

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02005/073718

発行日 平成20年1月10日 (2008.1.10)

(43) 国際公開日 平成17年8月11日 (2005.8.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2 G O 4 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 15 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2005-517386 (P2005-517386)	(71) 出願人	303010452
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/018722		株式会社 L T T バイオファーマ
(22) 国際出願日	平成16年12月15日 (2004.12.15)		東京都港区愛宕2丁目5番1号
(31) 優先権主張番号	特願2004-19439 (P2004-19439)	(74) 代理人	100083301
(32) 優先日	平成16年1月28日 (2004.1.28)		弁理士 草間 攻
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	水島 徹
			熊本県熊本市国府3丁目27-23 B2
			O2
		(72) 発明者	水島 裕
			東京都港区六本木6丁目12-3-24 O2
		Fターム(参考)	2G043 AA06 EA01 GA07 GB16 GB28
			KA02 KA05
			2G045 FB12 GC15
			4C084 AA17 NA14 ZA681 ZB111 ZB112
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法

(57) 【要約】

胃粘膜に対して安全であり、消化管傷害の副作用が少ない化合物またはその塩、とくに非ステロイド系抗炎症化合物またはその塩を選択するスクリーニング方法を提供することであり、蛍光色素、特にカルセインを内封するとともに、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール等のリン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリボソームを使用し、当該リボソームと試験化合物を反応させ、リボソームからの蛍光色素の漏出の程度を評価することを特徴とする、胃粘膜に安全な化合物、特に非ステロイド系抗炎症化合物のスクリーニング方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛍光色素を内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソームを使用し、当該リポソームと試験化合物を反応させ、リポソームからの内封された蛍光色素の漏出の程度を評価することを特徴とする、胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法。

【請求項 2】

細胞膜モデルとして使用するリン脂質が、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものである請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

10

【請求項 3】

蛍光色素の漏出の程度を当該蛍光色素の励起波長の蛍光を測定することにより行う請求項 1 または 2 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】

蛍光色素がカルセイン、ローダミンまたはフルオレセイン誘導体から選択されるものである請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

蛍光色素としてカルセインを使用する請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

20

【請求項 6】

カルセインの漏出の程度を、520nmの蛍光を測定することにより行う請求項 5 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

試験化合物が、抗炎症作用を有する化合物である請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 8】

抗炎症作用を有する化合物が、非ステロイド系抗炎症化合物またはステロイド系化合物である請求項 7 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 9】

試験化合物が、胃粘膜保護作用を有する化合物である請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

30

【請求項 10】

請求項 7 または 8 に記載のスクリーニング方法で得られる胃粘膜に安全な抗炎症性化合物またはその塩。

【請求項 11】

請求項 9 に記載のスクリーニング方法で得られる胃粘膜保護作用物質。

【請求項 12】

胃粘膜傷害作用を有する化合物をスクリーニングするために使用する、蛍光色素を内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソーム。

40

【請求項 13】

蛍光色素がカルセイン、ローダミンまたはフルオレセイン誘導体から選択されるものである請求項 12 に記載のリポソーム。

【請求項 14】

細胞膜モデルとして使用するリン脂質が、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものである請求項 12 に記載のリポソーム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、胃粘膜に対して安全である、いわゆる消化管障害の副作用が少ない化合物またはその塩、特に抗炎症化合物またはその塩、あるいは胃粘膜保護作用物質を評価・選択するスクリーニング方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

抗炎症薬のなかでも非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）は、優れた抗炎症作用を発揮する薬物であるが、消化管障害等の副作用が大きく、とくに胃潰瘍を誘発させる副作用が臨床の現場で大きな問題となっている。すなわち、現在において最も主要な胃潰瘍、胃炎の原因としては、非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）の使用があげられている。

10

【0003】

しかしながらその一方で、高齢化社会の進展に伴い、NSAIDsの投与を必要とする患者も今後増え続けることが予想される。事実、高齢者の増加とともに、腰痛症、骨粗鬆症、慢性関節リウマチなどの症状の緩和にNSAIDsの使用が増加傾向にある。

したがって、NSAIDsによる胃潰瘍の誘発を抑えた、胃粘膜傷害の副作用が無いNSAIDs、すなわち胃粘膜に安全なNSAIDsを開発することは、重要なことであるといえる。

【0004】

本発明者は、先にNSAIDsが有する胃潰瘍誘発の副作用の原因が、NSAIDsの直接細胞傷害性作用であることを発見し、直接細胞傷害性のないNSAIDsは、胃粘膜に対し安全で有用な薬になるという考え方を提案してきている（特許文献1）。

20

【特許文献1】特開2003-207507号公報

【0005】

すなわち、細胞膜におけるシクロオキシゲナーゼの作用を阻害し、胃粘膜防御因子であるプロスタグランジンを減少させること、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害活性を有する直接細胞傷害性作用の無いNSAIDsが、胃潰瘍誘発等の副作用を有しない化合物であるとの考え方に基づき、胃粘膜細胞傷害性と、胃粘膜でシクロオキシゲナーゼの作用の阻害性の両者を指標にしたスクリーニング方法を提案してきている。

【0006】

本発明者は、その考え方をベースにさらに研究を重ねた結果、NSAIDsの直接細胞障害性作用の原因がNSAIDsの膜傷害性にあることを新規に見出し、さらに、その膜傷害性を簡便に検出し得る細胞膜モデルの作成に成功した。したがって、かかる細胞膜モデルを用いて、NSAIDsの膜傷害性の有無を判定することにより、胃粘膜に対して安全なNSAIDsを検索することが可能となる。

30

また、この細胞膜モデルを使用すれば、NSAIDsのみならず、胃粘膜に対して安全な薬物、すなわち胃粘膜保護作用物質を広く検索することが可能となる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかして本発明は、胃粘膜に対して安全であり、消化管障害の副作用が少ない化合物またはその塩、とくに非ステロイド系抗炎症化合物またはその塩を選択するスクリーニング方法を提供することを課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

かかる課題を解決するため、本発明の一つの基本的態様は、具体的には；

（1）蛍光色素を内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソームを使用し、当該リポソームと試験化合物を反応させ、リポソームからの内封された蛍光色素の漏出の程度を評価することの特徴とする、胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法；

（2）細胞膜モデルとして使用するリン脂質が、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスフ

50

ァチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものである上記（１）に記載のスクリーニング方法；

（３）蛍光色素の漏出の程度を当該蛍光色素の励起波長の蛍光を測定することにより行う上記（１）または（２）に記載のスクリーニング方法；

（４）蛍光色素がカルセイン、ローダミンまたはフルオレセイン誘導体から選択されるものである上記（１）ないし（３）に記載のスクリーニング方法；

であり、特に好ましくは、

（５）蛍光色素としてカルセインを使用する上記（１）ないし（３）に記載のスクリーニング方法；

（６）カルセインの漏出の程度を、５２０nmの蛍光を測定することにより行う上記（５）に記載のスクリーニング方法である。 10

【０００９】

本発明はさらに別の態様として、

（７）試験化合物が、抗炎症作用を有する化合物である上記（１）ないし（６）のいずれかに記載のスクリーニング方法；

（８）抗炎症作用を有する化合物が、非ステロイド系抗炎症化合物またはステロイド系化合物である上記（７）に記載のスクリーニング方法；

（９）試験化合物が、胃粘膜保護作用を有する化合物である上記（１）ないし（６）のいずれかに記載のスクリーニング方法；

でもある。 20

【００１０】

さらに本発明は、また別の態様として、

（１０）上記した（７）または（８）に記載のスクリーニング方法で得られる胃粘膜に安全な抗炎症性化合物またはその塩；

（１１）上記した（９）に記載のスクリーニング方法で得られる胃粘膜保護作用物質；
である。

【００１１】

さらに本発明は、別の態様として上記したスクリーニング方法に使用する細胞膜モデルを有するリポソームを提供するものでもあり、具体的には、

（１２）胃粘膜傷害作用を有する化合物をスクリーニングするために使用する、蛍光色素を内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソーム； 30

（１３）蛍光色素がカルセイン、ローダミンまたはフルオレセイン誘導体から選択されるものである上記（１２）に記載のリポソーム；

（１４）細胞膜モデルとして使用するリン脂質が、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものである上記（１２）に記載のリポソーム；

である。

【発明の効果】

【００１２】

本発明が提供するスクリーニング方法は、簡便な細胞膜モデルを使用することにより、薬物の膜傷害性を検出することが可能となる。したがって、本発明が提供するスクリーニング方法を使用することにより、試験化合物の膜傷害性、特に非ステロイド系抗炎症作用を有する化合物（NSAIDs）の膜傷害性を簡単に測定することができ、その結果、胃粘膜に安全であり、胃粘膜障害の無い、臨床的に極めて有用なNSAIDsを開発し得る利点を有している。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

【図１】１０種類のNSAIDsに関して、その細胞生存率の低下で見た細胞傷害性（ネクローシス）と、本発明のリポソームモデルによる膜傷害性の相関関係を示す図である。 50

【図 2】 10 種類の NSAIDs に関して、その細胞生存率の低下で見た細胞傷害性（アポトーシス）と、本発明のリポソームモデルによる膜傷害性の相関関係を示す図である。

【図 3】 本発明の実施例 2 の結果について、その一部を示す図である。

【図 4】 本発明の実施例 2 の結果について、その一部を示す図である。

【図 5】 本発明の実施例 3 におけるインドメタシンとテプレノンを用いた場合のカルセインの漏出率を示した図である。

【図 6】 本発明の実施例 3 におけるジクロフェナックとテプレノンを用いた場合のカルセインの漏出率を示した図である。

【図 7】 本発明の実施例 3 におけるセレコキシブとテプレノンを用いた場合のカルセインの漏出率を示した図である。

【図 8】 本発明の実施例 3 におけるイブプロフェンとテプレノンを用いた場合のカルセインの漏出率を示した図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明で使用する細胞膜モデルとしては、細胞膜透過性を有する蛍光色素を内封したリポソームとして、リン脂質で構成されたリポソームを使用するものである。すなわち、NSAIDs の膜傷害性は、細胞膜の脂質部分における膜のバリアー性を破壊することが主な作用であると考えられることから、リン脂質で構成されたリポソームを作成し、そのリポソームに蛍光色素を内封してやり、かかるリポソームと NSAIDs を反応させることにより、リポソームからの蛍光色素の漏出の程度を評価すれば、NSAIDs の膜傷害性の程度が判明できる

【0015】

そのような蛍光色素としては、カルセイン、ローダミンまたはフルオレセイン誘導体等をあげることができる。そのなかでもカルセイン（calcein）を好ましく使用することができる。カルセインは、細胞傷害活性の測定に汎用されている蛍光色素であり、生細胞を染色し、細胞毒性の無い蛍光色素である。

【0016】

また、リポソーム膜を構成するリン脂質としては、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミン、カルジオリピン等を挙げることができる。これらのリン脂質は一種類を用いてリポソーム膜を構成してもよく、また複数種用いてリポソーム膜を構成してもよい。

【0017】

したがって、本発明はリン脂質から構成されるリポソーム膜に対し、試験化合物を反応させた場合におけるそのリポソーム膜の損傷程度の度合を測定することを手段とするものであり、言うなれば、胃粘膜を、リン脂質を使用したリポソーム膜に置き換えて試験しようとするものである。

したがって、胃粘膜とリン脂質を使用したリポソーム膜との間の相関性が存在するかどうかの一つの問題となる。本発明者の検討によれば、例えば、NSAIDs におけるネクロシス／アポトーシスによる細胞生存率の低下でみた細胞傷害性と、リポソームモデルによる膜傷害性は良く一致していることが確認された。

【0018】

また、本発明者の検討によれば、NSAIDs の直接細胞傷害性の原因が、NSAIDs の膜傷害性にあることは以下の事実から証明された。すなわち、これまでに臨床的に使用されている 10 種類の NSAIDs に関して、その細胞生存率の低下で見た細胞傷害性（ネクロシス／アポトーシスによる細胞生存率の低下でみた細胞傷害性）と、上記したリポソームモデルによる膜傷害性の程度を対比した。その結果、図 1 および 2 に示すように、その細胞傷害性と膜傷害性は極めて良く対応しており、直接細胞傷害の原因が、NSAIDs の膜傷害性に存在するものであることが確認された。すなわち、細胞傷害性の高い NSAIDs は、膜傷害性も高いものであり、細胞傷害性が弱い NSAIDs は、膜傷害性も弱いという対応が確認された（相

10

20

30

40

50

関係数：0.91）。

【0019】

以上のように、本発明が提供する細胞膜モデルであるリポソームを使用する膜傷害性の判定により、NSAIDsの細胞傷害性を判定することができることとなる。ところで、本発明者は先に、胃潰瘍誘発の副作用の原因が、NSAIDsの直接細胞傷害性であることを見出し、直接細胞傷害性のない細胞膜モデルは、胃粘膜に安全であるという考え方を提唱している。そして、上記したように、この直接細胞傷害性の原因が、NSAIDsの膜傷害性にあるという事実からみれば、本発明が提供する細胞膜モデルを用いた膜傷害性の度合を測定することにより、胃粘膜に安全なNSAIDsをスクリーニングすることが可能となるのである。

【0020】

本発明が提供する細胞膜モデルを用いた、胃粘膜に安全なNSAIDsのスクリーニング方法は、具体的には以下のようにして行うことができる。すなわち、蛍光色素である、例えばカルセインを内封するリン脂質から構成されるリポソームと、スクリーニングすべきNSAIDsを種々の濃度で反応させ、リポソームからのカルセインの漏出（すなわちリポソーム膜の傷害による漏出）の程度を、520nmの蛍光を測定することにより行うことができる。

【0021】

本発明が提供する細胞膜モデルを用いた、胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法の妥当性は、蛍光色素を内封するリン脂質から構成されるリポソームと、例えば、膜障害性のあるNSAIDsと共に、粘膜保護作用物質を添加させることにより、リポソームに内封された蛍光色素の漏出が抑制される事実からも、立証された。

【0022】

すなわち後記する実施例から判明するように、例えば、膜障害性のあるNSAIDsとして知られているインドメタシン、ジクロフェナック、セレコキシブあるいはイブプロフェンと、胃粘膜保護作用のある抗潰瘍薬であるテプレノン（商品名：セルベックス（登録商標））を併用して、本発明の蛍光色素であるカルセインを内封したリポソームと反応させると、併用したテプレノンの用量に依存して、リポソームからのカルセインの漏出が抑制された。

【0023】

この事実は、胃粘膜保護作用物質であるテプレノンが細胞膜の傷害性を防止することによってNSAIDsの膜傷害作用を軽減させていることに他ならない。したがって、本発明が提供する細胞膜モデルを用いた膜傷害性の度合を測定することにより、胃粘膜に安全な化合物、特にNSAIDsをスクリーニングすることができることを証明しているのである。

【0024】

なお、上記したスクリーニング方法は、主にNSAIDsのスクリーニング方法であるが、本発明が提供するスクリーニング方法は、NSAIDsにのみ限定されず、胃粘膜に対して安全な薬物、すなわち胃粘膜障害性のない化合物を広くスクリーニングすることができることはいうまでもない。

【実施例】

【0025】

以下に本発明を、具体的実施例により説明する。

実施例1：カルセイン内封リポソームの作成

卵黄由来のフォスファチジルコリン（10μmol、7.7mg）を、クロロホルム／メタノール（1：2）混合液に溶解後、乾燥させた。その後1.5mLのジエチルエーテルに溶解させ、1mLの100mMカルセイン－水酸化ナトリウム含有水溶液（pH7.4）と混合した。次いでジエチルエーテルを除去し、カルセインを内封したリポソーム溶液を得た。

【0026】

実施例2：種々の公知のNSAIDsとの反応によるリポソームからのカルセインの漏出

NSAIDsとして、臨床的に使用されている公知のインドメタシン、イブプロフェン、ケト

10

20

30

40

50

プロフェン、ジクロフェナック、フルルビプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、セレコキシブ、エトドラクおよびニメスリドを選択し、上記実施例1で得たリポソーム溶液中に種々の濃度で添加し、30℃にて10分間反応させた。反応液の520nmの蛍光を測定することにより、リポソームからのカルセインの漏出（膜傷害）を測定した。

その結果を、図3（インドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ジクロフェナックおよびフルルビプロフェンについての結果）および図4（メフェナム酸、フルフェナム酸、セレコキシブ、エトドラクおよびニメスリドについての結果）にまとめて示した。

【0027】

図3に示したNSAIDsであるインドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ジクロフェナックおよびフルルビプロフェンについては、胃粘膜細胞傷害性の強さは、インドメタシン>ジクロフェナック>フルルビプロフェン>イブプロフェン>ケトプロフェンの順であるとされている。リポソームからのカルセインの漏出の程度もその順であり、リポソームからのカルセインの漏出（膜傷害性）の程度を評価することにより、胃粘膜に安全な非ステロイド系抗炎症化合物の評価ができてることが良く理解された。

【0028】

また、図4に示したNSAIDsであるメフェナム酸、フルフェナム酸、セレコキシブ、エトドラクおよびニメスリドについては、胃粘膜細胞傷害性の強さは、セレコキシブ>メフェナム酸>フルフェナム酸>ニメスリド>エトドラクの順であるとされている。リポソームからのカルセインの漏出の程度もその順であり、図3に示した結果と同様に、リポソームからのカルセインの漏出（膜傷害性）の程度を評価することにより、胃粘膜に安全な非ステロイド系抗炎症化合物の評価ができてることが良く理解された。

【0029】

実施例3：種々の公知のNSAIDsと胃粘膜保護作用物質を併用した反応によるリポソームからのカルセインの漏出

NSAIDsとして、臨床的に使用されている公知のインドメタシン、ジクロフェナック、セレコキシブおよびイブプロフェンを選択し、胃粘膜保護作用物質との併用によるリポソームからのカルセインの漏出を検討した。

【0030】

方法：

添加するNSAIDsの濃度としては、細胞膜傷害を顕著に生じさせる濃度とし、インドメタシンについては6mMを、ジクロフェナックについては4mMを、セレコキシブについては0.08mMを、イブプロフェンについては20mMを添加した。

胃粘膜保護作用物質としてテブレノン（商品名：セルベックス（登録商標））を用い、無添加（コントロール）、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、および 10^{-4} Mをそれぞれ併用した。

上記実施例1で得たリポソーム溶液中にそれぞれの試験濃度で添加し、30℃にて10分間反応させ、反応液の520nmの蛍光を測定することにより、リポソームからのカルセインの漏出（膜傷害）を測定した。

【0031】

結果：

図5～図8にその結果を示した。

図5は、インドメタシン6mMとテブレノンをその用量を変化させて併用した場合のカルセインの漏出率を示したものであるが、併用するテブレノンの用量に依存してカルセインの漏出が抑制されているのが判明する。

【0032】

また、図6は、ジクロフェナック4mMとテブレノンをその用量を変化させて併用した場合のカルセインの漏出率を示したものであり、図7は、セレコキシブ0.08mMとテブレノンをその用量を変化させて併用した場合のカルセインの漏出率を示したものであり、図8は、イブプロフェン20mMとテブレノンをその用量を変化させて併用した場合のカルセインの漏出率を示したものであるが、いずれの場合にあっても、併用するテブレノ

ンの用量に依存してカルセインの漏出が抑制されていた。

【0033】

なお、添加する4種類のNSAIDsの濃度について、インドメタシンについては4および8 mM、ジクロフェナックについては2および10 mM、セレコキシブについては0.05および0.1 mM、イブプロフェンについては40および60 mMと変化させて同様の実験を行ったが、テプレノンと併用することでリポソームからのカルセインの漏出（膜傷害）が抑制されていた。

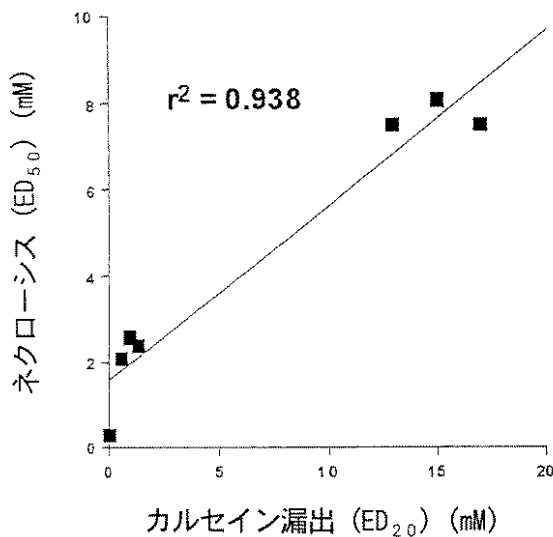
【産業上の利用可能性】

【0034】

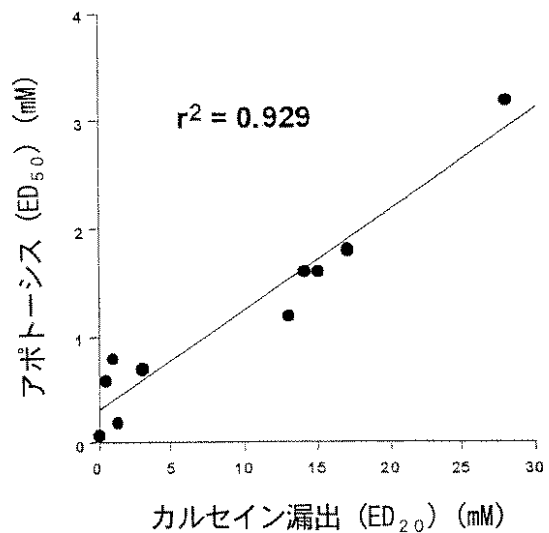
以上記載のように、本発明により、極めて簡便な細胞膜モデルを使用することにより、試験化合物、特に非ステロイド系抗炎症作用を有する化合物（NSAIDs）の膜傷害性を検出することが可能となる。したがって、本発明のスクリーニング方法を使用することにより、NSAIDsの膜傷害性を簡単に測定することができることから、胃粘膜に安全な、胃粘膜傷害の無い、臨床的に極めて有用なNSAIDsをはじめとする化合物を開発し得る利点を有している。

10

【図1】

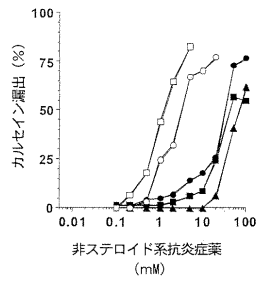


【図2】



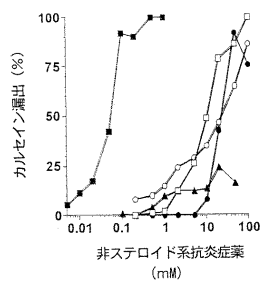
【図 3】

—○— インドメタシン —○— ジクロフェナク
 —■— イブuproフェン —●— フルルビプロフェン
 —▲— ケトプロフェン

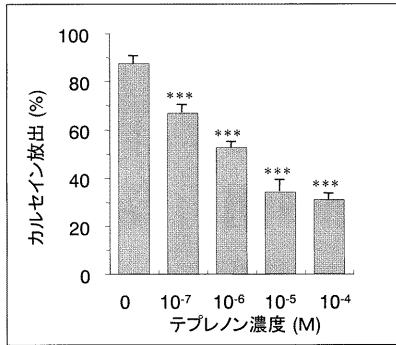


【図 4】

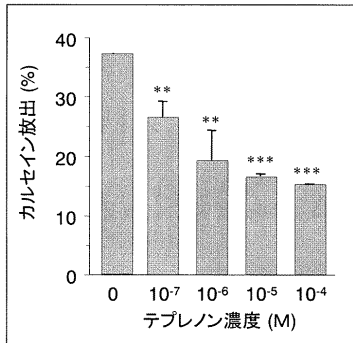
—○— メフェナム酸 —○— フルフェナム酸
 —■— セレコキシブ —●— ニメスリド
 —▲— エトドラク



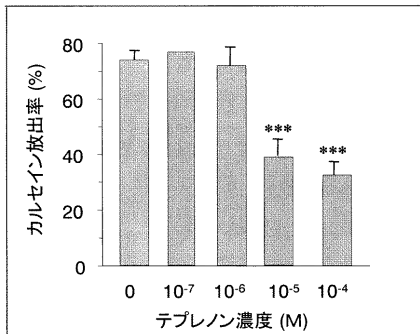
【図 5】



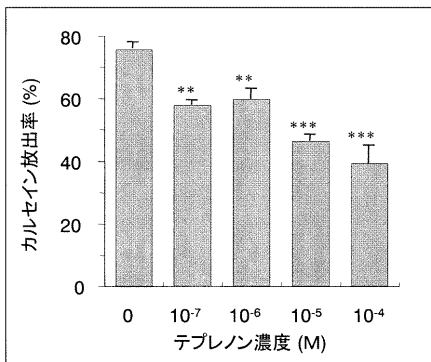
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018722

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/15, G01N33/483, A61P29/00

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.Cl⁷ G01N33/15, G01N33/483, A61P29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-207507 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 25 July, 2003 (25.07.03), Claims & WO 03/38430 A	1-9, 12-14
A	JP 7-191033 A (Hitachi Engineering Co., Ltd.), 28 July, 1995 (28.07.95), Claims; Par. No. [0018] (Family: none)	1-9, 12-14

☒ 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
13 January, 2005 (13.01.05)Date of mailing of the international search report
01 February, 2005 (01.02.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018722

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 63-184063 A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 29 July, 1988 (29.07.88), Claims; page 2, upper right column, line 11 to lower right column, line 1 & DE 3778308 A & EP 0268773 A & ES 2037045 A	1-9, 12-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018722

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 10, 11
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:
Although the invention of claims 10 and 11 relates to a substance obtained by the screening method, what particular substances are covered thereby is utterly unclear so that any meaningful search cannot be carried out.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2004/018722	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ G01N33/15, G01N33/483, A61P29/00			
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 ⁷ G01N33/15, G01N33/483, A61P29/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2004年 日本国登録実用新案公報 1994-2004年 日本国実用新案登録公報 1996-2004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)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	JP 2003-207507 A(武田薬品工業株式会社) 2003.07.25 特許請求の範囲等参照 & WO 03/38430 A	1-9、12-14	
A	JP 7-191033 A(日立電子エンジニアリング株式会社) 1995.07.28 特許請求の範囲、【0018】等参照 (ファミリーなし)	1-9、12-14	
A	JP 63-184063 A(和光純薬工業株式会社) 1988.07.29 特許請求の範囲、第2頁右上欄11行-右下欄1行等参照 & DE 3778308 A & EP 0268773 A & ES 2037045 A	1-9、12-14	
☐ 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 13.01.2005		国際調査報告の発送日 01.2.2005	
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) 加々美 一恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3251	

国際調査報告	国際出願番号 PCT/J P 2004/018722
<p>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)</p> <p>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。</p> <p>1. ☐ 請求の範囲 _____ 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、</p> <p>2. ☒ 請求の範囲 <u>10, 11</u> 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、 請求の範囲 10, 11に係る発明は、スクリーニング方法で得られた物質に関するものであるが、具体的にどのような物質が内含されるのかが全く不明であって、有効な調査をすることができない。</p> <p>3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>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)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p> <p>1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p> <p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p>☐ 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。</p> <p>☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G O 1 N 21/64 (2006.01)		G O 1 N 21/64		F
G O 1 N 33/483 (2006.01)		G O 1 N 33/483		C

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,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

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。