

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008 年 10 月 9 日 (09.10.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/120708 A1

(51) 国際特許分類:

C07D 231/26 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)
A61K 31/4152 (2006.01) A61P 41/00 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(NAGATANI, Satoru) [JP/JP]; 〒7348551 広島県広島市南区霞 1 丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学内 Hiroshima (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKs & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/056064

(22) 国際出願日: 2008 年 3 月 28 日 (28.03.2008)

(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 2007-086662 2007 年 3 月 29 日 (29.03.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 田辺三菱製薬株式会社 (MITSUBISHI TANABE PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5418505 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 2 番 10 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 檜山 英三 (HIYAMA, Eiso) [JP/JP]; 〒7348551 広島県広島市南区霞 1 丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学内 Hiroshima (JP). 首藤 毅 (SUDO, Takeshi) [JP/JP]; 〒7348551 広島県広島市南区霞 1 丁目 2 番 3 号 国立大学法人広島大学内 Hiroshima (JP). 長谷 諭

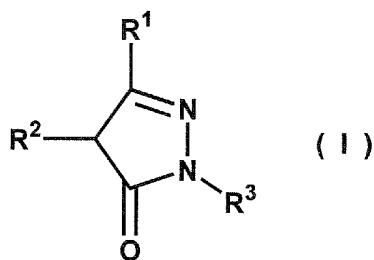
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: ENGRAFTMENT ENHANCER OR PROLIFERATION ENHANCER IN TISSUE PLANTATION

(54) 発明の名称: 組織移植における生着増強剤又は増殖増強剤



(57) Abstract: It is intended to provide a means for enhancing the engraftment rate or proliferation rate in a transplanted tissue *in vivo* by establishing a tissue transplantation method wherein a single donor is sufficient for a single recipient with the use of a compound represented by the following general formula (I) as the active ingredient to thereby solve the problem of donor shortage that is one of serious problems in tissue transplantation in these days.

(57) 要約: 式 (I) を有効成分として用いることで、一人のレシピエントに対して一人のドナーで十分であるような組織移植法を確立して、現在の組織移植の大きな問題点の 1 つであるドナー不足を解消するために、移植組織の生体内での生着率を増強又は増殖率を

増強するための手段を提供する。

明 細 書

組織移植における生着増強剤又は増殖増強剤

技術分野

- [0001] 本発明は、組織移植における、移植した組織の生着増強又は増殖増強のための医薬及び方法に関する。より具体的には、膵島移植における膵島細胞の生着増強又は増殖増強のための医薬及び方法に関する。

背景技術

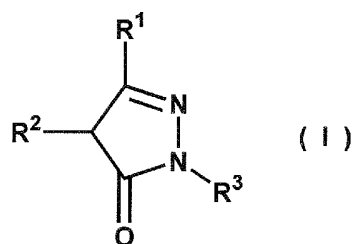
- [0002] 糖尿病とは、主に膵臓のインスリン産生能低下に起因するインスリンの絶対的又は相対的不足によって引き起こされる、持続的な高血糖状態である。原因としては、遺伝的因子及び環境的因子の両方が挙げられる。多因子遺伝疾患であり、現在多数の候補遺伝子が報告されている。環境因子としては、肥満、過食、ストレス、薬剤、ウイルス感染などが挙げられる。自己免疫的機序によって発症する1型糖尿病と、それ以外の原因により2型糖尿病との2種類に大別され、後者がその大半を占めている。糖尿病は、病状の進行又は長期の罹病期間によって、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性精神障害などの合併症を併発する。
- [0003] 糖尿病の治療としては、主に、食事療法又は運動療法を中心として、各種経口血糖降下薬(α -グルコシダーゼ阻害薬、スルホニル尿素阻害薬、スルホニル尿素剤、ビッグアニド剤、インスリン感受性改善薬など)又はインスリン療法が行われている。しかしながら、これらは糖尿病の原因である膵臓のインスリン産生能低下に対してアプローチするものではなく、根治的な治療ではない。日本における糖尿病患者数は700万人、潜在的な患者数は1900万人にのぼると推定され、かつその数は現在急増している。これらの状況から、根治的治療の確立が求められている。
- [0004] 膵島移植は、その根治的治療として2000年にEdmontonグループが画期的な成績を報告して以来、その機運が一気に加速している。日本でも2004年の膵島移植第一例目以来、2年間で30回以上の膵島移植が実施され、良好な成績が報告されている。年々膵島移植症例数は増加しており、今後の発展が期待されている。
- [0005] 膵島移植における現状の大きな問題点の1つは、一人のレシピエントに対して一人

のドナーからの膵島の移植では十分な効果を得ることができない点にある。したがって、数人のドナーから移植を繰り返し実施することが必要とされる。それによって深刻なドナー不足に陥っており、根治的治療である膵島移植が満足に実施されていない。

[0006] 特許文献1は、膵島移植に十分な量の膵島細胞をインビトロで増殖させるための培養法を開示している。しかしながら、特許文献1に開示される発明では、インビトロでの培養の過程で異物混入の可能性が高いという問題が当然に存在し、残念ながらヒトにおける実用化には程遠い。

[0007] 一方、下記式(I)

[化1]



(式中、 R^1 は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコシカルボニルアルキルを表し、 R^2 は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、 R^3 は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラゾロン誘導体については、医薬の用途として、脳機能正常化作用(特許文献2;特公平5-31523号公報)、過酸化脂質生成抑制作用(特許文献3;特公平5-35128号公報、例1の化合物)、抗潰瘍作用(特許文献4;特開平3-215425号公報)が知られている。しかしながら、これらの各刊行物には、この

化合物が組織移植における、移植した組織の生着増強作用又は増殖増強作用を有すること、示唆ないし教示されていない。

[0008] 特許文献1:特開2000-139455号公報

特許文献2:特公平5-31523号公報

特許文献3:特公平5-35128号公報

特許文献4:特開平3-215425号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 一人のレシピエントに対して一人のドナーで十分であるような膵島移植法を確立して、現在の膵島移植の大きな問題点の1つであるドナー不足を解消するために、移植膵島細胞の生体内での生着率を増強するための薬剤又は増殖を増強するための薬剤及び方法を提供することが、本発明の課題である。

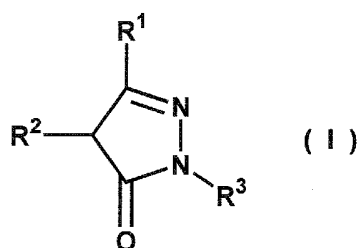
課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、前記式(I)で示される化合物が、生体内における移植膵島細胞の生着率及び／又は増殖を増強することを発見し、上記課題を解決した。以下の実施例に示すように、前記式(I)で示される化合物が移植膵島細胞の生体内での生着率を増強する又は増殖を増強することに起因して、1個体のドナー由来の膵島細胞による膵島移植によって、1個体のレシピエントにおける高血糖状態を有意に改善することが実証された。以上のことから、本発明は、現在の膵島移植の大きな問題点の1つであるドナー不足を解消し、より効率的な糖尿病(1型糖尿病及び2型糖尿病を含む)の処置のための薬学的組成物を提供する。本発明によって、1型糖尿病及び2型糖尿病を含む全ての糖尿病のための、画期的な治療が提供される。

[0011] すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 下記式(I)

[化2]



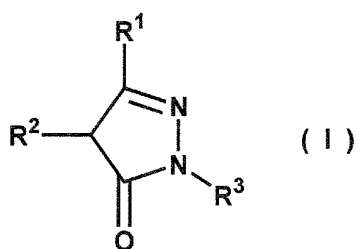
(式中、 R^1 は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、 R^2 は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、 R^3 は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラズロン誘導体若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分とする組織移植における移植組織の生着増強剤又は増殖増強剤。

[0012] (2) 式(I)で示される化合物が3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オンである請求項1に記載の生着増強剤又は増殖増強剤。

(3) 移植組織が臍島細胞である請求項1又は2に記載の生着増強剤又は増殖増強剤。

(4) 下記式(I)

[化3]



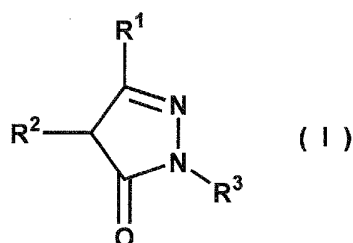
(式中、 R^1 は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、 R^2 は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、 R^3 は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラズロン誘導体若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、組織移植における移植組織の生着増強方法又は増殖増強方法。

(5)式(I)で示される化合物が3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オンである請求項4に記載の生着増強方法又は増殖増強方法。

[0013] (6)移植組織が臍島細胞である請求項4又は5に記載の生着増強方法又は増殖増強方法。

(7)組織移植における移植組織の生着増強剤又は増殖増強剤の製造のための、下記式(I)

[化4]



(式中、 R^1 は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、 R^2 は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、 R^3 は水素原子、炭素数1

～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラズロン誘導体若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の使用。

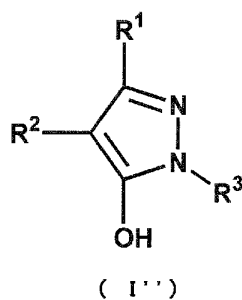
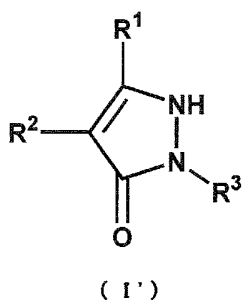
[0014] (8)式(I)で示される化合物が3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オンである請求項7に記載の使用。

(9)移植組織が臍島細胞である請求項7又は8に記載の使用。

[0015] 本発明の組織移植における移植組織の生着増強剤又は増殖増強剤に含有される前記式(I)のピラズロン誘導体は、合目的な任意の方法により合成することができ、好ましい合成方法の例としては特開昭62-108814号公報に記載されている方法が挙げられる。

[0016] 本発明の組織移植における移植組織の生着増強又は増殖増強のために用いる有効成分としては、遊離形態の前記式(I)のピラズロン誘導体を用いてもよいが、任意の水和物又は溶媒和物、あるいは、前記式(I)のピラズロン誘導体又はその任意の水和物若しくは溶媒和物の生理的に許容される塩を用いることもできる。なお、該ピラズロン誘導体には特公平5-31523号公報第5欄上段の化学構造式に示されるような互変異性体(下式(I'))又は(I''))が存在するが、本発明の医薬の有効成分には、これらの異性体のすべてが包含されることはいうまでもない。

[0017] [化5]



[0018] 前記式(I)において、 R^1 の定義におけるアリール基としては、フェニル基並びにメチル基、ブチル基、メキシ基、ブトキシ基、塩素原子及び水酸基等の置換基で置換されたフェニル基等が挙げられる。

R^1 、 R^2 及び R^3 の定義における炭素数1～5のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基等が挙げられる。

[0019] R^1 の定義における総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基としては、メキシカルボニルメチル基、エトキシカルボニルメチル基、プロポキシカルボニルメチル基、メキシカルボニルエチル基、メキシカルボニルプロピル基等が挙げられる。

R^2 の定義におけるアリールオキシ基としては、フェノキシ基、p-メチルフェノキシ基、p-メトキシフェノキシ基、p-クロロフェノキシ基、p-ヒドロキシフェノキシ基等が挙げられ、アリールメルカプト基としては、フェニルメルカプト基、p-メチルフェニルメルカプト基、p-メトキシフェニルメルカプト基、p-クロロフェニルメルカプト基、p-ヒドロキシフェニルメルカプト基等が挙げられる。

[0020] R^1 及び R^2 の定義における炭素数3～5のアルキレン基としては、トリメチレン基、テトラメチレン基、ペンタメチレン基、メチルトリメチレン基、エチルトリメチレン基、ジメチルトリメチレン基、メチルテトラメチレン基等が挙げられる。

R^2 及び R^3 の定義における炭素数1～3のヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基等が挙げられる。 R^3 の定義における炭素数5～7のシクロアルキル基としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

[0021] R^3 の定義において、フェニル基の置換基における炭素数1～5のアルコキシ基としては、メキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基等が挙げられ、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基としては、メキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基等が挙げられ、炭素数1～3のアルキルメルカプト基としては、メチルメルカプト基、エチルメルカプト基、プロピルメルカプト基等が挙げられ、炭素数1～4のアルキルアミノ基としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、ブチルアミノ基等

が挙げられ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基等が挙げられる。

[0022] 本発明で用いる式(I)の化合物の好ましい例としては、例えば、3-メチルー1-フェニルー2-ピラゾリン-5-オン若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物が挙げられる。

[0023] 前記式(I)のピラズロン誘導体の生理的に許容される塩としては、酸付加塩又は塩基付加塩を用いることができる。例えば、塩酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩、若しくはリン酸塩などの鉱酸塩；メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩、若しくはフマル酸塩などの有機酸塩；ナトリウム塩、カリウム塩、若しくはマグネシウム塩などの金属塩；アンモニウム塩；又は、エタノールアミン若しくは2-アミノ-2-メチルー1-プロパノールなどの有機アミン塩などを用いることができるが、生理的に許容されるものであれば塩の種類は特に限定されることはない。

[0024] 本発明において、組織移植における移植組織の生着増強又は増殖増強のために用いる有効成分である前記式(I)の化合物若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の1種又は2種以上をそのまま患者に投与してもよいが、好ましくは、有効成分と薬理的及び製剤学的に許容しうる添加物を加え、当業者に周知な形態の製剤として提供されるべきである。

[0025] 薬理的及び製剤学的に許容しうる添加物としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を用いることができる。経口投与に適する製剤の例としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、液剤、又はシロップ剤等を挙げることができ、非経口投与に適する製剤としては、例えば、注射剤、点滴剤、又は坐剤などを挙げることができる。

[0026] 経口投与に適する製剤には、添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリド

ン、又はゼラチン等の結合剤;ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤;ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤;ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

[0027] 注射あるいは点滴用に適する製剤には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成する溶解剤又は溶解補助剤;ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤;無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

[0028] なお、上記の式(I)の化合物を有効成分とする脳保護剤(点滴剤)が、すでに臨床において使用されているので(一般名「エダラボン」、商品名「ラジカット(登録商標)」:田辺三菱製薬株式会社製造・販売)、本発明の組織移植における移植組織の生着増強又は増殖増強に用いる製剤として、上記市販製剤をそのまま用いることができる。

上記の式(I)の化合物を投与するに際しては、例えば免疫抑制剤等の他の薬剤と共に投与することも可能である。

[0029] 本発明の医薬は、例えば、脾臓移植の直後、6時間後、12時間後、24時間後、36時間後、48時間後またはそれ以上後などに、計1回、計2回、計3回、計4回またはそれ以上の回数、投与され得る。好ましくは、脾臓移植の直後およびその24時間後の計2回投与されるか、または脾臓移植の直後、その12時間後およびその24時間後の計3回投与される。最も好ましくは、本発明の薬学的組成物は、脾臓移植の直後およびその24時間後の計2回投与される。本明細書中において、脾臓移植の「直後」とは、脾臓移植手術中(閉腹まで)を含む。

[0030] 本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口的又は非経口的に投与することができる。

本発明の医薬の投与量は患者の年齢や状態などの条件に応じて適宜選択可能であるが、一般的には、成人に対して0.1~100mg/kg程度を注射又は点滴により投与するか、0.1~100mg/kg程度を経口的に投与することが好ましい。具体的に

は、被験体の体重1kg当たり、約0.1mg/日～約100mg/日であり、より好ましくは、約0.1mg/日～約50mg/日であり、さらにより好ましくは、約1mg/日～約10mg/日であり、最も好ましくは、約3mg/日である。注射により投与する場合には、例えば、特開昭63-132833号公報に記載された注射剤などを用いることが好適である。

[0031] 本明細書において使用される「膵島細胞」とは、ランゲルハンス島ともいわれ、膵臓の内分泌機能を司る細胞集合体をいう。膵島細胞は、膵A細胞、膵B細胞及び膵D細胞の3種類の細胞から構成される。細胞集団を構成する主要な細胞は、膵B細胞であり、膵臓の中心部を占めている。この膵B細胞によってインスリンが分泌される。1型糖尿病では、発症から間もない時期にリンパ球を主体とする細胞浸潤が認められる。やがて膵B細胞が選択的に消失するとともに、膵島はその容積が減少し、膵A細胞が主体となる。膵島のインスリン分泌には予備能があり、90～95%の膵A細胞が消失した場合に1型糖尿病が発症する。2型糖尿病では膵島に形態学的な変化は基本的には認められず、ただ膵島によるインスリン分泌能が低下する。

[0032] 本明細書において使用される「移植」とは、自己移植、同系移植及び同種移植を包含する。本明細書において、自己移植とは、自家移植ともいい、同一個体間で行われる移植をいう。遺伝的背景が全く同一であるため、移植片拒絶反応は起こらない。本明細書において、同系移植とは、移植片のドナーとレシピエントとが異なる個体に属するが、遺伝的背景が同一である場合の移植をいう。具体的には、一卵性双生児又は純系(同系)動物間の移植が挙げられる。この移植においても、移植片拒絶反応は起こらない。本明細書において、同種移植とは、臨床医学的な血縁間又は非血縁間での移植である。ドナーの移植片の中にはレシピエントには存在しない抗原が存在するため、免疫抑制的処置がなければレシピエントの免疫系が応答し、数日～数週のうちに移植片を拒絶及び排除する。本発明の一実施形態において、膵島移植は自己移植で行われる。本発明の別の実施形態において、膵島移植は同系移植で行われる。本発明のなお別の実施形態において、膵島移植は同種移植で行われる。

発明の効果

[0033] 組織移植における移植組織の生体内での生着増強剤又は増殖増強剤を提供する。これによって、一人のレシピエントに対して一人のドナーで十分であるような組織移植法を確立して、現在の大きな問題点の1つであるドナー不足を解消することが可能である。

発明を実施するための最良の形態

[0034] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

実施例

[0035] (糖尿病ラットの作製)

(1)レシピエントラットはF344 ラット6～8週齢オス100～150g程度を使用した。ラットをエーテル麻酔下でStreptozotocin (Sigma) 70mg/kgを腹腔内注入し、糖尿病ラットを作製した。

(2)STZ注入2日目以降に血糖を測定し、連続400mg/dl以上をもって糖尿病ラットであることを確認し、レシピエントラットとした。

[0036] (膵島分離)

(1)ドナーラットはF344 ラット8～12週齢オス150～200g程度を使用した。

(2)コラゲナーゼS-1/10mg をHBSS(1%BSA) 20mlに溶解しコラゲナーゼHBSS液(100U/ml以上)を作製し氷中に保存した。1匹につき20mlを必要とする。

(3)ラットをエーテル麻酔下に断頸、瀉血し、開腹して腹腔内臓器を全摘出した。

(4)総胆管を肝管合流部付近で露出した。24Gエラスターを左肝管からカニューレーションし(膵胆管合流部が上流のことがあるため深く挿入しない)、4-0絹糸で結さつ固定した。総胆管十二指腸側を4-0絹糸で結さつした。

(5)24GエラスターからコラゲナーゼHBSS液15mlをゆつくり注入し、膵臓を尾部まで十分に膨張させた。

(6)膨潤した膵臓を摘出した。腸液と膵液が酵素反応するため、腸管を傷つけないように注意しつつ、付着している脂肪組織をできるだけ除去した。

(7)残りのコラゲナーゼHBSS液5mlと混和し、氷上の50ml試験管に移した。

(8)膵組織を含むコラゲナーゼHBSS液にCO₂ ガスを加えて37℃高温槽に入れ、2

0分間インキュベートし、酵素消化させた。

(9) 20分後、試験管を氷上に移し酵素消化を止め、氷冷HBSS40mlで混和し、優しくピペッティング攪拌した。

(10) 遠心分離(2000rpm, 1分, 4°C)し、上清をデカント除去した。

(11) 氷冷HBSS40mlを加え、ピペッティング攪拌した。

(12) 遠心分離(2000rpm, 1分, 4°C)し、上清を除去し、氷冷HBSS40mlを加えてピペッティング攪拌し、金属メッシュを通して50ml試験管に移した。

[0037] (13) 遠心分離(2000rpm, 1分, 4°C)、上清を除去し、水分を十分に拭き取った。

(14) 沈殿した組織に常温のFicoll-Conray・A液4mlを加え、ピペッティング攪拌し、15ml試験管に移した。

(15) Ficoll-Conray・C液3mlとD液2mlを順に丁寧に重層した。

(16) 遠心分離(2200rpm, 10分, 15°C)した。

(17) B液とC液の間層に臍島が集まるが、B液とC液の2層をすべて抽出した。

(18) 氷冷RPMI/10%FBS10mlで攪拌し、遠心分離(2000rpm, 1分, 4°C)した。

(19) 上清を除去し、氷冷RPMI/10%FBS10mlで攪拌し、遠心分離(2000rpm, 1分, 4°C)した。

(20) 上清を除去し、RPMI/10%FBS10mlで攪拌し、黒シャーレに移した。

(21) 黒シャーレに市販品のラジカット(登録商標)注30mgの0.116ml(エダラボンとして100 μ mol)を入れた。

(22) シャーレを回転させながら揺らして臍島を中央に集めながら、臍島が沈殿するのを待った。

(23) 中央に沈殿した臍島を、ピペットでカウントしながら回収した。

(24) 再び臍島を中央に集め、回収した。ゆっくり時間をかけて臍島が沈殿するのを待ち、3回程で回収した。ドナーラット1匹で約200~250個の臍島が回収できた。

[0038] (実施例1: 臍島移植及びエダラボン投与による、糖尿病ラット血糖値の推移)

(臍島移植)

上述の方法で調製した10匹糖尿病ラットを、ネンブタール20mg/kg(10倍希釈4

mg/kgBW)腹腔内麻酔下を開腹し、分離した膵島約200～250個(ドナーラット1匹分)を門脈から26G針で注入した。タココンプ綿棒で圧迫止血した。

[0039] (エダラボン投与)

止血確認後、尾静脈より、市販品のラジカット(登録商標)注30mgを用いて、エダラボン3mg/kgを全身投与したのち、閉腹した。移植24時間後に、尾静脈より、市販品のラジカット(登録商標)注30mgを用いて、エダラボン3mg/kgを全身投与した。このラットの血糖値の推移を図1に示す。同量の一匹分のラットの膵島細胞を移植し、エダラボンを投与しなかったコントロールラットにおける血糖値の推移を図2に示す。図1と図2との比較から、移植直後及び移植24時間後にエダラボンを投与したラットでは、顕著に血糖値が低下したのに対して、コントロールラットでは血糖値の低下は見られなかった。この結果から、本発明の医薬を使用することで、1個体のドナー由来の膵島細胞による膵島移植によって1個体のレシピエントにおける高血糖状態を改善し得ることが実証された。この結果は、エダラボンがレシピエントの体内において、膵島細胞の生着又は増殖を増強させているものと考えられる。

また、エダラボンには血糖上昇抑制作用が認められている(日本公開特許公報 特開平3-215426号公報)が、ラットに3mg/kgのエダラボンを投与したときの血中濃度半減期は1時間未満であり(薬理と治療 vol.25 Supplement 1997 pp.255-281)、投与翌日にはエダラボン自体の血糖上昇抑制効果は消失するものと考えられる。一方で、図1の結果によれば、移植後7日以降(2回目のエダラボン投与後6日以降)でも血糖値はコントロールラットに比べて低値を示している。よって、今回の結果はエダラボン自体の血糖上昇抑制効果によるものではなく、エダラボンが膵島細胞の生着又は増殖を増強させた結果として高血糖状態を改善しているものと考えられる。

図面の簡単な説明

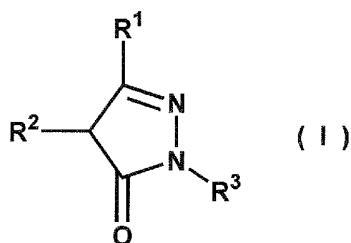
[0040] [図1]図1は、1匹分の膵島細胞を移植し、移植直後及び移植から24時間後に3mgのエダラボンを投与した糖尿病ラットにおける、血糖値の推移を示す。

[図2]図2は、1匹分の膵島細胞を移植した糖尿病ラットにおける血糖値の推移を示す。

請求の範囲

[1] 下記式(I)

[化1]



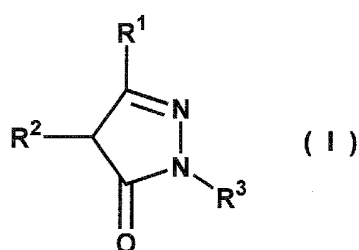
(式中、 R^1 は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、 R^2 は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、 R^3 は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラズロン誘導体若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分とする組織移植における移植組織の生着増強剤又は増殖増強剤。

[2] 式(I)で示される化合物が3-メチルー1-フェニルー2-ピラズリン-5-オンである請求項1に記載の生着増強剤又は増殖増強剤。

[3] 移植組織が臍島細胞である請求項1又は2に記載の生着増強剤又は増殖増強剤。

[4] 下記式(I)

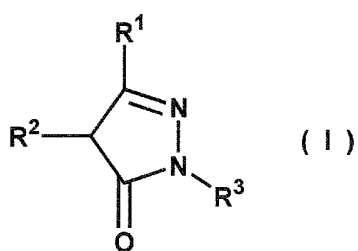
[化2]



(式中、 R^1 は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、 R^2 は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、 R^3 は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラズロン誘導体若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、組織移植における移植組織の生着増強方法又は増殖増強方法。

- [5] 式(I)で示される化合物が3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オンである請求項4に記載の生着増強方法又は増殖増強方法。
- [6] 移植組織が臍島細胞である請求項4又は5に記載の生着増強方法又は増殖増強方法。
- [7] 組織移植における移植組織の生着増強剤又は増殖増強剤の製造のための、下記式(I)

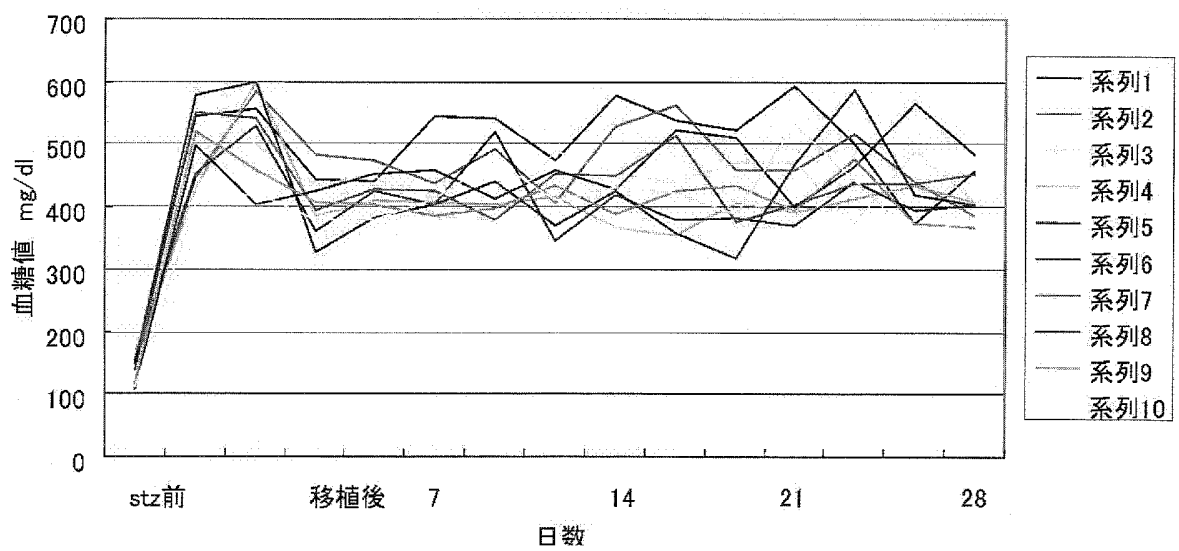
[化3]



(式中、R¹は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、R²は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は炭素数1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、R³は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラズロン誘導体若しくはその生理的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の使用。

- [8] 式(I)で示される化合物が3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オンである請求項7に記載の使用。
- [9] 移植組織が膵島細胞である請求項7又は8に記載の使用。

图 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D231/26(2006.01)i, A61K31/4152(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P39/06(2006.01)i, A61P41/00(2006.01)i, A61P43/00(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)

C07D231/26, A61K31/4152, A61P1/18, A61P3/10, A61P39/06, A61P41/00, A61P43/00

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

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

CAPLUS/REGISTRY (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/Y	JP 11-79991 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 23 March, 1999 (23.03.99), Full text; particularly, Claim 6 (Family: none)	1, 2, 7, 8/1-3, 7-9
Y	RAO P. et al., Protective Effect of a Radical Scavenger, MCI-186 on Islet Cell Damages Induced by Oxidative Stress Transplantation Proceedings, 2005, 37(8), pp.3457-3458	1-3, 7-9
Y	Takeshi SHUTO et al., "Kansaisei ni yoru Kannai Ishoku Suito no Seichaku Sokushin Koka - Sui Setsujogo Jika Suito Ishoku no Seiseki Kojo ni Mukete -", Japanese Journal of Gastroenterological Surgery, 01 July, 2004 (01.07.04), 37(7), page 1332	1-3, 7-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
14 April, 2008 (14.04.08)

Date of mailing of the international search report
01 May, 2008 (01.05.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056064

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 3-215426 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 20 September, 1991 (20.09.91), (Family: none)	1-3, 7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056064

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.: 4 - 6

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

Claims 4 to 6 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the 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

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056064

Document 4 reports and indicates that 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one has an effect of inhibiting a blood sugar level rise and this functional effect lasts for about 7 days.

In the present invention, on the other hand, a compound represented by the general formula (I) is used as an engraftment enhancer or a proliferation enhancer for a transplanted tissue in tissue transplantation. In the pharmacological test conducted in practice in Examples, however, blood sugar level changes were compared merely in the case of pancreatic islet transplantation alone and in the case of combining pancreatic islet transplantation with 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. Considering that 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one alone has an effect of inhibiting a blood sugar level rise lasting for about 7 days as reported in document 4, there is a possibility that the fact that the blood sugar was maintained at a low level in the case of combining pancreatic islet transplantation with 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one was caused not by the enhancement of the engraftment or proliferation of pancreatic islet cells by 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one but merely by the effect of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one of inhibiting a blood sugar level rise. Therefore, it cannot be directly concluded based on the above-described pharmacological test alone that the compound represented by the general formula (I) is usable as an engraftment enhancer or a proliferation enhancer in a transplanted tissue in tissue transplantation.

Such being the case, claims 1 to 3 and 7 to 9 of the present application are not supported in the meaning within PCT Article 6.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C07D231/26(2006.01)i, A61K31/4152(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P39/06(2006.01)i, A61P41/00(2006.01)i, A61P43/00(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 (I P C))

Int.Cl. C07D231/26, A61K31/4152, A61P1/18, A61P3/10, A61P39/06, A61P41/00, A61P43/00

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

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)

CAplus/REGISTRY(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 請求の範囲の番号
X/Y	JP 11-79991 A (三菱化学株式会社) 1999.03.23, 全文、特に請求項 6 (ファミリーなし)	1, 2, 7, 8/1-3, 7-9
Y	RAO P. et al., Protective Effect of a Radical Scavenger, MCI-186 on Islet Cell Damages Induced by Oxidative Stress Transplantation Proceedings, 2005, 37(8), pp.3457-3458	1-3, 7-9
Y	首藤毅ら, 肝再生による肝内移植膵島の生着促進効果—膵切除後自家膵島移植の成績向上にむけて—	1-3, 7-9

☒ 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

1 4 . 0 4 . 2 0 0 8

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 5 . 2 0 0 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

植原 克典

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 2

4 P

9 8 4 0

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	日本消化器外科学会雑誌, 2004. 07. 01, 37(7), p. 1332 JP 3-215426 A (三菱化成株式会社) 1991. 09. 20, (ファミリーなし)	1-3, 7-9

法第8条第3項（P C T 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。

- 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)

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

☐ 追加調査手数料及び、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。

引用文献4には、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンが血糖上昇抑制作用を有すること、そして、その作用効果は7日程度持続することが記載、示唆されている。

一方、本願発明は、式(I)で表される化合物を組織移植における移植組織の生着増強剤又は増殖増強剤として用いるものであるが、実施例にて実際に行われている薬理試験は、脾島移植のみの場合と脾島移植と3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを組み合わせた場合の血糖値の変化を比較しているのみであり、引用文献4に記載のとおり、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンが単独で7日程度の血糖上昇抑制作用を有することを鑑みれば、脾島移植と3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンを組み合わせた場合の血糖値が低く維持されているのは、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンが脾島細胞の生着又は増殖を増強しているのではなく、単なる3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンによる血糖上昇抑制効果である可能性があることより、上記薬理試験のみからでは、本願発明は、式(I)で表される化合物が組織移植における移植組織の生着増強剤又は増殖増強剤として使用し得ることを直ちに導くことができない。

よって、本願請求項1～3、7～9は、PCT第6条の意味での裏付けを欠いている。