

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-519225

(P2006-519225A)

(43) 公表日 平成18年8月24日(2006.8.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 P 25/30 (2006.01)	A 6 1 P 25/30	4 C O 8 4
A 6 1 P 25/36 (2006.01)	A 6 1 P 25/36	4 C O 8 6
A 6 1 P 25/32 (2006.01)	A 6 1 P 25/32	
A 6 1 K 31/4178 (2006.01)	A 6 1 K 31/4178	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-502684 (P2006-502684)	(71) 出願人	503310763 社団法人芝罘会 京都府京都市左京区吉田牛の宮町11-1
(86) (22) 出願日	平成16年2月26日 (2004.2.26)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月21日 (2005.10.21)	(74) 代理人	100087114 弁理士 齋藤 みのり
(86) 国際出願番号	PCT/JP2004/002301	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 国際公開番号	W02004/075916	(72) 発明者	中西 重忠 京都府京都市左京区上高野鷺町21-3
(87) 国際公開日	平成16年9月10日 (2004.9.10)	(72) 発明者	疋田 貴俊 アメリカ合衆国21209-4942メリ ーランド州ボルティモア、アパートメント 102、ハローデイル・ロード6803番 最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/449,868		
(32) 優先日	平成15年2月27日 (2003.2.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 依存症治療用医薬組成物

## (57) 【要約】

本発明は薬物依存症の治療におけるアセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物の使用に関し、本願発明は該薬物を有効成分とする、薬物依存症の治療用医薬組成物、該薬物を用いて薬物依存症を治療する方法を提供するものである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物を有効成分とする薬物依存症を治療するための医薬組成物。

## 【請求項 2】

薬物依存症がモルヒネ型、アルコール型、バルビツール酸型、アンフェタミン型、コカイン型、大麻型、有機溶剤型、カート型、幻覚剤型から選択される請求項 1 記載の組成物。

## 【請求項 3】

薬物依存症がモルヒネまたはコカインに起因する、請求項 2 記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 4】

薬物依存症がアルコールに起因する、請求項 2 記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

薬物がコリン作動性アルカロイド、コリンエステラーゼ阻害剤またはコリンエステルである、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

コリン作動性アルカロイドがピロカルピン、オキソトレモリンまたはセビメリンである、請求項 5 記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

コリンエステラーゼ阻害剤が、フィゾスチグミン、タクリンおよびタクリン類似体、ファシクリン、メトリホナート、ヘプチルーフィゾスチグミン、リバスティグミン、ノルピリドスチグミン、ノルネオスチグミン、フペラジン、アンベノニウム、エンドロフォニウム、イソフルロフェート、ネオスチグミン、ピリドスチグミン、ジスチグミン、ドネペジル、およびこれらの塩、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を維持している誘導体またはプロドラッグから選択される、請求項 5 記載の医薬組成物。

20

## 【請求項 8】

コリンエステラーゼ阻害剤がガラントミン、エピガラントミンおよびノルガラントミンならびにそれらの類似体、塩および誘導体から選択される、請求項 5 記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

薬物が血液脳関門を通過しうるものである、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

30

## 【請求項 10】

薬物が実質的にアセチルコリンの作用を昂進および脱抑制する請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

薬学的に許容しうるアセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物の治療有効量を、薬物依存症の患者に投与することからなる、薬物依存症を治療する方法。

## 【請求項 12】

アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物の、薬物依存症治療剤の製造における使用。

40

## 【請求項 13】

候補薬物をアセチルコリンの作用を増強または脱抑制する能力に関し検索することからなる薬物依存症の治療剤のスクリーニング法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、薬物依存症の治療に関し、さらに詳しくは、中枢神経における神経伝達物質であるアセチルコリンの作用を昂進または脱抑制しうる薬物を含有する、薬物依存症の治療のための医薬組成物、また、そのような薬物を用いて薬物依存症を治療する方法に関する。

50

## 【背景技術】

## 【0002】

薬物依存は様々なタイプの依存性薬物が原因で引き起こされる疾患であり、依存症に悩む患者は、世界中で3,000万人を越えると推定されている。薬物依存に関連した社会的機能の障害や器質性精神障害（器質性精神病）が社会問題化し、多大の費用が必要となることから、その有効な対策が世界規模で求められている。

## 【0003】

薬物依存には、ある薬物を摂取したいという止めがたい欲求を示す精神依存と、生体がある薬物の影響下に在ることに適応した結果、その薬物が体内から消退して薬理作用が減弱もしくは消失したときに精神的および身体的に現れる病的な症候（離脱症状）としての身体依存とがある。

## 【0004】

これら依存症の発症における脳内報酬系の関与が指摘されている。脳内報酬系は動物の脳内自己刺激行動を引き起こす部位として同定されるもので、快感や動機付け、多幸感をもたらす機能を担っている。依存性薬物の多くが脳内報酬系を賦活し、使用者に快感をもたらすこと、原因物質である薬物が体内から消失した後も強い影響を残し続けることなどが薬物依存症の治療を極めて困難にしている。依存性薬物は、その症状に応じて、モルヒネ型、アルコール型、バルビツール酸型、アンフェタミン型、コカイン型、大麻型、有機溶剤型、カート型、幻覚剤型などに分類されるが、一般に薬物依存を起こす物質として知られているのは、コカイン、アヘン類（ヘロインやモルヒネなど）、アルコール、アンフェタミン（またはアンフェタミン様物質）、カフェイン、大麻、幻覚剤、吸入剤、ニコチン、フェンシクリジン（またはフェンシクリジン様物質）、鎮静剤、催眠剤及び抗不安薬などである。しばしば、一人の患者が1つ以上の物質に依存している。

## 【0005】

依存性薬物の多くが1回の使用で依存を引き起こし、一度影響を受けると薬物摂取をやめた後も長期間、症状が持続する例があることが、薬物依存症を脳の慢性疾患としてとらえている理由である。さらに、この様な薬物の過剰摂取は生体に重大な影響を及ぼし、時に死に導くことさえある。

## 【0006】

本明細書中、「薬物依存」は米国精神科協会のDSM-IV障害分類の判定基準による物質関連障害、すなわち物質使用障害と物質誘発性障害を含む。

## 【0007】

現時点では薬物依存症に対する有効な治療法はほとんどない。コカインとアンフェタミン依存には精神療法が行われているが効果に乏しく、また内科的治療法は存在しない。ドーパミンのアゴニストおよびアンタゴニストの適用が考えられているが、治療効果は少ない。コカインとアンフェタミンが誘発する精神病性障害に対して抗精神病薬が対症療法として用いられている。アヘン類やニコチン依存に対してはメタドンやニコチンパッチなどの代替物質による維持療法が行われるが、離脱症状の防止には有効であっても依存は続いている状態である。また、アルコール依存の離脱症状に対して用いられるベンゾジアゼピンは、アルコール依存そのものの治療には効果がない。さらに、アルコール依存のリハビリテーション治療期に用いられる嫌酒薬であるジスルフィラムは、アルコールと同時摂取すると有害な反応を引き起こすことから、必ず精神療法や行動療法とともに用いなければならないという不都合がある。米国で認可された治療薬であるオピオイド受容体拮抗薬のナルトレキソンの有効性も未だ確立されていない。

## 【0008】

薬物依存と密接な関係にある脳内報酬機能に関する重要な脳内部位は、腹側被蓋野(VTA)、側坐核(NAc)、青斑核、内側前脳束である。特に、腹側被蓋野から側坐核に投射するドーパミン作動性神経系が報酬系の機能発現に中心的な役割を果たしている(図1)。図1は中脳辺縁系のドーパミン作動性経路を示す図である。図1が示すように、脳内報酬機能は腹側被蓋野から放出されたドーパミンが側坐核に作用することにより発現する。コカイン

10

20

30

40

50

ンは側坐核の神経細胞のドーパミン輸送体を阻害することにより側坐核のドーパミンの濃度を上昇させ、またアヘン類、アンフェタミン、およびアルコールも側坐核のドーパミンの濃度を上昇させることが知られており、これら依存性薬物による薬物依存症誘発の作用機序として、側坐核におけるドーパミン濃度の上昇が指摘されている。

【0009】

このような観点から、ドーパミンおよび、ドーパミン作動性神経系と間接的に関係のあるセロトニン、GABA、グルタミン酸などの神経伝達物質、その受容体、該受容体と関連する細胞内情報伝達系等を標的にした薬物も検討されてきたが、未だ薬物依存症に有効な物質は開発されていない。

【0010】

一方、側坐核内にはドーパミンとは別の神経伝達物質であるアセチルコリンを産生するアセチルコリン産生細胞が存在する。本発明者らはこの側坐核アセチルコリン産生細胞を選択的に除去する方法を確立し、アセチルコリンがドーパミンに対して拮抗作用を有すること、側坐核アセチルコリン産生細胞を除去したマウスにおいては、側坐核のアセチルコリンの低下によってコカインに対する感受性が上昇することを示した(PNAS, 98: 13351-13354 (2001))。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記の状況に鑑み、従来の薬物依存症の治療薬開発の試みとは異なる観点から薬物依存症の有効な治療手段を開発することを目的として鋭意、研究を重ねてきた。そして、側坐核のアセチルコリン濃度と薬物依存症の発症との関係に着目して種々検討し、アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物が薬物依存症の治療に有用であることを見出した。

【0012】

即ち、本発明は、

(1) アセチルコリン(ACh)の作用を昂進または脱抑制する薬物を有効成分とする薬物依存症を治療するための医薬組成物、

(2) 薬物依存症がモルヒネ型、アルコール型、バルビツール酸型、アンフェタミン型、コカイン型、大麻型、有機溶剤型、カート型、幻覚剤型から選択される(1)記載の組成物、

(3) 薬物依存症がモルヒネまたはコカインに起因する、(2)記載の医薬組成物、

(4) 薬物依存症がアルコールに起因する、(2)記載の医薬組成物、

(5) 薬物がコリン作動性アルカロイド、コリンエステラーゼ(ChE)阻害剤またはコリンエステルである、(1)から(4)のいずれかに記載の医薬組成物、

(6) コリン作動性アルカロイドがピロカルピン、オキソトレモリンまたはセビメリンである、(5)記載の医薬組成物、

(7) コリンエステラーゼ阻害剤が、フィゾスチグミン、タクリンおよびタクリン類似体、ファシクリン、メトリホナート、ヘプチルーフィゾスチグミン、リバスティグミン、ノルピリドスチグミン、ノルネオスチグミン、フベラジン、アンベノニウム、エンドロフォニウム、イソフルロフェート、ネオスチグミン、ピリドスチグミン、ジスチグミン、ドネペジル、およびこれらの塩、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を維持している誘導体またはプロドラッグから選択される、(5)記載の医薬組成物、

(8) コリンエステラーゼ阻害剤がガラントミン、エピガラントミンおよびノルガラントミンならびにそれらの類似体、塩および誘導体から選択される、(5)記載の医薬組成物、

(9) 薬物が血液脳関門を通過しうるものである、(1)から(8)のいずれかに記載の医薬組成物、

(10) 薬物が実質的にアセチルコリンの作用を昂進および脱抑制する(1)から(9)のいずれかに記載の医薬組成物

10

20

30

40

50

(11) 薬学的に許容しうるアセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物の治療有効量を、薬物依存症の患者に投与することからなる、薬物依存症を治療する方法、

(12) アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物の、薬物依存症治療剤の製造における使用、および

(13) 候補薬物をアセチルコリンの作用を増強または脱抑制する能力に関し検索することからなる薬物依存症の治療剤のスクリーニング法などに関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明者等は、初めて脳の側坐核 (nucleus accumbens) のコリン作動神経系の昂進作用または脱抑制作用が、薬物依存の治療につながると発見した (後述の実験例参照)。

本発明の薬物依存症治療用組成物は、精神依存および/または身体依存を示す薬物依存症の治療に有効であり、また、逆耐性を示す対象に対しても優れた効果を示すことから、広範な薬物依存症に対して用いることができる。

【0014】

本発明の医薬組成物は、アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物を有効成分とし、これに通常の医薬用賦形剤または希釈剤を配合して調製される。

【0015】

本明細書中、「薬物依存(症) (drug dependence)」とは当該技術分野で通常用いられる意味を有し、薬物を使用しているものがある薬物に対して精神依存 (psychological dependence) および/または身体依存 (physical dependence) 状態にあることを意味する。精神依存とは、依存性薬物に対する強い欲求から、その使用を意思で制御できない状態を指し、身体依存とは、不眠、不安、痙攣発作、幻覚等の症状を示し、依存性薬物の中断または減少による退薬症候 (withdrawal syndrome) や離脱症状 (abstinence syndrome) を引き起こす状態を指す。

【0016】

薬物依存症は一般に、その原因物質によってモルヒネ型、アルコール型、バルビツール酸型、アンフェタミン型、コカイン型、大麻型、有機溶剤型、カート型、幻覚剤型に分類される。

【0017】

本発明の医薬組成物は原因となる依存性薬物の種類にかかわらず使用しうるが、依存性薬物がモルヒネ型、アルコール型、バルビツール酸型、コカイン型の薬物である場合に優れた効果が期待でき、特に依存性薬物がモルヒネ、コカイン、アルコールである場合により優れた効果が期待できる。

【0018】

また、「アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物」とはアセチルコリンの作用を昂進するか、脱抑制する作用を有する薬物であり、コリン作動薬と総称される。それらには、(1)コリン作動性アルカロイド、(2)抗コリンエステラーゼ薬 (コリンエステラーゼ阻害物質)、および(3)コリンエステル類 (例えばアセチルコリン、メタコリン、カルバコール、ベタネコール等のムスカリン受容体またはニコチン受容体に作用する薬物) が含まれ、本発明には、血液脳関門を通過し、神経伝達システム内で活性であり、かつ薬学的に許容されるものであれば、任意の薬物を用いることができる。中でもコリン作動性アルカロイドおよび抗コリンエステラーゼ薬が好ましく、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストおよびコリンエステラーゼ阻害物質が特に好ましい。本明細書中では、便宜上、これらの薬物を単に「コリン作動薬」と呼称することもある。

【0019】

コリン作動性アルカロイドは、ムスカリン、ピロカルピン、オキソトレモリンおよびセピメリンなどムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであって、当該技術分野で既知のものから適宜選択することができる。

【0020】

抗コリンエステラーゼ薬 (コリンエステラーゼ阻害物質) は、当該技術分野で既知のも

10

20

30

40

50

のから適宜選択することができ、フィゾスチグミン、タクリンおよびタクリン類似体、ファシクジン、メトリホナート、ヘプチルーフィゾスチグミン、リバスティグミン、ノルピリドスチグミン、ノルネオスチグミン、フペラジン、ドネペジル、アンベノニウム、エドロホニウム、イソフルロフェイト、ピリドスチグミン、ジスチグミンおよびこれらのいずれかの塩、誘導体およびプロドラッグ、並びにガラントミン、エピガラントミンおよびノルガラントミンおよびそれらの類似体、塩および誘導体を挙げることができ、なかでもドネペジル、ガラントミンおよびそれらの塩が好ましい。

**【0021】**

コリン作動薬は、血液脳関門の通過を可能にし、さらにはバイオアベイラビリティを向上させるために安定性や溶解性を改善させる目的で適当な塩、エステル、プロドラッグ等の誘導体に変換して用いることができる。 10

**【0022】**

コリンエステラーゼ阻害剤であるガラントミン類はヒガンバナ科 (Amaryllidaceae) のスノードロップの球根から単離される第三級アルカロイドである (Pharmac. Thr., 68: 13-128 (1995))。

**【0023】**

本発明には、天然起源、化学合成により得られるもの、ガラントミンの活性を維持している誘導体等など、任意の入手可能なガラントミンが有用である。そのような化合物、合成方法は既知であり、例えば特表2001-513497A (W099/07359)、特表2002-326959A (EP0879596, US5633238)等に記載されている。 20

**【0024】**

また、本発明には、ドネペジルまたはその活性を維持している誘導体等、入手可能なドネペジルが有用である。そのような化合物および合成方法は既知であり、例えば特開平11-171861A、特表2002-525264A等に記載されている。

**【0025】**

なお、本発明に使用するコリンエステラーゼ阻害剤がガラントミンに機能的に類似した誘導体である場合、それらは、下記記載のインビトロ法 (Thomsen and Kewitz, Life Sciences, 46: 1553-1558 (1990), Thomsen et al. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 26: 469-475 (1988)) による測定で、ブチルコリンエステラーゼよりもアセチルコリンエステラーゼに対して少なくとも10倍の選択性、好ましくは少なくとも20倍の選択性、より好ましくは少なくとも40倍の選択性、最も好ましくは少なくとも50倍の選択性を有している化合物として定義づけられる。 30

**【0026】**

例えば、ガラントミンヒドロプロミドは、ThomsenおよびKewitz (Life Sciences, 46: 1553-1558 (1990)) に記載された条件の下で試験すると、50倍の選択性を示す。従って、ある薬物が本発明における「アセチルコリンの作用を昂進、または脱抑制する」薬物であるか否かは、ガラントミンヒドロプロミドの例に示されるように、Thomsenらのインビトロ法で測定した時、ブチルコリンエステラーゼよりもアセチルコリンエステラーゼに対して少なくとも10倍の選択性、好ましくは少なくとも20倍の選択性、より好ましくは少なくとも40倍の選択性、最も好ましくは少なくとも50倍の選択性を有することを基準に決定される。 40

**【0027】**

また、本発明に使用するコリンエステラーゼ阻害剤がドネペジルまたはその誘導体である場合、そのようなコリンエステラーゼ阻害剤は、ブチルコリンエステラーゼよりもアセチルコリンエステラーゼに対して少なくとも10倍の選択性、好ましくは100倍の選択性、より好ましくは1000倍の選択性を有している。

**【0028】**

本発明の医薬組成物は、活性成分であるコリン作動薬 (ドネペジルまたはガラントミン、その誘導体またはそれらの塩等) に、必要に応じて1種以上の薬学的に許容しうる担体、賦形剤または希釈剤を配合し、常法に従い経口または非経口投与に適した適当な剤形に 50

製剤化される。投与経路（経口または静脈、筋肉または皮下経路の注射または埋め込み装置による髄腔内投与を含む）に応じて、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、溶液、トローチ、ペッサリー、クリーム、坐剤またはパッチなどの経皮配合物、たとえば、クリーム、軟膏もしくはローション等の任意の剤形をとることができる。これらは当業者既知の方法で調製される。

#### 【0029】

例えば、錠剤は、活性成分と補助成分と一緒に圧縮又は打錠成型して得られる。補助成分としては、製剤的に許容される賦形剤、例えば結合剤（例、トウモロコシでん粉）、充填剤（例、ラクトース、微結晶性セルロース）、崩壊剤（例、でん粉グリコール酸ナトリウム）又は滑沢剤（例、ステアリン酸マグネシウム）などが用いられる。錠剤は既知の方法でコーティングされてもよい。シロップ剤、液剤、懸濁剤などの液体製剤の場合、例えば、懸濁化剤（例、メチルセルロース）、乳化剤（例、レシチン）、保存剤などを用いる。注射用製剤の場合、溶液、懸濁液、油性もしくは水性乳濁液またはその様なもののいずれでもよく、これらは懸濁安定剤又は分散剤などを含有していてもよい。吸入剤として使用する場合は吸入器に適応可能な液剤として用いる。

10

#### 【0030】

本発明の医薬組成物は、保存、運搬の利用者の便宜、コンプライアンス等を考慮して経口および経皮経路が好ましい。

#### 【0031】

コリン作動薬の投与量は、選択された薬物の種類、投与形態、患者の症状、年齢、体重、性別、あるいは併用される薬物（あるとすれば）などにより異なり、最終的には医師の判断に委ねられるが、経口投与の場合、1日2～100mg、好ましくは1日5～70mg、より好ましくは10～30mgの範囲とすることができる。非経口投与の場合、1日0.1～100mg、好ましくは1日5～100mg、より好ましくは1日10～50mg、さらに好ましくは1日5～30mgの範囲とすることができる。より低い用量から始めることがしばしば好ましい。ガラントミンなどの経皮投与の用量は経口投与とほぼ同等である。

20

#### 【0032】

本発明の組成物には1またはそれ以上のコリン作動薬を含有させることができ、さらに、必要に応じて他の薬物を併用してもよい。そのような薬物として、ドーパミン受容体拮抗薬、例えばハロペリドールを挙げることができる。併用する薬物は、本発明におけるコリン作動薬と単一製剤として、もしくは分けて製剤化され、本発明の医薬組成物と同時に、もしくは別に投与される。

30

#### 【0033】

本発明に従って依存症患者を治療するには、上記のようにして得られる医薬組成物を、治療を必要とする患者に適当な経路および方法で投与する。そのような方法は当業者に既知である。

以下に実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、これらは単なる例示であり本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0034】

実験例 1 側坐核のコリン作動性細胞を破壊したマウスにおけるモルヒネ精神依存に対する感受性試験

40

コリン作動性細胞除去マウス (IT-tg) の作成

側坐核におけるアセチルコリン濃度低下の依存性薬物（薬物依存を引き起こす薬物）に対する感受性への影響を検証するため、側坐核のアセチルコリン産生細胞（コリン作動性細胞）を破壊したコリン作動性細胞除去マウス (IT-tg) を作成した。側坐核のコリン作動性細胞を選択的に破壊するために、トランスジェニックマウスとイムノトキシンとして Anti-Tac(Fv)-PE38を用いるイムノトキシンによる細胞標的法 (IMCT) を用いた (小林ら、PNAS, 92: 1132-1136(1995); 渡辺ら、Cell, 95: 17-27(1998))。Anti-Tac(Fv)-PE38は、ヒト・インターロイキン2型受容体サブユニット (hIL-2R) に対するモノクローナル抗体の可変領域と緑膿菌外毒素をもとに開発された組み換え融合蛋白であり、

50

Chaudharyらの方法(Nature, 339: 394-397(1989))によって、大腸菌BL21より精製できる。Anti-Tac(Fv)-PE38はhIL-2Rを発現する細胞を特異的に認識するイムノトキシンであり、蛋白合成を阻害することで、hIL-2Rを発現する細胞を選択的に脱落させる。そこで、側坐核のコリン作動性細胞に特異的にhIL-2Rを発現するトランスジェニックマウスにAnti-Tac(Fv)-PE38を局所投与することによって、側坐核のコリン作動性細胞を選択的に破壊する方法を開発した。側坐核では、コリン作動性細胞にのみ代謝型グルタミン酸受容体2型(mGluR2)が発現する。そこで本発明者等らは、渡辺ら(Cell, 95: 17-27 (1998))に記載の方法に従い、マウスmGluR2遺伝子上流域18.3キロ塩基対をプロモーターとしてhIL-2Rと緑色蛍光蛋白(GFP)の融合蛋白(hIL-2R/GFP)を発現させたトランスジェニックマウスを作成した。野生型およびトランスジェニックマウスはC57B6/J系を用いた。9-13週齢のトランスジェニックマウスの側坐核に、頭骸骨の大泉門より前方1.5mm、側方0.8mm、深さ3.5mmにガラス針の先端を置き、0.5マイクロリットルのリン酸バッファ生理食塩水に10ngのイムノトキシンを含む溶液を、3分間かけて投与した(疋田らPNAS, 98: 13351-13354 (2001))。イムノトキシンを投与し2週間後に、脳のアセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼに対する抗体による免疫組織化学法において検証すると、トランスジェニックマウスの側坐核において70%以上のコリン作動性細胞の減少が認められた。イムノトキシンによる細胞破壊はアセチルコリン産生細胞に特異的であり、側坐核においてドーパミン神経終末、GABA作動性投射細胞、パルプアルブミン陽性細胞などに数の変化はみられなかった。また、ドーパミンとその代謝物である、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC)とホモバニリン酸(HVA)の濃度は変化せずに、アセチルコリン濃度を正常値の23%にすることができた(金子ら、Science, 289, 633-637, (2000))。上記のイムノトキシンで処置したトランスジェニックマウスをコリン作動性細胞破壊マウス(IT-tg)として実験に用いた。

10

20

#### 【0035】

イムノトキシンそのものは野生型マウスに投与してもアセチルコリン産生細胞に影響を与えないとされており(疋田らPNAS, 98: 13351-13354 (2001))、野生型マウスとトランスジェニックマウスの側坐核の両側にイムノトキシンを投与した。

#### 【0036】

#### A. 場所嗜好試験

コリン作動性細胞破壊マウス(IT-tg)と野生型マウス(IT-wt)を用い、その行動を調べることによって、側坐核アセチルコリン濃度の減少が依存性薬物に対する感受性に与える影響を検証した。

30

#### 【0037】

Anti-Tac(Fv)-PE38(IT)をマウスの側坐核に投与して2週間後に、IT-tgとIT-wtの両方のマウスに対して、モルヒネによる条件付け場所嗜好試験(CPP)を行った。条件付け場所嗜好試験は、依存性薬物を投与すると実験動物は投与された環境と結びつけて、その環境に長く滞在するようになる(場所嗜好性を獲得する)ことを利用して、依存性薬物に対する精神依存の程度を定量化する方法であり、例えばケルツらの方法(Nature, 401: 272-276, (1999))に従い、実施できる。条件付け場所嗜好試験には、中央に小さな部屋を配し、両側に壁の色と床の形状が異なる大きな部屋を連結させた、3つの部屋で構成される装置を用いた。条件付け前(0日目)に3つの部屋を30分間、マウスを自由に行き来させた。次の日より、3日間、以下の条件付けを行った。3つの部屋をつなぐ2つの扉を閉めて3つの部屋を区切った後に、まず生理食塩水をマウスの腹腔内に投与後すぐに、大きな部屋の1つに入れ、20分間、放置した。この4時間後に、1mg/kgないしは5mg/kgの塩酸モルヒネを腹腔内投与し、すぐに別の側の大きな部屋に入れ、20分間、放置した。この3日間の条件付けが終了した翌日に、中央の小さな部屋にマウスを入れ、扉を開放して、3つの部屋を30分間自由に行き来させた。マウスが両側の大きな部屋に滞在した時間(秒)を赤外線装置によって測定した。IT-tgマウスとIT-wtマウスのモルヒネに対する精神依存を、モルヒネを用いて条件付けした部屋の滞在時間から、生理食塩水を用いて条件付けした部屋の滞在時間を減算した値として定量化した(IT-tg;8-10例、IT-wt;7-12例)。

40

50

以降の行動実験の結果は図に示すように棒グラフあるいは折れ線グラフで示した。各群の平均値を、エラーバーで表した標準誤差とともに示した。統計分析は分散分析法によった。多重比較検定はScheffe法によった。

#### 【0038】

モルヒネ側、生理食塩水側のそれぞれに滞在した時間(秒)の差(モルヒネ側 - 生理食塩水側)を求め、縦軸に記載した。IT-tgとIT-wtは条件付けする前には共に場所嗜好性は示さなかった(図2 a、条件付前)。図2 aから、1 mg/kgのモルヒネで3日間条件付けした場合、IT-wtは場所嗜好性を示さなかったのに対して、IT-tgはこの量のモルヒネで条件付けした部屋に対して有意な場所嗜好性を示した(図2 a、条件付後、\* $P < 0.05$ の有意差)ことが判る。一方、5 mg/kgのモルヒネで3日間条件付けした場合はIT-wt、IT-tgともに場所嗜好性を示した。したがって、コリン作動性細胞を破壊し、側坐核のアセチルコリン濃度の低下させることにより、場所嗜好性試験において、モルヒネ依存の感受性が上昇することが明らかになった。

10

#### 【0039】

同様の実験において、モルヒネに代えてコカインを用いた場合、コカイン5mg/kgあるいは10mg/kgで3日間条件付けしたとき、IT-tgはIT-wtよりもコカインで条件付けした部屋に強い場所嗜好性を示した( $P < 0.01$ の有意差、疋田らPNAS, 98: 13351-13354 (2001))。

上記の結果は、側坐核のアセチルコリン濃度低下が、モルヒネ、コカイン等の依存性薬物への感受性を上昇させることを示している。

#### 【0040】

20

### B. 場所嫌悪試験

モルヒネ依存の状態から断薬を行うと、離脱症状と共に不快感を生じる。モルヒネの負の報酬効果、離脱症状に対する側坐核のアセチルコリンの濃度低下の影響を条件付け場所嫌悪(CPA)試験を用いて検証した。条件付け場所嫌悪試験は、例えばムルトラらの方法(Nature, 405: 180-183, (2000))に従い、実施できる。モルヒネを毎日2回、4日間(1-4日目)にわたって、10mg/kgより、10mg/kgずつ段階的に増量して40mg/kgまで腹腔内投与することによりマウスをモルヒネ依存の状態とした。場所条件付けは第5日目に、上記Aと同じ装置を用いて施行した。50mg/kgのモルヒネを投与した1時間後に生理食塩水を投与し、すぐに大きな部屋の1つに入れ、20分間、放置した。この4時間後に、50mg/kgのモルヒネを投与し、さらに1時間後にオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソン1mg/kgを腹腔内投与し、すぐに別の側の大きな部屋に入れ、20分間、放置した。この場所条件付けの翌日に中央の小さな部屋にマウスを入れ、扉を開放して、3つの部屋を30分間自由に動きさせた。マウスが両側の大きな部屋に滞在した時間(秒)を赤外線装置によって測定した。IT-tgマウスと、IT-wtマウスのモルヒネ断薬による負の報酬効果を、ナロキソンを用いて条件付けした部屋の滞在時間から、生理食塩水を用いて条件付けした部屋の滞在時間を減算した値(ナロキソン側 - 生理食塩水側)として定量化した(各8例)。条件付けする前にはIT-tgとIT-wtは共に場所嗜好性は示さなかった(図2 b、条件付前)。条件付け後ではIT-tgとIT-wtは共にナロキソンによる断薬を用いて条件付けした部屋に対する場所嫌悪を示したが、IT-tgはより強い場所嫌悪を示した(図2 b、条件付後、\* $P < 0.05$ の有意差)。したがって、側坐核のアセチルコリン濃度低下により、モルヒネ断薬による負の報酬効果が増強されることが明らかとなった。上記の結果は、アセチルコリン濃度の低下を抑制する薬剤がモルヒネ断薬による不快感の軽減に有用であることを示唆している。

30

40

#### 【0041】

### 実験例2 コリン作動性細胞を破壊したマウスにおけるモルヒネ離脱症状

モルヒネの連続投与により身体依存を生じる。モルヒネ断薬による離脱症状は依存症治療の障壁になっている。身体依存に対する側坐核のアセチルコリン濃度の低下の影響を、ナロキソンを用いて、モルヒネ断薬による離脱症状の程度を観察することによって検証した。実験例1Bと同様にマウスのモルヒネ依存の状態を作成した。第5日目に、50mg/kgのモルヒネを投与した1時間後に、生理食塩水あるいはナロキソン1mg/kgを投与して20分間、マウスのモルヒネ離脱症状である跳躍の回数を数えた(各8例)。この離脱症状は、ナ

50

ロキソンを投与したIT-tgマウスとIT-wtマウス(対照)の両方で観察された。しかし、IT-tgマウスはIT-wtマウスよりも有意に跳躍回数が多かった(図3、\* $P < 0.05$ の有意差)。したがって、側坐核のアセチルコリン濃度低下により、モルヒネ断薬による離脱症状が増強されることが明らかになった。上記の結果は、側坐核のアセチルコリンの濃度低下を抑制する薬剤がモルヒネ断薬による離脱症状の軽減に有用であることを示唆するものである。

【0042】

**実施例1** アセチルコリン濃度低下の抑制がモルヒネ精神依存に及ぼす影響

**A. 野生型マウスを用いる場所嗜好試験**

実験例1Aにおいて、側坐核におけるアセチルコリン濃度低下がモルヒネへの感受性を増強することを示した。この実施例では、コリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジルを用いてアセチルコリン濃度低下の抑制によるモルヒネ依存の治療の可能性を検証した。9 - 13週齢の野生型マウスに対して、実験例1Aと同様にして、1日5mg/kgのモルヒネ投与により3日間の場所条件付けを行った。この条件付けのモルヒネ投与の20分前に生理食塩水あるいは1mg/kgないし3mg/kgの塩酸ドネペジルを腹腔内投与した(各7-11例)。どの濃度のドネペジルであってもモルヒネによる場所嗜好性の程度を有意に軽減できた(図4a、\*\* $P < 0.01$ の有意差)。この結果、ドネペジルによるアセチルコリン濃度低下の抑制が、モルヒネ精神依存を軽減しうることが明らかになった。これは、アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬剤がモルヒネ依存の治療に有効であることを証明するものである。

10

【0043】

**B. コリン作動性細胞破壊マウスを用いる場所嗜好試験**

IT-tgマウスとIT-wtマウス(対照)において、アセチルコリン濃度低下の抑制によるモルヒネ精神依存への影響を検証した。5mg/kgのモルヒネ投与により3日間の場所条件付けを行い、この条件付けのモルヒネ投与の20分前に生理食塩水あるいは1mg/kgの塩酸ドネペジルを投与した(各7-9例)。IT-wtでは、ドネペジルによってモルヒネによる場所嗜好性が有意に減少した(図4b、\*\* $P < 0.01$ の有意差)。それに対して、IT-tgでは、ドネペジルによってモルヒネによる場所嗜好性を抑えることができなかった(図4b)。上記の結果から、ドネペジルによるモルヒネ精神依存の軽減が、側坐核のコリン作動性細胞が産生するアセチルコリンの分解を抑制することによるものと解釈される。すなわち、側坐核のコリン作動性細胞が産生するアセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬物が、最もモルヒネの場所嗜好性作用の軽減を示した。

20

30

【0044】

**実施例2** アセチルコリン濃度低下の抑制がコカイン精神依存に及ぼす影響

**A. コカイン依存に対するドネペジルの予防効果**

側坐核アセチルコリン産生細胞の除去による側坐核のアセチルコリン濃度の低下によってコカインに対する感受性が上昇することは明らかにされている(Hikida et al., PNAS, 98: 13351-13354 (2001))。ここでは、アセチルコリン濃度低下の抑制による薬物依存の治療の可能性がコカイン依存においても適応できるかを検証する。9 - 13週齢の野生型マウスに対して、実施例1Aと同様にして、10mg/kgのコカインにより3日間の場所条件付けを行った。この条件付けのモルヒネ投与の20分前に生理食塩水あるいは1mg/kgないし3mg/kgの塩酸ドネペジルを腹腔内投与した(各7-11例)。どの濃度のドネペジルであってもコカインによる場所嗜好性の程度を軽減できた(図5a、\*\* $P < 0.01$ の有意差)。この結果は、ドネペジルによる側坐核におけるアセチルコリン濃度低下の抑制がコカイン精神依存を軽減しうることを示している。即ち、アセチルコリンの作用の昂進または脱抑制する薬剤がコカイン精神依存の治療に有効であることが示された。

40

【0045】

**B. コカイン連続投与による逆耐性に対するドネペジルの予防効果**

連日コカインを投与すると、逆耐性現象と呼ばれる行動量の増大がみられる(Hikida et al., PNAS, 98: 13351-13354(2001)、Koob, Neuron, 16, 983-996 (1996))。逆耐性現象は薬物依存の発症に重要な機構と考えられている。IT-tgマウスでは、IT-wtマウスと

50

比べて、連日のコカイン投与による行動量がより増大した(Hikida et al., PNAS, 98: 13351-13354 (2001))。即ち、アセチルコリンの濃度低下により、逆耐性現象が大きくなることが示された。ここでは、アセチルコリン濃度の低下の抑制によって、逆耐性現象を防ぐことができるかどうかを検証した。

#### 【0046】

9 - 13週齢の野生型マウスを3日間、行動量測定用のチャンバーに入れ馴れさせた。その後、毎日1回、10mg/kgのコカインを腹腔内投与し、すぐにチャンバーに入れ10分間の行動量(移動量)を赤外線装置を用いて測定し、行動距離に換算した。コカイン投与の10分前に、生理食塩水あるいは1mg/kgのドネペジルを投与した(各10例)。生理食塩水を前処置した群では、行動量の増大が観察されたのに対して、ドネペジルを前処置した群では、行動量の上昇が全くみられなかった(図5b)。反復測定分散分析法による統計処理で、前処置により $F=20.7$ ,  $P<0.001$ の有意差を生じた。コカイン投与日それぞれにおいても、第1日目は $P<0.05$ の、第2 - 5日目は $P<0.01$ の有意差を生じた。したがって、ドネペジルの前処置により、コカインによる行動量の増大および逆耐性の形成を抑えることができた。このことは、アセチルコリン濃度低下の抑制によって、コカイン依存の発症を抑制できることを示しており、アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬剤が薬物依存の予防効果を持つことを証明するものである。

10

#### 【0047】

#### C. コカイン依存に対するドネペジルおよびガラントミンの治療効果

アセチルコリン濃度低下の抑制によるコカイン依存の治療の可能性を検証した。9 - 13週齢の野生型マウスに5日間にわたって、毎日1回、10mg/kgのコカインが腹腔内投与された。マウスに行動量の増大がみられ、コカイン依存の状態のモデルとなった。第6日目に、生理食塩水あるいは1mg/kgのドネペジルあるいは1mg/kgのガラントミンを前処置し、その10分後に10mg/kgのコカインを腹腔内投与した後、10分間にわたり行動量を測定した(各5-12例)。ドネペジルあるいは、別種類のアセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるガラントミンを前処置すると、第6日目にみられるコカインによる行動量の増大を有意に抑制した(図5c、\*\*\* $P<0.001$ 、\*\* $P<0.01$ の有意差)。この結果、すでにコカイン依存の状態になっていても、アセチルコリン濃度低下の抑制によりコカインによる異常行動を減少させることが示された。このことは、アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬剤がコカイン依存の乱用期においても、治療効果を持つことを示している。

20

30

#### 【0048】

#### D. 側坐核におけるコリン作動性細胞より産生されるアセチルコリンの昂進によるコカイン依存に対するドネペジルによる治療効果

ここでは、側坐核におけるコリン作動性細胞より産生されるアセチルコリンのコカイン異常行動に対する影響を検証した。Cと同様に、IT-wtマウスおよびIT-tgマウスにおいて、5日間にわたって、毎日1回、10mg/kgのコカインを腹腔内投与した。第6日目に、生理食塩水あるいは1mg/kgのドネペジルを前処置し、その10分後に10mg/kgのコカインを腹腔内投与しチャンバーに10分間入れ行動量を測定した(各7-11例)。IT-wtではドネペジルの前処置がコカイン異常行動を有意に減少させた(図5d、\* $P<0.05$ の有意差)。それに対して、IT-tgではドネペジルの前処置の影響を認めなかった。この結果は、コリンエステラーゼ阻害剤の作用が、コリン作動性細胞が産生するアセチルコリンを標的として、側坐核におけるアセチルコリンの作用を昂進することにより、コカイン異常行動が減少されたことを証明している。

40

#### 【0049】

#### E. コカインによる異常行動の再発に対するドネペジルの抑制効果

連日のコカイン投与により引き起こされた逆耐性現象は、その後、長期間断薬しても存続する。このことは、薬物依存者が長期間断薬しても、再び薬物摂取を行ってしまう再発(relapse)の機構として重要視されている。そこで、ドネペジルのコカイン依存再発に対する予防効果を後述のとおり検証した。9 - 13週齢の野生型マウスに6日間にわたって、毎日1回、10mg/kgのコカインを腹腔内投与し、コカイン依存を確立した。その後、5

50

日間(第7-11日)、コカインの投与を中止し、ホームケージにて飼育続けた。第12日目に生理食塩水あるいは1mg/kgのドネベジルを前処置し、その10分後に10mg/kgのコカインを腹腔内投与しチャンパーに10分間入れ行動量を測定した(各6例)。生理食塩水を前処置した群では、第12日目のコカイン投与により第1日目よりも強い異常行動がみられ、コカインの長期断薬後も逆耐性が維持されていることが分かった(図5e)。それに対して、ドネベジルを前処置した群では、第12日目のコカイン投与の後、異常行動がみられなかった(図5e、生理食塩水を前処置した群と比較し、\*\*\* $P < 0.001$ の有意差)。この結果は、アセチルコリン濃度低下の抑制によるコカイン異常行動の再発の抑制予防効果を示している。このことは、薬物依存のリハビリテーション期において、アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する薬剤が再発の予防に有用であることを示している。

10

【0050】

### 実施例3 アセチルコリン受容体刺激によるコカイン精神依存の軽減

ここでは、アセチルコリン受容体刺激によるコカイン精神依存への影響を検証した。It-tgマウスにおいて、外来性のアセチルコリンアゴニストのコカイン依存に対する予防効果を検証した。ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるピロカルピンを使用し、ピロカルピン投与前には、ピロカルピンの末梢組織への作用を防ぐために、メチルアトロピン(2mg/kg)をIT-tgマウスに投与した。その後、5mg/kgのコカインにより3日間の場所条件付けを行った。場所嗜好性試験においては、コカイン投与の20分前に生理食塩水またはピロカルピン(100mg/kg)が投与された(各6-13例)。生理食塩水で全処理されたIT-tgでは、5mg/kgのコカインに対して強い場所嗜好性を示した(図6)。それに対して、ピロカルピンの前処置によってコカインによる場所嗜好性を有意に抑えることができた(図6、生理食塩水の前処置群に対して\*\* $P < 0.01$ の有意差)。コリンエステラーゼ阻害剤と同様に、側坐核アセチルコリン濃度低下によって、コカイン精神依存に対する感受性が増加している状態においても、アセチルコリン受容体アゴニストによってコカイン精神依存が軽減できることが示された。したがって、コリン作動性細胞の減少によって、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の効果が乏しい場合(実施例1Bを参照)においても、アセチルコリン受容体を刺激する薬剤によってアセチルコリンの機能を補充・亢進させることが薬物依存症治療に有効であることが明らかになった。

20

【0051】

### 実施例4 アセチルコリン濃度低下の抑制によるアルコール精神依存の軽減効果

上述の実施例は、アセチルコリン濃度低下の抑制がコカインまたはモルヒネ依存に対し効果的であることを示している。ここでは、アセチルコリン濃度低下を抑制する医薬組成物のアルコール依存に対する治療効果を検証した。It-wtマウス(9-13週齢)を用い、実施例1と同様に、3日間にわたり20%(V/V)のエタノール(10mg/kg)が腹腔内投与された。場所嗜好性試験においては、エタノール投与の20分前に生理食塩水もしくはドネベジル(1mg/kg)が投与された(各7例)。結果としてドネベジルによる前処置はエタノールの条件付けによる場所嗜好性を有意に軽減し(図7、生理食塩水で前処置した群と比べ\* $P < 0.05$ の有意差)、ドネベジルによるアセチルコリンの濃度低下の抑制がアルコールの精神依存を軽減できることが明らかになった。したがって、アセチルコリンの作用を昂進または脱抑制する医薬組成物がアルコール依存の治療に有用であることを示した。

30

40

【産業上の利用可能性】

【0052】

本発明によれば、従来、有効な治療法がなかった薬物依存症の治療手段が提供される。本発明の医薬組成物は精神依存のみならず身体依存を伴う薬物依存症に有用であり、薬物依存に起因する様々な社会問題の解決に貢献しうる。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】図1は中脳辺縁系の側坐核を示す模式図である。側坐核は、薬物依存の原因となる重要な神経基質である。側坐核の神経活性は腹側被蓋野から分泌されたドーパミンだけではなく、側坐核のコリン作動性細胞より放出されたアセチルコリンによって制御される

50

。

## 【0054】

【図2】図2は、実験例1に記載の、側坐核におけるコリン作動性細胞を除去することによりおこるアセチルコリン濃度低下が依存性薬物への感受性に及ぼす影響を調べるための試験の結果を示している。図中、“IT”は、イムノトキシンを示し、“IT-tg”はコリン作動性神経細胞除去マウス、“IT-wt”はコントロールとして用いられたITが投与された野生型マウスである。IT-tgマウスは、イムノトキシン細胞標的法(IMCT)に従いイムノトキシンを導入することにより選択的に側坐核のコリン作動性神経細胞を除去したトランスジェニックマウスである。図2aは場所嗜好(CPP)試験の結果を示しており、該試験はマウスにモルヒネまたは生理食塩水を投与した後、一定の異なる部屋(場所)へ入れ、モルヒネの報酬効果と(モルヒネに関連づけられた)部屋の環境的特徴の関係を連合学習するという操作によりモルヒネによる場所条件付けを行い、条件付け終了後の自由移動期間中に動物がそれぞれの場所に滞在した時間(秒)を測定することにより行った。場所嗜好性はモルヒネ側に滞在した時間と生理食塩水側に滞在した時間との差(秒)で表される(縦軸)。図2bは場所嫌悪(CPA)試験の結果を示しており、マウスをモルヒネ依存性にした後、モルヒネ投与後にオピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンまたは生理食塩水を投与することにより条件付けを行いモルヒネの禁断症状を発生させた。場所嫌悪性もまた自由移動期間中に動物がナロキソン側に滞在した時間と生理食塩水側に滞在した時間との差(秒)で表される(縦軸)。

10

## 【0055】

【図3】図3は、実験例2に記載の、コリン作動性細胞除去マウスと野生型マウスにおいて、アセチルコリン濃度の低下が依存性薬物への身体依存に及ぼす影響を調べるための試験の結果を示している。図2の場合と同様に、コリン作動性細胞除去マウス(IT-tg)と野生型マウス(IT-wt)をモルヒネに対して身体依存性にし、これらのマウスに、モルヒネ投与後にナロキソンまたは生理食塩水を投与し、離脱症状(跳躍)の発現回数を観察した。

20

## 【0056】

【図4】図4は、実施例1に記載の、モルヒネ精神依存に対するコリンエステラゼ阻害薬の効果を調べるための場所嗜好性試験の結果を示している。図4aは、野生型マウスに対してモルヒネ投与前にドネペジルを投与した場合の場所嗜好性への影響を示す図である。図4bはコリン作動性細胞除去マウス(IT-tg)と野生型マウス(IT-wt)に対してモルヒネ投与前にドネペジルまたは生理食塩水を投与した場合の場所嗜好性への影響を示す図である。

30

## 【0057】

【図5】図5は、実施例2に記載の、コカインを用いて行った試験の結果を示している。図5aは上記図4aと同様、野生型マウスにおけるコカイン依存に対するドネペジルの効果を場所嗜好性で表した図である。図5bはコカイン連続投与による逆耐性に対するドネペジルの前処理効果を行動量の変化で表した図である。移動距離( $\text{cm} \times 10^3$ )は、行動量の変化の指標として測定された。図5cはコカイン依存性野生型マウスに対するドネペジルおよびガラントミンの効果を行動量で表した図である。図5dはコリン作動性細胞除去マウス(IT-tg)と野生型マウス(IT-wt)におけるコカイン連続投与による行動量の増大を示す図である。図5eはコカインに対して逆耐性を有する野生型マウスを長期間断薬した後、コカインを再投与した場合の異常行動に対するドネペジルの効果を示す図である。

40

## 【0058】

【図6】図6は、実施例3に記載の、コリン作動性細胞除去マウス(IT-tg)におけるコカイン精神依存に対する、ムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストであるピロカルピンの効果を調べるための場所嗜好性試験の結果を示す図である。

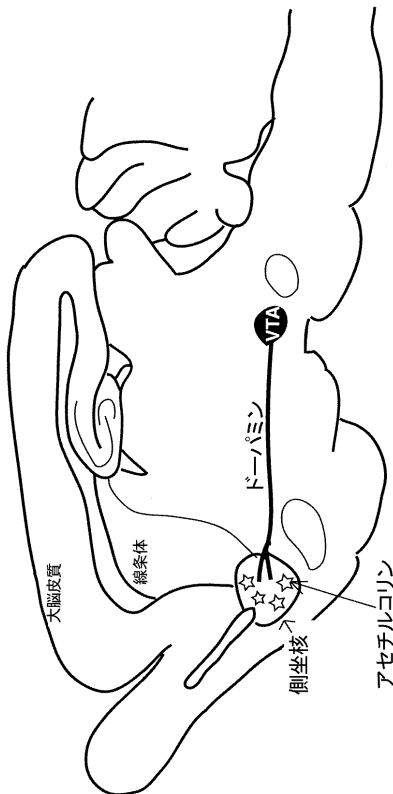
## 【0059】

【図7】図7は、実施例4に記載の野生型マウスにおけるアルコール依存に対するドネペジルの効果を調べるための場所嗜好性試験の結果を示す図である。

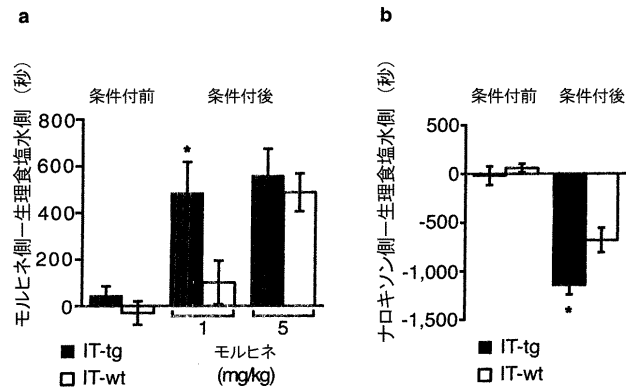
50

【 図 1 】

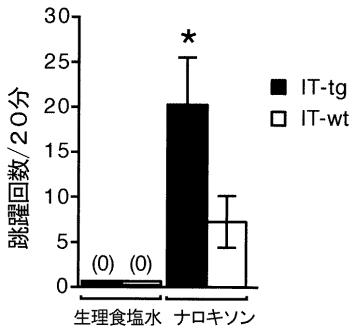
中脳辺縁系のドーパミン作動性神経系



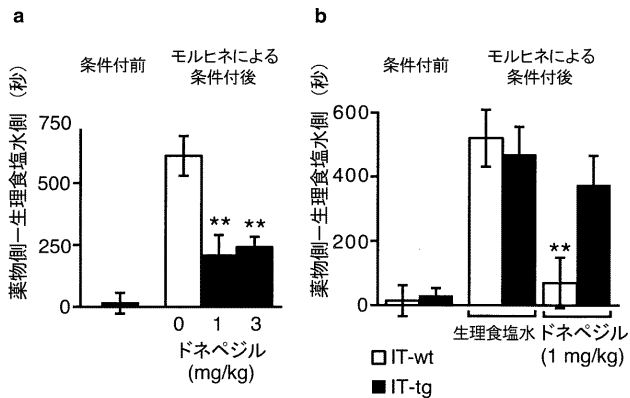
【 図 2 】



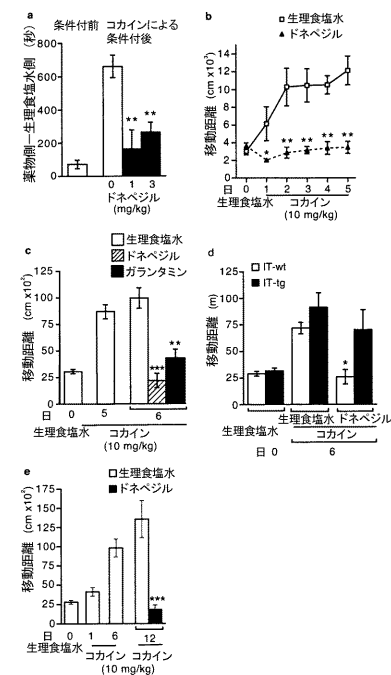
【 図 3 】



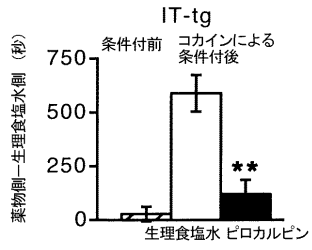
【 図 4 】



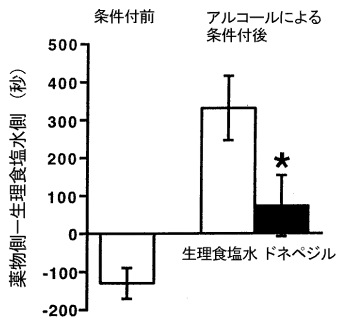
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONALSEARCHREPORT		International application No. PCT/JP 2004/002301	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
Int.Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 31/4178, 31/445, 31/55, A61P25/30, 25/32, 25/36			
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 <sup>7</sup> A61K45/00, 31/4178, 31/445, 31/55, A61P25/30, 25/32, 25/36			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Japanese Utility Model Gazette 1922-1996, Japanese Publication of Unexamined Utility Model Applications 1971-2004, Japanese Registered Utility Model Gazette 1994-2004, Japanese Gazette Containing the Utility Model 1996-2004			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)			
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WONG, Chak-Lam et al., Further studies on the role of cholinergic mechanisms in the development of increased naloxone potency in mice, European Journal of Pharmacology, 1979, Vol.56, No.1-2, pp.115-21 Abstract page 120, the right column, line 3 - line 33	1-6, 9, 10, 12, 13	
X	Chem. abstr., 1985, Vol.102 (Columbus, OH, USA), the abstract No.106222, KRUSZEWSKA, Alicja et al., The role of acetylcholine in the development of physical morphine dependence in rats, Acta Polonicae Pharmaceutica, 1984, Vol.41, NO.3, pp.381-4 (Pol)	1-6, 9, 10, 12, 13	
<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		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search 13.05.2004		Date of mailing of the international search report 07.6.2004	
Name and mailing address of the ISA/IP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer KOICHI SESHITA 4C 9284 Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3452	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOROWSKI, T. B. et al., The effects of tacrine on cocaine self-administration in rats: a potential pharmacotherapy for cocaine addiction . . . Society for Neuroscience Abstracts, 2000, Vol. 26, No. 1-2, Abstract No.-293.18.	1-5,7,9,10,12,13
X	WO 02/085370 A1 (HF ARZNEIMITTELFORSCHUNG GMBH) 2002.10.31 Zusammenfassung Anspruche page 4, line 14 - line 22 & EP 1383507 A1 & DE 10119862 A1 & NO 2003004740 A	1-5,8-10,12,13
X	WO 96/29332 A1 (LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME GMBH) 1996.09.26 Zusammenfassung Patentansprüche page 1, line 9 - line 28 & DE 19509663 A1 & IL 117371 A1 & CA 2215351 A & AU 9651088 A1 & AU 707203 B2 & EP 815112 A1 & EP 815112 B1 & CN 1178533 A & CN 1088460 B & JP 11-505519 A & EP 1095656 A2 & EP 1095656 A3 & EP 1095656 B1 & AT 203993 E & ES 2162035 T3 & PT 815112 T & PL 184238 B1 & AT 247473 E & SK 283861 B6 & ZA 9602140 A & NO 9704119 A & US 5877172 A & US 6194404 B1 & US 2001/001100 A1 & US 6335328 B2 & US 2002/028802 A1 & US 6573376 B2 & US 2003/012831 A1 & US 6617452 B2	1-5,8-10,12,13
X	WO 94/16708 A1 (LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME GMBH AND CO. KG) 1994.08.04 Zusammenfassung PATENTANSPRUCHE & DE 4301782 C1 & IL 108234 A1 & CA 2153570 A & AU 9458818 A1 & AU 685075 B2 & EP 680326 A1 & EP 680326 B1 & HU 72670 A2 & JP 8-505633 A & JP 3-511074 B & AT 146677 E & ES 2098920 T3 & PL 174812 B1 & CZ 284605 B6 & SK 282247 B6 & ZA 9400413 A & HR 940029 B1 & NO 9502906 A & US 5643905 A	1-5,8-10,12,13

## INTERNATIONALSEARCHREPORT

International application No.

PCT/JP2004/002301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAJEWSKA, M. D. et al., DHEAS: a maverick agent in cocaine dependence. , Society for Neuroscience Abstracts, 2000, Vol. 26, No. 1-2, Abstract No.-681.3.	1-3, 9, 10, 12, 13
X	WO 95/29909 A1 (PFIZER INC.) 1995.11.09 Abstract Claims & CA 2188427 AA & AU 9518845 A1 & EP 757685 A1 & JP 9-506371 A & JP 3004728 B & JP 11-193273 A & JP 3281320 B & JP 11-209374 A & JP 3158103 B & JP 11-217371 A & JP 3432753 B & FI 9604340 A & US 5854232 A	1-4, 9, 10, 12, 13
PX	HIKIDA, Takatoshi et al., Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, Vol.100, No.10, pp.6169-6173	1-10, 12, 13
A	WO 00/09483 A2 (FINETECH LTD.) 2000.02.24 & AU 9951910 A1 & EP 1129073 A2 & JP 2002-525264 A & US 6492522 B1	1-5, 7, 9, 10, 12, 13
A	JP 11-171861 A2 (EISAI CO., LTD.) 1999.06.29 (No family)	1-5, 7, 9, 10, 12, 13
A	WO 99/07359 A1 (SHIRE INTERNATIONAL LICENSING B.V.) 1999.02.18 & CA 2300405 A & AU 9887367 A1 & ZA 9807140 A & EP 1001761 A1 & JP 2001-513496 A	1-5, 8-10, 12, 13
A	WO 99/07363 A1 (MEDOSAN RICERCA S.R.L.) 1999.02.18 & EP 1024807 A1 & EP 1024807 B1 & JP 2001-513497 A & EP 1310250 A1 & AT 237326 E & PT 1024807 T & ES 2195162 T3	1-5, 8-10, 12, 13

## INTERNATIONALSEARCHREPORT

 International application No.  
 PCT/JP2004/002301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 515301 A2 (Snorrason, Ernir) 1992.11.25 & EP 515301 A3 & CA 2062094 A & CA 2062094 C & CA 2103022 A & EP 515302 A1 & WO 92/20327 A1 & WO 92/20328 A2 & WO 92/20328 A3 & AU 9218863 A1 & AU 658424 B2 & ZA 9203505 A & ZA 9203506 A & EP 584185 A1 & EP 584185 B1 & EP 584285 A1 & EP 584285 B1 & US 5312817 A & JP 6-507617 A & JP 3291730 B & JP 6-507621 A & AU 663086 B2 & AU 9218736 A1 & EP 879596 A2 & EP 879596 A3 & AT 183084 E & ES 2134215 T3 & JP 2002-326959 A & NO 9304103 A & NO 9304104 A & NO 9803939 A & GR 3031559 T3	1-5, 8-10, 12, 13

## INTERNATIONALSEARCHREPORT

International application No.

PCT/JP 2004 / 002301

**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.: 1.1  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 1.1 relates to a method for treatment of the human or animal body by therapy, which does not require an intentional search by the International Searching Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and 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:

The common matter of the claims, the use of a medical substance having an activity of enhancing or disinhibiting the action of Ach in the preparation of a therapeutic agent for treating drug dependence, is well-known, and the remaining subject-matter of each claims, the said use of each compound in the claims, differs from that of the others without there being any unifying novel concept common to all. Thus, among those claimed inventions there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding technical features. Therefore, these groups of inventions are not linked so as to form a single general inventive concept.

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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 31/55</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	31/55	
<b>G 0 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/15	Z
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50	Z

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

(72) 発明者 アイラ・パスタン

アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 - 1 1 0 5 メリーランド州ポトマック、ピオール・マウンテン・ロード  
1 1 7 1 0 番

Fターム(参考) 2G045 AA40 FB01

4C084 AA17 NA14 ZC392

4C086 AA01 AA02 BC38 CB22 MA01 MA04 NA14 ZC39