(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6510523号
(P6510523)
(45)発行日　令和1年5月8日(2019.5.8)　(24)登録日　平成31年4月12日(2019.4.12)

(51)Int.Cl.　F I
A61K 38/08 (2019.01)　A61K 38/08 ZNA
A61P 25/08 (2006.01)　A61P 25/08

請求項の数 14　(全 18 頁)

(21)出願番号　特願2016-536596(P2016-536596)
(86)(22)出願日　平成26年12月4日(2014.12.4)
(65)公表番号　特表2017-503766(P2017-503766A)
(43)公表日　平成29年2月2日(2017.2.2)
(86)国際出願番号　PCT/NZ2014/050016
(87)国際公開番号　WO2015/084188
(87)国際公開日　平成27年6月11日(2015.6.11)
審査請求日　平成29年11月27日(2017.11.27)
(31)優先権主張番号　618614
(32)優先日　平成25年12月4日(2013.12.4)
(33)優先権主張国　ニュージーランド(NZ)

(73)特許権者　511193293
クロンズ　ホールディングズ　カンパニー　リミテッド
Ｃｕｒｏｎｚ　Ｈｏｌｄｉｎｇｓ　Ｃｏｍｐａｎｙ　Ｌｉｍｉｔｅｄ
ニュージーランド国　０９７５　ウェルズフォード　アールディ　５　カムズ　ロード　１７３
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100142907
弁理士　本田　淳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】１つ以上の神経再生ペプチドを用いて癲癇または発作を治療または予防する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象において
（ｉ）癲癇；または
（ｉｉ）癲癇損傷；または
（ｉｉｉ）癲癇発作；または
（ｉｖ）癲癇発作損傷
を治療または予防するための薬剤の製造における、
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ（配列番号１）
または
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ－ＮＨ$_2$（配列番号２）
から選択されるペプチドの少なくとも１つの有効量の使用。
【請求項２】
前記薬剤が注射の手段により前記対象に投与されるように適合された、請求項１に記載の使用。
【請求項３】
前記薬剤が、経口投与の手段により前記対象に投与されるように適合された、請求項１に記載の使用。
【請求項４】

前記薬剤が１日に少なくとも１回の投与に適合された、請求項１～３のいずれか一項に記載の使用。
【請求項５】
前記薬剤が１日に少なくとも２回の投与に適合された、請求項１～４のいずれか一項に記載の使用。
【請求項６】
前記有効量が、対象に投与される量で少なくとも５μｇ／ｋｇである、請求項１～５のいずれか一項に記載の使用。
【請求項７】
前記有効量が、対象に投与される量で１０～２００μｇ／ｋｇである、請求項１～６のいずれか一項に記載の使用。
【請求項８】
対象において
（ｉ）癲癇；または
（ｉｉ）癲癇損傷；または
（ｉｉｉ）癲癇発作；または
（ｉｖ）癲癇発作損傷
を治療または予防するための薬剤であって、
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ（配列番号１）
または
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ－NH_2（配列番号２）
から選択されるペプチドを有効成分として含む薬剤。
【請求項９】
注射の手段により対象に投与されるように適合された、請求項８に記載の薬剤。
【請求項１０】
経口投与の手段により対象に投与されるように適合された、請求項８に記載の薬剤。
【請求項１１】
１日に少なくとも１回投与される、請求項８～１０のいずれか一項に記載の薬剤。
【請求項１２】
１日に少なくとも２回投与される、請求項８～１１のいずれか一項に記載の薬剤。
【請求項１３】
前記ペプチドの有効量が、対象に投与される量で少なくとも５μｇ／ｋｇである、請求項８～１２のいずれか一項に記載の薬剤。
【請求項１４】
前記ペプチドの有効量が、対象に投与される量で１０～２００μｇ／ｋｇである、請求項８～１３のいずれか一項に記載の薬剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、１つ以上の神経再生ペプチド（ＮＲＰ：ｎｅｕｒａｌ　ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ）を用い、対象において癲癇または発作またはそれらから起こる損傷を治療または予防する方法に関する。特に、本発明は、対象において癲癇または発作を治療または予防するためのＮＲＰ２９４５および近縁類似体の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
神経再生ペプチド（ＮＲＰ）は、中枢神経系疾患または損傷の状況下で神経前駆体および運命づけられた神経幹細胞の増殖、移動、分化および生存を促進する小さな合成ペプチドである（Ｇｏｒｂａ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；Ｓｉｎｇｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。ＮＲＰの発見は、開発されたｉｎ　ｖｉｔｒｏ外傷性脳損傷モデルを用いた実験に遡

る（Ｓｉｅｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９）。海馬器官型組織培養物（ＯＴＣｓ：ｏｒｇａｎｏｔｙｐｉｃ　ｔｉｓｓｕｅ　ｃｕｌｔｕｒｅｓ）に由来する生化学的に分画された細胞培養上清の投与は、視床皮質ＯＴＣ共培養において３～４日以内にニューロンブリッジの形成に至った（Ｌａｎｄｇｒａｆ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）。最初に完全同定された、ニューロン生存促進活性に関してフェムトモル効力を示す生活性ペプチドをコードする遺伝子は、マウスにおいて１２番染色体上にコードされ、１３５アミノ酸長のタンパク質をコードしていることが実験的に示された（Ｇｏｒｂａ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。ＮＲＰ２９４５はタンパク質分泌のカルシウム依存性アクチベータ（ｃａｌｃｉｕｍ　ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ａｃｔｉｖａｔｏｒ　ｏｆ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ　２）（ＣＡＰＳ２；Ｓａｄａｋａｔａ　ｅｔ　ａｌ．，２００４）としても知られる７ｑ３１．３５位に位置するヒトＮＲＰ遺伝子に由来し、ＣＡＰＳ２配列内の４０～５０番アミノ酸に相当する（Ｓｐｅｉｄｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，２００３）。

【０００３】

ＮＲＰは、神経変性作用と抗炎症作用の両方を有する（Ｌａｎｄｇｒａｆ　ｅｔ　ａｌ．２００５；Ｇｏｒｂａ　ｅｔ　ａｌ．，２００６およびＳｉｅｇ＆Ａｎｔｏｎｉｃ，２００７）。その後、ヒト初代脳細胞、ヒト胚神経幹細胞および動物細胞を用いたいくつかの研究では、ＮＲＰはナノモル下濃度で神経炎症性疾患の治療に好適な治療に関して神経保護効力と抗炎症効力の両方を有することが確認された（Ｇｏｒｂａ　ｅｔ　ａｌ．，２００６）。

【０００４】

過去２０年にわたって、ますます多くの証拠が、癲癇発作中に有害な転帰と協調して寄与する炎症プロセスの活性化が起こることを示している。薬物療法に不応の癲癇患者のヒト脳組織で、炎症性分子のレベルの上昇とグリア細胞および神経細胞ならびに微小血管内皮細胞におけるそれらの受容体のアップレギュレーションが示されており、これは発作病巣で炎症誘発経路が活性化されることを示唆している（Ａｒｏｎｉｃａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２，Ｃｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００９およびＶｅｚｚａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１ａ）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

脳において炎症性分子の発現および細胞損失を軽減し、おそらく癲癇発作の速度を緩慢にし得る神経保護・抗炎症薬が必要とされている。

本発明の目的は、神経再生ペプチドを用いて対象の癲癇もしくは発作または癲癇もしくは発作損傷を治療または予防するための方法を提供すること、または少なくとも有用な選択肢を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

第１の態様において、本発明は、投与工程において配列：
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ（配列番号１）
を含む神経再生ペプチドの有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象における癲癇または発作損傷を治療する方法を提供する。

【０００７】

一実施形態では、ペプチドは１１アミノ酸残基の配列：
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ
およびその機能的に許容される誘導体からなる。１つのこのような許容される誘導体は、ペプチドのＣ末端がアミド化されて
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ－NH_2（配列番号２）
となった配列を含む。

【０００８】

一実施形態では、対象への投与工程は、限定されるものではないが腹腔内、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、皮内、脳室内、鼻腔内および脊髄内注射を含む注射の手段による。別の実施形態では、対象への投与工程は経口投与の手段による。

【０００９】

別の実施形態では、対象に投与されるＮＲＰの有効量は少なくとも５μｇ／ｋｇである。別の実施形態では、対象に投与されるＮＲＰの有効量はＮＲＰ約１０～５０μｇ／ｋｇの間である。

【００１０】

第２の態様において、本発明は、配列：
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ（配列番号１）
を含む神経再生ペプチドの有効量を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象における癲癇または発作を予防する方法を提供する。

【００１１】

一実施形態では、ペプチドは１１アミノ酸残基の配列：
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ
およびその許容される誘導体からなる。１つのこのような許容される誘導体は、ペプチドのＣ末端がアミド化されて
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ－NH_2（配列番号２）
となった配列を含む。

【００１２】

一実施形態では、対象への投与工程は、限定されるものではないが腹腔内、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、皮内、脳室内、鼻腔内および脊髄内注射を含む注射の手段による。別の実施形態では、対象への投与工程は経口投与の手段による。

【００１３】

別の実施形態では、対象に投与されるＮＲＰの有効量は少なくとも５μｇ／ｋｇである。別の実施形態では、対象に投与されるＮＲＰの有効量はＮＲＰ約１０～２００μｇ／ｋｇの間である。

【００１４】

一実施形態では、上記で定義された方法は、配列：
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ（配列番号１）
または
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ－NH_2（配列番号２）
を含むペプチドの有効量を、それを必要とする対象に１日に少なくとも１回の方式で投与する工程を含む。

【００１５】

一実施形態では、本方法は、配列：
ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ（配列番号１）
を含むペプチドの有効量を、それを必要とする対象に１日に少なくとも１回の方式で投与する工程を含む。

【００１６】

一実施形態では、上記で定義された方法は、上記ペプチドを少なくとも１日おきの方式で投与する工程を含む。

一実施形態では、対象はヒトおよび伴侶動物からなる群から選択される。

【００１７】

一実施形態では、対象への投与工程は、限定されるものではないが腹腔内、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、皮内、脳室内、鼻腔内および脊髄内注射を含む注射の手段による。別の実施形態では、対象への投与工程は経口投与の手段による。

【００１８】

別の実施形態では、対象に投与されるＮＲＰの有効量は少なくとも５μｇ／ｋｇである。別の実施形態では、対象に投与されるＮＲＰの有効量はＮＲＰ約１０～５０μｇ／ｋｇの間である。

【００１９】

第３の態様において、本発明は、必要とする対象において

（ｉ）癲癇；または

（ｉｉ）癲癇により媒介されるニューロンもしくは神経ネットワークの損傷；または

（ｉｉｉ）発作；または

（ｉｖ）発作損傷

を治療または予防するための薬剤の製造における、

ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ（配列番号１）

または

ＧｌｙＡｒｇＡｒｇＡｌａＡｌａＰｒｏＧｌｙＡｒｇＡｉｂＧｌｙＧｌｙ－NH_2（配列番号２）

から選択されるペプチドの少なくとも１つの有効量の使用を提供する。

【００２０】

一実施形態では、対象への投与工程は、限定されるものではないが腹腔内、静脈内、筋肉内、動脈内、皮下、皮内、脳室内、鼻腔内および脊髄内注射を含む注射の手段による。別の実施形態では、対象への投与工程は経口投与の手段による。

【００２１】

一実施形態では、薬剤は１日に少なくとも１回の投与に適合される。

一実施形態では、薬剤は１日に少なくとも２回の投与に適合される。

一実施形態では、対象はヒトおよび伴侶動物からなる群から選択される。

【００２２】

以下の記載から、配列番号１または配列番号２のペプチドの有効量は、齧歯類モデルで投与される場合には５～２０μｇ／ｋｇの範囲の用量、イヌまたはヒトなどのより大型の対象に投与される場合には５～５０μｇ／ｋｇの範囲の用量であることを示すと理解されるべきである。

【００２３】

本明細書の説明および特許請求の範囲において、以下の頭字語、用語および句は、示されている意味を有する。

「有効量」は、対象における癲癇または発作活性の結果としてその対象に生じる癲癇または発作損傷を治療または予防するために有効な量を意味する。

【００２４】

「機能的に許容される誘導体」は、対象の癲癇または発作活性の前または後にその対象に投与するための組成物に含めるために適切な、アミド化、アシル化、アルキル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、プレニル化、塩化、硫酸化、またはそれらの組合せにより得られる配列番号１で定義されるペプチドの誘導体を意味する。

【００２５】

「癲癇損傷」は、癲癇発作のプロセスにより起こる対象の脳におけるニューロン損傷を意味する。

「発作損傷」は、癲癇発作のプロセスを原因とする発作または痙攣により起こる対象の脳におけるニューロン損傷を意味する。

【００２６】

以下、実施形態または実施例および添付の図面頁の図面を参照して本発明を説明する。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１Ａ】損傷対照群と比較した場合の、ラットにおける発作攻撃の持続時間、潜時および重篤度（挙動観察により評価）に及ぼす効果のプロット示す。ここで、配列番号１は添付の図面および明細書にＮＲＰ２９４５として示され、ラットにおいて予防的腹腔内注射

の手段により投与する場合には５μｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇの濃度であり、その後、このラットをＰＴＺに曝して発作を誘発した。
【図１Ｂ】対照ラット（偽操作）およびＰＴＺで酩酊状態としたラットならびに種々の濃度のＮＲＰ２９４５（５μｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇおよび２０μｇ／ｋｇ）で処置した動物（損傷対照との比較において、ラットにおける予防的腹腔内注射の手段により投与し、その後、ＰＴＺに曝してする発作を誘発した）の新皮質における脳波測定（ＥＣｏＧ：ｅｌｅｃｔｒｏｃｏｒｔｉｃｏｇｒａｐｈｙ）により記録された癲癇型バースト放電の代表的な例を示す。
【図１Ｃ】ＥＣｏＧ記録により評価されたＰＴＺ注射により誘発される癲癇型バースト放電の潜時、頻度、振幅および持続時間に及ぼす５および１０μｇ／Ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５の効果のプロットを示す。対照動物に比べて５および１０μｇ／ｋｇで処置したラットでは、スパイクの振幅は有意に小さく、スパイクの持続時間は有意に短かった。バースト放電の頻度は対照ラットよりも有意に少なかった。＊および＊＊はそれぞれｐ＜０．０５およびｐ＜０．００１を示す。
【図２Ａ】ラットの海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに新皮質の８μｍ切片における、ダークニューロンの産生に及ぼすＮＲＰ２９４５投与の阻害効果およびトルイジンブルーにより染色されるダークニューロンの光学顕微鏡的外観を示す種々の写真を示す。
【図２Ｂ】５、１０、および２０μｇ／ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５の効果に対する、ダークニューロンの産生に及ぼすＮＲＰ２９４５投与の阻害効果のプロットを示す。ＮＲＰ２９４５は、腹腔内ペンチレンテトラゾール（ＰＴＺ）注射による発作の誘導後のラットの海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚皮質におけるダークニューロンの産生を阻害した。＊はｐ＜０．００１を示す。
【図３Ａ】ラットのＰＴＺ誘発発作後の海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚皮質における正常ニューロンの体積加重平均体積に及ぼす種々の濃度のＮＲＰ２９４５投与の効果のプロットを示す。１０および２０μｇ／ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５による処置後の正常ニューロンの平均体積加重体積は、種々の脳領域で、対照ラットに比べて高かった。
【図３Ｂ】ラットのＰＴＺ誘発発作後の海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚皮質における正常ニューロンの体積加重平均体積に及ぼす種々の濃度のＮＲＰ２９４５投与の効果をグラフで示す。正常ニューロンの体積加重平均体積とダークニューロンの数の間の相関は、ＮＲＰ２９４５の適用後に、正常ニューロンの体積加重平均体積の増加が海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚皮質におけるダークニューロンの数の減少を伴っていたことを明らかにした。＊はｐ＜０．００１を示す。
【図４】Ａ～Ｃ：新皮質ならびに海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域におけるＧＡＢＡＡαおよびβ受容体ならびにＧＡＤ－６５発現の免疫組織化学の顕微鏡写真を示す。ＰＴＺ注射の３０分前のＮＲＰ２９４５（２０μｇ／ｋｇ）適用後の海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚皮質におけるＧＡＢＡＡαおよびβ受容体ならびにＧＡＤ－６５発現。Ｄ～Ｆ：新皮質ならびに海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域におけるＧＡＢＡＡαおよびβ受容体ならびにＧＡＤ－６５発現の定量結果（平均±Ｓ．Ｅ．Ｍ）を表す棒グラフを示す。データは、ＰＴＺ注射前のＮＲＰ２９４５処置が新皮質およびＣＡ１海馬領域においてＧＡＢＡＡαサブユニットのより高い発現をもたらしたことを示す。ＧＡＢＡＡβサブユニット発現は、ＣＡ１領域においてのみより高かった。ＧＡＤ－６５発現は、ＮＲＰ２９４５処置後の新皮質と海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域の両方で、対照ラットに比べて有意に高かった。＊はｐ＜０．００１を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
本発明のさらなる態様は添付の図面および下記の実施例を参照すれば明らかとなる。
実施例１：材料および方法
成体雄ウイスターラット（２００～２５０ｇ）を制御条件下（周囲温度＝２２℃、湿度＝４０％；１２時間の明／暗周期）、食物と水を任意に摂らせて飼育した。動物の齢およ

び体重を合わせ、ペンチレンテトラゾール（ＰＴＺ；５０ｍｇ／ｋｇを０．９％生理食塩水に溶解）の腹腔内注射の３０分前に、腹腔内注射により生理食塩水ＮＲＰ２９４５（５、１０もしくは２０μｇ／ｋｇ）または生理食塩水単独（対照）を無作為に施した。試験は全て、イラン、テヘランのＳｈｅｆａ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ　Ｃｅｎｔｅｒ動物倫理委員会により承認されたプロトコールに従って行った。

【００２９】

挙動試験

各ＰＴＺ注射後、各ラットの痙攣性挙動を３０分間評価し、生じた発作を次のようにスコア化した：０＝正常挙動；１＝不動；２＝硬直姿勢；３＝繰り返し掻く、旋回、または頭部振戦；４＝前肢クローヌス、起立、および転倒；５＝レベル４の挙動が繰り返し起こる、６＝重度の強直間代挙動または癲癇重積（Ｋａｒｉｍｚａｄｅｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）。発作発生の潜時は、ＰＴＺ投与から最初に検出可能な発作までの平均時間（秒）として定義した。全身性発作は、対称的な前肢および後肢緊張、その後の後肢クローヌス、および続いての跳躍活動を特徴とした。動物によっては２回以上の発作を呈する場合があったので、発作持続時間はこれら複数の発作の持続時間の合計として評価した。

【００３０】

外科術手順および脳波測定（ＥＣｏＧ）記録

動物を抱水クロラール３．５％（０．９％生理食塩水に溶解；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で麻酔し、各ラットの頭部を定位固定装置（Ｓｔｏｅｌｔｉｎｇ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、米国）に設置した。継続的抱水クロラール麻酔下、硬膜外記録用電極を左および右の体性感覚皮質上に定位固定的に埋入した（前頂から３．０ｍｍ後方、正中から３．０ｍｍ側方）。対照電極は鼻骨に配置する。ＥＣｏＧは増幅器（ＥＸＴ－０２　Ｆ、ＮＰＩ、ドイツ；０．５～３０ｋＨｚにてバンドパスフィルターを使用、サンプリングレート１０ｋＨｚ）に接続した単極式銀電極で記録し、デジタルオシロスコープにより保存した。ＥＣｏＧ記録は、生理食塩水またはＮＲＰ２９４５（５、１０、２０μｇ／ｋｇ）受容後３０分間およびＰＴＺの注射後３０分間行った。癲癇スパイク活性の潜時、持続時間、振幅、および頻度を、ＡｘｏＳｃｏｐｅ　１０ソフトウエア（Ａｘｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、米国カリフォルニア州）を用いて計算した。

【００３１】

立体解析法および物理的解剖器

正常ニューロンの体積加重平均体積は、海馬領域ＣＡ１およびＣＡ３の錐体層ならびに体性感覚皮質の系統的かつ無作為にサンプリングした１０の均一な顕微鏡視野に対する点サンプリング切片法により直接計算した。直線上の試験点の格子を、各特定の視野の核プロファイルのトレースに無作為に重ね合わせた。ニューロンの核をマークし、無作為に選択した方向から２本の等方性直線の中心をこのニューロンに合わせ、重ね合わせた。各直線と各ニューロンの細胞体の外表との交点をマークした。これらの直線は点サンプリング切片を形成するので、その長さを測定して３乗した。平均にπ／３を掛け、最後に、全ての切片の平均を求め、体積加重平均ニューロン体積の推定値とした。ダークニューロンの定量分析では、物理的解剖器法を用いた。８ｍｍ間隔の１０対の切片を各脳から採取した。各対の最初の切片を参照と呼び、２つ目の切片を比較に用いた。各切片対について、少なくとも１０の顕微鏡視野を、対象とする全領域での均一な系統的無作為サンプリングにより選択した。偏りのないフレームおよび物理的解剖器計数規則を用い、各視野のダークニューロンの計数を行った（Ｊａｆａｒｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。

【００３２】

組織学的研究

動物を抱水クロラール（３．５％；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で深麻酔し、２００ｍｌの生理食塩水、次いで、１％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）を含有する２００ｍｌの溶液で経心腔的灌流を行った。灌流後、全てのラットを断頭し、脳を摘出した。脳は１％ＰＦＡ中で少なくとも１０日間維持し、その後、組織学的研究向けに次のように処理した。脳を８μｍ厚の横断面切片とした。切片をトルイジンブルーで染色した。対象とする

全領域で系統的無作為サンプリングにより切片の選択を行った。種々の領域（海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚新皮質）を、デジタルカメラを備えた光学顕微鏡（ＢＸ５１、Ｏｌｙｍｐｕｓ、日本）下で観察した。４０倍油浸対物レンズ（Ｏｌｙｍｐｕｓ、日本）を用いてデジタル写真を撮影した。倍率は対物マイクロメーターを用いて計算した。

【００３３】

免疫組織化学的方法

動物を抱水クロラールで深麻酔し、２００ｍｌの生理食塩水、次いで、６００ｍｌの４％ＰＦＡ溶液で経心腔的灌流を行った。脳を摘出し、４％ＰＦＡ中、４℃で少なくとも４日間維持した後、免疫組織化学的研究向けに処理した。連続（８μｍ）冠状切片を作製した。各動物の前頂から１．８～３．３ｍｍ後で３枚のパラフィン包埋切片を作製し、キシロールおよびアルコールシリーズで再水和させ、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で３回洗浄し、遮断溶液（３％Ｈ２Ｏ２／メタノール　５分）中でインキュベートした。ＰＢＳ中で洗浄した後、スライドを９５℃のクエン酸ナトリウムバッファー中で１０分間煮沸した。２０分間室温まで冷却した後、スライドをＰＢＳで３回洗浄し、ＧＡＢＡＡα、ＧＡＢＡＡβまたはＧＡＤ－６５に対する市販のウサギポリクローナル抗ラット抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、イギリス）とともに４℃で一晩インキュベートした。抗体濃度は、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および０．１Ｍ　ＰＢＳ　ｐＨ７．４中、１～５％ＮＧＳを含有する溶液で、ＧＡＢＡＡαでは１：１００、ＧＡＢＡＡβでは１：５０、グルタミン酸デカルボキラーゼ－６５（ＧＡＤ－６５）では１：２００とした。次に、これらの切片をＰＢＳ中で３回すすぎ（各１０分）、０．３％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００および５％ＮＧＳを含むＰＢＳに１：４００希釈したヤギ抗ウサギセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、イギリス）とともに２２℃で１時間インキュベートした。ＰＢＳで数回洗浄した後、これらのスライドを３－３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ、Ｒｏｃｈｅ；０．５μｌ　ＤＡＢおよび１．５μｌ過酸化バッファー）中で５～１０分間インキュベートし、顕色させた。切片をヘマトキシリンで対比染色した。免疫染色の特異性に対する対照実験は、一次抗体を省略することによって行った。解析用の画像を顕微鏡に取り付けたデジタルカメラで取得した。

【００３４】

データは平均±ＳＥＭとして表した。統計分析は一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）とその後のテューキー事後検定およびＬＳＤ検定を使用することにより行った。統計的有意性の規準はＰ＜０．０５とした。ダークニューロン数とニューロン体積の間の相関はピアソン検定によって分析した。

【００３５】

結果

（ｉ）ＰＴＺ誘発発作に及ぼすＮＲＰ２９４５の効果

本研究では、ＰＴＺを用いてラットで癲癇発作を誘発した。対照群の動物は全て、ＰＴＺ注射の約２～３分後に典型的な発作挙動を生じた。ＰＴＺ誘発発作または痙攣は、２０μｇ／ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５の投与によって完全に抑えられた。より低濃度（５および１０μｇ／Ｋｇ）では、ＮＲＰ２９４５は、対照動物に比べ、ＰＴＺ注射後の発作攻撃の総持続時間を低減させた（ｐ＜０．０５、ｎ＝１２；図１Ａ、表１参照）が、発作攻撃の潜時および重篤度に影響を及ぼさなかった（図１Ａ）。

【００３６】

【表１】

	対照	5μg/kg	10μg/kg	20μg/kg
挙動試験				
潜時（秒）	144.2±11.8	230.2±10.6	150.2±7.4	-
持続時間（秒）	60.5±0.5	35.83±5.9*	37.67±7.3*	-
重篤度	4±0	3.67±0.21	3.67±0.21	-
ECoG				
潜時（秒）	27±7	326±24**	417±37**	-
持続時間（秒）	180±7.2	60±1.2**	60±2.1**	-
振幅（mV）	1.4±0.1	1.1±0.04**	0.84±0.1**	-
頻度（/分）	15±1.2	4.7±0.3**	6.67±0.9**	-
ダークニューロン				
CA1	2.56±0.2	1.53±0.1**	0.88±0.04*	1.37±0.1**
CA3	2.70±0.1	1.31±0.2**	0.80±0.1**	1.26±0.1**
皮質	3.63±0.3	1.42±0.1**	0.78±0.1**	1.30±0.1**
正常ニューロンの平均体積				
CA1	384.9±5.6	380.9±7.1	413.1±4.4**	451.9±5.5**
CA3	390.9±3.1	387.9±3.2	438.6±5.6**	474.1±5.1**
皮質	341.9±3.6	340.8±3.1	395.7±6.1**	387.9±7.5**

【００３７】

表１．ＰＴＺの注射後の挙動（ＰＴＺ誘発発作攻撃）、脳波測定（ＥＣｏＧ）により記録された癲癇型バースト放電、ダークニューロンの平均数および正常ニューロンの平均体積に及ぼす５、１０および２０μｇ／ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５の効果を示す。対照群はＰＴＺでのみ処置した。ＰＴＺ注射の３０分前に、生理食塩水中、種々の濃度のＮＲＰ２９４５を腹腔内投与した。＊および＊＊はそれぞれｐ＜０．０５およびｐ＜０．００１を示す。

【００３８】

（ｉｉ）ＰＴＺ誘発癲癇型ＥＣｏＧ活性に及ぼすＮＲＰ２９４５の効果

挙動観察を検証するために麻酔ラットのＥＣｏＧ記録を行った。対照ラットでの記録は、表面陽性の平坦な上面を持つ一連の振れからなった。これらの波形の持続時間は２０～２００ｍｓであり、周波数は０．３～４Ｈｚであった。ＰＴＺ（５０ｍｇ／ｋｇ）の注射後、最初の癲癇型スパイクが注射から２０～１８５（４５±１１）秒以内に発生した。これらのスパイクは着実に大きさを増し、５～１０分以内に１．４±０．１ｍＶの振幅、１８０±７．２秒の持続時間および１５±１．２／分の発生に達した。その後、癲癇型バースト放電はさらに３０分間一定を維持する（対照群）。ＰＴＺ注射の３０分前に生理食塩水中２０μｇ／ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５を適用すると（腹腔内）、癲癇型電場電位の発生が完全に抑えられた（図１Ｂ）。５および１０μｇ／ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５は、最初のスパイク波の発生までの潜時を増し、ＰＴＺにより誘発される癲癇型電場電位の振幅、持続時間および繰返し率を低減させた（Ｐ≦０．００１；図１ＢおよびＣ）。

【００３９】

（ｉｉｉ）ダークニューロンの産生に及ぼすＮＲＰ２９４５の効果

以下でＰＴＺ処置後のニューロン変性を評価するために、黒く濃染される核と明るい好酸性細胞質を有する好酸性ニューロンの出現を利用した（Ｇａｒｍａｎ，２０１１）。ダークニューロンは、ニューロンの萎縮、細胞質の好酸性、核濃縮、および周囲の海綿状態により識別された（Ｊａｆａｒｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）。海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚皮質におけるダークニューロンの密度は、生理食塩水投与に比

べてＮＲＰ２９４５投与後に有意に低下した。海馬ＣＡ１領域のダークニューロンの平均数は、対照ラット（ＰＴＺのみを受容）の２．５６±０．２３から、５、１０および２０μｇ／ｋｇの適用後のそれぞれ１．５３±０．１３、０．８８±０．０４および１．３７±０．０９に低下した（Ｐ≦０．００１；図２ＡおよびＢ、表１）。海馬ＣＡ３領域のダーク細胞の平均数もまた、対照ラットの２．７±０．１４から、５、１０および２０μｇ／ｋｇの適用後のそれぞれ１．３１±０．１７、０．８±０．０７および１．２６±０．１１に低下した（Ｐ≦０．００１；図２、表）。ＮＲＰ２９４５はまた、新皮質においてもＰＴＺ注射によりダークニューロンの産生を低減した。対照群の体性感覚皮質におけるダーク細胞の平均数は３．６３±０．２５であった。ＰＴＺ注射前に２０μｇ／ｋｇ濃度のＮＲＰ２９４５を投与すると、これらのニューロンの数はそれぞれ１．４２±０．１２、０．７８±０．０９、１．３±０．０８に低下した（Ｐ≦０．００１；図２ＡおよびＢ、表１）。

【００４０】

（ｉｖ）正常ニューロンの平均体積に及ぼすＮＲＰ２９４５の効果

対照ラットに比べて、種々の濃度のＮＲＰ２９４５を適用した後の海馬および体性感覚皮質で見られた正常ニューロンの体積加重平均体積には有意な差があった（図３Ａ、表１）。５μｇ／ｋｇのＮＲＰ２９４５は、ＰＴＺ誘発発作後の正常ニューロンの平均体積に影響を及ぼさなかった。海馬ＣＡ１およびＣＡ３領域ならびに体性感覚皮質は、対照群に比べて、１０および２０μｇ／ｋｇのＮＲＰ２９４５の適用後に正常ニューロンの平均体積加重体積がより大きかった（Ｐ≦０．００１；図３Ａ、表１）。

【００４１】

正常ニューロンの体積加重平均体積とダークニューロンの数の間の相関分析により、ＮＲＰ２９４５の適用後に、正常ニューロンの体積加重平均体積の増加が海馬ＣＡ１（ｒ＝０．０８４、Ｐ≦０．００１）およびＣＡ３（ｒ＝０．１４７、Ｐ≦０．０００１）領域ならびに体性感覚皮質（ｒ＝０．３０２、Ｐ≦０．００１）におけるダークニューロンの数の減少を伴っていたことが明らかになった（図３Ｂ）。

【００４２】

（ｖ）ＧＡＢＡＡ受容体αおよびβサブユニットならびにＧＡＤ－６５に及ぼすＮＲＰ２９４５の効果

ＮＲＰ２９４５の抗痙攣効果の可能性のある機構を評価するために、ＰＴＺ注射後のＧＡＢＡＡ受容体αおよびβサブユニットならびにＧＡＤ－６５の発現を免疫組織化学染色により評価した。対照ラットと比べた場合に、ＮＲＰ２９４５（２０μｇ／ｋｇ）による処置後に体性感覚皮質および海馬ＣＡ１領域におけるＧＡＢＡＡ受容体αサブユニット発現の有意な増強が見られた（Ｐ＜０．００１；図４Ａ）。２０μｇ／ｋｇのＮＲＰ２９４５の適用だけが、対照組織に比べてＣＡ１海馬領域におけるＧＡＢＡＡ受容体βサブユニットの発現を増強した（Ｐ＜０．００１；図４Ｂ）。本発明者らはまた、海馬および新皮質におけるＧＡＤ－６５免疫反応性に及ぼすＮＲＰ２９４５の効果も調べた。体性感覚皮質ならびにＣＡ１およびＣＡ３海馬領域におけるＧＡＤ－６５の免疫組織化学標識は、対照ラットに比べて、ＮＲＰ２９４５（２０μｇ／ｋｇ）の適用後のこれらの脳領域におけるＧＡＤ－６５免疫反応性ニューロンにおける発現の有意な増強を明らかにした（Ｐ＜０．００１；図４Ｃ）。

【００４３】

これらの結果は、ＮＲＰ２９４５がＰＴＺ誘発発作活性および癲癇型電場電位に対して抗痙攣および神経保護効果を提供すること、およびこのペプチドが癲癇または発作を予防するための望ましい選択肢を提供し得ることを強く示唆する。加えて、これらの結果はまた、ＮＲＰ２９４５がＰＴＺ注射後の発作活動によってもたらされる細胞構造への損傷を予防することも強く示唆する。ＮＲＰ２９４５は、種々の脳領域において、ダークニューロンの数を減らし、正常ニューロンの平均体積を増大させた。細胞損傷の予防とＮＲＰ２９４５による正常ニューロンの平均体積の増大との間には強い相関が見られた。さらに、ＮＲＰ２９４５は、ＰＴＺ注射を受けたラットの海馬および体性感覚皮質においてＧＡＢ

ＡＡ受容体αおよびβサブユニットならびにＧＡＤ－６５の発現を増強した。

【００４４】

本発明を実施形態または実施例を参照して記載してきたが、本発明の範囲から逸脱することなくこの実施形態または実施例に変形および改変を行うことができる。

既知の等価物が特定の特徴に存在する場合、このような等価物は、本明細書に具体的に言及されるかのように組み込まれる。

【００４５】

特に、バイオシーケンスの１つ以上のアミノ酸を機能的に類似のアミノ酸で置換することにより、機能的に類似のペプチド配列が得られると予想される。類似のペプチド配列の機能性は、過度の追加実験を行わなくとも、本明細書に開示される方法の使用によって確認できるということが示唆される。

【００４６】

参考文献

【００４７】

【表２－１】

Gorba T, Bradoo P, Antonic A, Marvin K, Liu DX, Lobie PE, Reymann KG, Gluckman PD, Sieg F. Neural regeneration protein is a novel chemoattractive and neuronal survival-promoting factor. Exp Cell Res. 2006 Oct 1;312(16):3060-74.

Sieg F, Wahle P, Pape HC. Cellular reactivity to mechanical axonal injury in an organotypic in vitro model of neurotrauma. Journal of Neurotrauma. 1999, 16: 1197-1

Landgraf P, Sieg F, Meyer G, Wahle P, Pape HC, Kreutz MR. A maternal blood-borne factor promotes survival of developing thalamus. FASEB J. 2005, 19: 225-227.

Sadakata T, Mizoguchi A, Sato Y, Katoh-Semba R, Fukuda M, Mikoshiba K, Furuichi T. The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. J Neurosci. 2004 Jan 7;24(1):43-52.

Speidel D, Varoqueaux F, Enk C, Nojiri M, Grishanin RN, Martin TF, Hofmann K, Brose N, Reim K. A family of Ca2+-dependent activator proteins for secretion: comparative analysis of structure, expression, localization, and function. J Biol Chem. 2003 Dec 26;278(52):52802-9.

Sieg F, Antonic A. Alternative Strategies in Neuroregeneration and Neurogenesis. Research signpost edition 2007 (chapter, pp 27-58). Editors: Valeria Sogos and Andrea Diana.

Singh, AT, Keelan JA, Sieg F. Regulation of trophoblast migration and survival by a novel neural regeneration peptide (NRP). Reprod. Biomed. Online. 2010 Aug;21(2):237-44.

Aronica E, Becker AJ, Spreafico, R. Malformations of cortical development. Brain Pathol. 2012 May;22(3):380-401.

Choi J, Koh S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. Yonsei Med J. 2008 Feb 29;49(1):1-18.

【００４８】

【表２－２】

Vezzani A, Ruegg S. The pivotal role of immunity and inflammatory processes in epilepsy is increasingly recognized: introduction. Epilepsia. 2011 May;52 Suppl 3:1-4.

Karimzadeh F, Soleimani M, Mehdizadeh M, Jafarian M, Mohamadpour M, Kazemi H, Joghataei MT, Gorji A. Diminution of the NMDA receptor NR2B subunit in cortical and subcortical areas of WAG/Rij rats. Synapse. 2013 Dec;67(12):839-46.

Jafarian M, Rahimi S, Behnam F, Hosseini M, Haghir H, Sadeghzadeh B, Gorji A. The effect of repetitive spreading depression on neuronal damage in juvenile rat brain. Neuroscience. 2010 Aug 11;169(1):388-94.

Ferrendelli JA, Holland, KD, McKeon AC, Covey DF. Comparison of the anticonvulsant activities of ethosuximide, valproate, and a new anticonvulsant, thiobutyrolactone. Epilepsia. 1989 Sep-Oct;30(5):617-22.

Meldrum B. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. Epilepsy Res. 2002 Jun;50(1-2):33-40.

Kupferberg H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. Epilepsia 2001;42 Suppl 4:7-12.

Leweke FM, Louvel J, Rausche G, Heinemann U. Effects of pentetrazol on neuronal activity and on extracellular calcium concentration in rat hippocampal slices. Epilepsy Res. 1990 Aug;6(3):187-98.

Walsh TJ, Stackman RW, Emerich DF, Taylor LA. Intraseptal injection of GABA and benzodiazepine receptor ligands alters high-affinity choline transport in the hippocampus. Brain Res Bull. 1993;31(3-4):267-71.

Follesa P, Tarantino A, Floris S, Mallei A, Porta S, Tuliqi G, Cagetti E, Caddeo M, Mura A, Serra M, Biggio G. Changes in the gene expression of GABAA receptor subunit mRNAs in the septum of rats subjected to pentylenetetrazol-induced kindling. Brain Res Mol Brain Res. 1999 Jun 18;70(1):1-8.

Psarropoulou C, Matsokis N, Anquelatou F, Kostopoulos G. Pentylenetetrazol-induced seizures decrease gamma-aminobutyric acid-mediated recurrent inhibition and enhance adenosine-mediated depression. Epilepsia 1994 Jan-Feb;35(1):12-9.

【００４９】

【表２－３】

Marley RJ, Heninger C, Hernandez TD, Gallager TW. Chronic administration of beta-carboline-3-carboxylic acid methylamide by continuous intraventricular infusion increases GABAergic function. Neuropharmacology 1991 Mar;30(3):245-51.

Rocha L, Ackermann RF, Engel JJr. Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. Epilepsy Res. 1996 Jun;24(2):65-72.

El Idrissi A, Messing J, Scalia J, Trenkner E. Prevention of epileptic seizures by taurine. Adv Exp Med Biol. 2003;526:515-25.

Becker A, Grecksch G, Matthies H. The influence of diazepam on learning processes impaired by pentylenetetrazol kindling. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1994 May;349(5):492-6.

Gasior M, Ungard JT, Beekman M, Carter RB, Witkin JM. Acute and chronic effects of the synthetic neuroactive steroid, ganaxolone, against the convulsive and lethal effects of pentylenetetrazol in seizure-kindled mice: comparison with diazepam and valproate. Neuropharmacology 2000 Apr 27;39(7):1184-96.

Tirassa P, Costa N, Aloe L. CCK-8 prevents the development of kindling and regulates the GABA and NPY expression in the hippocampus of pentylenetetrazole (PTZ)-treated adult rats. Neuropharmacology. 2005 Apr;48(5):732-42.

He X, Wang W, Ruan X, Li W, Zhang L. Effects of antisense glutamic acid decarboxylase oligodeoxynucleotide on epileptic rats induced by pentylenetetrazol. Chin Med J (Engl). 2002 Mar;115(3):425-9.

Holmes GL, Sarkisian M, Ben-Ari Y, Chevassus-Au-Louis N. Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. J Comp Neurol. 1999 Feb 22;404(4):537-53.

Huang LT, Yang SN, Liou CW, Hung PL, Lai MC, Wang CL, Wang TJ. Pentylenetetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. Epilepsia 2002 Jun;43(6):567-73.

【００５０】

【表２－４】

Mortazavi F, Ericson M, Story D, Hulce VD, Dunbar GL. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. Epilepsy Behav. 2005 Dec;7(4):629-38. Epub 2005 Oct 24.

Fang F, Lei H. Increased hippocampal T2 in a rat model of pentylenetetrazol-induced kindling correlates with seizure scores. J Neurol Sci. 2010; 292(1-2):16-23.

Franke H, Kittner H. Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. Pharmacol Biochem Behav. 2001 Oct-Nov;70(2-3):291-303.

Rauca C, Zerbe R, Jantze H. Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol-induced seizure and kindling. Brain Res., 847, 347–351 (1999).

Patsoukis N, Zervoudakis G, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA, Panagopoulos NT. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in the mouse cerebral cortex. Epilepsy Res 2004 Nov;62(1):65-74.

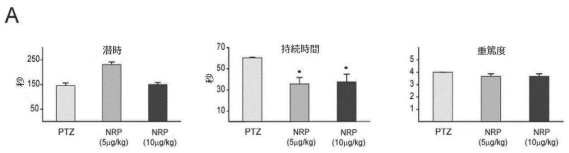
Tuunanen J, Halonen T, Pitkaenen A. Status epilepticus causes selective regional damage and loss of GABAergic neurons in the rat amygdaloid complex. Eur J Neurosci. 1996 Dec;8(12):2711-25.

Karimzadeh, F, Hosseini M, Mangeng D, Alavi H, Hassanzadeh GR, Bayat M, Jafarian M, Kazemi H, Gorji A. Anticonvulsant and neuroprotective effects of Pimpinella anisum in rat brain. BMC Complement Altern Med. 2012 Jun 18;12:76.

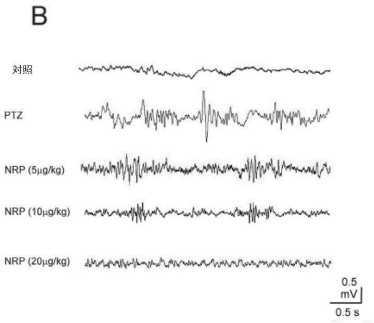
Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H. Neuroprotective properties of propofol and midazolam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. Acta Anaesthesiol Scand. 1999 Feb;43(2):153-62.

Garman RH. Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol. 2011 Jan;39(1):22-35.

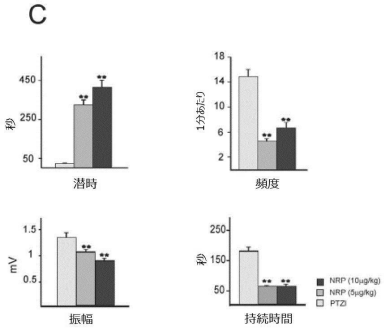
【図１Ａ】



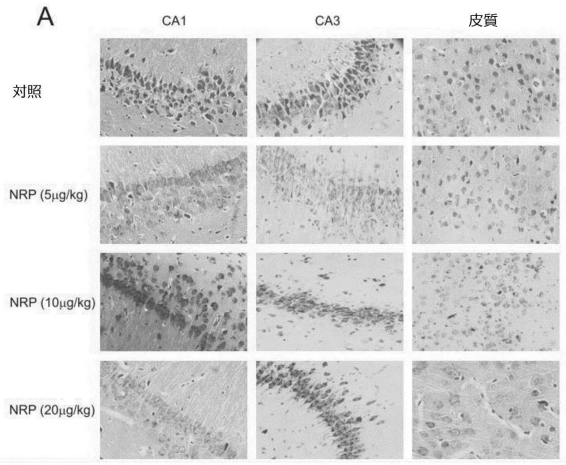
【図１Ｂ】



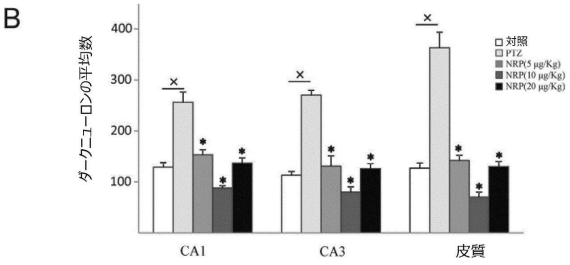
【図１Ｃ】



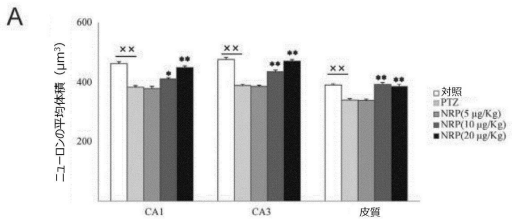
【図２Ａ】



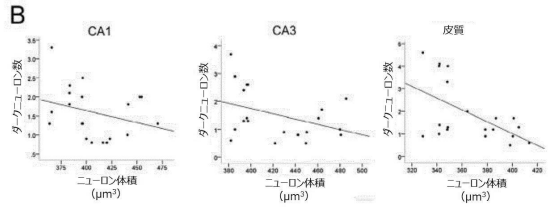
【図２Ｂ】



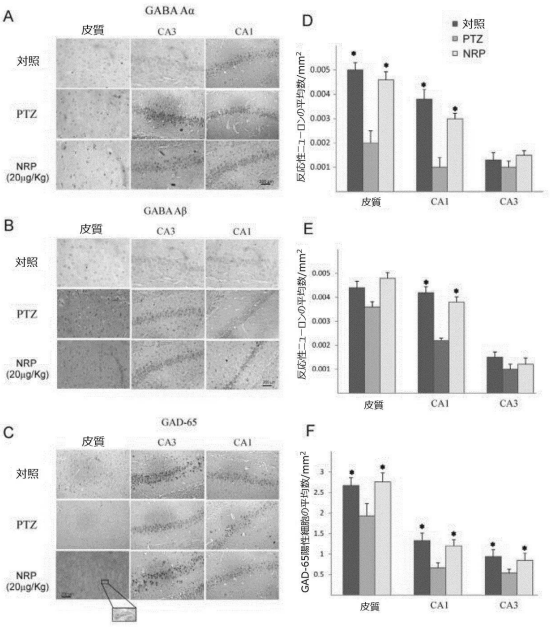
【図３Ａ】



【図３Ｂ】



【図４】



【配列表】
0006510523000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　ジーク、フランク
ニュージーランド国　０９７５　ウェルズフォード　アールディ　５　カムズ　ロード　１７３

審査官　小堀　麻子

(56)参考文献　特表２０１１－５１２３２２（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００５／０１３１２１２（ＵＳ，Ａ１）
南山堂　医学大辞典（豪華版），１９９８年，p.1973，「発作」の項
Epilepsia，２０１２年，Vol.53，No.7，p.1113-1118

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３８／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）