

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2013/118606

発行日 平成27年5月11日 (2015. 5. 11)

(43) 国際公開日 平成25年8月15日 (2013. 8. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 31/10 (2006.01)	A61K 31/10	2G045
A61P 33/06 (2006.01)	A61P 33/06	4B063
C12Q 1/06 (2006.01)	C12Q 1/06	4C206
GO1N 33/50 (2006.01)	GO1N 33/50	Z
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

出願番号 特願2013-557467 (P2013-557467)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2013/051829
 (22) 国際出願日 平成25年1月29日 (2013. 1. 29)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-25007 (P2012-25007)
 (32) 優先日 平成24年2月8日 (2012. 2. 8)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

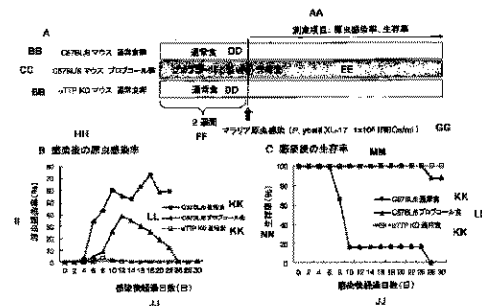
(71) 出願人 301021533
 独立行政法人産業技術総合研究所
 東京都千代田区霞が関1-3-1
 (71) 出願人 504300088
 国立大学法人帯広畜産大学
 北海道帯広市稲田町西2線11番地
 (74) 代理人 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 七里 元督
 大阪府池田市緑丘1丁目8番31号 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター内
 (72) 発明者 鈴木 宏志
 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マラリアの予防または治療薬及びそのスクリーニング方法

(57) 【要約】

トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を含有するマラリアの予防または治療薬が提供される。



AA Measurement items: protozoal infection rate, survival rate
 BB C57BL/6 mice - normal diet group, αTTP KO mice - normal diet group
 CC C57BL/6 mice - probucol group
 DD Normal diet
 EE Probucool (1% w/w)-containing diet
 FF Two weeks
 GG Malaria protozoal infection (P. yoelii XL-47 1x10⁵ IRBC/mL)
 HH Post-infection protozoal infection rate
 II Protozoal infection rate (%)
 JJ Days elapsed since infection (days)
 KK C57BL/6 - normal diet, αTTP KO - normal diet
 LL C57BL/6 - probucol diet
 MM Post-infection survival rate
 NN Survival rate (%)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を含有するマラリアの予防または治療薬。

【請求項 2】

前記化合物が、ABCA1トランスポーター阻害剤、TTP阻害剤、トコフェロール吸収抑制剤、トコフェロール代謝促進剤からなる群から選ばれる、請求項 1 に記載のマラリアの予防または治療薬。

【請求項 3】

前記化合物がプロブコールである、請求項 1 又は 2 に記載のマラリアの予防または治療薬。 10

【請求項 4】

細胞内に取り込まれるトコフェロールエステルを含む培地中で被験化合物の存在下に細胞を培養し、細胞内でエステル加水分解されたトコフェロールの細胞外への放出を評価する工程を有することを特徴とする、マラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 5】

前記トコフェロールエステルが標識されたトコフェロールエステルである、請求項 4 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】

被験化合物の存在下にTTPの細胞膜への移動を評価する工程を有することを特徴とする、マラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法。 20

【請求項 7】

トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を、マラリアの治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、マラリアの治療または予防方法。

【請求項 8】

マラリアの予防または治療薬を製造するための、トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の使用。

【請求項 9】

マラリアの予防または治療薬として使用するためのトコフェロールの血中濃度を低下させる化合物。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マラリアの予防または治療薬に関する。

【背景技術】

【0002】

マラリアはマラリア原虫が生体内に感染することによって引き起こされる病気であり、ワクチンや治療薬の研究が行なわれている。マラリアの特効薬であるキニーネよりも副作用の弱いクロロキンが開発されたが、クロロキンに耐性を持つ原虫が増えていること、抗原が一定でないためワクチンの製造が困難であるなどの理由によりキニーネもいまだに使用されており、決定的な治療法は確立されていない。キニーネ、クロロキン、クロトリマゾールなどの抗マラリア薬の作用機序は、ヘムに対する錯体形成であることが非特許文献 1 に記載されている。 40

【0003】

非特許文献 2 には、過去の疫学的観察では、微量栄養素、特にビタミン E の欠乏が原虫感染に抵抗性を誘導する可能性を示唆していた。非特許文献 3、4 では血液中のビタミン E (トコフェロール) レベルを調節する蛋白質であるトコフェロールトランスフェロプロテイン (TTP) の欠損したマウスの体内のトコフェロール量が減少し、ネズミ 50

マラリア原虫感染症に対する耐性を獲得することが記載されている。

【0004】

ビタミンEは多くの食物に比較的多量に含まれることから、ビタミンE欠乏の誘導は困難であり、原虫感染の予防あるいは治療のためにビタミンE欠乏を利用することは非現実的と考えられていた。

【0005】

一方、非特許文献5では、高脂血症治療薬であるプロブコールは、肝臓から血漿中へトコフェロールを放出するATP バインディングカセットトランスポーターA1 (ABCA1) 蛋白質を阻害する活性を有し、マウスへのプロブコール経口投与により血漿中 トコフェロール濃度を低下できることを記載している。しかしながら、プロブコールを投与して血漿中の トコフェロール濃度を低下させても赤血球中の トコフェロール量はほとんど変化しない。

10

【0006】

非特許文献6は、プロブコールを投与した患者が平均14%の血漿中ビタミンE濃度の減少が見られたことを開示しているが、この14%の減少は個人差よりも少なく、プロブコールがビタミンEの血漿中濃度を有意に低下できることは知られていなかった。

【0007】

非特許文献7は、クロロキンが TTP媒介 トコフェロール分泌を抑制することが記載されているが、クロロキンの作用機序は上記のように鉄との錯体形成が関与すると考えられていたので、非特許文献7は、クロロキンの新たな抗マラリア作用機序を開示しているとは認識されていなかった。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】 N. T. Huy et al. J. Biol. Chem., 2002;277:4152

【非特許文献2】 Shankar AH. J Infect Dis. 2000;182 Suppl 1:S37 53.

【非特許文献3】 Herbas MS, Suzuki H. et al. Am J Clin Nutr. 2010;91:200 7

【非特許文献4】 Herbas MS, Shichiri M, Suzuki H. et al. Malar J. 2010;9:101

【非特許文献5】 Shichiri M. et al. J Nutr Biochem. 2010;21:451 6

【非特許文献6】 Elinder LS et al. Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 1995;15:1057 6

30

3.

【非特許文献7】 M. Horiguchi et al. Genes to Cells, 2003;8:789 800

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、副作用がなく、かつ、マラリアの発症を予防することができ、マラリアに罹患した後で投与しても治療効果を有するマラリアの予防または治療薬及びそのスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

従来、 TTP欠損マウス及び ビタミンE (トコフェロール)が欠乏したヒトにおいて、マラリア耐性を獲得できることが示唆されていたが、これらの場合、生体内のビタミンE (トコフェロール)の総量が低下しているため、マラリア原虫の標的である赤血球中のビタミンE (トコフェロール)量が同様に低下しているため、これによりマラリア耐性を獲得できたものと考えられていた。

40

【0011】

本発明者らは、血漿中の トコフェロール濃度を低下できるが、赤血球中のビタミンE (トコフェロール)量がほとんど変化しないプロブコールについてマラリア治療効果を調べたところ、意外にも標的の赤血球の状態は変化していないにもかかわらずマラリアによる死亡率を劇的に低下できることを見出し、さらに検討して本発明を完成した。

50

【0012】

TTP欠損マウスのように、生体内のビタミンE(トコフェロール)量を大きく低下させると小脳失調や不妊のような副作用が発現するが、本発明では生体内のビタミンE(トコフェロール)の分布を変えて血漿中ビタミンE(トコフェロール)濃度を低下させているため、有効成分の投与を停止すると速やかに血漿中ビタミンE(トコフェロール)濃度は回復するため、このような不都合は回避できる。

【0013】

本発明の第一態様によれば、トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を含むマラリアの予防または治療薬が提供される。

【0014】

一実施形態では、化合物が、ABCA1トランスポーター阻害剤、TTP阻害剤、トコフェロール吸収抑制剤、トコフェロール代謝促進剤からなる群から選ばれる。

【0015】

別の実施形態では、化合物がプロブコールである。

【0016】

本発明の第二態様によれば、細胞内に取り込まれるトコフェロールエステルを含む培地中で被験化合物の存在下に細胞を培養し、細胞内でエステル加水分解されたトコフェロールの細胞外への放出を評価する工程を有することを特徴とする、マラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法が提供される。

【0017】

一実施形態では、トコフェロールエステルが標識されたトコフェロールエステルである。

【0018】

本発明の第三態様によれば、被験化合物の存在下にTTPの細胞膜への移動を評価する工程を有することを特徴とする、マラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法が提供される。

【0019】

本発明の第四態様によれば、トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を、マラリアの治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、マラリアの治療または予防方法が提供される。

【0020】

本発明の第五態様によれば、マラリアの予防または治療薬を製造するための、トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の使用が提供される。

本発明の第六態様によれば、マラリアの予防または治療薬として使用するためのトコフェロールの血中濃度を低下させる化合物が提供される。

【発明の効果】

【0021】

本発明によれば、副作用が低く、有効性の高いマラリアの予防または治療薬を提供することができる。

【0022】

本発明のマラリアの予防または治療薬は、クロロキン耐性株に対しても高い有効性を有する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】 トコフェロール放出アッセイによるスクリーニング法の概要

【図2】 トコフェロール放出アッセイによるスクリーニング法での薄層液体クロマトグラフィーの結果

【図3】 トコフェロール放出アッセイによるスクリーニング法でのトコフェロール放出の割合

【図4】 Aは実験動物の給餌スケジュール、Bはプロブコール食から通常食に変更後のマ

10

20

30

40

50

ウスの週数に対する血中 トコフェロール濃度のグラフ。プロブコールが トコフェロール血中濃度を減少できることが示されている。Controlは通常食を与えたC57BL/6Jマウス、K0は通常食を与えた TTP K0マウス。両者とも7週齢で採血。

【図5】Aは実験動物の給餌スケジュール、Bは感染後経過日数に対する原虫感染率のグラフ、Cは感染後経過日数に対する生存率のグラフ。プロブコールがマラリア感染の死亡率を顕著に減少させることを示す。

【図6】Aは実験動物の給餌スケジュール、Bは感染後経過日数に対する原虫感染率のグラフ、Cは感染後経過日数に対する生存率のグラフ。プロブコールがマラリア感染の死亡率を顕著に減少させることを示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0024】

本発明者らは、マラリア感染症におけるビタミンEの関連性について検討した。ビタミンEは脂溶性抗酸化物質であり、トコフェロール4種類（ α 、 β 、 γ 、 δ ）およびトコトリエノール4種類（ α 、 β 、 γ 、 δ ）の総称である。上述8種類のうち、最も活性の高いのは α -トコフェロールであり、ヒトを含め哺乳類の血液中でも最も高濃度に存在する。従って、本発明では α -トコフェロールについて着目したが、本発明のマラリアの予防または治療薬はビタミンEの血中濃度を低下させ、トコフェロールの合計量の血中濃度を低下させるものと考えられる。

【0025】

本発明の有効成分となる化合物は、 α -トコフェロールの血中濃度（血液、血漿又は血清中の濃度）を低下させることができる化合物を広く包含する。当該化合物は、 α -トコフェロール(ビタミンE)の血中濃度を低下させるのに必要な量(有効量)をマラリアに感染した患者もしくはマラリア感染の可能性のある被験体に、好ましくは α -トコフェロール(ビタミンE)の血中濃度を有意に低下させるのに必要な量投与されることで、マラリアを予防または治療することができる。

20

【0026】

α -トコフェロールの血中濃度（血液、血漿又は血清中の濃度）を低下させるとは、ヒトにおいて血中濃度の平均値が低下すればよく、有意に低下することが望ましい。 α -トコフェロールの血中濃度の低下の程度は、有効成分の投与前の血中濃度を基準として、平均で、例えば15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上である。従って、本明細書における「有効量」とは、 α -トコフェロールの血中濃度を、有効成分の投与前の血中濃度を基準として、平均で、例えば15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上低下させる濃度である。例えば、有効成分がプロブコールの場合には、1日量として下限が1200mg、1400mg、1600mg、1800mg、2000mg、2500mg、3000mg、3500mg、4000mg、5000mgが挙げられ、上限は10000mg、9000mg、8000mg、7000mg、6000mgが挙げられる。これらの上限と下限の任意の組み合わせ(例えば1200mg~10000mg)がプロブコールの有効量として例示される。プロブコール以外の有効成分の有効量は、プロブコールの有効量を参考にして適宜決定できる。

30

40

【0027】

本発明のマラリアの予防または治療薬の投与により、 α -トコフェロールの血中濃度は徐々に低下する。血中濃度低下後の α -トコフェロールの好ましい血漿中濃度(ヒト、成人)は、3.8 μ M以下、3.6 μ M以下、3.4 μ M以下、3.2 μ M以下、3.0 μ M以下、2.8 μ M以下、2.6 μ M以下、2.4 μ M以下、2.2 μ M以下、2.0 μ M以下、1.8 μ M以下、1.6 μ M以下、1.4 μ M以下、1.2 μ M以下、1.0 μ M以下、0.8 μ M以下、0.6 μ M以下、0.4 μ M以下または0.2 μ M以下である。

【0028】

本発明の有効成分は、 α -トコフェロールの血中濃度を低下させればよく、 α -トコフェ

50

ロールが多量に体内にあったとしても、血液中の濃度が低下していればよく、トコフェロールの生体内分布を調節する化合物を有効成分としてもよく、トコフェロールを分解又は排泄して生体内のトコフェロールの総量を低下させてもよい。トコフェロールの生体内分布を調節する化合物は、マラリア治療後速やかにトコフェロールの血中濃度を回復させることができ、副作用がより低いと推定されるので好ましい。

【0029】

本発明において、トコフェロールの血中濃度が「有意に低下」するとは、統計的な有意差をもってトコフェロールの血中濃度が低下することを意味し、具体的には $P < 0.05$ 、あるいは $P < 0.01$ の場合が含まれる。

【0030】

本発明のマラリア予防薬は、マラリア感染の3日以上前、好ましくは1週間以上前、より好ましくは2週間以上前に服用することで、マラリア感染に罹患しにくくなり、マラリアに感染した場合でもマラリアの症状は軽度で済み、重症化しにくい。例えば、マラリア感染の可能性のある地域に旅行する場合、旅行者は本発明のマラリア予防または治療薬を旅行前及び旅行中に服用することで、マラリア感染のリスクを大幅に低減することができる。本発明のマラリア予防または治療薬は、副作用が低いので、従来の副作用の強いマラリア治療薬と異なり、予防も含めて長期間服用することが可能である。

【0031】

本発明のマラリア治療薬は、マラリア感染後に服用した場合でもマラリアの増殖を抑え、マラリアの治癒を促進し、死亡率を低減することができる。

【0032】

「トコフェロール(ビタミンE)の血中濃度を有意に低下させる化合物」としては、例えば、トコフェロールの細胞から血液中への放出を抑制する化合物、血液中のトコフェロールの代謝および/または分解を促進する化合物、トコフェロールの吸収を抑制する化合物などが挙げられ、このような作用を有する化合物をマラリアの予防または治療薬の有効成分として使用することができる。トコフェロールの細胞から血液中への放出を抑制する化合物が速効性を有するために有効成分として好ましい。

【0033】

トコフェロールの細胞から血液中への放出を抑制する化合物は、たとえばABCA1トランスポーター阻害剤、TTP発現阻害剤、TTPとトコフェロールの結合阻害剤、TTPとABCA1の結合阻害剤など、トコフェロールが細胞内から血液中に移行する経路を阻害する化合物を広く包含する。

【0034】

本発明の好ましい有効成分は、プロブコールおよびそれ以外のABCA1トランスポーター阻害剤、TTP阻害剤、トコフェロール吸収抑制剤、トコフェロール代謝促進剤である。

【0035】

(1) ABCA1トランスポーター阻害剤

以下のi)~iv)が挙げられる：

i) glyburide

ii) 4,4'-diisothiocyanostilbene 2,2'-disulfonic acid (DIDS) Am J Clin Nutr. 2009;89(1):177-84.

iii) シクロスポリンA (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:2155-61.)

iv) ABCA1発現阻害剤

【0036】

(2) トコフェロールトランスファープロテイン(TTP)阻害剤

TTPの発現を阻害する薬剤が広く包含され、例えばsiRNA、shRNA、アンチセンスRNA、miRNA、もしくはリボザイム、又は細胞内でこれらのRNA分子を放出できる発現ベクターなどが挙げられる。

【0037】

10

20

30

40

50

また、TTPにトコフェロールと競合的に結合することによってTTPの機能を阻害する薬剤、TTPが細胞膜へ移動することを阻害し、細胞膜から血液中へトコフェロールを放出することを阻害する薬物が挙げられる。

【0038】

(3) トコフェロール吸収抑制剤

トコフェロールは食物の成分として小腸から吸収されるが、小腸からの取り込みを抑制する薬剤はトコフェロール血中濃度を減少する効果がある。

このような薬剤としては、以下のI)~III)が挙げられる。

【0039】

I) コレステロール吸収阻害剤としての陰イオン交換樹脂

医療用医薬品添付文書上に脂溶性ビタミン吸収阻害の記載のあるクエストラン(コレステラミン)、コレバイン(コレステミド)など

【0040】

II) 小腸コレステロールトランスポーター(NPC1L1)阻害剤

エゼチミブ(製品名ゼチーア)

高田龍平ら、「コレステロールトランスポーターNPC1L1によるビタミンEの消化管吸収」、ビタミン84(8), 376-383, 2010 08 25およびNarushima K, et al., Niemann pick C 1 like 1 mediates alpha tocopherol transport Mol Pharmacol. 2008;74(1):42-9に記載の化合物。これらの文献および該文献中の化合物は、参考として本明細書に援用される。

【0041】

III) リポ蛋白質リパーゼ(LPL)阻害剤

Triton WR1339など

【0042】

(4) トコフェロール代謝促進剤

トコフェロールはシトクロームP450(CYP4F2、CYP4F3など)および酸化によってカルボキシエチルヒドロキシクロマン(CEHC)に代謝される。シトクロームP450による代謝や酸化を促進する薬剤はトコフェロール血中濃度を減少する可能性がある。シトクロームP450(CYP4F2)は核内レセプターretinoid X receptor(RXR)によって誘導されることが知られており、sterol regulatory element binding protein(SREBP)によって誘導されることが最近報告されている(Hsu MH, Savas U, Griffin KJ, Johnson EF. Regulation of human cytochrome P450 4F2 expression by sterol regulatory element binding protein and lovastatin. J Biol Chem 2007; 282, 5225-5236)。

【0043】

本発明は、さらにマラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法を提供する。

【0044】

好ましいスクリーニング方法について、以下に説明する。

1) トコフェロール放出アッセイの概要(図1~3) トリチウムラベル(^3H)した酢酸トコフェロール(^3H TocAc)を含んだリポソームを作成し、培地に加える。 ^3H

TocAcは速やかに細胞内に取り込まれ、非特異的な加水分解酵素によりアセテートがはずれ、トリチウムでラベルされたToc(^3H Toc)となり、細胞外に放出される。リポソーム添加24時間後に細胞と培地を別々に回収し脂質の抽出を行い、薄層液体クロマトグラフィー(クロロホルムを使用)にて展開し露光した。酢酸トコフェロール以外にもトコフェロールは同様に使用できるが、酢酸トコフェロールが好ましい。

【0045】

標識は、トコフェロールまたはそのエステルは細胞内への取り込みと細胞外への放出に実質的に影響しない限りトリチウムラベル(^3H)以外の任意の標識を用いることができる。

【0046】

この方法では細胞内と培地中のTocAcとTocを別々に定量化することが可能である

10

20

30

40

50

(図2)。

【0047】

トコフェロールの放出をグラフ化すると(図3)、TTPを恒常的に発現させたMcA TTP21細胞ではMcARH7777細胞に比べ、細胞外のトコフェロールの割合が顕著に増加していることが分かる。

【0048】

ここで、McA TTP21細胞はTTPのある肝細胞を意味し、McA RH7777細胞はTTPのない肝細胞を意味する。Arita M, Nomura K, Arai H, Inoue K., alpha tocopherol transfer protein stimulates the secretion of alpha tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A insensitive pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(23):12437-41.を参照のこと。

10

【0049】

さらにトコフェロール放出アッセイの詳細(プロブコール投与時の実験の詳細)を以下(a)(i)に示す。

【0050】

(a)ラット肝癌由来細胞株であるMcARH7777細胞とMcARH7777細胞にTTPを恒常的に発現させたMcA TTP21細胞をコラーゲンコート6ウェルディッシュに播種する(1.2×10^5 cells/well)。

【0051】

(b)播種後24時間後に0.2% BSAおよび $10 \mu\text{g/ml}$ のApoA1を含有するDMEMに培地交換し、プロブコールを最終濃度 $10 \mu\text{M}$ または $20 \mu\text{M}$ にて添加する。プロブコールはエタノールに 40mM の濃度で溶解させる。

20

【0052】

(c)プロブコール添加後2時間後に $[^3\text{H}]$ TocAcをリポソームの形で添加する。

リポソーム組成:

リン脂質(ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ディセチルホスフェイト混合物) $200 \mu\text{l}$

コレステロール(3mM) $100 \mu\text{l}$

$[^3\text{H}]$ TocAc ($11,100,000\text{dpm}$) $300 \mu\text{l}$

非ラベル化 TocAc $10 \mu\text{l}$

30

上記試薬を混合したものの溶媒(クロロホルム)を窒素ガスを使用して完全乾固する。 0.3M ブドウ糖液 $200 \mu\text{l}$ を添加し、超音波破碎機にて3分間処理する。

【0053】

(d) リポソーム添加24時間後に細胞と培地を回収する。

i)培地をチューブに回収する。

ii)細胞を $200 \mu\text{l}$ のPBSにて2回洗浄し、 0.1% SDS水溶液(6% ピロガロール)で細胞を回収する。

【0054】

(e)培地および細胞成分に 1.5ml の 65% エタノール溶液と 3ml のヘキサンを加え、5分間振盪混合する。

40

【0055】

(f) 3000rpm で5分間遠心分離する。

【0056】

(g)上層のヘキサン層をガラスチューブに移し、エバポレーターにて完全に乾固する。

【0057】

(h)完全乾固したサンプルに $20 \mu\text{l}$ の酢酸エチルを加えて、TLCプレートに一点に滴下、乾燥する。

【0058】

(i)クロロホルムにて展開し乾燥後、RIイメージングアナライザにて検出解析する。

上記のプロトコールは単なる例示であり、当業者は適宜条件を変更して実施することが

50

できる。

その他のスクリーニング法について、さらに以下I) - VIII)に説明する

【0059】

I) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と電気化学検出器 (ECD) を用いて トコフェロールを測定する手法を用いる方法。

【0060】

前述の ^3H TocAcではなく、非ラベルの酢酸トコフェロールを同様の方法で細胞に添加して、24時間後に細胞および培地を回収する。(10cm ディッシュ程度の細胞量が必要) 回収した培地および細胞懸濁液に20 μM BHT含有クロロホルム/メタノール (2/1) を3倍量添加して1分間振盪混合後、15,000rpm で遠心分離5分間。

10

【0061】

クロロホルム層を別のチューブに移し、必要に応じて濃縮した後、HPLC ECDにて測定する。

HPLC条件

- ・カラム Wakosil II 5C18 RS 4.6mm x 250mm (Wako, Tokyo, Japan)
- ・還元カラムRC 10 4.0mm x 15mm (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・温度 40
- ・検出器 Nanospace SI 2 (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・溶離液 50mM NaClO₄含有メタノール
- ・流速 0.7ml/min
- ・注入量 10 μl

20

【0062】

II) 質量分析装置による トコフェロール測定を用いる方法。

上述I)と同様に非ラベルの酢酸トコフェロールを細胞に添加し、培地中および細胞中の トコフェロール含有量を測定する方法として質量分析装置 (GC MSやLC MS) を用いる方法も本発明のスクリーニング方法において使用することができる。

【0063】

III) 抗 トコフェロール特異抗体を用いた免疫学的測定法を用いた トコフェロール測定を用いる方法 上述I)と同様に非ラベルの酢酸トコフェロールを細胞に添加し、培地中および細胞中の トコフェロール含有量を測定する方法として抗 トコフェロール特異抗体を用いた免疫学的測定法 (ELISA) も本発明のスクリーニング方法において使用することができる。

30

【0064】

IV) マウスに各種薬剤を投与して トコフェロールの血中濃度を測定する方法。

各種薬剤を餌への混餌、給水、経口投与、腹腔内投与、静脈内投与などの方法によって、マウスやラットへ投与し、経時的に血液 (EDTA添加) や組織を採取する。

採取した血液サンプルは3500rpm x 5分の遠心処理で血漿分離する。

血漿もしくは組織懸濁液に対し20 μM BHT含有クロロホルム/メタノール (2/1) を3倍量添加し1分間振盪混合後、15,000rpm で遠心分離5分間する。

クロロホルム層を別のチューブに移し、HPLC ECDにて測定する。

40

HPLC ECDの条件は上述のI)と同様である。

【0065】

V) 細胞内の TTPの局在の蛍光顕微鏡観察

肝細胞内で トコフェロールに結合した TTPが細胞膜上に移動してABCA1などの輸送体に受け渡さないと肝細胞内より循環血液中に分配されない。

そこで、TTPの細胞内移動を阻害する薬剤をスクリーニングすれば、 トコフェロールの血中濃度抑制因子の候補を選択することができる。

具体的には、

(i) McA TTP細胞などの TTPの発現した細胞を用いる。

(ii) 試験薬剤投与後、経時的に反応を停止する。PBSで細胞を洗浄後、パラホルムアルデ

50

ヒドで固定する。

(iii)PBS洗浄後、0.5%トリトン100 PBS溶液で20分間もしくは冷メタノール溶液で2分間処理する。

(iv)PBS洗浄後、牛血清アルブミンPBS溶液などでブロッキングする。

(v)抗 TTP特異抗体を含んだ溶液に置換し1時間から数時間処理する。

(vi)PBS洗浄後、蛍光物質 (Alexaなど) 付加二次抗体にて処理。

(vii)蛍光顕微鏡を用いて TTPの細胞内局在を観察する。

【0066】

VI) 細胞内の TTPの局在を細胞小器官分画処理した分画のウエスタンブロットティングもしくはELISAにて観察する。

【0067】

上述V)の項と同様に TTPの細胞膜への移行を阻害する薬剤のスクリーニングの手法である。

具体的には

(i) 細胞内局在する TTPを細胞小器官ごとに分画精製する(ショ糖やフィコールなどの密度勾配を利用した密度勾配遠心分離法や細胞分画精製Kitを用いる)

(ii)細胞小器官ごとの TTPの存在する比率、TTP蛋白量を抗 TTP特異抗体を用いたウエスタンブロットティング法、もしくはELISA定量法によって解析する。

【0068】

VII) TTPやABCA1などの トコフェロール血中濃度調節に関与するタンパク質の発現調節に関わる薬剤、因子のスクリーニング

TTPやABCA1などの トコフェロール血中濃度調節に関わるタンパク質の遺伝子発現もしくは蛋白質の発現を計測する手法で薬剤のスクリーニングを行う。遺伝子発現のスクリーニング法としてはレポーターアッセイ法や定量的リアルタイムPCR法などが有用と考えられる。蛋白質の発現は上述の抗 トコフェロール特異抗体を用いたウエスタンブロットティング法、もしくはELISA定量法による評価が可能である。

【0069】

VIII) TTPの トコフェロール結合部位に結合する化合物、抗体等の探索

TTPには トコフェロールの結合する部位が特定されているが、この部位に結合する可能性のある化合物、抗体等をスクリーニングすることができれば、TTPによる トコフェロール運搬を阻害し、血中 トコフェロール濃度を減少させる薬剤を探し出すことが可能である。TTPおよび トコフェロール結合部位のアミノ酸配列、蛋白構造はすでに既知のものであり、蛋白構造から化合物の推定することでスクリーニングができる。

【0070】

本発明はさらに、 トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を、マラリアの治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、マラリアの治療または予防方法、マラリアの予防または治療薬を製造するための、 トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の使用、マラリアの予防または治療薬として使用するための トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物も提供する。 トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物およびその有効量については上述した通りである。

【0071】

1つの実施形態において、本発明は、 トコフェロールの血中濃度を有意に低下させる化合物と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物に関する。これらの医薬組成物は、マラリアの治療または予防のために使用することができる。医薬組成物は、経口、非経口または局所投与のために使用することができる。これらはたとえば、経口的に、例えば錠剤、被覆錠剤、硬および軟カプセル、液剤、乳剤もしくは懸濁液の形態で、経鼻的に、例えばスプレーの形態で、直腸に、例えば坐剤の形態で、非経口的に、例えば注射溶液もしくは輸液の形態で、または局所的に、例えば軟膏、クリームもしくはローションなどの形態で投与することができる。

【実施例】

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

以下に本発明を実施例によって説明する。

【 0 0 7 3 】

なお、以下の実施例において、プロブコール (WAKO, Japan)および通常食(CLEA, Japan)を使用した。

【 0 0 7 4 】

通常食：餌1kg当たり75mgの トコフェロールを含有

プロブコール食：餌1kg当たり75mgの トコフェロールと10gのプロブコールを含有 (1 % w/w)

【 0 0 7 5 】

実施例 1

4週齢のC57BL/6Jマウスの各群6匹 (雄3匹、雌3匹) を使用し、プロブコール食を2週間与えたのち、通常食に変更した。

【 0 0 7 6 】

プロブコール食投与2週間後と、通常食に変更した後、1週間後と、2週間後とに採血し (図 4 A)、採血後、3500rpmで5分間遠心処理し血漿成分を分離した。血漿に対し20 μ M BHT含有クロロホルム/メタノール (2/1) を3倍量添加し1分間振盪混合後、15,000rpm で遠心分離5分間した。

【 0 0 7 7 】

クロロホルム層を別のチューブに移し、血漿中の トコフェロール濃度をHPLC ECD に より測定した。

HPLC条件

- ・カラム Wakosil II 5C18 RS 4.6mm \times 250mm (Wako, Tokyo, Japan)
- ・還元カラムRC 10 4.0mm \times 15mm (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・温度 40
- ・検出器 Nanospace SI 2 (Shiseido, Tokyo, Japan)
- ・溶離液 50mM NaClO₄含有メタノール
- ・流速 0.7ml/min
- ・注入量 10 μ l

結果を図 4 B に示す。

【 0 0 7 8 】

図 4 A , B 中の0w、1w、2wはプロブコール投与終了後の週数を示す。

【 0 0 7 9 】

対照(control)として、通常食を与えているそれぞれ7週齢のC57BL/6Jマウスと TTP K 0マウス(Jishage K, Suzuki H. et al.: Tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblast in mice. J Bio I Chem 2001, 275:1669 1672.)からも採血し、同様に血清中の トコフェロール濃度をHPLCにより測定した。有意差検定はtwo way ANOVAにて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【 0 0 8 0 】

結果

通常食を投与しているC57BL/6Jマウスでは トコフェロールの血中濃度は雄0.860 μ M、雌1.30 μ Mであったが、通常食を投与している TTP K0では雄0.027 μ M、雌0.027 μ Mであった。

【 0 0 8 1 】

C57BL/6Jマウスにプロブコール食を投与開始し2週間後には、 トコフェロールの血中濃度は雄0.078 μ M、雌0.132 μ Mと減少していた。通常食に変更した後、1週間後には雄0.334 μ M、雌0.533 μ M、2週間後には雄0.847 μ M、雌0.544 μ Mと血中濃度の再上昇がみられた。

【 0 0 8 2 】

以上の結果から、プロブコールは経口投与により血漿中の トコフェロール濃度を有

10

20

30

40

50

意に低下させることができることが明らかになった。プロブコールの投与を中止すると、血漿中の トコフェロール濃度は2週間で大きく回復するため、副作用は低いことが推定される。

【0083】

実施例2

4週齢のC57BL/6Jマウスの各群6匹(雄3匹、雌3匹)を使用しマラリア原虫感染実験を行った。

【0084】

通常食を与えたC57BL/6Jマウスの群、通常食を与えた TTP K0マウスの群にマラリア原虫の感染を行った。

【0085】

感染2週間前よりプロブコール食を投与開始し、感染後も継続してプロブコール食を与え続けたC57BL/6Jマウスの群と、上記の2つの群とを比較した。通常食、プロブコール食は、上述と同じものを使用した(図5 A - C)。

【0086】

感染させたマラリア原虫はネズミマラリア原虫*Plasmodium.yoelii* 17XLで、マラリア原虫に寄生された赤血球を1ml当たり 1×10^5 細胞含む赤血球溶液を0.2ml(感染赤血球 0.2×10^5 個)腹腔内投与した。

【0087】

マラリア原虫感染後、経時的に採血を行い原虫感染率と生存率を評価した。結果を図5 B, Cに示す。

【0088】

原虫感染率(Parasitemia)の評価法

マウスの尾静脈から採取した静脈血をスライドガラス状にスメアを引き、ギムザ染色する。

【0089】

顕微鏡下で原虫の感染している赤血球数と非感染赤血球数を計測し原虫感染率を測定する。

【0090】

結果：図5 B, Cに示されるように、通常食を与えているC57BL/6Jマウスでは感染後4日目から原虫感染率が増加し、感染8日目から死亡例が出現し、28日後には全例死亡した。それに対して、TTP K0では寄生虫感染率の増加はごく軽度であり、観察期間中の死亡例はなかった。

【0091】

感染前2週間から感染後も継続してプロブコールを与えた群では、感染後6日目から12日目にかけて一過性に原虫感染率が増加するが、その後減少し、26日目には感染率が0となった。また、プロブコールを与えた群では、顕著に死亡率が減少し、28日目にわずかに死亡例があったのみであった。

【0092】

実施例3

次に、前述の実施例2と同様にマウスに通常食もしくはプロブコールを与え、マラリア原虫感染をさせたが、プロブコール投与群で感染後30日目に通常食に餌を変更した(図6 A)。

【0093】

マラリア原虫感染の方法および評価項目、評価手法は実施例2の実験と同様である。

【0094】

結果：図6 B, Cに示されるように、通常食を与えているC57BL/6Jマウスでは感染後4日目から原虫感染率が増加し、感染8日目から死亡例が出現し、18日後には全例死亡した。

プロブコールを与えた群では、感染後6日目から16日目にかけて一過性に原虫感染率が増加するが、その後減少し、22日目には感染率が0となった。プロブコールを与えた群で

10

20

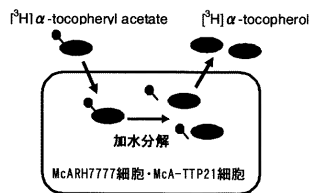
30

40

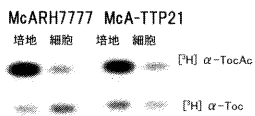
50

は、顕著に死亡率が減少し、20日目にわずかに死亡例があったのみであった。感染後30日目から通常食に変更しているが、原虫感染率の再増加および死亡率の増加は認められなかった。

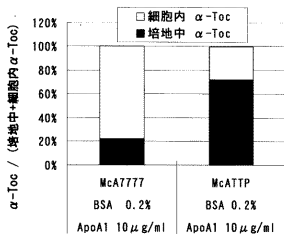
【 図 1 】



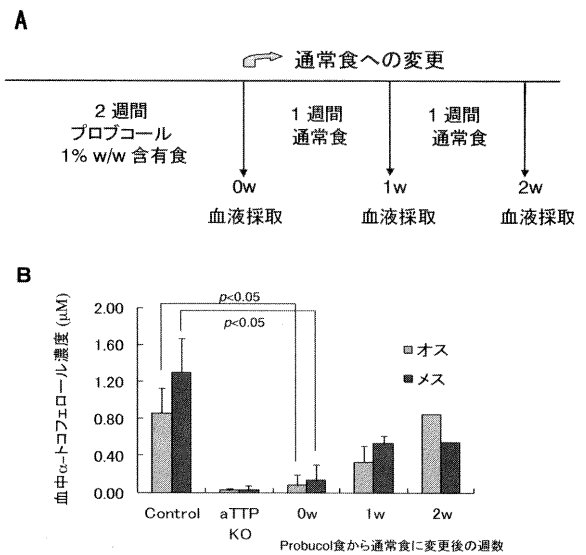
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【請求項 6】

被験化合物の存在下に TTP の細胞膜への移動を評価する工程と、

前記 TTP の細胞膜への移動を阻害する化合物を非ヒト動物に投与し、マラリア原虫感染後の非ヒト動物の感染率及び / 又は生存率を評価する工程と、
を有することを特徴とする、マラリアの予防または治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 7】

- トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の有効量を、マラリアの治療または予防を必要とする患者に投与することを含む、マラリアの治療または予防方法であって、前記化合物がプロブコールであるマラリアの治療または予防方法。

【請求項 8】

マラリアの予防または治療薬を製造するための、 - トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物の使用であって、前記化合物がプロブコールである使用。

【請求項 9】

マラリアの予防または治療薬として使用するための - トコフェロールの血中濃度を低下させる化合物であって、前記化合物がプロブコールである化合物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/051829
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/10(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P33/06(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) A61K31/10, A61K45/00, A61P33/06 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 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	PENET, M.F. et al, Protection against cerebral malaria by the low-molecular-weight thiol pantethine, Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, Vol.105, No.4, p.1321-6, See Abstract, Fig.1	1, 2, 8, 9 3
X Y	BOBBALA, D. et al, Effect of cyclosporine on parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice, Biochem Biophys Res Commun, 2008, Vol.376, No.3, p.494-8, See Fig.4	1, 2, 8, 9 3
X Y	WO 2007/101710 A1 (CENIX BIOSCIENCE GMBH), 13 September 2007 (13.09.2007), claims; examples & US 2009/0324580 A1 & EP 1832283 A1 & CA 2645211 A1 & CN 101489542 A	1, 2, 8, 9 3-6
<input checked="" 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 "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 04 April, 2013 (04.04.13)		Date of mailing of the international search report 16 April, 2013 (16.04.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/051829

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHICHIRI, M. et al, ATP-binding cassette transporter A1 is involved in hepatic alpha-tocopherol secretion, J Nutr Biochem, 2010, Vol.21, No.5, p.451-6, See Introduction, Results, Fig.1	1-6,8
Y	HERBAS, M.S. et al, Alpha-tocopherol transfer protein disruption confers resistance to malarial infection in mice, Malar J, 2010, Vol.9, p.101(1-12), See Abstract, Results, Figure 6	1-6,8
Y	COMBES, V. et al, ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology, Am J Pathol, 2005, Vol.166, No.1, p.295-302, See Figure 1	1-3,8
A	LE, G.O. et al, Cyclosporin A traps ABCA1 at the plasma membrane and inhibits ABCA1-mediated lipid efflux to apolipoprotein A-I, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, Vol.24, No.11, p.2155-61, See Abstract, Figure 2	1-3,8,9
A	NARUSHIMA, K. et al, Niemann-pick C1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport, Mol Pharmacol, 2008, Vol.74, No.1, p.42-9, See ABSTRACT, Fig.3	1-6,8,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/051829

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 7 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claim 7 pertains to "method for treatment of the human body by surgery or therapy" and thus relates to a subject matter on which it is not required to carry out an international search under the provision of PCT Rule 39.1 (iv).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The inventions of claims 1, 2, 8 and 9 cannot be considered to be novel as disclosed in the following documents, and therefore, these inventions have no special technical feature. Note: PENET, M.F. et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, Vol.105, No.4, p.1321-6 BOBBALA, D. et al, Biochem Biophys Res Commun, 2008, Vol.376, No.3, p.494-8 WO 2007/101710 A1 (CENIX BIOSCIENCE GMBH), 13 September 2007 (13.09.2007)</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2013/051829									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/10(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P33/06(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. A61K31/10, A61K45/00, A61P33/06											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2013年	日本国実用新案登録公報	1996-2013年	日本国登録実用新案公報	1994-2013年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2013年										
日本国実用新案登録公報	1996-2013年										
日本国登録実用新案公報	1994-2013年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/MEDLINE/EMBASE/BIGS IS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	PENET, M.F. et al, Protection against cerebral malaria by the low-molecular-weight thiol pantethine, Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, Vol.105, No.4, p.1321-6 See Abstract, Fig.1	1,2,8,9 3									
X Y	BOBBALA, D. et al, Effect of cyclosporine on parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice, Biochem Biophys Res Commun, 2008, Vol.376, No.3, p.494-8 See Fig.4	1,2,8,9 3									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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											
国際調査を完了した日 04.04.2013		国際調査報告の発送日 16.04.2013									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 安藤 公祐 電話番号 03-3581-1101 内線 3439	4U 4496								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2013/051829
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
X Y	WO 2007/101710 A1 (CENIX BIOSCIENCE GMBH) 2007.09.13, 請求項、 実施例等 & US 2009/0324580 A1 & EP 1832283 A1 & CA 2645211 A1 & CN 101489542 A	1, 2, 8, 9 3-6
Y	SHICHIRI, M. et al, ATP-binding cassette transporter A1 is involved in hepatic alpha-tocopherol secretion, J Nutr Biochem, 2010, Vol.21, No.5, p.451-6 See Introduction, Results, Fig.1	1-6, 8
Y	HERBAS, M. S. et al, Alpha-tocopherol transfer protein disruption confers resistance to malarial infection in mice, Malar J, 2010, Vol.9, p.101(1-12) See Abstract, Results, Figure 6	1-6, 8
Y	COMBES, V. et al, ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology, Am J Pathol, 2005, Vol.166, No.1, p.295-302 See Figure 1	1-3, 8
A	LE, G. O. et al, Cyclosporin A traps ABCA1 at the plasma membrane and inhibits ABCA1-mediated lipid efflux to apolipoprotein A-I, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, Vol.24, No.11, p.2155-61 See Abstract, Figure 2	1-3, 8, 9
A	NARUSHIMA, K. et al, Niemann-pick C1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport, Mol Pharmacol, 2008, Vol.74, No.1, p.42-9 See ABSTRACT, Fig.3	1-6, 8, 9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2013/051829

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項7は[手術又は治療による人体を処置する方法]であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1, 2, 8, 9に係る発明は、以下の文献に記載のとおり、新規性が認められないから、特別な技術的特徴を有しない。

<記>

PENET, M.F. et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, Vol.105, No.4, p.1321-6
BOBBALA, D. et al, Biochem Biophys Res Commun, 2008, Vol.376, No.3, p.494-8
WO 2007/101710 A1 (CENIX BIOSCIENCE GMBH) 2007.09.13

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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,PA,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

(72)発明者 ヘルバス コスタス マリア シェルリー

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

Fターム(参考) 2G045 AA25

4B063 QA01 QA18 QQ08 QR12 QR77 QS36 QX07 QX10

4C206 AA01 AA02 JA32 MA01 MA04 NA14 ZB38 ZC41

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。