

(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



(10) 国際公開番号

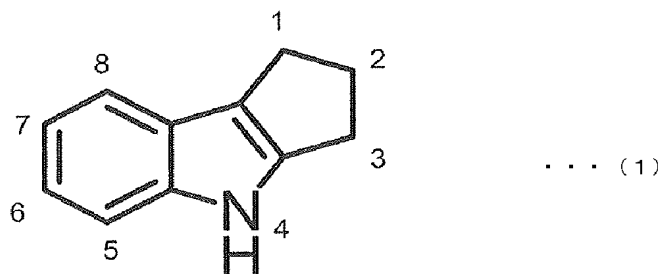
WO 2017/141966 A1

(43) 国際公開日
2017年8月24日(24.08.2017)

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/50 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/005527
 - (22) 国際出願日: 2017年2月15日(15.02.2017)
 - (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 2016-026406 2016年2月15日(15.02.2016) JP
 - (71) 出願人: 学校法人近畿大学(KINKI UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒5778502 大阪府東大阪市小若江3丁目
4番1号 Osaka (JP).
 - (72) 発明者: 船上 仁範(FUNAKAMI Yoshinori); 〒
5778502 大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号
学校法人近畿大学 薬学部内 Osaka (JP). 多賀
淳(TAGA Atsushi); 〒5778502 大阪府東大阪市小若
江3丁目4番1号 学校法人近畿大学 薬学部
内 Osaka (JP). 三田村 邦子(MITAMURA Kuniko);
〒5778502 大阪府東大阪市小若江3丁目4番1
号 学校法人近畿大学 薬学部内 Osaka (JP). 市
田 成志(ICHIDA Seiji); 〒5778502 大阪府東大阪
市小若江3丁目4番1号 学校法人近畿大学
薬学部内 Osaka (JP).
 - (74) 代理人: 廣幸 正樹(HIROKOH Masaki); 〒5300047
大阪府大阪市北区西天満3丁目1番6号 辰野
西天満ビル Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
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, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: STRESS EVALUATION METHOD

(54) 発明の名称: ストレス評価方法



(57) Abstract: Cortisol is conventionally known as a stress marker, but there are cases in which the expression thereof during stress is not constant, so cortisol is an unstable indicator. Further, cortisol does not enable distinguishing between acute stress and chronic stress. This stress evaluation method is characterized in that a state of acute stress in the test subject is determined when the 1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[b]indole shown in expression (1) is expressed.

(57) 要約: 従来ストレスマーカーとして知られているコルチゾールは、ストレス中の発現が一定しない場合があり、指標とするには不安定であった。また、急性ストレスと慢性ストレスの区別ができなかった。検査対象に、式(1)に示す1, 2, 3, 4-テトラヒドロシクロペンタ[b]インドールが発現している場合は、急性ストレス状態であると判断することを特徴とするストレス評価方法。



WO 2017/141966 A1

明 細 書

発明の名称： ストレス評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、人や動物が感じるストレスを評価する方法で、ストレスマーカーとして1, 2, 3, 4-テトラヒドロシクロペンタ [b] インドールを用いる方法に関する。

背景技術

[0002] ストレスはさまざまな外的要因によって引き起こされるもので、心身障害に至る原因となる場合もある。したがって、過度のストレスに陥っている場合は、ストレスを緩和する必要がある。しかし、ストレスは、外的要因に対する感じ方の個人差もあり、ストレスの感じ方を客観的に評価する方法が検討されてきた。

[0003] 特許文献1には、マッサージをした際に感じるストレス緩和の程度について言及されている。ここでは、ストレスマーカーとしてコルチゾールを用いる点が開示されている。

[0004] 特許文献2には、ストレスマーカーとして、デヒドロアンドロステロンサルフェート、17-ケトステロイドサルフェート、デヒドロエピアンドロステロンがストレスマーカーになり得ることが開示されている。なお、特許文献2では、コルチゾールは、ストレスを打ち消すアンチストレス因子が存在するため、一元的に定量指標としにくかった点が課題として挙げられている。

[0005] 特許文献3には、ストレスマーカーとしてデヒドロエピアンドロステロンを指標とすることが開示されている。

[0006] 特許文献4では、コルチゾールでのストレス評価は不安定であるので、安定的にコルチゾールをストレスの指標として測定するための方法が開示されている。

[0007] また、特許文献5には、腫瘍マーカーとして知られているクロモグラニン

Aがストレスマーカーとして利用でき、コーヒー豆の抽出物がクロモグラニンAの分泌を抑制する効果がある点が開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0008] 特許文献1：特開平11-023579号公報
特許文献2：特開平11-038004号公報
特許文献3：特開平11-326318号公報
特許文献4：特開2012-251857号公報
特許文献5：特開2006-081513号公報

発明の概要

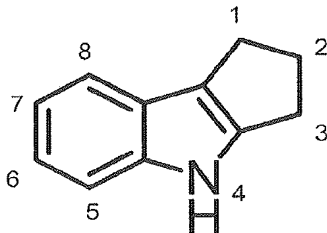
発明が解決しようとする課題

- [0009] 特許文献2、3、4が開示しているように、ストレスマーカーとして知られているコルチゾールは、ストレス中の発現が一定しない場合があり、指標とするには不安定であった。また、急性ストレスと慢性ストレスの区別ができなかった。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明は上記の課題に鑑みて想到されたので、ストレスに対して安定して発現する物質をストレスマーカーとし、ストレスを評価できるようにしたものである。より具体的に本発明に係るストレスの評価方法は、式(1)に示す1, 2, 3, 4-テトラヒドロシクロペンタ[b]インドールを指標とすることを特徴とする。

- [0011] [化1]



．．．（１）

発明の効果

[0012] 1, 2, 3, 4-テトラヒドロシクロペンタ [b] インドールは、急性のストレスがかかると、必ず発現するので、ストレス状態を確実に把握することができる。また、ストレスが定常化すると、発現がゼロになる。したがって、全く発現しないことを指標として、慢性ストレス状態であることを判断できる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]マウスにSARTというストレス状態を与える過程を説明する図である。

[図2]急性ストレスマウスと非ストレスマウスの血液の成分分析結果を示すチャートである。

[図3]図2の一部を拡大したチャートである。

[図4]急性ストレスマウスと慢性ストレスマウスの体液成分の分析結果を示すチャートである。

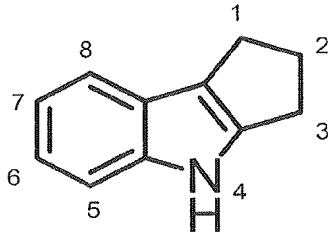
発明を実施するための形態

[0014] 以下に本発明に係るストレス評価方法について図面および実施例を示し説明を行う。なお、以下の説明は、本発明の一実施形態および一実施例を例示するものであり、本発明が以下の説明に限定されるものではない。以下の説明は本発明の趣旨を逸脱しない範囲で改変することができる。

[0015] 本発明に係るストレス評価方法では、ストレスマーカーとして、1, 2, 3, 4-テトラヒドロシクロペンタ [b] インドール（以後「TCI」と呼ぶ。）を用いる。

[0016]

[化2]



．．．（１）

[0017] 動物（少なくとも哺乳類）はストレスを感じるとTCIを産生し、血中にそれが観測される。TCIの測定には、GC/HPLCまたはGCMS/HPLC-MSなど目的成分を分離し定性定量が可能な分析装置を用いて測定することが望ましい。

[0018] また、本発明において、行動異常とは、ヒトの場合は公的な基準（WHO（世界保健機関）の国際疾病分類である「ICD-10」若しくは、米国精神医学会の「DSM-IV」など）に基づいて行ってもよい。動物の場合は、他の個体との比較や、以前の行動からの変化などで判断できる。小動物の場合は、高架式十字迷路試験などの試験によって評価を行ってもよい。

[0019] また、本明細書において、急性ストレス状態とは、ストレスを与えられた直後から陥る状態で、ストレスが解消されると、短時間内に消失するストレス状態である。また、慢性ストレス状態とは、一定期間の間ストレスを繰り返しまたは継続的に受けたために陥る状態で、身体に何らかの不定愁訴をともない、ストレスが解消されても、回復しない（少なくとも一定期間の間観察しても回復の兆しが見られない）状態をいう。以下実施例に基づいて説明する。

実施例

[0020] 実施例として、マウスを用いた実験を行った。マウスは、体重約20-25g（4週齢）のddY系雄性マウス（日本エスエルシー株式会社より購入）を使用した。マウスの通常飼育は室温24±1℃、12時間毎の明暗サイクル（午前7時から午後7時、点灯）下で行い、8匹/1ゲージとした。飼

料（MF（商品名）、オリエンタル酵母）及び水は自由に摂取させた。

[0021] 一部のマウスについては、Specific alternation of rhythm in temperature（SART）を施し、慢性ストレス状態にした。具体的には、室温24℃の飼育室（以下「常温飼育室」）と庫内温度4℃の動物飼育用チャンバー（以下「低温飼育室」）の両方にマウス飼育用ケージを用意し、毎日9時から16時までの間は1時間ごとにマウスを両ケージ間に移し変え、16時から翌朝9時までは4℃のチャンバー内で飼育するという環境温度変化に7日間曝すことによりストレスを加えた。実験当日の朝11時までSARTストレスの負荷方法に従って常温飼育室と低温飼育室の入れ替えを行った。

[0022] 図1にSARTストレスの負荷方法についての経過図を示す。Room Aは常温飼育室で、Room Bは低温飼育室である。マウスはケージ毎両室間を移動させられる。図中のラインは飼育用ケージの移動を表している。またラインの折れ曲がり点に記載している数字は時刻である。毎日9時から16時までの1時間毎に常温飼育室（Room A）と低温飼育室（Room B）の間を入れ替えられたマウスは、16時から翌朝の9時まで低温飼育室（Room B）に放置される。このような温度変化に7日間曝されること（SARTストレス）で、慢性ストレス状態を生み出している。SARTストレスを与えたマウスを「慢性ストレスマウス」と呼ぶ。

[0023] ストレスを与えなかったマウスは、「非ストレスマウス」と呼ぶ。また、一部の非ストレスマウスには、図1の低温飼育室Room Bに1時間放置することで、急性ストレスを与えた。このように急性ストレスを与えたマウスを、「急性ストレスマウス」と呼ぶ。なお、非ストレスマウスは、移動に伴うストレスの要素を除去するために、SARTストレスと同様のスケジュールで、ケージ間の移動を行った。もちろん、この移動によっても温度によるストレスはないようにした。

[0024] 上記のように、慢性ストレスマウスと、急性ストレスマウスと、非ストレスマウスに対して、シリカモノリス（直径2.9mm長さ10mm、吸着材

含有、ジーエルサイエンス社)で血液を採取し、GC/MS/TD(島津製作所:GC-2010、GCMS-Q2010Plus,OPTIC-4)を用いて分析を行った。

[0025] 図2には、結果を示す。横軸は時間(分:min)であり、縦軸は強度(無単位)である。cold1-1、cold2-1、cold3-1は急性ストレスマウスである。また、control2-1、control2-2、control3-1、control1-2はすべて非ストレスマウスである。

[0026] ストレスを与えると、人ではコルチゾールが発現するとされているが、マウスはコルチゾールを生合成するために必要な酵素をほとんど持っていない。したがって、ストレスが与えられた際には、コルチゾールになるはずのコレステロール(Cholest-5-en-3-ol)が発現する。

[0027] 図2では、急性ストレスマウス3匹(cold1-1、cold2-1、cold3-1)のうち、cold1-1とcold2-1には、コレステロールが発現したが、cold3-1には発生しなかった。一方、非ストレスマウスについては、4匹中4匹ともほとんどコレステロールの発現は認められなかった。

[0028] 図3は、図2の一部の区間を抜き出して拡大したものである。この部分のちょうど156mzに相等するピーク(図3中に矢印で示した。)は、急性ストレスマウス(cold1-1、cold2-1、cold3-1)には、3匹とも発現し、非ストレスマウスには、発現しない物質が確認できた。そして、この部分に相当するのがTCIであることが確認された。

[0029] すなわち、TCIは、急性ストレスマウスに確実に発現する物質であるので、ストレスマーカーとして利用することができる。

[0030] TCIは唾液中からも検出することができるので、与える負荷によってどの程度のストレスが生じるかを時系列で観測することが容易である。

[0031] 図4には、急性ストレスマウスと慢性ストレスマウスの血液を分析した結果を示す。ここでは、TCIは四角で囲った156mzのピーク部分に観測

される。急性ストレスマウスは、TCIが発現しているが、慢性ストレスマウスにはTCIが発現していなかった。

[0032] SARTストレスを負荷したマウスは慢性ストレス状態にあり、その行動パターンは明らかに非ストレスマウスと異なることがすでに報告されている (“Anxiety-Like Behavior in Elevated Plus-Maze Test in Repeatedly Cold-Stressed Mice”, Taeko Hata et al, Jpn. J. Pharmacol. 85, 189-196 (2001))。

[0033] つまり、TCIの発現を観察することで、急性ストレスを受けているか否かがわかり、行動が異常であってTCIが消失していることを観察することで、慢性ストレス状態になっているか否かを判断することができる。

[0034] このことを利用したストレス評価法について、より具体的に説明する。本発明に係るストレスマーカー (TCI) は、ヒトに対しても使用することができる。しかし、動物のストレス状態を知るのにより適している。

[0035] まず、検査対象の行動に異常が見られるか否かを観察する。ここで行動異常か否かは、高架式十字迷路試験といった試験方法でかなり客観的に知ることが出来る。また、一箇所にじっとしていて、行動が停止気味もしくは緩慢になっている若しくは、同一行動を際限なく繰り返すといった観察結果であってもよい。もちろん、これ以外の他の方法を用いても良い。この工程は、検査対象の行動異常の有無を調べる工程と言って良い。

[0036] 次に検査対象の体液 (血液採取が可能であれば血液が望ましい。) を採取する。そして、GC/MSで、TCIの発現を調べる。この工程は、検査対象にTCIが発現しているか否かを調べる工程と言ってよい。

[0037] ここでTCIの発現には、GC/MSやLC/MS以外に、抗TCI抗体 (モノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよい) を利用し、ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) で検出してもよい。また、EIA (Enzyme immunoassay) やRIA (Radioimmunoassay)

a y) を利用することができる。なお、抗TCI抗体は、公知の常法によって得られる。また、その他にTCIを特異的に検出できる方法を用いてもよい。

[0038] その結果、行動異常が見られずに、TCIの発現が見られる場合は、急性ストレス状態にあると判断する。また、行動異常が見られずに、TCIの発現が見られない場合は、特にストレスを受けていない、つまりリラックスした状態であると判断できる。

[0039] 一方、行動異常が見られ、なお、TCIの発現が見られない場合は、慢性ストレス状態にあると判断できる。

[0040] なお、検査対象の行動異常の有無を調べる工程はなくてもよい。TCIの発現が検知された時点で、少なくとも急性ストレス状態であると判断できるからである。

[0041] 以上のように、本発明に係るストレスマーカー（TCI）を利用したストレス評価方法は、急性ストレスの有無と、慢性ストレス状態になっているか否かの判断指針とすることができる。

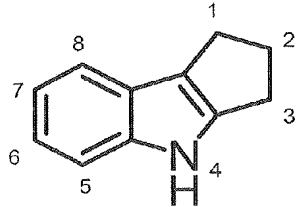
産業上の利用可能性

[0042] 本発明に係るストレスの評価方法は、行動の異常の有無とストレスマーカーであるTCIの発現の有無を利用してストレスのない状態なのか、急性ストレス状態なのか、慢性ストレス状態なのかを極めて客観的に評価することができるので、物言わぬ動物のストレス状態を客観的に評価することができる。もちろん、ヒトのストレス状態も客観的に評価することができる。

請求の範囲

[請求項1] 検査対象に、式(1)に示す1, 2, 3, 4-テトラヒドロシクロペンタ[b]インドールが発現している場合は、急性ストレス状態であると判断することを特徴とするストレス評価方法。

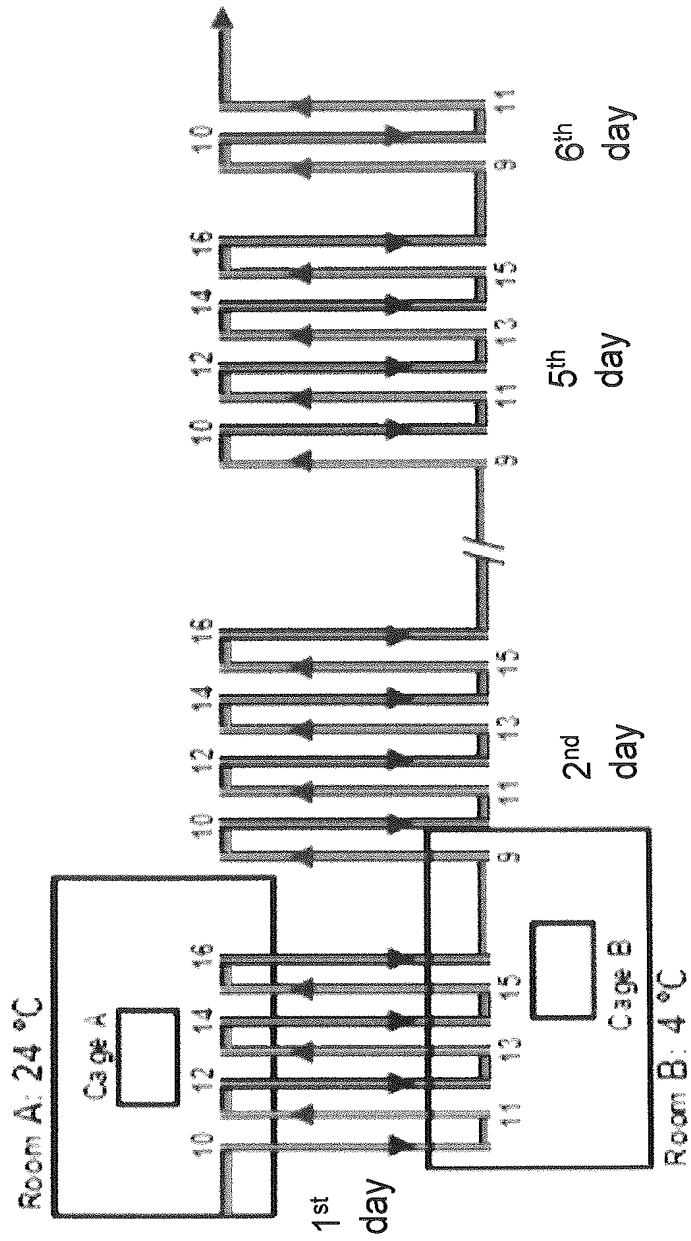
[化100]



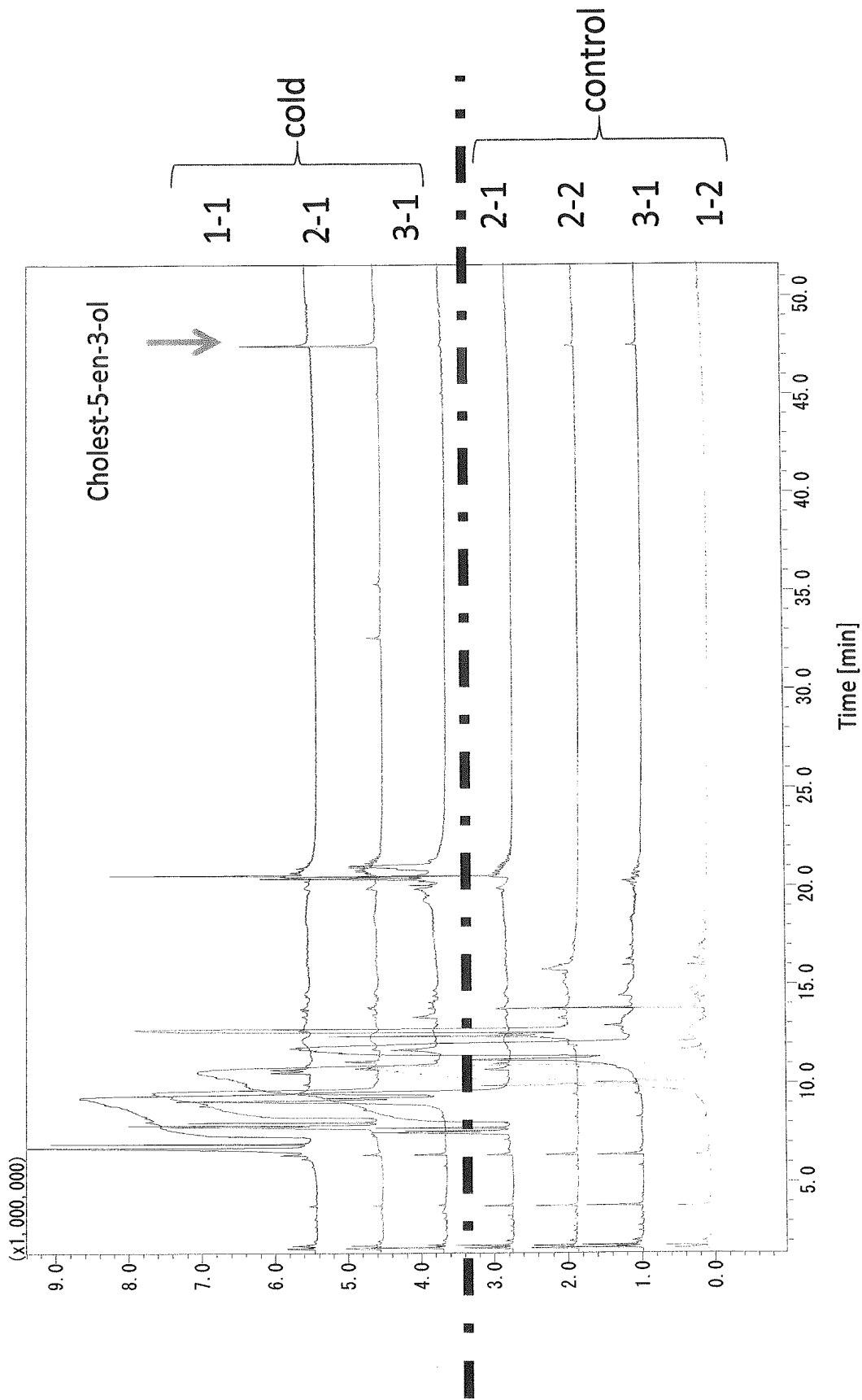
・・・(1)

[請求項2] 前記検査対象の行動異常の有無を調べる工程を有し、
前記行動異常が認められ、さらに前記1, 2, 3, 4-テトラヒドロシクロペンタ[b]インドールが発現していない場合は、慢性ストレス状態であると判断することを特徴とするストレス評価方法。

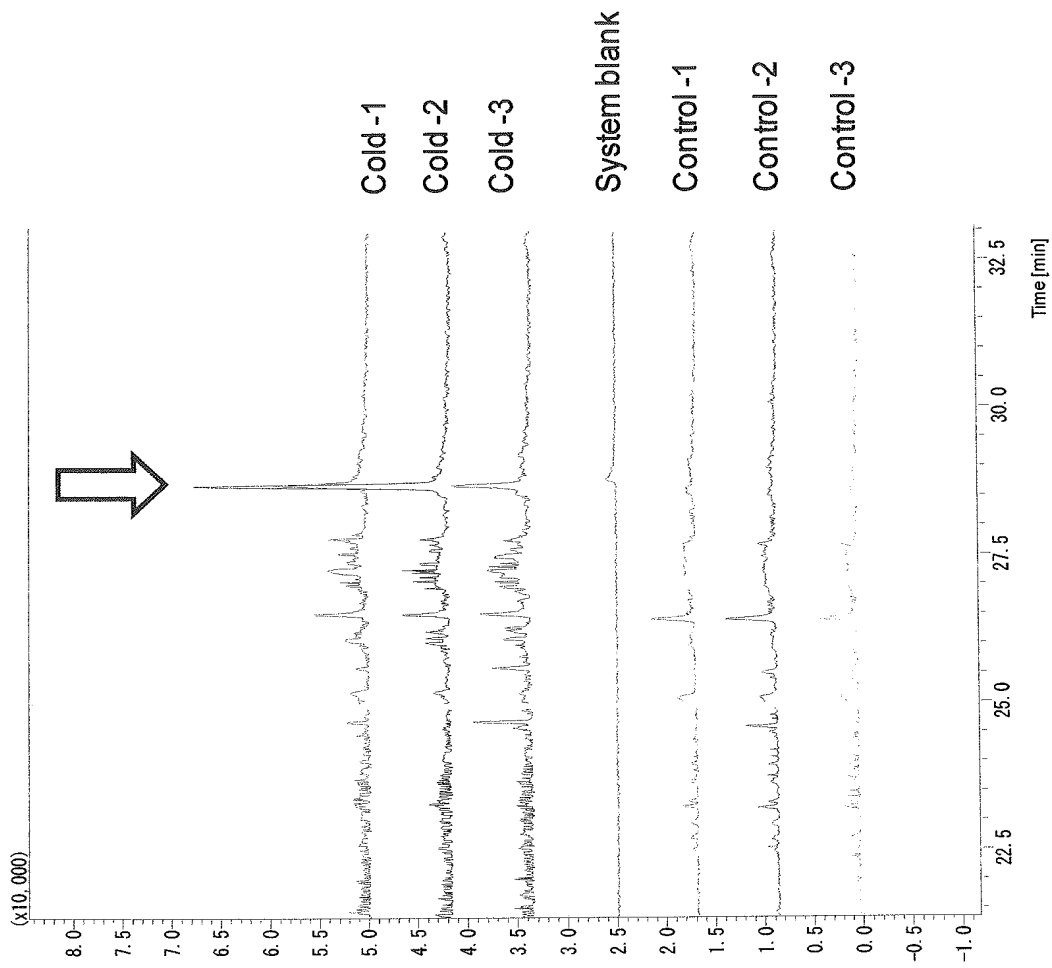
[圖1]



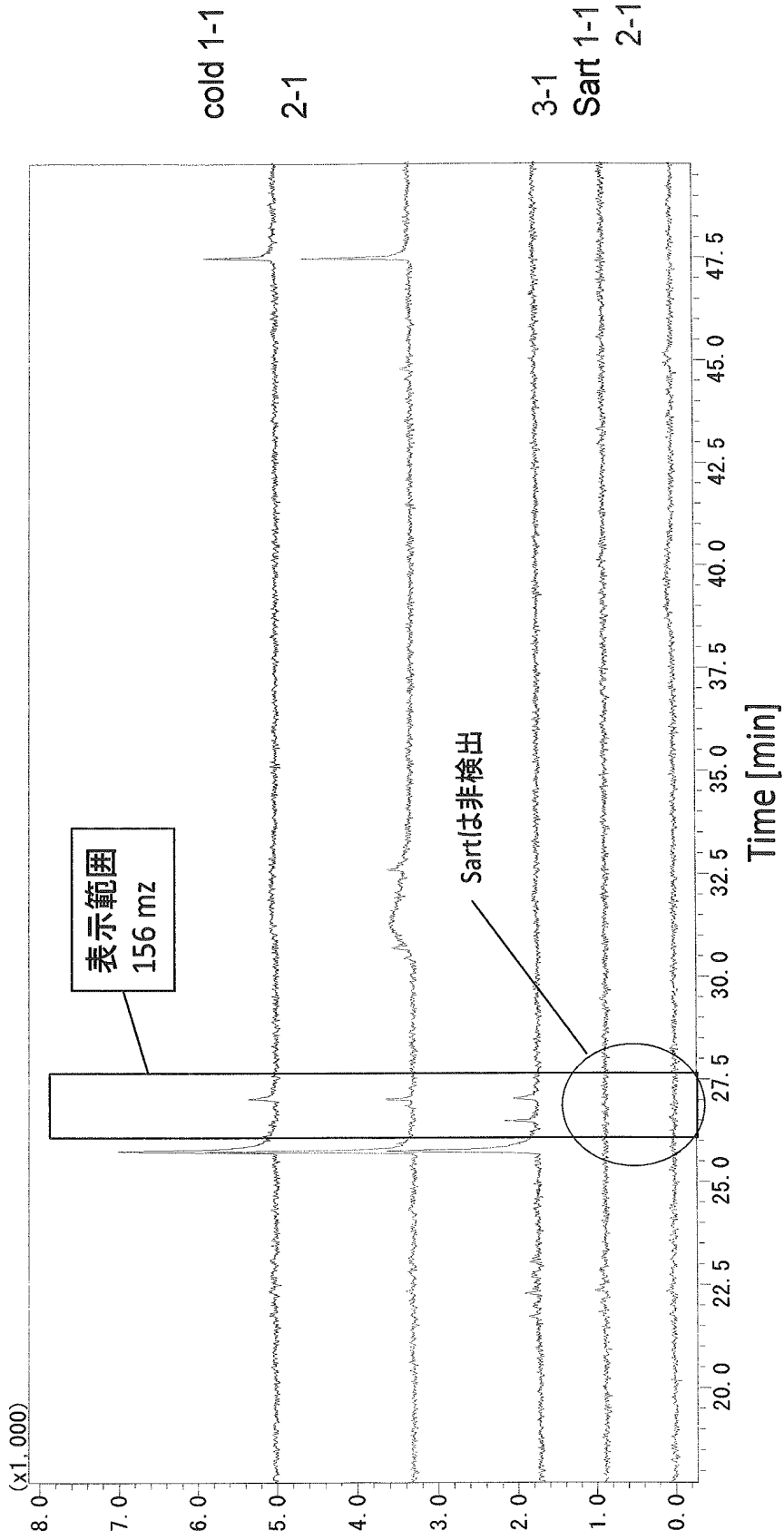
[圖2]



[3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/005527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
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)
G01N33/48-G01N33/98

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/REGISTRY (STN), PubMed, Scopus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUNAKAMI, Yoshinori et al., Effect of the alpha1-adrenoceptor Agonist Phenylephrine on SART Stress-induced Orthostatic Hypotension in Rats, BioPsychoSocial Medicine, 2010, Vol. 4, No. 13, p. 1-9	1-2
A	LEE, Jin-Hyung et al., Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule, Trends in Microbiology, 2015, Vol. 23, No. 11, p. 707-718	1-2
A	US 2015/0266821 A1 (RADIUS HEALTH, INC.), 24 September 2015 (24.09.2015), entire text; all drawings & WO 2011/097496 A1 & EP 2531029 A1	1-2

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 March 2017 (09.03.17)	Date of mailing of the international search report 21 March 2017 (21.03.17)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005527

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-523556 A (Andrey Alexandrovich Ivashchenko), 15 July 2010 (15.07.2010), entire text; all drawings & WO 2008/123796 A2 & EP 2145887 A2	1-2
A	WO 2014/177680 A1 (SALION GMBH), 06 November 2014 (06.11.2014), entire text; all drawings & EP 2799878 A1 & US 2016/0084843 A1	1-2

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. 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 (IPC))

Int.Cl. G01N33/48-G01N33/98

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY (STN), PubMed, Scopus

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	FUNAKAMI, Yoshinori et al., Effect of the alphas-adrenoceptor Agonist Phenylephrine on SART Stress-induced Orthostatic Hypotension in Rats, BioPsychoSocial Medicine, 2010, Vol. 4, No. 13, p. 1-9	1-2
A	LEE, Jin-Hyung et al., Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule, Trends in Microbiology, 2015, Vol. 23, No. 11, p. 707-718	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

09.03.2017

国際調査報告の発送日

21.03.2017

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)

赤坂 祐樹

2 J

8 3 5 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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	US 2015/0266821 A1 (RADIUS HEALTH, INC.) 2015.09.24, 全文、全図 & WO 2011/097496 A1 & EP 2531029 A1	1-2
A	JP 2010-523556 A (アンドレイ・アレクサンドロビッチ・イワシエンコ) 2010.07.15, 全文、全図 & WO 2008/123796 A2 & EP 2145887 A2	1-2
A	WO 2014/177680 A1 (SALION GMBH) 2014.11.06, 全文、全図 & EP 2799878 A1 & US 2016/0084843 A1	1-2