

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年6月3日(03.06.2011)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2011/065480 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/661 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/662 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/071127
- (22) 国際出願日: 2010年11月26日(26.11.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-268225 2009年11月26日(26.11.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人お茶の水女子大学(OCHANOMIZU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 Tokyo (JP). SANSHO 株式会社(SANSO CO. LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋1-2-10 東洋ビル3F Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 空伏 きみ子(MUROFUSHI Kimiko) [JP/JP]; 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 国立大学法人お茶の水女子大学内 Tokyo (JP). 金敷 晴美(KANASHIKI Harumi) [JP/JP]; 〒1730003 東京都板橋区加賀1-15-6-208 Tokyo (JP). 空伏 擴(MUROFUSHI Hiromu) [JP/JP]; 〒3360026 埼玉県さいたま市南区辻4-12-17 Saitama (JP). 後藤 真里(GOTOH Mari) [JP/JP]; 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 国立大学法人お茶の水女子大学内 Tokyo (JP). 垣内 康孝(KAKIUCHI Yasutaka) [JP/JP]; 〒1128610 東京都文京区大塚2丁目1番1号 国立大学法人お茶の水女子大学内 Tokyo (JP). 小林 進(KOBAYASHI Susumu) [JP/JP]; 〒1520032 東京都目黒区平町2-1-7 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))



WO 2011/065480 A1

(54) Title: NERVE CELL DEATH INHIBITOR

(54) 発明の名称: 神経細胞死抑制剤

(57) Abstract: Provided is a novel nerve cell death inhibitor which has an effect of inhibiting delayed nerve cell death caused by transient ischemia. Specifically provided is a drug for inhibiting delayed nerve cell death caused by transient ischemia, which contains cyclic phosphatidic acid or carbacyclic phosphatidic acid or a salt thereof.

(57) 要約: 本発明の課題は、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制する作用を有する新規な神経細胞死抑制剤を提供することである。本発明によれば、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するための薬剤が提供される。

明 細 書

発明の名称： 神経細胞死抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸を有効成分とする一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するための薬剤に関する。

背景技術

[0002] 脳血管疾患には、血管の病的プロセスにより生じる何らかの脳の異常が含まれる。血管の病的プロセスには、次のいずれか1つまたは複数が含まれると考えられる。血栓または塞栓による血管内腔の閉塞、血管の破裂、血管壁の透過性の変化、血液質の粘度上昇などによる変化がある。

[0003] 脳血管疾患は典型的には発作として現れる、発作は血流の欠如及び脳への不十分な酸素により生じる脳組織の死として特徴づけることができる。欧米においては、心疾患及び癌について、発作が主な死因である。わが国においては、脳血管障害の死亡率は減少している一方、発症率は増加しており、高齢者の寝たきりの原因の約4割を占めている。

[0004] 発作は虚血性または出血性である。虚血性発作では、血管を閉塞する血栓により、またはアテローム硬化症により、脳の一部への血液供給が低下するか、止まる。脳への血流低下または停止が、脳虚血として知られている。脳虚血は数秒から数分持続する事があり、虚血が2、3分以上起こると脳組織の梗塞が生じる。更に、脳虚血は、重篤且つ長時間の心不全またはショックに由来する循環及び低血圧の障害からも起こりうる。

[0005] これまで、脳虚血疾患に対する治療薬は幾つか臨床の現場で使用されてきており多くの患者の救命に貢献してきているが、発作を発症してからの治療には十分な効果を発揮し得ていないのが現状である。また、下記の文献においては神経細胞死を引き起こす疾患の予防法並びに治療法として、リゾフォスファチジルエタノールアミンを用いる技術（特許文献1）、グルタメート

レセプターアゴニスト（特許文献2）、ピリドキシン、ピリドキサミンなど（特許文献3）、ホスファチジルコリンなどを有効成分とする予防剤（特許文献4）、ドコサヘキサエン並びにその誘導體（特許文献5）、ジリノレオイルホスファチジルエタノールアミンを有効成分とする医薬組成物（特許文献6）、リゾホスファチジン酸、リゾホスファチジルイノシトールなど（特許文献7）が知られている。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2007-22966号公報
- 特許文献2：特開平7-196533号公報
- 特許文献3：特表2003-528146号公報
- 特許文献4：特開2000-239168号公報
- 特許文献5：特開平2-49723号公報
- 特許文献6：特開2005-247728号公報
- 特許文献7：特表平11-512439号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] しかしながら、脳血管障害による一過性脳虚血による遅発性神経細胞死を原因とする病態に対して、現在までに十分な効果が認められる治療薬はなく、新たな薬剤の開発が求められている。即ち、本発明は、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制する作用を有する新規な神経細胞死抑制剤を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

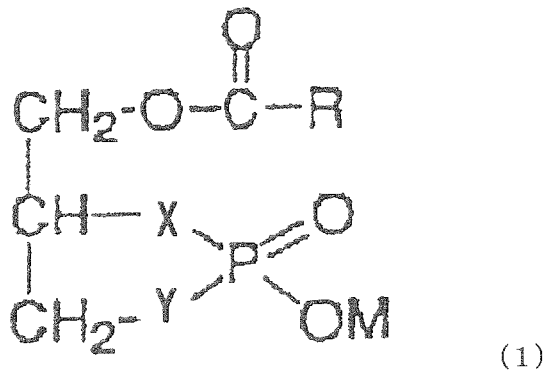
- [0008] 本発明者は、すでに環状ホスファチジン酸及びその誘導體が神経細胞の分化誘導、神経細胞の神経突起伸長作用を有し、脳神経細胞死を抑制することを見いだしているが、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸及びその誘導體が、一過性脳虚血による遅発性神経細胞死を抑制すること

を見だし、本発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明によれば、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するための薬剤が提供される。

好ましくは、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸は、式(1)で示される化合物である。

[化1]



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、-O-又は-CH₂-を示すが、X及びYが同時に-CH₂-になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

[0010] 好ましくは、一般式(1)において、X及びYが-O-である。

好ましくは、一般式(1)において、X又はYが-CH₂-である。

好ましくは、一般式(1)において、RがC₁₅H₂₉又はC₁₇H₃₃である。

[0011] 本発明によればさらに、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸あるいはその塩を、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を伴う患者に投与することを含む、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制する方法が提供される。

[0012] 本発明によればさらに、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するための薬剤の製造のための、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスフ

ァチジン酸あるいはその塩の使用が提供される。

発明の効果

- [0013] 本発明によれば、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする、副作用の少ない一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するための薬剤を提供できる。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1] 図1は、一過性脳虚血処理に伴う海馬CA1領域遅発性神経細胞死における2ccPA（カルバ環状ホスファチジン酸）及びcPA（環状ホスファチジン酸）の効果を示す。

[図2] 図2は、一過性脳虚血処理に伴う海馬CA1領域の観察結果を示す。

[図3] 図3は、一過性脳虚血処理に伴う海馬CA1領域遅発性神経細胞死における2ccPA（カルバ環状ホスファチジン酸）及びcPA（環状ホスファチジン酸）の効果を示す。

発明を実施するための形態

- [0015] 以下、本発明について更に具体的に説明する。

本明細書中で以下に記載する実施例では、コントロール群を含むラット海馬CA1領域の錐体細胞に対して、一過性の脳虚血処理による遅発性神経細胞死が誘導されている実験系を用いた。この実験系において、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸は明らかに同領域の遅発性神経細胞死を抑制する働きがあることが示された。

- [0016] 一過性脳虚血によって、遅発性の神経細胞死が起こることが、脳梗塞などの疾患の治療効果を妨げる原因となっている。そのメカニズムは未だ明らかでないことも多いが、一過性脳虚血後に、神経細胞特有の細胞死決定機構が働いて、それが最終的にアポトーシス共通の経路に不可逆的に進行すると考えられている。その際に、海馬CA1領域で一過性脳虚血後、遅発性神経細胞死に先立って、ユビキチン/プロテアソームの機能が不可逆的に低下し、それが神経細胞死を引き起こすきっかけとなることが報告され、その際に、カスパーゼ3やp53が必要不可欠であることが明らかにされている(Yonekura, I., Ta

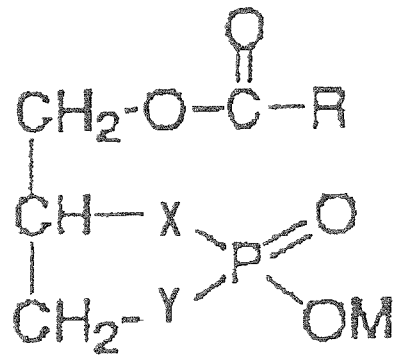
kai, K., Asai, A., Kawahara, N., Kirino, T. p53 potentiates hippocampal neuronal death caused by global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 26: 1332-1340 (2006); 及び Asai, A., Tanahashi, N., Qui, J.-H., Saito, N., Chi, S., Kawahara, N., Tanaka, K., Kirino, T. Selective proteasomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 22: 705-710 (2002)。

[0017] また、虚血により、嫌気性代謝によるアシドーシスの進行によって Na^+ の細胞内流入が起こり、 Na^+ 負荷のために細胞が膨張すること、その後にかかる再還流によってフリーラジカルの発生と Ca^{2+} の流入が起こり、フリーラジカルによる細胞膜障害がさらなる Ca^{2+} 増加を引き起こして、最終的には細胞膜破壊を起こして細胞死をきたすことも報告されている（橋本克次，吉岡淳，今橋憲一，楠岡英雄 カルシウムと再還流障害. 呼吸と循環 49: 43-49 (2001)）。また再還流後には、アラキドン酸代謝系や一酸化窒素合成酵素からのフリーラジカル産生による酸化ストレスも、細胞死を助長する（Love, S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 9: 119-131 (1999)）。このことから、再還流時にフリーラジカルスカベンジャーを投与することにより、細胞死への経路を遮断して再還流障害を軽減あるいは阻止できる可能性が考えられ、この観点から開発された治療薬がラジカット（一般名：エダラボン）である。これは、フリーラジカル消去により、細胞膜脂質の過酸化を抑制して、脳保護作用を示す物質で、本研究によるcPAとは作用機序が全く異なる。

[0018] 即ち、本発明の薬剤は、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するために使用することができ、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸又はその塩を有効成分として含む。環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸としては本発明の効果を示すものであれば特に限定されないが、好ましくは、下記式（I）で示される環状ホスファチジン酸を使用することができる。

[0019]

[化2]



(1)

[0020] (式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{CH}_2-$ を示すが、X及びYが同時に $-\text{CH}_2-$ になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

[0021] 式(1)において、置換基Rが示す炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、エイコシル基などが挙げられる。

[0022] 置換基Rが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、8-デセニル基、8-ウンデセニル基、8-ドデセニル基、8-トリデセニル基、8-テトラデセニル基、8-ペンタデセニル基、8-ヘキサデセニル基、8-ヘプタデセニル基、8-オクタデセニル基、8-イコセニル基、8-ドコセニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジエニル基、ヘプタデカ-8, 11, 14-トリエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13-テトラエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13, 16-ペンタエニル基、ヘニコサ

−3, 6, 9, 12, 15, 18−ヘキサエニル基などが挙げられる。

[0023] 置換基Rが示す炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、8−デシニル基、8−ウンデシニル基、8−ドデシニル基、8−トリデシニル基、8−テトラデシニル基、8−ペンタデシニル基、8−ヘキサデシニル基、8−ヘプタデシニル基、8−オクタデシニル基、8−イコシニル基、8−ドコシニル基、ヘプタデカ−8, 11−ジニル基などが挙げられる。

[0024] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N−メチルプロリジン環などが挙げられる。

[0025] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

[0026] 従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8, 9−メタノペンタデシル基などが挙げられる。

[0027] 置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、p−ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

[0028] Rは、好ましくは、炭素数9~17の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数9~17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数9~17の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基である。Rは、さらに好ましくは、炭素数9, 11, 13, 15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、又は炭素数9, 11, 13, 15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基である。Rは、特に好ましくは、炭素数9, 11, 13, 15又は17の

直鎖状若しくは分岐状アルケニル基である。

[0029] 一般式(1)で示される化合物中のX及びYはそれぞれ独立に、 $-O-$ 又は $-CH_2-$ を示すが、X及びYが同時に $-CH_2-$ になることはない。即ち、X及びYの組み合わせは以下の3通りである。

(1) Xが $-O-$ であり、Yが $-O-$ である。

(2) Xが $-CH_2-$ であり、Yが $-O-$ である。

(3) Xが $-O-$ であり、Yが $-CH_2-$ である。

[0030] 式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。

[0031] 式(I)の化合物はその置換基の種類に応じて、位置異性体、幾何異性体、互変異性体、又は光学異性体のような異性体が存在する場合があるが、全ての可能な異性体、並びに2種類以上の該異性体を任意の比率で含む混合物も本発明の範囲内のものである。

[0032] また、式(I)の化合物は、水あるいは各種溶媒との付加物(水和物又は溶媒和物)の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の範囲内のものである。さらに、式(I)の化合物及びその塩の任意の結晶形も本発明の範囲内のものである。

[0033] 一般式(1)で示される化合物のうちX及びYが $-O-$ である化合物は、例えば、特開平5-230088号公報、特開平7-149772号公報、特開平7-258278号公報、特開平9-25235号公報に記載の方法等に準じて化学的に合成することができる。

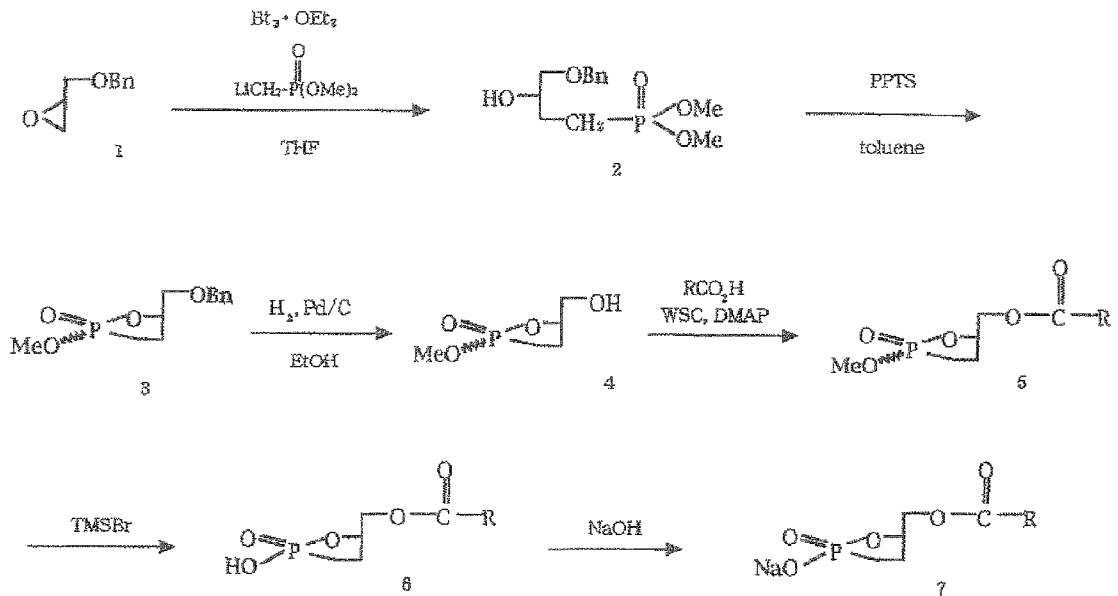
[0034] また、一般式(1)で示される化合物のうちX及びYが $-O-$ である化合物

は、特開2001-178489号公報に記載の方法に準じてリゾ型リン脂質にホスホリパーゼDを作用させることによって合成することもできる。ここで用いるリゾ型リン脂質は、ホスホリパーゼDを作用しうるリゾ型リン脂質であれば特に限定されない。リゾ型リン脂質は多くの種類が知られており、脂肪酸種が異なるもの、エーテル又はビニルエーテル結合をもった分子種などが知られており、これらは市販品として入手可能である。ホスホリパーゼDとしては、キャベツや落花生などの高等植物由来のものやStreptomyces chromofuscus, Actinomadula sp.などの微生物由来のものが市販試薬として入手可能であるが、Actinomadula sp. No. 362由来の酵素によって極めて選択的にcPAが合成される（特開平11-367032号明細書）。リゾ型リン脂質とホスホリパーゼDとの反応は、酵素が活性を発現できる条件であれば特に限定されないが、例えば、塩化カルシウムを含有する酢酸緩衝液（pH5～6程度）中で室温から加温下（好ましくは37℃程度）で1から5時間程度反応させることにより行う。生成したcPA誘導体は、常法に準じて、抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー（TLC）などにより精製することができる。

[0035] また、一般式(1)で示される化合物のうちXが $-CH_2-$ であり、Yが $-O-$ である化合物は、特開2004-010582号公報又は国際公開WO03/104246号公報に記載の方法により合成することができる。

[0036] また、一般式(1)で示される化合物のうちXが $-O-$ であり、Yが $-CH_2-$ である化合物は、文献記載の方法（Kobayashi, S., 他, *Tetrahedron Letters* 34, 4047-4050 (1993)；並びに「日本薬学会 第23回 反応と合成の進歩シンポジウム1997年11月17、18日（熊本市民会館）環状ホスファチジン酸およびカルバ体誘導体の合成と生理作用、要旨集ページ101-104」）に準じて合成することができ、また国際公開WO2002/094286号公報に記載の方法により合成することができる。具体的な合成経路の一例を以下に示す。

[0037] [化3]



[0038] 上記においては、先ず、市販の(R)-ベンジルグリシジルエーテル(1)を $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ で活性化させ、メチルホスホン酸ジメチルエステルに $n\text{-BuLi}$ を作用させて得られるリチオ体を反応させることでアルコール(2)を得る。

得られたアルコールを、トルエン中で過剰のp-トルエンスルホン酸のピリジニウム塩を用いて 80°C で反応させることにより、環化体(3)を得る。この環化体を、水素雰囲気下で20% $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ を用いて加水素分解し、脱ベンジル化を行う(4)。縮合剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いて、脂肪酸と反応させてカップリング体(5)を得る。次に、求核剤としてブロモトリメチルシランを用いて、メチル基だけを位置選択的に除去し、環状ホスホン酸(6)を得る。これをエーテルを用いて分液ロートに移しこみ、少量の0.02Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、分液操作を行い、ナトリウム塩(7)として目的化合物を抽出、精製する。

[0039] 本発明において有効成分として用いる環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸は、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制することができる。本発明の薬剤は、一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するための薬剤として使用することができる。

[0040] 本発明の薬剤は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有

効成分である環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸（好ましくは、式（１）で示される化合物）とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

[0041] 本発明の薬剤は、種々の形態で投与することができるが、好適な投与形態としては、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の薬剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。

[0042] 本発明の薬剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、溶解剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的な成分は当業者に周知されている。

[0043] 経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

[0044] 注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物とし

ては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、界面活性剤等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン, 等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

[0045] 本発明の薬剤はヒトなどの哺乳動物に投与することができる。

本発明の薬剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ から $1,000\ \text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\ \text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。上記投与量の薬剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

[0046] 以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例

[0047] 実施例 1：cP A がラット海馬における一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死に及ぼす効果

方法

実験は、20匹の成熟雄ウイスター系ラット（体重280～370g）で行った。

脳虚血及び組織学的解析の方法は、基本的にKagitani, F., Uchida, S., Hotta, H, and Sato, A (2000) Effects of nicotine on blood flow and delayed neuronal death following intermittent transient ischemia in rat hippocampus. Jpn. J. Physiol. 50, 585-595に従い、以下に述べるように一部改変した。動物をハロセン（麻酔の導入時3.5%；手術および虚血中1.5%）で麻酔した。抗生物質を投与（viccillin 50mg/kg 筋注）し、環状ホスファチジン酸投与用の浸透圧ポンプを腹部皮下へ埋め込んだ。続いて気管挿管し、呼吸を人工呼吸器（SN-480-7, Shinano, 東京）を用いて維持した。直

腸温および側頭筋温をモニターし、ヒートパッドとランプ（ATB-1100, 日本光電工業、東京）を用いて両者とも約37.5°Cに維持した。両側椎骨動脈を永久結紮し、両側総頸動脈を8分間一過性に閉塞した。一過性脳虚血終了直後にハロセンを切り、15分後に人工呼吸器をはずした。

[0048] ポンプ調製

5, 50 μ g/mL rac-2ccPA16:1/0.2%脂肪酸フリーのウシ血清アルブミン（BSA）—生理食塩水（0.9% NaCl）、500 μ g/mL rac-2ccPA(16:1)/2% BSA—生理食塩水、50, 500 μ g/mL, 5mg/mL R-cPA18:1/0.2% BSA—生理食塩水を調整し、それぞれMini osmotic pump model 2000 (alzet, CA)に200 μ lずつ注入した。対照群として、0.2% BSA—生理食塩水、2% BSA—生理食塩水を注入したポンプを調整した。ポンプを虚血手術前に腹腔内に埋め込み、5日間継続皮下投与を行った。

[0049] 実験群

C 1 群（比較例）：0.2% BSA—生理食塩水（4匹）

C 2 群（比較例）：2% BSA—生理食塩水（2匹）

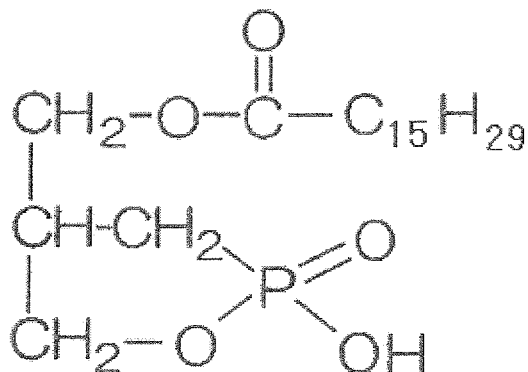
2ccPA群（本発明）：50 μ g/mL 2ccPA16:1（18 μ g/kg/5d）、（44 nmol/kg/5d）（4匹）

cPA群（本発明）：500 μ g/mL cPA16:1（180 μ g/kg/5d）、（400 nmol/kg/5d）（4匹）

参考：2ccPA16:1（分子量：410.22）、cPA18:1（分子量：440.23）

[0050] 2ccPA16:1の構造は以下の通りである。

[化4]



果がみられた（図1）。

[0054] 実施例2：cPAがラット海馬における一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死に及ぼす効果

実施例1と同様の化合物（2ccPA16:1、及びcPA18:1）を用いて、実施例1と同様の実験系で、cPAがラット海馬における一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死に及ぼす効果を調べた。

[0055] 海馬CA1領域の錐体細胞を組織学的に観察した結果を図2に示す。

図2のA（Vehicle投与群）のa、及びB（cPA投与群）のaは、海馬（Bregma -3.3mm）のCA1（矢頭が挟んでいる範囲）の領域を示す。

[0056] 図2のA（Vehicle投与群）のb、及びB（cPA投与群）のbは、CA1領域における細胞の状態を示す。小さく濃く染まっているのが核の凝集を起こした細胞、つまり遅発性細胞死を起こした神経細胞であり、大きな丸になっている細胞が生細胞であり、核は細胞の中心に小さく存在することがわかる。A（Vehicle投与群）のbでは、死細胞の数が多く、生存している神経細胞がほぼ見当たらないのに対し、B（cPA投与群）のbでは生きていた細胞が主となっており、死んでいる細胞は僅かである。cPA処理により、CA1領域の神経細胞の生存率が大幅に上昇していることがわかる。

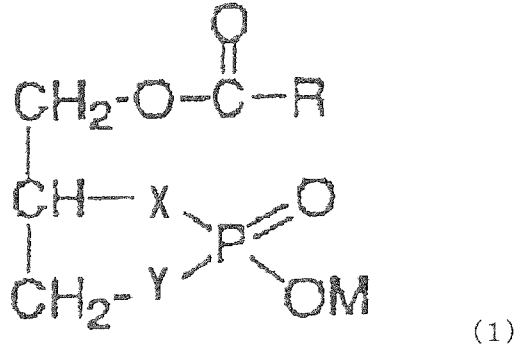
[0057] 図2のA（Vehicle投与群）のc、及びB（cPA投与群）のcは、GFAP（glial-fibrillary acidic protein）の染色像を示す。GFAPはアストログリアに局在する中間径フィラメントを構成するタンパク質であり、GFAPの発現は、脳損傷、認知症などの神経疾患で増加、症例の重症度に関与すると考えられている。A（Vehicle投与群）のcでは、死細胞の周りにところどころ濃く茶色（anti-GFAP, DAB染色）に染色されている細胞がみられるが、B（cPA投与群）のcでは細胞の周りに濃く染色されている部位はAのcほど見当たらなかった。即ち、cPA投与により、GFAPの産生が抑制されたと考えられる。

[0058] ラットの海馬CA1に存在する生細胞数の数を調べた結果を図3に示す。Control（虚血処理なし）のラットは、420個ほどの神経細胞を持つことが示

された。一方、Vehicle（虚血処理後）のラットでは生神経細胞の数は平均48個と1割ほどに減少する。しかしながら、cPA、2ccPAで処理したラットの脳では生細胞の数が顕著に増えることが示された。特に、cPAは濃度依存的に、脳虚血後の遅発性神経細胞死を抑制することが分かり、 $18 \mu\text{g}/\text{kg}/5$ 日の投与で、平均253個の細胞が生き残り、6割の細胞が生存したまま残ることが分かった。虚血処理から比べても、5倍ほど生存率が上がったといえる。

[請求項7] 環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸が、式（1）で示される化合物である、請求項1に記載の方法。

[化2]



（式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、-O-又は-CH₂-を示すが、X及びYが同時に-CH₂-になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。）

[請求項8] 一般式（1）において、X及びYが-O-である、請求項6又は7に記載の方法。

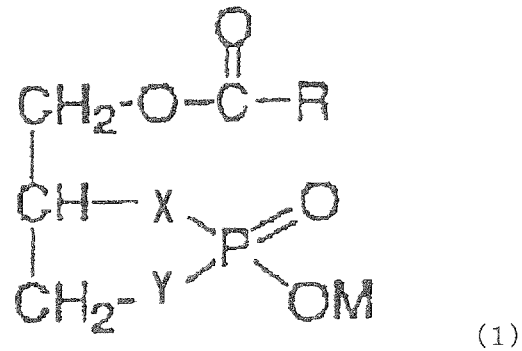
[請求項9] 一般式（1）において、X又はYが-CH₂-である、請求項6又は7に記載の方法。

[請求項10] 一般式（1）において、RがC₁₅H₂₉又はC₁₇H₃₃である、請求項6から9の何れか1項に記載の方法。

[請求項11] 一過性脳虚血による遅発性の神経細胞死を抑制するための薬剤の製造のための、環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸あるいはその塩の使用。

[請求項12] 環状ホスファチジン酸又はカルバ環状ホスファチジン酸が、式（1）で示される化合物である、請求項11に記載の使用。

[化3]



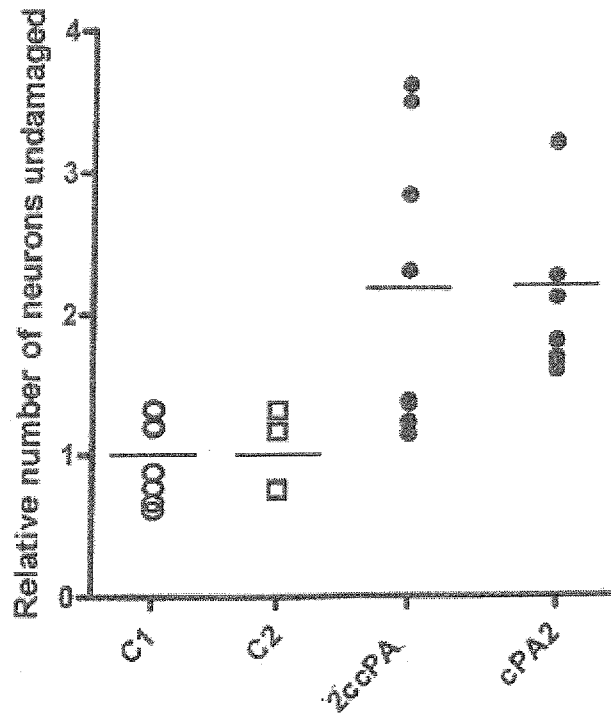
(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、-O-又は-CH₂-を示すが、X及びYが同時に-CH₂-になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

[請求項13] 一般式(1)において、X及びYが-O-である、請求項11又は12に記載の使用。

[請求項14] 一般式(1)において、X又はYが-CH₂-である、請求項11又は12に記載の使用。

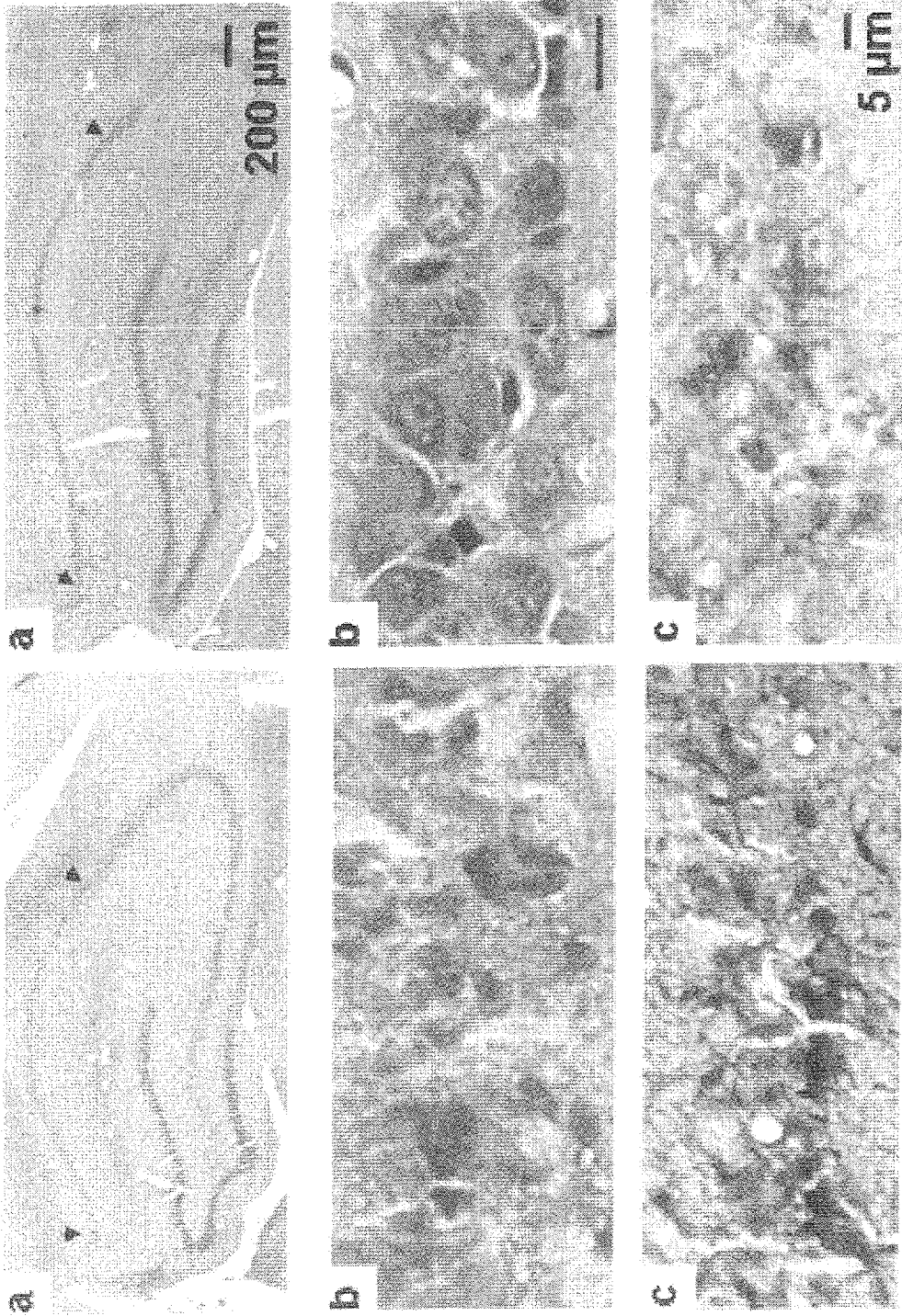
[請求項15] 一般式(1)において、RがC₁₅H₂₉又はC₁₇H₃₃である、請求項11から14の何れか1項に記載の使用。

[Fig. 1]

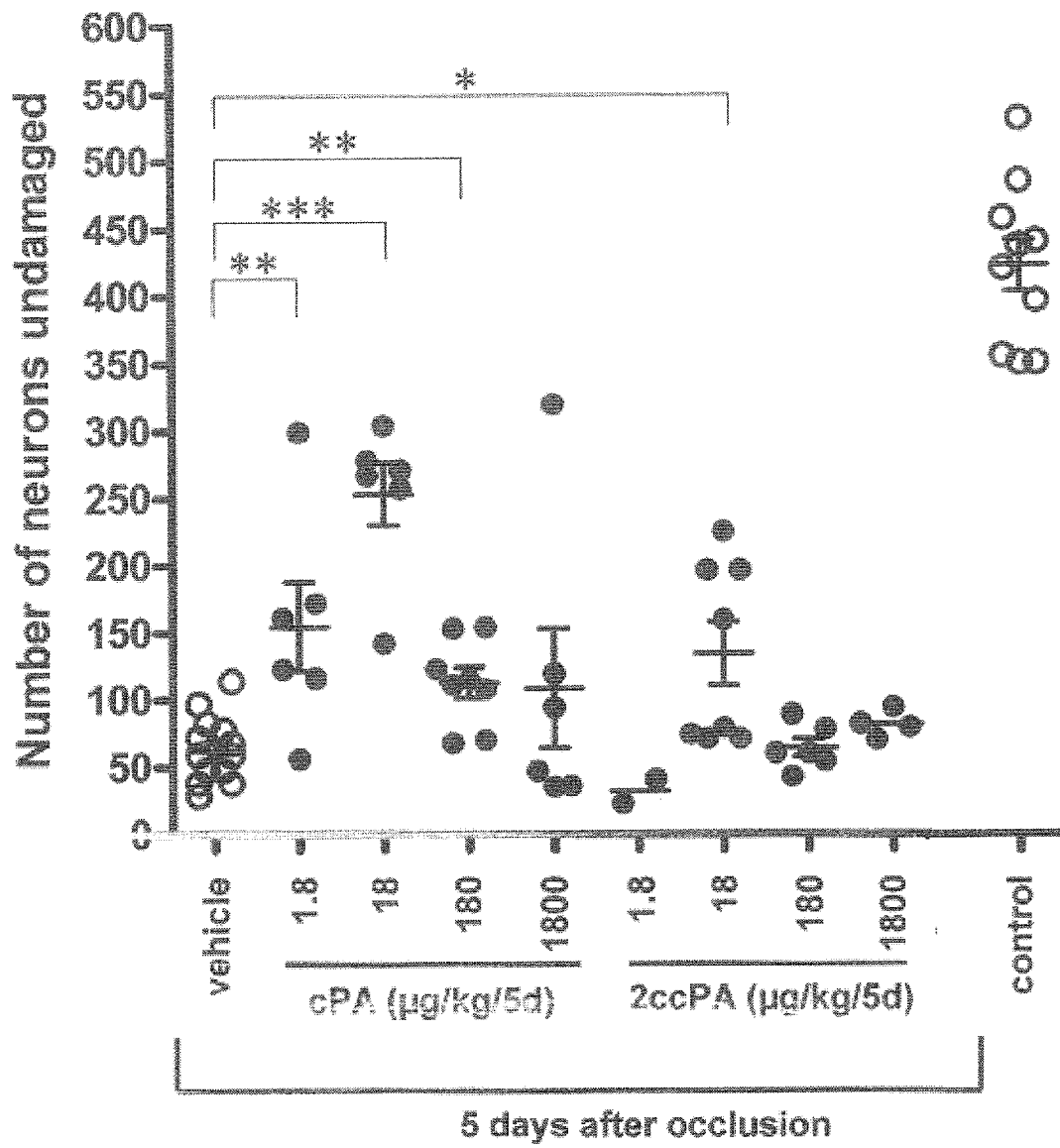


[図2]

A vehicle B cPA



[圖3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071127

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/661(2006.01) i, A61K31/662(2006.01) i, A61P25/00(2006.01) i, A61P25/28(2006.01) i, A61P43/00(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) A61K31/661, A61K31/662, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) | | | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>FUJIWARA, Yuko et al, Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons, Journal of Neurochemistry, 2003, Vol.87, No.5, p.1272-1283</td> <td>1-5,11-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2002-308779 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), entire text & US 2004/0176329 A1 & EP 1386612 A1 & WO 2002/083149 A1</td> <td>1-5,11-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2002-308778 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), entire text & US 2004/0220149 A1 & EP 1391204 A1 & WO 2002/083148 A1</td> <td>1-5,11-15</td> </tr> </tbody> </table> | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | Y | FUJIWARA, Yuko et al, Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons, Journal of Neurochemistry, 2003, Vol.87, No.5, p.1272-1283 | 1-5,11-15 | Y | JP 2002-308779 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), entire text & US 2004/0176329 A1 & EP 1386612 A1 & WO 2002/083149 A1 | 1-5,11-15 | Y | JP 2002-308778 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), entire text & US 2004/0220149 A1 & EP 1391204 A1 & WO 2002/083148 A1 | 1-5,11-15 | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | |
| Y | FUJIWARA, Yuko et al, Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons, Journal of Neurochemistry, 2003, Vol.87, No.5, p.1272-1283 | 1-5,11-15 | | | | | | | | | | | |
| Y | JP 2002-308779 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), entire text & US 2004/0176329 A1 & EP 1386612 A1 & WO 2002/083149 A1 | 1-5,11-15 | | | | | | | | | | | |
| Y | JP 2002-308778 A (Gen Com Co.), 23 October 2002 (23.10.2002), entire text & US 2004/0220149 A1 & EP 1391204 A1 & WO 2002/083148 A1 | 1-5,11-15 | | | | | | | | | | | |
| <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 10 December, 2010 (10.12.10) | Date of mailing of the international search report 21 December, 2010 (21.12.10) | | | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No. | Authorized officer Telephone No. | | | | | | | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071127

| 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 2002-540146 A (Yeda Research & Development Co., Ltd.), 26 November 2002 (26.11.2002), entire text & US 6914056 B1 & WO 2000/057865 A2 | 1-5,11-15 |
| Y | WO 2000/009139 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 24 February 2000 (24.02.2000), entire text & US 6150345 A | 1-5,11-15 |
| Y | SHIGENO, Taku et al, Amelioration of Delayed Neuronal Death in the Hippocampus by Nerve Growth Factor, The Journal of Neuroscience, 1991, Vol.11, No.9, p.2914-2919 | 1-5,11-15 |
| Y | ABE, Koji, Therapeutic Potential of Neurotrophic Factors and Neural Stem Cells Against Ischemic Brain Injury, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2000, Vol. 20, p.1393-1408 | 1-5,11-15 |
| Y | HOTTA, Harumi et al, Cyclic phosphatidic acid stimulates respiration without producing vasopressor or tachycardiac effects in rats, European Journal of Pharmacology, 2006, Vol. 543, No.1-3, p.27-31 | 1-5,11-15 |
| P,X | GOTOH, Mari et al, Effects of cyclic phosphatidic acid on delayed neuronal death following transient ischemia in rat hippocampal CA1, European Journal of Pharmacology, 2010, Vol.649, No.1-3, p.206-209 | 1-5,11-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071127

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 6-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 6 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Rule 39.1(iv).
2. 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:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. 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.:
4. 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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071127

Although such a description as "method set forth in claim 1" is appeared in claim 7, the invention in claim 1 is not relevant to an invention concerning method, and therefore, said description concerning citation is inadequate. Therefore, the above-said description appeared in claim 7 is regarded to be a typographical error for "method set forth in claim 6 in Japanese text.

| | | |
|--|---|----------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K31/661(2006.01)i, A61K31/662(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P43/00(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. A61K31/661, A61K31/662, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2010年 日本国実用新案登録公報 1996-2010年 日本国登録実用新案公報 1994-2010年 | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/REGISTRY/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 |
| Y | FUJIWARA, Yuko et al, Cyclic phosphatidic acid elicits neurotrophin-like actions in embryonic hippocampal neurons, Journal of Neurochemistry, 2003, Vol.87, No.5, p.1272-1283 | 1-5, 11-15 |
| Y | JP 2002-308779 A (株式会社ジェンコム) 2002.10.23, 全文 & US 2004/0176329 A1 & EP 1386612 A1 & WO 2002/083149 A1 | 1-5, 11-15 |
| Y | JP 2002-308778 A (株式会社ジェンコム) 2002.10.23, 全文 & US 2004/0220149 A1 & EP 1391204 A1 & WO 2002/083148 A1 | 1-5, 11-15 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <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 10.12.2010 | 国際調査報告の発送日 21.12.2010 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 松浦 安紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 | 4C 3336 |

| 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 2002-540146 A (イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド) 2002. 11. 26, 全文 & US 6914056 B1 & WO 2000/057865 A2 | 1-5, 11-15 |
| Y | WO 2000/009139 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2000. 02. 24, 全文 & US 6150345 A | 1-5, 11-15 |
| Y | SHIGENO, Taku et al, Amelioration of Delayed Neuronal Death in the Hippocampus by Nerve Growth Factor, The Journal of Neuroscience, 1991, Vol.11, No.9, p.2914-2919 | 1-5, 11-15 |
| Y | ABE, Koji, Therapeutic Potential of Neurotrophic Factors and Neural Stem Cells Against Ischemic Brain Injury, Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2000, Vol.20, p.1393-1408 | 1-5, 11-15 |
| Y | HOTTA, Harumi et al, Cyclic phosphatidic acid stimulates respiration without producing vasopressor or tachycardiac effects in rats, European Journal of Pharmacology, 2006, Vol.543, No.1-3, p.27-31 | 1-5, 11-15 |
| P, X | GOTOH, Mari et al, Effects of cyclic phosphatidic acid on delayed neuronal death following transient ischemia in rat hippocampal CA1, European Journal of Pharmacology, 2010, Vol.649, No.1-3, p.206-209 | 1-5, 11-15 |

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 6-10 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6-10は治療による人体の処置方法に関するものであって、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きの国際調査機関は認めた。

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。

請求項7に「請求項1に記載の方法」と記載されているが、請求項1に係る発明は方法の発明ではないから、かかる引用は不合理である。したがって、請求項7の当該記載は「請求項6に記載の方法」の誤記とみなした。