

(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  
2012年8月30日(30.08.2012)



(10) 国際公開番号  
WO 2012/115185 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 38/00 (2006.01) A61P 25/04 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
A61P 25/02 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/054408
- (22) 国際出願日: 2012年2月23日(23.02.2012)
- (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 2011-036855 2011年2月23日(23.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小海 康夫(KOKAI Yasuo) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 大木 豪介(OOKI Gousuke) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 松本 圭代(MATSUMOTO Kayo) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 今井 伸一(IMAI Shinichi) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 和田 卓郎(WADA Takuro) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁

目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所(CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋2-8-21 金鳳堂ビル9階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2012/115185 A1

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATMENT, AMELIORATION OR PROPHYLAXIS OF PAIN

(54) 発明の名称: 疼痛を治療、改善、または予防するための組成物

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a composition for treatment, amelioration or prophylaxis of pain. The inventors have found that metallothionein protein is expressed in healthy peripheral nerves but is not expressed in peripheral nerves experiencing pain. The inventors have also found that pain is suppressed in a rat that suffers from neuropathic pain by administering metallothionein to the rat.

(57) 要約: 疼痛を治療、改善、または予防するための組成物を提供することを目的とし、メタロチオネインタンパク質は、健全な末梢神経においては発現しているが、疼痛が生じている末梢神経においては発現が認められないことを見出した。また、神経障害性疼痛を惹起したラットにメタロチオネインを投与することによって、該ラットにおける疼痛が抑制されることを見出した。

## 明 細 書

### 発明の名称：疼痛を治療、改善、または予防するための組成物 技術分野

[0001] 本発明は、疼痛を治療、改善、または予防するための組成物および方法に関する。また、本発明は、疼痛の治療、改善、または予防に対する該組成物の有効性を判定する方法に関する。さらに、本発明は、疼痛を診断するための組成物および方法に関する。

### 背景技術

[0002] 複合性局所疼痛症候群 (Complex regional pain syndrome、CRPS) とは、骨折などの外傷や神経損傷の後に続発する疼痛が、外傷の程度とは不釣り合いに激しくかつ持続性に遷延する症候群である。これまで様々な呼称で呼ばれてきており、1867年に Mitchell が南北戦争で銃創などにより受傷した神経損傷後の灼熱痛をカウザルギー (Causalgia) と記載したのがはじまりとされている。その後も、有痛性骨萎縮症 (algodystrophy)、慢性外傷性浮腫 (chronic traumatic edema)、疼痛性外傷後骨粗鬆症 (painful post-traumatic osteoporosis) など様々な名称で呼ばれてきた。その後、外傷後の頑固な灼熱痛や異常な血管の収縮および拡張は交感神経系に原因があると提唱され、1946年に Evans により反射性交感神経性ジストロフィー (Reflex Sympathetic Dystrophy、RSD) という概念が導入された。その後、カウザルギーやRSDという呼称が疼痛関連領域で一般的に使用されてきたが、1986年の国際疼痛学会で、明らかな神経損傷を伴わないものをRSD、逆に神経損傷に伴うものをカウザルギーと明確に定義された。しかしながら、RSDの中には交感神経ブロックなどに反応しないものも存在し、病態の首座が不明瞭であるなどの様々な物議を呼び、1994年に国際疼痛学会の用語委員会により、RSDはCRPSタイプIに、カウザ

ルギーはCRPSタイプIIに統一されて定義され、現在にいたる。

[0003] CRPSの特徴としては、アロディニア、痛覚過敏、感覚低下、触覚異常、皮膚色の変化、発汗異常、皮膚の萎縮や色素沈着、皺の消失と光沢化、爪の形態変形や菲薄化、関節の可動域制限、骨萎縮、筋力低下、不随運動など様々な症状を呈する。CRPSの最大の特徴として、その疼痛の強さが挙げられる。外傷の程度に不釣り合いに強度かつ持続的な疼痛は、患者のQOLを著しく低下させる。しかしながら、CRPSの治療の現場は非常に混乱している。その最大の理由は病態の解明がなされていないためである。これまで保存的な治療法としては薬物療法（NSAIDs、ステロイド、強弱オピオイド、抗不安剤、抗痙攣剤など）、運動療法（関節可動域訓練、筋力訓練など）、ブロック療法（交感神経ブロック、背髄電気刺激療法など）、外科的治療法としては神経剥離、神経切除、神経移植など様々な治療法が試みられてきたが、未だ有効な治療法、特に有効な医薬組成物がないというのが現状である。

[0004] 一方、メタロチオネイン（metallothionein、MT）は近年中枢神経系で注目されているタンパク質である。アルツハイマー病、パーキンソン病、ALSなど様々な神経変性疾患や脳損傷後でその上昇が確認されており、さらにMTは神経再生に寄与するタンパク質であることが知られている（非特許文献1～7）。

[0005] しかしながら、MTについて、末梢神経系においてはほとんど研究されておらず、MTとCRPS等における疼痛との関係については、これまで何ら報告されていない。

### 先行技術文献

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Chung, R. S. ら、J Biol Chem、2008年、283巻、22号、15349～58ページ

非特許文献2：Chung, R. S. ら、「The native copper- and zinc-binding protein metal

lothionein blocks copper-mediated Abeta aggregation and toxicity in rat cortical neurons.」、PLoS One、2010年8月11日、5巻、8号、e12030

非特許文献3：Nagano, S. ら、Eur J Neurosci、2001年、13巻、7号、1363～70ページ

非特許文献4：Pedersen, M. O. ら、Biofactors、2009年、35巻、4号、315～25ページ

非特許文献5：Ebadi, M. ら、Exp Biol Med (Maywood)、2006年、231巻、9号、1576～83ページ

非特許文献6：Chung, R. S. ら、J Neurosci、2003年、23巻、8号、3336～42ページ

非特許文献7：Stankovic, R. K ら、Neurosci Lett、2006年、402巻、1-2号、1～6ページ

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、疼痛の発症機序に関与する分子を同定し、当該分子を利用した疼痛の治療、改善、または予防のための組成物および方法を提供することにある。また、本発明の目的は、疼痛の治療、改善、または予防に対する該組成物の有効性を、当該分子を標的として判定する方法を提供することにある。さらなる本発明の目的は、当該分子を標的とした疼痛の診断のための組成物および方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、メタロチオンイン (metallothionein、MT) タンパク質は、健常な末梢神経においては発現しているが、疼痛が生じている末梢神経においては発現が認められないことを見出した。さらに、神経障害性疼痛（神経因性疼痛

) を惹起したラットにメタロチオネインタンパク質を投与することによって、該ラットにおける疼痛が抑制されることを見出した。これらの事実から、本発明者らは、メタロチオネインタンパク質を利用して疼痛の治療などが可能であること、メタロチオネインタンパク質の発現を指標として該治療などの有効性を判定することが可能であること、さらには、メタロチオネインタンパク質の発現を指標として疼痛の診断が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] 本発明は、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

(1) メタロチオネインタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを含有する、疼痛を治療、改善、または予防するための組成物。

(2) メタロチオネインタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを投与する、疼痛を治療、改善、または予防するための方法。

(3) 被験者における疼痛の治療、改善、または予防に対する(1)に記載の組成物の有効性を判定するための方法であって、被験者から単離した試料におけるメタロチオネインタンパク質の発現を検出し、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現よりも有意に低い場合に、前記被験者における疼痛の治療、改善、または予防に対して、(1)に記載の組成物が有効性が高いと判定する方法。

(4) メタロチオネインタンパク質の発現を検出する分子を含有する、疼痛を診断するための組成物。

(5) 疼痛を診断するための方法であって、被験者から単離した試料におけるメタロチオネインタンパク質の発現を検出し、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現よりも有意に低い場合に、前記被験者は疼痛を罹患している、または疼痛を罹患する危険性を有していると判定する方法。

## 発明の効果

[0010] 本発明において、MTタンパク質の発現低下が疼痛の発症に関与しており、MTタンパク質の投与が疼痛の予防、改善、または治療において顕著な効果を示すことが明らかとなった。本発明により、新たな作用機序に基づく疼痛の治療、改善、または予防を行うことが可能となり、新たな指標により客観的に疼痛の診断を行うことが可能となった。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]ウェスタンブロッティングによって、CRPS患者の末梢神経におけるメタロチオネインタンパク質の発現を調べた結果を示す、写真である。

[図2]免疫染色によって、CRPS患者の末梢神経におけるメタロチオネインタンパク質の発現部位を調べた結果を示す、顕微鏡写真である。なお図中「MT」は抗メタロチオネイン抗体を用いて、「S100」はシュワン細胞特異的なマーカーであるS100に対する抗体を用いて、「NFM」は軸索特異的なマーカーであるNFMに対する抗体を用いて、各々免疫染色した結果を示す。

[図3]Seltzerモデルの疼痛に対するMT局所投与の効果を、von Frey test（刺激：1.26g）にて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、Seltzerモデル作製のための手術を施した日後1日目、3日目、5日目、及び7日目（Day1、Day3、Day5、及びDay7）、並びに該手術前（術前）における結果を示し、縦軸は、Seltzerモデルにおいて、右（患側）足底への刺激に対する疼痛逃避行動（Withdrawal response）の総回数から、左（健側）足底への刺激に対する疼痛逃避行動の総回数を引いた値を示す。

[図4]Seltzerモデルの疼痛に対するMT局所投与の効果を、von Frey test（刺激：4.35g）にて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、Seltzerモデル作製のための手術を施した日後1日目、3日目、5日目、及び7日目（Day1、Day3、Day5、及びDay7）、並びに該手術前（術前）における結果を示し、縦軸は、Seltzerモデルにおいて、右（患側）足底への刺激に対する疼痛逃避行動（W

ithdrawal response) の総回数から、左 (健側) 足底におけるその総回数を引いた値を示す。

[図5] Seltzerモデルの疼痛に対するMT局所投与の効果を、von Frey test (刺激: 8.75 g) にて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、Seltzerモデル作製のための手術を施した日後1日目、3日目、5日目、及び7日目 (Day 1、Day 3、Day 5、及びDay 7)、並びに該手術前 (術前) における結果を示し、縦軸は、Seltzerモデルにおいて、右 (患側) 足底への刺激に対する疼痛逃避行動 (Withdrawal response) の総回数から、左 (健側) 足底におけるその総回数を引いた値を示す。

[図6] Seltzerモデルの疼痛に対するMT局所投与の効果を、Hargreaves test にて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、Seltzerモデル作製のための手術を施した日後1日目、3日目、5日目、及び7日目 (Day 1、Day 3、Day 5、及びDay 7)、並びに該手術前 (術前) における結果を示し、縦軸は、Seltzerモデルにおいて、左 (健側) 足底に熱刺激を放射してから疼痛逃避行動をとるまでの平均時間から、右 (患側) 足底におけるその平均時間を引いた値を示す。

[図7] Seltzerモデルの疼痛に対するGST融合MTタンパク質 (GST-MT) の腹腔内投与の効果を、von Frey test (刺激: 1.26 g) にて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、Seltzerモデル作製のための手術を施した日後3日目、5日目、及び7日目 (Day 3、Day 5、及びDay 7)、並びに該手術前 (術前) における結果を示す。縦軸は、図3におけるそれと同義である。

[図8] Seltzerモデルの疼痛に対するGST-MTの腹腔内投与の効果を、von Frey test (刺激: 4.35 g) にて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、Seltzerモデル作製のための手術を施した日後3日目、5日目、及び7日目 (Day 3、Day 5、及びDay 7)、並びに該手術前 (術前) における結果を示す。縦軸は、図4におけるそ

れと同義である。

[図9] S e l t z e rモデルの疼痛に対するG S T-M Tの腹腔内投与の効果を、v o n F r e y t e s t（刺激：8.75g）にて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、S e l t z e rモデル作製のための手術を施した日後3日目、5日目、及び7日目（D a y 3、D a y 5、及びD a y 7）、並びに該手術前（術前）における結果を示す。縦軸は、図5におけるそれと同義である。

[図10] S e l t z e rモデルの疼痛に対するG S T-M Tの腹腔内投与の効果を、H a r g r e a v e s t e s tにて調べた結果を示すグラフである。なお横軸は、S e l t z e rモデル作製のための手術を施した日後3日目、5日目、及び7日目（D a y 3、D a y 5、及びD a y 7）、並びに該手術前（術前）における結果を示す。縦軸は、図6におけるそれと同義である。

### 発明を実施するための形態

[0012] <疼痛を治療、改善、または予防するための組成物、並びに方法>

本発明は、メタロチオネインタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを含有する、疼痛を治療、改善、または予防するための組成物を提供する。また、本発明は、メタロチオネインタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを投与する、疼痛を治療、改善、または予防するための方法を提供する。

[0013] 本発明において「メタロチオネインタンパク質」とは、重金属に対する親和性が高い、システイン残基が豊富なタンパク質である（以下、メタロチオネインのことを「MT」とも称する）。メタロチオネインタンパク質が由来する生物としては、特に制限はなく、例えば、ヒト、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サルなどが挙げられるが、ヒトの疼痛を治療または予防するために用いる場合には、ヒト由来であることが好ましい。ヒト

由来のMTタンパク質としては例えば、MT-1A、MT-1B、MT-1E、MT-1F、MT-1G、MT-1H、MT-1M、MT-1X、MT-2A、MT-3、及びMT-4が挙げられる。典型的には、ヒトMT-1AとしてACCESSION No. NP\_005937 (NM\_005946)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-1BとしてACCESSION No. NP\_005938 (NM\_005947)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-1EとしてACCESSION No. NP\_783316 (NM\_175617)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-1FとしてACCESSION No. NP\_005940 (NM\_005949)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-1GとしてACCESSION No. NP\_005941 (NM\_005950)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-1HとしてACCESSION No. NP\_005942 (NM\_005951)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-1MとしてACCESSION No. NP\_789846 (NM\_176870)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-1XとしてACCESSION No. NP\_005943 (NM\_005952)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-2AとしてACCESSION No. NP\_005944 (NM\_005953)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-3としてACCESSION No. NP\_005945 (NM\_005954)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられ、ヒトMT-4としてACCESSION No. NP\_116324 (NM\_032935)で特定される蛋白質(遺伝子)が挙げられる。

[0014] また、本発明における「メタロチオネインタンパク質」には、前記天然型のMTタンパク質と同等の機能を有する限り、アミノ酸の置換、欠失、付加、挿入などにより前記天然型のMTタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体が含まれる。変異は、自然界において(すなわち、非人工的に)

生じたものであっても、人為的に導入されたものであってもよい。人為的な変異の導入は、例えば、部位特異的変異誘発 (site-directed mutagenesis) 法 (Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.) により行うことができる。このような変異体におけるアミノ酸の変異数は、その機能が保持される限り、特に制限はないが、通常、10アミノ酸以内、好ましくは5アミノ酸以内 (例えば、3アミノ酸以内、2アミノ酸以内、1アミノ酸) である。

[0015] また、本発明における「メタロチオネインタンパク質」には、前記天然型のMTタンパク質と同等の機能を有する限り、前記天然型のMTタンパク質をコードするDNAと高い相同性を有するDNAによりコードされるタンパク質が含まれる。ここで「高い相同性」とは、塩基レベルで少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上 (例えば、95%以上) の配列の同一性を指す。アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、AltschulらによるアルゴリズムBLAST (J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990); Nucl. Acids Res. 17, 3389-3402 (1997)) によって決定することができる。パラメータは例えば、E value=0.01とし、その他はデフォルト値を用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

[0016] このようなタンパク質をコードするDNAは、当業者に公知のハイブリダイゼーション技術 (例えば、Hanahan, D. ら、Meth. Enzymol.、1983年、100巻、333~342ページに記載の方法、Benton, W. D. ら、Science、1977年、180~182ページに記載の方法) を利用して調製することができる。すなわち、当業者であれば、前記天然型のMTタンパク質をコードするDNA、またはその一部を利用してハイブリダイゼーションを行い、種々の他の生物からこれと相同性の高いDNAを単離し、さらに単離したDNAから前記天然型のMTタン

パク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることができる。前記天然型のMTタンパク質をコードするDNAと相同性の高いDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件としては、ハイブリダイゼーションを「6×SSC、40%ホルムアミド、25℃」、洗浄を「1×SSC、55℃」で行う条件を用いることができる。より好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6×SSC、40%ホルムアミド、37℃」、洗浄を「0.2×SSC、55℃」で行う条件、さらに好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6×SSC、50%ホルムアミド、37℃」、洗浄を「0.1×SSC、62℃」で行う条件を用いることができる。なお、当業者であれば、SSCの希釈率、ホルムアミド濃度、温度などの諸条件を適宜選択することで、上記の条件と同様のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を実現することができる。

[0017] また、前記天然型のMTタンパク質をコードするDNAと高い相同性を有するDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの遺伝子増幅技術を利用して調製することも可能である。

[0018] さらに、本発明にかかる「メタロチオネインタンパク質」には、前記天然型のMTタンパク質と同等の機能を有する限り、その部分ペプチドをも包含する。かかる部分ポリペプチドは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、さらに好ましくは20アミノ酸以上の鎖長を有するポリペプチドである。

[0019] 調製したタンパク質（変異体を含む）や部分ペプチドが、前記天然型のMTタンパク質と「同等の機能を有する」とは、これらが疼痛の予防または治療の効果を有することを意味する。当該効果を有するか否かは、後述の実施例に示すようなSeitzerモデル等を用いた、疼痛に関する行動評価によって判定することができる。

[0020] 本発明にかかるMTタンパク質は公知の手法を適宜選択して調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、前記天然型のMTタンパク質の発現量が高い腎臓や肝臓組織の抽出液に対し、抗MTタンパク質抗体を用いた

アフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、例えば、本発明にかかるMTタンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより調製することが可能である。

[0021] より具体的には、宿主が大腸菌 (*Escherichia coli*) の場合、プラスミドベクター pET-3 (Rosenberg, A. H. et al., *Gene* 56, 125-35 (1987))、pGEX-1 (Smith, D. B. and Johnson, K. S., *Gene* 67, 31-40 (1988)) などが用いられる。大腸菌の形質転換は、熱ショック法 (例えば、塩化カルシウム法、Hanahan法、Inoue法、塩化ルビジウム法)、電気穿孔法などで行うことができる。宿主が分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の場合には、プラスミドベクター pESP-1 (Lu, Q. et al., *Gene* 200, 135-144 (1997)) などが用いられる。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、電気穿孔法などにより行われる。宿主が昆虫細胞の場合には、バキュロウイルスベクター pBacPAK8/9 (BDクロンテック社) などが用いられる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、バイオテクノロジー (*Bio/Technology*), 6, 47-55 (1980)) などに記載の方法に従って行うことができる。また、宿主が哺乳動物細胞、例えば、CHO細胞、HeLa細胞などの場合、pMSG (BDクロンテック社) などのベクターが用いられる。ほ乳動物細胞への組換えDNAの導入は、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., *Virology* 52, 456-467 (1973))、DEAE-デキストラン法 (Sussman, D. J. and Milman, G., *Mol. Cell. Biol.* 4, 1641-1643 (1984))、リポフェクション法 (Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

84, 7413-7417 (1987))、電気穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J. 1, 841-845 (1982)) などで行われる。また、宿主細胞において発現させた組換えタンパク質は、公知の方法により精製することができる。例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合タンパク質の形で合成し、金属キレート樹脂、GST親和性レジンに結合させることにより精製することができる (Smith, M. C. et al., J. Biol. Chem. 263, 7211-7215 (1988))。また、ベクターとして pESP-1 を用いた場合、目的のタンパク質は、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として合成されるため、GST親和性レジンに結合させることより組換えタンパク質を精製できる。融合タンパク質から目的タンパク質を分離するには、例えば、トロンビン、血液凝固因子 Xa など で切断する。しかしながら、後述の実施例において示す通り、MTタンパク質は融合タンパク質が付加されていても、疼痛の予防または治療の効果を有している。そのため、本発明にかかるMTタンパク質においては、前記切断の処理等が不要であり、簡便かつ比較的低コストにて得られる融合タンパク質が付加されているMTタンパク質も好適に用いることができる。

[0022] 本発明にかかる「メタロチオネインタンパク質をコードする遺伝子」は、典型的なものとしては、例えば、前述の ACCESSION No. で特定される遺伝子が挙げられる。また、本発明にかかる「メタロチオネインタンパク質をコードする遺伝子が挿入されたベクター」としては、動物細胞内にて挿入された前記「メタロチオネインタンパク質をコードする遺伝子」を発現させることが可能なものであればよい。前記「メタロチオネインタンパク質をコードする遺伝子」を発現させることが可能なベクターとしては、例えば、pMSG (BDクロンテック社) 等のプラスミドDNA、レトロウイルスベクター (Danos, O. and Mulligan, R. C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

85, 6460-6464 (1988); Dranoff, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3539-3543 (1993)、アデノウイルスベクター (Wickham, T. J. et al., Cell 73, 309-319 (1993)) 等のウィルスベクター) 等が挙げられるが、これらに制限されない。

[0023] 本発明において「疼痛」とは、物理的刺激、あるいは疼痛物質（セロトニンやブラジキニンなど）による化学的な刺激を疼痛神経終末端が感知し、電気的なシグナルに変換し温痛覚求心経路である外側脊髄視床路を通過し、大脳の中心後回が痛みとして認識した結果を意味する。本発明における疼痛としては、特に制限されることなく、例えば、絞扼性神経障害、難治性疼痛、脊椎疾患において生ずる疼痛が挙げられる。

[0024] 絞扼性神経障害としては、例えば、手根管症候群、肘部管症候群、Guyon管症候群、胸郭出口症候群、足根管症候群、Morton病が挙げられる。難治性疼痛としては、例えば、CRPS、糖尿病性ニューロパチー、腕神経損傷、肋間神経痛（帯状疱疹後神経痛）、癌性ニューロパチー、有痛性神経腫、幻肢痛、術後疼痛症候群などのいわゆる神経障害性疼痛（神経因性疼痛）が挙げられる。なお「神経障害性疼痛」とは、神経系の一次的な損傷、あるいはその機能異常が原因となって生じた疼痛であり、神経毒性物質や化学療法等による神経障害や、外傷による末梢神経損傷、四肢切断による幻肢痛、椎間板ヘルニアによる神経根症、代謝性疾患、感染症、腫瘍浸潤、脊髄損傷、脳卒中、多発性硬化症など様々な原因によって生じる疼痛を意味する。また、脊椎疾患としては、頸椎／腰椎椎間板ヘルニア、脊髄損傷、脊柱管狭窄症が挙げられる。

[0025] これら全ての疾患は、末梢神経に物理的もしくは化学的な傷害が加わることによって起こる疼痛を伴う。従って、後述の表4において示すように、有痛性神経腫（1人は切断の結果できたアンプテーションニューローマ（断端神経腫）、もう1人はリストカット後に生じた神経腫）においてもMTタンパク質が消失していたことから明らかなように、かかる末梢神経障害（傷害

)においてはMTタンパク質は消失または減少しており、また後述の実施例3及び4において示すように、それら傷害を受けている末梢神経にMTタンパク質を投与することで、かかる疼痛は緩和されるため、本発明の組成物はこれら疾患における疼痛の治療、改善、または予防に好適に用いることができ、神経障害性疼痛における疼痛の治療、改善、または予防により好適に用いることができ、CRPSにおける疼痛の治療、改善、または予防に特に好適に用いることができる。

[0026] 本発明の組成物は、医薬組成物、飲食品（動物用飼料を含む）、あるいは研究目的（例えば、インビトロやインビボの実験）に用いられる試薬の形態であり得る。

[0027] 本発明の組成物は、疼痛を緩和する作用を有するため、疼痛、例えば、前記絞扼性神経障害、難治性疼痛、脊椎疾患において生ずる疼痛などの治療または予防のために投与される医薬組成物として、また、疼痛の改善または予防のために日常的に摂取される飲食品として好適に用いることができる。

[0028] 本発明の組成物は、公知の製剤学的方法により製剤化することができる。例えば、カプセル剤、錠剤、丸剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、咀嚼剤、バッカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤、乳剤、塗布剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、経皮吸収型製剤、ローション剤、吸引剤、エアゾール剤、注射剤、坐剤などとして、経口的または非経口的に使用することができる。

[0029] これら製剤化においては、薬理学上許容される担体または媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、溶剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、芳香剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等と適宜組み合わせることができる。また本発明の組成物を医薬組成物として用いる場合には、絞扼性神経障害、難治性疼痛、脊椎疾患などの前記疾

患の治療または予防に用いられる公知の医薬組成物と併用してもよい。

[0030] 本発明の医薬組成物の投与方法としては特に制限はなく、例えば、経口投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、皮内投与、神経内投与、気道内投与、直腸投与、筋肉内投与、輸液による投与が挙げられる。また、本発明の医薬組成物の好ましい投与方法としては、疼痛が生じている末梢神経への直接注射、疼痛が生じている末梢神経付近の皮膚への注射、経皮吸収型製剤等による経皮投与、腹腔内投与が挙げられ、より好ましい投与方法としては、腹腔内投与が挙げられる。

[0031] 本発明の組成物を飲食品として用いる場合、当該飲食品は、例えば、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養補助食品、病者用食品、食品添加物、あるいは動物用飼料であり得る。本発明の飲食品は、上記のような組成物として摂取することができる他、種々の飲食品として摂取することもできる。飲食品の具体例としては、食用油、ドレッシング、マヨネーズ、マーガリンなどの油分を含む製品；スープ類、乳飲料、清涼飲料水、茶飲料、アルコール飲料、ドリンク剤、ゼリー状飲料、機能性飲料等の液状食品；飯類、麺類、パン類等の炭水化物含有食品；ハム、ソーセージ等の畜産加工食品；かまぼこ、干物、塩辛等の水産加工食品；漬物等の野菜加工食品；ゼリー、ヨーグルト等の半固形状食品；みそ、発酵飲料等の発酵食品；洋菓子類、和菓子類、キャンディー類、ガム類、グミ、冷菓、氷菓等の各種菓子類；カレー、あんかけ、中華スープ等のレトルト製品；インスタントスープ、インスタントみそ汁等のインスタント食品や電子レンジ対応食品等が挙げられる。さらには、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、液状、ペースト状またはゼリー状に調製された健康飲食品も挙げられる。本発明の組成物は、ヒトを含む動物を対象として使用することができるが、ヒト以外の動物としては特に制限はなく、種々の家畜、家禽、ペット、実験用動物などを対象とすることができる。具体的には、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サルなどが挙げられるが、これらに制限されない。

- [0032] 本発明における飲食品の製造は、当該技術分野に公知の製造技術により実施することができる。当該飲食品においては、絞扼性神経障害、難治性疼痛、脊椎疾患などの前記疾患の改善または予防に有効な1種もしくは2種以上の成分を添加してもよい。また、疼痛の緩和以外の機能を発揮する他の成分あるいは他の機能性食品と組み合わせることによって、多機能性の飲食品としてもよい。
- [0033] 本発明の組成物を投与または摂取する場合、その投与量または摂取量は、対象の年齢、体重、症状、健康状態、組成物の種類（医薬品、飲食品など）などに応じて、適宜選択される。例えば、1回当たりの本発明の医薬組成物の投与量は、有効成分であるタンパク質量として、 $800\text{ ng/kg}$ 体重～ $8\text{ mg/kg}$ 体重が好ましい。遺伝子として投与する場合には、発現するタンパク質が上記投与量の範囲となるように投与することが好ましい。
- [0034] このように本発明は、本発明の組成物を対象に投与もしくは摂取させること等によって、疼痛を治療、改善、または予防することができる。従って、本発明は、メタロチオネインタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを投与する、疼痛を治療、改善、または予防するための方法をも提供するものである。
- [0035] 本発明の組成物の製品（医薬品、飲食品、試薬）またはその説明書は、疼痛を治療、改善、または予防するために用いられる旨の表示を付したものであり得る。ここで「製品または説明書に表示を付した」とは、製品の本体、容器、包装などに表示を付したこと、あるいは製品の情報を開示する説明書、添付文書、宣伝物、その他の印刷物などに表示を付したことを意味する。
- [0036] なお、本発明においては、メタロチオネインタンパク質の発現を促進する分子を投与して、疼痛を治療、改善、または予防する態様も考えられる。従って、本発明は、メタロチオネインタンパク質の発現を促進する分子を含有する、疼痛を治療、改善、または予防するための組成物を提供することができる。さらに、本発明は、メタロチオネインタンパク質の発現を促進する、疼痛を治療、改善、または予防するための方法も提供することができる。

[0037] 本態様における「メタロチオネインタンパク質の発現の促進」は、最終的にメタロチオネインタンパク質の発現が促進される限り、転写段階における促進および翻訳段階における促進のいずれによるものであってもよい。「メタロチオネインタンパク質の発現を促進する分子」としては、例えば、メタロチオネインタンパク質の合成を誘導することが知られている、カドミウム、ビスマス、および銅などの金属、並びにこれらの金属塩が挙げられる（関ら、治療、2006年7月、88巻、7号、1853～1858ページ 参照）。また、パーキンソン病モデルのラットに対して、ペルゴリドメシル酸塩（pergolide mesilate）を投与することによって、線状体でのメタロチオネイン mRNAの濃度を上昇させるといった報告があることから、ペルゴリドメシル酸塩も挙げられる（Onoら、Biol. Pharm. Bull.、2009年、32巻、1813～1817ページ 参照）。さらに、本発明にかかる「メタロチオネインタンパク質の発現を促進する」方法としては、例えば、ALS患者脳内のメタロチオネインmRNAの濃度が、運動療法によって上昇することが知られていることから、運動療法が挙げられる。

[0038] <疼痛の治療、改善、または予防に対する本発明の組成物の有効性を判定する方法>

本発明は、被験者における疼痛の治療、改善、または予防に対する前述の組成物の有効性を判定するための方法であって、被験者から単離した試料におけるメタロチオネインタンパク質の発現を検出し、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現よりも有意に低い場合に、前記被験者における疼痛の治療、改善、または予防に対して、本発明の組成物の有効性が高いと判定する方法を提供する。

[0039] 本発明において、「被験者」とは特に制限はなく、例えば、ヒト、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サルなどが挙げられる。また、疼痛（例えば、前記、絞扼性神経障害、難治性疼痛、脊椎疾患において生ず

る疼痛)を患っていてもいなくともよい。

[0040] 本発明において、「被験者から単離した試料」とは、健常者においてメタロチオネインタンパク質の発現が確認されている細胞、組織、体液等であればよく、例えば、血液、末梢神経、皮膚、粘膜が挙げられる。また、試料の単離の方法は特に限定されることなく、対象の細胞、組織、体液等に適した公知の手法を適宜採用することができる。なお、本発明において「健常者」とは、疼痛(例えば、前記、絞扼性神経障害、難治性疼痛、脊椎疾患において生ずる疼痛)を患っていない者のことを意味する。

[0041] 本発明において、「メタロチオネインタンパク質の発現」とは、メタロチオネインタンパク質をコードする遺伝子の転写および翻訳の双方を含む意である。従って、本発明における「タンパク質の発現の検出」には、メタロチオネインタンパク質の検出のみならず、メタロチオネインmRNAの検出も含まれる。なお、メタロチオネインタンパク質又はメタロチオネインmRNAの前記試料からの単離の方法は特に限定されることなく、対象の細胞、組織、体液等に適した公知の手法を適宜採用することができる。

[0042] 本発明における「メタロチオネインタンパク質の発現の検出」には、公知の手法を用いることができる。メタロチオネインタンパク質を検出する方法としては、例えば、免疫組織化学的染色法、イメージングサイトメトリー、フローサイトメトリー、ELISA法、ラジオイムノアッセイ、免疫沈降法、イムノブロットイング、抗体アレイ、等のメタロチオネインタンパク質に結合する抗体を用いて検出する方法(免疫学的手法)が挙げられる。またメタロチオネインタンパク質をコードするmRNAを検出する方法としては、例えば、RT-PCR、DNAマイクロアレイ解析法、ノーザンブロットイング、*in situ* ハイブリダイゼーション、ドットブロット、RNAseプロテクションアッセイ法が挙げられる。

[0043] 被験者から単離した試料におけるメタロチオネインタンパク質の発現の検出の結果、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現よりも有意に低い場合、前記被験者における疼痛の治療、改善、または予防に

対して、本発明の組成物が有効性が高いと判定される。逆に、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現と同等である場合、前記被験者における疼痛の治療、改善、または予防に対して、本発明の組成物が有効性は高くないと判定される。

[0044] <疼痛を診断するための組成物および方法>

本発明は、メタロチオネインタンパク質の発現を検出する分子を含有する、疼痛を診断するための組成物を提供する。また、本発明は、疼痛を診断するための方法であって、被験者から単離した試料におけるメタロチオネインタンパク質の発現を検出し、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現よりも有意に低い場合に、前記被験者は疼痛を罹患している、または疼痛を罹患する危険性を有していると判定する方法を提供する。

[0045] 本発明において「メタロチオネインタンパク質の発現を検出する分子」とは、当該検出が可能である限り特に制限はなく、例えば前述の「メタロチオネインタンパク質の発現の検出」において列挙した方法に用いられる分子が挙げられる。具体的には、メタロチオネインタンパク質に結合する抗体、メタロチオネインタンパク質をコードする mRNA に対して特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチド（ポリヌクレオチドプライマー、ポリヌクレオチドプローブ等）が挙げられる。当該ポリヌクレオチドは、通常、メタロチオネインタンパク質をコードする mRNA の塩基配列と相補的な少なくとも 15 塩基の鎖長を有する。ここで「相補的」とは、検出が可能である限り、すべての塩基配列が（すなわち、完全に）相補的でなくともよい。これら抗体やポリヌクレオチドは、必要に応じて標識されていてもよい。これら抗体やポリヌクレオチドの作成方法や標識方法は、当業者に公知である。

[0046] 組成物には、メタロチオネインタンパク質の発現を検出する上記分子以外に、他の成分を含むことができる。このような他の成分としては、例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩、標識化合物、二次抗体などが挙げられる。賦形剤としては乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができ

る。崩壊剤としてはデンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としてはリン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としてはアラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としてはモノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。安定剤としてはプロピレングリコール、ジエチリン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としてはフェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

[0047] 当該組成物は、診断に必要な他の標品と組み合わせてキットとすることもできる。他の標品としては、標識の検出に必要な基質、陽性対照や陰性対照、あるいは試料の希釈や洗浄に用いる緩衝液等が挙げられる。また、標識されていない抗体を標品とした場合には、当該抗体に結合する物質（例えば、二次抗体、プロテインG、プロテインAなど）を標識化したものを、キットに含めることができる。さらに、キットには、その使用説明書を含めることができる。

## 実施例

[0048] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0049] (実施例1)

### <CRPS患者の末梢神経についてのプロテオミクス解析>

CRPS患者の末梢神経3検体（表1に記載の「CRPS1~3」）、コントロール（健常神経）として新鮮遺体から摘出した腓腹神経2検体（表1に記載の「コントロール1~2」いずれも摘出後は-80℃で保存しておいた）から、タンパク質抽出を行った（用いた神経の詳細については表1 参

照)。すなわち、各神経検体5mmを、抽出バッファー(40mM Trisベース、0.5% Triton X-100、10% グリセロール、5mM EDTA、2mM Pefabloc) 200 $\mu$ L内にてホモゲナイズを行い、その後4 $^{\circ}$ Cにて30分間振動させ、さらに4 $^{\circ}$ C、10万Gにて30分超遠心処理を施し、可溶性画分と不溶性画分とに分離した。得られた不溶性画分に、さらに1% SDSを100 $\mu$ L加えて、70 $^{\circ}$ Cで30分間加温後、22 $^{\circ}$ C、40000gにて30分間超遠心を行い、上清を抽出した。可溶性画分はTCAにて処理し、沈殿させた後SDS-U(0.2M Tris-HCl、4% SDS、8M ウレア、0.1% DTT、0.01% ブロモフェノールブルー)に溶解した。また、不溶性画分の上清もSDS-Uに溶解した。なお、CRPS患者の末梢神経は治療として神経切除術を行った際に患者の同意を得たものであり、健常神経は札幌医科大学に献体として提供されたものである。

[0050] 得られたタンパク質抽出液について、プロテオミクスの手法を用いて、質量分析装置にて、ペプチド解析を行った。すなわち先ず、8~20%ポリアクリルアミドゲルに、前記可溶性画分及び前記不溶性画分のタンパク質をそれぞれ200 $\mu$ gセットして、約10cm進むまで(10Vにて一晩)泳動して分画した。次いで、このポリアクリルアミドゲルを、Ez Stain Silver キット(Atto社製)を用いて銀染色した後、固定液(メタノール100mL、超純水(例えば、Milli-Q水、以下同じ)80mL、酢酸20mL、S-1液2mL)に浸し10分振とうした。そして、この固定液を排液した後、超純水に浸し10分振とうし、ポリアクリルアミドゲルを洗浄し、さらにこの超純水を排液した。この洗浄操作を3回繰り返した後、ポリアクリルアミドゲルを染色液(超純水200mL、S-2液2mL)に浸し、5分振とうした後、この染色液を排液した。次いで、ポリアクリルアミドゲルを超純水に浸し、正確に30秒振とうした後、排液した。そして、発色液(超純水400mL、S-3液2mL、S-4液2mL)の半分ポリアクリルアミドゲルを浸し、正確に30秒振とうした後、排液し、

さらに発色液の残りの半分に浸し適度な色がつくまで振とうし、排液した。次いで、ポリアクリルアミドゲルを停止液（超純水500mL、酢酸5mL）に浸し10分振とうした後、OHPスキニングでバンド（分画された前記可溶性画分及び前記不溶性画分のタンパク質）の確認を行った。

[0051] 次に、OHPスキニングにて確認されたバンドの同定を行うために、前述の通りに銀染色を施したポリアクリルアミドゲルを、還元・アルキル化処理し、さらにトリプシン処理を施した。すなわち、前記ポリアクリルアミドゲルを50mM Tris (pH8.8) に浸して1分振とうした後、排液し、さらに10mM DTT液（DTT粉末0.5gを50mM Tris (pH8.8) 50mlに溶解した液）に浸して15分振とうした後、排液した。次いで、ポリアクリルアミドゲルをIAA溶液（Iodoacetamide）粉末1gを50mM Tris (pH8.8) 50mlに溶解した液）に浸して15分振とうした後、排液した。そして、ポリアクリルアミドゲルを停止液（1%酢酸）に浸して10分振とうした。次いで、このように処理したポリアクリルアミドゲルに切れ目を入れて、1mm区画のサイコロ状にした。そして、得られたサイコロ状のゲルにACNを加えて10分振動した後、このACNを除去した。次いで、Speed Vacにて15分間処理し、これらのゲルを乾燥させた。そして、かかる乾燥したゲルに100mM Ambicを加え、10分振動した後、このAmbicを除去した。次いで、ACNを加えて10分振動した後、このACNを除去した。そして、Speed Vacにて15分間処理し、これらのゲルを乾燥させた。さらに、かかる乾燥したゲルに100mM Ambicを加え、30分振動した後、このAmbicを除去した。次いで、ACN（750 $\mu$ l）を加えて10分振動した後、このACNを除去した。そして、Speed Vacにて30分間処理し、これらのゲルを乾燥させた。このようにして得られた、乾燥したゲルにトリプシン溶液（12.5ng/ $\mu$ L in 50mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、5mM  $\text{CaCl}_2$ ）を加えて、37 $^\circ\text{C}$ にて一晩インキュベーションした。

[0052] 次に、前述の通りにトリプシン処理を施したゲルからペプチドを抽出し、質量分析を行った。すなわち、前記トリプシン処理を施したゲルに20 mM Ambicを加え、20分間超音波処理を施し、軽く遠心を加えた後、液を回収した。次いで、回収した液に、5%FA/50%ACNを加え、20分間超音波処理を施し、軽く遠心を加えた後、液を回収し、この回収操作を3回繰り返した。そして、回収した液を22℃、20KGにて20分間遠心した。そして、得られた上清を上清を新たなエッペンドルフチューブに移し、液量が約50μLになるまで蒸発させた。次いで、15分間超音波処理を施した後、超遠心用のチューブにうつし、22℃、40KGにて30分間超遠心した。このようにして得られたサンプルを4800 plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems社製)で解析し、5検体(CRPS3検体、Fresh cadaver2検体)から得られたMS、MS/MSのデータを質量分析装置専用のソフトウェア(protein pilot ver3.)を用いて、データベース解析を行い、タンパク質の同定を行った。得られた結果のうち、CRPS患者の末梢神経においてタンパク質の発現が認められなかったものについて、表2に示す。なお、表2中、「unused (Prot Score)」は、タンパク質の同定に使用したペプチドの信頼度から計算されるスコアを示す。

[0053] [表1]

	採取神経	年齢	性別
CRPS1	尺骨神経手背枝	38	女性
CRPS2	固有掌側母指神経	47	男性
CRPS3	正中神経掌側皮枝	76	女性
コントロール1	腓腹神経	80	男性
コントロール2	腓腹神経	88	女性
コントロール3	腓腹神経	86	女性

[0054]

[表2]

タンパク質名	アクセッション No.	Unused (Prot Score)	被覆率 (%)
メタロチオネイン2A (Metallothionein 2A)	spt P02795	7.38	83.6
メタロチオネイン1H (Metallothionein-1H)	spt P80294	4	34.4
C反応性タンパク質前駆体 (C-reactive protein precursor)	spt P02741	4	13.4
OTTHUMP0000030191	trm Q9NTT1	2.08	12.9
PHYHD1 タンパク質	trm Q7Z7P9	2	4.4
メタロチオネイン1G (Metallothionein-1G)	spt P13640	0.77	67.2
MTE	trm Q86YX3	0.55	34.4

[0055] 上記解析の結果、CRPS患者の末梢神経においてに特異的に上昇しているタンパク質はなかったが、CRPS患者の末梢神経において特異的に発現

していないものとしてメタロチオネイン (MT) が見出された (表2 参照)。

[0056] (実施例2)

<CRPS患者の末梢神経におけるMTの発現分析>

次に、前記CRPS患者の末梢神経についてのプロテオミクス解析の結果を受けて、CRPS患者の末梢神経におけるMTタンパク質の発現並びにその局在をウェスタンブロッティング及び免疫染色にて分析した。得られた結果を図1、図2、表3、及び表4に示す。なお、表3は各サンプル (CRPS患者の末梢神経 (CRPS 1~3) 及び健常神経 (コントロール1~3)) における各タンパク質 (MT、S100、NFM) に対する染色強度を示す。表4は、CRPS検体5検体、有痛性神経腫2検体、および整形外科疾患で広範囲切除を行った病理ブロックに含まれている末梢神経57検体の免疫染色をさらに行った結果、すなわち各サンプル (CRPS患者、有痛性神経腫患者、新鮮屍体、良性腫瘍、及び悪性腫瘍の患者の末梢神経) におけるMTタンパク質の発現を免疫染色の陽性又は陰性にて示す。また、ウェスタンブロッティング及び免疫染色の方法は下記に示す通りである。

[0057] <ウェスタンブロッティング>

各サンプルをSDS-PAGEにて分画した。すなわち、先ず、5mmの末梢神経サンプルを、100 $\mu$ L T-PER (登録商標) Tissue Protein Extraction Reagent、1 $\mu$ L Halt (登録商標) protease inhibitor、及び1 $\mu$ L 0.5M EDTA (Thermo社製) 内でホモゲナイズした。次いで、4 $^{\circ}$ Cにて30分間振動を加えた後、4 $^{\circ}$ C、40KGにて超遠心を行い、上清を取り分けた。得られた上清のタンパク質の濃度測定をBCA法にて行い、タンパク質量10 $\mu$ gに対して泳動バッファー (0.6125M Tris-HCl pH6.8、10%SDS、50%グリセロール、0.02%ブロモフェノールブルー) と終濃度50mMのDTTとを加え、65 $^{\circ}$ Cにて20分間加温した。そして、このように調製したサンプルを10~20

%ポリアクリルアミドミニゲルにロードし、30 mA C. C. (定電流)にて泳動した。

[0058] 前記SDS-PAGEに供したゲルを、転写バッファー(2 mM CaCl<sub>2</sub>含有 10 mM CAPS/10%メタノール)にて、電圧40 Vを1時間かけ、PVDF膜に各サンプル由来のタンパク質を転写した。次いで、タンパク質が転写された膜を2.5%グルタルアルデヒド溶液に1時間浸した後、PBSにて5分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した(ただし、3回目は50 mMとなるようモノエタノールアミンを加えたPBSにて洗浄を行った)後、5%スキムミルク溶液にて1時間ブロッキング処理を行った。そして、膜をPBSにて軽くリンスした後、室温下、湿箱にて各一次抗体と2時間反応させた。なお、用いた一次抗体は下記の通りである。

抗メタロチオネイン抗体(Dako社製、製品番号:M0639、マウス由来モノクローナル抗体)は、メタロチオネインタンパク質のN末端から5~7個のアミノ残基を認識する抗体であり、MT-1及びMT-2の全てのアイソフォームに結合する。また、本ウェスタンブロットティングに使用の際には、0.1% BSA/PBSにて100分の1に希釈して使用した。抗アクチン抗体(SIGMA社製、製品番号:A2103、ウサギ由来ポリクローナル抗体)は、各サンプルにおける内部標準としてアクチンを検出するために用いた抗体であり、本ウェスタンブロットティングに使用の際には、0.1% BSA/PBSにて500分の1に希釈して使用した。

[0059] このようにして各一次抗体と反応させた膜を、1%スキムミルク及び0.1% Tween 20を含有するPBS溶液にて5分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、さらにPBSにて膜を軽くリンスした。そして、膜を、室温下、湿箱にて各一次抗体に対応する二次抗体と30分間反応させた。なお、用いた二次抗体は下記の通りである。

ヤギ由来抗マウスIgG抗体(Thermo社製、#31432)を、抗メタロチオネイン抗体の検出のために、0.1% BSA/PBSにて1000分の1に希釈して使用した。

ヤギ由来抗ウサギIgG抗体（IBL社製、#17502）を、抗アクチン抗体の検出のために、0.1% BSA/PBSにて2000分の1に希釈して使用した。

[0060] このようにして各二次抗体と反応させた膜を、1%スキムミルク及び0.1% Tween 20を含有するPBS溶液にて5分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、さらにPBSにて膜を軽くリンスした。そして、膜をSuperSignal（登録商標）West Pico Chemiluminescent Substrate（Thermo社製）と室温にて1分間反応させた。次いで、暗室にて露光および現像処理を行い、メタロチオネインタンパク質及びアクチンタンパク質を検出した。

[0061] <免疫染色>

先ず、各末梢神経検体を10%ホルマリンにて固定した後、パラフィンにて包埋した。次いで、各末梢神経検体を薄切りに切片にした後、脱パラフィン処理を行い、3% $H_2O_2$ メタノールに10分間浸した後、PBSにて3分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、抗原賦活化溶液（pH9、ニチレイ社製）を加えて105℃にて15分間オートクレーブ処理を施した。次いで、粗熱をとった後、PBSにて3分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、ブロッキング試薬（ブロックエース、雪印社製）を各切片（スライド）上に2滴（約100 $\mu$ L）載せた。そして、各1次抗体を100 $\mu$ L載せて、1時間各切片と反応させた。なお、用いた一次抗体は下記の通りである。

抗メタロチオネイン抗体（Dako社製、製品番号：M0639、マウス由来モノクローナル抗体）は、メタロチオネインタンパク質のN末端から5～7個のアミノ残基を認識する抗体であり、MT-1及びMT-2の全てのアイソフォームに結合する。また、本免疫染色に使用の際には、50分の1に希釈して使用した。

抗S100抗体（DAKO社製、N1573、ウサギ由来ポリクローナル抗体）は、シュワン細胞特異的なマーカーであるS-100A1及びBを認識

する抗体である。また、本免疫染色に使用の際には、製造会社提供の濃度そのままにて使用した。

抗NFM抗体（invitrogen社製、13-0700、マウス由来モノクローナル抗体）は、軸索特異的なマーカーであるNFMのC末端を認識する抗体である。また、本免疫染色に使用の際には、100分の1に希釈して使用した。

[0062] このようにして各一次抗体と反応させた切片を、PBSにて3分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、各一次抗体に対応する二次抗体を100 $\mu$ L載せて、30分間各切片と反応させた。なお、二次抗体は、Envision（DAKO ChemMate社製）ユニバーサルキットに含まれている抗体を用いた。

[0063] このようにして各二次抗体と反応させた切片を、PBSにて3分間洗浄した。この洗浄操作を3回繰り返した後、DAB発色液100 $\mu$ L載せて、10分間各切片と反応させた。また、ヘマトキシリンにて核染色を施した後、脱水、封入処理を行い、顕微鏡下にて観察を行った。

[0064] [表3]

	MT	S100	NFM
CRPS1	-	+	+
CRPS2	-	+	+
CRPS3	-	+	+
コントロール1	++	++	+
コントロール2	+	++	+
コントロール3	++	++	+

[0065]

[表4]

	検体数	平均年齢	男:女	陽性	陰性
CRPS	5	52±14.4	1:4	0	5
有痛性神経腫	2	44.5±13.4	1:1	0	2
新鮮屍体 (Fresh cadaver)	5	84±7.1	3:2	5	0
良性腫瘍	5	51±16.4	2:3	5	0
悪性腫瘍					
脱灰あり	11	28.6±25.2	7:4	2	9
脱灰なし					
術前化学療法あり	10	50.2±15	4:6	10	0
術前化学療法なし	26	64.7±16.9	12:14	26	0

[0066] 図1に示した結果から明らかなように、前記プロテオミクス解析の結果と

一致して、健常な神経においてはMTタンパク質が発現しているのに対し、CRPS患者の末梢神経においてはその発現が認められなかった。

[0067] また図2及び表3に示した結果から明らかなように、免疫染色にてMTの局在を評価した結果、MTタンパク質は軸索においては、その発現が認められないものの、シュワン細胞においては発現していた。また図には示していないが、表4に示した結果から明らかなように、全ての有痛性末梢神経（CRPS5検体及び有痛性神経腫2検体）においてMTタンパク質の発現は認められず、それ以外の末梢神経57検体では、組織標本に脱灰操作が加えられていた9検体を除いた全てにおいてMTタンパク質の発現が認められた。

[0068] （実施例3）

<SelzerモデルへのMTタンパク質の局所投与実験>

前述の結果を受けて、神経障害性疼痛（神経因性疼痛）を惹起するSelzerモデルにMTタンパク質を局所投与し、該モデルにおける疼痛に対するMTタンパク質の効果の有無を調べた。得られた結果を図3～6に示す。なお、用いたモデルラット、及び該モデルラットに投与したMTタンパク質の調製方法、並びに該モデルラットの評価方法等は下記に示す通りである。また、Selzerモデルは、坐骨神経部分結紮（坐骨神経部分損傷、partial sciatic nerve ligation, PSL）モデルとも称され、神経障害性疼痛のモデルとして解釈されている（佐々木ら、日薬理誌、2006年、127巻、151～155ページ 参照）。

[0069] <Selzerモデルの調製方法>

SDラット8匹（雌、体重：240～260g）に対して、坐骨神経部分結紮モデル（Selzerモデル）の手術を施行した。すなわち、該ラットにペントバルビタールナトリウム 50mg/kgを腹腔内投与し、麻酔した後、腹臥位として右大腿近位部を約2cm切開して進入し、坐骨神経を露出させた。次いで、大腿骨転子部付近で、坐骨神経がposterior biceps semitendinosusの分枝を出したすぐ遠位において、坐骨神経の背側1/3～1/2を8-0ナイロンで硬く結紮した。

そして、筋膜及び皮膚を4-0ナイロンで縫合した。

[0070] <MTタンパク質の調製方法>

先ず、末梢神経検体より、total RNAをTRI Reagent (登録商標、SIGMA社製)を用いて抽出し、SuperScript Synthesis System (Invitrogen社製)にてcDNAの合成を行った。そして、得られた各cDNAを鋳型として、下記プライマーを用いて、ヒトMT2Aの全長をPCRにて増幅した。

[0071] プライマーの配列

5' -GAAGATCTATGGATCCCAACTGCTCCTG-3'

(配列番号: 1)

5' -GGAATTCAGGCGCAGCAGCTGCACTTG-3' (

配列番号: 2)

次いで、プラスミド (pGEX-6P-1、GE Healthcare社製) はBamH1及びEcoR1にて制限酵素処理を行い、増幅して得られたヒトMT2Aの全長はBgl2及びEcoR1にて制限酵素処理を行った後、Ready-To-Go T4 DNA Ligase (GE Healthcare社製)を用いて連結し、ヒトMT2Aの全長タンパク質を発現することが可能なプラスミドベクターを構築した。そして、得られたプラスミドベクターを大腸菌 (BL21) に導入した。

[0072] 次いで、この大腸菌を、50 µg/mlアンピシリン及び0.2%グルコース含有LB培地2 mL中、37°C、250 r/minにて振とうさせながら、一晩インキュベーションした。そして翌日、該培養液500 µLを、50 µg/mlアンピシリン及び0.2%グルコース含有LB培地50 mlに加えて、37°C、250 r/minにて振とうさせながら、さらに一晩インキュベーションした。次いで翌朝、該培養液のODを計測してスケールアップ後にOD600が0.1になるように調整し、得られた調整後の培養液10 mLを1 mM ZnSO<sub>4</sub>含有LB培地500 mLに加えて、OD600が0.8になるまで37°C、250 r/minにて振とうさせながらインキュ

ベーションした。そして、かかるインキュベーション後、0.1M IPTG溶液を終濃度0.1mMとなるように加えて、さらに30℃、250r/minにて振とうさせながら8時間インキュベーションした。次いで、得られた培養液を4℃、5000gにて、15分間遠心した後、上清を破棄し、ペレットのみとした。そして、得られたペレットをPBSにて洗浄した後、4℃、4000rpmにて、20分間遠心し、上清を破棄した。次いで、溶解バッファー（50mM Tris-HCl pH7.4、0.25M スクロース、1% Triton X-100、1mM EDTA、1mM DTT、1×Complete（プロテアーゼインヒビター、Roche社製、製品番号：1873580）、1mM PMSF）に得られたペレットを懸濁した後、超音波処理を施した。そして、4℃、10000gにて30分間遠心した後、上清を回収した。次いで、回収して得られた上清にグルタチオン セファロース 4Bゲル（GS4Bゲル、GE Healthcare社製）を加えて室温にて1時間ローテーション処理を施した。そして、このGS4Bゲル混合液を4℃、500gにて5分間遠心した後、上清を破棄し、GS4Bゲルを回収した。回収して得られたGS4BゲルをPBSにて洗浄した後、カラムに分注し、さらにPBSおよび切断用バッファー（50mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT）にて洗浄した。そして、1mLの酵素液（切断用バッファー920μL、及び切断プロテアーゼ（Precision Protease）80μL）を加えた後、4℃にて4時間静置した。次いで、このカラムに切断用バッファーを加えて、組み換えヒトMT2Aタンパク質を回収した。

[0073] <SeltzerモデルへのMTタンパク質の投与>

前記手術直後に、治療群には、前記メタロチオネイン2A組み換えタンパク質（recombinant-Metallothionein2A、rMT2A）を、対照群にはPBSを投与した。すなわち、手術当日にrMT2A 20μgをPBSにて希釈して0.1mLとしたものを前記Selt

zerモデルの坐骨神経に27G針を刺入し、神経内に投与した（対照群はPBS 0.1mlを投与した）。そして、その後6日間はrMT2A 10 $\mu$ gをPBSにて希釈して0.4mLとしたものを毎日、経皮的に神経周囲に局所注射した（対照群はPBS 0.4mLを局所注射した）。

[0074] <Seltzerモデルの行動評価>

前記モデルラットの行動評価は下記の通り、von Frey test およびHargreaves testにて、術前、術後1、3、5、7日目に行った。

[0075] - von Frey test -

金網状の台の上にプラスチックケースを設置し、前記モデルラットをケース内へ入れて落ち着くまで20分間待機した。そして、von Frey filament (Semmes-Weinstein monofilaments: Stoelting Co. USA) で1.26g、4.35g、及び8.75gの3刺激を左右の足底に10回ずつ交互に3セット行い、疼痛逃避行動 (Withdrawal response、この場合、つつかれた肢を上げる行動) の回数を計測し、右 (患側) 足底への刺激に対する疼痛逃避行動の総回数から、左 (健側) 足底への刺激に対する疼痛逃避行動の総回数を引いた値を算出した。

[0076] なお、かかる1.26g、4.35g、及び8.75gは各検査時にキャリブレーションを行って得られた数値である。また、Von Frey Monofilamentは、径の太さに応じて20個用意されており、径の細かいものから、1.65、2.36、…、6.45、6.65とナンバー (index number) が付されているので、図3～5中において、前記キャリブレーションした数値に対応したindex numberを各々併記する (キャリブレーションした数値、及びindex numberについては、Judith Bell-Krotoskiら、THE JOURNAL OF HAND SURGERY、1987年1月、12A巻、1号、155～161ページの記載参照)。

[0077] - ハーグリーブステスト (Hargreaves test) -

ガラス台の上にプラスチックケースを設置し、前記モデルラットをケース内へ入れて落ち着くまで20分間待機した。そして、無拘束下熱刺激装置390型(米国IITC社製)を用いて左右の足底に熱刺激を放射し、疼痛逃避行動をとるまでの時間(熱のあてられた肢を上げるまでの時間)を計測した。なお、計測は左右とも5回ずつ行い、その平均時間を算出し、左(健側)足底に熱刺激を放射してから疼痛逃避行動をとるまでの平均時間から、右(患側)足底におけるその平均時間を引いた値を算出した。

[0078] また、von Frey test及びHargreaves testにおいては、ともに左右差で比較を行いた。統計学的解析においては、unpaired Student's t testを用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

[0079] 図3～6に示した結果から明らかなように、von Frey testでは4.35g、8.75gの刺激に対しては、術後3日目から有意に疼痛行動が減少した。さらに、1.26gの刺激に対しても術後7日目で有意な疼痛行動の減少が認められた。通常、von Frey testにおいて、径の太いVon Frey Monofilamentを用いて与える刺激(本実施例においては、Von Frey Monofilament 5.07(8.75g)を用いて与える刺激)による痛みと、径の細いVon Frey Monofilamentを用いて与える刺激(本実施例においては、Von Frey Monofilament 4.17(1.26g)を用いて与える刺激)による痛みとは量的な点のみならず、質的な点においても異なり、これら異なる刺激に反応する神経回路も異なると考えられている。すなわち、一次知覚神経は主に触圧覚を担うA $\beta$ 線維、鋭い痛みを担うA $\delta$ (デルタ)線維、鈍い痛み・温冷覚を担うC線維からなるが、神経因性疼痛においては触圧覚が強い疼痛に変化するなど複雑な神経線維応答変調を生じさせると考えられている。従って、MTタンパク質はこれら異なる刺激による異なる疼痛を両方とも抑制できる効果を有していることも明らか

になった。

[0080] また、Hargreaves testにおいては、術後3日目及び7日目にて疼痛回避行動までの時間が有意に改善していた。従って、MTタンパク質をラットに投与することにより、該ラットの疼痛を有意に抑制することができ、前記von Frey testの結果と併せて、MTタンパク質は機械刺激・熱刺激の双方に対応する除痛効果を有していることが明らかになった。

[0081] (実施例4)

＜SeizelモデルへのMTタンパク質の腹腔内投与実験＞

前記SeizelモデルにGST融合MTタンパク質を100 $\mu$ g/回、術日も含め、その後7日連続で腹腔内投与（IP）した。また、対照群として、GST融合MTタンパク質の代わりに、GSTタンパク質を投与したSeizelモデルも調製した。そして、実施例3の記載と同様にして、これらモデルラットの行動を評価した。得られた結果を図7～10に示す。なお、前記Seizelモデルに投与したGST融合MTタンパク質は、＜MTタンパク質の調製方法＞において、切断処理を施さず、GSTが付加されたままの組み換えヒトMT2Aタンパク質である。

[0082] 図7～10に示した結果から明らかなように、von Frey testでは、1.26gの刺激に対しては、術後5日目から有意に疼痛行動が減少した。また、4.35g又は8.75gの刺激に対しては、術後7日目で疼痛行動の有意な減少が確認された。

[0083] また、Hargreaves testでは、統計的な有意差は確認できなかったが、図10に示す通り、疼痛回避行動までの時間は明らかに改善されていた。

[0084] 従って、MTタンパク質は、実施例3に記載のような局所投与（障害を受けた神経内及び近傍への投与）に限らず、腹腔内投与にても機械刺激・熱刺激の双方に対応する除痛効果を有していることが明らかになった。また、精製のタグタンパク質（GST）が付加されたままでも、MTタンパク質は

疼痛改善効果を有していることも明らかになった。

### 産業上の利用可能性

[0085] 本発明のMTタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを含有する組成物により、新たな作用機序に基づく疼痛の治療、改善または予防が可能となる。また、本発明のMTタンパク質の発現を検出する分子を含有する組成物により、客観的な指標により疼痛の診断が可能となる。従って、本発明は、特に医療分野において大きく貢献しうるものである。

### 配列表フリーテキスト

[0086] 配列番号 1～2

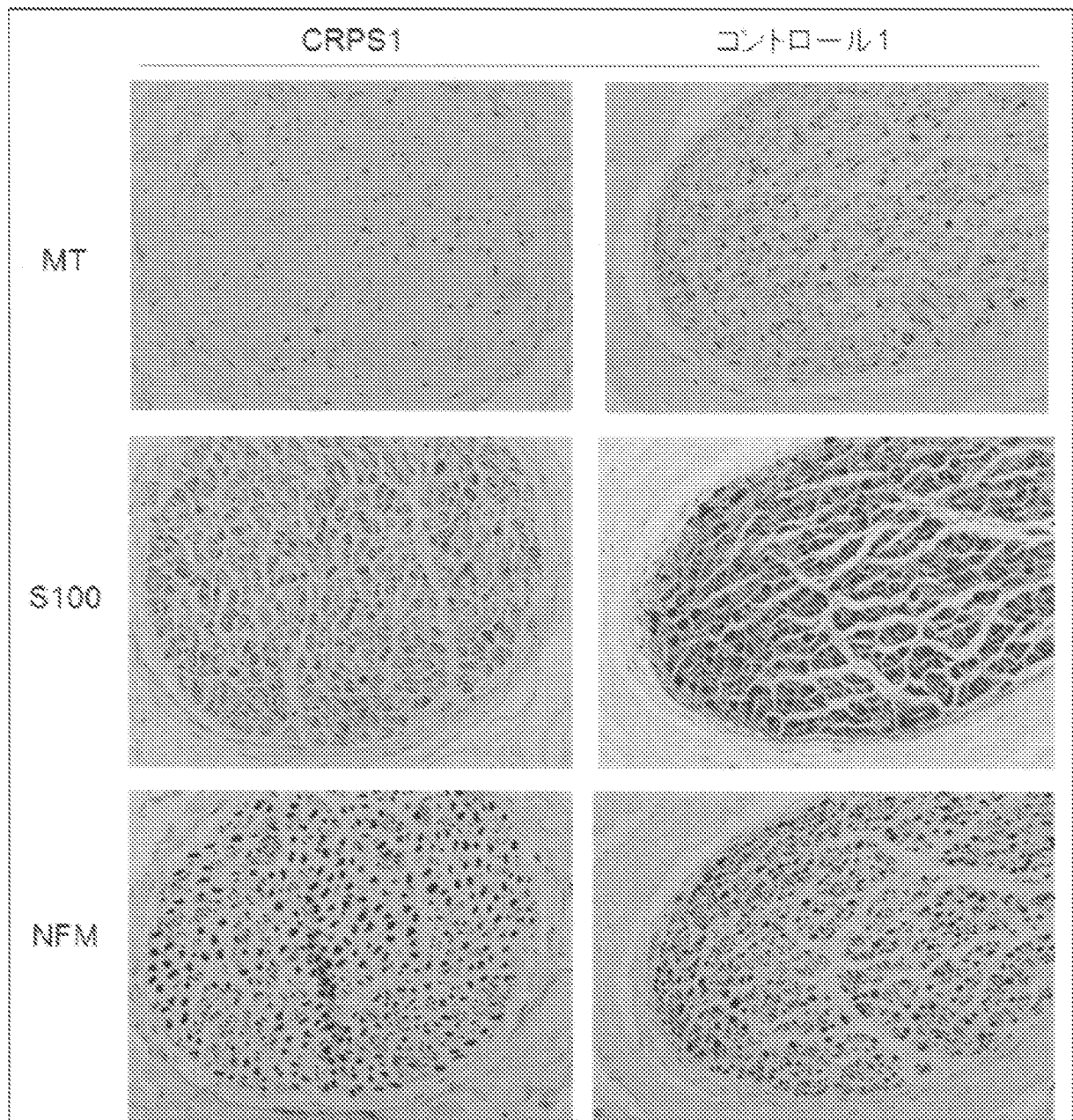
< 2 2 3 > 人工的に合成されたプライマーの配列

## 請求の範囲

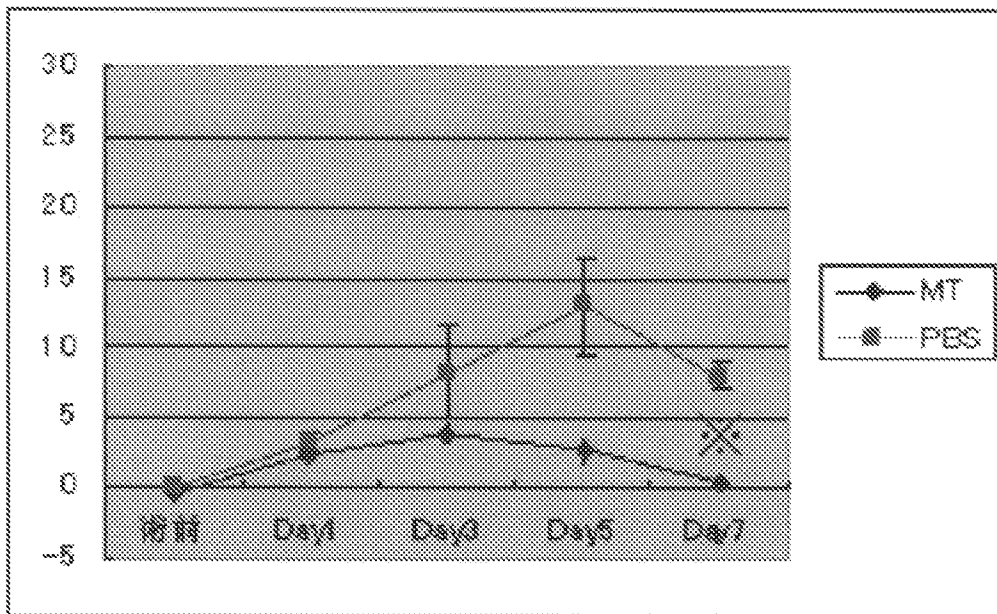
- [請求項1]           メタロチオネインタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを含有する、疼痛を治療、改善、または予防するための組成物。
- [請求項2]           メタロチオネインタンパク質、該タンパク質をコードする遺伝子、または該遺伝子が挿入されたベクターを投与する、疼痛を治療、改善、または予防するための方法。
- [請求項3]           被験者における疼痛の治療、改善、または予防に対する請求項1に記載の組成物の有効性を判定するための方法であって、被験者から単離した試料におけるメタロチオネインタンパク質の発現を検出し、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現よりも有意に低い場合に、前記被験者における疼痛の治療、改善、または予防に対して、請求項1に記載の組成物が有効性が高いと判定する方法。
- [請求項4]           メタロチオネインタンパク質の発現を検出する分子を含有する、疼痛を診断するための組成物。
- [請求項5]           疼痛を診断するための方法であって、被験者から単離した試料におけるメタロチオネインタンパク質の発現を検出し、該発現が、健常者におけるメタロチオネインタンパク質の発現よりも有意に低い場合に、前記被験者は疼痛を罹患している、または疼痛を罹患する危険性を有していると判定する方法。



[図2]



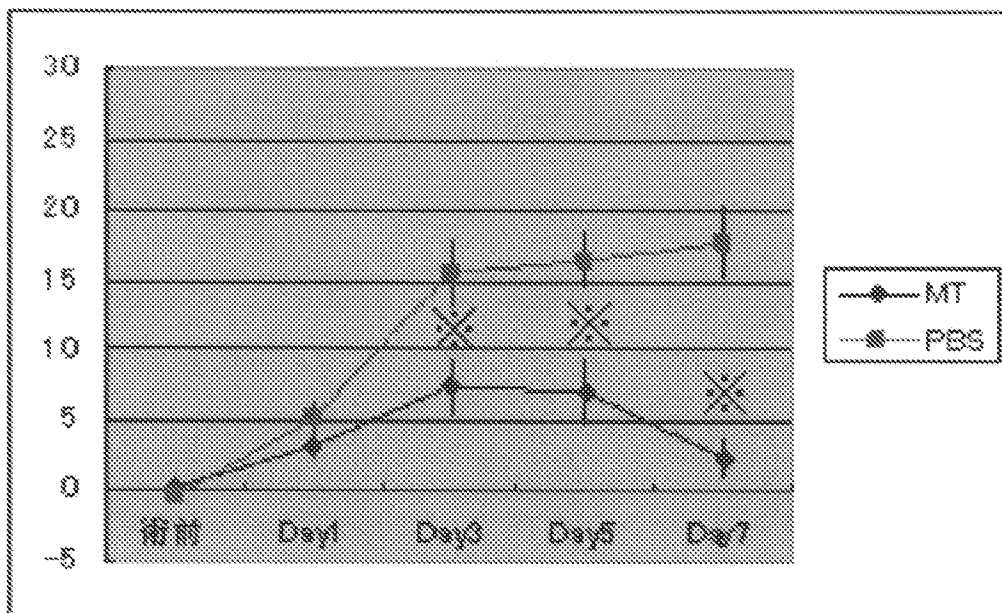
[図3]



4.17(1.26g)

\*P&lt;0.05

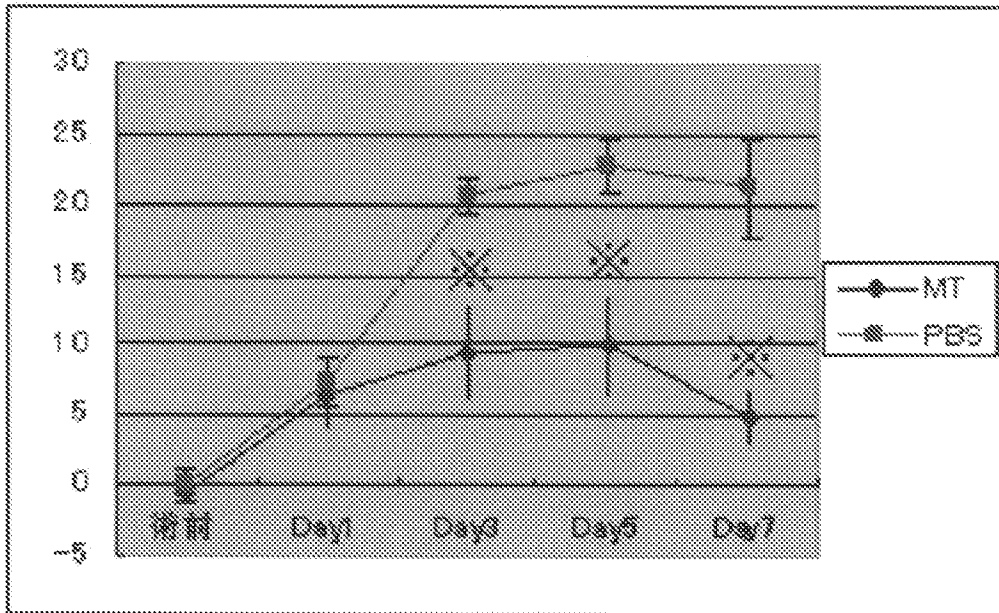
[図4]



4.56(4.35g)

\*P&lt;0.05

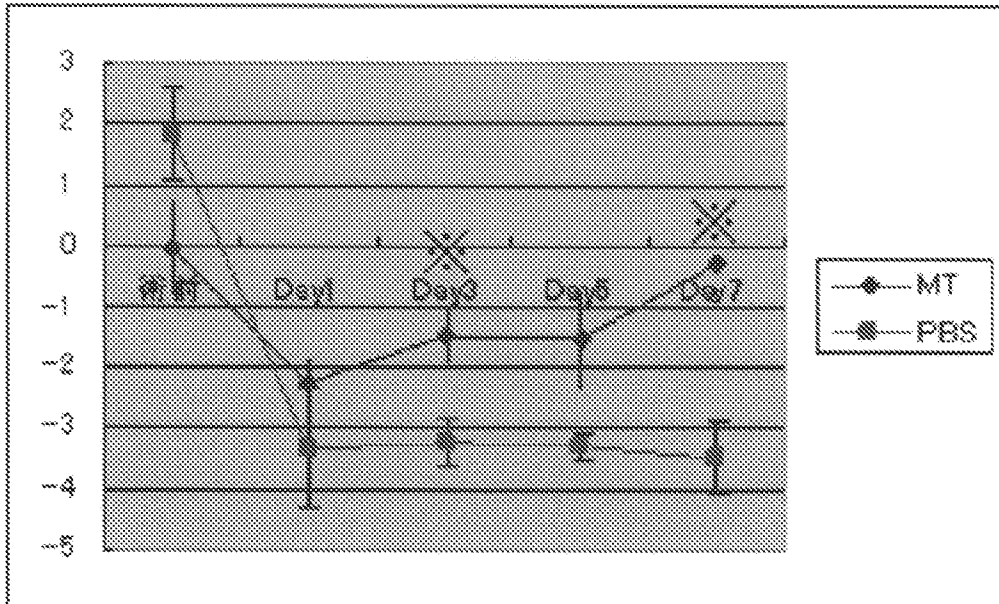
[図5]



5.07(8.75g)

※P&lt;0.05

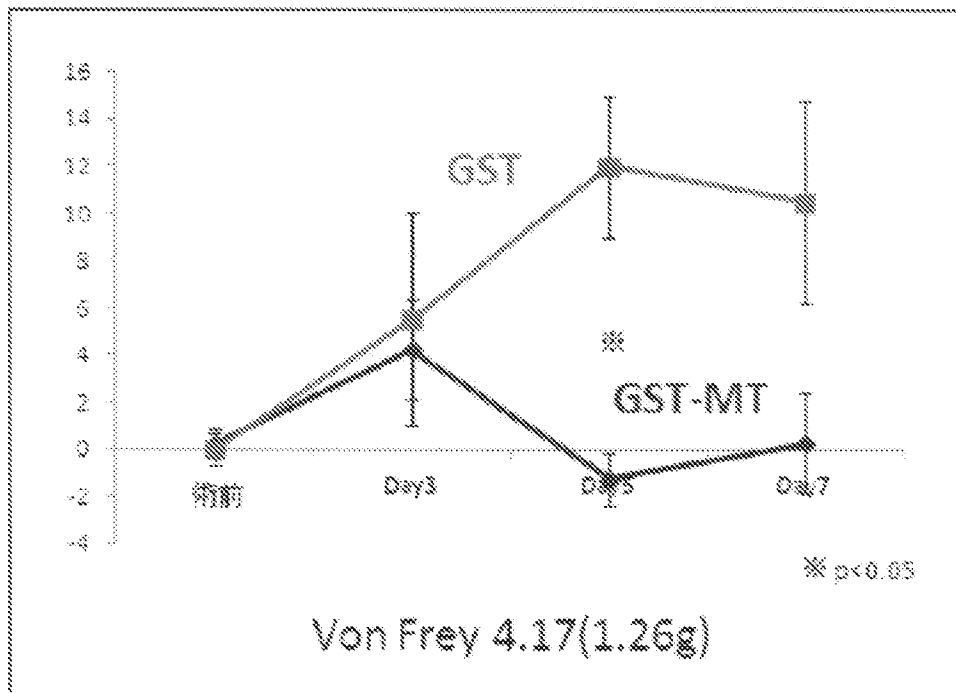
[図6]



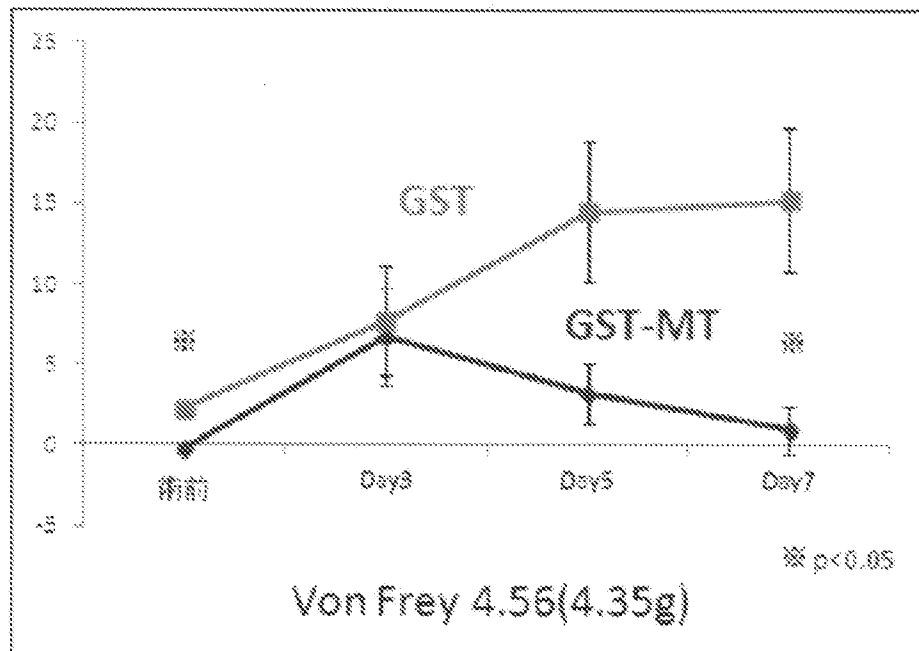
heat

※P&lt;0.05

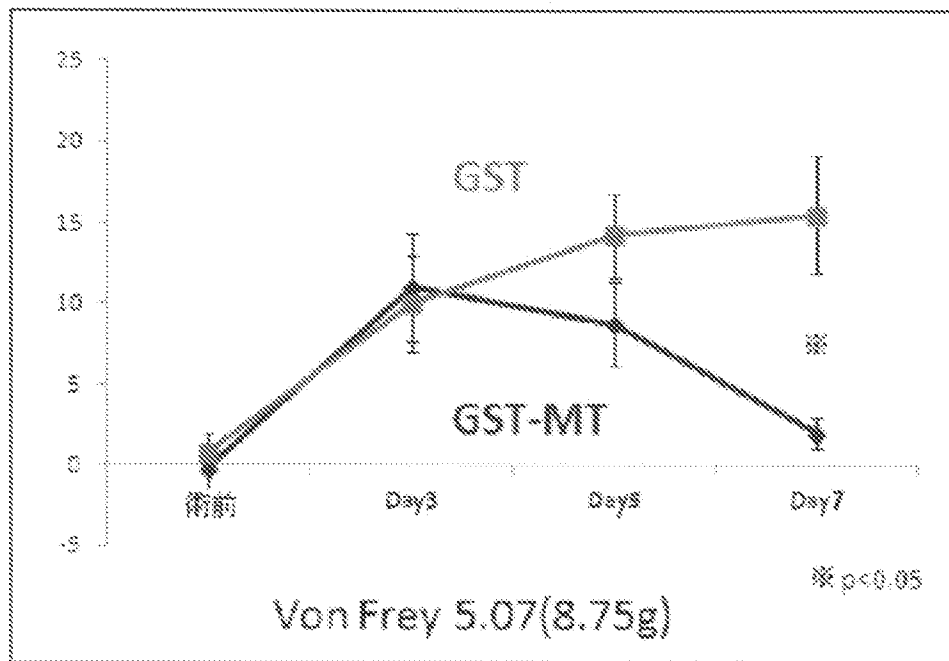
[図7]



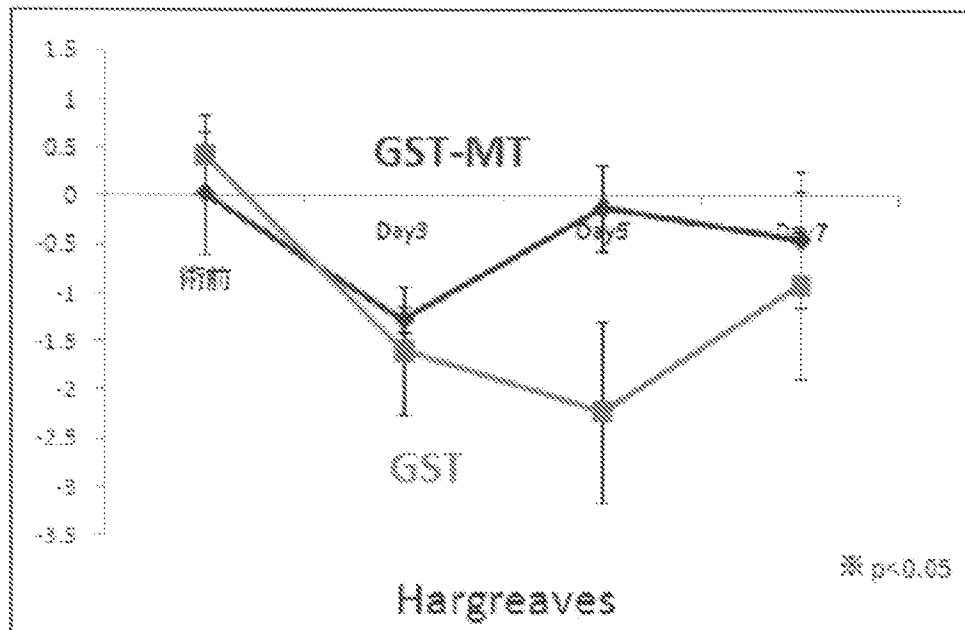
[図8]



[図9]



[図10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054408

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, A61P25/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/68(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)

A61K38/00, A61K48/00, A61P25/02, A61P25/04, C12N15/09, G01N33/68

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	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NORDBERG, G.F., Historical perspectives on cadmium toxicology, Toxicol Appl Pharmacol, 2009, Vol.238, No.3, p.192-200	1, 4
Y		1, 4
Y	JP 2001-509026 A (INCYTE PHARM INC.), 10 July 2001 (10.07.2001), particularly, claims; pages 4, 30 to 46 & WO 98/031795 A2 & US 5814480 A & EP 953049 A2	1, 4
Y	Shun'ichi HORIGUCHI, Jukinzoku Chudoku, Karada no Kagaku Zokan, 1988, vol.20, pages 148 to 152	1, 4
Y	Supervised by Masanori FUKUSHIMA, Merck Manual 18th edition, Japanese language edition, Nikkei Business Publications, Inc., 2006, pages 2838 to 2866	1, 4

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  
04 April, 2012 (04.04.12)

Date of mailing of the international search report  
17 April, 2012 (17.04.12)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054408

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Iwao UCHIYAMA, "Metals as Potential Environmental Pollutants and their Health Effects", Materia Japan, 2004, vol.43, no.8, pages 636 to 638	1, 4
X	JP 2002-253250 A (National Research Institute of Brewing), 10 September 2002 (10.09.2002), particularly, paragraph [0015] (Family: none)	1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2012/054408

**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.: 2, 3, 5  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 2, 3 and 5 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P25/02(2006.01)i, A61P25/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/68(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. A61K38/00, A61K48/00, A61P25/02, A61P25/04, C12N15/09, G01N33/68

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

日本国实用新案公報	1922-1996年
日本国公開实用新案公報	1971-2012年
日本国实用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録实用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	NORDBERG, G. F., Historical perspectives on cadmium toxicology, Toxicol Appl Pharmacol, 2009, Vol.238, No.3, p.192-200	1, 4
Y		1, 4
Y	JP 2001-509026 A (INCYTE PHARM INC) 2001.07.10, 特に、特許請求の範囲, p.4, 30-46 & WO 98/031795 A2 & US 5814480 A & EP 953049 A2	1, 4
Y	堀口俊一, 重金属中毒, からだの科学 増刊, 1988, vol.20, p.148-52	1, 4

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

04.04.2012

国際調査報告の発送日

17.04.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平林 由利子

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

3634

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	福島雅典監修, メルクマニュアル第18版日本語版, 日経BP社, 2006, p. 2838-2866	1, 4
Y	内山巖雄, 環境汚染物質としての金属と生体への影響, まてりあ, 2004, vol. 43, no. 8 p. 636-8	1, 4
X	JP 2002-253250 A (独立行政法人酒類総合研究所) 2002. 09. 10, 特 に、【0015】 (ファミリーなし)	1

## 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 (PCT 17条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 2, 3, 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項2, 3, 5は手術又は治療による人体の処置方法及び診断方法であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。