarum* 群 (小葉内炎症が軽微に抑制された所見)。G、H : *L. salivarius* 群 (小葉内炎症が軽微に抑制された所見)。A-H : $\times 20$ 。A、C、E、G : HE 染色。B、D、F、H : M-T 染色。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の NASH モデル動物は、高脂肪食を摂取させ、肝障害剤を 4 回以上投与することにより作製できる。

[0012] 用いられる動物は、特に制限されるものではなく、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、サル等を挙げることができるが、マウスを用いることが好ましい。マウスを用いる場合は、通常のマウスであればよく、雑種でも系統種でもよいが、実験動物として用いられているマウス、

例えばC 5 7 B L / 6系マウス、C 3 H系マウス、I C R系マウス、B A L B / c系マウス等が好ましい。

[0013] 高脂肪食としては、脂肪を20質量%以上含有する食餌であればよく、さらに脂肪を30～80質量%含有する食餌、特に脂肪を40～60質量%含有する食餌が好ましい。ここで脂肪としては、動物性脂肪、植物性脂肪にかかわらず、あらゆる種類の脂肪を用いることができ、コーン油、大豆油、なたね油、牛脂、豚脂を例示することができるが、特に牛脂、豚脂が好ましい。また高脂肪食中の脂肪以外の成分は、通常の食餌成分であればよく、タンパク質、炭水化物、ミネラル等を含んでもよい。

[0014] 高脂肪食の摂取期間は、肥満が生じるのに必要な期間であればよく、特に制限されないが、2週間以上が好ましく、さらに4週間以上、さらに4～16週間、特に8～16週間が好ましい。また高脂肪食摂取の開始時期は特に制限されないが、5週齢からが好ましい。また、高脂肪食は、動物に毎日自由摂取させればよい。

[0015] 用いられる肝障害剤は特に制限されるものではなく、例えば、四塩化炭素、ガラクトサミン、アセトアミノフェン、L P S（リポ多糖）等を挙げることができるが、特に四塩化炭素が好ましい。

[0016] 肝障害剤は、4回以上投与することが、動物にヒトN A S H特有の症状を発症させる点で重要である。投与回数は4～10回が好ましく、4～8回がより好ましい。投与回数が4回未満の場合には、肝臓に炎症や線維化が生じず、ヒトのN A S H特有の症状が発症しない。

[0017] 肝障害剤の投与手段は、腹腔投与、静脈投与、経口投与、皮下投与等、特に限定されるものではないが、皮下投与が好ましい。また投与量は、通常の肝障害を生じさせる量である1 m l / k g 体重 / 回よりも低用量であることが、ヒトN A S H特有の症状を発症させるために重要であり、具体的には、0.05～0.5 m L / k g 体重 / 回が好ましく、0.1～0.25 m L / k g 体重 / 回がより好ましい。0.05 m L / k g 体重 / 回よりも少ないと、N A S Hの症状を呈しない場合があり、0.5 m L / k g 体重 / 回よりも

多いと、ヒトNASH特有の症状を発症せず、通常の肝障害モデル動物となってしまう場合があるため好ましくない。また、初回の投与量は2回目以降よりも少ない方が死亡個体数が減少するため好ましい。肝障害剤の投与開始時期は、特に限定されるものではないが、高脂肪食摂取開始後2週間後からが好ましく、特に高脂肪食開始後4週間後からがより好ましく、さらに好ましくは8週間後からである。また、肝障害剤の投与間隔は、週に1～3回が好ましく、週に2回が特に好ましい。なお、肝障害剤投与期間中も高脂肪食は摂取し続けるのが好ましい。

[0018] より好ましい高脂肪食の摂取と肝障害剤投与のスケジュールは高脂肪食を8週間以上摂取させた後、高脂肪食の摂取を続けつつ、週に2回、肝障害剤を0.1～0.25 mL/kg体重/回、合計4回以上皮下投与するというものである。

[0019] 高脂肪食を摂取させ、肝障害剤を4回以上投与すれば、動物にヒトNASH特有の病理所見が現われる。その病態とは、大滴性脂肪肝であり、肝臓の小葉内の中心静脈周囲に炎症があり、風船様に腫大した肝細胞が認められることである。従来のNASHモデルでは、小葉内の中心静脈周囲における炎症及び風船様腫大と、大滴性脂肪肝との両方の病理所見が生じるものがなかった。従って、本発明のNASHモデル動物は、ヒトのNASHの病態モデルとして特に有用である。ここで、肝細胞の風船様腫大について、風船様腫大が生じる場所は特に限定されるものではないが、ヒトNASHの症状により類似しているという点から中心静脈周囲に生じていることが好ましい。また、脂肪肝とは、肝臓に大量の脂肪が沈着した状態のことをいい、より詳細には、大滴性脂肪肝（沈着）及び／又は小脂肪的蓄積（沈着）が認められる状態であるが、ヒトのNASHにより類似しているという点で、大滴性脂肪肝（沈着）が認められるものである必要がある。

[0020] また、本発明のNASHモデル動物は、さらに肝組織が線維化するという症状も呈していることが好ましく、線維化まで生じているNASHモデル動物は、NASHの診断基準としてよく知られているMatteoniらの分

類のNASH (Type 4) によく合致しており、より病態が進んだNASHのモデル動物となり得る。また、ヒトNASHの症状に類似しているという点から、線維化は中心静脈周囲に生じていることがより好ましい。

[0021] さらに、本発明のNASHモデル動物は、血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST (GOT))、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT (GPT))、遊離脂肪酸 (NEFA)、中性脂肪 (TG) から選ばれる1以上が通常飼料で飼育された動物に比べて高いものである。好ましくは、ASTは、200 U/L以上、より好ましくは500 U/L以上であり、さらに好ましくは1000 U/L以上である。ALTは300 U/L以上、より好ましくは800 U/L以上であり、さらに好ましくは1200 U/L以上である。遊離脂肪酸 (NEFA) は1000 μ Eq/L以上、より好ましくは1200 μ Eq/L以上である。中性脂肪は20 mg/dL以上、より好ましくは30 mg/dL以上である。ヒトNASH患者においても、上記の指標は健常人に比べて高いことが報告されており、本発明のNASHモデル動物は、ヒトNASHの症状に類似した病態を示すものである。

[0022] 本発明のNASHモデル動物は、ヒトのNASH特有の症状を呈しており、NASHの病態の研究用として有用であるとともに、NASH予防治療剤 (NASH予防治療薬、NASH予防治療用食品) などのスクリーニングに有用である。また、被験物質のNASH予防治療効果の評価にも有用である。

[0023] 動物に高脂肪食を摂取させ、肝障害剤の投与前、投与の間及び／又は投与後に被験物質を投与し、肝障害剤を4回以上投与した後、肝障害の程度を観察することにより、該被験物質のNASH予防治療効果が評価でき、NASH予防治療剤のスクリーニングができる。ここで、肝障害の程度は、被験物質非投与群との対比、及び／又は正常動物群 (通常食群、肝障害剤非投与群など) との対比により行うことができる。

[0024] 本発明のNASHモデル動物を用いたスクリーニング方法によりスクリー

ニングされたNASH予防治療剤の有効成分としては、特定の乳酸菌が挙げられる。そのような乳酸菌は、乳酸菌を $1 \times 10^{10} / \text{g}$ 含有する乳酸菌含有高脂肪食をマウスに12週間、1日当たりの摂取量が3gとなるように摂取させ、前記乳酸菌含有高脂肪食の投与開始から数えて9週目～12週目に四塩化炭素（初回：0.05ml/kg体重、2回目以降：0.1ml/kg体重）を週2回、合計8回皮下投与した際に、乳酸菌非投与のマウスに比べて血清中ALTの値が65%以上低下する乳酸菌である。より詳細には、後記表9に記載の菌末含有高脂肪食（菌末含有高脂肪食あたりの菌数：菌末含有高脂肪食1g中の菌数は以下の式で求める：培養液中の培養終了時の生菌数/凍結乾燥で製造された菌末量（g） $\times$ 菌末含有高脂肪食1g中の菌末の重量（g）。*L. Crispatus*： $2.47 \times 10^{12} / 1.754 \times 0.0005 = 7.04 \times 10^8 / \text{g}$ 、*B. Bifidum*： $2.74 \times 10^{12} / 1.55 \times 0.0005 = 8.84 \times 10^8 / \text{g}$ 、*L. Plantarum*： $7.36 \times 10^{12} / 2.737 \times 0.0005 = 1.34 \times 10^9 / \text{g}$ 、*L. Salivarius*： $2.4 \times 10^{12} / 2.995 \times 0.0005 = 4.01 \times 10^8 / \text{g}$ 、*S. thermophilus*： $4.6 \times 10^{11} / 2.444 \times 0.0005 = 9.41 \times 10^7 / \text{g}$ ）を12週間自由摂取させ（マウス1匹あたりの飼料の平均摂取重量 *L. Crispatus*：2.4g/日、*B. Bifidum*：2.4g/日、*L. Plantarum*：2.4g/日、*L. Salivarius*：2.4g/日、*S. thermophilus*：2.6g/日）、菌末含有高脂肪食の投与開始から数えて9週目～12週目に四塩化炭素（初回：0.05ml/kg体重、2回目以降：0.1ml/kg体重）を週2回、合計8回皮下投与する。四塩化炭素を最終投与してから24時間後に血液を採取し、血清中のALT値をトランスアミナーゼCII テストワコー（和光純薬）を用いて測定する。そのALT値が、乳酸菌非投与のマウス（表9に記載の高脂肪食を12週間投与し、前記と同様に四塩化炭素を8回投与したマウス）に比べて65%以上低下する乳酸菌である。この乳酸菌非投与群のマウス1匹あたりの飼料の平均摂取量

は、 $2.5 \text{ g} / \text{日}$ である。この時にマウスが摂取した乳酸菌の菌数は、いずれの菌種でも $1 \times 10^{10} / \text{g} \times 3 \text{ g} \times 7 \times 12 = 2.52 \times 10^{12}$ よりも少ないものであるが、これよりも少ない菌数で、乳酸菌非投与のマウスに比べてALTが65%以上低下する場合は、乳酸菌を $1 \times 10^{10} / \text{g}$ 含有する高脂肪食をマウスに12週間、1日当たりの摂取量が3gとなるように摂取させ、前記乳酸菌含有高脂肪食の投与開始から数えて9週目～12週目に四塩化炭素（初回： $0.05 \text{ ml} / \text{kg BW}$ 、2回目以降： $0.1 \text{ ml} / \text{kg BW}$ ）を週2回、合計8回皮下投与した際にも、乳酸菌非投与のマウスに比べて血清中ALTの値が65%以上低下するものである。また、乳酸菌非投与のマウスに比べて、血清中のASTの値が40%以上低下する乳酸菌を用いることがより好ましい。また好ましくは、血清中ALTの値が70%以上、より好ましくは80%以上低下するものである。また好ましくは、血清中ASTが50%以上低下し、さらに好ましくは80%以上低下するものである。また好ましくはNASH特有の症状である小葉内の炎症、線維化が改善し、優れたNASH予防治療作用を有するものである。また、これらの乳酸菌は、小葉内の抗炎症剤、抗線維化剤として用いることもできる。

[0025] このような性質を有する乳酸菌であれば、その種類は特に制限されるものではなく、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバチルス・ファーメンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバチルス・デルブルッキースブスピーシーズ、ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*)、ラクトバチルス・デルブルッキースブスピーシーズ、デルブルッキース (*Lactobacillus delbrue*

ckii subsp. delbrueckii)、ラクトバチルス・ジョンソニー (*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 等のラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus salivarius*) 等のストレプトコッカス属細菌、ラクトコッカス・ラクチスサブスピーシーズ、ラクチス (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、ラクトコッカス・ラクチスサブスピーシーズ、クレモリス (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、ラクトコッカス・ラフィノラクチス (*Lactococcus raffinolactis*) 等のラクトコッカス属細菌、エンテロコッカス・フェカーリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 等のエンテロコッカス属細菌、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・アドレスセンチス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・カテヌラータム (*Bifidobacterium catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・アングラータム (*Bifidobacterium angulatum*)、ヒトの腸内から分離される由来を持つビフィドバクテリウム・ガリカム (*Bifidobacterium gallicum*)、食品に利用されているビフィドバクテリウム・ラクチス (*Bifidobacte*

rium lactis)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (Bifidobacterium animalis) 等の乳酸菌が挙げられる。これらの中でも特に、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ラクトバチルス・プランタラム、ラクトバチルス・サリバリウス、ストレプトコッカス・サーモフィルスからなる群から選ばれる1種以上が好ましく、さらにビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT 10347 (FERM BP-10613: 寄託日 平成17[2005]年6月23日)、ラクトバチルス・プランタラム YIT 0132 (FERM BP-11349: 寄託日 平成22[2010]年2月24日)、ラクトバチルス・サリバリウス YIT 0432 (FERM P-22129: 寄託日 平成23[2011]年6月15日)、ストレプトコッカス・サーモフィルス YIT 2001 (FERM BP-7538: 寄託日 平成13[2001]年1月31日) からなる群から選ばれる1種以上が好ましい。また、これらの菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (NITE-IPOD) (〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に寄託されている。なお、特表2005-512590号公報に記載のストレプトコッカス・サーモフィラス・エス・エス・ピー・サリヴァリウス (CD8株) (DSM 14667) は、現在の分類では、ストレプトコッカス・サリバリウスに分類されるべきものであり、ストレプトコッカス・サーモフィルスとは別種の菌である。

[0026] なお、乳酸菌の使用形態は、例えば、細菌菌体 (生菌) 及び当該細菌菌体の処理物から選ばれる1以上を挙げることができる。当該処理物としては、常法の処理による処理物であれば特に限定されず、例えば、加熱菌体 (死菌体)、その凍結乾燥物、それらを含有する培養物、細菌の超音波等による破砕液、細菌の酵素処理液、それらを濾過や遠心分離等の固液分離手段によって分離した固体残渣等; 細胞壁を酵素若しくは機械的手段により除去した処理液、当該処理液の濃縮物、それらの希釈物、それらの乾燥物等; 細菌を界面活性剤等によって溶解した後、エタノール等によって沈殿させて得られる

核酸含有画分；前記細菌の超音波等による破碎液や細胞の酵素処理液等に対し、例えば各種クロマトグラフィーによる分離などの分離・精製処理を行ったもの等が挙げられる。

前記死菌体は、例えば、加熱処理、抗生物質等の薬物による処理、ホルマリン等の化学物質による処理、紫外線による処理、 γ 線等の放射線による処理により得ることができる。後述のように、乳酸菌の培養終了時の生菌数を一定量含有するものであれば、生菌・死菌・その他の菌体処理物を問わず、有効性が期待できる。

[0027] また、本発明によれば、N A S H予防治療のための前記乳酸菌が提供できる。また、N A S H予防治療剤製造のための前記乳酸菌の使用が提供できる。またN A S H予防治療のための前記乳酸菌の使用が提供できる。さらに、前記乳酸菌の有効量を摂取することを特徴とするN A S H予防治療方法が提供できる。

[0028] また、本発明のN A S H予防治療剤は、医薬品として用いるだけでなく、飲食品、医薬部外品、ペットフード等として用いることもできる。

[0029] また、本発明のN A S H予防治療剤の有効成分である乳酸菌を使用する際の投与量に厳格な制限はない。対象者や適用疾患等の様々な使用態様によって得られる効果が異なるため、適宜投与量を設定することが望ましいが、N A S H予防治療作用の点で、乳酸菌の菌数を、 1×10^9 以上を1日量として含有する量が好ましく、 $5 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{12}$ を1日量として含有する量より好ましく、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ を1日量として含有する量がさらに好ましい。なお、本発明における菌数は乳酸菌培養終了時の生菌数に基づいて算出する。

実施例

[0030] 次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

[0031] 実施例 1

(1) モデル動物の作製

作製したN A S Hモデルマウスを以下に示した（表1）。

高脂肪食（牛脂40%混餌飼料）を自由摂取させて8週間飼育した雄のC57BL/6N系マウスに下記の条件で四塩化炭素（0.1 mL/kg体重）を皮下投与し、四塩化炭素を最後に投与してから下記の時間が経過した後、エーテル麻酔下で放血屠殺した。また、各群5匹から肝臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。また表2に高脂肪食の組成を示した。

Group 1とGroup 9については、放血屠殺する直前に、腹部大動脈から採血した。得られた血液を1時間以上氷上にて放置した後、3000 rpmで15分間遠心分離を行い、血清を調製した。

なお、四塩化炭素を2回以上投与する場合は、1週間の最大投与回数が2回となるようにした。

[0032] [表1]

実験群構成		
群	処理（屠殺時間）	動物数
Group 1	無処置対照群：通常飼料	5
Group 2	高脂肪食対照群	5
Group 3	高脂肪食+四塩化炭素 1回投与（投与後 24 時間）	5
Group 4	高脂肪食+四塩化炭素 1回投与（投与後 48 時間）	5
Group 5	高脂肪食+四塩化炭素 1回投与（投与後 72 時間）	5
Group 6	高脂肪食+四塩化炭素 2回投与（投与後 24 時間）	5
Group 7	高脂肪食+四塩化炭素 4回投与（投与後 24 時間）	5
Group 8	高脂肪食+四塩化炭素 6回投与（投与後 24 時間）	5
Group 9	高脂肪食+四塩化炭素 8回投与（投与後 24 時間）	5

[0033]

[表2]

高脂肪食の組成

原材料名	重量 (g)
コーンスターチ	199.5
カゼイン	200
スクロース	100
牛脂	400
セルロースパウダー	50
mineral mix (AIN-93G-MX)	35
vitamin mix (AIN-93G-VX)	10
L-cystine	3
重酒石酸コリン	2.5
合計	1000

[0034] (2) 病理組織学的観察

固定後の肝臓を常法により切り出し、パラフィン包埋後、パラフィンブロックを約4 μ mの厚さに薄切し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を施して、光学顕微鏡にて観察した。さらに膠原線維の有無を確認するためにパラフィン切片にMasson's trichrome (M-T) 染色を実施した。

(3) 血液生化学性状の測定

7170型自動分析装置((株)日立製作所)を用いて、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST (GOT))、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT (GPT))、遊離脂肪酸(NEFA)、中性脂肪(TG)を測定した。

(4) NASHの診断基準

現在、臨床におけるNASHの病理組織学的診断基準には、Matteoniらの分類(Gastroenterology 1999, 116:1413-1419)、Kleinerらの分類(Hepatology 2005, 41:1313-1321)、及びBruntrらの分類(American Journal of Gastroenterology 1999, 94:2467-2474)がある。米国肝臓学会 Single Topic Conference 2002ではNASHの必須所

見として大滴性脂肪肝、小葉内炎症、肝細胞の風船様腫大をあげ、NAFLDのType 3 (Matteoniらの分類 (Gastroenterology 1999, 116:1413-1419)) 以上をNASHと組織診断している (表3)。また、日本肝臓学会でも組織診断基準にMatteoniらの分類を奨励している。これらのことから今回、MatteoniらによるNAFLDの分類をNASHの診断基準として用いた。

すなわち、NASHは大滴性脂肪肝、小葉内炎症および肝細胞の風船様腫大を必須とし (表3のType 3)、これらの症状に加えて、マロリー小体又は線維化が認められる場合はType 4に分類される。

また、臨床でのヒトNASHでは大滴性脂肪肝、小葉内炎症、風船様腫大及び／又は線維化が中心静脈周囲で生じていることが報告されていることから、上記の症状が中心静脈周囲で生じている場合に、ヒトNASHの症状により類似した病態ということが出来る。

[0035] [表3]

Matteoni による NAFLD の分類		
Type 1	脂肪肝 (大滴性) のみ	NAFLD
Type 2	脂肪肝 (大滴性) + 小葉内の炎症	NAFLD
Type 3	Type 2 + 肝細胞の風船様腫大	NASH
Type 4	Type 3 + マロリー小体又は線維化	NASH

[0036] (5) 結果

(a) 高脂肪食対照群 (Group 2) の病理組織的变化

高脂肪食対照群 (Group 2) では中心静脈周囲から小葉中間帯において、肝細胞に小脂肪滴が認められた (図1B)。小脂肪滴は無処置対照群では観察されなかったことから高脂肪食の投与に起因した変化と考えられた。

[0037] (b) 高脂肪食+四塩化炭素1回投与後の経時的な病理組織的变化 (Group 3~5)

高脂肪食+四塩化炭素の1回投与群 (Group 3~5) において、高脂肪食対照群 (Group 2) と同様に、小脂肪滴が中心静脈周囲から小

葉中間帯において認められた（図1C）。しかし、これらの群においては、NAFLDに観察される大滴性脂肪肝、及びNASHに観察される肝細胞の風船様細胞や線維化などの所見は確認されなかった（表4、5、図1C）。

[0038] (c) 高脂肪食+四塩化炭素の投与回数増加に伴う病理組織的变化（Group 6～9）

高脂肪食+四塩化炭素の複数回投与群（Group 6～9）では大滴性脂肪肝が認められた（図1D）。この大滴性脂肪肝は四塩化炭素の投与回数の増加に伴い、発生頻度が高く、かつ強くなる傾向が認められた（表4、5）。一方、中心静脈周囲における小脂肪滴は減少する傾向が認められた（表4、5）。これまでに大滴性脂肪肝及び小脂肪滴の相互関係についての報告はないが、大滴性脂肪肝は四塩化炭素の複数回投与に起因した変化であると考えられた。さらに四塩化炭素の複数回投与群（Group 6～9）において肝細胞の風船様腫大が中心静脈周囲に5例中2～3例の割合で各群に認められた（図1E）。

[0039] また、高脂肪食+四塩化炭素を4回以上投与した群（Group 7～9）では、中心静脈周囲においてリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤（炎症）及び軽度の線維化が観察された（図1F、図2D）。炎症細胞浸潤（炎症）の発生頻度は、投与回数に比例して増加する傾向が認められた（表4、5）。線維化は中心静脈周辺かつ肝細胞を取り囲むように認められ（図2D）、5例中3～4例の割合で各群に認められた（表4、5）。しかし、ヒトの肝硬変で報告されているようなbridging fibrosisまで進行した線維化像はすべての群において認められなかった。

[0040] 病理組織学的検査の結果、高脂肪食+四塩化炭素を1回投与した群（Group 3～5）においては、肝細胞内に小脂肪滴の蓄積のみ認められたが、高脂肪食+四塩化炭素を4回以上投与した群においては、臨床でのヒトNASHで報告されている大滴性脂肪肝、中心静脈周囲の炎症細胞浸潤（炎症）、中心静脈周囲の肝細胞の風船様腫大及び中心静脈周囲の線維化が観察された。高脂肪食+四塩化炭素を4回以上投与した群のうち、高脂肪食+四塩

化炭素の4回投与群（Group 7）及び高脂肪食＋四塩化炭素の6回投与群（Group 8）では5例中1例、高脂肪食＋四塩化炭素の8回投与群（Group 9）では5例中3例が、Matteoniらが分類したNASHの診断基準（表3のType 4）に一致することが明らかになった。

[0041] （d）血液生化学性状（Group 1、9）

血清中のAST、ALT、遊離脂肪酸、中性脂肪を測定したところ、高脂肪食＋四塩化炭素の8回投与群（Group 9）で通常食群（Group 1）に対して有意に高かった（表6）。

AST、ALT、遊離脂肪酸、中性脂肪は、ヒトNASH患者でも健常人に比べて上昇していることが報告されており、ヒトNASHと同様の結果が得られた。

[0042] 今回の結果から、マウスでは高脂肪食の単独投与のみではNASH様病変は誘発されず、高脂肪食の給餌かつ四塩化炭素の単回投与及び2回投与の場合においても、NASH様病変は誘発されないことが明らかとなった。また、四塩化炭素を単回投与してから72時間経過させても、症状が進行することはなく、NASH様病変は誘発されないことが明らかとなった。

一方、四塩化炭素を4回以上投与することでNASH様病変が誘発されること、さらに四塩化炭素の投与回数の増加によりNASH様病変が強かつ高頻度に誘導されることが明らかとなった。

また、四塩化炭素8回投与群では、血液生化学性状もヒトNASHと類似した結果を示すことが明らかとなった。

NASHの発生機序については十分明らかにされておらず、複数回に渡って肝臓に障害を与えることでNASHが誘発されるとの報告もない。今回の結果から、肝障害剤を、通常、肝障害を生じさせる量である1ml/kg体重/回よりも低用量で、かつ4回以上投与することにより、NASH様病変が誘発されることが明らかとなった。NASHの発生機序が未だ不明確な点に鑑みると、NASH様病変が前記の方法により誘発される理由は、不明で

ある。

[0043] [表4]

病理組織所見（総括表）													
	大滴性脂肪肝				小脂肪滴蓄積				小葉内炎症				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Group 1	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	
Group 2	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	
Group 3	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	
Group 4	5	0	0	0	0	0	1	4	5	0	0	0	
Group 5	5	0	0	0	0	0	1	4	5	0	0	0	
Group 6	3	2	0	0	0	0	4	1	5	0	0	0	
Group 7	1	4	0	0	0	0	5	0	4	1	0	0	
Group 8	0	0	5	0	0	2	3	0	3	2	0	0	
Group 9	0	1	4	0	0	3	2	0	2	3	0	0	

	肝細胞の風船様腫大				線維化				
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Group 1	5	0	0	0	5	0	0	0	
Group 2	5	0	0	0	5	0	0	0	
Group 3	5	0	0	0	5	0	0	0	
Group 4	5	0	0	0	5	0	0	0	
Group 5	5	0	0	0	5	0	0	0	
Group 6	2	3	0	0	5	0	0	0	
Group 7	3	2	0	0	2	3	0	0	
Group 8	3	2	0	0	2	3	0	0	
Group 9	2	3	0	0	1	3	1	0	

－：変化なし、＋：軽度、++：中程度、+++：重度

[0044]

[表5]

病理組織所見（個別表）						
群	No.	大滴性脂肪肝	小脂肪滴蓄積	小葉内炎症	肝細胞風船様腫大	線維化
Group 1	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
Group 2	1	-	+++	-	-	-
	2	-	+++	-	-	-
	3	-	+++	-	-	-
	4	-	+++	-	-	-
	5	-	+++	-	-	-
Group 3	1	-	+++	-	-	-
	2	-	+++	-	-	-
	3	-	+++	-	-	-
	4	-	+++	-	-	-
	5	-	+++	-	-	-
Group 4	1	-	+++	-	-	-
	2	-	++	-	-	-
	3	-	+++	-	-	-
	4	-	+++	-	-	-
	5	-	+++	-	-	-
Group 5	1	-	+++	-	-	-
	2	-	+++	-	-	-
	3	-	++	-	-	-
	4	-	+++	-	-	-
	5	-	+++	-	-	-
Group 6	1	-	++	-	-	-
	2	+	++	-	+	-
	3	-	++	-	+	-
	4	-	++	-	+	-
	5	+	+++	-	-	-
Group 7	1	+	++	-	-	+
	2	-	++	-	-	-
	3	+	++	-	+	+
	4	+	++	-	-	-
	5	+	++	+	+	+
Group 8	1	++	+	-	-	-
	2	++	++	+	-	+
	3	++	++	+	+	+
	4	++	+	-	-	-
	5	++	++	-	+	+
Group 9	1	++	+	+	+	+
	2	++	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	++
	4	++	++	-	-	+
	5	++	++	+	+	+

- : 変化なし、+ : 軽度、++ : 中程度、+++ : 重度

[0045]

[表6]

血液生化学性状

	Group 1	Group 9
	無処置対照群	高脂肪食+四塩化炭素 8 回投与群
AST (U/L)	89.8±31.6	815±941 *
ALT (U/L)	38.9±22.0	1066±1190 *
遊離脂肪酸 (μEq/L)	847.1±79.8	1142±191 *
中性脂肪 (mg/dL)	11.9±1.9	31.7±11.5 *

[0046] 実施例 2

四塩化炭素の投与量を 0.25 mL/kg 体重とした以外は、実施例 1 と同様に四塩化炭素皮下投与 8 回（2 回/週）を行った。

その結果、表 7 に示す病理組織所見、図 3、4 に示す肝臓症状を有する NASH モデルマウスを得た。このマウスは、中心静脈周囲に炎症を呈し、線維化を生じており、また、大滴性脂肪肝、肝細胞の風船様腫大を呈した。

[0047] [表7]

病理組織所見（個別表）

群	動物番号	大滴性脂肪肝	小脂肪滴蓄積	小葉内炎症	肝細胞風船様腫大	線維化
A	1	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—
B	1	++	+	+	+	＋（中心静脈周囲）
	2	++	+	+	+	＋（中心静脈周囲）
	3	+	+	+	+	＋（中心静脈周囲）

A：コントロール群（通常飼料）

B：高脂肪食+四塩化炭素 0.25 mL/kg 体重群

[0048] 実施例 3

（1）試験群および試験スケジュール

以下の実験は、C57BL/6N 系統、7 週齢のマウスを用いて行った。通常食群は、一般的な飼育飼料である AIN93G を 12 週間摂取させた試験群である。コントロール群には NASH 発症のため、12 週間の高脂肪食摂取と 9～12 週目にかけて四塩化炭素（初回：0.05 mL/kg 体重

、2回目以降：0.1 ml/kg体重）を週2回、合計8回皮下投与した。

各乳酸菌投与群には、コントロール群の高脂肪食をベースとして各凍結乾燥菌末を0.05%混餌した飼料を摂取させた（飼料中の菌数：菌末は培養液を凍結乾燥して製造した。飼料1g中の菌数は以下の式で求める：培養液中の培養終了時の生菌数/凍結乾燥で製造された菌末量（g）×飼料1g中の菌末の重量（g）。L. Crispatus： $2.47 \times 10^{12} / 1.754 \times 0.0005 = 7.04 \times 10^8 / g$ 、B. Bifidum： $2.74 \times 10^{12} / 1.55 \times 0.0005 = 8.84 \times 10^8 / g$ 、L. Plantarum： $7.36 \times 10^{12} / 2.737 \times 0.0005 = 1.34 \times 10^9 / g$ 、L. Salivarius： $2.4 \times 10^{12} / 2.995 \times 0.0005 = 4.01 \times 10^8 / g$ 、S. thermophilus： $4.6 \times 10^{11} / 2.444 \times 0.0005 = 9.41 \times 10^7 / g$ ）。四塩化炭素の投与方法および投与タイミングはコントロール群と同じである。AIN93G、高脂肪食および乳酸菌菌末を含有した高脂肪食の組成は表9に記載した。各試験ともに飼料および飲料水は自由に摂取させた（マウス1匹あたりの飼料の平均摂取重量 通常食：2.4 g/日、コントロール：2.5 g/日、L. Crispatus：2.4 g/日、B. Bifidum：2.4 g/日、L. Plantarum：2.4 g/日、L. Salivarius：2.4 g/日、S. thermophilus：2.6 g/日）。

四塩化炭素を最終投与してから24時間後に剖検を行ない、血液および臓器を採取した。血液から血清を調製しAST、ALTの測定に用いた。また採取した肝臓は、病理組織解析用として10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬し保存した。

[0049]

[表8]

試験群	YIT No.	N	飼料	菌末 投与量 (%)	四塩化炭素 投与
通常食		4	AIN93G	-	-
コントロール		8	高脂肪食	-	+
<i>L. crispatus</i>	YIT 0346	8	菌末含有高脂肪食	0.05	+
<i>B. bifidum</i>	YIT 10347	8	菌末含有高脂肪食	0.05	+
<i>L. plantarum</i>	YIT 0132	8	菌末含有高脂肪食	0.05	+
<i>L. salivarius</i>	YIT 0432	8	菌末含有高脂肪食	0.05	+
<i>S. thermophilus</i>	YIT 2001	8	菌末含有高脂肪食	0.05	+

[0050] [表9]

	AIN93G	高脂肪食	菌末含有高脂肪食
コーンスターチ (g)	397.5	199.5	199
カゼイン (g)	200	200	200
α コーンスターチ (g)	132	0	0
スクロース (g)	100	100	100
コーン油 (g)	70	0	0
牛脂 (g)	0	400	400
セルロースパウダー (g)	50	50	50
AIN93G ミネラルミックス (g)	35	35	35
AIN93 ビタミンミックス (g)	10	10	10
L-シスチン (g)	3	3	3
重酒石酸コリン (g)	2.5	2.5	2.5
乳酸菌菌末 (g)	-	-	0.5
合計 (g)	1000	1000	1000

[0051] (2) 血清中のAST、ALT値の測定

血清中のAST、ALT値はトランスアミナーゼCII テストワコー（和光純薬）を用いて測定した。操作はマニュアルに従って行なった。

[0052] (3) 病理組織解析

各試験群、3～4個体の肝臓を病理組織解析に用いた。ホルマリン溶液にて固定した肝臓を常法により切り出し、パラフィン包埋後、パラフィンブロックを約4 μ mの厚さに薄切し、Hematoxylin-Eosin (H

E) 染色を施して、光学顕微鏡にて観察した。さらにコラーゲン線維を証明するためにパラフィン切片にMasson's trichrome (MT) 染色を実施した。

病理組織の診断項目として小葉内炎症、線維化を調べた。

病態のグレーディングは、肝臓切片の全視野を観察して、病態が認められない：－（陰性）、病態が全視野の20％以下：±（極軽度）、病態が全視野の20～50％：＋（軽度）、病態が全視野の50～80％：++（中程度）、病態が全視野の80％以上：+++（重度）とした。

[0053] (4) 結果

(a) 血清中のAST, ALT値の測定

血清中のAST値を測定したところ、*L. plantarum*、*L. salivarius*群では有意な低下が認められた（*L. plantarum* $p=0.026$ 、*L. salivarius* $p=0.021$ ）。*B. bifidum*群では低下の傾向が認められた（ $p=0.07$ ）。*S. thermophilus*群でも低下の傾向が認められた。また血清中のALT値を測定したところ、*B. bifidum*、*L. plantarum*、*L. salivarius*群では有意な低下が認められた（*B. bifidum* $p=0.031$ 、*L. plantarum* $p=0.012$ 、*L. salivarius* $p=0.008$ ）。*S. thermophilus*群では低下の傾向が認められた（ $p=0.054$ ）。しかし、*L. crispatus*群については、AST、ALTともに顕著な低下は認められなかった。ASTの結果を表10に示す。ALTの結果を表11に示す。

[0054] [表10]

AST (U/L)

	通常食	コントロール	<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>S. thermophilus</i>
平均	29.39	1562.29	1041.36	421.27	182.67	217.32	659.71
低減率	—	—	33%	73%	88%	86%	57%

低減率＝（コントロール－菌体投与群）／コントロール×100

[0055] [表11]

ALT (U/L)

	通常食	コントロール	<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>S. thermophilus</i>
平均	11.52	1341.19	958.89	334.57	190.25	190.63	435.11
低減率	—	—	29%	75%	85%	85%	67%

低減率 = (コントロール - 菌体投与群) / コントロール × 100

[0056] (b) 病理組織解析

肝臓の病理組織解析を行ない、菌体投与が肝臓におよぼす影響を調べた。その結果、*B. bifidum*群、*L. plantarum*群、*L. salivarius*群の一部の個体では小葉内炎症がコントロール群に比べて軽微であった。また、*L. plantarum*群、*S. thermophilus*の一部の個体では、線維化がコントロール群に比べて軽微であった。結果を図5、表12に示す。

[0057] [表12]

実験群	No	小葉内炎症	線維化
通常食	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	-
コントロール	1	+	+
	2	+	+
	3	++	+
	4	+	++
Bb	1	±	+
	2	±	+
	3	+	+
Lp	1	+	+
	2	+	±
	3	±	+
Ls	1	+	+
	2	+	+
	3	±	+
St	1	+	±
	2	+	+
	3	+	+

-:陰性、±:軽微、+:軽度、++:中等度、+++:重度

Bb: *B. bifidum*, Lp: *L. plantarum*, Ls: *L. salivarius*, St: *S. thermophilus*.

[0058] マウス1匹が一日あたりに摂取する菌数は、*B. Bifidum*: 2.12×10^9 、*L. Plantarum*: 3.2×10^9 、*L. Salivarius*: 9.62×10^8 、*S. thermophilus*: 2.45×10^8 である。使用したマウスの体重は約37gであるから、マウス摂取量は、*B. Bifidum*: $5.73 \times 10^{10} / \text{kg BW} / \text{日}$ 、*L. Plantarum*: $8.65 \times 10^{10} / \text{kg BW} / \text{日}$ 、*L. Salivarius*: $2.6 \times 10^{10} / \text{kg BW} / \text{日}$ 、*S. thermophilus*: $6.62 \times 10^9 / \text{kg BW} / \text{日}$ である。アメリカ食品医薬品局 (FDA) のガイダンスに従い、マウス摂取量をヒト摂取量に換算すると (計算方法: ヒト投与量 ($/ \text{kg BW} / \text{日}$) = マウス投与量 ($/ \text{kg BW} / \text{日}$) $\times 3$ (マウス体表面換算係数) $/ 37$ (ヒト体表面換算係数))、ヒト摂取量は、*B. Bifidum*: $4.65 \times 10^9 / \text{kg BW} / \text{日}$ 、*L. Plantarum*: $7.01 \times 10^9 / \text{kg BW} / \text{日}$ 、*L. Salivarius*: $2.11 \times 10^9 / \text{kg BW} / \text{日}$ 、*S. thermophilus*: $5.37 \times 10^8 / \text{kg BW} / \text{日}$ である。ヒトの体重を70kgとすると、マウスと同様の効果を奏するために、ヒト1人が一日に摂取すべき菌数は、*B. Bifidum*: 3.26×10^{11} 、*L. Plantarum*: 4.91×10^{11} 、*L. Salivarius*: 1.48×10^{11} 、*S. thermophilus*: 3.76×10^{10} である。これはいずれも特表2005-512590号公報に記載の1兆8000億 (1.8×10^{12}) よりも少ない。したがって、本願発明の乳酸菌は、特表2005-512590号公報に記載の乳酸菌よりも少ない菌数で、より高い効果を奏するという有利な点をもつものである。

[0059] 以上の結果から、NASHモデル動物を用いて、NASH予防治療剤のスクリーニングができることが示され、被験物質のNASH予防治療効果の評価も可能であることが示された。

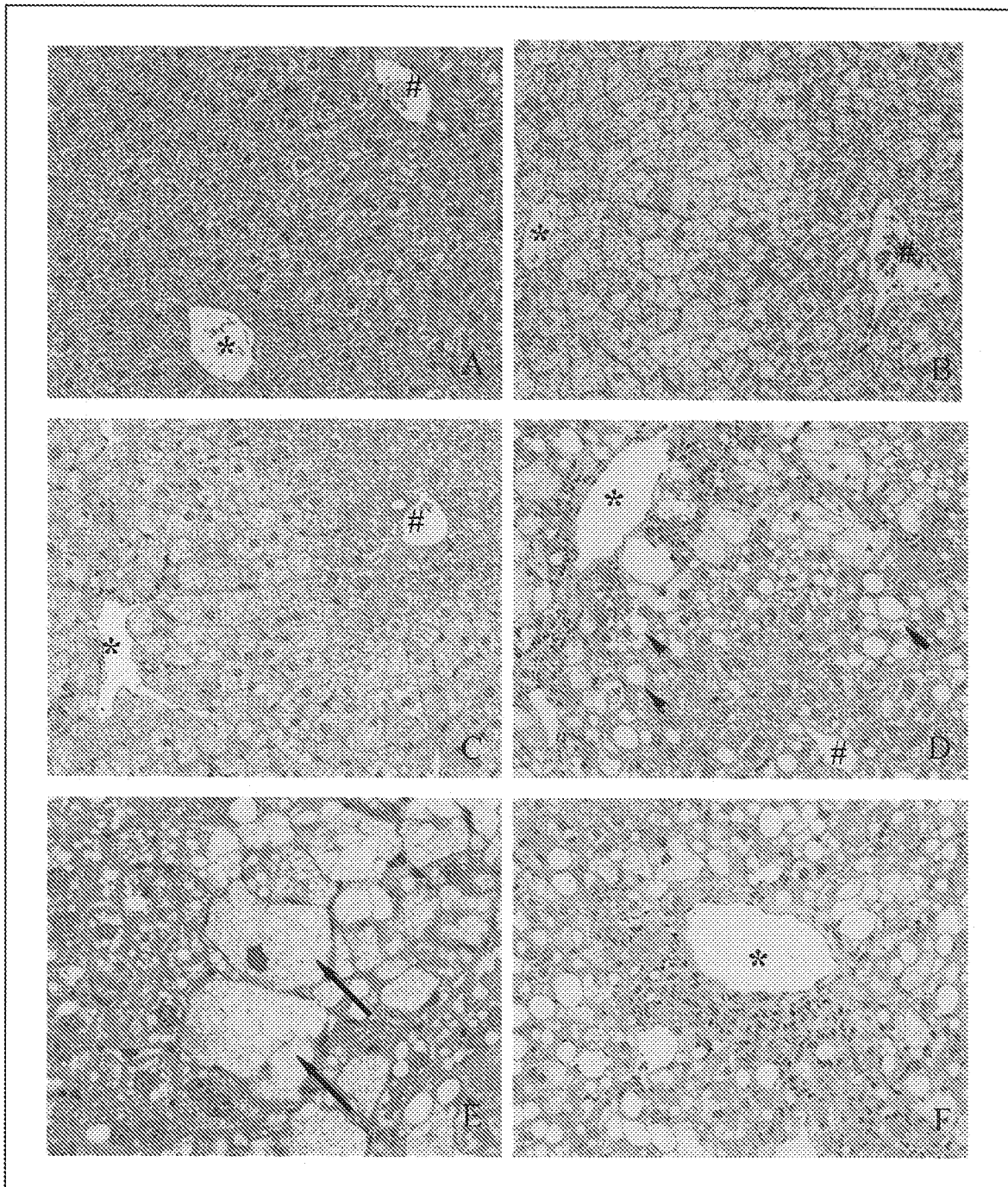
請求の範囲

- [請求項1] 高脂肪食を摂取させ、肝障害剤を4回以上投与することにより得られるNASHモデル動物。
- [請求項2] 高脂肪食が、脂肪を40～60質量%含むものである請求項1記載のNASHモデル動物。
- [請求項3] 肝障害剤の投与量が0.05～0.5mL/kg体重/回である請求項1又は2記載のNASHモデル動物。
- [請求項4] 肝障害剤の投与回数が4～8回である請求項1～3のいずれか1項記載のNASHモデル動物。
- [請求項5] 肝障害剤の投与が皮下投与である請求項1～4のいずれか1項記載のNASHモデル動物。
- [請求項6] 高脂肪食の摂取期間が、2週間以上である請求項1～5のいずれか1項記載のNASHモデル動物。
- [請求項7] 肝障害剤が、四塩化炭素である請求項1～6のいずれか1項記載のNASHモデル動物。
- [請求項8] NASHモデル動物がマウスである請求項1～7のいずれか1項記載のNASHモデル動物。
- [請求項9] 大滴性脂肪肝であり、肝臓の小葉内の中心静脈周囲に炎症があり、肝細胞が風船様に腫大している請求項1～8のいずれか1項に記載のNASHモデル動物。
- [請求項10] 肝組織が線維化している請求項1～9のいずれか1項記載のNASHモデル動物。
- [請求項11] 血清中のAST、ALT、遊離脂肪酸、中性脂肪から選ばれる1以上が、通常飼料で飼育された動物に比べて高いものである請求項1～10のいずれか1項記載のNASHモデル動物。
- [請求項12] 血清中のASTが200U/L以上であり、ALTが300U/L以上であり、遊離脂肪酸が1000μEq/L以上であり、中性脂肪が20mg/dL以上である請求項1～11のいずれか1項記載のN

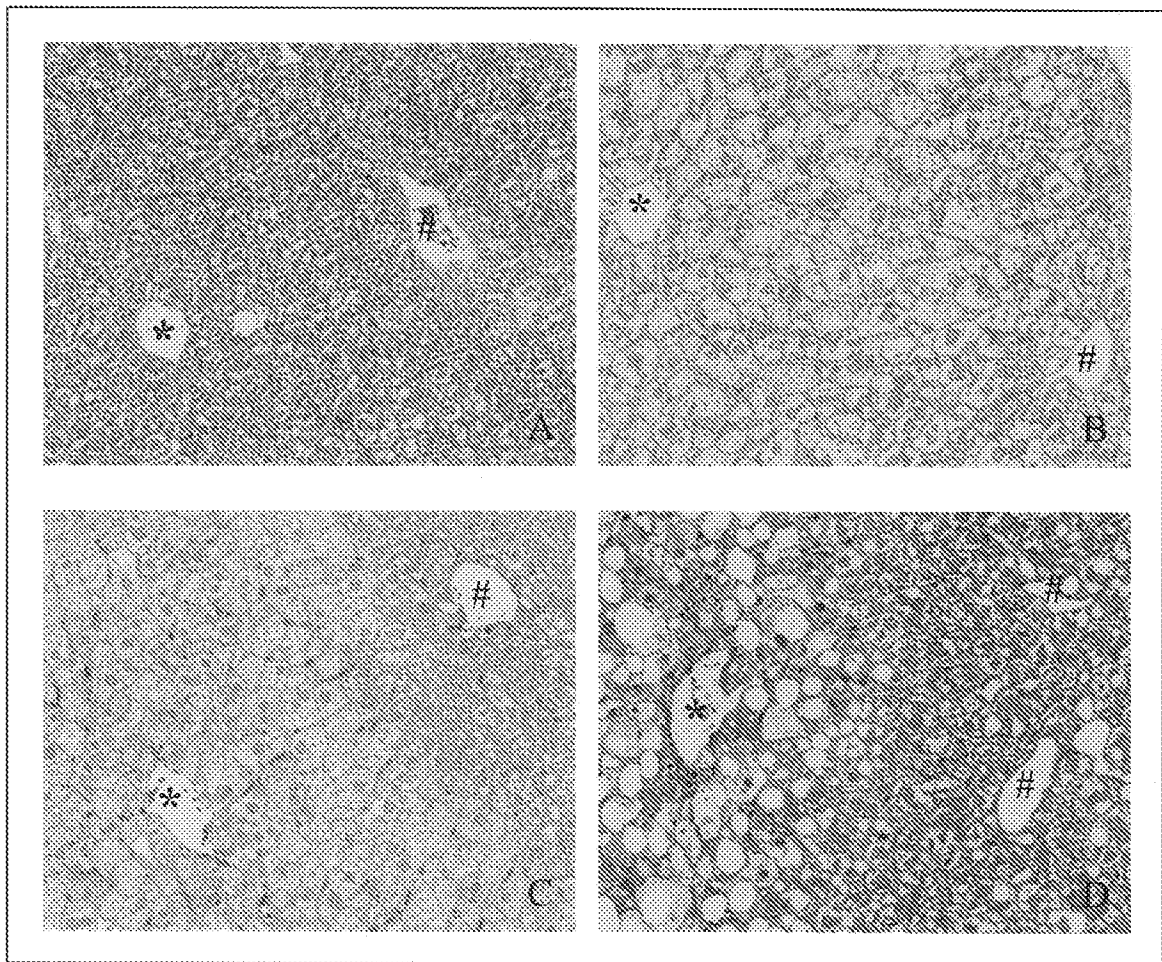
A S Hモデル動物。

- [請求項13] 大滴性脂肪肝であり、肝臓の小葉内の中心静脈周囲に炎症があり、肝細胞が風船様に腫大しているN A S Hモデル動物。
- [請求項14] 高脂肪食を摂取させ、肝障害剤を4回以上投与することを特徴とするN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項15] 高脂肪食が、脂肪を40～60質量%含むものである請求項14記載のN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項16] 肝障害剤の投与量が0.05～0.5 mL/kg体重/回である請求項14又は15記載のN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項17] 肝障害剤の投与回数が4～8回である請求項14～16のいずれか1項記載のN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項18] 肝障害剤の投与が皮下投与である請求項14～17のいずれか1項記載のN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項19] 高脂肪食の摂取期間が、2週間以上である請求項14～18のいずれか1項記載のN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項20] 肝障害剤が、四塩化炭素である請求項14～19のいずれか1項記載のN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項21] N A S Hモデル動物がマウスである請求項14～20のいずれか1項記載のN A S Hモデル動物の作製方法。
- [請求項22] 請求項1～13のいずれか1項記載のN A S Hモデル動物を用いることを特徴とする、N A S H予防治療剤のスクリーニング方法。
- [請求項23] 請求項1～13のいずれか1項記載のN A S Hモデル動物を用いることを特徴とする、被験物質のN A S H予防治療効果の評価方法。

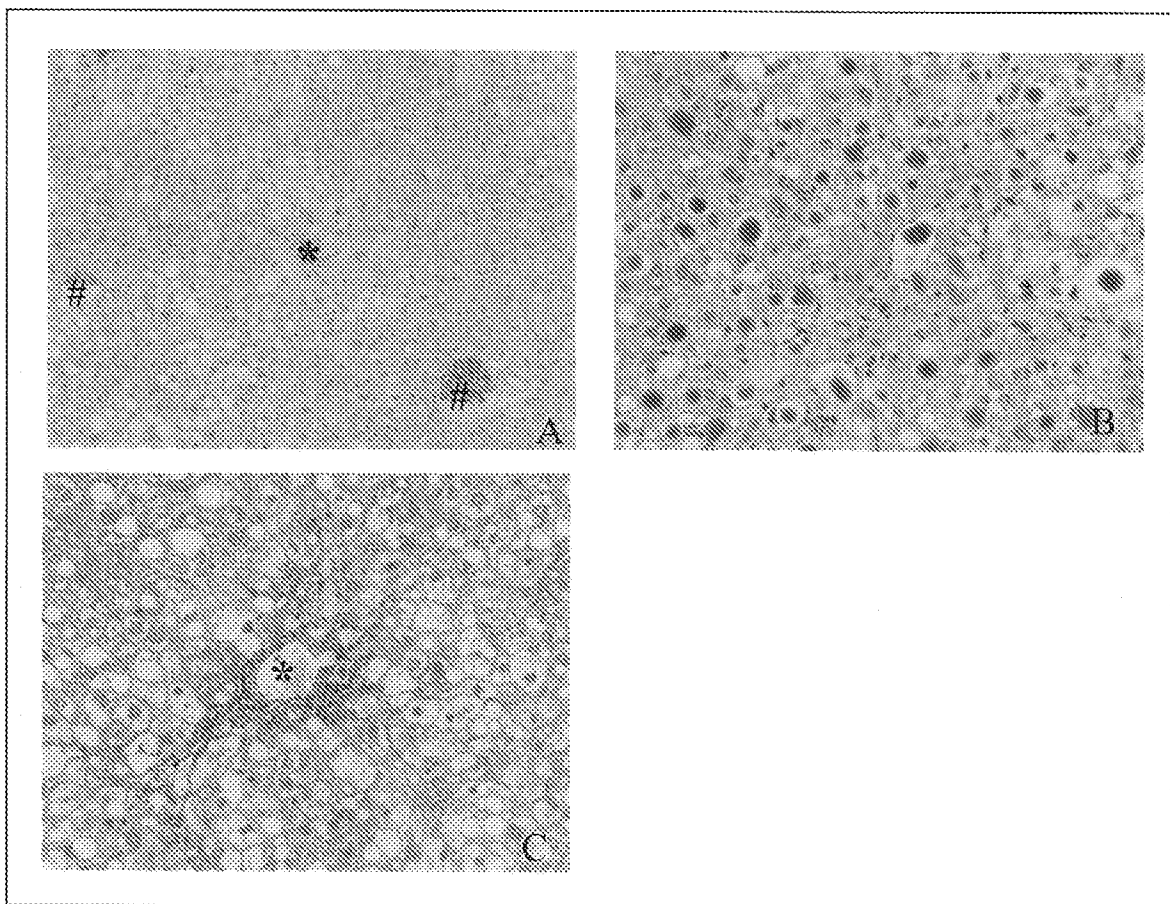
[図1]



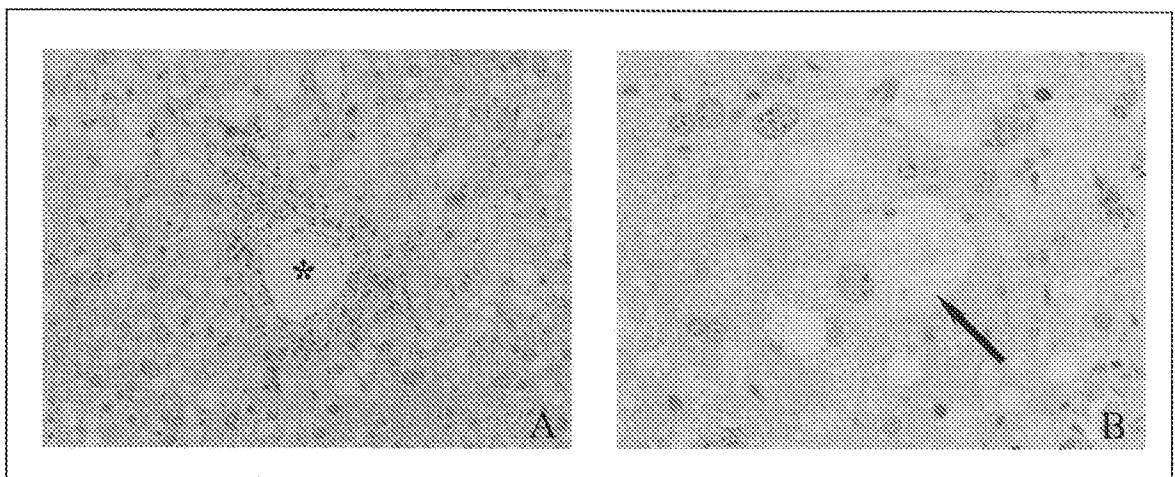
[図2]



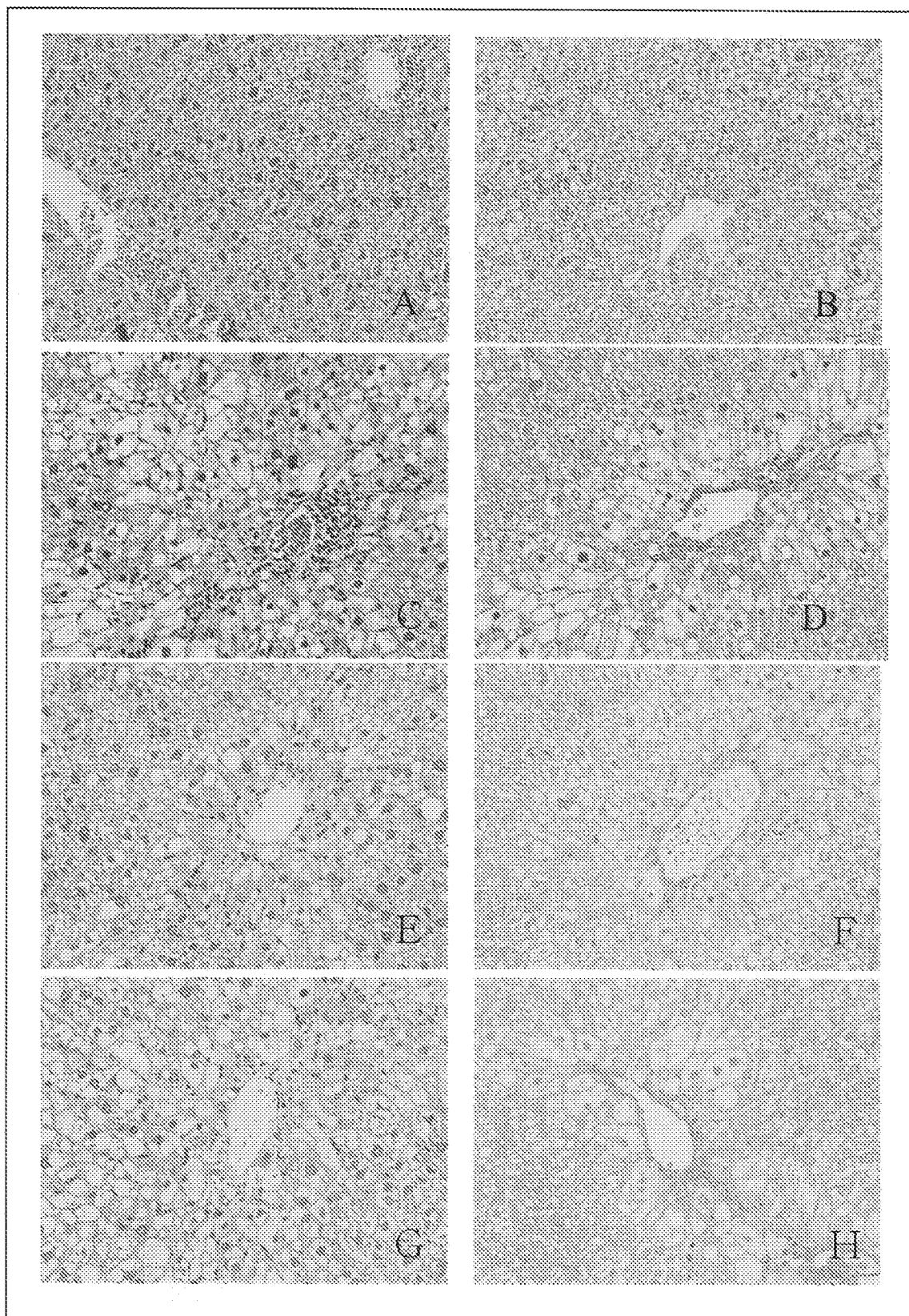
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/068878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/027(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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)

A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50

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 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2006/030792 A1 (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 March 2006 (23.03.2006), paragraphs [0016], [0022], [0024], [0027] to [0029], [0037] & EP 1790220 A1 & CA 2580669 A	1-6, 8, 10, 11, 14-19, 21-23 7, 9, 12, 13, 20
A	WO 2008/018191 A1 (Okayama University), 14 February 2008 (14.02.2008), paragraph [0008] & US 2010/0189647 A1	1-23
A	WO 2008/001614 A1 (Hiroshima Industrial Promotion Organization), 03 January 2008 (03.01.2008), paragraph [0022] & US 2009/0313710 A1 & CA 2656243 A	1-23



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

16 October, 2012 (16.10.12)

Date of mailing of the international search report

30 October, 2012 (30.10.12)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027 (2006.01)i, G01N33/15 (2006.01)i, G01N33/50 (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. A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii

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 A A	WO 2006/030792 A1 (萬有製薬株式会社) 2006.03.23, 【0016】, 【0022】, 【0024】, 【0027】 ~ 【0029】, 【0037】 段落 & EP 1790220 A1 & CA 2580669 A WO 2008/018191 A1 (国立大学法人 岡山大学) 2008.02.14, 【0008】 段落 & US 2010/0189647 A1	1-6, 8, 10, 11, 14-19, 21-23 7, 9, 12, 13, 20 1-23

☒ 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

1 6 . 1 0 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

3 0 . 1 0 . 2 0 1 2

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)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

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

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	WO 2008/001614 A1 (財団法人ひろしま産業振興機構) 2008.01.03, 【0022】段落 & US 2009/0313710 A1 & CA 2656243 A	1-23