

(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
2018年3月29日(29.03.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/056412 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/36 (2015.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01) *C12Q 1/06* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/034374
- (22) 国際出願日: 2017年9月22日(22.09.2017)
- (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 2016-186190 2016年9月23日(23.09.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP). 日本臓器製薬株式会社(NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町2丁目1番2号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 田中 啓之 (TANAKA, Hiroyuki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 村瀬 剛 (MURASE, Tsuyoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 吉川 秀樹(YOSHIKAWA, Hideki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 藤澤 裕樹(FUJISAWA, Hiroki); 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町2丁目1番2号 日本臓器製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 藤井 郁郎 (FUJII, Ikuro); 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町2丁目1番2号 日本臓器製薬株式会社 技術法務部 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, JO, 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))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: SCHWANN CELL DIFFERENTIATION PROMOTER AND PERIPHERAL NERVE REGENERATION PROMOTER

(54) 発明の名称: シュワン細胞分化促進剤及び末梢神経再生促進剤

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a Schwann cell differentiation promoter, a peripheral nerve regeneration promoter, or the like that contains an extract from inflamed tissue inoculated with vaccinia virus. The present invention demonstrates that extracts from inflamed tissue inoculated with vaccinia virus promote the differentiation of Schwann cells and the regeneration of peripheral nerves. Thus, a pharmaceutical preparation that contained an extract from inflamed tissue inoculated with vaccinia virus would be useful as a Schwann cell differentiation promoter, a peripheral nerve regeneration promoter, or the like.

(57) 要約: 本発明の目的は、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有するシュワン細胞の分化促進剤、末梢神経再生促進剤等を提供することにある。本発明において、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物がシュワン細胞の分化及び末梢神経の再生を促進することが示された。従って、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有する製剤はシュワン細胞の分化促進剤、末梢神経の再生促進剤等として有用なものである。



WO 2018/056412 A1

明 細 書

発明の名称： シュワン細胞分化促進剤及び末梢神経再生促進剤 技術分野

[0001] 本発明は、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物（以下「本抽出物」と表記することがある。）の新規な医薬用途等に関するものである。より具体的には、本抽出物を含有するシュワン細胞分化促進剤、末梢神経再生促進剤等に関する。

背景技術

[0002] 脊椎動物の神経軸索に多重層を形成している髄鞘は、神経インパルスの跳躍伝導による効果的な神経伝導に寄与している。この髄鞘は、末梢神経系においてはシュワン細胞により形成されている。

[0003] 末梢神経の細胞体は、運動神経では脊髄前角に、感覚神経では後根神経節（dorsal root ganglion ; DRG）に存在している。細胞体から伸展した軸索を取り囲むように髄鞘を形成するのがシュワン細胞である。末梢神経が損傷を受けると、損傷部以遠の軸索と髄鞘は貪食除去される（ワラー変性）。軸索の変性に伴い、シュワン細胞は未分化な状態へと脱分化し脱髄が生じる。その後、再生過程において、未分化なシュワン細胞は損傷部以遠で増殖し、軸索再生のための足場を形成する。最終的には再生軸索が遠位方向へ伸長し、それに伴い再生軸索の周囲を取り巻いたシュワン細胞も再分化し、髄鞘が形成される（再髄鞘化）。このように、シュワン細胞は、末梢神経の再生過程において重要な役割を果たすことが知られている。

[0004] 上記のように末梢神経は損傷後の神経再生能を有しているが、この神経機能の回復能力は常に十分とはいえない。末梢神経の再生過程において、再生神経の伸長速度は非常に遅く、再生に要する期間は数ヶ月から1年以上と長時間を要する。そのため、その間に神経細胞が死滅してしまい、機能回復に至らない場合も多い。

[0005] また、末梢神経における髄鞘損傷では、シュワン細胞の損傷による脱髄の

ために、神経伝導速度が遅延することが知られている。これらのことから、未分化シュワン細胞の分化及び再髄鞘化を促進することは、末梢神経の損傷や脱髄性疾患の治療に有効であると考えられる。なお、本願において用いられる「治療」には、「軽減」、「改善」、「進行抑制」等の意味が含まれる。

[0006] 本発明に係るシュワン細胞分化促進剤又は末梢神経再生促進剤に含有されるワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物（本抽出物）又はこれを含有する製剤については、鎮痛作用、鎮静作用、抗ストレス作用、抗アレルギー作用（特許文献1参照）、免疫促進作用、抗癌作用、肝硬変抑制作用（特許文献2参照）、特発性血小板減少性紫斑病に対する治療効果（特許文献3参照）、帯状疱疹後神経痛、脳浮腫、痴呆、脊髄小脳変性症等への治療効果（特許文献4参照）、レイノー症候群、糖尿病性神経障害、スモン後遺症等への治療効果（特許文献5参照）、カリクレイン産生阻害作用、末梢循環障害改善作用（特許文献6参照）、骨萎縮改善作用（特許文献7参照）、敗血症やエンドトキシンショックの治療に有効な一酸化窒素産生抑制作用（特許文献8参照）、骨粗鬆症に対する治療効果（特許文献9参照）、Nef作用抑制作用やケモカイン産生抑制作用に基づくエイズ治療効果（特許文献10、11参照）、脳梗塞等の虚血性疾患に対する治療効果（特許文献12参照）、線維筋痛症に対する治療効果（特許文献13参照）、感染症に対する治療効果（特許文献14参照）、抗癌剤による末梢神経障害の予防又は軽減作用（特許文献15参照）、慢性前立腺炎、間質性膀胱炎及び／又は排尿障害の治療効果（特許文献16参照）、BDNF等の神経栄養因子の産生促進作用（特許文献17参照）、軟骨細胞におけるコラーゲン及びプロテオグリカン合成促進作用（特許文献18参照）など非常に多岐に及ぶ作用・効果が知られている。さらに、近年、シュワン細胞に対する作用として、その増殖促進作用が報告されている（非特許文献1参照）。しかしながら、本抽出物又はこれを含有する製剤が、シュワン細胞の分化促進作用又は末梢神経の再生促進作用を有することはこれまで知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特開昭53-101515号公報
特許文献2：特開昭55-87724号公報
特許文献3：特開平1-265028号公報
特許文献4：特開平1-319422号公報
特許文献5：特開平2-28119号公報
特許文献6：特開平7-97336号公報
特許文献7：特開平8-291077号公報
特許文献8：特開平10-194978号公報
特許文献9：特開平11-80005号公報
特許文献10：特開平11-139977号公報
特許文献11：特開2000-336034号公報
特許文献12：特開2000-16942号公報
特許文献13：国際公開WO2004/039383号公報
特許文献14：特開2004-300146号公報
特許文献15：国際公開WO2009/028605号公報
特許文献16：国際公開WO2011/111770号公報
特許文献17：国際公開WO2011/162317号公報
特許文献18：国際公開WO2012/051173号公報

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：日本手外科学会雑誌、30巻、1号、演題番号2-5-22、
2013年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、本抽出物を含有するシュワン細胞の分化促進剤、末梢神経の再生促進剤等を提供するものである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、有効な治療法が求められている末梢神経損傷の薬剤治療について鋭意研究を行った結果、本抽出物が優れたシュワン細胞の分化促進作用及び末梢神経の再生促進作用を有することを見出し、本発明を完成した。

発明の効果

[0011] 本抽出物は、シュワン細胞の分化や末梢神経の再生を促進するという優れた薬理作用を有する。また、本抽出物を含有する製剤は、副作用等の問題点の少ない安全性の高い薬剤として長年使用されているものであるため、本発明は極めて有用性の高いものである。

発明を実施するための形態

[0012] 本抽出物は、ワクシニアウイルスを接種して発痘した動物の炎症組織から抽出分離した非蛋白性の活性物質を含有する抽出物である。本抽出物は、抽出された状態では液体であるが、乾燥することにより固体にすることもできる。本製剤は、医薬品として非常に有用なものである。本製剤として出願人が日本において製造し販売している具体的な商品に「ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液含有製剤」（商品名：ノイロトロピン／NEUROTROPIN〔登録商標〕）（以下「ノイロトロピン」という。）がある。ノイロトロピンには、注射剤と錠剤があり、いずれも医療用医薬品（ethical drug）である。

[0013] ノイロトロピンの注射剤の適応症は、「腰痛症、頸肩腕症候群、症候性神経痛、皮膚疾患（湿疹、皮膚炎、蕁麻疹）に伴う掻痒、アレルギー性鼻炎、スモン（SMON）後遺症状の冷感・異常知覚・痛み」である。ノイロトロピンの錠剤の適応症は、「帯状疱疹後神経痛、腰痛症、頸肩腕症候群、肩関節周囲炎、変形性関節症」である。本製剤は、出願人が創製し、医薬品として開発したものであり、その有効性と安全性における優れた特長が評価され、長年にわたり販売されて、日本の医薬品市場で確固たる地位を確立しているものである。

[0014] 本発明におけるワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物はワクシニアウイ

ルスを接種して発痘した炎症組織を破碎し、抽出溶媒を加えて組織片を除去した後、除蛋白処理を行い、これを吸着剤に吸着させ、次いで有効成分を溶出することによって得ることができる。即ち、例えば、以下のような工程である。

(A) ワクシニアウイルスを接種し発痘させたウサギ、マウス等の皮膚組織等を採取し、発痘組織を破碎し、水、フェノール水、生理食塩液またはフェノール加グリセリン水等の抽出溶媒を加えた後、濾過または遠心分離することによって抽出液（濾液または上清）を得る。

(B) 前記抽出液を酸性のpHに調整して加熱し、除蛋白処理する。次いで除蛋白した溶液をアルカリ性に調整して加熱した後に濾過または遠心分離する。

(C) 得られた濾液または上清を酸性とし活性炭、カオリン等の吸着剤に吸着させる。

(D) 前記吸着剤に水等の抽出溶媒を加え、アルカリ性のpHに調整し、吸着成分を溶出することによってワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を得ることができる。その後、所望に応じて、適宜溶出液を減圧下に蒸発乾固または凍結乾燥することによって乾固物とすることもできる。

[0015] ワクシニアウイルスを接種し炎症組織を得るための動物としては、ウサギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、サル、ラット、マウスなどワクシニアウイルスが感染する種々の動物を用いることができ、炎症組織としてはウサギの炎症皮膚組織が好ましい。ウサギはウサギ目に属するものであればいかなるものでもよい。例としては、アナウサギ、カイウサギ（アナウサギを家畜化したもの）、ノウサギ（ニホンノウサギ）、ナキウサギ、ユキウサギ等がある。これらのうち、カイウサギが使用するには好適である。日本では過去から飼育され家畜又は実験用動物として繁用されている家兎（イエウサギ）と呼ばれるものがあるが、これもカイウサギの別称である。カイウサギには、多数の品種（ブリード）が存在するが、日本白色種やニュージーランド白色種（ニュージーランドホワイト）といった品種が好適に用いられ得る。

[0016] ワクシニアウイルス (*vaccinia virus*) は、いかなる株のものであっても

よい。例としては、リスター (Lister) 株、大連 (Dairen) 株、池田 (Ikeda) 株、EM-63株、ニューヨーク市公衆衛生局 (New York City Board of Health) 株等が挙げられる。

[0017] 上記した本抽出物の基本的な抽出工程 (A) ~ (D) は、より詳しくは、例えば、以下のようなものとして実施できる。

工程 (A) について

ウサギの皮膚にワクシニアウイルスを皮内接種して発痘させた炎症皮膚組織を採取する。採取した皮膚組織はフェノール溶液等で洗浄、消毒を行なう。この炎症皮膚組織を破碎し、その1乃至5倍量の抽出溶媒を加える。ここで、破碎とは、ミンチ機等を使用してミンチ状に細かく砕くことを意味する。また、抽出溶媒としては、蒸留水、生理食塩水、弱酸性乃至弱塩基性の緩衝液などを用いることができ、フェノール等の殺菌・防腐剤、グリセリン等の安定化剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム等の塩類などを適宜添加してもよい。この時、凍結融解、超音波、細胞膜溶解酵素又は界面活性剤等の処理により細胞組織を破壊して抽出を容易にすることもできる。得られた懸濁液を、5日乃至12日間放置する。その間、適宜攪拌しながら又は攪拌せずに、30乃至45°Cに加温してもよい。得られた液を固液分離（濾過又は遠心分離等）によって組織片を除去して粗抽出液（濾液又は上清）を得る。

[0018] 工程 (B) について

工程 (A) で得られた粗抽出液について除蛋白処理を行う。除蛋白は、通常行われている公知の方法により実施でき、加熱処理、蛋白質変性剤（例えば、酸、塩基、尿素、グアニジン、アセトン等の有機溶媒など）による処理、等電点沈澱、塩析等の方法を適用することができる。次いで、不溶物を除去する通常の方法、例えば、濾紙（セルロース、ニトロセルロース等）、ガラスフィルター、セライト、ザイツ濾過板等を用いた濾過、限外濾過、遠心分離などにより析出してきた不溶蛋白質を除去した濾液又は上清を得る。

[0019] 工程 (C) について

工程 (B) で得られた濾液又は上清を、酸性、好ましくはpH3.5乃至5.5に調整し、吸着剤への吸着操作を行う。使用可能な吸着剤としては、活性炭、カオリン等を挙げることができ、抽出液中に吸着剤を添加し攪拌するか、抽出液を吸着剤充填カラムに通過させて、該吸着剤に有効成分を吸着させることができる。抽出液中に吸着剤を添加した場合には、濾過や遠心分離等によって溶液を除去して、活性成分を吸着させた吸着剤を得ることができる。

[0020] 工程 (D) について

工程 (C) で得られた吸着剤から活性成分を溶出 (脱離) させるには、当該吸着剤に溶出溶媒を加え、塩基性、好ましくはpH9乃至12に調整し、室温又は適宜加熱して或いは攪拌して溶出し、濾過や遠心分離等の通常の方法で吸着剤を除去する。用いられる溶出溶媒としては、塩基性の溶媒、例えば塩基性のpHに調整した水、メタノール、エタノール、イソプロパノール等又はこれらの適当な混合溶液を用いることができ、好ましくはpH9乃至12に調整した水を使用することができる。溶出溶媒の量は適宜設定することができる。このようにして得られた溶出液を、原薬として用いるために、適宜pHを中性付近に調整するなどして、最終的にワクシニアウイルス接種ウサギ炎症皮膚抽出物 (本抽出物) を得ることができる。

[0021] 本抽出物は、できた時点では液体であるので、適宜濃縮・希釈することによって所望の濃度のものにもできる。本抽出物から製剤を製造する場合には、加熱滅菌処理を施すのが好ましい。注射剤にするためには、例えば塩化ナトリウム等を加えて生理食塩液と等張の溶液に調製することができる。また、液体あるいはゲル等の状態で経口投与することも可能であるが、本抽出物に適切な濃縮乾固等の操作を行うことによって、錠剤等の経口用固形製剤を製造することもできる。本抽出物からこのような経口用固形製剤を製造する具体的な方法は、日本特許第3818657号や同第4883798号の明細書に記載されている。こうして得られる注射剤や経口用製剤等が本製剤の例である。また、本製剤のうち、浸透圧ポンプ等の連続投与装置に充填するものとしては、液体のものが適切である。従って、液体の本抽出物や本製剤を充填

することができる。

- [0022] 以下に、本抽出物の製造方法の例、及び本抽出物の新規な薬理作用、シュワン細胞の分化や末梢神経の再生の促進作用に関する薬理試験結果を示すが、本発明はこれらの実施例の記載によって何ら制限されるものではない。

実施例

- [0023] 実施例 1 本抽出物の製造

健康な成熟家兔の皮膚にワクシニアウイルスを皮内接種し、発痘した皮膚を切り取り採取した。採取した皮膚はフェノール溶液で洗浄・消毒を行なった後、余分のフェノール溶液を除去し、破碎して、フェノール溶液を加え混合し、3～7日間放置した後、さらに3～4日間攪拌しながら35～40℃に加温した。その後、固液分離して得た抽出液を塩酸でpH4.5～5.2に調整し、90～100℃で30分間、加熱処理した後、濾過して除蛋白した。さらに、濾液を水酸化ナトリウムでpH9.0～9.5に調整し、90～100℃で15分間、加熱処理した後、固液分離した。

- [0024] 得られた除蛋白液を塩酸でpH4.0～4.3に調整し、除蛋白液質量の2%量の活性炭を加えて2時間攪拌した後、固液分離した。採取した活性炭に水を加え、水酸化ナトリウムでpH9.5～10とし、60℃で90～100分間攪拌した後、遠心分離して上清を得た。遠心分離で沈澱した活性炭に再び水を加えた後、水酸化ナトリウムでpH10.5～11とし、60℃で90～100分間攪拌した後、遠心分離して上清を得た。両上清を合せて、塩酸で中和し、本抽出物を得た。

- [0025] 実施例 2 (試験方法と試験結果)

次に、上記実施例 1 で得られた本抽出物の、シュワン細胞の分化促進作用及び末梢神経再生促進作用を示す薬理試験の試験方法及び試験結果を示す。

- [0026] 細胞及び試薬

試験例 1、2 及び 4 においては、以下の手順で調製されたシュワン細胞を用いた。

シュワン細胞の初代培養は生後1～3日のWistar系ラットから坐骨神経を摘出し、シュワン細胞を単離した後、3～8継代目を実験に使用した。培養には

ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に3%FBS、20 ng/ml ニューレグリン及び3 μ M フォルスコリンを添加したものをを用いた。

試験例3においては、以下の手順で調製されたシュワン細胞を用いた。

シュワン細胞の初代培養は生後1~5日のWistar系ラットから坐骨神経を摘出し、シュワン細胞を単離した後、3~10継代目を実験に使用した。培養にはDMEMに3%FBS、20 ng/ml ニューレグリン及び300nM フォルスコリンを添加したものをを用いた。

調製されたシュワン細胞を用いて、シュワン細胞の細胞内シグナル、髄鞘関連タンパク質の発現及び軸索の髄鞘化に与える本抽出物の効果を調べた。

[0027] なお、髄鞘の主要構成タンパクはMyelin Basic Protein (以下「MBP」という。)、Myelin Protein Zero (以下「P0」という。)等の髄鞘関連タンパク質である。一般に髄鞘関連タンパク質の発現はオリゴデンドロサイト(中枢神経系で髄鞘を形成している細胞)及びシュワン細胞の分化の指標とされている。すなわち、髄鞘関連タンパク質の発現促進作用を有することは、オリゴデンドロサイト及びシュワン細胞の分化促進作用を有していると考えられる。

[0028] 統計解析

試験例1、2、4乃至7においては、統計解析は、JMP software version 11 (SAS Institute社)を用いてTukey-Kramer HSD検定を行った。

試験例3においては、統計解析は、SAS System Version 9.1.3 (SAS Institute社)を用いて多群間比較にはBartlettの検定を行い、等分散の場合はDunnettの多重比較検定を、不等分散の場合はSteelの多重比較検定を行った。

[0029] 試験例1 本抽出物がシュワン細胞の細胞内シグナルに与える効果の評価(増殖培地)

ポリ-L-リジンコートされた35mm dishに3%ウシ胎児血清 (FBS)、20 ng/ml ニューレグリン及び3 μ M フォルスコリンを含むDMEMを培地としてシュワン細胞を 2×10^4 個/cm²の濃度で播種し、24時間培養後、本抽出物を添加し、カプランバッファー (50 mM Tris、pH7.4、150 mM NaCl、10% glycerol、1%NP4

0) を用いて細胞溶解液を作成した。12%SDS-PAGEによって電気泳動した後、ポリフッ化ビニリデンメンブレンに転写した。5% skim milk でブロッキングし、一次抗体として、抗リン酸化AKT抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗AKT抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗リン酸化p44/42 MAPK抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗p44/42 MAPK抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗リン酸化p38抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗p38抗体 (1:1000; Cell Signaling社) を4°Cで一晩反応させた。反応後二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体 (1:1000; Cell Signaling社) を1時間反応させた後、ECL reagents (GEヘルスケア社) を反応させ、MF-ChemiBIS 3.2 (DNRバイオイメージングシステムズ社) を用いてバンドを検出した。各バンドの染色強度を算出し、AKTに対するリン酸化AKT (pAKT) の比率、ERKに対するリン酸化ERK (pERK) の比率及びp38に対するリン酸化p38 (p-p38) の比率 (平均値±標準誤差) を算出した。上記試験の結果の一例を表1、表2及び表3に示す。

[0030] [表1]

	AKT に対する pAKT の比率
対照	1.00±0.06
本抽出物 0.1 NU/mL	1.88±0.06*
本抽出物 0.2 NU/mL	1.76±0.04*
本抽出物 0.5 NU/mL	2.03±0.05**

*:p<0.05 vs 対照、**:p<0.01 vs 対照

[0031]

[表2]

	ERK に対する pERK の比率
対照	1.00±0.04
本抽出物 0.1 NU/mL	0.84±0.06
本抽出物 0.2 NU/mL	0.47±0.14*
本抽出物 0.5 NU/mL	0.33±0.11**

*:p<0.05 vs 対照、**:p<0.01 vs 対照

[0032] [表3]

	p38 に対する p-p38 の比率
対照	1.00±0.07
本抽出物 0.1 NU/mL	0.96±0.06
本抽出物 0.2 NU/mL	0.84±0.04
本抽出物 0.5 NU/mL	0.37±0.01*

*:p<0.05 vs 対照

[0033] 増殖培地において、本抽出物群では、対照群と比較して、AKTのリン酸化の増強（表1）、ERKのリン酸化の減弱（表2）及びp38のリン酸化の減弱（表3）が有意に認められた。本抽出物が、未分化なシュワン細胞の分化シグナルを促進することが確認された。

[0034] 試験例2 本抽出物がシュワン細胞の細胞内シグナルに与える効果の評価（分化培地）

ポリ-L-リジンコートされた35mm dishに3%ウシ胎児血清（FBS）、20 ng/ml ニューレグリン及び3µM フォルスコリンを含むDMEMを培地としてシュワン細胞を2×10⁴個/cm²の濃度で播種し、24時間培養後、1 mM のcAMPを添加して分化誘導すると同時に本抽出物を添加した。カプランバッファー（50 mM Tris、pH7.4、150 mM NaCl、10% glycerol、1%NP40）を用いて細胞溶解液を作

成した。12%SDS-PAGEによって電気泳動した後、ポリフッ化ビニリデンメンブレンに転写した。5% skim milk でブロッキングし、一次抗体として、抗リン酸化AKT抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗AKT抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗リン酸化p44/42 MAPK抗体 (1:1000; Cell Signaling社)、抗p44/42 MAPK抗体 (1:1000; Cell Signaling社) を4°Cで一晩反応させた。反応後二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体 (1:1000; Cell Signaling社) を1時間反応させた後、ECL reagents (GEヘルスケア社) を反応させ、MF-ChemiBIS 3.2 (DNRバイオイメージングシステムズ社) を用いてバンドを検出した。各バンドの染色強度を算出しAKTに対するpAKTの比率及びERKに対するpERKの比率 (平均値±標準誤差) を算出した。上記試験の結果の一例を表4及び表5に示す。

[0035] [表4]

	AKT に対する pAKT の比率
対照	1.00±0.04
cAMP	1.91±0.07*
cAMP 本抽出物	7.00±0.16#

*:p<0.05 vs 対照、#:p<0.05 vs cAMP

[0036] [表5]

	ERK に対する pERK の比率
対照	1.00±0.08
cAMP	0.80±0.15
cAMP 本抽出物	0.28±0.05#

#:p<0.05 vs cAMP

[0037] 分化培地において、本抽出物群では、cAMP群と比較して、AKTのリン酸化の増強 (表4) 及びERKのリン酸化の減弱 (表5) が有意に認められた。本抽出

物が、分化誘導されたシュワン細胞の分化をさらに促進することが確認された。

[0038] 試験例3 本抽出物がシュワン細胞の髄鞘関連タンパク質の発現に与える効果の評価（ウェスタンブロッティング法）

ポリ-L-リジンコートされた35mm dishに3%ウシ胎児血清（FBS）、20 ng/ml ニューレグリン及び3 μ M フォルスコリンを含むDMEMを用いてシュワン細胞を2 \times 10⁴個/cm²の濃度で播種した。24時間培養後、1 mM のcAMPを添加して分化誘導すると同時に本抽出物を添加した。72時間後にカプランバッファ（50 mM Tris、pH7.4、150 mM NaCl、10% glycerol、1%NP40）を用いて細胞溶解液を作成した。12%SDS-PAGEによって電気泳動した後、ポリフッ化ビニリデンメンブレンに転写した。5% skim milk でブロッキングし、一次抗体として、髄鞘蛋白の指標である抗MBP抗体（1：1000；Sigma-Aldrich社）、抗P0抗体（1：1000；Abcam社）を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。反応後二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体（1：1000；Cell Signaling社）を1時間反応させた後、ECL reagents（GEヘルスケア社）を反応させ、MF-ChemiBIS 3.2（DNRバイオイメージングシステムズ社）を用いてバンドを検出した。各バンドの染色強度を算出しGAPDHに対するMBP、P0の比率（平均値 \pm 標準誤差）を算出した。上記試験の結果の一例を表6及び表7に示す。

[0039] [表6]

	GAPDH に対する MBP の比率
対照	1.00 \pm 0.03
本抽出物	1.37 \pm 0.03
cAMP	1.74 \pm 0.03
cAMP 本抽出物	2.64 \pm 0.02**

**：p<0.01 vs cAMP

[0040]

[表7]

	GAPDH に対する P0 の比率
対照	1.00 ± 0.01
本抽出物	2.06 ± 0.06 [#]
cAMP	2.07 ± 0.03
cAMP 本抽出物	3.13 ± 0.04 ^{**}

#: p<0.05 vs 対照、**: p<0.01 vs cAMP

[0041] cAMPのみ添加した群と比較して、cAMPに本抽出物を更に添加することで、MBP (表6) 及びP0のタンパク質の有意な発現増強 (表7) が認められた。

[0042] 試験例4 本抽出物がシュワン細胞の髄鞘関連タンパク質のmRNA発現に与える効果の評価 (リアルタイムPCR法)

DMEMに3%FBS、20 ng/ml ニューレグリン及び300nM フォルスコリンを添加した培地で24時間培養した後、ニューレグリン及びフォルスコリンを含まない培地に変更して更に24時間培養した。ニューレグリン、フォルスコリン及び本抽出物を添加し、8時間培養した後に細胞を回収した。回収した細胞からRNeasy mini kit (QIAGEN社) でRNAを精製し、逆転写してcDNAを合成した。シュワン細胞の分化により発現が増加する髄鞘関連タンパク質の遺伝子のレベルを、表8に記載の特異的プライマー対を用いたリアルタイムPCR法で測定した。対照でのmRNA発現量を1としたときの各群の比率 (平均値±標準誤差) を算出した。上記試験の結果の一例を表9乃至表12に示す。

[0043] [表8]

	sense	配列番号	antisense	配列番号
MBP	AAGATCCCACAGCAGCTTCC	配列番号1	TAAAGAAGCGCCCGATGGAG	配列番号2
P0	GTAGGGGACCCTAGCTGGAA	配列番号3	TGTCCGGTGGGTTTTTGACA	配列番号4
PMP22	TGTTGCTCTTCGTCTCCACC	配列番号5	GAGGAGTAGCAGTGCTGGAC	配列番号6
ペリアキシン	TCCAAGTTTGCCATCTCGCT	配列番号7	GATGGACAGATCGAGGGCAG	配列番号8
GAPDH	GACAACCTTTGGCATCGTGA	配列番号9	ATGCAGGGATGATGTTCTGG	配列番号10

[0044] [表9]

	対照での MBP 発現量を 1 としたときの比率
対照	1.00±0.04
フォルスコリン ニューレグリン	0.45±0.06 [#]
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 10 mNU/mL	0.59±0.03
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 100 mNU/mL	0.99±0.03 [*]

[#]: p<0.05 vs 対照、^{*}: p<0.05 vs フォルスコリン及びニューレグリン

[0045] [表10]

	対照での P0 発現量を 1 としたときの比率
対照	1.00±0.07
フォルスコリン ニューレグリン	0.91±0.05
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 10 mNU/mL	0.94±0.06
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 100 mNU/mL	1.48±0.03 [*]

^{*}: p<0.05 vs フォルスコリン及びニューレグリン

[0046]

[表11]

	対照での PMP22 発現量を 1 としたときの比率
対照	1.00±0.04
フォルスコリン ニューレグリン	0.75±0.02 [#]
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 10 mNU/mL	0.97±0.05
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 100 mNU/mL	1.74±0.03 [*]

[#]:p<0.05 vs 対照、^{*}:p<0.05 vs フォルスコリン及びニューレグリン

[0047] [表12]

	対照でのペリアキシン発現量を 1 としたときの比率
対照	1.00±0.13
フォルスコリン ニューレグリン	1.02±0.04
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 10 mNU/mL	0.85±0.07
フォルスコリン ニューレグリン 本抽出物 100 mNU/mL	1.40±0.09 [*]

^{*}:p<0.05 vs フォルスコリン及びニューレグリン

[0048] フォルスコリン及びニューレグリン添加群と比較して、本抽出物100mNU/mLを更に添加することで、MBP（表9）、P0（表10）、PMP22（表11）及びペリアキシン（表12）のmRNAの有意な発現増強が認められた。

[0049] 試験例5 本抽出物がシュワン細胞の分化に与える効果の評価

胎生15日のWistar系ラットから採取したDRG神経細胞を、ポリ-L-リジンコート及びラミニンでコートされた8wellスライドチャンバーに2% B27 nutrient supplement、0.2 mmol/L L-グルタミン、1%ペニシリン/ストレプトマイシン及び50 ng/mL nerve growth factor を含むneurobasal培地を用いて4×10⁴個/wellの濃度で播種した。細胞播種後7日目に50g/mLアスコルビン酸を添加

して分化誘導し、本抽出物を添加した。分化誘導14日後及び21日後に蛍光免疫染色を行った。一次抗体として、抗MBP抗体 (Calbiochem社)、抗neurofilament 200抗体 (Sigma-Aldrich社)を4℃で一晩反応させた。反応後二次抗体としてAlexa 594標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (1:1000; Molecular Probes社) 及びAlexa 488標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (1:1000; Molecular Probes社)を1時間反応させた。二次抗体反応後、核の評価のためDAPI (4'-6-ジァミジノフェニル-2-インドール:和光純薬社)を含有しているマウント剤 (商品名:Permafluor [登録商標]、Thermo Fisher Scientific社)に反応させた。NIS Elements BR software (ニコン社)を用いて、MBP陽性領域の長さ、広さ (平均値±標準誤差)を評価した。上記試験の結果の一例を表13及び表14に示す。

[0050] [表13]

	MBP 陽性領域の長さ(μm)	
	分化誘導 14 日後	分化誘導 21 日後
対照	45.2±2.30	50.7±0.64
本抽出物	51.7±1.25*	60.7±2.54**

*:p<0.05 vs 対照(分化誘導 14 日後)、**:p<0.01 vs 対照(分化誘導 21 日後)

[0051] [表14]

	MBP 陽性領域の面積(μm ²)	
	分化誘導 14 日後	分化誘導 21 日後
対照	2288±92.8	3569±111
本抽出物	3741±132**	5171±81.1***

** :p<0.01 vs 対照(分化誘導 14 日後)、***:p<0.001 vs 対照(分化誘導 21 日後)

[0052] 対照群と比較して、本抽出物群では分化誘導後14日及び21日後においてMBP陽性領域の長さ (表13) 及び面積 (表14) が有意に増加しており、シュワン細胞の分化促進が認められた。

[0053] 試験例 6 坐骨神経圧挫損傷モデルにおける評価

坐骨神経圧挫損傷モデルを用いて、神経損傷後の再髄鞘化に対する本抽出物の効果を調べた。本抽出物をラットに浸透圧ポンプを用いて連続投与し、免疫組織学的評価を行った。

(1) 坐骨神経圧挫損傷モデルラットの作製及び本抽出物の投与

浸透圧ポンプ（商品名：alzet〔登録商標〕、model：2ML2、DURECT社）内に生理食塩液、本抽出物をそれぞれ注入し、37℃の生理食塩液中で一晩静置した。6週齢雄性Wistar系ラットにミダゾラム（2 mg/kg）、ブトルファンール（2.5 mg/kg）、メデトミジン（0.15 mg/kg）の混合麻酔薬を腹腔内投与して深鎮静をかけた。ラットの左坐骨神経を展開し、坐骨切痕から遠位5mmの位置に鑷子で圧挫損傷を加えた。圧挫時間は10秒間、圧挫回数は3回とし、圧挫操作の間隔は10秒間とした。筋膜及び皮膚を4-0ナイロン縫合糸で縫合した。生理食塩液封入浸透圧ポンプ又は本抽出物封入浸透圧ポンプ（12NU/kg/日）をそれぞれラットの背部皮下に留置した。なお、実験ラットは以下の2群に分類した。

- ・発症対照群：坐骨神経圧挫損傷を加えて生理食塩液を全身投与する群
 - ・本抽出物投与群：坐骨神経圧挫損傷を加えて本抽出物を全身投与する群
- 浸透圧ポンプは2週間留置し、浸透圧ポンプを入れ替え、さらに2週間留置して本抽出物又は生理食塩液を4週間連続投与した。

[0054] (2) 免疫組織学的評価

術後4週間が経過したラットを麻酔薬で鎮静をかけ、坐骨神経を採取した。4%パラホルムアルデヒドで24時間常温にて固定後、20%スクロース液に浸し、ティシュー・テック（サクラファインテックジャパン社）に包埋、液体窒素で凍結させ、5μmの厚みで横断面の凍結切片を作成した。凍結切片を100%メタノールで-20℃、30分間浸透させ、PBS + 0.2% TritonX + 5% bovine serum albuminでブロッキングした後、一次抗体として抗NF200ウサギ抗体（1：1000；102M4784、Sigma-Aldrich社）及び抗MBPマウス抗体（1：1000；NE1018、CALBIOCHEM社）を4℃で一晩反応させた。反応後二次抗体としてAl

exa 488標識ヤギ抗ウサギIgG抗体（1：1000；Lifetechnologies社）とAlexa 568標識ヤギ抗マウスIgG抗体（1：1000；Lifetechnologies社）を1時間反応させた。二次抗体反応後、核の評価のためDAPI（4'-6-ジアミジノフェニル-2-インドール：和光純薬社）を含有しているマウント剤（商品名：Perma fluor〔登録商標〕、Thermo Fisher Scientific社）に反応させた。NIS Elements BR software（ニコン社）を用いて、MBP陽性軸索数／全軸索数を髄鞘化率として計算し（平均値±標準誤差）、評価した。上記試験の結果の一例を表15に示す。

[0055] [表15]

	髄鞘化率(%)
発症対照	67.1±1.5
本抽出物投与	79.9±1.1***

***:p<0.001 vs 発症対照

[0056] 発症対照群と比較して、本抽出物投与群では髄鞘化率が有意に上昇しており、髄鞘化促進作用が認められた（表15）。

[0057] 試験例7 ラット坐骨神経局所脱髄モデルにおける評価

LPC誘発脱髄モデルを用いて、脱髄後の再髄鞘化に対する本抽出物の効果を調べた。上記試験例6（1）と同様の方法で、本抽出物をラットに浸透圧ポンプを用いて連続投与し、免疫組織学的評価を行った。

（1）坐骨神経局所脱髄モデルラットの作製及び本抽出物の投与

試験例6と同様に、浸透圧ポンプ（商品名：alzet〔登録商標〕、model：2ML1、DURECT社）内に生理食塩液、本抽出物をそれぞれ注入し、37℃の生理食塩液中で一晩静置した。6週齢雄性Wistar系ラットにミダゾラム（2 mg/kg）、ブトルファノール（2.5 mg/kg）、メデトミジン（0.15 mg/kg）の混合麻酔薬を腹腔内投与して深鎮静をかけた。坐骨切痕のレベルで左坐骨神経を露出させ、ハミルトンシリンジを用いて、生理食塩液又は、2% LPC（Sigma-Aldrich社）をそれぞれ5μL 近位坐骨神経に投与した。LPC投与7日後に、生理食

塩液封入浸透圧ポンプ又は本抽出物封入浸透圧ポンプ（24 NU/kg/日）を背部皮下に留置し、その後1週間、生理食塩液又は本抽出物を連続投与した。

[0058] （2）免疫組織学的評価

術後2週間経過したラットを麻酔薬で鎮静をかけ、坐骨神経を採取した。試験例6（2）と同様に、NIS Elements BR software（ニコン社）を用いて、MBP陽性軸索数/全軸索数を髄鞘化率として計算し（平均値±標準誤差）、評価した。上記試験の結果の一例を表16に示す。

[0059] [表16]

	髄鞘化率(%)
発症対照	41.4±0.58
本抽出物投与	74.4±0.46***

***:p<0.001 vs 発症対照

[0060] 発症対照群と比較して、本抽出物投与群では髄鞘化率が有意に上昇しており、髄鞘化促進作用が認められた（表16）。

[0061] （3）坐骨神経機能指数評価

運動機能の評価のため、術後2週時点で坐骨神経機能指数（the sciatic function index; SFI）を測定した。SFI測定のため、ラットの後足の裏にインクをつけ40 cm四方の水平台の上に事務用紙（office paper）を敷き、その上を歩行させ足跡を記録した。以下の項目を計測し下記の式でSFIを計算した。SFI=0が正常、SFI=-100が機能低下を示す。

<SFI数式>

$$SFI = -38.3 \times ((EPL - NPL) / NPL) + 109.5 \times ((ETS - NTS) / NTS) + 13.3 \times ((EITS - NITS) / NITS) - 8.8$$

<各項目>

EPL=experimental print length

NPL=normal print length

ETS=experimental toe spread

NTS=normal toe spread

EITS=experimental intermediary toe spread

NITS=normal intermediary toe spread

上記試験の結果の一例を表 17 に示す。

[0062] [表17]

	坐骨神経機能指数(%)
対照	-9.25±0.90
本抽出物投与	-7.66±1.18
発症 対照	-22.5±3.13***
発症 本抽出物投与	-7.75±0.41###

***:p<0.001 vs 対照、###:p<0.001 vs 発症対照

[0063] 発症対照群と比較して、発症本抽出物投与群では、SFIの有意な改善が認められ、運動機能が改善した（表 17）。

[0064] (4) フォン・フライ試験 (von Frey test)

感覚機能の評価のため、術後 2 週時点でフォン・フライフィラメント (0.008 g-26 g、商品名: TouchTest [登録商標]、North Coast Medical社) を用いて機械刺激に対する下肢反応閾値 (mechanical hind paw withdrawal threshold) を測定した。前記ラットにメッシュ状のフェンスの上を歩かせて、足底部に上記フィラメントで圧を加え逃避行動を起こした値を記録した。評価に際して、健側及び患側それぞれを測定し患側/健側比を算出し評価した。上記試験の結果の一例を表 18 に示す。

[0065]

[表18]

	下肢反応閾値 患側/健側比
対照	0.89±0.08
本抽出物投与	0.88±0.06
発症 対照	1.65±0.30*
発症 本抽出物投与	0.83±0.08 ^{##}

*:p<0.05 vs 対照、#:p<0.01 vs 発症対照

[0066] 感覚神経の機能評価である機械刺激に対する下肢反応閾値 (mechanical hind paw withdrawal threshold) の患側/健側比は、発症対照群と比較して発症本抽出物投与群では有意に回復し、知覚異常 (鈍麻) が改善した (表18)。

[0067] (5) ホットプレート試験 (Hot plate test)

温度刺激に対する評価のため、術後2週時点でホットプレート装置 (Ugo basile社) を用いて、患肢の最初の逃避反応 (患肢をなめる、上げる) を示すまでの時間 (Hot plate latency) を52.5°Cの設定で測定した。カットオフタイムは45秒とした。上記試験の結果の一例を表19に示す。

[0068] [表19]

	逃避反応までの時間(秒)
対照	10.1±0.54
本抽出物投与	9.20±0.43
発症 対照	13.6±0.43 ^{***}
発症 本抽出物投与	9.57±0.57 ^{###}

***:p<0.001 vs 対照、###:p<0.001 vs 発症対照

ホットプレート試験において、発症対照群と比較して発症本抽出物投与群では、有意な改善が認められ、温熱性知覚異常 (鈍麻) が改善した (表19)

)。

[0069] (6) 電気生理学的評価

術後2週経過したラットを麻酔薬で鎮静をかけ、手術台に腹臥位とし、左坐骨神経及び左前脛骨筋を展開した。神経伝導速度 (nerve conduction velocity; NCV) は、坐骨神経圧挫損傷部の近位側及び遠位側をそれぞれ双極電極で刺激して、各測定値から算出した。終末潜時 (terminal latency; TL) 及び複合筋活動電位 (compound muscle action potentials; CMAP) は、坐骨神経近位を双極電極で刺激して測定した。測定及び評価は、データ収録・解析システムPowerLab 2/26 (AD Instruments社) を用いた。上記試験の結果の一例を表20乃至表22に示す。

[0070] [表20]

	神経伝導速度(m/秒)
対照	41.8±2.230
本抽出物投与	40.7±2.01
発症 対照	23.8±2.02***
発症 本抽出物投与	41.3±1.46###

***:p<0.001 vs 対照、###:p<0.001 vs 発症対照

[0071] [表21]

	終末潜時(ミリ秒)
対照	1.84±0.06
本抽出物投与	1.89±0.05
発症 対照	2.43±0.12***
発症 本抽出物投与	1.88±0.04###

***:p<0.001 vs 対照、###:p<0.001 vs 発症対照

[0072]

[表22]

	複合筋活動電位(ミリボルト)
対照	48.0±3.61
本抽出物投与	48.1±4.72
発症対照	25.5±5.07*
発症本抽出物投与	47.3±5.13#

*:p<0.05 vs 対照群、#:p<0.05 vs 発症対照

[0073] 発症対照群と比較して、本抽出物投与群では、NCV、TL及びCMAPの有意な回復が認められ、電気生理学的な機能が改善した（表20乃至表22）。

[0074] 以上のことから、本発明の好ましい実施態様としては以下のようなものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0075] (1) ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含むシュワン細胞分化促進剤。

(2) 末梢神経再生促進剤である、上記(1)に記載のシュワン細胞分化促進剤。

(3) 末梢神経再生促進剤が、末梢神経損傷治療剤である、上記(2)に記載のシュワン細胞分化促進剤。

(4) 末梢神経再生促進剤が、脱髄性疾患治療剤である、上記(2)に記載のシュワン細胞分化促進剤。

(5) 分化促進が髄鞘化促進である、上記(1)乃至(4)のいずれかに記載のシュワン細胞分化促進剤。

(6) 髄鞘化促進が髄鞘関連タンパク質の発現促進である、上記(5)に記載のシュワン細胞分化促進剤。

(7) 髄鞘関連タンパク質がMBP、PO、PMP22又はペリアキシンである、上記(6)に記載のシュワン細胞分化促進剤。

(8) 炎症組織がウサギの炎症皮膚組織である、上記(1)乃至(7)のい

ずれかに記載のシュワン細胞分化促進剤。

(9) 注射剤である、上記(1)乃至(8)のいずれかに記載のシュワン細胞分化促進剤。

(10) 経口剤である、上記(1)乃至(8)のいずれかに記載のシュワン細胞分化促進剤。

[0076] (11) シュワン細胞における髄鞘関連タンパク質の発現に対する作用を指標とする、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤の判定又は評価方法。

(12) 髄鞘関連タンパク質がMBP、PO、PMP22又はペリアキシンである、上記(11)に記載の判定又は評価方法。

(13) 髄鞘関連タンパク質の発現に対する作用が促進作用である、上記(11)又は(12)に記載の判定又は評価方法。

(14) 髄鞘関連タンパク質の発現に対する作用を、細胞におけるMEK/ERK経路に介在するタンパク質に対する作用を指標として測定する、上記(11)乃至(13)のいずれかに記載の判定又は評価方法。

(15) MEK/ERK経路に介在するタンパク質がERK1/2である、上記(14)に記載の判定又は評価方法。

(16) MEK/ERK経路に介在するタンパク質に対する作用がタンパク質のリン酸化抑制作用である、上記(14)又は(15)に記載の判定又は評価方法。

(17) 髄鞘関連タンパク質の発現に対する作用を、細胞におけるPI3K/AKT経路に介在するタンパク質に対する作用を指標として測定する、上記(11)乃至(13)のいずれかに記載の判定又は評価方法。

(18) PI3K/AKT経路に介在するタンパク質がAKTである、上記(17)に記載の判定又は評価方法。

(19) PI3K/AKT経路に介在するタンパク質に対する作用がタンパク質のリン酸化促進作用である、上記(17)又は(18)に記載の判定又は評価方法。

(20) 炎症組織がウサギの炎症皮膚組織である、上記(11)乃至(19)のいずれかに記載の判定又は評価方法。

[0077] (21) 上記(11)乃至(20)のいずれかに記載の判定又は評価を行うことによって、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤の品質規格を担保する方法。

(22) ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有する製剤が、注射剤又は経口剤である、上記(21)に記載の品質規格を担保する方法。

[0078] (23) 治療が必要な患者にワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤を投与することからなる、末梢神経損傷の治療方法。

(24) 末梢神経損傷の治療がシュワン細胞の分化促進によるものである、上記(23)に記載の方法。

(25) 治療が必要な患者にワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤を投与することからなる、脱髄性疾患の治療方法。

(26) 脱髄性疾患の治療がシュワン細胞の分化促進によるものである、上記(25)に記載の方法。

(27) 分化促進が髄鞘化促進である、上記(24)又は(26)に記載の方法。

(28) 髄鞘化促進が髄鞘関連タンパク質の発現促進である、上記(27)に記載の方法。

(29) 髄鞘関連タンパク質がMBP、PO、PMP22又はペリアキシンである、上記(28)に記載の方法。

(30) 炎症組織がウサギの皮膚組織である、上記(23)乃至(29)のいずれかに記載の方法。

(31) 投与が注射によるものである、上記(23)乃至(30)のいずれかに記載の方法。

(32) 投与が経口によるものである、上記(23)乃至(30)のいずれかに記載の方法。

産業上の利用可能性

[0079] 以上のとおり、本抽出物がシュワン細胞の分化促進作用及び末梢神経再生促進作用を示すことから、本抽出物を含有する製剤は、末梢神経損傷の治療効果を有すると考えられた。

請求の範囲

- [請求項1] ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を含有するシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項2] 末梢神経再生促進剤である、請求項1に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項3] 末梢神経再生促進剤が、末梢神経損傷治療剤である、請求項2に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項4] 末梢神経再生促進剤が、脱髄性疾患治療剤である、請求項2に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項5] 分化促進が髄鞘化促進である、請求項1乃至4のいずれか一項に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項6] 髄鞘化促進が髄鞘関連タンパク質の発現促進である、請求項5に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項7] 髄鞘関連タンパク質がMBP、PO、PMP22又はペリアキシンである、請求項6に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項8] 炎症組織がウサギの炎症皮膚組織である、請求項1乃至7のいずれか一項に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項9] 注射剤である、請求項1乃至8のいずれか一項に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項10] 経口剤である、請求項1乃至8のいずれか一項に記載のシュワン細胞分化促進剤。
- [請求項11] シュワン細胞における髄鞘関連タンパク質の発現促進作用を指標とする、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤の判定又は評価方法。
- [請求項12] 髄鞘関連タンパク質がMBP、PO、PMP22又はペリアキシンである、請求項11に記載の判定又は評価方法。
- [請求項13] 髄鞘関連タンパク質の発現促進作用を、細胞におけるERK1/2のリン酸化抑制作用を指標として測定する、請求項11又は12に記載

載の判定又は評価方法。

[請求項14] 髄鞘関連タンパク質の発現促進作用を、細胞におけるAKTのリン酸化促進作用を指標として測定する、請求項11又は12に記載の判定又は評価方法。

[請求項15] 炎症組織がウサギの炎症皮膚組織である、請求項11乃至14のいずれか一項に記載の判定又は評価方法。

[請求項16] 請求項11乃至15のいずれか一項に記載の判定又は評価を行うことによって、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物又はこれを含有する製剤の品質規格を担保する方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/034374

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K35/36 (2015.01) i, A61K35/76 (2015.01) i, A61P25/00 (2006.01) i, A61P25/02 (2006.01) i, A61P43/00 (2006.01) i, C12N15/09 (2006.01) i, C12Q1/06 (2006.01) i, G01N33/15 (2006.01) i, G01N33/50 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61K35/36, A61K35/76, A61P25/00, A61P25/02, A61P43/00, C12N15/09, C12Q1/06, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Japanese Published Examined Utility Model Applications	1922-1996
Japanese Published Unexamined Utility Model Applications	1971-2017
Japanese Examined Utility Model Registrations	1996-2017
Japanese Registered Utility Model Specifications	1994-2017

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

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	松岡峰造他, ノイロトロピンは AKT, ERK シグナルを介して Schwann 細胞の分化を促進させる, 日本整形外科学会雑誌, August 2016, vol. 90, no. 8, pp. S1759, 2-PP-8, entire text, non-official translation (MATSUOKA, Houzou et al., Neurotrophin promotes differentiation of Schwann cells via AKT, ERK signal.; The Journal of the Japanese Orthopaedic Association)	1-10 7, 11-16
X	田中啓之, 末梢神経系におけるノイロトロピンの効果, 日本ペインクリニック学会誌, June 2016, vol. 23, no. 3, p. 350, paragraph 2, (TANAKA, Hiroyuki; The effect of Neurotrophin on peripheral nervous system, Journal of the Japan Society of Pain Clinicians)	1-10

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
24 November 2017

Date of mailing of the international search report
12 December 2017

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/JP2017/034374

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-516832 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 10 June 2004, paragraph [0005] & US 2003/0039987 A1, paragraph [0005] & US 2008/0057509 A1 & WO 2002/051981 A2 & CA 2399280 A & CA 2847458 A	7
Y	JP 2003-502382 A (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT COMPANY LTD.) 21 January 2003, page 3, the last line to page 4, line 3 & JP 4846148 B2 & US 7201896 B1 & WO 2000/078331 A2, page 1, line 26 to page 2, line 1 & EP 1185293 A1 & DE 60023139 D & IL 130586 D & AU 5423100 A & NO 20015673 A & CA 2374997 A & HK 1047549 A & ES 2250140 T & CN 1364088 A	7
Y	WO 2011/162317 A1 (NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 29 December 2011, claims 8-13, 16, 17, 19, example 1, paragraphs [0030], [0047] & JP 11-162317 A1 & US 2013/0122512 A1, claims 8-13, 16, 17, 19, example 1, paragraphs [0063], [0092] & EP 2587265 A1 & CN 102959400 A & TW 201224450 A	11-16
Y	ISHIHARA, K. et al., The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site, FEBS Lett., 2003, vol. 550, no. 1/3, pp. 107-113, abstract	13
P, X	WO 2017/146230 A1 (UNIV OSAKA) 31 August 2017 (Family: none)	1-10
P, X	WO 2017/154822 A1 (UNIV OSAKA) 14 September 2017 (Family: none)	1-10
P, X	MATSUOKA, H. et al., Neurotrophin accelerates peripheral nerve regeneration by promoting the differentiation of Schwann cells, Journal of Orthopaedic Research, March 2017, vol. 35, Supp. Supplement 1, Abstract Number: 0807	1-10
P, X	松岡峰造他, ノイロトロピンはシュワン細胞の分化を促進させ末梢神経再生効果を発揮する, 日本マイクロサージャリー学会学術集会プログラム・抄録集, October 2016, vol. 43rd, p. 165, R-34, non-official translation (MATSUOKA, Houzou et al., Neurotrophin promotes the differentiation of Schwann cells and exerts peripheral nerve regenerating effect, The Annual Meeting of the Japanese Society for Reconstructive Microsurgery: Program and Abstracts)	1-10
A	WO 2009/28605 A1 (UNIV KYUSHU) 05 March 2009 & US 2011/0111051 A1 & EP 2191836 A1 & AU 2008292407 A & CA 2698129 A & CN 101790377 A & HK 1143734 A & KR 10-2010-0057535 A & TW 200911277 A	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/034374

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 5288182 B2 (NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 14 June 2013 & US 2010/0048408 A1 & WO 2008/029838 A1 & EP 2075341 A1 & CA 2663390 A & KR 10-2009-0047525 A & CN 101528947 A & AU 2007292082 A	11-16
A	FLEDERICH, R. et al., Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A, Nature Medicine, 2014, vol. 20, no. 9, pp. 1055-1061	11-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K35/36(2015.01)i, A61K35/76(2015.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K35/36, A61K35/76, A61P25/00, A61P25/02, A61P43/00, C12N15/09, C12Q1/06, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	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）

WPI, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
X Y	松岡峰造他, ノイロトロピンは AKT, ERK シグナルを介して Schwann 細胞の分化を促進させる, 日本整形外科学会雑誌, 2016.08, Vol. 90, No. 8, Page. S1759, 2-PP-8, 全文	1-10 7, 11-16
X	田中啓之, 末梢神経系におけるノイロトロピンの効果, 日本ペインクリニック学会誌, 2016.06, Vol. 23, No. 3, Page. 350, 第2パラグラフ	1-10

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

24. 11. 2017

国際調査報告の発送日

12. 12. 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）
 六笠 紀子

4U 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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
Y	JP 2004-516832 A (バイラー カレッジ オブ メディシン) 2004.06.10, 段落 0005 & US 2003/0039987 A1, [0005] & US 2008/0057509 A1 & WO 2002/051981 A2 & CA 2399280 A & CA 2847458 A	7
Y	JP 2003-502382 A (イエダ リサーチ アンド ディベロップメン ト カンパニー リミテッド) 2003.01.21, 第3頁最終行~第4頁 第3行 & JP 4846148 B2 & US 7201896 B1 & WO 2000/078331 A2, page1, line26-page2, line1 & EP 1185293 A1 & DE 60023139 D & IL 130586 D & AU 5423100 A & NO 20015673 A & CA 2374997 A & HK 1047549 A & ES 2250140 T & CN 1364088 A	7
Y	WO 2011/162317 A1 (日本臓器製薬株式会社) 2011.12.29, 特許請求 の範囲請求項 8-13, 16, 17, 19, 実施例 1, 段落 0030, 0047 & JP 11-162317 A1 & US 2013/0122512 A1 claims8-13, 16, 17, 19, Example1, [0063], [0092]& EP 2587265 A1 & CN 102959400 A & TW 201224450 A	11-16
Y	ISHIHARA K, et al, The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site., FEBS Lett., 2003, Vol. 550, No. 1/3, Page. 107-113, Abstract	13
P, X	WO 2017/146230 A1 (国立大学法人大阪大学) 2017.08.31, (ファミリーなし)	1-10
P, X	WO 2017/154822 A1 (国立大学法人大阪大学) 2017.09.14, (ファミリーなし)	1-10
P, X	MATSUOKA, H et al, Neurotrophin accelerates peripheral nerve regeneration by promoting the differentiation of Schwann cells., Journal of Orthopaedic Research, 2017.03, Vol. 35, Supp. Supplement 1., Abstract Number: 0807	1-10
P, X	松岡峰造他, ノイロトロピンはシュワン細胞の分化を促進させ末梢 神経再生効果を発揮する, 日本マイクロサージャリー学会学術集会 プログラム・抄録集, 2016.10, Vol. 43rd, Page. 165, R-34	1-10
A	WO 2009/28605 A1 (国立大学法人九州大学) 2009.03.05, & US 2011/0111051 A1 & EP 2191836 A1 & AU 2008292407 A & CA 2698129 A & CN 101790377 A & HK 1143734 A & KR 10-2010-0057535 A & TW	1-10

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
	200911277 A	
A	JP 5288182 B2 (日本臓器製薬株式会社) 2013.06.14, & US 2010/0048408 A1 & WO 2008/029838 A1 & EP 2075341 A1 & CA 2663390 A & KR 10-2009-0047525 A & CN 101528947 A & AU 2007292082 A	11-16
A	FLED RICH R. et al, Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A., Nature Medicine, 2014, Vol.20, No.9, p.1055-1061	11-16