

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-538930

(P2008-538930A)

(43) 公表日 平成20年11月13日(2008.11.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A A 2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M 4 B O 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15	Z

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2008-509198 (P2008-509198)	(71) 出願人	500294958 ヒタチ ケミカル リサーチ センター インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 926 17 アーバイン ヘルズ サイエンス ズ ロード 1003
(86) (22) 出願日	平成18年4月28日 (2006.4.28)	(71) 出願人	000004455 日立化成工業株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目1番1号
(85) 翻訳文提出日	平成19年12月25日 (2007.12.25)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/016376	(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
(87) 国際公開番号	W02006/116721	(74) 代理人	100106622 弁理士 和久田 純一
(87) 国際公開日	平成18年11月2日 (2006.11.2)		
(31) 優先権主張番号	60/675,580		
(32) 優先日	平成17年4月28日 (2005.4.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食物サプリメントに対する個体変動評価のモデルとしての全血における *ex vivo* 遺伝子発現

(57) 【要約】

サプリメントのような食物成分の投与を個別に調整するための方法が開示される。当該方法において、哺乳類の全血は食物成分に曝露される。食物成分への曝露後に、そしていくつかの場合、曝露された血球のさらなる刺激後に、疾患状態と関連づけられるマーカー mRNA のレベルが白血球において測定される。曝露後の mRNA レベルを曝露されなかった血球で判明した値と比較することにより、哺乳類において存在する食物成分の作用が何かを確定し得る。多数の考え得る食物成分に対して哺乳類の血液をスクリーニングすることにより、疾患状態を治療するか又は予防するために特定の哺乳類に対して調整される最適な食物成分のセットを開発し得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌又は自己免疫疾患に対する個々の哺乳類における食物成分の潜在的有効性の評価方法であって、

哺乳類の全血を食物成分に曝露する工程、

前記曝露後に、癌又は自己免疫疾患と関連する mRNA の量を測定する工程、及び

測定結果に基づいて哺乳類における前記食物成分の潜在的有効性を同定する工程

を含み、前記 mRNA の量の変化が前記食物成分の潜在的有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項 2】

10

曝露されなかった全血中に存在する前記 mRNA の量が測定され、曝露されなかった全血中で測定された該 mRNA の量を曝露された全血中で測定された前記 mRNA の量と比較することにより前記 mRNA の量の変化を確定する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記曝露後、前記全血を刺激剤に曝露する工程、及び

曝露されなかった全血から得られる測定結果を、前記食物成分及び前記刺激剤への曝露後に得られる測定結果と比較することを含む前記食物成分の潜在的有効性を評価する工程をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記刺激剤がフィットヘムアグルチニン、放射線及び熱凝集性 IgG から成る群から選択される、請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 5】

前記 mRNA の量が測定される前に前記曝露されなかった全血が対照媒体に曝露される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

前記対照媒体がリン酸緩衝生理食塩水又はジメチルスルホキシドである、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記全血を曝露することがヘパリンの付加を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

30

前記全血が 5 時間以下の間刺激される、請求項 3 記載の方法。

【請求項 9】

前記全血が 30 分～4 時間刺激される、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記 mRNA が、インターロイキン - 2、インターロイキン - 4、腫瘍壊死因子、IgG Fc 受容体、p21、Fas リガンド、腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 3 及び腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 15 をコードする mRNA から成る群から選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

40

前記食物成分が、ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を前記食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、

前記曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球中の IgG Fc 受容体をコー

50

ドする mRNA の量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性を同定する工程

を含み、前記 mRNA の量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を前記食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、

哺乳類の前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血を放射線で刺激する工程、

前記刺激後に、前記曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球中の p 2 1 又は P U M A 遺伝子産物をコードする mRNA の量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

前記比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性を同定する工程

を含み、前記 mRNA の量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を前記食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、

哺乳類の前記曝露された全血及び曝露されなかった全血をフィトヘムアグルチニンで刺激する工程、

前記刺激後に、前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球中のインターロイキン - 2、インターロイキン - 4、腫瘍壊死因子 及び F a s リガンドから成る群から選択されるタンパク質をコードする mRNA の量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

前記比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性を同定する工程

を含み、前記 mRNA の量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、

哺乳類の前記曝露された全血及び曝露されなかった全血を熱凝集性 I g G で刺激する工程、

前記刺激後に、前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球中の腫瘍壊死因子スーパーファミリー 3 及び腫瘍壊死因子スーパーファミリー 1 5 から成る群から選

10

20

30

40

50

扱われる遺伝子産物をコードする mRNA の量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

前記比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性を同定する工程

を含み、前記 mRNA の量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サプリメントのような食物成分の投与を調整するための方法に関する。当該方法において、哺乳類の全血は食物成分に曝露される。食物成分への曝露後に、そしていくつの場合、曝露された血球のさらなる刺激後に、白血球において、疾患状態と関連づけられるマーカー mRNA のレベルが測定される。曝露後の mRNA レベルを曝露されなかった血球で見出された値と比較することにより、哺乳類における食物成分の効果が何かを判定し得る。多数の考え得る食物成分に対して哺乳類の血液をスクリーニングすることにより、疾患の治療又は予防のために特定の哺乳類に対して調整される最適な食物成分のセットを開発し得る。

【背景技術】

【0002】

ビタミン、ポリフェノール、ウコン等の食物成分（サプリメント）は、培養細胞及び動物における種々の生物学的活性を誘導することが知られており、そしてこれらの活性のいくつかはその後の臨床試験により確認されている。これらの生物学的活性のいくつかは、種々の疾患状態における患者の予後に効果があると予測される。例えば免疫系の構成成分の活性を増大した食物成分はいくつかの癌に対する効果を有することが予測され得るが、一方、或る種の免疫系構成成分の活性を低減した食物成分は自己免疫疾患の場合に効き目があると思われる。しかしながら、特定の個体のための食物成分の個別化された組合せを設計するために臨床試験結果を用いることは難しい。応答者及び非応答者はともに試験集団中に存在し、そして非応答者集団は応答者集団より実質的に多い場合には、二重盲検臨床試験は、効能を有することが予測され得る食物成分をもはや同定し得ない。さらに、遺伝子型又は 1 塩基多型分析は、標的遺伝子及びホットスポットが特性化された場合に、食物の最適化において有用であるに過ぎない。いわゆる調整された、個別化された又は個人化された薬剤又は栄養の価値は、科学業界及び一般大衆の両方の間で認識されている（Jain, KK, "Personalized medicine," Curr Opin Mol Ther 2002; 4: 548-58参照）。しかし、適用可能な技術は今のところ限られている。

【0003】

種々の報告はすでに、食物サプリメントの血中レベルを示している。既知の標準的な血中レベルにおける種々の食物サプリメントの既知の又は予測作用を、食事療法に関して考慮中の哺乳類の実際の個々の結果と比較することが望ましい。これは、哺乳類のための食物又は食物サプリメントセットを設計する目的で、全血が採取される哺乳類の白血球中の各サプリメントの効果を評価することを可能にするだろう。白血球中でのこれらの作用は、炎症、癌免疫、自己免疫疾患等に適用可能である。しかしながら、特に *ex vivo* 状態で、これを成し遂げるための有効な方法は今のところ存在しない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、候補食物成分への哺乳類の全血の曝露後に、白血球で測定されるマーカー mRNA のレベルに基づいた、個々の哺乳類に対するサプリメントのような食物成分の調整方法を開示する。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

本発明の一実施の形態では、癌又は自己免疫疾患に対する個々の哺乳類における食物成分の潜在的有効性の評価方法であって、哺乳類の全血を食物成分に曝露する工程、曝露後に、癌又は自己免疫疾患と関連する mRNA の量を測定する工程、及び測定結果に基づいて哺乳類における食物成分の潜在的有効性を同定する工程を含み、前記 mRNA の量の変化が食物成分の潜在的有効性と関連することを特徴とする方法が提供される。

【 0 0 0 6 】

さらなる態様では、曝露されなかった全血中に存在する mRNA の量が測定され、該曝露されなかった全血中で測定された mRNA の量を曝露された全血中で測定された mRNA の量と比較することにより mRNA の量の変化が確定される。

10

【 0 0 0 7 】

さらなる態様では、本方法は、曝露後、全血を刺激剤に曝露する工程、及び曝露されなかった全血から得られる測定結果を、食物成分及び刺激剤への曝露後に得られる測定結果と比較することを含む食物成分の潜在的有効性を評価する工程をさらに含む。

【 0 0 0 8 】

さらなる態様では、刺激剤がフィトヘムアグルチニン、放射線及び熱凝集性 IgG から成る群から選択される。

【 0 0 0 9 】

さらなる態様では、mRNA の量が測定される前に曝露されなかった全血が対照媒体に曝露される。

20

【 0 0 1 0 】

さらなる態様では、対照媒体がリン酸緩衝生理食塩水又はジメチルスルホキシドである。

【 0 0 1 1 】

さらなる態様では、全血を曝露することがヘパリンの付加を含む。

【 0 0 1 2 】

さらなる態様では、全血が 5 時間以下の間刺激される。

【 0 0 1 3 】

さらなる態様では、全血が 30 分 ~ 4 時間刺激される。

【 0 0 1 4 】

さらなる態様では、mRNA が、インターロイキン - 2、インターロイキン - 4、腫瘍壊死因子、IgG Fc 受容体、p21、Fas リガンド、腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 3 及び腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 15 をコードする mRNA から成る群から選択される。

30

【 0 0 1 5 】

さらなる態様では、食物成分が、ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g - リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される。

【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる実施の形態は、ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g - リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性の測定方法であって、哺乳類の全血を食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球中の IgG Fc 受容体をコードする mRNA の量を測定する工程、曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び比較結果に基づいて食物成分の潜在的抗癌有効性を同定する肯定を含み、mRNA の量の変化が食物成分の有効性と関連することを特徴とする方法を提供する。

40

50

【0017】

本発明のさらなる実施の形態は、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性の測定方法であって、哺乳類の全血を食物成分に4時間以下の間曝露する工程、哺乳類の曝露された全血及び曝露されなかった全血を放射線で刺激する工程、刺激後に、曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球中のp21又はPUMA遺伝子産物をコードするmRNAの量を測定する工程、曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び比較結果に基づいて食物成分の潜在的抗癌有効性を同定する工程を含み、mRNAの量の変化が食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法を提供する。

10

【0018】

本発明のさらなる実施の形態は、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性の測定方法であって、哺乳類の全血を食物成分に4時間以下の間曝露すること、哺乳類の曝露された全血及び曝露されなかった全血をフィトヘムアグルチニンで刺激すること、該刺激後に、曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球中のインターロイキン-2、インターロイキン-4、腫瘍壊死因子及びFasリガンドから成る群から選択されるタンパク質をコードするmRNAの量を測定すること、曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較すること、及び比較結果に基づいて食物成分の潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性を同定することを含み、mRNAの量の変化が食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法を提供する。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0019】

本発明の実施形態では、食物サプリメントのような種々の食物成分に応答する個体変動が評価された。「食物成分」とは哺乳類の食物の一部を構成する任意の化合物又は物質を指し、一方、「食物サプリメント」は、哺乳類の食事を補足するために用いられる、ビタミン及び天然抽出物のような有用な食物成分を示す。ヘパリン化ヒト全血は各食物成分とともに*ex vivo*でインキュベートされ、そして食物成分への曝露により誘導される遺伝子発現における変化は、食物サプリメントに曝露された白血球における、及びそのように曝露されない白血球における癌、自己免疫疾患等のような症状に関連した遺伝子の発現を定量することにより評価された。いくつかの場合、全血は、mRNAレベルを定量する前に、フィトヘムアグルチニン、放射線又は熱凝集性IgG(「HAG」)のような刺激剤により刺激された。さらに、いくつかの食物サプリメントに関しては、曝露されなかった全血中のmRNAレベルを定量する前に、血液は食物サプリメントが普通は溶解される媒体に曝露された。

30

40

【0020】

いくつかの食物成分は、遺伝子発現を増大するか又は阻害することが見出された。しかしながら実質的な個体間変動が同定され、この変動は統計学的に有意であった。所定の個体に関して、特定の食物成分への個体の全血の曝露により誘導されるmRNA変化は、mRNAが関連する症状の予防又は治療における食物成分の潜在的有効性と相関する。正及び負の相関の両方が考えられる。正の相関は食物成分が症状に対して有効であり得るということを示し、一方、負の相関は食物成分がその個体において有効でなく、用いられるべきでないということを示す。mRNAレベルの増大又は低減は、定量される症状の種類及び定量されるmRNAの種類に依存してによって、症状に対する食物成分の潜在的有効性を示し得る。インターロイキン-2(T細胞活性化に関するマーカー)のような免疫系の

50

活性に関連した mRNA のレベルの増大は癌に対する潜在的有効性と正に相関し、一方、同一 mRNA のレベルの低減は自己免疫疾患に対する有効性と正に相関し得る。多数の食物成分に対する個体の血液のスクリーニングから得られるデータは、癌のような、定量 mRNA と関連する疾患を治療又は予防するために最適化される食物を設計するために用いられ得る。

【 0 0 2 1 】

この方法は、自然の天然産物中に含有される普遍的な活性成分を発見するための産業分野において有用である。ヘルスケアの分野では、当該方法は、個人別の食事療法の設計において新しい可能性を開く。

【 0 0 2 2 】

本発明の方法は、本発明の実施例においてより詳細に説明される、しかしながらこれらの実施例は本発明を限定するよう意図されるべきでない。

【 実施例 1 】

【 0 0 2 3 】

生理学的状態とできるだけ近い白血球機能を評価するために、本発明の方法の一実施形態は、特定の白血球集団を単離せずに、全血を用いる。抗凝固剤クエン酸塩デキストロス溶液及びエチレンジアミン四酢酸は多数の生物学的活性のための重要な構成成分であるカルシウムをキレートするので (Eggesbo et al., "LPS induced release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in EDTA or heparin anticoagulated whole blood from persons with high or low levels of serum HDL," Cytokine 1996; 8: 152-60参照)、この実施形態における抗凝固剤としてヘパリンを用いた。mRNA 転写はタンパク質合成とその後の生物学的活性の上流事象であるため、mRNA によりコードされるタンパク質に関連した生物学的活性の指標として、mRNA レベルが本発明の一実施形態で用いられる。本発明の一実施形態は、20 ~ 40% という少ない遺伝子発現における変化の同定を可能にする mRNA の定量方法を用いる (Mitsubishi M., "Absolute quantitation of mRNA in human blood leukocytes as a model for phenotypic gene expression-based diagnostics," Clin Chem, 2006参照)。

【 0 0 2 4 】

この実施例では、インターロイキン - 2 (IL - 2)、インターロイキン - 4 (IL - 4) 及び腫瘍壊死因子 - (TNF - a) のフィトヘムアグルチニン誘導性遺伝子発現を、以下のように定量した。50 µL のヘパリン化全血を、種々の食物サプリメントとともに30分間の間インキュベートした。以下のサプリメントを用いた：ビタミンA、C及びD、エピガロカテキン没食子酸塩(緑茶由来)、ゲニステイン(大豆由来)並びにクルクミン(香辛料のウコンから)。ビタミンAは、免疫系を刺激することが既知である。ビタミンCは、T細胞の活性を増大することが示されている。ビタミンDは、或る種の癌に対して防御作用を有すると思われる。エピガロカテキン没食子酸塩は強力な抗酸化剤であり、癌細胞に見出される多薬剤耐性を低減し、そして選択的に腫瘍細胞におけるアポトーシスを誘導すると思われる。ゲニステインは、抗癌活性を有することがいくつかの研究で見出されている。考え得る作用メカニズムとしては、アポトーシスの上向き調節、血管新生の阻害、DNAトポイソメラーゼIIの阻害、及びタンパク質チロシンキナーゼの阻害が挙げられる。クルクミンは、腫瘍細胞において前アポトーシス作用を有し、そしてこのような細胞中でしばしば高度に過剰発現される転写因子NF - Bの活性を妨害する。

【 0 0 2 5 】

食物サプリメントとのインキュベーション後、100 µg / mL のフィトヘムアグルチニン(PHA)を付加し、インキュベーションを37 °Cでさらに2時間継続した。各食物サプリメントの濃度(表1、注参照)は、報告された血中レベルよりわずかに高かった。次にmRNAを精製し、cDNAを合成して、TaqManリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、IL - 2、IL - 4及びTNF - のレベルを定量した(Holland, et al., "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase," Proc

10

20

30

40

50

Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7276-80参照)。

【0026】

食物成分に曝露された全血、並びに非曝露のままである全血から、mRNA及びcDNAを調製した。要するに、手製96ウエルフィルタープレートを集集プレート上に置き、そして150 μ lの5mM トリス、pH7.4を導入した。4 で1分間、120 \times gで遠心分離後、50 μ lの血液試料を各ウエルに適用し、直ちに4 で2分間、120 \times gで遠心分離し、その後、300 μ lのPBSで1回、各ウエルを洗浄し、4 で5分間、2000 \times gで遠心分離した。次に、例えば0.5%のN-ラウロイルサルコシン、4 \times SSC、10mMトリスHCl pH7.4、1mMのEDTA、0.1%のIGEPAL CA-630及び1.791 M グアニジンチオシアネートを含むし、1%の2-メルカプトエタノール(BioRad, Hercules, CA, USA)、0.5mg/mlのプロテインナーゼK(Pierce, Rockford, IL, USA)、0.1mg/mlのサケ精子DNA(5 Prime Eppendorf/Brinkmann, Westbury, NY, USA)、0.1mg/mlの大腸菌tRNA(Sigma)、表2に示した特異的なリバープライマーの各々10mMを含むカクテル、及び標準RNA34オリゴヌクレオチドを補ったストック溶解緩衝液60 μ lをフィルタープレートに導入し、その後、37 で10分間インキュベートした。次にフィルタープレートをオリゴ(dT)固定化マイクロプレート(GenePlate, RNAture)上に載せ、4 で5分間、2000 \times gで遠心分離した。4 で一晩貯蔵後、マイクロプレートを100 μ lの単純溶解緩衝液で3回、その後、150 μ lの洗浄緩衝液(0.5MのNaCl、10mMのトリス、pH7.4、1mMのEDTA)で4 で3回、洗浄した。1 \times RT-緩衝液、各々1.25mMの各dNTP、4単位のrRNasin及び80単位MMLV逆転写酵素(Promega)(プライマーなし)を含む緩衝液30 μ lを添加し、37 で2時間インキュベートすることにより、各ウエル中でcDNAを直接合成した。特異的プライマーにより開始されたcDNAは溶液中に存在し、そしてオリゴ(dT)により開始されたcDNAはマイクロプレート中に固定されたままであった。TaqMan PCRのために、結果的に生じた4 μ lのcDNA溶液を384ウエルPCRプレートに直接移して、これに、5 μ lのTaqMan汎用マスターミックス(ABI)及び1 μ lのオリゴヌクレオチドカクテル(各々15 μ Mのフォワード及びリバープライマー、及び3~6 μ MのTaqManプローブ)を導入し、そしてPCRをPRISM 7900HT(ABI)中で、95 で10分を1サイクル、その後、95 で30秒、55 で30秒及び60 で1分を45サイクル実行した。SYBRグリーンPCRも用い得る。このために、cDNAを水中で3~4倍に希釈し、4 μ lのcDNA溶液を384ウエルPCRプレートに直接移して、これに、5 μ lのマスターミックス(BioRad, Hercules, CA)及び1 μ lのオリゴヌクレオチドカクテル(各々15 μ Mのフォワード及びリバープライマー)を適用し、そしてPCRをPRISM 7900HT(ABI)中で、95 で10分を1サイクル、その後、95 で30秒及び60 で1分を45サイクル実行した。各遺伝子を別個のウエル中で増幅した。分析用ソフトウェア(SDS, ABI)により、Ctを確定した。

【0027】

それぞれT細胞活性化、IgEカスケード(有力なアレルギー反応)の活性化及び細胞障害性のマーカーとして、IL-2、IL-4及びTNF- α を選択した。正確な統計学的分析(スチューデントt検定)のために、全血の三重アリコートを出発物質として用いた。データをサイクル閾値(Ct)として表わしたが、これは或る量のPCR産物を生成するために必要とされるPCRのサイクルであり(図1)、Ctは非刺激試料のCt値をPHA刺激試料の値から差し引いたものであり、そしてCtは非処理対照試料のCt値を食物サプリメント処理試料の値から差し引いたものである(表1)。Ctは対数スケールであるため、1 Ct又はCtは二倍又は半分の量を意味し、そして負のCt値は発現の増大を意味する。

【0028】

図1は、全血中のPHA誘導性遺伝子発現を示す。50 μ Lのヘパリン化全血を、種々

10

20

30

40

50

の濃度 (A) 又は $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ (B) の P H A とともに 2 時間 (A) 若しくは種々の長さの時間 3 7 でインキュベートし、次に I L - 2 ()、I L - 4 () 及び T N F () のレベルを上記のように定量した。系中にスパイクされた標準人工 R N A (R N A 3 4) () も定量した。各データは、全血の三重アリコートからの平均 $C t \pm$ 標準偏差であった。

【 0 0 2 9 】

図 1 に示すように、P H A は約 $10 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の $E C_{50}$ で、用量依存的に I L - 2、I L - 4 及び T N F - mRNA 発現を誘導した (図 1 A)。mRNA の誘導は迅速で、そして約 30 ~ 60 分後にプラトーに達した (図 1 B)。P H A それ自体に及ぼす二次作用を回避するために、P H A 用量及びインキュベーション期間を、最大レベル ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 120 分) に固定した。表 I に示したように、食物サプリメントの作用は各 mRNA に関して実質的個体変動を示した。 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の P H A での遺伝子発現は過剰飽和されたため (図 1 A)、 ~ 0.65 C T 未満の変化は顕著で、統計学的有意を有した。興味深いことに、緑茶エピガロカテキン没食子酸塩 (E G C G) は 7 つの個体すべてにおいて P H A 誘導性 I L - 4 発現を増強したが、しかし I L - 2 及び T N F - に対するその作用は個体変動を示した (表 1)。I L - 2 に関しては、7 人のうち 3 例が減少を示し、1 人が増大を示し、そして 3 人が変わらなかった (表 I)。ウコン (Turmeric curcumin) (Cur.) は、2 個体において I L - 2、I L - 4 及び T N F - 発現を有意に低減したが、しかし他の 5 人は変化を示さなかった (表 I)。ビタミン A、C 及び D はすべて、1 ~ 3 を除いて、I L - 4 発現を増強した (表 I)。大豆ゲニステイン (表 1 中の標識「 G e n 」) は主に不活性であったが、しかし中には有意の応答を示す個体もあった (表 I)。

10

20

【 0 0 3 0 】

【表 1】

表 1. ex vivo での有糸分裂誘導性遺伝子発現に及ぼす食物サプリメントの作用

mRNA	食物サ プリメント	被検者 1	被検者 2	被検者 3	被検者 4	被検者 5	被検者 6	被検者 7
		$\Delta \Delta Ct$ (平均±標準偏差, n=3)**						
IL-2	VA	-0.98±0.04	-1.61±0.32	0.49±0.33	-0.29±0.21	-1.16±0.02	-0.26±0.20	-0.66±0.35
	VC	-0.18±0.54	0.00±0.60	1.04±0.21	1.47±0.19	-0.80±0.13	1.02±0.05	0.07±0.27
	VD	-0.13±0.07	0.06±0.40	0.00±0.15	-0.31±0.30	-0.45±0.61	-0.55±0.14	-0.86±0.12
	EGCG	-0.1±0.02	-0.67±0.48	1.32±0.54	0.81±0.11	-0.99±0.33	1.1±0.14	-0.41±0.29
	Gen.	-0.41±0.53	0.90±0.44	0.11±0.23	0.08±0.04	-0.02±1.03	0.00±0.27	-0.28±0.20
	Cur.	1.47±0.59	2.51±0.23	0.31±0.14	0.33±0.27	0.03±0.20	0.01±0.14	-0.01±0.21
IL-4	VA	-2.14±0.08	-1.56±0.34	-0.15±0.40	-0.98±0.41	-1.24±0.13	-0.65±0.09	-1.15±0.39
	VC	-2.20±0.72	-0.86±0.62	-0.77±0.40	-0.43±0.17	-1.22±0.17	-0.77±0.09	-1.30±0.22
	VD	-0.17±1.0	0.06±0.15	-0.77±0.40	-0.43±0.17	-1.22±0.17	-0.77±0.09	-1.30±0.22
	EGCG	-1.83±0.20	-1.56±0.46	-0.82±0.34	0.92±0.25	-1.37±0.3	-0.9±0.01	-1.47±0.41
	Gen.	-1.83±0.20	-1.56±0.46	-0.82±0.34	-1.04±0.16	-0.45±0.34	-0.34±0.02	0.28±0.25
	Cur.	1.27±0.78	3.09±0.15	-0.01±0.07	0.10±0.27	0.00±0.20	0.10±0.13	0.52±0.26
TNF α	VA	-1.56±0.11	-0.57±0.94	0.51±0.03	-0.08±0.29	-0.76±0.34	-0.50±0.10	-1.11±0.24
	VC	-1.82±0.65	0.10±1.14	-0.04±0.27	0.09±0.16	-1.21±0.14	-0.48±0.04	-0.40±0.15
	VD	-0.25±1.47	0.14±0.40	-0.04±0.27	0.09±0.16	-1.21±0.14	-0.48±0.04	-0.40±0.15
	EGCG	-1.14±0.32	-0.63±0.66	0.33±0.62	-0.16±0.12	-1.22±0.29	-0.66±0.14	-0.94±0.46
	Gen.	-1.14±0.32	-1.01±0.04	0.33±0.62	-0.16±0.12	-0.32±0.54	-0.02±0.20	-0.17±0.18
	Cur.	3.52±1.84	3.64±2.26	0.83±0.60	0.45±0.15	0.13±0.17	0.07±0.01	0.12±0.21

* VA: ビタミンA (最終濃度=100nM)、VC: ビタミンC (10 μ g/mL)、VD: ビタミンD (100nM)、EGCG: エピガロカテキン没食子酸

塩(緑茶) (10 μ M)、Gen: ゲニステイン (大豆) (2 μ M)、Cur: クルクミン (ウコン) (200nM)。

** 太字: 有意の増強、下線: 有意の阻害。

【表 2】

表 2. 遺伝子プライマー配列

mRNA	TAQMANプローブ	フォワードプライマー	リバースプライマー
IL-2	CTGATGAGAC AGCAACCATT GTAGAATTTC TGAA	GAACTAAAGG GATCTGAAAC AACATTC	TGTTGAGATG ATGCTTTGAC AAA
IL-4	CGATTTCCTGAA ACGGCTCGACA GG	CACAGGCACA AGCAGCTGAT	CCTTCACAGG ACAGGAATTC AAG
TNF- α	ACTTTGCCGA GTCTGGGCAGG	TCAATCGGCC GACTATCTC	CAGGGCAATG ATCCCAAAGT
CD32A	CTGAACCCCA GGGCACCTAC TGACG	GCTGACGGCG GCTACATG	GAGGAAGAGT CAGGTAGATGT TTTTATCA
p21	CCACTCCAAA CGCCGGCTGA TC	TTCTGCTGTCT CTCCTCAGATT TCT	GGATTAGGGC TTCCTCTTGG A
PUMA	CCCCGCCCA TCAATCCA	GGGCCCAGACT GTGAATCCT	ACGTGCTCTC TCTAAACCTA TGCA
FasL	FAM-CTGAGCC ATCGGTGAAAC TA ACAGATAAGC A-TAMRA	TGGCAGCATC TTCACTTCTA AATG	GAAATGAGTC CCCAAACAT CTCT
TNFSF3		AGGGTGTACGT CAACATCAGTC A	CACGGCCCCAA AGAAGGT
TNFSF15		TGCGAAGTAGG TAGCAACTGGT T	CCATTAGCTTG TCCCCTTCTTG
RNA34	CCAAGGCCCA GCCCTCACAC A	AGCCCCCTCAC TCCCAA	GGGTGCTGTGC TTCTGTGAAC

10

20

30

【実施例 2】

【0032】

本発明の方法のこの実施例では、一個体の白血球でCD32A mRNAの発現を評価した。このmRNAはIgG Fc受容体をコードし、そして抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)に関連する。CD32A mRNAレベルを増大する食物成分は、個体のADCC活性を引き上げ、したがって抗癌活性を直接提供すると予測される。或いはこのような食物成分は、循環白血球中のIgG Fc受容体mRNAレベルを同時に増大することにより、トラスツズマブ(ヘルセプチン)又はリツキシマブ(リツキサン)のような近年開発された高価なモノクローナル抗体ベースの治療の効果を増強し得る。CD32A mRNAレベルの測定に上記の方法を用いたが、但し、フィトヘムアグルチニンのような刺激剤は用いなかった。プライマー配列は、上記の表2に示されている。

40

【0033】

用いた食物サプリメントは：ビタミンA(「VA」；100nmol/L、最終濃度)、ビタミンC(「VC」、10mg/mL)、ビタミンD(「VD」、100nmol/L)、ビタミンE(「VE」；1IU/mL)、エピガロカテキン没食子酸塩(緑茶から得られるカテキンポリフェノール)(「EGC」又は「カテキン」；10mmol/L)、 α -リノール酸(植物油中の多不飽和脂肪酸)(「rLA」；1mg/mL)、ゲニステイン(大豆)(「Gen」；2mmol/L)、クルクミン(「Cur」；香辛料ウコン)(200nmol/L)、クエルセチン(「Que」；植物色素フラボノイド)(

50

100 nmol/L)、熟成ニンニク(Kyolic(「Kyol」)、全長)、アガリクス(「Agar」; Kyowa、全長)、プロポリス(「Propo」; 1:10希釈)、メシマコブ(「Mesh」)、ノニ抽出物(「Noni」)及びサメ肝油(「Alk」; アルコキシグリセロール)(非同定用量)。これらの食物成分のすべてが、免疫系若しくは癌又は両方に及ぼす作用を報告した。上記の実施例1で考察した食物成分のほかに、ビタミンEは免疫食作用に及ぼす強力な作用を有することが既知であり、そして感染に対する感受性を低減するに際して、特にストレス下で、動物に対して有益であることが示されている。リノール酸の欠如は、免疫系欠陥を生じる。それは免疫支持プロスタグランジンの産生における中間体である。クエルセチンは、ラットにおいてナチュラルキラー細胞活性を引き上げ、そして肥満細胞、好塩基球及び好中球の脱顆粒を阻止することが示されている。熟成ニンニク抽出物は、免疫系強化物質として数十年間用いられてきた。アガリクス茸、例えばアガリクス・ブラゼイ(Agaricus blazei)の抽出物は、抗腫瘍作用を有することが示されている。蜂の巣から得られる抗生物質であるプロポリスはコーヒー酸フェネチルエステルを含有し、これは、動物モデルにおいて癌形成を防止することが示されている。プロポリスは、アポトーシスのプロセスを増大することにより、癌細胞増殖を阻害する。メシマコブ(Phellinus linteus)は、抗腫瘍ベータ・グルカンを含有する重要な薬用茸である。その水性抽出物は、腫瘍の増殖を抑制することが示されている。ノニ抽出物は、ヤエヤマアオキ(Morinda citrifolia)の果実から得られ、そして肺腫瘍を有するマウスの生存持続期間を有意に延ばすことが示されているノニ-pptと呼ばれる多糖物質に富んだを含有する。サメ肝油中に見出されるもののようなアルコキシグリセロールは、抗癌治療及び免疫増強剤として用いられてきた。用いられ得るさらなる食物成分はフコイダンであり、これは海草から得られ、そして腫瘍細胞侵襲を阻害し、免疫系構成成分のレベルを引き上げることが示されている。この実施例では、リン酸緩衝生理食塩水を対照として用いた。

10

20

30

40

50

【0034】

インキュベーションは、37で3時間であった。次にCD32A mRNAを定量した。その結果を図2に示す。白丸は、 $p < 0.05$ を示す。各記号は、50 mLヘパリン化全血の三重アリコートからの平均 \pm S.D.である。ゲニステインの血漿濃度は、1回的大豆ミール後8時間で4 mmol/Lであることが報告されている。したがって全血中2 mmol/Lゲニステインを用いた3時間インキュベーションは、合理的に達成可能である。

【0035】

この個体における結果は、食物成分ビタミンD & E、エピガロカテキン没食子酸塩、リノール酸、ゲニステイン、プロポリス及びノニ抽出物が抗癌活性のために最適化された食物中でこの個体に用いるのに適している、ということを示す。

【実施例3】

【0036】

この実施例では、4個体のヘパリン化全血を、37で1~2時間、種々の食物サプリメントとともにプレインキュベートし(実施例2の場合と同一血中濃度で)、次に1 Gy放射線で刺激した。次に血液を、37で2時間インキュベートした。次に実施例1に記載した方法を用いて、p21 mRNAのレベルを評価した。プライマー配列を表2に示す。DNA損傷応答に及ぼす各食物成分の作用を示すアポトーシスマーカーとして、p21 mRNAを選択した。p21に代わるものとして、PUMA(アポトーシスのp53上向き調節化モジュレーター)mRNAを定量し得る。

【0037】

結果を図3に示す。この図において、白丸は放射線刺激を用いずに得られた値を示し、一方、黒丸は、放射線が用いられたことを示す。各記号は、50 mLヘパリン化全血の三重アリコートからの平均 \pm S.D.である。

【0038】

図3に示したように、食物成分に対する個体応答は、広範に変化した。このような結果

は、腫瘍細胞におけるアポトーシスを促すことにより癌を治療するか又は防止するために最適化される個々の食物を設計するために用いられ得る。

【実施例 4】

【0039】

この実施例では、2 個体のヘパリン化全血を、37 で 1 ~ 2 時間、種々の食物サプリメントとともにプレインキュベートし（実施例 2 の場合と同一血中濃度で）、次にフィトヘムアグルチニンで刺激した。次に血液を、37 で 2 時間インキュベートした。次に実施例 1 に記載した方法を用いて、Fas リガンド (FasL) のレベルを評価した。プライマー配列を表 2 に示す。アポトーシスの促進に及ぼす各食物成分の作用を示すアポトーシスマーカーとして、Fas リガンド mRNA を選択した。

10

【0040】

結果を図 4 に示す。この図において、中黒記号は対照値と有意に異なる値を示し、斜線記号は、対照値を上回る有意の増大を表わす値を示し ($p < 0.05$)、そして中白記号は、対照値と比較して有意の低減を表わす値を示す ($p < 0.05$)。各記号は、50 mL ヘパリン化全血の三重アリコートからの平均 \pm S.D. である。

【0041】

図 4 に示したように、食物成分に対する個体応答は、大幅に変化した。このような結果は、腫瘍細胞におけるアポトーシスを促すことにより癌を治療するか又は防止するために最適化される個々の食物を設計するために用いられ得る。

20

【実施例 5】

【0042】

この実施例では、2 例の個体のヘパリン化全血を、37 で 30 分間、種々の食物サプリメントとともにプレインキュベートし（実施例 2 の場合と同一血中濃度で）、次に 1.2 μ L の熱凝集性 IgG で刺激した。63 で 15 分間、PBS 中で 20 mg/mL ヒト IgG (Sigma, St. Louis) を加熱することにより、熱凝集性 IgG (HAG) を調製した (Ostreiko et al., Immunol Lett. 15, 311 (1987) 参照 (この記載内容は参照により本明細書中で援用される))。次に血液を、37 で 2 時間インキュベートした。次に、実施例 1 に記載した方法を用いて、TNFSF3 及び TNFSF15 mRNA のレベルを評価したが、mRNA を定量するために SYBR グリーン PCR は用いなかった。TNFSF3 は、リンフォトキシン - アルファ (LT アルファ)、腫瘍壊死因子 - ベータ (TNF - ベータ) 及びリンフォトキシン - ベータ (LT ベータ) としても既知である。分泌 LT アルファは、可溶性ホモ三量体 LT アルファ 3 として集合する。分泌 LT アルファはまた、膜会合 LT ベータと複合体を形成して、2 つの型のヘテロ三量体 LT アルファ 1 / ベータ 及び LT アルファ 2 / ベータ 1 を生じる。TNFSF3 は活性化ナイーブ CD4 細胞、非分極 IL - 2 分泌エフェクター 及び Th1 エフェクター により発現され、そして TNFSF3 受容体はいくつかの腫瘍細胞により発現される。TNFSF15 は TL1A としても既知であり、そして TNF スーパーファミリーに属する II 型膜貫通タンパク質である。TNFSF15 は、内皮細胞中で主に発現され、その発現は TNF - 及び IL - 1 により誘導可能である。TNFSF15 は、デス受容体 3 (DR3) (これは現在、TNF 受容体スーパーファミリーメンバー 25 (TNFRSF25) と呼ばれる) と高親和性で結合する。細胞状況によって、TNFSF15 による DR3 の結合は、2 つのシグナル伝達経路 (転写因子 NF - κ B の活性化又はカスパーゼ 及び アポトーシスの活性化) のうちの一方を誘発し得る。

30

40

【0043】

プライマー配列を上記の表 2 に示す。これらの mRNA を、免疫系活性及びアポトーシス応答に及ぼす各食物成分の効果を示すアポトーシスマーカーとして選択した。

【0044】

結果を図 5、図 6 及び図 7 に示す。図 5 において、白丸は PBS 対照を用いて個体 1 から得られた TNFSF3 値を示し、一方、黒丸は、HAG 刺激を用いた場合の個体で得られた TNFSF3 値を示す。さらに、灰色陰影丸は、HAG がクエルセチンに曝露された

50

血液中のTNFSF3発現を誘導したことを示す。TNFSF3受容体はいくつかの癌細胞で発現されるため、この遺伝子の発現の増大はこれらの細胞のアポトーシスを増大し、したがってクエルセチンは、この個体に関して抗癌特性を有する食物中に含入するのに良好な候補である。白及び黒三角は、個体2からの値と同じ値を示す。図5におけるY軸値は、サイクル閾値(Ct)を示す。各記号は、50mLヘパリン化全血の三重アリコートからの平均±S.D.である。図6及び図7は、2つの個体(図6)における、並びにビタミンAのみの投与による5つのさらなる個体(図7)におけるTNFSF15の定量の結果を示す。図6から分かるように、ビタミンAはTNFSF-15のベースライン発現を低減し、そして1例(個体1)におけるHAGに及ぼす作用を排除した。図7に示した追跡調査データでは、ビタミンAは、個体1における、そして全体的には7個体のうちの2個体(両方の図の個体1)において、HAG誘導性TNFSF15発現に及ぼす阻害作用を示した。これらの個体1のような個体では、ビタミンAは、免疫系が自己免疫疾患のように不適切に活性化される症状を治療するか又は防止するに際して有用であり得る。

10

【0045】

上記の実施例では、血中レベルが確定されている食物サプリメントを用いた。しかしながら当該方法の他の実施形態では、天然物質の種々の自然抽出物をスクリーニングして、活性成分を同定し得る。適切なmRNA標的を選択することにより、種々の機能が取り扱われ得る。特定の症状に関する食物成分の潜在的有効性を評価するために定量するための適切なmRNAの選択は、十分に当業者の能力内である。結果は、生理学的*ex vivo*遺伝子発現分析が個体における食物サプリメントの効能の同定のための適切な方法である、ということを実証している。高濃度の食物サプリメントにおける負の応答は、採血時点で検査される食物サプリメントによる、白血球機能の望ましい増大又は阻害が起こり得ないだろうことを示唆し得る。この研究は特定の食物サプリメントを用いたが、しかし当該方法は、他の食物成分、例えば特定の食物に同等に適用可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】全血のフィットヘムアグルチニン刺激後の白血球中のIL-2、IL-4及びTNF-mRNAのレベルの測定結果を示す図である。

【図2】種々の食物成分への全血の曝露後の白血球中のCD32A mRNAのレベルの測定結果を示す図である。

30

【図3】種々の食物成分への全血の曝露及び放射線刺激後の白血球中のp21 mRNAのレベルの測定結果を示す図である。

【図4】種々の食物成分への全血の曝露及びフィットヘムアグルチニン刺激後の白血球中のFasリガンドmRNAのレベルの測定結果を示す図である。

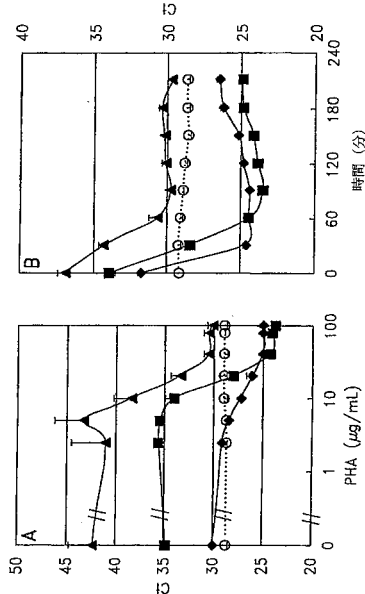
【図5】種々の食物成分への全血の曝露及び熱凝集性IgG刺激後の白血球中の腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー3のmRNAのレベルの測定結果を示す図である。

【図6】種々の食物成分への全血の曝露及び熱凝集性IgG刺激後の白血球中の腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー15のmRNAのレベルの測定結果を示す図である。

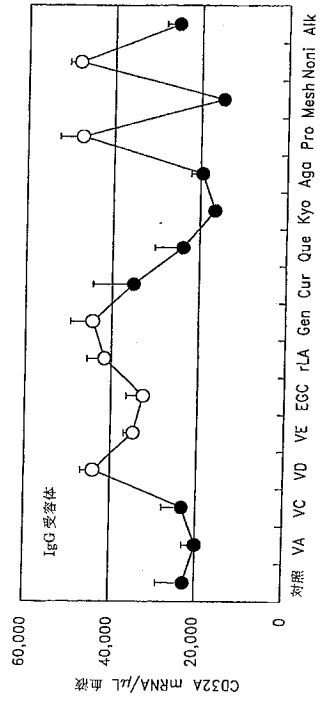
【図7】種々の食物成分への全血の曝露及び熱凝集性IgG刺激後の白血球中の腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー15のmRNAのレベルの測定結果を示す図である。

40

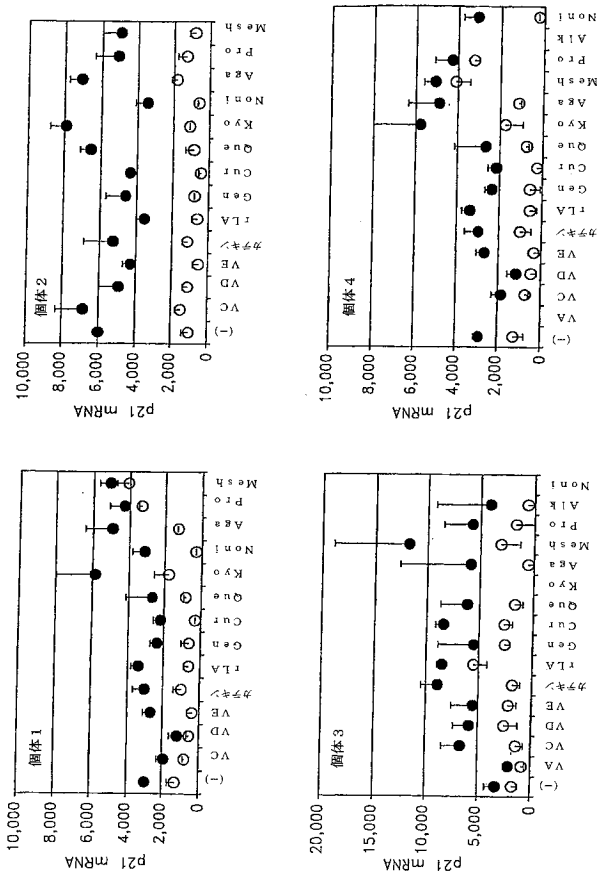
【 図 1 】



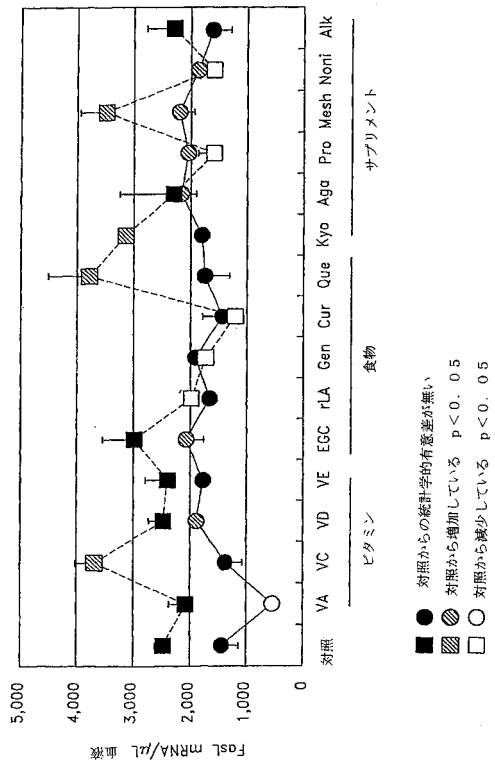
【 図 2 】



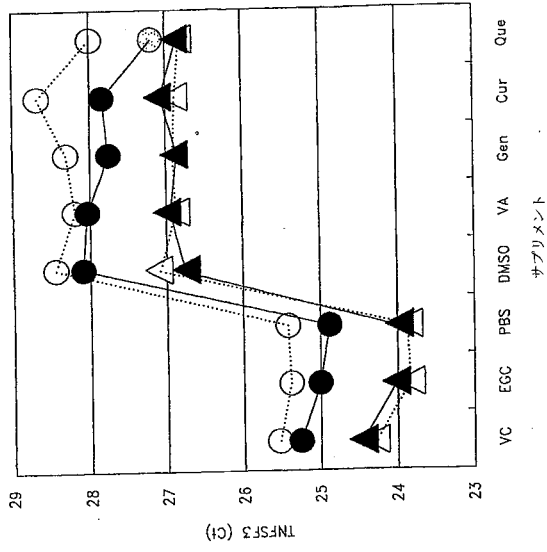
【 図 3 】



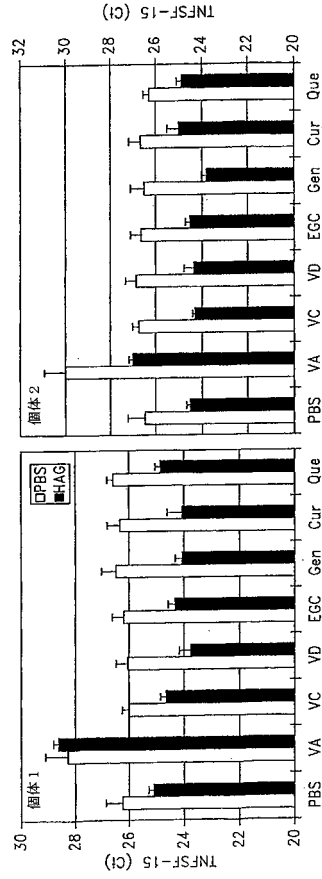
【 図 4 】



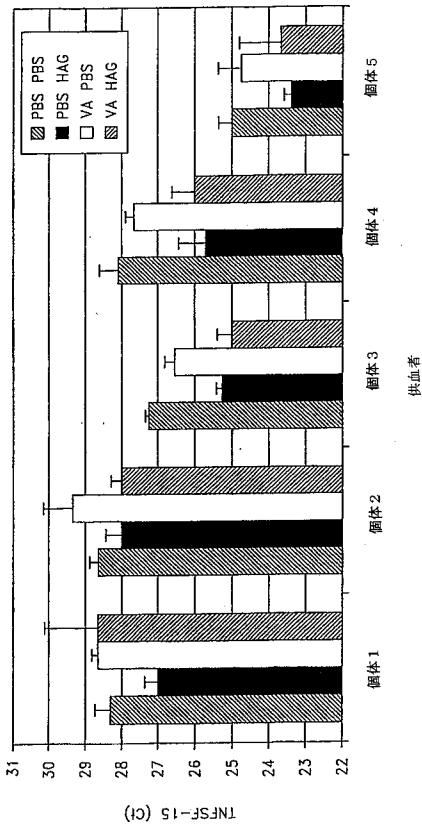
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【手続補正書】

【提出日】平成19年1月12日(2007.1.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌又は自己免疫疾患に対する個々の哺乳類における食物成分の潜在的有効性の評価方法であって、

in vitroで哺乳類の全血を食物成分に曝露する工程、

前記曝露後に、前記全血中の、癌又は自己免疫疾患と関連するmRNAの量を測定する工程、及び

測定結果に基づいて哺乳類における前記食物成分の潜在的有効性を同定する工程を含み、前記mRNAの量の変化が前記食物成分の潜在的有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項2】

曝露されなかった全血中に存在する前記mRNAの量が測定され、曝露されなかった全血中で測定された該mRNAの量を曝露された全血中で測定された前記mRNAの量と比較することにより前記mRNAの量の変化を確定する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記曝露後、前記全血を刺激剤に曝露する工程、及び

曝露されなかった全血から得られる測定結果を、前記食物成分及び前記刺激剤への曝露後に得られる測定結果と比較することを含む前記食物成分の潜在的有効性を評価する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

前記刺激剤がフィトヘムアグルチニン、放射線及び熱凝集性IgGから成る群から選択される、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記mRNAの量が測定される前に前記曝露されなかった全血が対照媒体に曝露される、請求項2記載の方法。

【請求項6】

前記対照媒体がリン酸緩衝生理食塩水又はジメチルスルホキシドである、請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記全血を曝露することがヘパリンの付加を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記全血が5時間以下の間刺激される、請求項3記載の方法。

【請求項9】

前記全血が30分～4時間刺激される、請求項8記載の方法。

【請求項10】

前記mRNAが、インターロイキン-2、インターロイキン-4、腫瘍壊死因子、IgGFc受容体、p21、Fasリガンド、腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー3及び腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー15をコードするmRNAから成る群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項11】

前記食物成分が、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフ

コイダンから成る群から選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 2】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を前記食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、

前記曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球中の I g G F c 受容体をコードする m R N A の量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性を同定する工程

を含み、前記 m R N A の量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を前記食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、

哺乳類の前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血を放射線で刺激する工程、

前記刺激後に、前記曝露された全血及び曝露されなかった全血の血球中の p 2 1 又は P U M A 遺伝子産物をコードする m R N A の量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

前記比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性を同定する工程

を含み、前記 m R N A の量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を前記食物成分に 4 時間以下の間曝露する工程、

哺乳類の前記曝露された全血及び曝露されなかった全血をフィトヘムアグルチニンで刺激する工程、

前記刺激後に、前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球中のインターロイキン - 2、インターロイキン - 4、腫瘍壊死因子 及び F a s リガンドから成る群から選択されるタンパク質をコードする m R N A の量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

前記比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性を同定する工程

を含み、前記 m R N A の量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

ビタミン A、ビタミン C、ビタミン D、ビタミン E、エピガロカテキン没食子酸塩、g-リノール酸、ゲニステイン、クルクミン、クエルセチン、熟成ニンニク、アガリクス、

プロポリス、メシマコブ、ノニ抽出物、アルコキシグリセロール及びフコイダンから成る群から選択される食物成分の哺乳類における潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性の測定方法であって、

哺乳類の全血を食物成分に4時間以下の間曝露する工程、

哺乳類の前記曝露された全血及び曝露されなかった全血を熱凝集性IgGで刺激する工程、

前記刺激後に、前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球中の腫瘍壊死因子スーパーファミリー3及び腫瘍壊死因子スーパーファミリー15から成る群から選択される遺伝子産物をコードするmRNAの量を測定する工程、

前記曝露された全血及び前記曝露されなかった全血の血球で得られる測定結果を比較する工程、及び

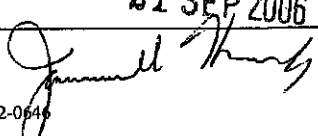
前記比較結果に基づいて前記食物成分の潜在的抗癌有効性又は潜在的抗自己免疫疾患有効性を同定する工程

を含み、前記mRNAの量の変化が前記食物成分の有効性と相関することを特徴とする方法。

【請求項16】

前記mRNAが白血球mRNAである、請求項1記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US06/16376
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 36/00(2006.01),31/593(2006.01),31/355(2006.01),31/34(2006.01),31/07(2006.01),49/00(2006.01) A01N 65/00(2006.01) USPC: 424/9.2,725;514/168,458,474,725,904,936 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) U.S. : 424/9.2,725;514/168,458,474,725,904,936 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubMed, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0006613 (Shyjan et al.) 17 January 2002 (17.01.2002) Page 3 [0027]-[0031]; page 5, [0049]; page 7, [0067]-[0074]; page 12, [0127]	1
Y	US 2002/0106684 (Kopreski, MS) 8 August 2002 (8.08.2006), page 3, [0012]; page 4, [0023-0026]; claims 45 and 49	1, 11
Y	Ames, B.N. and Wakimoto, P. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? Nature 202, 2, 694-704.	1, 11
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 15 August 2006 (15.08.2006)		Date of mailing of the international search report 21 SEP 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Johann Richter Telephone No. 571-272-0646 

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(72)発明者 ミツハシ マサト

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 1 4 アーバイン フェアードーン 1 1

Fターム(参考) 2G045 AA13 BB34 CA25 DA14 FB02

4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ16 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42

QR50 QR62 QR90 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008538930A5	公开(公告)日	2009-02-26
申请号	JP2008509198	申请日	2006-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	日立化成研究中心公司 日立化成工业株式会社		
[标]发明人	ミツハシマサト		
发明人	ミツハシ マサト		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15		
CPC分类号	A61K36/07 A61K31/07 A61K31/34 A61K31/355 A61K31/593 A61K36/746 A61K36/8962 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/5308		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BB34 2G045/CA25 2G045/DA14 2G045/FB02 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/ /QQ03 4B063/QQ16 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR62 4B063/QR90 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/ /QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	60/675580 2005-04-28 US		
其他公开文献	JP2008538930A JP4945554B2		

摘要(译)

公开了一种单独调节食品成分如补充剂的给药方法。在该方法中，整个哺乳动物血液暴露于食物成分。暴露于膳食组分之后，在某些情况下后连接于疾病状态的标志物的mRNA的暴露的血液水平的进一步刺激白细胞进行测定。通过比较暴露于未暴露的血细胞中的mRNA水平后，可以确定哺乳动物中存在的食物成分的作用是什么。通过针对大量可能的食物成分筛选哺乳动物血液，可以开发一组最佳食物成分，其针对特定哺乳动物进行调整以治疗或预防疾病状态。