(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
2008 年1 月31 日 (31.01.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/013270 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/064786

(22) 国際出願日: 2007 年7 月27 日 (27.07.2007)

(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2006-207231 2006 年7 月28 日 (28.07.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418526 大阪府大阪市中央区道修町二丁目１番５号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松岡 昌三 (MATSUOKA, Shozo) [JP/JP]; 〒5418564 大阪府大阪市中央区久太郎町一丁目８番２号 小野薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 船越 洋祐 (FUNAKOSHI, Yosuke) [JP/JP]; 〒5418564 大阪府大阪市中央区久太郎町一丁目８番２号 小野薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 今川 昌之 (IMAGAWA, Masayuki) [JP/JP]; 〒5418564 大阪府大阪市中央区久太郎町一丁目８番２号 小野薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 畠山 克敏 (HATAKEYAMA, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒5418564 大阪府大阪市中央区久太郎町一丁目８番２号 小野薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 渡部 潤 (WATANABE, Jun) [JP/JP]; 〒5418564 大阪府大阪市中央区久太郎町一丁目８番２号 小野薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島２丁目１番３１号ＯＲＩＸ堂島ビル３階 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, 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 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** METHOD FOR DIAGNOSIS OF NEUROPSYCHIATRIC DISEASE

(54) 発明の名称: 精神神経疾患の診断方法

(57) **Abstract:** A method for measurement of a blood CRF level for use in the diagnosis of a neuropsychiatric disease, comprising the steps of: analyzing a blood collected from a mammal and calculating a CRF level in the blood; and comparing the calculated blood CRF level with the standard value for a blood CRF level.

(57) 要約: 哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のＣＲＦ濃度を算出する工程と、得られた血液中ＣＲＦ濃度を血液中ＣＲＦ濃度の基準値と比較する工程とを含む、精神神経疾患の診断のための血液中ＣＲＦ濃度の測定方法。

WO 2008/013270 A1

明 細 書

精神神経疾患の診断方法

技術分野

[0001] 本発明は、血液中CRF(corticotropin-releasing factor;コルチコトロピン放出因子)濃度の測定方法、これを利用した精神神経疾患の診断方法、血液中CRF濃度の調節方法、精神神経疾患の治療スケジュールの決定方法、精神神経疾患の治療及び/又は症状進展抑制方法、精神神経疾患の再発予防方法、及び精神神経疾患の治療又は症状進展抑制剤のスクリーニング方法等に関する。

背景技術

[0002] CRFは、1981年にヒツジ視床下部から単離された41個のアミノ酸ペプチドである。このCRFは視床下部から放出され、脳下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン(adreno corticotropic hormone : ACTH)の分泌調節を担っていることが示唆された(サイエンス(Science)、1982年、第218巻、377-379頁(非特許文献1)参照)。CRFの生物学的効果は、まず放出されたCRFが下垂体前葉のACTH産生細胞等の膜表面に存在するCRFレセプターへ結合することから始まる。CRFレセプターには2つのサブタイプのレセプターが存在し、それぞれ脳内の異なった領域に分布していることが明らかになっている。例えば、レセプター1は下垂体、視床下部および大脳皮質等に存在し、レセプター2は主に脳の中隔および視床下部室傍核等に存在する。また、CRFレセプターは、末梢臓器、例えば、心臓、胃腸、肺、副腎髄質、脾臓、肝臓、腎臓および前立腺等にも存在する。具体的には、腸および脾臓にはレセプター1、胃にはレセプター2が多く存在し、心臓および骨格筋にはレセプター2のうちでも2βが多く存在する。CRFの刺激によって分泌されたACTHは、副腎皮質からのコルチゾールの分泌を促し、生殖、成長、胃腸機能、炎症、免疫系および神経系等に対する全身的な作用に関連する。よって、CRFは、脳下垂体前葉においてACTH合成および分泌を促進する、視床下部－下垂体－副腎系の主要な因子の1つであると考えられている。

[0003] 一方、CRFはうつ病や不安障害の患者において脳で過剰分泌されているとの報告

がある(サイエンス(Science)、1984年、第226巻、1342-1343頁(非特許文献2);ニューロサイエンス・アンド・ビヘイビャール・レビューズ(Neuroscience and Behavioral Reviews)、1998年、第22巻、635-651頁(非特許文献3);ザ・ジャーナル・オブ・エンドクリノロジー(J.Endocrinol.)、1999年、第160巻、1-12頁(非特許文献4)参照)。また、CRFは中枢神経および下垂体を介し、ストレスにも深く関わっている。例えば、CRFを脳内に投与するとストレス環境にさらされた動物と同様の行動、内分泌応答等が見られることが報告されている(ネイチャー(Nature)、1982年、第297巻、331頁(非特許文献5)参照)。これらのことより、CRFの中枢神経系や精神神経系疾患、あるいは末梢臓器の疾患への関与が注目されている。

[0004] 現在、大うつ病の診断には、米国精神医学会のDSM-IV-TR(精神疾患の診断・統計マニュアル)や世界保健機構(WHO)のICD-10(国際疾病分類第10改訂版)等の診断基準が用いられている。また、精神神経疾患患者はその症状の程度によって、軽症、中等症、または重症患者に分類でき、症状の程度の評価は、例えば、うつ病においては、HAM-D(Hamilton Rating Scale For Depression)、MADRS(Montgomery and Asberg Depression Rating Scale)等のうつ病診断基準により評価することができる。しかし、これらは問診を中心とした診断であるため、誤診も少なくないのが実状である。

[0005] 一方、客観的に精神神経疾患患者を診断する方法の一つとして、脳脊髄液(cerebrospinal fluid:以下、CSFという。)中のCRF濃度を測定し、その値によって診断する方法が知られている。既に、精神神経疾患、特に大うつ病患者のCSF中のCRF濃度が、健常人のそれと比較して高値を示すことが報告されている(アメリカン・ジャーナル・オブ・サイキアトリー(American Journal of Psychiatry)、1987年、第144巻、873-877頁(非特許文献6)、バイオロジカル・サイキアトリー(Biological Psychiatry)、1989年、第24巻、355-359頁(非特許文献7)参照)。しかし、CSFの採取は、身体的負担や侵襲が大きく、また危険性も高いため、CSFを医療の現場で診断や薬効評価に用いることは大変難しく、実用的な手段となりえなかった。

非特許文献1:サイエンス(Science)、1982年、第218巻、p.377-379

非特許文献2:サイエンス(Science)、1984年、第226巻、p.1342-1343

非特許文献3:ニューロサイエンス・アンド・ビヘイビャール・レビューズ(Neuroscience and Behavioral Reviews)、1998年、第22巻、p.635-651

非特許文献4:ザ・ジャーナル・オブ・エンドクリノロジー(J.Endocrinol.)、1999年、第160巻、p.1-12

非特許文献5:ネイチャー(Nature)、1982年、第297巻、p.331

非特許文献6:アメリカン・ジャーナル・オブ・サイキアトリー(American Journal of Psychiatry)、1987年、第144巻、p.873-877

非特許文献7:バイオロジカル・サイキアトリー(Biological Psychiatry)、1989年、第24巻、p.355-359

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、被検者への侵襲が少ない精神神経疾患の診断方法、及び精神神経疾患の治療及び/又は症状進展抑制剤のスクリーニング方法を提供することを主な課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決するために本発明者らは研究を重ね、血液中CRF濃度と精神神経疾患の症状との間に相関関係があることを見出した。具体的には、健常人のCSF中のCRF濃度と血液中CRF濃度とを比較し、また精神神経疾患患者のCSF中のCRF濃度と血液中CRF濃度とを比較し、CSF中のCRF濃度と血液中CRF濃度との間に正の相関関係があることを見出した。本発明者らはこの知見をもとにさらに鋭意研究を重ね、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、

項1. 哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を血液中CRF濃度の基準値と比較する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の診断のための血液中CRF濃度の測定方法。

項2. 血液中CRF濃度の基準値が12～15pg/mLである項1に記載の方法。

項3. 哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を血液中CRF濃度の基準値と比較する工程と、血液中

CRF濃度が基準値より高い場合に精神神経疾患であると判断する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の診断方法。

項4. 血液中CRF濃度の基準値が12～15pg／mLである項3に記載の方法。

項5. 哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を血液中CRF濃度の基準値と比較する工程と、血液中CRF濃度が基準値より高い哺乳動物に薬剤を投与する工程とを含むことを特徴とする、血液中CRF濃度の調節方法。

項6. 血液中CRF濃度の基準値が12～15pg／mLである項5に記載の方法。

項7. 薬剤がCRF拮抗薬である項5に記載の方法。

項8. 精神神経疾患の哺乳動物又は精神神経疾患が疑われる哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中CRF濃度を算出する工程と、薬剤の投与量および投与期間を定める工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の治療スケジュールの決定方法。

項9. 精神神経疾患の哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を前回血液採取時の血液中CRF濃度と比較する工程と、血液中CRF濃度が前回血液採取時の血液中CRF濃度と同等、又はより高値である哺乳動物に血液中CRF濃度を低下せしめる量の薬剤を投与する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の治療および／または症状進展抑制方法。

項10. 寛解期にある精神神経疾患の哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を前回血液採取時の血液中CRF濃度と比較する工程と、血液中CRF濃度が前回血液採取時の血液中CRF濃度より高値である哺乳動物にそれを低下せしめる量の薬剤を投与する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の再発予防方法。

項11. 精神神経疾患がうつ病である項10に記載の方法。

項12. 薬剤がCRF拮抗薬である項10に記載の方法。

項13. 哺乳動物に被検物質を投与する工程と、被検物質を投与された哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中

CRF濃度を被検物質投与前の血液中CRF濃度と比較する工程と、被検物質投与により血液中CRF濃度を低下させる物質を選択する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又は再発予防剤のスクリーニング方法。

項14. 精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又は再発予防剤が、CRF拮抗による精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又はCRF拮抗による再発予防剤である項13に記載の方法。

項15. 被検物質投与による血液中CRF濃度低下が、被検物質投与前の血液中CRF濃度の5%以上である被検物質を選択する、項13に記載の方法。

に関する。また、本発明は、

項16. 哺乳動物から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、基準値と比較することを特徴とする、精神神経疾患の診断のための血液中CRFの測定方法。

項17. 基準値が12～15pg／mLである項16に記載の方法。

項18. 哺乳動物から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、得られるCRF濃度を精神神経疾患の診断のための指標とすることを特徴とする、精神神経疾患の診断方法。

項19. 精神神経疾患の診断のための指標となる血液中CRF濃度の基準値が12～15pg／mLである項18に記載の診断方法。

項20. 哺乳動物から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、血液中CRF濃度が基準値より高値である哺乳動物に薬剤を投与することを特徴とする、血液中CRF濃度の調節方法。

項21. 血液中CRF濃度の基準値が12～15pg／mLである項20に記載の方法。

項22. 薬剤がCRF拮抗薬である項21に記載の方法。

項23. 薬剤を投与して精神神経疾患の患者を治療する方法であって、患者から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、薬剤の投与量を決定することを特徴とする、精神神経疾患の治療方法。

項24. 薬剤を投与して精神神経疾患の患者を治療するに際して、患者から採取

した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、薬剤の投与量および投与期間を定めることを特徴とする、精神神経疾患の治療スケジュールの決定方法。

項25. 哺乳動物にCRF拮抗薬の候補化合物を投与して、投与動物から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、前記候補化合物投与前の血液中CRF濃度と比較することを特徴とする、CRF拮抗薬のスクリーニング方法。

項26. 候補化合物投与後の血液中CRF濃度が、候補化合物投与前の血液中CRF濃度の5%以上の低下を示す候補化合物をCRF拮抗薬として選択する、項25に記載の方法。

項27. 精神神経疾患の患者から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、血液中CRF濃度が前回血液採取時の血液中CRF濃度と同等か、あるいはより高値である精神神経疾患の患者にそれを低下せしめる量の薬剤を投与することを特徴とする、精神神経疾患の治療および／または症状進展抑制方法。

項28. 寛解期にある精神神経疾患の患者から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出し、血液中CRF濃度が前回血液採取時の血液中CRF濃度より高値である精神神経疾患の患者にそれを低下せしめる量の薬剤を投与することを特徴とする、精神神経疾患の再発予防方法。

項29. 精神神経疾患がうつ病である項28記載の方法。

項30. 薬剤がCRF拮抗薬である項28記載の方法。

項31. 薬剤を投与して精神神経疾患の患者を治療するに際して、患者から採取した血液を分析手段に付し、そのCRF濃度を算出することを含む、薬剤の投与量決定方法に関する。

[0009] (I)精神神経疾患の診断方法など

以下、本発明の精神神経疾患の診断のための血液中CRF濃度の測定方法、及び精神神経疾患の診断方法を説明する。

[0010] 対象

本発明方法の対象となる哺乳動物としては、例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等が挙げられるが、これらに限定されない。特に、ヒトが好適な対象である。通常は、精神神経疾患に罹患している哺乳動物、又は精神

神経疾患に罹患していることが疑われる哺乳動物が対象となる。

[0011] 血液

本発明において、血液としては、全血、血清または血漿のいずれを用いてもよく、血清または血漿が好ましい。全血は注射器等によって哺乳動物から採取することができる。血漿または血清は、採取した全血から公知の手段で分離することができる。なお、血液は動脈血由来のものであっても静脈血由来のものであってもよい。

[0012] 血液の分析及びCRF濃度の算出

＜分析・濃度の算出＞

本発明方法で用いられる血液の分析手段としては、血液中CRFの量を分析できるものであれば特に限定されない。具体的な分析手段としては、例えば、抗原抗体反応を利用して血液中CRFを検出する方法等が挙げられる。このような分析手段を用いることで血液中CRFの量を測定し、別途作成した検量線から血液中CRF濃度を算出することができる。この場合、抗体としては、全血、血清、又は血漿等に存在するCRFを特異的に認識する抗体が好ましい。抗CRF抗体としては、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。具体的には、分析対象となる哺乳動物（例えば、ヒト、ラットまたはマウス等）由来のCRFを公知の方法で、異なる種の哺乳動物（例えば、ウサギ、ヤギ、ラット等）に免疫して得られる抗体等が挙げられる。血液中のCRFを検出し、血液中CRF濃度を測定する手段としては、具体的には、ラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定（ELISA）法、またはウェスタンブロット法等が好ましく挙げられる。

[0013] RIA法を用い血液中CRF濃度を測定する場合には、公知のRIA法を用いることができる。具体的には、放射性標識物質で標識した抗CRF抗体と血液とを反応させて複合体を形成させ、形成した標識物（bound；B）と未反応物（free；F）を分離（B・F分離）し、放射活性を測定してB／Fの比率を求め、別途作成した検量線からCRF濃度を算出することにより、血液中CRF濃度を得ることができる。

[0014] また、RIA法としては、二抗体法も好ましく挙げられる。二抗体法で血液中CRF濃度を測定する場合には、例えば、まず血液と希釈したCRF抗血清（最終希釈倍率約500～5000倍希釈）を反応させた後、放射性標識物質で標識したCRFを加えて反応

させる。次いで、第二抗体を加え反応させた後、例えば、ポリエチレングリコール等を加え、血液中のγ－グロブリンを沈殿させた後、遠心分離して上清を取り除き、沈殿の放射活性を測定し、別途作成した検量線からCRF濃度を算出することにより、血液中CRF濃度を得ることができる。第二抗体としては、例えば、正常ウサギ血清等が挙げられる。放射性標識物質としては、例えば、^{125}I、^{32}P、^{35}S、^{3}H、^{14}C等が挙げられ、特に^{125}Iが好ましい。放射線量は、例えば、オートラジオグラフィー、γカウンターまたは液体シンチレーションカウンター等で測定することができる。

[0015] ELISA法を用い血液中CRF濃度を測定する場合には、公知のELISA法を用いることができる。具体的には、例えば、ポリスチレン等の固相に抗CRF抗体を結合させ、そこに血液を添加し、前記抗CRF抗体と結合した血液中のCRFを酵素標識抗体と反応させて可視化することによって血液中CRF濃度を測定することができる。

[0016] また、ウェスタンブロット法を用いて血液中CRF濃度を測定する場合にも、公知のウェスタンブロット法を用いることができる。具体的には、血液にドデシル硫酸ナトリウム（SDS）等の変性剤を加えた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、電気泳動終了後、蛋白をニトロセルロース膜等に転写し、転写された蛋白中のCRFを抗CRF抗体を用いて可視化することによって、あるいは引き続きデンシトメトリー等で定量を行うことによって、血液中CRF濃度を測定することができる。

[0017] また、血液中CRF濃度の測定には、血液中CRF分析キットを使用することもできる。該分析キットの態様は、血液中のCRF分析を簡便に実施するための分析キットであれば特に限定されない。具体的には、血液中に含まれるCRFを特異的に認識する抗CRF抗体を含有し、抗原抗体反応を利用して血液中CRF濃度を測定できる分析キットが好ましい。上記分析キットとしては、血液中CRF濃度を測定することを可能にする抗体や器材等を少なくとも1種含んでいればよい。特に、RIA法を利用する場合には、放射性標識した抗CRF抗体が検定キット中に含まれることが好ましく、あるいは二抗体法を利用する場合は放射性標識したCRFおよび抗CRF抗体等が検定キット中に含まれることが好ましい。ELISA法を利用する場合には、抗CRF抗体を固定化した担体等が検定キット中に含まれることが好ましい。ウェスタンブロット法を利用する場合には、抗CRF抗体のほか、SDS等の変性剤、ポリアクリルアミドゲル等の

電気泳動に必要な器材およびニトロセルロース膜等の転写膜等が検定キット中に含まれることが好ましい。

[0018] ＜血液の前処理＞

血液中CRF濃度の測定の前に、例えば、固相抽出(solid-phase extraction : SPE)等を用いた前処理により血液中の夾雑物を低減させることが好ましい。該前処理により、分析・測定の迅速化および簡素化を行うことができ、結果として本発明で開示する方法を簡便に実施することができる。固相抽出は、例えば、CRFに合致した固相にCRFを保持(吸着)させ、次いで溶出溶媒により固相に保持(吸着)されたCRFを溶出させる公知の方法により実施できる。固相抽出法における固相としては、例えば、オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)、弱塩基性陰イオン交換体、シリカゲル、スチレンジビニルベンゼン共重合体(SDB)、プロピルスルホニルシリル化シリカゲル、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲル、アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲル、アミノプロピルシリル化シリカゲル、アルミナ、エチルシリル化シリカゲル、エチレンジアミン－Ｎ－プロピルシリル化シリカゲル、カルボキシメチルシリル化シリカゲル、強塩基性陰イオン交換体またはグリセリルプロピルシリル化シリカゲル等が挙げられるがこれらに限定されない。また、これら固相は1種または2種以上を組み合わせて使用することもできる。好ましい固相の組み合わせとしては、例えば、ODS、弱塩基性陰イオン交換体、シリカゲル、SDBの組み合わせ等が挙げられる。固相抽出法は、上記固相が充填された市販のカートリッジまたはミニカラムあるいは固相抽出ディスクプレート等を用いることができる。そのようなカートリッジまたはミニカラム等としては、例えば、Bond Elut C18(Varian製;ODS系固相)、Bond Elut LRC-C18(Varian製;ODS系固相)、Sep-Pak C18(Waters社製;ODS系カラム)、Sep-Pak Vac C18(Waters社製;ODS系固相)、Sep-Pak Plus C18(Waters社製;ODS系固相)、Bond Elut DEA(Varian製;弱塩基性陰イオン交換体固相)、abselut NEXUS(Varian製;SDB系固相)またはSep-Pak Plus PS-2(Waters社製;SDB系固相)等が挙げられるが、これらに限定されない。前記カートリッジまたはミニカラム等は1種または2種以上を組み合わせて用いることができる。固相抽出ディスクプレートとしては、例えば、C-18-SD(3M社製)、C-8-SD(3M社製)またはMPC-SD(3M社製)等

が挙げられる。また、固相抽出法には、固相マイクロ抽出法(solid-phase micro extraction：SPME)が含まれる。SPMEとしては、上記固相を結合させた細いニードル等が挙げられる。固相抽出法における、固相に保持(吸着)されたCRFを溶出する溶媒としては、例えば、ODS系固相やSDB系固相では酢酸エチル、クロロホルム、メタノールまたはアセトニトリル等が挙げられ、例えば、弱塩基性陰イオン交換体固相では、水－アセトニトリル混液[例えば、酢酸水溶液(約0．1～90％(v／v))／アセトニトリル(約2:8～5:5(v／v))]等が挙げられる。

[0019] また、固相は、血液注入前にCRFを保持(吸着)し得るようコンディショニングすることが好ましい。コンディショニングの手順は、固相によって異なるが、例えば、ODS系固相やSDB系固相ではまず溶出溶媒(例えば、酢酸エチル、クロロホルム、アセトニトリル、アセトニトリル／酢酸水溶液混液[アセトニトリル／酢酸水溶液(約0．1～90％(v／v))(約5:5～8:2(v／v))]等)、次いで極性の高い溶媒(例えば、メタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル、アセトニトリル／酢酸水溶液混液[アセトニトリル／酢酸水溶液(約0．1～90％(v／v))(約5:5～8:2(v／v))]、次いで水性溶媒[例えば、水、水／酢酸混液(約100:1～80:1(v／v))、塩酸(0．1～0．5N)等]の一定量を、固相が充填されたカートリッジまたはミニカラムに通すか、固相抽出ディスクプレートに注入し、吸引することにより実施できる。

[0020] 固相に注入される血液は、緩衝液等で希釈されることが好ましい。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液またはトリス塩酸緩衝液等が挙げられる。緩衝液には、例えば、尿素、塩酸グアニジン等の蛋白質変性剤や、Tween－20、トリトンX－100(登録商標)等の界面活性剤が含まれていてもよい。また、塩酸グアニジン等の溶液で希釈してもよい。

[0021] CRFを保持した固相は、CRF溶出前に、例えば、水、水／酢酸混液(約100:1～80:1(v／v))、塩酸(0．1～0．2N)等の水性溶媒の一定量で洗浄されることが好ましい。該洗浄により、固相に負荷された試料に含まれるCRF以外の夾雑物を除去することができる。

[0022] 精神神経疾患の診断

このようにして得られた血液中のCRF濃度が基準値より高い場合に、その被験者は

精神神経疾患を患っていると判断することができる。本発明において、基準値とは、疾病を患っていない哺乳動物の血液中CRF濃度を意味する。例えば、哺乳動物としてヒトを用いるのであれば、疾病を患っていないヒト、いわゆる健常人の血液中CRF濃度を基準値という。この場合、基準値は、複数の健常人の血液中CRF濃度を集積して母集団とし、これを統計解析することで平均値として求められる。基準値は、例えば、哺乳動物の種類、測定方法、時間的要因または当該動物の生活環境等により変動するが、例えば、ヒトの基準値は、約12～15pg／mLの範囲に含まれる。

[0023] 本発明の診断方法などでは、哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中CRF濃度を算出した後、これを基準値と比較することによって、上記血液を提供した哺乳動物が、精神神経疾患を患っている可能性が高いか否かを判断することができる。この際、血液を提供した哺乳動物の血液中CRF濃度が基準値より高いほど精神神経疾患に罹患している可能性が高いと判断することができる。哺乳動物、例えばヒトでは、例えば、血液中CRF濃度が、約12～15pg／mLの基準値、例えば約12pg／mL、好ましくは約13pg／mL、より好ましくは約14pg／mL、さらにより好ましくは約15pg／mLを超えるヒトは、精神神経疾患に罹患している可能性が高いと判断することができる。なお、精神神経疾患に罹患している哺乳動物（好ましくはヒト）の血液中CRF濃度は、通常、高くとも約50pg／mL以下、好ましくは約40pg／mL以下、より好ましくは約30pg／mL以下、さらにより好ましくは約25pg／mL以下、とりわけ好ましくは約25pg／mL以下の値を示す。

[0024] さらに、本発明で開示する前記の方法を用いれば、精神神経疾患を患っている哺乳動物の疾患の程度、いわゆる、軽症、中等症、又は重症の別も判断することができる。血液を提供した哺乳動物の血液中CRF濃度が基準値より高くなるにつれて、該疾患の程度は、軽症、中等症、重症というように、より重度である可能性が高いと判断することができる。疾患の程度の判断に関して一例を挙げてみれば、例えば、精神神経疾患が大うつ病である場合、血液中CRF濃度が、例えば約12pg／mL、好ましくは約13pg／mL、より好ましくは約14pg／mLを超える場合には軽症の大うつ病である可能性が高いと判断することができる。また血液中CRF濃度が、例えば約13pg／mL、好ましくは約14pg／mL、より好ましくは約15pg／mLを超える場合には中

等症の大うつ病である可能性が高いと判断することができる。また血液中CRF濃度が、例えば約14pg／mL、好ましくは約15pg／mL、より好ましくは約16pg／mL、さらにより好ましくは約17pg／mL、とりわけ好ましくは約18pg／mLを超える場合には重症の大うつ病である可能性が高いと判断することができる。

[0025] 上記基準値は、ヒト以外の哺乳動物にも適用することができる。

[0026] 精神神経疾患

本発明において、精神神経疾患とは、CRFが関与する精神神経疾患を意味する。CRFが関与する精神神経疾患としては、例えば、気分障害（例えば、うつ病（大うつ病（MDD）、小うつ病、単一エピソードうつ病、分娩後うつ病、小児虐待誘発性うつ病、老人性うつ病、仮面うつ病、季節性うつ病等）、双極性感情障害、不定愁訴、月経前不快気分障害、産後気分障害、閉経周辺期または閉経期間気分障害）、不安障害（例えば、全般性不安障害、パニック障害、強迫性障害、社会不安障害、恐怖症性不安障害（高所恐怖症、閉所恐怖症、広場恐怖症、社会恐怖症等））、適応障害（例えば、情緒的障害、行為障害、それらの両方を伴う障害、身体的愁訴、社会的な引きこもり、職業上または学業上の停滞）、ストレス関連障害（例えば、心的外傷後ストレス障害（PTSD）、ストレス誘導性免疫抑制、ストレス誘発性頭痛、ストレス誘発性熱、ストレス誘発性疼痛、手術襲撃ストレス、ストレスに伴う胃腸機能障害（胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍等）、過敏性腸症候群、性欲減退症、勃起機能低下症）、摂食障害（例えば、神経性食欲不振症、過食症、神経性嘔吐症）、精神作用物質使用による症状もしくはその依存症（例えば、アルコールの禁断症状、アルコール依存症、薬物中毒、薬物依存症）、器質性精神障害（例えば、アルツハイマー型老人性痴呆、多梗塞性痴呆症）、統合失調症、注意欠陥多動性障害、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症）、疼痛、けいれん性疾患（例えば、痙攣、筋痙攣）、発作性障害（例えば、てんかん、発作、片頭痛）あるいは睡眠障害（例えば、非器質性睡眠障害、繊維筋痛性睡眠障害）等が挙げられる。

[0027] また、本発明における精神神経疾患には、上記の精神神経疾患に伴って起こる、CRFが関与する疾患、即ち、血液中CRF濃度が変動する疾患も含まれる。このような

疾患としては、例えば、消化器系疾患（例えば、消化性潰瘍（胃潰瘍、十二指腸潰瘍等）、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）、過敏性腸症候群、ストレスに伴う胃腸機能障害（胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍等）、下痢あるいは便秘等）、呼吸器系疾患（例えば、喘息、気管支炎、慢性閉塞性肺疾患あるいはアレルギー性鼻炎等）、内分泌性疾患（例えば、甲状腺機能障害症候群、クッシング病あるいは抗利尿ホルモン不適合分泌症候群等）、代謝性疾患（例えば、肥満症あるいは低血糖等）、循環器系疾患（例えば、高血圧、虚血性心疾患、頻脈、うっ血性心不全あるいは脳血管疾患等）、皮膚疾患（例えば、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎あるいは乾癬等）、尿路性器系疾患（例えば、排尿障害、頻尿あるいは尿失禁等）、眼疾患（例えば、ブドウ膜炎等）、筋骨格系疾患（例えば、関節リウマチ、変形性骨関節症または骨粗鬆症等）等が挙げられる。

[0028] 本発明においては、精神神経疾患として、特に、大うつ病（MDD）、とりわけ、軽症または中等症の大うつ病を対象とすることが好ましい。

[0029] (II)精神神経疾患の治療方法など

以下、血液中CRF濃度の調節方法、精神神経疾患の治療スケジュールの決定方法、精神神経疾患の治療及び／又は症状進展抑制方法、精神神経疾患の再発防止方法を説明する。対象となる哺乳動物の種、血液、血液の分析、CRF濃度の算出、精神神経疾患の種類については、前述した通りである。

[0030] 前述した方法において、さらに薬剤の投与を組合わせることによって、血液中CRF濃度を調節することが可能となる。具体的には、例えば、哺乳動物から採取した血液を分析し、そのCRF濃度を算出し、血液中CRF濃度が上記基準値より高値である場合に、該哺乳動物に薬剤を投与することによって、血液中CRF濃度を低下させる等の調節を行うことができる。特に、血液中CRF濃度が基準値より高値を示した哺乳動物が、精神神経疾患に罹患している場合、かかる調節方法は精神神経疾患の治療又は症状進展抑制方法となる。つまり精神神経疾患に罹患している哺乳動物（特にヒト）の血液中CRF濃度を調節することにより、上記精神神経疾患を治療、緩和、又は症状の進展を抑制することができる。この場合、哺乳動物、通常は精神神経疾患の患者又は精神神経疾患への罹患を疑われる者から採取した血液を分析し、血液

中のCRF濃度を算出し、それに応じて、薬剤の種類とその薬剤の投与量を決定することができる。さらに精神神経疾患に罹患している哺乳動物(特にヒト)を治療するに際して、該哺乳動物から採取した血液を分析し、そのCRF濃度を算出し、例えば、薬剤、その薬剤の投与量およびその薬剤の投与期間等を含む精神神経疾患の治療スケジュール等を決定することもできる。なお、本発明において、薬剤としては、一般的に精神神経疾患の予防、治療および／または症状進展抑制に用いられる薬剤であればどのようなものであってもよい。

[0031] また、本発明において、「予防」とは疾患の成立そのものを妨げ、又は遅らせることを意味し、「治療」とは病態を治癒の方向へ導くこと、又は完全に回復することを意味し、「症状進展抑制」とは病態の悪化を抑制し進行をとどめることを意味する。本発明における薬剤としては、例えば、うつ病や不安障害の治療に用いられる薬剤が好ましく用いられる。

[0032] さらに、本発明で開示する前記の方法では、血液中CRF濃度を経時的に測定することで、より効果的に、血液中CRF濃度を調節し、精神神経疾患を治療又は症状進展抑制し、精神神経疾患の治療スケジュールを決定することができる。具体的には、経時的に血液中CRF濃度を測定する、いわゆるモニタリングを行い、血液中CRF濃度が前回測定時の血液中CRF濃度と比較して高値を示している場合、あるいは同等の値を示している場合に、その血液中CRF濃度を低下せしめる量の薬剤を投与することによって、より効果的に精神神経疾患を治療し、あるいは症状進展抑制することができる。例えば、半年～1年に1回、半月～数ヶ月に1回、あるいは1週間～数週間に1回ぐらいの頻度で血液中CRF濃度を測定することが好ましい。ここで、「血液中CRF濃度を低下せしめる量の薬剤」の投与量としては、該薬剤が通常、精神神経疾患の予防、治療および／または症状進展抑制のために用いられている投与量を基準に適宜増減すればよいが、例えばその投与量が不明である場合等には、血液中CRF濃度をモニタリングしながら血液中CRF濃度の低下が確認されるまで順次投与量を増量していけばよい。

[0033] またさらに、本発明で開示する前記の方法は、精神神経疾患の寛解期にある哺乳動物(好ましくは患者)の再発予防にも使用できる。精神神経疾患、特にうつ病等は、

寛解と再発を繰り返す疾患として知られているが、例えば、寛解期において、上記の如く血液中CRF濃度のモニタリングを行って、血液中CRF濃度が前回測定時の血液中CRF濃度と比較して高値を示している場合に、その血液中CRF濃度を低下せしめる量の薬剤を投与することによって、精神神経疾患の再発を未然に防ぐ、即ち予防することができる。ここで、「血液中CRF濃度を低下せしめる量の薬剤」の投与量としては、前記に準じて解すればよい。

[0034] 前記したように、本発明において、薬剤としては、一般的に精神神経疾患の予防、治療および／または症状進展抑制に用いられる薬剤であればどのようなものであってもよく、例えば、うつ病や不安障害の治療に用いられる薬剤が好ましく用いられる。このような薬剤としては、例えば、AVP-923、JDS-103、JZP-3、ODS-II、ORG-34517、PRX-00023、SLV-308、ST-200、TJ-96、VEC-162、アゴメラチン(agomelatine)、アデメチオニン(ademetionine)、アドラフィニル(adrafinil)、アプレピタント(aprepitant)、アミスルプリド(amisulpride)、アミネプチン(amineptine)、アミベグロン(amibegron)、アモキサピン(amoxapine)、アリピプラゾール(aripiprazole)、アルプラゾラム(alprazolam)、アルモダフィニル(armodafinil)、イストラデフィリン(istradefylline)、エイコサペンタエン酸エチル(ethyl eicosapentaenoate)、エチゾラム(etizolam)、エチフォキシン(etifoxine)、エトペリドン(etoperidone)、エプリバンセリン(eplivanserin)、エンタカポン(entacapone)、オキサゼパム(oxazepam)、オキサゾラム(oxazolam)、オキサフロザン(oxaflozane)、オキシトリプタン(oxitriptan)、オセモゾタン(osemozotan)、オランザピン(olanzapine)、カソピタント(casopitant)、カマゼパム(camazepam)、カルバマゼピン(carbamazepine)、キヌプラミン(quinupramine)、クアゼパム(quazepam)、クロキサゾラム(cloxazolam)、クロチアゼパム(clotiazepam)、クロバザム(clobazam)、ケタゾラム(ketazolam)、ゲピロンER(gepirone-ER)、コハク酸デスベンラファキシン(desvenlafaxine succinate)、サブスタンスP拮抗薬(substance P antagonists)、サレデュタント(saredutant)、ジアゼパム(diazepam)、ジアゼパムエマルジョン(diazepam emulsion)、ジヒドロエルゴクリプチン(dihydroergocryptine)、ジプラシドン(ziprasidone)、シュウ酸エスシタロプラム(escitalopram oxalate)、セチプチリン(setiptiline)、セルトラリン(sertraline)、セレギリン(selegiline)、ゾテピン(zotepine)、ゾニサミド(zonisamide)、ダポキセチン(dap

oxetine)、タラグルメタド(talaglumetad)、タンドスピロン(tandospirone)、チアガビン(tiagabine)、チアネプチン(tianeptine)、デスベンラファキシン(desvenlafaxine)、テトラバメート(tetrabamate)、デメキシプチリン(demexiptiline)、デロラゼパム(delorazepam)、ドスレピン(dosulepine)、トピラメート(topiramate)、トフィソパム(tofisopam)、トラゾドン(trazodone)、トロキサトン(toloxatone)、ニトロキサゼピン(nitroxazepine)、ネミフィチド・ジトリフルテート(nemifitide ditriflutate)、パゴクローン(pagoclone)、ハラゼパム(halazepam)、パリペリドン(paliperidone)、バルプロ酸(valproic acid)、バルプロ酸ナトリウム(valproate sodium)、パロキセチン(paroxetine)、ピナゼパム(pinazepam)、ビフェプルノックス(bifeprunox)、ビラゾドン(vilazodone)、ピルリンドール(pirlindole)、ビロキサジン(viloxazine)、ブスピロン(buspirone)、ブプロピオン(bupropion)、ブプロピオンEA塩(bupropion EA salt)、ブプロピオンSR(bupropion SR)、フマル酸ケチアピン(quetiapine fumarate)、プラステロン(prasterone)、プラゼパム(prazepam)、プラミペキソール(pramipexole)、フルジアゼパム(fludiazepam)、フルタゾラム(flutazolam)、フルトプラゼパム(flutoprazepam)、フルボキサミン(fluvoxamine)、プレガバリン(pregabalin)、フロキセチン(fluoxetine)、フロキセチン・オランザピン合剤(fluoxetine + olanzapine)、ブロチゾラム(brotizolam)、ブロマゼパム(bromazepam)、ベンタゼパム(bentazepam)、ベンラファキシンXR(venlafaxine XR)、マレイン酸アセナピン(asenapine maleate)、マレイン酸トリミプラミン(trimipramine maleate)、ミアンセリン(mianserin)、ミダゾラム(midazolam)、ミナプリン(minaprine)、ミラキシオン(Miraxion)、ミルタザピン(mirtazapine)、ミルナシプラン(milnacipran)、メキサゾラム(mexazolam)、メシル酸パロキセチン(paroxetine mesylate)、メシル酸ラサギリン(rasagiline mesylate)、メタクラゼパム(metaclazepam)、メディフォキサミン(medifoxamine)、メトラリンドール(metralindole)、モクロベミド(moclobemide)、モダフィニル(modafinil)、ラメルテオン(ramelteon)、ラモトリジン(lamotrigine)、リカルバゼピン(licarbazepine)、リスペリドン(risperidone)、リルマザフォン(rilmazafone)、ルフィナミド(rufinamide)、レベチラセタム(levetiracetam)、レボキセチン(reboxetine)、レボスルピリド(levosulpiride)、ロフェプラミン(lofepramine)、ロフラゼプ酸エチル(ethyl loflazepate)、ロルメタゼパム(lormetazepam)、塩酸アトモキセチン(atomoxetine hydrochloride)、塩酸アロセトロン(alosetron hydrochloride)

、塩酸イミプラミン(imipramine hydrochloride)、塩酸デュロキセチン(duloxetine hydrochloride)、塩酸ネファゾドン(nefazodone hydrochloride)、塩酸フリバンセリン(flibanserin hydrochloride)、塩酸ベンラファキシン(venlafaxine hydrochloride)、塩酸マプロチリン(maprotiline hydrochloride)、臭化水素酸シタロプラム(citalopram hydrobromide)、炭酸リチウム(lithium carbonate)等が挙げられる。

[0035] これらの一般的な薬剤は、精神神経疾患を予防、治療および／または症状進展抑制することで、結果的に血液中CRF濃度を低下せしめる働きをもたらす。即ち、薬剤の投与後に血液中CRF濃度を測定することより、精神神経疾患を予防、治療および／または症状進展抑制できたことを確認することができる。

[0036] また、本発明における薬剤としては、血液中やCSF中、あるいは生体内の他の部位のCRFの作用を遮断することにより精神神経疾患の病態を改善せしめる作用を有する化合物も好ましい。このような化合物としては、例えば、CRF拮抗薬等が挙げられる。CRF拮抗薬としては、例えば、8－(3－ペンチルアミノ)－2－メチル－3－(2－クロロ－4－メトキシフェニル)－6，7－ジヒドロ－5H－シクロペンタ[d]ピラゾロ[1，5－a]ピリミジン メタンスルホン酸塩、BMS-562086、GSK-876008、DPC-368、SSR-125543、TS-041、AAG-561、NBI-34041、GW-876008、IL-488、ウロコルチンII(urocortin-II)、ピバガビン(pivagabine)等が挙げられるが、これらに限定されない。CRF拮抗薬もまた、精神神経疾患を予防、治療および／または症状進展抑制することで、結果的に血液中CRF濃度を低下せしめる働きをもたらす。

[0037] 上記例示した薬剤の投与経路は、薬剤の種類によって異なる。

[0038] (III)精神神経疾患の治療及び／又は症状進展抑制・精神神経疾患の再発予防剤のスクリーニング方法

本発明で開示する血液中CRF濃度の測定方法は、精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又は再発予防剤のスクリーニング方法、好ましくは、CRF拮抗薬のスクリーニング方法にも用いることができる。該スクリーニング方法は、哺乳動物、好ましくは、血液中CRF濃度が基準値より高値である哺乳動物に、CRF拮抗薬の候補化合物等の薬剤を投与して、該薬剤を投与された前記哺乳動物から採取した血液を分析し、そのCRF濃度を算出し、薬剤投与前の哺乳動物の血液中CRF

濃度と比較することにより実施できる。投与量は、薬剤の種類によって異なるが、例えば、体重1kgあたり数十マイクログラムから数百ミリグラム、好ましくは体重1kgあたり約30μg～約600mg、より好ましくは体重1kgあたり約0．3mg～約60mg、さらにより好ましくは体重1kgあたり約1mg～約20mgの範囲とすればよい。血液中CRF濃度が薬剤投与後に低下する場合は、CRF拮抗薬として利用可能性がある。この場合、薬剤が投与された哺乳動物の血液のCRF濃度を、薬剤投与前の血液中CRF濃度と比較して約5%以上、好ましくは約5%～30%、より好ましくは約10%～30%、特に好ましくは約20%～30%、とりわけ好ましくは約25%～30%低下させる薬剤が好ましく、このような薬剤をCRF拮抗薬として認定又は選択することができる。上記の方法は、CRF拮抗薬に限られず、精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制に用いられる薬物のスクリーニング方法、又は精神神経疾患の再発予防に用いられる薬物のスクリーニング方法として一般的に応用可能である。

[0039] また、かかるスクリーニングにおいて、薬剤投与後に血液中CRF濃度が上昇する化合物が見出された場合は、該化合物をCRF作用薬として利用できる可能性がある。

発明の効果

[0040] 本発明に従えば、精神神経疾患の患者や、あるいは精神神経疾患に罹患している可能性が疑われる人等から採取した血液を分析手段に付することによって、CSF採取のように身体的負担や侵襲を伴うことなく、簡便かつ安全に精神神経疾患であるか否かを、あるいは精神神経疾患の重症度を診断できる。このため、CSF採取時の患者の苦痛やCSF採取後に見られる、例えば、低脊髄圧症候群や頭痛等の発生を抑制できる。またCSF採取時の脊髄損傷の危険を回避できる。

[0041] 血液中CRF濃度の基準値において、血液中CRF濃度とCSF中に含まれるCRF濃度とは相関関係を有するので、血液中CRF濃度を測定することにより、例えば、以下の(1)乃至(7)の効果を有する。

(1)CRFが関与する精神神経疾患の診断が可能となる。

(2)薬剤を投与してCRFが関与する精神神経疾患の患者を治療するに際して、薬剤およびその投与量を決定することができる。

(3)薬剤を投与してCRFが関与する精神神経疾患の患者を治療するに際して、投与

する薬剤やその投与量および薬剤の投与期間を定める等、前記疾患の治療スケジュールを決定できる。

(4)薬剤を投与してCRFが関与する精神神経疾患の患者を治療するに際して、投与された薬剤の有効性を判断できる。

(5)精神神経疾患の患者から血液を経時的に採取し、その血液中CRF濃度をモニタリングしながら薬剤の投与を行うことによって、精神神経疾患の治療および／または症状進展抑制を効果的・効率的に行うことができる。

(6)再発と寛解を繰り返すような精神神経疾患において、寛解期にある精神神経疾患の患者から血液を経時的に採取し、その血液中CRF濃度をモニタリングしながら薬剤の投与を行うことによって、精神神経疾患の再発を予防することができる。

(7)哺乳動物に例えば、CRF拮抗薬の候補化合物等の薬剤を投与して、薬剤の投与前および投与後の血液中CRF濃度を比較することにより、投与された薬剤の有効性を評価して、精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又は再発予防剤、特にCRF拮抗薬として認定するスクリーニングの方法等に利用できる。

図面の簡単な説明

[0042] [図1]図1は健常人におけるCSF中のCRF濃度と血漿中CRF濃度の相関関係を示す図である。縦軸はCSF中のCRF濃度を示し、横軸は血漿中のCRF濃度を示し、Rは相関係数を示す。

[図2]図2は大うつ病患者におけるCSF中のCRF濃度と血漿中CRF濃度の相関関係を示す図である。縦軸はCSF中のCRF濃度を示し、横軸は血漿中のCRF濃度を示し、Rは相関係数を示す。

[図3]図3は、図1および図2に示した健常人及び大うつ病患者におけるCSF中のCRF濃度と血漿中CRF濃度の相関関係を同一のグラフ上に示した図である。縦軸はCSF中のCRF濃度を示し、横軸は血漿中CRF濃度を示し、Rは相関係数を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0043] 以下に実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以下の実施例において、比は容積比を示す。

実施例 1

[0044] (1)検体

検体として、健常人(9人)または軽症～中等症の大うつ病患者(12人)から採取した血液(2．5mL)またはCSF(2．5mL)を使用した。

[0045] (2)検体の前処理

まず、Sep－Pak C18(Waters社製;ODS系カラム)を、アセトニトリル／0．5%酢酸(6／4)の混合液、メタノールおよび水で順次洗浄し、コンディショニングした。検体に6M塩酸グアニジン溶液を加えた検体液を、前記コンディショニング後のSep－Pak C18に付した。次いで、該Sep－Pak C18を0．1N塩酸で洗浄し、アセトニトリル／0．5%酢酸(6／4)の混合液で展開溶出することで、除タンパクされた血漿およびCSFの溶出液を得た。得られた溶出液は、それぞれ凍結乾燥した。

[0046] (3)RIA法によるCRFの測定

上記(2)で凍結乾燥した血漿またはCSF(検体)と、ウサギを用いて作成した抗CRF血清を緩衝液(0．05%Tween20、0．1%BSA(ウシ血清アルブミン)および0．1%アジ化ナトリウム含有の0．1M PBS(リン酸緩衝食塩水;pH7．4))に加えて検体液を調製し、該検体液を4℃で24時間インキュベートした。次いで、インキュベート後の検体液に^{125}I－CRFを添加して、4℃でさらに24時間インキュベートした。さらに、第二抗体として、1%NRS(Normal Rabbit Serum)および25%ポリエチレングリコールを検体液に加え、撹拌しながら4℃で4時間インキュベートした。その後、検体液を遠心分離(3000r.p.m.)して上清を除去し、沈殿物の放射活性をγ－カウンター(ARC－1000;アロカ社製)で測定した。別途作成した検量線から、検体のCRF濃度を算出した。

結果を以下に示す。

[0047] [表1]

健常人	ＣＲＦ濃度（pg/mL）	
	ＣＳＦ中	血液中
1	9.66	13.86
2	13.26	8.79
3	12.36	9.68
4	12.14	9.53
5	14.68	12.67
6	12.71	10.92
7	17.74	13.77
8	18.01	16.57
9	13.94	12.61

[0048] [表2]

大うつ病患者	ＣＲＦ濃度（pg/mL）	
	ＣＳＦ中	血液中
1	19.85	8.24
2	19.55	11.49
3	14.63	11.12
4	20.60	9.67
5	28.88	18.06
6	23.50	15.06
7	30.55	22.58
8	26.71	21.96
9	29.44	13.44
１０	23.95	10.17
１１	20.04	7.76
１２	16.27	7.10

[0049] 健常人では、CSF中のCRF濃度は9.66～18.01pg／mLであり、血液中CRF濃度は9.53～16.57pg／mLであった。健常人の血液中CRF濃度とCSF中のCRF濃度との間には、正の相関が認められた（図1）。また大うつ病患者では、CSF中のCRF濃度は14.63～30.55pg／mLであり、血液中CRF濃度は7.10～22.58pg／mLであった。大うつ病患者の血液中CRF濃度とCSF中のCRF濃度との間には、正の相関が認められた（図2）。

[0050] また、多くの大うつ病患者のCSF中のCRF濃度は20pg／mLを越えており、血液中CRF濃度についてもばらつきはあるものの、15pg／mLを越える高値であるものが多かった。それに対して、健常人のCSF中のCRF濃度は20pg／mL未満であり、血液中CRFの濃度もばらつきが少なく、15pg／mL以下の値がほとんどであり、大うつ病患者に比べて低い値が多かった。

[0051] 次に、健常人と大うつ病患者の血液中CRF濃度とCSF中のCRF濃度との関係を1つのグラフとして図3に示した。図3においても血液中CRF濃度とCSF中のCRF濃度との間に正の相関が認められた。この結果は、血液中CRF濃度が大うつ病の指標となることを示す。

産業上の利用可能性

[0052] 本発明で開示する方法を用いれば、CRFが関与する精神神経疾患を診断することができ、その治療スケジュール、例えば、使用薬剤の選択、該薬剤の投与量の決定および該薬剤の投与期間等の選択に利用できる。また、本発明で開示する方法は、CRF拮抗薬等のスクリーニングに利用することもできる。

請求の範囲

[1] 哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を血液中CRF濃度の基準値と比較する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の診断のための血液中CRF濃度の測定方法。

[2] 血液中CRF濃度の基準値が12～15pg／mLである請求の範囲第1項に記載の方法。

[3] 哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を血液中CRF濃度の基準値と比較する工程と、血液中CRF濃度が基準値より高い場合に精神神経疾患であると判断する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の診断方法。

[4] 血液中CRF濃度の基準値が12～15pg／mLである請求の範囲第3項に記載の方法。

[5] 哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を血液中CRF濃度の基準値と比較する工程と、血液中CRF濃度が基準値より高い哺乳動物に薬剤を投与する工程とを含むことを特徴とする、血液中CRF濃度の調節方法。

[6] 血液中CRF濃度の基準値が12～15pg／mLである請求の範囲第5項に記載の方法。

[7] 薬剤がCRF拮抗薬である請求の範囲第5項に記載の方法。

[8] 精神神経疾患の哺乳動物又は精神神経疾患が疑われる哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中CRF濃度を算出する工程と、薬剤の投与量および投与期間を定める工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の治療スケジュールの決定方法。

[9] 精神神経疾患の哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を前回血液採取時の血液中CRF濃度と比較する工程と、血液中CRF濃度が前回血液採取時の血液中CRF濃度と同等、又はより高値である哺乳動物に血液中CRF濃度を低下せしめる量の薬剤を投与する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の治療および／または症状進展抑制方法

。

[10] 寛解期にある精神神経疾患の哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を前回血液採取時の血液中CRF濃度と比較する工程と、血液中CRF濃度が前回血液採取時の血液中CRF濃度より高値である哺乳動物にそれを低下せしめる量の薬剤を投与する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の再発予防方法。

[11] 精神神経疾患がうつ病である請求の範囲第10項に記載の方法。

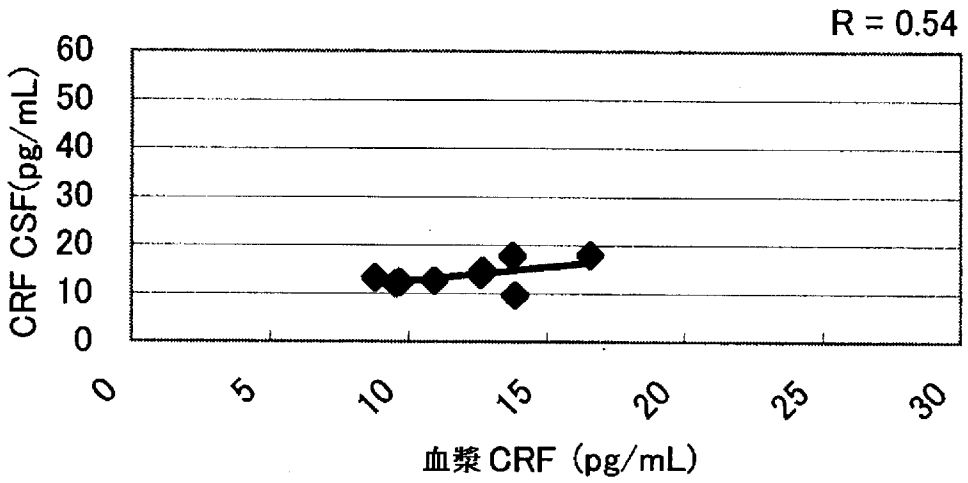
[12] 薬剤がCRF拮抗薬である請求の範囲第10項に記載の方法。

[13] 哺乳動物に被検物質を投与する工程と、被検物質を投与された哺乳動物から採取した血液を分析し、血液中のCRF濃度を算出する工程と、得られた血液中CRF濃度を被検物質投与前の血液中CRF濃度と比較する工程と、被検物質投与により血液中CRF濃度を低下させる物質を選択する工程とを含むことを特徴とする、精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又は再発予防剤のスクリーニング方法。

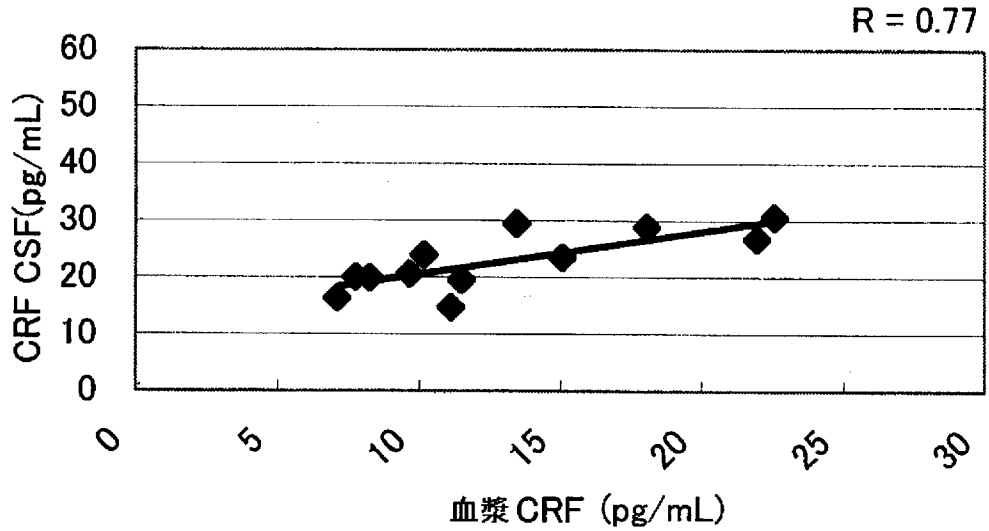
[14] 精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又は再発予防剤が、CRF拮抗による精神神経疾患の治療及び／若しくは症状進展抑制剤、又はCRF拮抗による再発予防剤である請求の範囲第13項に記載の方法。

[15] 被検物質投与による血液中CRF濃度低下が、被検物質投与前の血液中CRF濃度の5%以上である被検物質を選択する、請求の範囲第13項に記載の方法。

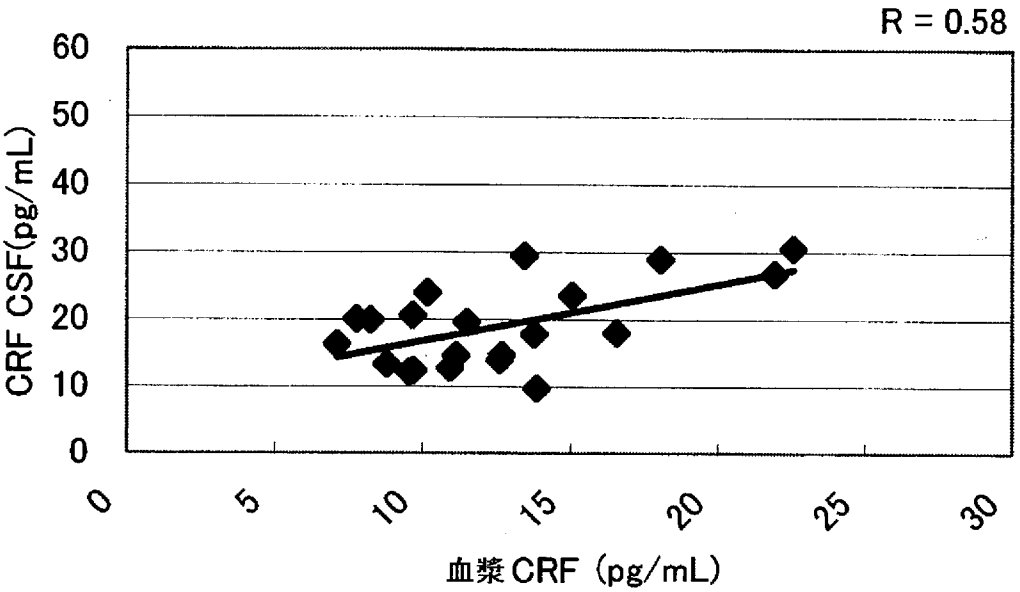
[図1]


R = 0.54
CRF CSF(pg/mL)
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
血漿 CRF (pg/mL)

[図2]


R = 0.77
CRF CSF(pg/mL)
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
血漿 CRF (pg/mL)

[図3]


R = 0.58
CRF CSF(pg/mL)
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
30
血漿 CRF (pg/mL)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/064786

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/53(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61P25/00*(2006.01)i, *A61P25/24*(2006.01)i, *G01N33/15*(2006.01)i, *G01N33/50*(2006.01)i, *G01N33/543*(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/53, A61K45/00, A61P25/00, A61P25/24, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/543

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 1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Xing XIA et al., "Ethanolic Extracts from Curcuma longa Attenuates Behavioral, Immune, and Neuroendocrine Alterations in a Rat Chronic Mild Stress Model.", Biol.Pharm.Bull., 2006.05.01, Vol.29 No.5, p.938-944	1,2,13-15
A	Satoru SUZUKI et al., "Somatostatin Analogue (SMS 201-995) Decreases Plasma Levels of Corticotropin (ACTH) and Corticotropin-Releasing Hormone in a Patient with Ectopic ACTH-Producing Tumors.", Endocrinologia Japonica, 1990.12, Vol.37 No.6, p.923-932	1,2,13-15
A	Shuso Suemaru et al., "CEREBROSPINAL FLUID AND PLASMA CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE IN SENILE DEMENTIA.", Life Sciences, Vol.48 No.19, 1991, p.1871-1879	1,2,13-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
15 August, 2007 (15.08.07)	28 August, 2007 (28.08.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/064786

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Banki C.M.et al., "CSF Corticotropin-Releasing Factor-Like Immunoreactivity in Depression and Schizophrenia.", The American Journal of Psychiatry, 1987, Vol.144 No.7, p.873-877	1,2,13-15
A	Mihaly Arato et al., "Elevated CSF CRF in Suicide Victims.", Biological Psychiatry, 1989, Vol.25 No.3, p.355-359	1,2,13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/064786

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. [X] Claims Nos.: 3-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 3 to 12 pertain to methods for treatment of the human body or animal body by therapy and diagnostic methods to be practiced on the human body or animal body, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, (continued to extra sheet)

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０６４７８６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/24(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53, A61K45/00, A61P25/00, A61P25/24, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/543

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	１９７１－２００７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００７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）

JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

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	関連する請求の範囲の番号
X	Xing XIA et al., “Ethanolic Extracts from Curcuma longa Attenuates Behavioral, Immune, and Neuroendocrine Alterations in a Rat Chronic Mild Stress Model.”, Biol.Pharm.Bull., 2006.05.01, Vol.29 No.5, p.938-944	１、２、１３－１５
A	Satoru SUZUKI et al., “Somatostatin Analogue(SMS 201-995) Decreases Plasma Levels of Corticotropin (ACTH) and Corticotropin-Releasing Hormone in a Patient with Ectopic ACTH-Producing Tumors.”, Endocrinologia Japonica, 1990.12, Vol.37 No.6, p.923-932	１、２、１３－１５

☑　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 １５．０８．２００７	国際調査報告の発送日 ２８．０８．２００７
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）　２Ｊ　３９０６ 白形　由美子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Shuso Suemaru et al., “CEREBROSPINAL FLUID AND PLASMA CORTICOTROPIN-RELEASING HORMONE IN SENILE DEMENTIA.”, Life Sciences, Vol.48 No.19, 1991, p.1871-1879	１、２、１３－１５
A	Banki C.M. et al., “CSF Corticotropin-Releasing Factor-Like Immunoreactivity in Depression and Schizophrenia.”, The American Journal of Psychiatry, 1987, Vol.144 No.7, p.873-877	１、２、１３－１５
A	Mihaly Arato et al., “Elevated CSF CRF in Suicide Victims.”, Biological Psychiatry, 1989, Vol.25 No.3, p.355-359	１、２、１３－１５

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０６４７８６

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．☑ 請求の範囲３－１２ 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、
請求の範囲３－１２は、治療による人体又は動物の体の処置方法及び人体又は動物の体の診断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．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ 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．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ 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。

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の範囲について作成した。

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の範囲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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲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ので、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の範囲について作成した。

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を伴う異議申立てがなかった。