

(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5月5日(05.05.2011)



(10) 国際公開番号  
WO 2011/052592 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/53 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)  
A23L 1/015 (2006.01) G01N 33/14 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/068974
- (22) 国際出願日: 2010年10月26日(26.10.2010)
- (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 2009-248505 2009年10月29日(29.10.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 有限会社イムノ (iMmno, Inc.) [JP/JP]; 〒3501113 埼玉県川越市田町2-4-21-201 Saitama (JP). 学校法人埼玉医科大学 (SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷3-8 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松下 祥 (MATSUSHITA Sho) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷3-8 学校法人埼玉医科大学医学部免疫学内 Saitama (JP). 東 文裕 (HIGASHI Takehiro) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷3-8 学校法人埼玉医科大学医学部免疫学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所 (CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋2-8-21 金鳳堂ビル9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, 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, 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.
- (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 (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))



WO 2011/052592 A1

(54) Title: METHOD FOR EVALUATING RISK OF INDUCING ONSET OF ATOPIC DERMATITIS BY BREAST MILK OR FOOD OR DRINK, AND BREAST MILK OR FOOD OR DRINK WITH REDUCED RISK OF INDUCING ONSET OF ATOPIC DERMATITIS

(54) 発明の名称: 母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、およびアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品

(57) Abstract: By disclosing, with the use of HPLC and mass spectrometry, that the active form exhibiting Th2 adjuvant activity of breast milk is coenzyme A, it is discovered that a risk of causing the onset of atopic dermatitis can be evaluated by targeting coenzyme A, and a food or drink or breast milk with a reduced risk of causing the onset of atopic dermatitis can be produced by removing or inactivating coenzyme A.

(57) 要約: HPLC および質量分析により、母乳の Th2 アジュバント活性の本体が、コエンザイム A であることを突き止め、コエンザイム A を標的としてアトピー性皮膚炎を発症させる危険性を評価することが可能であること、およびコエンザイム A を除去または不活性化することにより、アトピー性皮膚炎を発症させる危険性が減少された飲食品または母乳を製造することが可能であることを見出した。

## 明 細 書

### 発明の名称：

母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、およびアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品

### 技術分野

[0001] 本発明は、母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、およびアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品に関し、より詳しくは、コエンザイムAを標的として、母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、およびコエンザイムAが除去または不活性化されることにより、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された飲食品または母乳に関する。

### 背景技術

- [0002] 近年、環境要因と免疫応答のインターフェイスとして、樹状細胞（Dendritic cells：DC）が重要な役割を演じていることが明らかとなりつつある。樹状細胞とは、造血幹細胞起源の単球から分化した細胞で、マクロファージやB細胞とともに、主要な抗原提示細胞（antigen-presenting cells：APC）として知られている。樹状細胞は、ナイーブT細胞に抗原を提示して該ナイーブT細胞の一次応答を誘導できる、唯一のプロフェッショナル抗原提示細胞（professional APC）として機能しており、特にヘルパーT細胞（Th細胞）への分化誘導には、樹状細胞による抗原提示が必須とされている。樹状細胞による抗原提示は、食作用により取り込まれたタンパク質抗原がペプチドへと断片化され、該ペプチド（抗原ペプチド）がMHCクラスI分子やMHCクラスII分子と結合し、該樹状細胞表面に輸送されることにより行われる。
- [0003] 一方、上記のような抗原提示に関与するタンパク質抗原とは異なり、抗原非特異的に樹状細胞の抗原提示機能を増加させ、免疫応答を増強するタンパク質抗原以外の活性物質も知られている。このような物質をアジュバントと

呼ぶ。アジュバントの一部は、未熟樹状細胞 (immature DC : iDC) 表面上の特定のTOLL-like receptor (TLR) と結合する。そのシグナルが細胞内に伝達されることにより当該未熟樹状細胞は活性化され、成熟樹状細胞 (mature DC : mDC) へと分化する (例えば、非特許文献 1 参照)。成熟樹状細胞にはいくつかのタイプが知られており、それぞれがナイーブCD4陽性T細胞に対して異なる分化誘導活性を有している。一般に、Th1 (T helper 1) 細胞を誘導する成熟樹状細胞をDC1、Th2 (T helper 2) 細胞を誘導する成熟樹状細胞をDC2、Th17 (T helper 17) 細胞を誘導する成熟樹状細胞をDC17、Tr (T regulatory) 細胞を誘導する成熟樹状細胞をDCrと呼ぶ。そして、未熟樹状細胞をDC1に分化させる活性を有するアジュバントをTh1アジュバント、DC2に分化させる活性を有するアジュバントをTh2アジュバント、DC17に分化させる活性を有するアジュバントをTh17アジュバント、DCrに分化させる活性を有するアジュバントをTrアジュバントと言う。

[0004] Th1アジュバントとしては、主として細菌によって産生されるリポ多糖類 (lipopolysaccharide : LPS) などが、Th2アジュバントとしては、住血吸虫由来のリン脂質であるフォスファチジルセリン (phosphatidylserine) などが、Th17アジュバントとしては、カードラン (curdlan) などが、Trアジュバントとしては、リソ・フォスファチジルセリン (lysophosphatidylserine) などが知られている (例えば、非特許文献 2 参照)。

[0005] Th細胞の機能の平衡状態が崩れること (Thインバランス) によって多くの免疫疾患が生じることが知られており、例えば、Th1細胞の過剰活性化によって生じる疾患としては、1型糖尿病などの自己免疫疾患が、Th2細胞の過剰活性化によって生じる疾患としては、アトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギー性疾患が知られている。従って、アジュバントが、ナイーブCD4陽性T細胞をいずれのTh細胞に分化誘導する活性を有するかは、免疫応答反応において、さらには免疫疾患の治療においても重要となってくる。

[0006] 我々の生活を取り巻く環境物質や化学物質などの特定物質の中には、アジュバントとしての免疫応答修飾活性を有するものが多数存在する。実際、そ

これらの特定物質のうちいくつかに関しては、アトピー性皮膚炎、花粉症、気管支喘息などのアレルギー疾患の原因因子であることが知られており、現在でも人間の健康的な生活を脅かしている。従って、特定物質が有するアジュバント活性を評価すること、特に、いずれのTh細胞に対するアジュバント活性を有するかを評価することは、特定物質の人体に与える影響を予測する上でも重要であり、また特定物質を含む工業製品などの安全性や、特定物質を含む薬剤などの有効性を確認する上でも極めて重要である。

[0007] そこで、本発明者らは、樹状細胞を用いてTh細胞に対するアジュバント活性を評価する方法を開発した（特許文献1）。そして、樹状細胞としてTHP-1細胞を用い、アトピー性皮膚炎を発症した乳児が摂取した母乳におけるTh2アジュバント活性を検出した結果、母乳におけるTh2アジュバント活性とアトピー性皮膚炎との関連を見出している（非特許文献3）。

[0008] しかしながら、母乳におけるTh2アジュバント活性の本体は、いまだ明らかになっていない。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開2006/054415号公報

#### 非特許文献

[0010] 非特許文献1：Takeda K, Akira S. Cell Microbiol 5: 143-153, 2003

非特許文献2：van der Kleij D, et al., J Biol Chem. 277(50): 48122-48129, 2002

非特許文献3：アレルギー 第57巻 第9・10号 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会号、「アトピー性皮膚炎患児摂取母乳の試験管内アジュバント活性評価法を用いたコホート研究」、社団法人 日本アレルギー学会、第14ページ、平成20年10月30日

### 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、母乳のTh2アジュバント活性の本体を同定することにある。さらなる本発明の目的は、同定されたTh2アジュバント活性の本体を標的としてアトピー性皮膚炎を発症させる危険性を評価する方法を提供すること、および該本体が除去または不活性化されることにより、アトピー性皮膚炎を発症させる危険性が減少された飲食品または母乳を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、まず、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、生後6ヶ月の時点でアトピー性皮膚炎を発症した患児の母乳におけるTh2アジュバント活性の本体の精製を試みた。その結果、この活性が、母乳における液相中に回収され、逆相HPLCにおいて、単一画分として溶出されることが判明した。本発明者らは、次に、この画分に対して、質量分析を行った。質量分析においては、多くのシグナルが検出されたが、その中の「 $M_i=384.7719$ 、 $M_{i+1}=385.2754$  ( $M_{i+1}-M_i=0.5035$ )」のシグナルが、高Th2アジュバント活性の母乳においては検出される一方、低Th2アジュバント活性の母乳においては検出されないことが判明した。このシグナル分子の分子量を決定したところ、767.5292であり、この分子量は、コエンザイムAの分子量と完全に一致していた。コエンザイムAが母乳におけるTh2アジュバント活性の本体であることを裏づけるため、本発明者らは、次に、独自に開発した系で、コエンザイムAのTh2アジュバント活性を測定した。その結果、コエンザイムAは、*in vitro*において、低濃度でも、Th2アジュバント活性を示すことが判明した。また、母乳におけるコエンザイムAの濃度は、患児のアトピー性皮膚炎と明らかな相関を示した。さらに、コエンザイムAのTh2アジュバント活性は、コエンザイムAを経口投与したマウスを用いた実験においても見出された。以上から、出生直後に摂取した母乳中に含まれるコエンザイムAが、乳児のアトピー性皮膚炎の発症を誘導していることが示唆された。

[0013] コエンザイムAとアトピー性皮膚炎の発症の誘導との関係が示されたことか

ら、本発明者らは、コエンザイムAを標的として、母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価することが可能であり、また、コエンザイムAを除去または不活性化することにより、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品を製造することが可能であることを見出した。

[0014] 本発明は、上記知見に基づくものであり、より詳しくは、下記の発明を提供するものである。

(1) 母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法であって、母乳または飲食品におけるコエンザイムAを検出することを特徴とする方法。

(2) アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品の製造方法であって、母乳または飲食品におけるコエンザイムAを除去または不活性化することを特徴とする方法。

(3) (2)に記載の方法により製造された、コエンザイムAが除去または不活性化された母乳または飲食品。

(4) (1)に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)を含むキット。

(a) コエンザイムAと結合する物質

(b) (a)の物質が結合した固相

(5) (1)に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)が結合された器具。

(a) コエンザイムAと結合する物質

(b) (a)の物質が結合した固相

(6) (1)に記載の方法に用いるための、(5)に記載の器具を含む装置。

(7) (2)に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)を含むキット。

(a) コエンザイムAと結合する物質またはコエンザイムAを不活性化す

る物質

(b) (a)の物質が結合した固相

(8) (2)に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)が結合された器具。

(a) コエンザイムAと結合する物質またはコエンザイムAを不活性化する物質

(b) (a)の物質が結合した固相

(9) (2)に記載の方法に用いるための、(8)に記載の器具を含む装置。

### 発明の効果

[0015] 本発明により、コエンザイムAとアトピー性皮膚炎の発症の誘導との関係が見出されたことから、母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性をコエンザイムAを標的として効率的に評価することが可能となった。また、コエンザイムAを除去または不活性化することにより、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品を効率的に製造することが可能となった。

### 図面の簡単な説明

[0016] [図1]分画された母乳におけるTh2アジュバント活性を検出した結果を示すグラフである。A. 母乳試料を遠心により、表面脂質、中間液相および沈殿の画分に分離し、cAMPを指標にTh2アジュバント活性を検出した結果を示す。B. 生後6カ月目にアトピー性皮膚炎を発症した群(AD(+))の母乳の液体画分をろ過したものについて、IL-5/IFN $\gamma$ を指標にTh2アジュバント活性を検出した結果を示す。

[図2]母乳の液相をC8 RP-HPLCにロードした結果を示すグラフである。実線は、A280を、点線は%ACNを示す。

[図3]in vitroにおける、コエンザイムAのTh2アジュバント活性を検出した結果を示すグラフである。A. cAMPを指標にTh2アジュバント活性を検出した結果を示す。B. IL-5またはIL-5/IFN $\gamma$ を指標にTh2アジュバント活性を検出

した結果を示す。

[図4] in vivoにおける、コエンザイムAのTh2アジュバント活性を検出した結果を示すグラフである。A. コエンザイムAを経口投与したマウスから採取したCD3 $\epsilon$ 陰性細胞と、アロジェネティックなナイーブCD4陽性T細胞とを用いてリンパ球混合培養反応を誘導し、T細胞におけるIL-4、IL-5、およびIFN $\gamma$ の産生を検出した。B. Th2アジュバント活性を、IL-4/IFN $\gamma$ およびIL-5/IFN $\gamma$ で表したグラフである。

### 発明を実施するための形態

- [0017] 本発明は、コエンザイムAがTh2アジュバント活性を有し、その摂取により、アトピー性皮膚炎の発症が誘導されうるといふ、本発明者らの知見に基づく。従って、本発明は、母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法であつて、母乳または飲食品におけるコエンザイムAを検出することを特徴とする方法を提供する。
- [0018] 本発明の方法に用いる「母乳」としては特に制限はなく、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価したい所望の母乳を用いることができる。母乳としては、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、マウス、ラットなど種々の哺乳動物由来のものを対象とすることができる。ヒトの乳児におけるアトピー性皮膚炎発症を誘導する危険性を評価する場合には、母乳は、出産直後のものであることが好ましい。ここで「出産直後」とは、出産後2週間以内、好ましくは1週間以内（例えば、4日以内）を意味する。本発明の方法により、出産直後の母乳におけるコエンザイムAを検出することで、それを摂取した乳児におけるアトピー性皮膚炎発症の危険性を評価することができる。
- [0019] 本発明の方法に用いる「飲食品」としては特に制限はなく、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価したい所望の飲食品を用いることができる。飲食品としては、例えば、食品、健康食品、機能性食品、栄養補助食品、特定保健用食品、医薬部外品などが挙げられる。具体的には、乳幼児用の人工乳や離乳食、ヨーグルト、乳飲料などの乳製品、ジュース、菓子類、麺



・穀類、インスタント食品、サプリメントなどが考えられる。

[0020] 母乳または飲食品におけるコエンザイムAの検出は、例えば、コエンザイムAに特異的な抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウェスタンブロッティングなどの公知の方法により測定することができる。コエンザイムAに対する抗体は、それを認識し得る限り、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。コエンザイムAに対する抗体は、コエンザイムAを抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、コエンザイムAをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間のうちに血液を採取し、血ペイを除去することにより調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、コエンザイムAで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。免疫に際しては、コエンザイムAは、必要に応じて、KLHなどの抗原性刺激のあるキャリアプロテインに結合して用いることができる。

[0021] 母乳または飲食品におけるコエンザイムAの検出は、コエンザイムAに結合する、上記抗体以外の物質を利用して検出することもできる。このような物質としては、例えば、コエンザイムAと結合するタンパク質（酵素を含む）が挙げられる。コエンザイムAと結合する酵素は、例えば、デホスホ-CoAキナーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、アシルCoAリダクターゼ、パルミトイルCoAヒドラーゼ、スクシニルCoAヒドラーゼ、シトレートシンターゼ、あるいは、これらの混合物でありうる。

[0022] コエンザイムAの検出において、コエンザイムAに結合する抗体その他の物質は、必要に応じて、適宜標識されうる。標識としては、検出可能であれば特に制限はないが、例えば、蛍光標識、酵素標識、放射標識が挙げられる。

[0023] また、母乳または飲食品におけるコエンザイムAの検出は、コエンザイムAの補酵素活性を指標として検出することもできる。検出の対象となる補酵素活性としては、例えば、アシル基（例えば、アセチル基）の転移活性が挙げ

られる (E. R. STADTMAN, et al., J. Biol. Chem. 191(1): 365-76, 1951参照のこと)。市販のキットを利用すれば、このような補酵素活性を簡便に検出することが可能である。例えば、Coenzyme A Assay kit (Bio Vision Research Products) を利用した場合、コエンザイムAの補酵素活性により生産された物質が、OxiRedプローブと反応し、色 ( $\lambda = 570\text{nm}$ ) と蛍光 (Ex=535/Em=587nm) が生じるため、これらを測定することにより、コエンザイムAの濃度を定量することが可能である。

[0024] さらに、本実施例や特許第3780283号公報に記載のように、LC-MS法によって、コエンザイムAを検出することも可能である。例えば、オクチルシラン基 (C8) が結合したシリカゲル基剤を用いた逆相クロマトグラフィーを行い、TFA-アセトニトリル濃度勾配により溶出した、コエンザイムAが含まれると考えられる所定の画分について、質量分析器により分析を行うことにより、コエンザイムAのピークを検出することが可能である。

[0025] 本発明の方法においては、母乳や飲食品を上記方法により評価した結果、母乳や飲食品が有意な濃度もしくは量でコエンザイムAを含むと評価された場合、その母乳や飲食品は、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性があると評価される。

[0026] ここで「有意な濃度もしくは量」とは、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性があるレベルの濃度もしくは量を意味する。例えば、本発明の方法において母乳を用いる場合には、対照として、アトピー性皮膚炎を発症していない乳児の母乳におけるコエンザイムAの濃度の値を用い、母乳中のコエンザイムAの濃度が、この対照値よりも高いとき（好ましくは2倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは5倍以上であるとき）、母乳検体は、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性があると評価される。一般に、出産直後の母乳において、0.5nMの濃度以上のコエンザイムAが含まれていた場合、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性があると評価され、濃度が1.0nM以上であった場合は、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が高いと評価される。この評価に基づいて、乳児における、アトピー性皮膚炎の発症を

予防することが可能である。

- [0027] 本発明は、また、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品の製造方法であって、母乳または飲食品におけるコエンザイムAを除去または不活性化することを特徴とする方法を提供する。
- [0028] 本発明の方法において、母乳または飲食品からコエンザイムAを除去するには、例えば、コエンザイムAと結合する物質を用いることができる。このような物質としては、例えば、上記のコエンザイムAに対する抗体や上記のコエンザイムAと結合する酵素が挙げられる。これら抗体や酵素、あるいは、コエンザイムAを生産する微生物からの抽出物を、例えば、ハロゲン化シアンで活性化させた、水に不溶性の多糖類（例えば、プロモシアン、ヨウ化シアン、あるいは塩化シアンで活性化させたセファロース、セファデックス、デキストラン、アガロースなど）に結合させ、コエンザイムAのアフィニティー精製に用いることができる（特開昭49-35584号公報、米国特許3935072号公報）。また、母乳または飲食品におけるコエンザイムAの不活性化には、例えば、コエンザイムAを不活性化する物質を用いることができる。このような物質としては、例えば、アロキササンが挙げられる（S. J. COOPERSTEIN., J. Biol. Chem. 232: 695-704, 1958）。アロキササンは、コエンザイムAと直接反応し、アセチル化反応を阻害する。その他、エタノール、アセトアルデヒド、一酸化窒素がコエンザイムAを不活性化することが知られており（H. P. T. Ammon, et al., Biochem. Pharmacol. 18(1): 29-33, 1969、W. E. W. Roediger, Digestion 65: 191-195, 2002）、これらを本発明に利用することも考えられる。
- [0029] なお、本発明における「コエンザイムAを不活性化する物質」は、コエンザイムAと結合する活性を有する場合、「コエンザイムAと結合する物質」でもある。また、「コエンザイムAと結合する物質」は、コエンザイムAを不活性化する活性を有する場合、「コエンザイムAを不活性化する物質」でもある。
- [0030] コエンザイムAと結合する物質あるいはコエンザイムAを不活性化する物質は、それらが固相に結合可能である限り、それらを結合させた固相に、母乳

や飲食品（材料や製造過程の加工物などを含む）を適用することによって、母乳や飲食品からコエンザイムAを除去あるいは母乳や飲食品に含まれるコエンザイムAを不活性化することができる。母乳や飲食品を固相に適用する場合には、事前に、これらを蒸留水、緩衝液、あるいは水溶性溶媒などに溶解させ、遠心などにより、不純物や沈殿物を除去することが好ましい。

[0031] 本発明に用いる固相は、コエンザイムAを除去または不活性化するための物質が結合可能な表面を持つ固体である。この表面は、好ましくは疎水性の表面である。固相としては、例えば、シリカ粒子、フィルター、固相抽出カラム、ポリマー材料、フィルター材料、ポリスチレンビーズ、磁性微粒子、ラテックス、あるいはこれらの表面を加工したものが挙げられる。

[0032] 本発明において、コエンザイムAの除去または不活性化のために、様々な手法を選択することが可能である。例えば、コエンザイムAを除去または不活性化するための物質が結合した固相に微粒子状のものを使用した場合、バッチ法によるコエンザイムAの除去が可能となる。すなわち、試料溶液中に、上記固相を懸濁させ、その後、コエンザイムAと固相との複合体を沈殿させ、液体成分を分離することで、コエンザイムAを除去することが可能である。この沈殿過程においては重力による沈殿のほか、遠心分離操作により沈殿をさせることも可能である。また、微粒子に磁石により吸引される性質を付与しておけば、沈殿操作を磁石による吸引により行うこともできる。

[0033] また、固相にフィルター状や固相カラム状のものを使用した場合、フィルター透過法によるコエンザイムAの除去あるいは不活性化が可能となる。この場合は、試料とコエンザイムAを除去または不活性化するための物質が結合した固相との接触は、試料がフィルターもしくはカラム中を透過する過程で行われる。

[0034] また、コエンザイムAを除去または不活性化するための物質あるいは当該物質が結合した固相を結合させた器具（例えば、これら物質または固相で表面加工したフラスコ、ビーカー、タンクなどの容器、これら物質または固相が充填されたカラムなど）を用いれば、ここに母乳または飲食品の試料を適用

することにより、それらに含まれるコエンザイムAの除去または不活性化を行うこともできる。

[0035] また、上記器具が設置された装置であって、その装置における試料の注入部に、試料を注入することにより、注入された試料が、器具におけるコエンザイムAを除去または不活性化するための物質と接触し、装置の排出部から、コエンザイムAが除去または不活性化された試料が回収される装置を用いれば、簡便に本発明の方法を実施することが可能である。例えば、コエンザイムAを除去または不活性化するための物質が結合した固相が充填されたカラムを利用する場合、当該装置には、カラム中で、試料溶液の流れを形成させるためのポンプやポンペなどの機器や温度や処理時間の調節のための機器などが含まれる。

[0036] コエンザイムAを不活性化するための物質を用いる場合、当該物質を母乳または飲食品に添加して、母乳または飲食品に含まれるコエンザイムAを不活性化することもできる。この場合は、コエンザイムAを不活性化するための物質が、摂取した哺乳動物の生体において有害でないものであることが望ましい。

[0037] 本発明は、上記の本発明の方法により製造された、コエンザイムAが除去または不活性化された母乳または飲食品を提供するものである。このような母乳または飲食品は、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が少ない母乳または飲食品として、有用である。本発明の母乳または飲食品は、特に、乳児が摂取する場合において、有効性が高いと考えられる。

[0038] 本発明は、また、上記本発明の母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、あるいは上記本発明のアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品の製造方法、に用いるための、キットを提供する。

[0039] 本発明のキットには、上記のコエンザイムAと結合する物質または当該物質が結合した固相が含まれる。これらは、上記した通り、必要に応じて適宜標識することにより、母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する

危険性を評価するための試薬（あるいはその有効成分）となる。アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品の製造方法に用いる場合、キットは、コエンザイムAと結合する物質に代えて、上記のコエンザイムAを不活性化する物質を用いることもできる。本発明のキットには、さらに、その使用説明書が含まれていてもよい。

[0040] 本発明は、また、上記本発明の母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、あるいは上記本発明のアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品の製造方法、に用いるための、器具を提供する。

[0041] 本発明の器具は、上記のコエンザイムAと結合する物質または当該物質が結合した固相が結合されたものである。母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法に用いる場合、本発明の器具に結合させる物質としては、コエンザイムAと結合する物質に代えて、上記のコエンザイムAを不活性化する物質を用いることもできる。

[0042] 本発明は、さらに、上記本発明の母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、あるいは上記本発明のアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品の製造方法、に用いるための、上記器具を含む装置を提供する。

[0043] 上記本発明のキット、器具、あるいは装置を用いれば、簡便に、母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価することが可能であり、また、簡便に、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品を製造することが可能である。

## 実施例

[0044] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0045] なお、本実施例における材料および方法は、次の通りである。

[0046] <コホート>

2007年1月から2008年5月までに千葉大医学部附属病院産科、JFE川鉄千葉病

院を受診し、出生コホート調査へ参加同意の得られた妊婦から出生した児900名を対象とした。アトピー性皮膚炎（AD）の定義は、生後6か月時の質問票により2か月以上続くかゆみのある湿疹とした。生後6ヶ月時でのアトピー性皮膚炎児55名、対照健康児55名を選び、採取してあった母乳中のTh2アジュバント活性を測定した。

[0047] <母乳の採取>

生後数日と生後1か月時の母乳を、ディスポーザブルポリスピッツに採取し、凍結保存(-80°C)した。凍結保存しておいた母乳を流水にて溶解し、1mlずつマイクロチューブ(1.5ml)に分注した。10,000g、10分4°Cで遠心を行い、細胞(下層)と乳性脂肪(上層)を分離した。乳性脂肪をアスピレーターで吸引して取り除いた後、中間のクリアな水溶性画分をマイクロチューブ(1.5ml)にとって、4°Cで保存した。

[0048] <細胞内cAMP濃度の測定>

THP-1細胞を、加湿培養器中、37°Cで、5% CO<sub>2</sub>の条件下、10% ウシ胎児血清、1% ペニシリンおよびストレプトマイシン、および1% L-グルタミンで補完したRPMI1640培地で培養した。50ng/mlのPMA(ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート)に48時間曝したTHP-1細胞を洗浄し、その後、1mMの3-イソブチル-1-メチルーキサンチンの存在下で、37°Cで培養した。10分後、細胞を30%の母乳(AD:n=55、非AD:n=55)で10分間刺激し、cell lysis buffer(Molecular Devices)で溶解した。いくつかの実験においては、50ng/mlのPMAで48時間処理したTHP-1細胞を10μMのプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)に曝した。細胞内cAMPレベルは、メーカー使用説明書に従い、CatchPoint™ cyclicAMP fluorescent assay kit(Molecular Devices社)を用いて計測した。いくつかの実験においては、デルタ(Δ)-cAMPを、アジュバント刺激ありのPMA刺激を与えたTHP-1におけるcAMPの濃度から、アジュバント刺激なしのPMA刺激を与えたTHP-1におけるcAMPの濃度を差し引くことにより算出した。

[0049] <ヒト単球由来樹状細胞(Mo-DCs)とTリンパ球の調製>

ヒトMo-DCsおよびCD45RA陽性ナイーブT細胞(99%を超える純度)は、従前の報告(Takagi, R. et al., J Immunol 181: 186-189, 2008)に従い調製した。

[0050] <樹状細胞を用いたT細胞分化解析>

未熟Mo-DCsは、1~10%の母乳液体画分または0~10 $\mu$ g/mlのコエンザイムAで刺激した。液体画分またはコエンザイムAとの培養から2日後、混合リンパ球培養反応(MLR)を誘導するために、細胞成分をさらに、HLA-DR-非共有アロジェニックCD4陽性ネガティブT細胞とともに、10%ヒト血清を補完したRPMI1640培地で、6~8日間培養した。その後、T細胞を抗CD3抗体と抗CD28抗体(BD Pharmingen社)で再刺激した。IFN $\gamma$ とIL-5のELISAキット(R&D systems社)を用いたELISAによるIFN $\gamma$ とIL-5の解析のために、培養上清を48時間後に回収した。

[0051] <HPLC解析>

母乳の液相は、0.06% TFAで平衡化した、4.6 $\times$ 250mmのC8逆相(RP)-HPLCカラム(Shiseido)にロードした。A214とA280を継続的にモニターしながら、カラムを、室温下、1.0ml/分の流速で、0.052% TFA-アセトニトリル濃度勾配により溶出した。画分は、濃縮し、Speed Vac(Savant社)で乾燥させた。

[0052] <質量分析>

マススペクトルは、エレクトロスプレーイオン化源を備えたLCMS-IT-TOF mass spectrometer(島津製作所)に記録した。試料は、0.2ml/分の流速にて、50% アセトニトリルと0.1% ギ酸の混合物を含む緩衝液でパルス注入された。操作のために、エレクトロスプレー電圧は、4.5kVにセットし、キャピラリー温度を200 $^{\circ}$ Cとした。窒素ガスの噴霧は、1.5L/分でセットした。スペクトルは、200~1000 質量/電荷(m/z)の範囲を、0.3秒毎に2分間スキャンすることにより取得した。スキャン時間における各スペクトルの統合と予想された範囲における質量の計算のために、コンピュータプログラム LCMSソリューションを用いた。



[0053] <コエンザイムA濃度の決定>

コエンザイムAの濃度は、Coenzyme A Assay kit(BioVision Research Products)を用いて、メーカー使用説明書に従い、決定した。

[0054] <コエンザイムAを経口投与したマウスから採取したCD3 $\epsilon$ 陰性細胞を用いたリンパ球混合培養反応>

SJL/Jマウス(H-2<sup>s</sup>)とNc/Ngaマウス(非H-2<sup>s</sup>)をCharles River社と日本エスエルシー株式会社からそれぞれ購入した。SJL/Jマウスに50 $\mu$ g/mlのコエンザイムAを経口投与した。2日後に、「CD3 $\epsilon$  cell isolation kit」(Miltenyi Biotec社)を用いて、腸間膜リンパ節細胞よりCD3 $\epsilon$ 陰性細胞を得た。同日に、「CD4<sup>+</sup> T cell isolation kit」と「CD62L<sup>+</sup> T cell isolation kit」(Miltenyi Biotec社)を用いて、Nc/Ngaマウスの脾臓からCD62L陽性ナイーブCD4陽性T細胞を得た。その後、 $1 \times 10^4$ のCD3 $\epsilon$ 陰性細胞と $1 \times 10^5$ のアロジェネティックなCD62L陽性ナイーブCD4陽性T細胞を96ウェルの平底培養プレートで共培養し、10% FCSが補充されたRPMI1640培地中で7日間、リンパ球混合培養反応(MLR)を誘導した。次いで、T細胞を抗CD3抗体および抗CD28抗体(Biolegends社)で再刺激した。培養上清を16時間後に採取し、IFN $\gamma$ 、IL-4およびIL-5のELISAキット(R&D systems社)を用いて、IFN $\gamma$ 、IL-4、およびIL-5に関して解析した。

[0055] [実施例1] 母乳におけるTh2アジュバント活性本体の精製と質量分析

本発明者らは、樹状細胞としてTHP-1細胞を用い、母乳におけるTh2アジュバント活性を検出した結果、アトピー性皮膚炎と関連した母乳において、cAMPの形成を指標としたTh2アジュバント活性が増加していることを見出している(非特許文献3)。そこで、本発明者らは、母乳を遠心により3つの画分、すなわち、細胞を含む沈殿、中間液相、表面脂質に分離した。これらの画分をPMA処理したTHP-1細胞と共培養し、cAMPを上昇させる活性を評価した。その結果、cAMPを上昇させる活性は、沈殿や脂質画分ではなく、液体画分に効率よく回収された(図1A)。この活性は、除菌のためろ過した後でも、そのまま残っていた。

[0056] 次に、本発明者らは、樹状細胞が仲介するT細胞分化の解析において、Th1/Th2サイトカインプロファイルを調査した。この解析では、Mo-DCsを用い、ろ過した母乳の液相による刺激を行った。この解析においては、母乳調製物は、樹状細胞のみと共培養した（T細胞は、母乳に曝さなかった）。LPSとフォルスコリンをそれぞれTh1アジュバントとTh2アジュバントの陽性対照として用いた（データは示していない）。その結果、母乳の液相は、高いIL-5/IFN $\gamma$ 比を示したことから、実際に、樹状細胞に作用してTh2細胞の分化を誘導する活性を持つことが判明した（図1B）。

[0057] そこで、次に、本発明者らは、C8逆相HPLCを用いることにより、母乳の液相の精製を行った。30秒毎の画分のcAMP誘導活性を決定したところ、高cAMP誘導性の母乳における11.0~11.5分の画分が、排他的に、最も高い活性を示す一方、低cAMP誘導性の母乳における11.0~11.5分の画分は、このようなcAMP誘導活性を示さなかった（図2）。この画分は、A280シグナルをほとんど含んでいなかったことから、ほとんどタンパク質を含まないことが示唆された。15~25分の画分は、多くのA280シグナルを示したが、cAMP誘導シグナルは示さなかった（データは示していない）。

[0058] [実施例2] 母乳中のTh2アジュバント活性の本体の質量分析による同定  
本発明者らは、高cAMP誘導性の母乳における11.0~11.5分の画分を質量分析により解析した。その結果、検出された多くのシグナルのうち、「 $M_i=384.7719$ 、 $M_{i+1}=385.2754$  ( $M_{i+1}-M_i=0.5035$ )」のシグナルが、高活性の母乳において検出されたが、低活性の母乳においては検出されないことが判明した（表1）。

[0059]

[表1]

AD(+) 乳児					母乳					AD(-)乳児				
Mi	Mi+1	Mi+1-Mi	v	MW	Mi	Mi+1	Mi+1-Mi	v	MW	Mi	Mi+1	Mi+1-Mi	v	MW
216.1228	217.1273	1.0045	1	215.1155	216.1231	217.1149	0.9918	1	215.1158	216.1231	217.1149	0.9918	1	215.1158
599.3896	600.3924	1.0028	1	598.3823	599.3895	600.3933	1.0038	1	598.3822	599.3895	600.3933	1.0038	1	598.3822
316.2127	317.2143	1.0016	1	315.2054	316.2127	317.2147	1.0020	1	315.2054	316.2127	317.2147	1.0020	1	315.2054
384.7719	385.2754	0.5035	2	<b>767.5292</b>										
430.2440	431.2476	1.0036	1	429.2367	430.2454	431.2577	1.0123	1	429.2381	430.2454	431.2577	1.0123	1	429.2381
485.3589	486.3613	1.0024	1	484.3516	485.3585	486.3604	1.0019	1	484.3512	485.3585	486.3604	1.0019	1	484.3512

v: 原子価数, MW: 分子量

[0060] このシグナルの分子の分子量を算出したところ、767.5292であった。これは、コエンザイムAの分子量と完全に一致した。2つの他の母乳調製物の実験においても同様の結果が得られた。以上から、母乳中のコエンザイムAがTh2アジュバント活性に関与していることが示唆された。

[0061] [実施例3] *in vitro*における、コエンザイムAのTh2アジュバント活性の解析

次いで、本発明者らは、樹状細胞を用い、*in vitro*において、コエンザイムAのTh2アジュバント活性を試験した。Th2アジュバント活性は、MLRと細胞内cAMP濃度の変化により試験した。その結果、PMAで処理したTHP-1細胞は、10~30 μg/ml (13~39 μM) のコエンザイムAと共培養すると、細胞内cAMPが上昇した。さらに、Mo-DCsを1 μg/mlのコエンザイムAで前処理すると、アロジェニックナイーブCD4陽性T細胞がTh2細胞に分化した(図3B)。以上から、コエンザイムA自体にTh2アジュバント活性があることが判明した。

[0062] [実施例4] *in vivo*における、コエンザイムAのTh2アジュバント活性の解析

さらに、本発明者らは、コエンザイムAが*in vivo*においてTh2アジュバント活性を示すか試験した。マウスにコエンザイムAを含む飲用水(10~20 μg/kg/日)を経口投与した。この投与量は、母乳が最も高いTh2アジュバント活性を示した幼児によるコエンザイムAの経口摂取量に対応する。CD3ε陰性細胞は、コエンザイムA投与の2日後に、腸間膜リンパ節より単離し、アロジェネ

イックなCD62L陽性ナイーブCD4陽性T細胞と共培養した。このMLR解析において、高濃度のIL-4とIL-5が有意に誘導された(図4A)。IFN $\gamma$ においては統計的有意差は認められなかった(図4A)。IL-4/IFN $\gamma$ 比およびIL-5/IFN比は、処理したマウスにおいて顕著に高かった(図4B)。以上から、in vivoにおいても、コエンザイムAにTh2アジュバント活性があることが判明した。

### 産業上の利用可能性

[0063] 以上説明したように、本発明によれば、母乳または飲食品におけるアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性をコエンザイムAを標的として効率的に評価することが可能となる。また、コエンザイムAを除去または不活性化することにより、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品を効率的に製造することが可能となる。従って、本発明は、アトピー性皮膚炎の発症予防などの医療分野において、また、アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性の少ない母乳や飲食品の開発などの食品分野において、大きく貢献するものである。

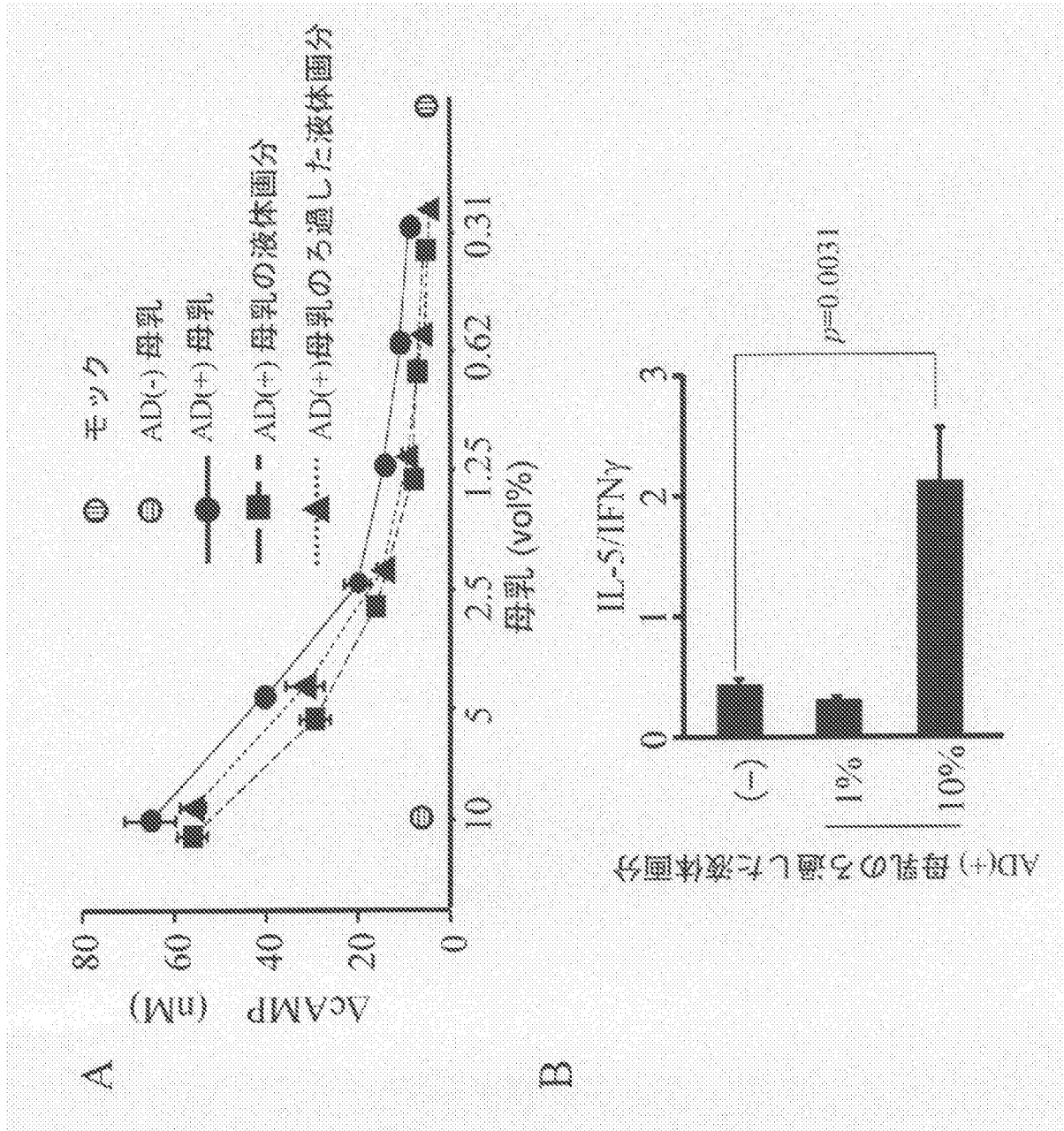
## 請求の範囲

- [請求項1] 母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法であって、母乳または飲食品におけるコエンザイムAを検出することを特徴とする方法。
- [請求項2] アトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品の製造方法であって、母乳または飲食品におけるコエンザイムAを除去または不活性化することを特徴とする方法。
- [請求項3] 請求項2に記載の方法により製造された、コエンザイムAが除去または不活性化された母乳または飲食品。
- [請求項4] 請求項1に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)を含むキット。  
(a) コエンザイムAと結合する物質  
(b) (a)の物質が結合した固相
- [請求項5] 請求項1に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)が結合された器具。  
(a) コエンザイムAと結合する物質  
(b) (a)の物質が結合した固相
- [請求項6] 請求項1に記載の方法に用いるための、請求項5に記載の器具を含む装置。
- [請求項7] 請求項2に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)を含むキット。  
(a) コエンザイムAと結合する物質またはコエンザイムAを不活性化する物質  
(b) (a)の物質が結合した固相
- [請求項8] 請求項2に記載の方法に用いるための、下記(a)または(b)が結合された器具。  
(a) コエンザイムAと結合する物質またはコエンザイムAを不活性化する物質

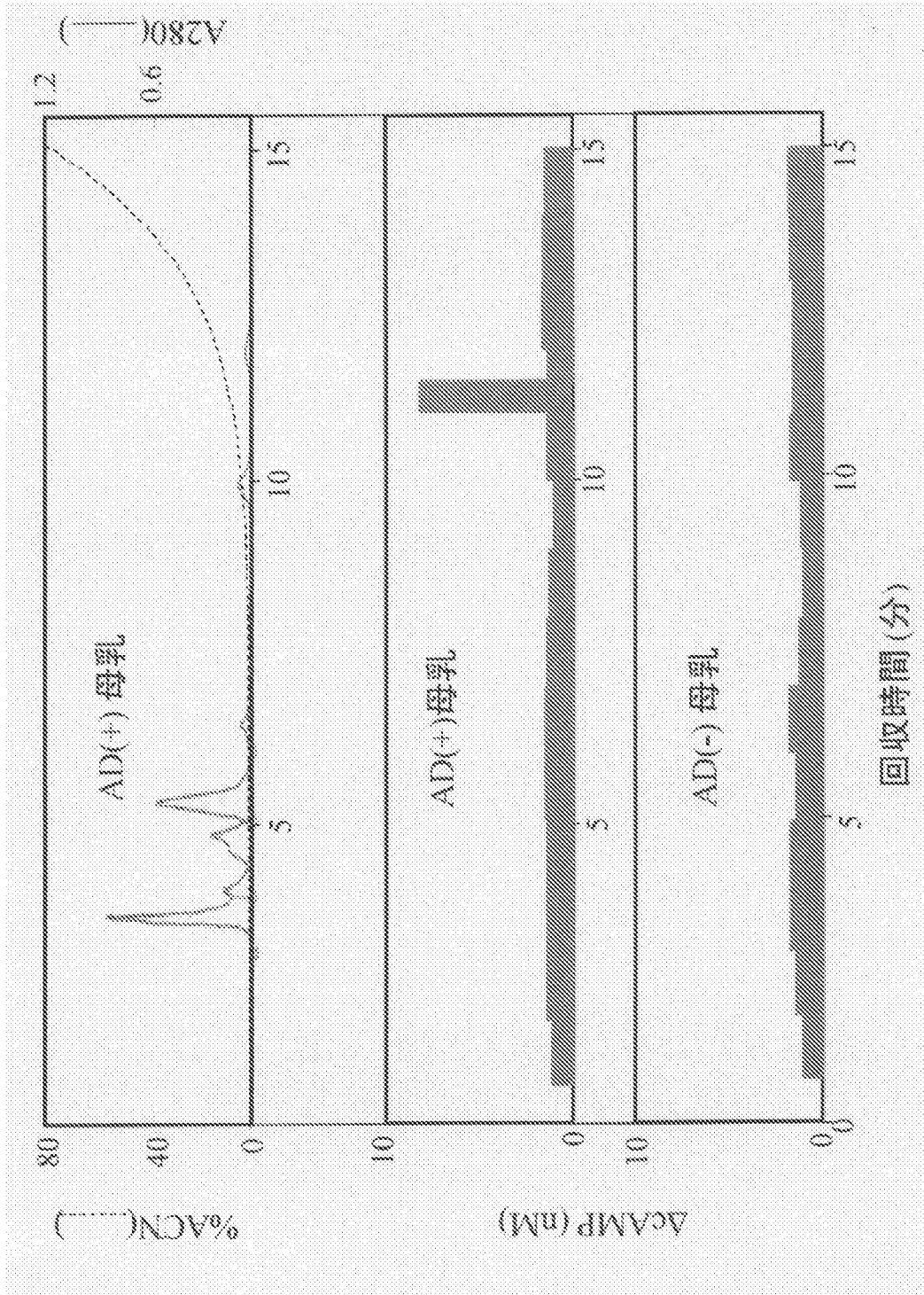
(b) (a) の物質が結合した固相

[請求項9] 請求項2に記載の方法に用いるための、請求項8に記載の器具を含む装置。

[図1]

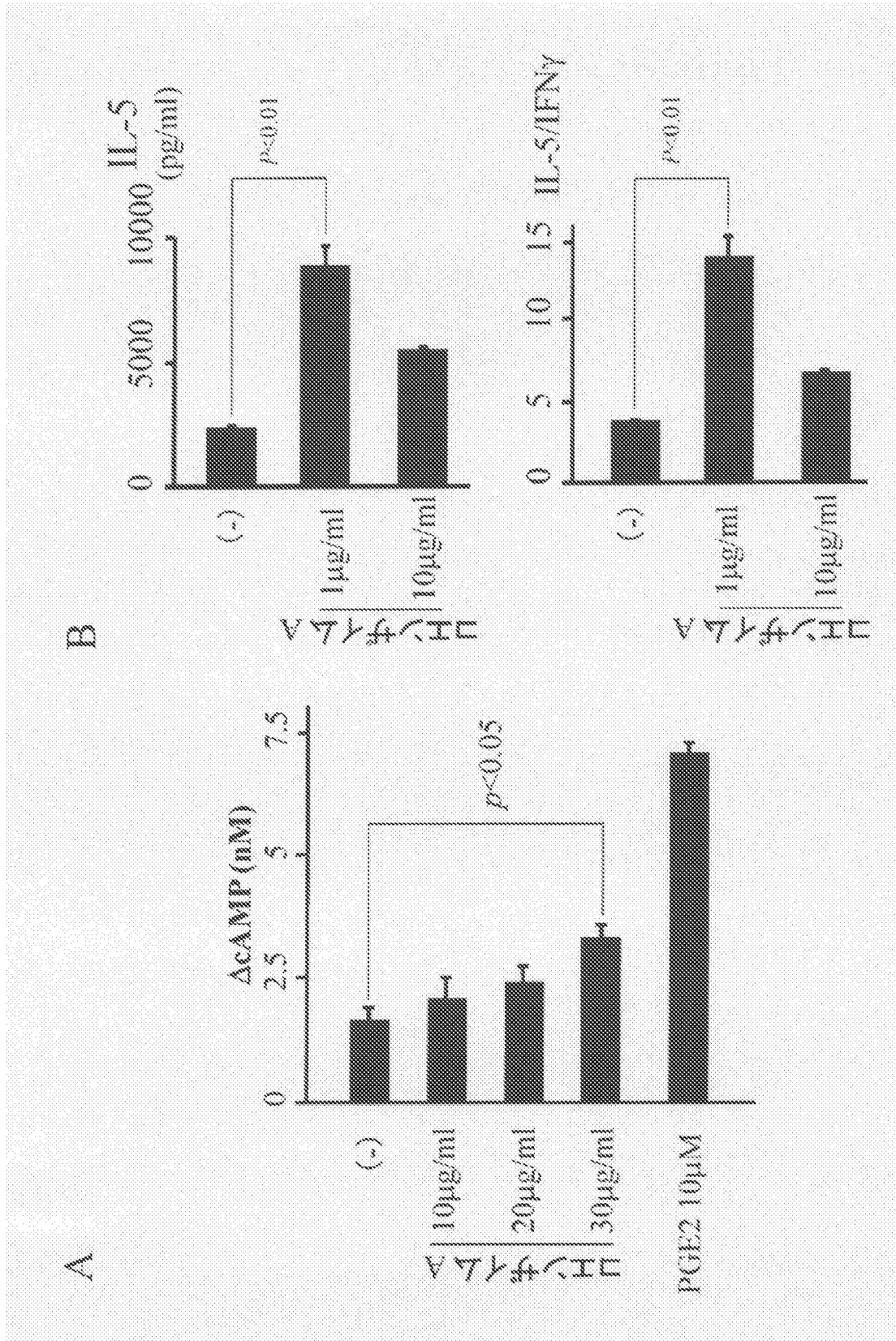


[図2]

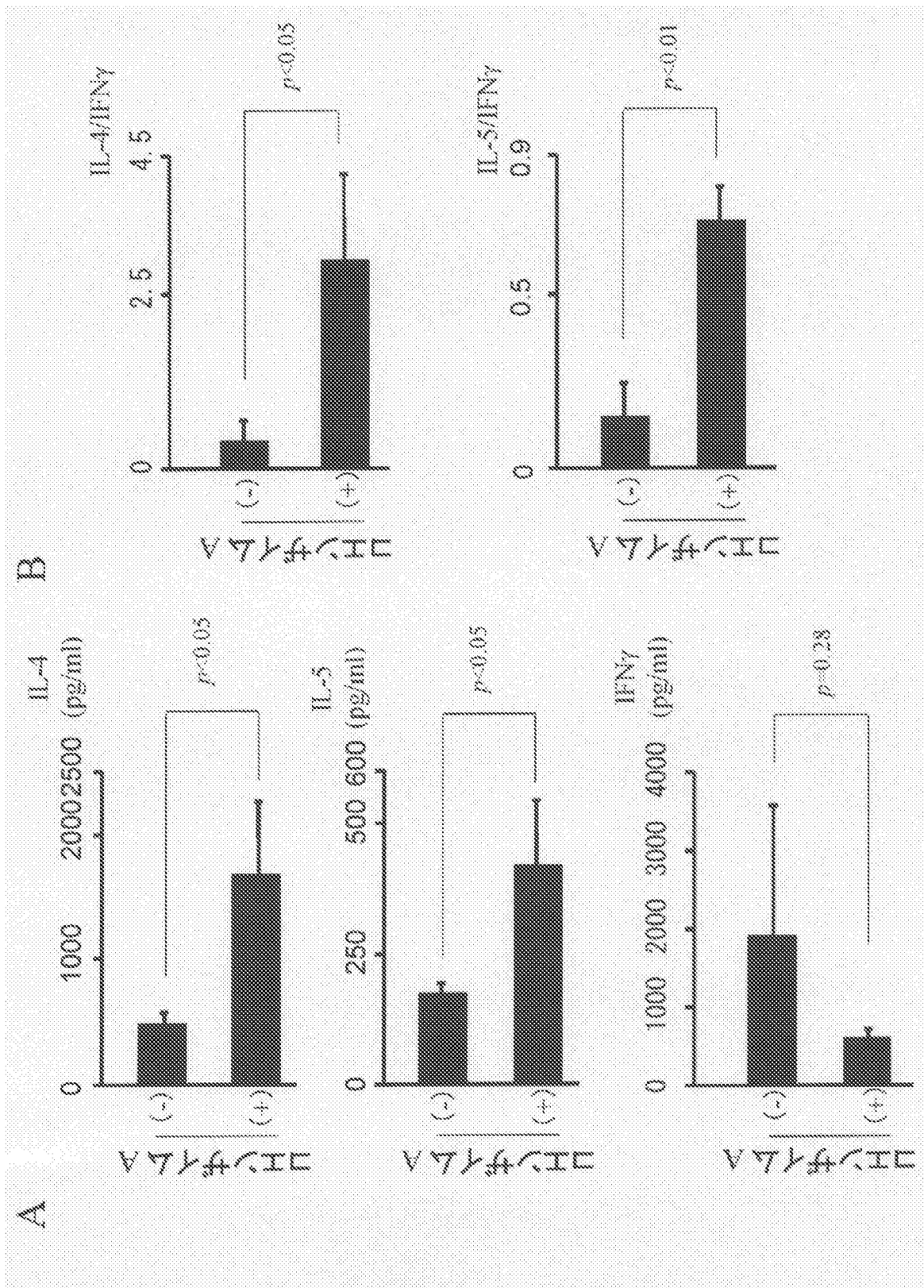




[図3]



[図4]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/068974

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, A23L1/015(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/14(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)

G01N33/53, A23L1/015, C12Q1/02, G01N33/14

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CAPlus (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/054415 A1 (Sho MATSUSHITA, Yasushi UEMURA, Masatoshi WAKUI, Kazuhisa NAKANO), 26 May 2006 (26.05.2006), entire text; all drawings (Family: none)	1-9
A	JP 3780283 B2 (Teijin Ltd.), 31 May 2006 (31.05.2006), claims (Family: none)	1-9
A	JP 49-035584 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 02 April 1974 (02.04.1974), entire text & US 3935072 A & GB 1440369 A & DE 2340407 A & DE 2340407 A1 & FR 2195639 A	1-9

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

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 December, 2010 (15.12.10)Date of mailing of the international search report  
28 December, 2010 (28.12.10)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/068974

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takehiro HIGASHI, Sho MATSUSHITA, Yosuke MIZUNO, Teruyuki SAKAI, Shin'ichiro TAKEI, "Adjuvant Kassei no Tayosei to sono Oyo", Journal of Saitama Medical Univerisity, 2009.09, vol.36, no.1, pages 33 to 35	1-9
A	Takehiro HIGASHI, Kumiko HASHIMOTO, Rie TAKAGI, Sho MATSUSHITA, Yoshiya TANAKA, Naoki SHIMOJO, Yoichi KONO, "Atopic Dermatitis Kanji Sesshu Bonyu no Shikenkan-nai Adjuvant Kassei Hyokaho o Mochiita Cohort Kenkyu", Japanese Journal of Allergology, 30 October 2008 (30.10.2008), vol.57, no.9/10, page 1407	1-9
P,X	Takehiro HIGASHI, Sho MATSUSHITA, "Atopic Dermatitis Kanji ga Sesshu shita Bonyu ni Fukumareru Th2 Adjuvant Kassei Busshitsu no Dotei", Japanese Journal of Allergology, 25 October 2010 (25.10.2010), vol.59, no.9/10, page 1269	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, A23L1/015(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/14(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. G01N33/53, A23L1/015, C12Q1/02, G01N33/14

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 1971-2010年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2010年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2010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), CAplus(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2006/054415 A1 (松下祥, 植村靖史, 涌井昌俊, 中野和久) 2006.05.26, 全文・全図等参照 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 3780283 B2 (帝人株式会社) 2006.05.31, 【特許請求の範囲】等参照 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 49-035584 A (田辺製薬株式会社) 1974.04.02, 全文 & US 3935072 A & GB 1440369 A & DE 2340407 A & DE 2340407 A1 & FR 2195639 A	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー  
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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 15.12.2010	国際調査報告の発送日 28.12.2010
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) 草川 貴史 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J 4 0 7 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
A	東丈裕、松下祥、水野洋介、酒井輝行、竹井眞一郎、 アジュバント活性の多様性とその応用、埼玉医科大学雑誌、2009. 09, Vol. 36, No. 1, Page. 33-35	1-9
A	東丈裕、橋本久実子、高木理英、松下祥、田中良哉、下条直樹、河野陽 一、アトピー性皮膚炎患児摂取母乳の試験管内アジュバント活性評価法を 用いたコホート研究、アレルギー、 2008. 10. 30, Vol. 57, No. 9/10, Page. 1407	1-9
P, X	東丈裕、松下祥、アトピー性皮膚炎患児が摂取した母乳に含まれる Th2 ア ジュバント活性物質の同定、アレルギー、2010. 10. 25, Vol. 59, No. 9/10, Page. 1269	1-9