(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3577313号
(P3577313)
(45)発行日　平成16年10月13日(2004.10.13)　(24)登録日　平成16年7月16日(2004.7.16)

(51)Int.Cl.[7]　F I
A61K 38/27　A61K 37/36
A61P 13/12　A61P 13/12

請求項の数 10　(全 37 頁)

(21)出願番号　特願平6-508296
(86)(22)出願日　平成5年9月15日(1993.9.15)
(65)公表番号　特表平8-501778
(43)公表日　平成8年2月27日(1996.2.27)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/008734
(87)国際公開番号　WO1994/006461
(87)国際公開日　平成6年3月31日(1994.3.31)
審査請求日　平成12年5月23日(2000.5.23)
(31)優先権主張番号　07/949,594
(32)優先日　平成4年9月22日(1992.9.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　ジェネンテク，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア　９４０８０―４９９０、サウス・サンフランシスコ、ディーエヌエイ・ウェイ　１
(74)代理人　弁理士　園田　吉隆
(74)代理人　弁理士　小林　義教
(72)発明者　クラーク、ロス・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア９４０４４、パシフィカ、ウルスラ・ドライブ７１１番

審査官　瀬下　浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】急性腎不全の予防方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

急性腎不全（ARF）が起こると予測される、あるいは起こりつつある哺乳動物のための、IGF－Ｉを必須成分とする急性腎不全の予防薬。

【請求項２】

哺乳動物がヒトである請求項１に記載の予防薬。

【請求項３】

IGF－Ｉの有効量が0.01から1mg/kg/dayである請求項１又は２に記載の予防薬。

【請求項４】

ARFが起こった後も継続投与される請求項１ないし３の何れか１項に記載の予防薬。

【請求項５】

ARFが虚血性腎臓傷害によるものである請求項１ないし４の何れか１項に記載の予防薬。

【請求項６】

ヒトが心臓手術を受けつつある場合の請求項２に記載の予防薬。

【請求項７】

哺乳動物が腎臓移植を受けている場合の請求項１ないし４の何れか１項に記載の予防薬。

【請求項８】

移植の前に投与される請求項７に記載の予防薬。

【請求項９】

移植の間に投与される請求項７に記載の予防薬。

【請求項１０】
ARFが腎臓毒傷害によるものである場合の請求項１ないし４の何れか１項に記載の予防薬。
【発明の詳細な説明】
（発明の背景）
（発明の分野）
この発明は哺乳動物の急性腎不全の予防または改善方法に関するものである。急性腎不全は、細胞壊死や腎臓機能低下を起こす腎血流減少または腎臓毒に起因するものであろう。
（関連技術の説明）
インシュリン様の成長因子Ｉ（IGF－Ｉ）は、例えば血液やヒトの脳脊髄液のようなヒトの体液の中に天然に存在するポリペプタイドである。腎臓を含む大抵の組織は、特定のIGF－結合蛋白と共にIGF－Ｉを生産する。IGF－Ｉの生産は成長ホルモン（GH）の支配的な刺激的影響下にあり、そして若干のIGF－Ｉ結合蛋白もまたGHによって影響をうける。Tanner et al.,Acta Endocrinol.84:681－696（1977）;Uthne et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,39:548－554（1974）を参照。IGF－Ｉはヒトの血清から単離されており組換えで製造される。例えばEP 123,228及び128,733を参照。
ヒト成長ホルモン（hGH）は191のアミノ酸から成る単一鎖のポリペプタイドである（分子量は21,500）。ジスルフィド結合は53と165の位置および182と189の位置を結合する。Niall,Nature,New Biology,230:90（1971）。hGHは特に窒素、燐、カリウム及びカルシウムの保持の故に活性な蛋白同化剤である。下垂体切除ラットをGHで処置すると、ラットの少なくとも一部の成長率を保持できる。Moore et al.,Endocrinology,122:2920－2926（1988）。下垂体（GH－欠乏）対象における最も著しい効果の中に、成長増大を起こす骨成長板軟骨の加速された直線的成長がある。Kaplan,Growth Disorders in Children and Adolescents（Springfield,IL:Charles C.Thomas,1964）。
特に月経閉止後の女性においてはGH分泌は年齢と共に下降することが報告されている。Millard et al.,Neurobiol.Aging,11:229－235（1990）;Takahashi et al.,Neuroendocrinology,46:137－142（1987）。また次も参照。Rudman et al.,J.Clin.Invest.67:1361－1369（1981）;Blackman,Endocrinology and Aging,16:981（1987）。更に、減少した身体の痩せ、脂肪組織塊の拡張および皮膚の薄化を含めた老化の現れの若干は、毎週３回のGH処置で減少出来るとの報告がある。例えばRudman et al.,N.Eng.J.Med.,323:1－６（1990）および同じ雑誌でのそれに随伴するDr.Vance（pp52－54）による報告を参照。
６月齢のラットに比べて20月齢のラットではIGF－Ｉレベルは半分に減少しているとの報告がある。Takahashi and Meiters,Proc Soc.Exp.Biol.Mex.,186:229－233（1987）。更に次をも参照。Florini and Roberts,J.Gerontol.35:23－30（1980）;Florini et a.,Mech.Ageing Dev.,15:165－176（1981）;Chatelain et al.,Pediatrie,44:303－308（1989）;Florini et al.,J.Gerontol.40:2－７（1985）;Hall and Sara,Clinics in Endocrin.and Metab.,13:91（1984）;Baxter,Advances in Clinical Chemistry,25:49（1986）;Clemmons and Under wood,Clinics in Endocrin.and Metab.,15:629（1986）;Hintz,Advances in Pediatrics,28:293（Year Book Medial Publishers,Inc.,1981）;Johanson and Blizzard,The Johns Hopkins Medical Journal,149:115－117（1981）。最後の５つの文献は老人における低IGF－Ｉレベルを述べている。Hintz;Clemmons and Underwood;及びBaxterの文献はIGF－Ｉについての一般的総説である。
更に、試験管内での熟成培養でサイクル化の能力のあるヒトの２倍体繊維芽細胞の中には、血小板由来の成長因子（PDGF）および上皮成長因子（EGF）による成長フラクションの調節に僅かの変化があるがＳ相内への侵入速度の調節にはIGF－Ｉに極めて多く存在していることが見いだされた。Chen and Rabin ovitch,J.Cell.Physiol.,144:18－25（1990）。著者等は、熟成培養における細胞分裂数のゆっくりした成長は通常供給されるものよりうんと多いレベルでのIGF－Ｉの必要性に関連していると思われる。これは多分IGF－Ｉ結合蛋白（IGFBP－３）の過剰生産によるものであり、従ってそのレセプターに対するIGF－Ｉの入手の現象によるものと思われる。Golstein et al.,"Cellular and Molecular Appl

ications to Biology of Aging",AFCR Meeting Abstract,Seattle,May 4－5,1991。
老齢の哺乳動物以外におけるIGF－Ｉの種々の生物学的活性が同定された。たとえばIGF－Ｉは糖尿病を治療するのに用いるヒトの血中グルコース濃度を低下させることが報告されている。Guler et al.,N.Engl.J.Med.,317:137－140（1987）;Froesch et al.,U.S.Pat.No.4,988,675。更にIGF－Ｉは心不全を治療したり（WO 92/11865,published 23 July 1992）ならびに下垂体切除ラット（Skottner et al.,J.Endocr.,112:123－132（1987））、糖尿病のラット（Scheinwiller et al.,Nature,323:169－171（1986）及び小型のラット（Skottner et al.,Endocrinoloy,124:2519－2526（1989））のようなIGF－Ｉの低いレベルで特徴づけられるいくつかの代謝条件における成長を促進したりするのに有用であるとの報告がある。迅速に成長しているラット新生児におけるIGF－Ｉの同化効果は生体内で見出されている。Philipps et al.,Pediatric Res.,23:298（1988）。食餌の少ない、ストレスのある、または病気の動物においてはIGF－Ｉレベルは減少することが良く知られている。
下垂体切除ラットの腎臓の重さは皮下へのIGF－Ｉの長期注入によって実質的に増大する。Guler et al.,Proceedings of the 1st European Congress of Endocrinology,103:abstract 12－390（Copenhagen,1987）;Guler et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:4889－4893（1988）。スネルの小型のマウス及び小型のラットの腎臓も同様である。van Buul－Offers et al.,Pediatri.Res.,20:825－827（1986）;Skottner et al.,Endocrinology,supra。Ｎ－末端から最初の３つのアミノ酸を除去したdes－IGF－Ｉと呼ばれる先端切除IGF－Ｉ分子が、GH欠乏ラットにおける腎臓成長因子としてIGF－Ｉよりも活性であることが見いだされた。Lemmey et al.,Am.J.Physiol.260:E213－E219（1991）。
ヒトや動物へのGHの投与は糸球体の濾過速度、腎臓プラスマ流、近位細管ホスフェート再吸収および近位細管ブドウ糖新生を増大することを示す長い研究の歴史がある。Corvilain and Abramow,J.Clin.Invest.,41:1230－12135（1962;Corvilain and Abramow,J.Clin.Invest.,43:1608－1612（1964）。腎臓機能に対するこれらの効果のほかに、過剰のGHもまた糸球体や近位尿細管の肥大をおこすことが報告されている。Gershberg et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,17:377－385（1957）。しかしヒトにおいては腎臓機能は短期間のGH注入では変化しないので、GHのこれらの効果の幾つかは直接的のものではないこともまた認められている。Parving et al.,Acta Endocrinol.,89;796－800（1978）。
GH－IGF軸は全身の正常な組織成長と同化活性に関係している。GHの作用は、元来はソマトメジンまたは成長仲介物質と呼ばれたところのIGF類によって大いに仲介されていると信じられている。IGF－Ｉレベルは、単純な腎臓切除、実験的糖尿病およびカリウム欠乏を伴って１－２日にわたり対側の腎臓で増大する。Flyvbjerg et al.,"Kidney IGF－I Accumulation Occurs in Four Diffeent Conditions with Rapid Initial Kidney Growth in Rats",Modern Concepts of Insulin－Like Growth Factors,EM Spencer,eds.,Elsevier s Publishing,NY,pp.207－217（1991）;Stiles et al.,Endocrinology,117:2397－2401（1985）。GHは単離したラットの腎採取管でのIGF－Ｉ遺伝子の発現を刺激することが見いだされている。Rogers et al.,J.Amer.Phys.,F474－F479（1990）。GHは用量依存的に下垂体切除ラット腎臓の顕著な酸性化欠陥を補正することができる。Welbourne and Cronin,Amer.J.Phys.,R1036－R1042（1991）。
GHについて以前に見られた効果のいくつかは、IGF－Ｉが動物やヒトに投与されたときに引き続き見られるが（Guler et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:4889－4893（1988））、IGFはGHによって必須的には調節されない。ウサギの近位回旋細管移動に対するGHとIGF－Ｉの効果の結果の相違が報告されている。Quigley and Baun,J.Clin.Invest.,88:368－374（1991）。
腎臓はGH投与に反応してIGFを生産すること、及びIGF－Ｉは腎臓組織内に高度に濃縮されることが同時に報告されている。McConaghey and Dehnel,J.Endocrinol.,52:587－588（1972）;D'Ercole et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:935－939（1984）。これらの観察は、GHの欠如下においても腎臓内のIGF－ImRNAの定常的状態のレベルを示し（Murphy et al.,Endocrinology,121:684－691（1987））また腎臓採取管へのIGF－Ｉペプタイドの免疫

組織化学による局地化（Andersson and Jennische,Acta Physiol.Scand.,132:453－457（1988））へと引き続き拡大された。更にIGF－Ｉはラットの腎臓の採取管や（Fagin and Melmed,Endocrinol.120:718－723（1987））、ヒトの排泄物（Han et al.,Science Wash.EDC,236:193－198（1987）;Hen et al.,Pediatrics Res.,22:245－247（1987））内にも見いだされた。さらには腎臓の成長に対するIGF－Ｉの効果はGHの同時投与によっては減少しなかった（U.S.Pat.No.5,126,324 issued June 30,1992）。

腎臓内ではIGF－ImRNAは独立して生産されるし、またIGF－ImRNAを増大させる採取管内のレセプターとのGH結合によって生産される。生産されたIGF－Ｉは次いで細胞外の空間に入り、近位尿細管内のIGF－Ｉレセプターをパラクリニア的に相互作用をする。GHは単離したラットの腎臓採取管内のIGF－Ｉ遺伝子発現を促進することが見いだされた。Rogers et al.,Am.J.Physiol.259:F474－F479（1990）。腎臓組織は、腎臓細胞の膜上のIGF－Ｉレセプターの高い濃度の故に極めてIGF－Ｉに反応的である。Hammerman,Am.J.Physiol.257:F5－３－F514（1989）;Rogers and Hammerman,Proc.Natl.Acad.USA,86:6363－6366（1989）;Hammerman and Gavin,Am.J.Physiol.,251:E32－E41（1986）;Pillion et al.,Am.J.Physiol.,255:E504－E512（1988）;Hammerman and Rogers,Am.J.Physiol.,253:F841－F847（1987）。IFG－Ｉ因子はまた動脈平滑筋、静脈内皮および基礎側面膜のようなところに存在している。Conti et al.,Am.J.Physiol.,255:F1214－F1219（1988）;Arnqvist et al.,Am.J.Physiol.,254:C411－C414（1988）。

高められたGHの循環は、増大した腎臓プラズマ流と糸球体腎臓流と関連している。実際、腎臓の血流力学の測定値はGHの単一注入の数時間後以内に上昇し、ほぼ同時にその血清IGF－Ｉ濃度は増大する。これらの発見は、IGF－Ｉは腎臓プラズマ流と糸球体ろ過速度を増大させ得ることを示唆する。実際、IGF－Ｉは糸球体ろ過と腎臓プラズマ流を上昇させ（Guler et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:2868－2872（1989））そして腎臓ホスフェート輸送とプラズマ1,25－ジヒドロキシビタミンD_3を増大させる（Caverzacio et al.,Endocrinol.,127:453－459（1990））ことが見いだされた。さらに、60－72時間断食させたラットへの短期間のIGF－Ｉの単独注入は糸球体濾過速度を上昇させること（Hirschberg and Koppel,J.Clin.Invest.,83:326－330（1989）;Hirschberg et al.,J.Clin.Invest.,87;1200－1206（1991））およびヒトへのIGF－Ｉの投与は糸球体濾過速度と腎臓プラズマ流を高めることが見いだされた。Guler et al.,Acta Endocrinol.,121:101－106（1989）;Froesch et al.,Trendsin Endocrinology and Metabolism,p.254－260,Vol.1,Issue 5（Elsevier Science Pub.Co.,1990;U.S.Pat.No.5,106,832 issued 21 April 1992。

更に、EGFは虚血後の急性腎不全（Humes et al.,J.Clin.Invest.,84:1757－1761（1989）;Norman et al.,Clin.Sci.,78:445－450（1990））及び腎臓毒の塩化第二水銀による損傷（Coimbra et al.,Am.J.Physiol.,259:F438（1990））における腎臓修復の再生を促進することが示されている．加うるに、もう一つ他の成長因子である形質転換増殖因子α（TGF－α）もまた腎臓に対する虚血傷害からの腎臓修復と回復を促進するとの報告がある（Reiss et al.,Kidney Internat.,37:492（1990））。

GHの投与は糸球体濾過速度と腎臓プラズマ流を増大することが見いだされているので（Haffner et al.,Clin.Nephrol.,32:266－269（1989）;Hirschberg et al.,Kidney Int.,35:865－870（1989））、このホルモンは慢性の腎不全の治療における腎臓機能を高めるための薬剤として用い得ることが示唆されている。Gershberg,J.Clin.Endocrinol.Metab.20:1107－1119（1960）;White et al.,Am.J.Physiol.,157:47－51（1949）。しかし正常な腎臓機能の背景における発見とは対照的に、慢性腎不全のヒト成人（Beck et al.,Metabolism,13:1108－1134（1964）;Haffner,supra）や子供（Koch et al.,J.Pediatr.115:365－371（1989））へのGHの投与は糸球体濾過速度を上昇させなかった。これらの研究は、種々の程度と多くの病因の慢性腎不全患者を対象としている。

腎臓の成長や修復におけるIGF－Ｉの急性的役割はもっと論争的である。GH治療により肥大した腎臓や（D'Ercole et al.,supra）、片側腎臓切除に伴う残存腎臓の肥大（Andersson and Jennische,supra）においてはIGF－Ｉ蛋白が増大することを示すデータがある。さらに1991年には、腎臓補償肥大におけるIGF－Ｉの役割が論争的として記載されている

。Mulroney and Haramati,73rd Annual Meeing,The Endocrine Society,June 19－22,9119,page 141 of Programs and Abstract Book,Abstract 444参照。しかしIGF－Ｉ腎臓で多くの役割を持っているので、これらの環境下での組織IGF－Ｉ量の増大は、腎臓の成長反応における役割を必須的に示すものではない。
IGF－ImRNAとIGF－Ｉレセプターm RNAの位置の間には大きな差異がある。IGF－Ｉへのメッセージは、主に近位尿細管内に見いだされ採取管を欠如する腎臓IGF－Ｉレセプターの塊りからの採取管「下流」内に主として見いだされる。Lajara et al.,Am.J.Physiol.,257:F252－261（1989）。レセプターとリガンドのこの異なる分布は、IGF－Ｉレセプターは腎臓皮質内にあり、一方IGF－Ｉは腎臓髄室にあるという点において変わっている。局地的な腎臓IGF－Ｉペプタイドは腎臓内で僅かの活性しか持たず、そして尿細管内のIGF－Ｉレセプターは一般の循環からの内分泌のIGF－Ｉに主として反応するということが可能である。たとえば次の腎臓傷害のような腎臓IGF－Ｉ（mRNAまたはペプタイド濃度）の変化の基本的特徴は従って疑問的である。Miller and Hammerman,Am.J.Physiol.F747－F751（1990）;Martin et al.,Proc.2nd Int.IGF Symposium,p.1423（1991）。
急性腎不全（ARF）はすべての入院患者の５％近くと集中治療単位患者の20%の経過を悪化させる。すべての場合の１％において腎不全は重篤であり死亡の危険は全体で６倍増加する。ARFは通常は、細胞壊死をもたらす腎臓毒や近位尿細管の破損でおこる腎臓血流の現象によるものである。これに続いて窒素生産物、液および電解質の減少ならびに加速された異化作用状態がおこる。もしもARFが重篤で長引けば、血液透析治療が行われない限り死亡する。現在の治療は、液の平衡、電解質のホメオスタシス、複雑な医療問題の処理、いろんな関与する腎臓毒の透析および注意深い監視を含むところの早期診断と援護的治療を包含している。何週間かの最後の段階の間、患者は高いリスク状態にある。最初の場合におこるARFを予防するか、または少なくともその効果を改善するような薬物の必要がこの技術においては存在する。
従ってこの発明の目的は、ARFにかかるリスクのある哺乳動物におけるARFの予防や改善に有用な薬物を提供することである。
最も通常的には、典型的には虚血性腎臓傷害に由来する高窒素血症や乏尿をもたらす急性尿細管壊死を予防または改善することが一つの特異的な目的である。そのような通常および重篤な傷害からの快復は典型的には入院患者の透析では４－６週間を要し顕著な死亡率を伴う。
この発明の他の目的はARF患者の透析の必要性を無くするか減少させることである。
非乏尿性の腎臓疾患の予防または改善はこの発明の更に他の目的である。
これらの目的は当業者にとって明白であろう。
（発明の要旨）
従ってこの発明は、ARFが起こるかまたは起こりつつあると予期される時またはその前にIGF－Ｉの効果的量（即ち、有効量）を哺乳動物に投与することから成るところの、ARFの危険性にある哺乳動物におけるARFの予防の方法を提供することである。
もしもIGF－Ｉが、虚血または腎臓毒により腎臓傷害が起こるか起こりつつあると予期される時かその前に投与されると、ARFは予防されないまでも少なくとも改善され得る。
【図面の簡単な説明】
図１は７日間にわたるIGF－Ｉ処理ウサギ（ひし形）と対照（正方形）に対するウサギ腎臓虚血および再灌流における血中の尿素窒素濃度のグラフである。
図２は７日間にわたるIGF－Ｉ処理ウサギ（ひし形）と対照（正方形）に対するウサギ腎臓虚血および再灌流における血清クレアチニンレベルのグラフである。
図３は７日間の期間にわたるdes－IGF－Ｉ処理および対照－閉塞ウサギの毎日の重量のグラフであって、中に点のある黒い正方形は正常であり、中に点のある白い正方形は吸蔵およびdes－IFG－Ｉであり、黒いひし形は閉塞対照であり、そして白いひし形は無処理の開腹である。des－IGF－ＩはIGF－Ｉの同族体である。
図４は、腎臓（黒い正方形）、脾臓（１方向の線）および心臓（２方向の線）についてのdes－IGF－Ｉ処理および対照－閉塞ウサギの臓器の重量のグラフである。変異の分析（AN

OVA）のｐ値は腎臓（0.0004）（対照［cl.］Ｎ＝7,desN＝９）および脾臓（0.028）については有意であり、心臓（0.84）（cl.N＝6,desN＝４）については統計的に有意でなかった。
図５はdes－IGF－Ｉ処理、閉塞（正方形）および対照－閉塞（ひし形）における７日間の血清クレアチニンレベルのグラフである。
図６はdes－IGF－Ｉ処理、閉塞（正方形）および対照－閉塞（ひし形）における７日間の血清尿素窒素レベルのグラフである。
図７はIGF－Ｉ処理および対照のウサギの臓器の重量のグラフで、直線は腎臓をあらわし、点線は心臓をあらわし、水平の線は胸腺をあらわし、そして対角線は脾臓をあらわす。
図８はIGF－Ｉ処理、閉塞（正方形）及び対照－閉塞（ひし形）における６日間の血清クレアチニンレベルのグラフである。
図９はIGF－Ｉ処理、閉塞（正方形）及び対照－閉塞（ひし形）における６日間の血清尿素窒素レベルのグラフである。
図10は腎臓外皮組織による90分にわたる3H－ｐ－アミノ馬尿酸塩（^{3}H－PAH）摂取のグラフである。白い正方形は正常を、白い三角形は閉塞＋des－IGF－Ｉを、白い丸印は閉塞＋IGF－Ｉを、そして半黒の正方形は閉塞対照をあらわす。
図11は腎臓外皮組織による90分にわたる^{14}C－TEA摂取のグラフである。白い正方形は正常を、白い三角形は閉塞＋des－IGF－Ｉを、白い丸印は閉塞＋IGF－Ｉを、そして半黒の正方形は閉塞対照をあらわす。
図12は下垂体切除ラットにおけるdes－IGF－Ｉ（黒い正方形）およびIGF－Ｉ（白い正方形）の投与量に対する腎臓の重量のグラフである。ラットは、IGF－ＩまたはdesーIGF－Ｉの各々６用量で皮下ミニポンプ注入で７日間処理し、屠殺しそして両方の腎臓の湿重量を求めた。
図13は希釈剤（丸印）またはdes－IGF－Ｉ（正方形）を用いての７日間にわたるラットでの体重増加のグラフである。
図14は希釈剤（丸印）またはdes－IGF－Ｉ（正方形）を用いての７日間にわたるラットでの血中尿素窒素レベルのグラフである。
図15は希釈剤（丸印）またはdes－IGF－Ｉ（正方形）を用いての７日間にわたるラットでの血中クレアチニンレベルのグラフである。
図16は対照（丸印）、クランプ後30分（丸印）、およびクランプ後60分（正方形）における４日間にわたるラットでの体重増加のグラフである。
図17は対照（丸印）、クランプ後30分（丸印）、およびクランプ後60分（正方形）における４日間にわたるラットでの血中尿素窒素のグラフである。
図18は対照（丸印）、クランプ後30分（丸印）、およびクランプ後60分（正方形）における４日間にわたるラットでの血中クレアチニンのグラフである。
図19は次のもので処理した腎臓傷害（60分のクランピング）をもつラットの４日間にわたる体重増加のグラフである。偽物（白い丸印）、クランプ（白い正方形）、クランプ＋IGF－Ｉ（黒い正方形）、およびクランプ＋des－IGF－Ｉ（黒い丸印）。
図20は次のもので処理した腎臓傷害（60分のクランピング）をもつラットの４日間にわたる血中尿素窒素レベルのグラフである。偽物（白い丸印）、クランプ（白い正方形）、クランプ＋IGF－Ｉ（黒い正方形）、およびクランプ＋des－IGF－Ｉ（黒い丸印）。
図21は次のもので処理した腎臓傷害（60分のクランピング）をもつラットの４日間にわたる血中クレアチニンのグラフである。偽物（白い丸印）、クランプ（白い正方形）、クランプ＋IGF－Ｉ（黒い正方形）、およびクランプ＋des－IGF－Ｉ（黒い丸印）。
（好ましい実施態様の説明）
A:定義
ここで用いる「急性腎不全」または「ARF」とは、腎臓の近位尿細管の破壊による腎臓血流の減少（虚血腎臓傷害）または細胞壊死をおこす腎臓毒によって引き起こされる条件を意味する。この用語は、乏尿および高窒素血症をおこす急性の尿細管の壊死ならびに非乏尿性腎臓疾患を含む、中程度から重症のARFまでを包含する。それは窒素性の生産物、液

体および電解質ならびに加速された異化作用状態のような症状によって特徴づけられる。もしARFが重症であれば、血液透析治療が行われない限り死を招く。
ARFは、急性尿細管の浮腫、壊死またはそこへの虚血性傷害後の間質もしくは細管の浮腫によって特徴付けられる。腎臓の虚血は、特に長期の低血圧、心臓や大動脈のバイパス手術または腎臓移植のような血圧低下を含むいろんな手段で引き起こされる。加えて、例えば腎臓の物理的傷害や負傷によっても誘発される。すなわちIGF－Ｉが、腎臓の移植の前または途中での腎臓の元々の状態の保持のために使用できる。
細胞壊死をもたらす腎臓毒の例としては、シクロスポロン、重金属中毒、静脈内へのコントラスト色素投与、アミノグリコサイド類のような抗生物質（例えばトブラマイシン、ゲンタマイシン、アミカシンやストレプトマイシン）及びアンフォテリシンのような抗カビ剤がある。
ARFの「予防」とは、ARFを防ぐか又は少なくとも改善することを言う。
ARFの「危険のある」哺乳動物とは、経済的に重要な哺乳動物たとえばウシ、ヒツジ及びブタ動物ならびにヒトを包含する。実施される手術や移植またはこうむる可能性のある疾患からARFになりやすいので後者が好ましい。
ここで「IGF－Ｉ」とは、天然配列のものか変化した形態の、そして天然、合成または形質転換からの如何なる原料からの、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、トリ及び好ましくはヒトを含む如何なる種からものインシュリン様の成長因子を表す。動物用にここで用いて好ましいものは、治療されるべき特定の種からのIGF－Ｉの形態であり、例えばブタの治療にはブタIGF－Ｉが、ヒツジの治療にはヒツジIGF－Ｉが、ウシの治療にはウシIGF－Ｉ、等々という具合である。ヒトにここで用いて好ましいものはヒトの天然配列の成熟したIGF－Ｉ、更に好ましくは次の文献に記載の方法で製造したＮ－端末メチオニンを持たないものである。すなわちEP 230,869 published August 5,1987;EP 128,733 published December 19,1987;EP 288,451 published October 26,1988。更に好ましくは、この天然配列のIGF－Ｉは組換え技術で生産され、臨床研究のためにGenentech,Inc.,South San Francisco,CAから入手できる。他に好ましく用いられるものは、例えばKabiGen AB,Stockholm,Swedenから入手できるような、プラセンタ膜を用いての放射性レセプターアッセイで測定して約14,000単位/mgよりも大きい特異性活性をもつIGF－Ｉである。
最も好ましいIGF－Ｉ変種は次の文献に記載のものである。U.S.Pat.No.5,077,276 issued December 31,1991;PCT WO 87/01038 published February 26,1984;PCT WO 89/05822 published June 29,1989。すなわち成熟分子のＮ－末端から３の位置に少なくともグルタミン酸残基がないものか、又はＮ－末端に５コまでのアミノ酸の削除を持つものである。最も好ましい変種はＮ－末端から最初の３コのアミノ酸が削除されたものである（脳IGF,tlGF－Ｉ、des（１－３）IGF－ＩまたはdesーIGF－Ｉとも呼ばれる）。
B.発明の実施の態様
予防は、腎臓の傷害（ARF）が発生する又は発生しつつあると予期される時またはその前に、すなわち傷害が進行しつつあると予期される間の時期をも含めて進行する傷害の前にIGF－Ｉで処置することによって達成される。
例えば腎臓傷害を予防し軽減するため又は移植した腎臓の拒絶反応を防ぐための処置は、腎臓傷害がおこる又はおこりつつあると予期される時かその前、すなわち冠動脈の選択的手術や胸部外科手術の時かその前、腎臓毒投与の間またはその前、又は腎臓移植を行う時かその前に開始される。
もし処置が腎臓傷害がおこるかおこりつつあると予期される前に行われた場合は、その傷害がおこると予測される約48時間から約0.5時間前に行うのが好ましい。場合により、IGF－Ｉの投与はARFがおこる又はおこりつつあると予期される後にも適宜継続する。一般に傷害の間は直ちには発生せずに24時間又はそれ以上経過して発生する腎臓障害の臨床症状は、血中尿素窒素もしくはクレアチニンレベルの増大または有機イオン輸送の減少を包含する。
この発明の種々の目的のために、IGF－Ｉは非経口的を含めいろんな適当な技術によって哺乳動物に直接に投与され、局所的や全身的に投与することが出来る。特定の投与ルート

は、例えばIGF－Ｉ使用により予期または予測される副作用を含めての患者の医療歴に依存する。非経口投与の例は皮下、筋肉内、静脈内、動脈内および腹腔内投与などである。好ましくは投与は、腎臓傷害をおこすであろう原因の始まる時かその前における連続注入（例えば浸透圧ポンプのようなミニポンプや、皮下ルートを用いての）又は例えば静脈内や皮下内手段を用いての単回の注射もしくは複数回の注射（例えば２－４回の）によって行われる。好ましくはIGF－Ｉの皮下投与が行われる。投与はまた単純投与形態または徐放性のデポ処方として行うことが出来る。

更にIGF－Ｉは、現在たとえばIGFBP－１、IGFBP－2,IGCBP－３、IGFBP－４又はIGFBP－６として知られているような結合蛋白の一つまたはそれ以上と共に適当に投与される。IGF－Ｉはまた投与のためにレセプター、抗体または抗体フラグメントと適当にカップリングさせる。IGF－Ｉのための好ましい結合蛋白はIGFBP－３であり、これは次の文献に記載されている。WO 89/09268 published October 5,1989;Martin and Baxter,J.Biol.Chem.,261:8754－8760（1986）。このグルコシル化されたIGFBP－３蛋白は、ほとんどの内因性IGF類を運びそしてまたGHで調節されるヒトプラズマ内に見いだされる125－150Kdの糖蛋白複合体の非還元的SDS－PAGEゲル上での約53Kdの酸に安定な成分である。

蛋白がIGF－Ｉと結合したIGFの投与は国際公告WO 92/13556 published 20 August 1992に記載の方法により適当に達成される。簡単に言えばIGF－ＩとIGFBPは約0.5:1から約3:1、好ましくは約1:1のモル比での皮下注射により効果的用量で投与される。

治療に用いられるIGF－Ｉ組成物は、個々の患者の臨床状態（特にIGF－Ｉ単独投与での処置の副作用）、IGF－Ｉ組成物の到達部位、投与の方法、投与のスケジュール及び実施者が分かっているその他の因子をよく考えて上で善良な医学実務に一致する様式で処方され投与されるであろう。その目的のためのIGF－Ｉの「効果的な量」はそのような考慮により決定される。

一般的提案として、一用量あたりの非経口的投与されるIGF－Ｉの全医薬的効果量は患者の体重の約１μg/kg/dayから10mg/kg/dayの範囲であろう。但し上記のようにこれは治療上の考慮により変動することを条件とする。更に好ましくはこの用量は少なくとも0.01mg/kg/dayであり、最も好ましくはヒトについては、ホルモンとして約0.01から1mg/kg/dayである。もし連続投与するときは、IGF－Ｉは典型的には約１μg/kg/hourから約50μg/kg/hourの用量率で、一日１－４回注射するか又は例えばミニポンプを用いて連続的皮下注入で投与する。静脈内バッグ溶液もまた用いられる。適切な用量の選択のための決定要件は近位尿細管外皮の再生で測定されて得られる結果、加速された異化作用の防御、過剰に蓄積された窒素生産物、液体および電解質の防御、などである。

IGF－Ｉはまた持続放出系により投与される。持続放出組成物の適当な例は、例えばフィルムやマイクロカプセルのような有形製品の形態での半透過性の高分子のマトリックスを包含する。持続放出マトリックスはポリアクタイド（U.S.Pat.No.3,773,919;EP 58,481）、Ｌ－グルタミン酸およびガンマエチルＬ－グルタメート（Sidman et al.,J.Biopolymers,22:547－556（1983））、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langer et al.,J.Biomed.Mater.Res.,15:167－277（1981）;Langer,Chem.Tech.,12:98－105（1982））、エチレンビニルアセテート（Langer et al.,supra）またはポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸（EP 133,988）である。持続放出IGF－Ｉ組成物はまたリポソーム的にエントラップしたIGF－Ｉをも含む。IGF－Ｉを含有するリポソームはそれ自体公知の次の方法で製造される。DE 3,218,121;Epstein et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82:3688－3692（1985）;Hwang et al.,Proc.Natl.Acad.U.S.A.,77:4030－4034（1980）;EP 52,322;EP 36,676;EP88,046;EP 143,949;EP 142,641;日本特許出願83－118008;U.S.Pat.Nos.4,485,045及び4,544,545;並びにEP 102,324。通常はリポソームは、選択された比率が最適のIGF－Ｉ治療のために調節されている脂質量が約30モルパーセントより大きいコレステロールである一側面タイプの小さい（約200から800オングストローム）ものから成る。

一つの実施態様における非経口的投与のために、IGF－Ｉは一般的にそれを所望の純度で単位用量の注射可能の形態（溶液、懸濁液又はエマルジョン）で医薬的に許容される担体、すなわち使用用量と濃度での希釈剤に非毒性であり処方内の他の成分と禁忌でないよう

な担体と混合することにより処方化される。例えば処方は好ましくは、ポリペプタイドに対して有害であることが知られているような酸化剤やその他の化合物を包含しない。
一般的に、処方はIGF－Ｉを液体の担体または微粉砕した個体の担体またはその両方と均一かつ密接に接触させて製造する。ついで必要に応じて、その生産物を所望の処方の形態とする。好ましくは担体は非経口用の担体であり、さらに好ましくは血液と等張の希釈剤溶液である。そのような担体ベヒクルの例は水、リンゲル液および右旋糖溶液を包含する。固定化した油やオイレン酸エチルのような非水性ベヒクルもまたリポソームと同様にここで有用である。
担体は適切には、等張性や化学的安定性を高めるような物質といった添加物の少量を含有する。そのような材料は、用いられた用量や濃度においては希釈剤に対して非毒性であり、そして次のようなものを含有する。すなわち緩衝液、例えばリン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸、およびその他の有機酸またはそれらの塩類；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸；低分子（約10コより少ない残基）のポリペプタイド、例えばポリアルギニンやトリペプタイド；蛋白、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性の高分子、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン；単糖類、二糖類、およびその他の炭水化物、例えばセルロースとその誘導体、グルコース、マンノース、デキストリン；キレート化剤、例えばEDTA;糖アルコール、例えばマンニトールやソルビトール；対イオン、例えばナトリウム；及び／または非イオン性の界面活性剤、例えばポリソルベート、ポロキサマー、PEG。
IGF－Ｉは典型的には上記のようなベヒクルの中に、約0.1mg/mlから100mg/ml、好ましくは１－10mg/mlの濃度で、約３から８のpHで処方される。全長のIGF－Ｉは一般に約６より大きくないpHで安定でり、des（１－３）－IGF－Ｉは約3.2－５で安定である。上記の希釈剤、担体または安定剤のうちのあるものを使用するとIGF－Ｉ塩の処方が得られることは理解されるであろう。
更にIGF－Ｉ、好ましくは全長IGF－Ｉは、許容される担体ベヒクル内で処方されて医薬組成物、好ましくは細胞を含まないそれを形成する。一つの実施態様においては処方に用いる緩衝液は、その組成物が混合後に直ちに用いられるか又は後日の使用のために保存されるかに依存する。もし直ちに使用されるのなら、全長IGF－Ｉがマンニトール、グリシン及びホスフェート（pH7.4）内に処方され得る。もしこの混合物が保存されるのなら、約pH6の緩衝液たとえばクエン酸塩内で、このpHでIGF－Ｉの溶解度を増大させる界面活性剤、例えば0.1%のポリソルベート20またはポロキサマー188と共に処方される。最終製剤は安定な液体または凍結乾燥固体であってよい。
治療投与に用いるIGF－Ｉは滅菌されているべきである。滅菌は、滅菌濾過膜（例えば0.2ミクロンの膜）を通過する濾過により容易に行われる。一般に治療用のIGF－Ｉ組成物は、皮下注射針で突き刺すことの可能なストッパーを持った静脈注射用溶液のバッグまたはバイアルのような滅菌したアクセスポートを持つ容器の中に入れられる。
IGF－Ｉは通常は、水溶液として又は再製のために凍結乾燥処方として例えば密封したアンプルやバイアルのような単位または複数用量の容器に貯蔵される。凍結乾燥処方の一例として、滅菌濾過したIGF－Ｉの１％（w/v）水溶液を10mlのバイアルに入れ、得られた混合物を凍結乾燥する。注入溶液は、注射用の滅菌水を用いて、凍結乾燥したIGF－Ｉを再製することにより製造される。
GHもまた、この発明によりIGF－Ｉで処置した哺乳動物に投与され得る。GHはこの目的のための如何なる適当な時に投与してもよい。すなわちGHは、ARFがおこるか又はおこりつつあると予期される時やその前に適当に投与され、またARFがおこるか又はおこりつつあると予期された後に適当に投与しまたは継続される。
もしGHが用いられたときは、典型的には少なくとも0.1mg/kg/dayの用量で、上のIGF－Ｉで用いられたような用量と適当な投与によりIGF－Ｉとは別に又はIGF－Ｉと共に投与することが出来る。hGHはIGF－Ｉよりも高いpH、例えば7.4－7.8で安定であることが知られている。
またGHは、一つまたはそれより多くの結合蛋白と共に適当に投与される。良く特徴づけら

れたそのような結合蛋白は、ヒトを含めていろんな種においてGHBPとして機能し血液中で循環するGHレセプターの細胞外領域を構成するところの高親和性成長ホルモン結合蛋白（GHBP）である。Ymer and Heringtn,Mol.Cell.Endocrino.,41:153（1985）;Smith and Talamantes,Endocrinology,123:1489－1494（1988）;Emtner and Roos,Acta Endocrinologica（Copenh.）,122:296－302（1990）。Baumann et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,62:134－141（1986）;EP 366,710 published 9 May,1990;Herington et al.,J.Clin.Invest.,77:1817－1823（1986）;Leung et al.,Nature,330:537－543（1987）。GHに対し低い親和性の第二のBPはまた、GHレセプターと構造的に無関係との記載がある。Baumann and Shaw,J.Clin.Endocrinol.Metab.,70:680－686（1990）。

GHおよびIGF－Ｉ両者の用量はもし併用したときは、IGF－Ｉ単独投与の場合よりも少なくてよい。IGF－ＩとGHの両方の用量を検討する実務者は、これらのホルモンによる公知の副作用を考慮に入れるべきである。hGHについては副作用としてはナトリウム保持や細胞外容量の拡大など（Ikkos et al.,Acta Endocrinol.（Copenhagen）,32:341－361（1959）;Biglieri et al.,J.Clin.Endocrinol.Metab.,21:361－370（1961））の他に過インシュリン症や過血糖症がある。IGF－Ｉの主要な副作用は過血糖症である。Guler et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA（1989）,supra。実際、IGF－ＩとGHの併用は両剤の望ましからぬ副作用の軽減（例えばIGF－Ｉの過血糖症やHの過インシュリン症）およびIGF－Ｉで抑圧されるGHの分泌の快復をもたらす。

加うるに、IGF－Ｉは、さらに虚血的や腎臓毒的傷害を予防し改善するための他の治療剤と適当に併用して投与される。この目的のために有用な物質は例えばスーパーオキサイドジスムターゼ並びにVLA－４、LFA－１、Mac－１、p150,95、EGF、及びTGF－αなどのアンタゴニスト（例えば抗体）である。これらのものはIGF－Ｉの投与と同時、前または後で投与でき、IGF－Ｉの投与ルートと同じか又は別のルートで投与することが出来る。

この発明は、次の実施例を参照してさらに詳細に説明される。ただしこれらの実施例はこの発明の範囲を限定するためのものではない。

実施例　１　ウサギの治療についての最初の研究

序論

ARFの動物における進展とこれらの希釈剤またはIGF－ＩまたはdesーIGF－Ｉに対する経時的反応をモニターするために、血清中のBUNおよびクレアチニンレベルを測定した。筋肉活性の代謝生成物であるクレアチニンは、プラスマレベルでは比較的一定を保っており、最大作用後には測定が行われないと仮定する。尿素窒素測定は、代謝状態、食事、水和作用その他の因子の影響であまり信頼できない。しかし尿素窒素とクレアチニンの両方のクリアランスは、代謝や生理的状態には無関係に腎臓疾患や急性腎臓傷害の間は顕著に減少する。これら２つの成分は腎臓機能を指示するものとして認められており、これらの血中濃度は腎障害で上昇する他の危険な化合物の濃度を反映する。クレアチニンは腎臓で濾過されるが分泌や再分泌はされない。尿素窒素は濾過され、そして受動的に再吸収される。合わせて、それらのものは腎臓の機能を評価し、そして腎不全をモニターするときの主要な研究用パラメータである。

プロトコール

実施例で詳しく述べるすべてのIGF－Ｉ実験において、組換えヒトIGF－Ｉを用いた。これはKabiGen AB,Stockholm,Swedenからプラセンタ膜を用いてのラジオレセプターアッセイで14,000U/mgより大きい比活性を有するものとして商業的に入手可能であり、またGenentech,Inc.,South San Franciscoから臨床研究用として入手可能である。この実施例ではIGF－Ｉを5mg/mlの割合で10mMクエン酸緩衝液および125mMのNaCl（pH6.0）に溶解した。

体重が2.5－3.0kgのオスのニュージーランド産の白ウサギを、研究のあいだを通じて使用した。0.1mlの鎮痛剤（Hypnorm）［1.0mgの腫瘍壊死因子－α（Fluanisone）と0.315mgのFentanyl/ml溶液］で静脈内に予備投与した後、1mlの血液サンプルを耳動脈から採取した。血液は直ちにVacutainer血清分離管に入れた。次いで動物を0.68ml/kgのHypnormの筋肉内注射で完全に麻酔した。動物を板に固定したあと、腹毛をクリップで留め、手術室をヨード溶液で清浄にし、アルコールで脱脂し、さらにヨードで清浄にして滅菌手術の準備を

した。滅菌条件下に開腹術を行った。食塩水に浸したガーゼを用いて腸を左の腎臓に露出するように動かした。左の腎臓の動脈を解剖して遊離させ、セレフィンクリップ（Baby Dieffenbach Serrefin;Harvard Apparatus,Cat.No.52－3241 or 52－3258）で固定した。ついでこの方法を右の腎臓動脈に対して繰り返した。両方の腎臓の動脈の閉塞後、5mg/mlの組換えヒトIGF－Ｉを含んだ２つのアルゼット浸透圧ポンプ（Alza Corporation,Palo Alto,CA,Model 2ML－1 of 2144 microliter fill）を腹腔の片側に設置した。これらのポンプを働かせて設置直後に作動させるようにした。各々のポンプは11.75μl/hrを送る。従って各々の動物は2.82mg/day/動物、または約1mg/kg/dayを受理する。開腹の傷を食塩水で湿したガーゼと滅菌タオルで覆った。２時間の虚血期間のあいだ、さらに0.2－0.5mlのHypnormを用いて麻酔を保持した。

２時間の虚血のあとクリップを外した。腹部筋肉には4.0Prolene縫合を用い、皮膚には2.0Proleneを用いて開腹手術を終えた。ついで動物を、胸骨の姿勢が開腹するまで水で加熱した集中的管理培養器の中で快復させた。次いで動物を個々に自由に標準的研究室用の食餌と水道水を与えるように飼育した。手術は２日で全部で12匹の動物で行った。すなわち６匹（２匹は対照、４匹は処置）は１日；そして６匹（３匹は対照、３匹は処置）は11日後で行った。

血液サンプル

24時間後およびそれに続く24時間毎の合計６日間、耳の動脈または静脈から各々1mlの血液サンプルを採取した。これらのサンプルを血清分離管内で固め10℃で遠心分離して血清を分離した。血清を除去し、エピンドルフ管に入れ、そして－20℃で貯蔵して分析待ちとした。この期間は通常は24－36時間であり、48時間を越えることは稀である。次いでサンプルを解凍し、Monarch遠心分離分析器（モデル76）でBUN、血清クレアチニン及び血中グルコース濃度を測定した。

統計的分析

各グループ間の統計的な差は、繰り返しの測定の変異の二方向分析（ANOVA）を用い、次いで最小有意差（LSD）テストを行って個々の時点間の有意差を同定した。

結果

７日間で５匹の対照動物のすべては生存した；第４日目（手術後３日）に７匹の処置動物のうち１匹が死亡した。次からはこの動物は研究から除外した。

BUN:

対照動物では、手術前のBUNは16±0.89mg/dlであった。これは第４日に109±25mg/dlと5.81倍に増大した。

表１

食塩水で処理した対照動物のＢＵＮ値

日	平均	標準偏差	ＳＥＭ
1	１６．００	２．００	０．８９
2	８１．８０	１５．９７	７．１４
3	１０６．８０	３５．６０	１５．９２
4	１０９．００	５６．０３	２５．０６
5	９７．６０	６４．４３	２８．８２
6	８６．００	７１．８３	３２．１２
7	７９．２０	７２．１２	３２．２５

無作意に選び出しそしてIGF－Ｉで処理した動物は、対照として選んだ動物のBUNの手術前と類似のレベルであった。これらの動物のBUNレベルの最大上昇は第３日目ではいくらか少なかった（73±15.6mg/dl）（表２と図１参照）。更にこれらの動物のBUNレベルは第７日目までに殆ど対照の値に戻った。

表２

ＩＧＦ－Ｉ処理した動物のＢＵＮの値

日	平均	標準偏差	ＳＥＭ
1	１５．１７	２．３２	０．９５
2	６２．１７	１３．４７	５．５０
3	７３．００	３６．９０	１５．０６
4	７０．８３	４６．０８	１８．８１
5	５０．３３	３６．７２	１４．９９
6	３０．００	１９．１８	７．８３
7	２１．００	９．７２	３．９７

処理した動物の尿素窒素の濃度は第６および７日目に顕著に低下した。図１を参照。

血清クレアチニン：

対照と処理した動物の間では血清クレアチニンレベルにおいて顕著な差はなかった（表３および4;図２）ただし処理動物では第５および６日目の値は無処理動物の値の半分であった。

表３

食塩水処理の対照動物における血清クレアチニンの値

日	平均	標準偏差	ＳＥＭ
1	１．０６	０．４８	０．２２
2	５．１６	１．４６	０．６５
3	５．８６	２．４３	１．０９
4	４．９２	２．５８	１．１５
5	３．９６	２．２５	１．０１
6	２．８４	１．５１	０．６８
7	２．３２	０．８７	０．３９

表４

ＩＧＦ－Ｉ処理動物における血清クレアチニンの値

日	平均	標準偏差	ＳＥＭ
1	１．０３	０．１４	０．０６
2	４．５８	１．６０	０．６５
3	５．０２	２．９４	１．２０
4	３．７５	２．１７	０．８９
5	２．４５	１．３１	０．５４
6	１．６５	０．７２	０．２９
7	１．２７	０．４２	０．１７

血中グルコース：
両方のグループでの血中グルコースレベルは手術後の最初の日に約60mg/dlに低下し、実験期間の残りのあいだ両方のグループで130－160mg/dlの丘状となる。この２つのグループの間では統計的な差は見られなかった（表５および６）。

表5

対照動物における血中グルコースレベル

日	平均	標準偏差	ＳＥＭ
1	１８２．４０	２２．２３	９．９４
2	１１９．６０	１３．２４	５．９２
3	１４２．６０	２１．２０	９．４８
4	１５５．８０	２２．６１	１０．１１
5	１４８．２０	３４．２２	１５．３０
6	１５６．６０	３２．３０	１４．４５
7	１６５．４０	３２．７５	１４．６４

表6

ＩＧＦ－Ｉ処理動物における血中グルコースレベル

日	平均	標準偏差	ＳＥＭ
1	１８１．００	３３．３９	１３．６３
2	１２４．８３	２０．４４	８．３４
3	１３４．００	１０．３７	４．２３
4	１４０．８３	７．９１	３．２３
5	１３４．３３	１２．５６	５．１３
6	１３０．５０	１４．７２	６．０１
7	１４６．００	２１．８９	８．９４

結論

腎臓虚血の導入時におけるIGF－Ｉの投与はBUNのレベルを著しく減少させ、そして２時間の腎臓虚血に次いで６日間の再透析をしたウサギでの血清クレアチニンを減少させるようであった。処理した動物でのBUNレベルは手術前の値よりも迅速かつ完全な回復を示し、そして第６日目までに食塩水処理の対照よりも顕著に低かった。これはIGF－ＩがARFのおそれのある哺乳動物での腎臓傷害を予防するか又は少なくとも改善する能力があることを示す。

実施例２

ウサギの処理の第二の研究

序論

この研究ではもっと多くのウサギを使用し、そして単にBUNとクレアチニンの値を測定したのみならず、さらに試験管内の腎臓細胞機能の評価のために腎臓機能を近位尿細管細胞

により有機イオンの摂取の研究によって評価した。腎臓細管によるカチオン移動はウサギやヒトを含む多くの動物で示されており（Besseghir et al.,Am.J.Physiol.,241:F308－F314（1981）;Rennick et al.,Am.J.Physiol.232:F443－F447（1977））そして中因性および合成的のカチオンの分泌において本質的な役割を演じている。
細管の内腔に入るためには、分子は基礎側面と刷子縁膜（それぞれBLMおよびBBMと称す）の両方に交差せねばならない。BLMを通ってのカチオンの進入は電気的勾配で駆動されるようであり、BBMを通っての移動はカチオンとプロトンの間の電気的中性の対交換である。Dantzler et al.,Am.J.Physiol.256:F290－F297（1989）;Montrose－Rafizadeh et al.,Am.J.Physiol.257:F243－F251（1989）。下記の試験管内のデザインでは、濃縮されたカチオンは同様にBLMに進入するようであり、ただし濃度勾配に対し２次的なBBM対輸送体を通っての逆進入もまた可能である。アニオン分泌は、BLM活性輸送と内腔液への引き続く拡散の結合が前提とされていた。Tune et al.,Am.J.Physiol.217:1057－1063（1969）。
ここの研究においてこれらの輸送体は^{14}C－TEA（テトラエチルアンモニウム）及び^{3}H－PAHを用いて試験管内で研究された。TEAは細胞内では破壊されず、従って捕捉活性測定の良好な手段である。PAHは代謝されるが、ただしごくゆっくりである。1930年に最初に用いられた外皮切片技術は長い間ひろく用いられてきた。いくつかの変数たとえば組織の厚み、媒体の酸素量、媒体のイオンレベル、及び培養期間中の攪拌などが管理されねばならぬ。この実施例ではこれらの変数は下記のようにして考慮されている。
グループごとの臓器の重さと体重は血清尿素窒素とクレアチニンレベルと同様にグループ平均±SEMとして記録する。外皮切片の結果のデータは、与えられた時間とウサギの切片／媒体の平均として記録する。次いでこれらの比率をグループごとに集めて各々のグループに対する平均とSEMを求める。１つ及び２つの因子のＰ値を報告する（ANOVA）。しばしば二因子ANOVAの変数は処理の日および処理グループに対する特定の測定の値である。日が用いられたときは、第０日は勘定に入れない。その理由は、それは対照の測定であり、そして計算は処理の第１日（このとき薬物の作用はそれ以後の日よりも多分顕著であるから）および処理の最後の日（このとき最後の日まで生存したウサギはほぼ正常の状態にまで典型的に回復しており、そして腎臓疾患で死亡したものはもはや研究には使用しないから）は時として排除される。
腎臓の機能に対するIGF－Ｉおよび先端切断分子であるdes－IGF－Ｉの効果と、それに続く腎臓虚血で誘発される腎臓傷害がこの実施例で研究された。以下にはIGF－Ｉ及びdes－IGF－Ｉの両方が、虚血傷害後の腎臓を再生するために効果的な薬剤であることを示す。
プロトコール
動物モデルの作成
オスのニュージーランド産のシロウサギ（２－3kg）を数日のあいだ動物飼育施設に慣れさせ、そして研究に入った。これら動物を、温度と照明の調節された部屋に入れそしてウサギ用のナッツと水を自由に摂取させた。
実験グループ
動物を６つの処理グループの一つに無作意に割り当てる。すなわち腎臓動脈閉塞プラスIGF－Ｉ（ARF＋IGF－Ｉ）またはプラスdes－IGF－Ｉ（ARF＋des－IGF－Ｉ）または腎臓動脈閉塞プラス希釈剤（ARF対照）；開腹のみプラスIGF－Ｉ（LAP＋IGF－Ｉ）または開腹のみプラス希釈剤（LAP対照）；更に処置を受けないウサギのグループも含まれる（正常）。第２日まで生存したウサギだけを研究に使い、静脈切開しそして毎日体重を測定する。更に第７日まで生存したウサギを屠殺し、臓器の湿重量を測り、そして腎臓を外皮組織イオン取り込み測定のために取り出す。グループ研究の死亡率とタイミングの故に、５匹のIGF－Ｉ処理および３匹の希釈剤処理動物は、イオンの取り込み研究には用いなかった。（グループ化、略号およびサンプルサイズについては次の表を参照）。

処理グループ	血清化学＊ (N＝)	外皮切片＊＊ (N＝)
Ｉ．腎臓動脈閉塞＋希釈剤（ＡＲＦ対照）	１１	６
ＩＩ．腎臓動脈閉塞＋des-IGF-I(ARF+des-IGF-I)	１０	３
ＩＩＩ．腎臓動脈閉塞＋IGF-I(ARF+IGF-I)	１３	１０
ＩＶ．開腹＋IGF-I (LAP + IGF-I)	３	３
Ｖ．開腹＋希釈剤（ＬＡＰ対照）	２	２
ＶＩ．正常の無処理対照（正常）	２	４

＊：第２日及びその前に死亡しなかったウサギを含む

＊＊：外皮実験が実施中に第７日まで生存したウサギを含む

動物モデルの作成

手術前およびそれ以降は毎日、体重を測定した。血液（1cc）を耳の動脈から採取した。６つの群でウサギを1.7mlのHypnorm（i.m.）で麻酔し、手術20分前に投与し、そして更に３回を手術中に全部で2.3mlまたは0.4ml/kg/hrのHypnormを与えた。

麻酔してから動物の毛を剃り、清浄にし、滅菌布で包み、そして腹腔を中央線切断によって露出させた。鋭い刃での解剖で右と左の腎臓動脈を遊離させセレフィンのクリップ（Baby Dieffenbach Serrefin;Harvard Apparatus;Cat.＃52－3241 or 52－3258）で止めた。動脈の閉塞と同時に、3.3mgのdes－IGF－I/ml酢酸（100mM;pH4.5）2.0mlを含む１つのアルゼット浸透圧ポンプ（Alza Corporation,Palo Alto,CA,Model 2ML－１）、または各々上述の組換えヒトIGF－Ｉ（5.0mg/ml、ただし塩化ナトリウム／酢酸ナオリウム緩衝液、pH6.0）の2.0mlもしくはその希釈剤を含む２つのアルゼット浸透圧ポンプを腹腔内に入れた。これらのポンプを入れた直後に作動させた。各々のポンプは10.58μl/hrを供給し、処理動物に全部で約0.364mg/kg/dayのdes－IGF－Ｉか又は1.1kg/kg/dayのIGF－Ｉを各動物に与えた。すなわちdes－IGF－Ｉの投与量はIGF－Ｉのそれの３分の１であった。対照動物は希釈剤の入ったポンプを受け入れた。次いで動物を食塩水で浸したガーゼで覆い、再透析まで２時間のあいだ放置した。

動脈閉塞２時間後にクリップを取り除き、再透析を目で確かめた。腹壁は0.0プロレンで閉鎖し、2.0プロレンで縫合した皮膚で覆い、結び目は刺激を防ぐために皮膚の下に埋め込んだ。次いで動物を35℃に加熱したパッドに移し、うつ向きの位置に置き、そして意識が戻るまで飼育し（約４－５時間）、その後に維持用のケージに移し、残りの実験期間のあいだ食餌と水を与えた。

データの採集

閉塞後の第１－６日に、血液1.0ccを耳の動脈から採取し、10分間遠心分離し、そして血清を－80℃で貯蔵した。６匹のウサギの各々について完了したとき、サンプルを室温で解凍し、そしてMonarch 2000 Chemical Systems Instrument（Allied Instrument Laboratories,Lexington,MA）にかけてクレアチニン、尿素窒素、グルコース、ナトリウム、カリウム、カルシウム、コレステロール、アルブミン、アルカリ性リン酸塩（ALP）及びガンマ－グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）の分析を行った。第７日目にウサギを安楽死させ、右の腎臓、肝臓、脾臓、心臓および胸腺を採取し重さを測った。臓器をホルマリン内に固定し組織学的評価を行った。更に左の腎臓を採取し重さを測り、そして外皮切片を下記のように試験管内イオン取り込みの研究に用いた。

実験に使った動物の腎臓動脈の完全かつ一定の閉塞は、高められた血清尿素窒素および血清クレアチニンレベルで確認した。開腹のみを実施した動物では、血清クレアチニンレベルは比較的一定に保たれ全ての場合で1.6mg/dlより低く、そして血清尿素窒素レベルは全ての場合で10mg/dlよりも低かった。予測される閉塞が行われた動物において、すべての場合のクレアチニンレベルは3.5mg/dlより上に上昇し、そして尿素窒素レベルは65mg/dl（Ｎ＝48）より上に上昇した。

腎臓外皮組織の作成

屠殺直後、左の腎臓を取り出し、水平の軸に沿って1cmの厚みに切断し、そして冷却したリン酸塩緩衝食塩（PBS）の中に入れた。次いで腎臓外皮を各々の水平切片の周囲からスライスし、Stadei－Riggsの組織スライサーにかけ、そこで各々の腎臓から約30－100mgの0.3－0.4mmの切片を18コ作成し、一番そとの切片は捨てた。次いで切片を個々に100％の酸素の雰囲気と共に^{14}C－TEA及び^{3}H－PAHの媒体中25℃で培養し、そして０、15、30、45、60および90分の期間の間70サイクル／分で一定の攪拌を行い、各々の期間において各々３コの切片を取り除いた。20mlのクロス及びタッガート緩衝液（72.8μg/lのPAH、10.78g/lの$Na_2HPO_4 . 7H_2O$、1.33g/lのKH_2PO_4、1.48g/lの$MgSO_4 . 7H_2O$、35.07g/lのNaCl及び1.49g/lのKCl）（Cross and Taggard,Amer.J.Physiol.,161:181－190（1950））、10mlの乳酸塩（0.90g/100ml）並びに55mlの脱イオン水から成る培養基（1MのNaOHを用いてpHを7.4に調節）で培養を行った。次いで$CaCl_2 . 2H_2O$（0.736g/100ml）2mlを加え、最終容量を脱イオン水で100mlに調節した。腎臓組織の添加の前に、培養基を100％の酸素を30分間通じさせた。使用直前に0.334μCi/3mlの濃度の^{14}C－PAHと^{3}H－TEAを加えた。

特定の時点で切片を培養基から取り出し、吸取紙で乾かし、重さを測り、1.0mlのプロトソ（New England Nuclear,Boston,MA）に溶かし、そして塩酸で中和した。各々の腎臓切片とその培養基1.0ml内の放射能をLS5000TD液体シンチレーションカウンター（Beckman Instruments,Fullerton,CA）を用いて測定した。結果は、100μｌの培養基のdpmで培養組織の100mg毎のdpm（分毎の分解）として報告される。時間毎の３つの切片の各々のグループの平均とSEMを各々のウサギについて計算した。これらの値から、ARF＋IGF－Ｉ、ARF＋IGF－I,ARF＋des－IGF－I,ARF対照、正常、およびLAP＋IGF－Ｉグループについての平均切片／培養基比率およびSEMを計算した。

統計的分析

スチューデントのＴ－検定で毎日グループ間でデータを分析し、処理と日を２つの分類として用い二因子の繰り返し測定ANOVAを使って６日または３日の傾向を評価した。組織サンプルの組織学的品質を、フィッシャーの検定法で計算した統計的差を用い、いくつかのカテゴリーの各々における正常から重篤までの変化範囲のスケールで分類した。

ウサギのグループからのデータを個々に分析し、そしてもし体重に関連する差が発見できなかった場合はデータをプールした。クレアチニンの手術後の上昇と同様に、効果的な腎臓虚血を手術時に目で確認した。非閉塞ウサギにおいては手術後のクレアチニンはすべての日において1.6mg/dlより低く保たれていた。これに反して腎臓動脈をクランプされたウサギは、第１日にはクレアチニンは2.00－7.10mg/dlであり、第７日には腎臓組織はARFの兆候を示した。腎臓動脈のクランピングは全てのウサギにおいてARFと一致する測定可能な変化を生じたので、この実験モデルの有効性が認められた。

結果:des－IGF－Ｉと対照の比較

ウサギの体重

実験のあと、無処理のウサギは７日間で平均して殆ど15％の体重減少を経験した（表７および図３）。これは閉塞され非処理の動物では第６日までに350mgより多いことを意味する。des－IGF－Ｉが与えられた時は動物はまだ体重減少を示していたが、その減少は非処理グループにおけるよりも著しく少なくて、平均して僅か200mgの減少に過ぎず、すなわち殆ど40％の改善であった。

ANOVAは、ｐ＝0.0055である第２日を除く全ての日において非有意のｐ値を示した。しかし日と体重対グループを用いての二因子ANOVAは全てにおいて0.048のｐ値を示した。

閉塞なしの開腹を行ったグループはまた、閉塞した非処理のウサギのように第６日までに

殆ど同様の全体重を減少するという、手術後の著しい体重減少を経験した。Ｎ＝２の非処理開腹グループは第６日までに平均して335mgを喪失した。IGF－Ｉ処理の開腹グループは第６日までに243mgを喪失した。IGF－Ｉ処理開腹グループと非処理開腹グループの間には顕著な差はなく、またIGF－Ｉ処理の開腹グループと閉塞し非処理のグループの間にも顕著な差はなかった。この発見の重要性を以下に説明しよう。

表７

毎日の体重減少（ｋｇ）：ｄｅｓ－ＩＧＦ－Ｉ処理と対照との比較

第ｘ－０日	des	SEM	Control	SEM	N=(c1+des) lap	SEM
1－0	-.07	.028	-.15	.022	(4,4)	-.19	.03
2－0	-.13	.02	-.23	.015	(4,4)	-.27	.05
3－0	-.17	.033	-.34	.028	(4,4)	-.31	.0
4－0	-.20	.042	-.34	.047	(4,4)	-.31	.1
5－0	-.20	.077	-.34	.08	(4,4)	-.34	.15
6－0	-.25	.061	-.38	.076	(9,8)*	-.34	.21
7－0	-.06	.023	-.23	.08	(3,4)**	-.27	.24

＊：第６日の値は、毎日体重を測定せず第６日の体重がわかっているところの同じプロトコールからの９匹の追加的のウサギを含む。

＊＊：１匹のControl（対照）ウサギは第６日に死亡した。

臓器の重量

des－IGF－Ｉ処理動物において、腎臓重量（右腎臓のみ）の分析は、des－IGF－Ｉ処理動物（Ｎ＝９）の平均腎臓重量は閉塞された非処理の対照（Ｎ＝７）よりも1.5倍大きいことがわかった（各々14.87±0.774g対10.21±0.61g、ｐ＝0.0004）。処理した動物の脾臓重量は対象グループのそれよりの２倍であった（各々2.43±0.44g対1.17g±0.21g、ｐ＝0.028）。心臓の重量はグループ間で差はなく、胸腺の重量は研究のこの最初のグループでは測定しなかった。図４参照。

血清クレアチニンレベル

すべてのウサギにおいて、閉塞後の血清クレアチニンレベルは、対照平均の1.14±0.8mg/dlから第２日にはdes－IGF－Ｉ処理および対照グループで各々7.8±0.77及び6.9±0.63mg/dlと閉塞後高くなった（ｐ＝0.7）。両グループにおいて、これら上昇したレベルは第７日には0.9±0.15及び1.18±0.12mg/dlの正常値に戻り、そしてどの時点でも血清クレアチニンレベルは２つのグループ間で有意の差はなかった（表８および図５）。

血清尿素窒素レベル

閉塞後の血清尿素窒素レベルは17.7±0.7mg/dlの正常レベルから、第２日には対照グループでは125±9.3mg/dl、そして処理グループでは110±9.3mg/dlに上昇した。対照グループにおいては、これらのレベルは第６日には74±29.6mg/dlと低下し、一方des－IGF－Ｉ処理グループでは58±25.6mg/dlに戻った。いかなる日においてもグループ間のANOVAは統計的に有意ではなかったが、尿素窒素レベルと日対グループの二因子反復測定ではｐ＝0.058であり、処理グループの平均レベルはいかなる日でも常に非処理グループよりも低かった。表８および図６参照。

血清グルコースレベル

閉塞des－IGF－Ｉ処理および閉塞対照動物の両方での血清グルコースレベルは手術後は平均初期レベルの173±22mg/dlから、第１日には各々101±8.5kg/dlおよび125±15.4mg/dlと低下した。第１日から後のレベルは両グループで約140mg/dlに上昇し、そして実験の残りを通じて127と165mg/dlの間を保った。IGF－Ｉ処理動物は手術後は血清グルコースレベルについて同じ減少を示した。開始時の平均値164mg/dlは第１日にはIGF－Ｉ処理グループでは103±4.0kg/dlに、また対照グループでは129±7.0kg/dlに低下した。それ以降のレベルは122から170mg/dlの範囲内を保った。表８参照。

表８

ｄｅｓ－ＩＧＦ－Ｉ処理動物と対照－閉塞動物におけるクレアチニン、尿素窒素およびグルコースの血清レベル

日：	0	1	2	3	4	5	6	7
（クレアチニン）								
des-IGF-I平均	1.18	6.45	7.80	5.45	4.24	3.16	2.72	0.90
des-IGF-I SEM（±）	.10	.39	.77	.83	1.07	1.10	1.06	.15
対照平均	1.09	6.44	6.94	6.16	5.03	3.92	2.93	1.18
対照ＳＥＭ （±）	.05	.52	.63	.97	1.11	1.07	1.00	.12
N = (cl, des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9*	8,9**	4,3

処理及び第１－７日対グループの二因子ＡＮＯＶＡはｐ＝０．２９であった

（尿素窒素）								
des-IGF-I平均	18	91	110	98	82	62	58	15
des-IGF-I SEM（±）	.9	5.7	9.3	14.0	20.7	22.1	25.6	3.2
対照平均	17	102	125	126	111	93	74	19
対照ＳＥＭ （±）	0.8	6.0	9.3	18.6	24.4	27.2	29.6	1.8
N = (cl, des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9	8,9	5,4

処理及び第１－７日対グループの二因子ＡＮＯＶＡはｐ＝０．０５８であった

（グルコース）

des-IGF-I平均	177	101	143	137	131	131	139	127
des-IGF-I SEM（±）	20.1	8.5	8.0	4.2	6.4	7.5	15.8	3.7
対照平均	168	125	148	148	165	160	154	133
対照ＳＥＭ （±）	9.5	15.4	8.0	3.8	18.6	20.0	16.5	5.5
N = (c1, des)	9,10	9,10	9,10	9,10	9,10	9,9	8,9	5,4

処理及び第１－７日対グループの二因子ＡＮＯＶＡはｐ＝０．０９であった

＊：処理したウサギ＃４は死亡

＊＊：対照のウサギ＃７は死亡

結果:IGF－Ｉと対照の比較
ウサギの体重
IGF－Ｉ実験に使った対照ウサギからのデータは、両対照グループのプロトコールは同じではあったがdes－IGF－Ｉ実験に用いた対照ウサギからのデータとは一緒にしなかった。予期したようにARFは全てのウサギにおいて手術後は著しい体重減少を示した。ARF対照は第６日に376±84gの平均減少を示し、これは最初の体重の15%損失である。しかしdes－IGF－Ｉとは違って、IGF－Ｉは投与用量では顕著な体重減少を示さなかった。IGF－Ｉ処理ウサギは第６日に250±50gを減少し、これは9.5%の減少（ｐ＝0.34）であった。ANOVAは全ての日において有意なｐ値を示さず、また日及び処理対グループでの２－因子ANOVAにおいては0.62であった。表９参照。ARF＋IGF－ＩとIGF－Ｉグループの間には有意の差はなかった。

表９

毎日の体重減少（ｋｇ）：　ＩＧＦ－Ｉ処理と対象の比較

第ｘ－０日	ＩＧＦ－Ｉ	ＳＥＭ	対照	ＳＥＭ	Ｎ（cl.,IGF-I）
1－0	－．１０	0．０１	－．１１	．０２	（１１，１３）*
2－0	－．２９	0．０３	－．３０	．０３	（6，１０）**
3－0	－．２９	0．０３	－．３０	．０３	（9，１２）
4－0	－．３０	0．０３	－．３５	．０４	（9，１２）
5－0	－．３２	0．０４	－．３６	．０５	（9，１２）
6－0	－．２５	0．０５	－．３８	．０８	（9，１２）
7－0	－．２１	0．０７	－．３０	．１４	（4，6）***

＊：２５－４２及び４４－４９のウサギを含む

＊＊：対照の＃４０、４２及び４４並びにＩＧＦ－Ｉ処理のものは第３日に死亡。さらに４５－４９のウサギは第３日には体重測定せず

＊＊＊：３１－４２のウサギの体重のみを含む。それ以前のウサギは第６日に屠殺した。

臓器の重量

IGF－Ｉ処理動物において第７日の腎臓の重さは対照グループの腎臓のそれと等しかった。平均のIGF－Ｉ処理腎臓重量は11.85±0.62であり、一方非処理腎臓重量は10.19±0.65gでANOVAは0.10のｐ値を与えた。

胸腺の平均湿重量は対照胸腺の約２倍で、各々4.7±0.4g及び2.7±であって0.2という有意のANOVAp値を与えた。胸腺の大きさをウサギの体重に補正すると、胸腺の平均重量は顕著な処理関連差を表すという可能性を増大させる（ｐ＝0.01）。しかし正常ウサギ胸腺重量とARF＋IGF－Ｉ胸腺重量の比較は、処理されたウサギと正常なものは類似の質の胸腺を示した。

２つのグループの脾臓は類似の大きさであり、IGF－Ｉ処理と対照グループでは各々1.7±0.3gおよび2.0±0.5gであった。des－IGF－Ｉについては処理とは無関係に類似の大きさの心臓であり、IGF－Ｉ処理動物の肝臓は大きさでは差がなかった。表10及び図７を参照。６匹の動物は体重測定をせず、また他の４匹は第７日前に死亡した。従ってこれらのデータは10匹の処理ウサギと６匹の対照ウサギを含むものである。

表１０

ＩＧＦ－Ｉ処理とｄｅｓ－ＩＧＦ－Ｉ処理と対照－閉塞ウサギの臓器の重量

グループ	腎臓	脾臓	胸腺	心臓	肝臓	N = (K,S,T,H,L)*
IGF-I	11.9	1.7	4.7	6.3	61.6	(10,10,6,10,10)**
SEM (±)	0.06	0.3	0.4	0.3	2.9	
ARF Cl.	10.2	2.0	2.7	6.3	72.3	(6,6,4,6,6)**
SEM (±)	0.7	0.5	0.6	0.3	6.5	
des	14.9	2.4	-	6.9	-	(9,8,0,4,0)***
SEM (±)	0.8	0.4	0.2	-	-	
des Cl.	10.1	11.2	-	6.8	-	(7,7,0,6,0)
SEM (±)	0.6	0.2	-	0.5	-	
Normal	7.0	1.4	5.2	5.8	87.0	N = 2
SEM (±)	0.4	0.3	1.7	0.7	25.2	

＊：　Ｋ＝腎臓；Ｓ＝脾臓；Ｔ＝胸腺；Ｈ＝心臓；Ｌ＝肝臓

＊＊：３１－４２のウサギにおいて、ＩＧＦ－Ｉ処理動物（Ｎ＝６）と対照動物（Ｎ＝４）は全ての臓器の重量を測定した。２５－３０のウサギは、ＩＧＦ－Ｉ処理動物（Ｎ＝４）と対照動物（Ｎ＝２）は胸腺以外の全ての臓器の重量を測定した。

＊＊＊：第７日まで生存した１－２３のｄｅｓ－ＩＧＦ－Ｉ処理ウサギ、９匹のｄｅｓ－ＩＧＦ－Ｉ処理動物の全て、及び７匹の対照動物の全てについて腎臓を秤量した。処理ウサギ＃１３は脾臓重量記録がなく、処理ウサギ５匹および対照ウサギ１匹は心臓を秤量しなかった、但し大きさや組織には差は認められなかった。このグループの動物においては胸腺と肝臓の重さは記録しなかったが、グループ間の大きさの差は目では認められなかった。

血清クレアチニンレベル

IGF－Ｉ処理および非処理グループの動物はまた、第１日の1.00±0.09という正常値から、第２日には各々5.8±0.7mg/dl及び6.5±0.8mg/dlの高さまで血清クレアチニンレベルの手術後の上昇をみた。この両方のグループで、これら上昇したレベルは第７日には正常に近い1.17±0.12及び1.2±0.06に各々処理および対照グループで復帰した。第５および６日に、IGF－Ｉ処理動物では、各々ｐ＝0.004及び0.01という、対照グループより著しく低

い血清クレアチニンレベルを示した。これらの日において処理動物は対照グループよりも40％も低いという値を示した。全体としての二因子ANOVAは有意ではない（第１－６日でｐ＝0.192）けれど、薬物の効果は快復の後期（第４－６日）に見られるようである。これらの日の二因子ANOVAは有意（ｐ＝0.0334）であった。表11及び図８参照。

血清尿素窒素レベル

IGF－Ｉ処理および非処理グループの動物は、高められた閉塞後血清尿素と窒素レベルを示した。第０日での基礎線平均の15.5±0.7mg/dlは第２日にはARF対照では122.4±12.1mg/dlに、ARF＋IGF－Ｉ動物では89.9±12.0mg/dlに上昇した。第７日には両方のグループは何れも正常レベルに近い20±5.5mg/dl以下に復帰した。ANOVAは、毎日における差は第１、４、５及び６日で統計的に有意であり、そして第１日から第６日における日と血清尿素窒素レベルに対する２－因子ANOVA処理は0.0348というｐ値であることを示した。表11及び図９参照。

表１１

ＩＧＦ－Ｉ処理および対照－閉塞ウサギにおける

クレアチニン、尿素窒素およびグルコースの血清レベル

日	0	1	2	3	4	5	6	7

（クレアチニン）

IGF-I mean	1.0	5.2	5.8	3.9	2.3	1.7*	1.3*	1.2
IGF-I SEM	0.03	0.4	0.7	0.6	0.3	0.2	0.1	0.1
Control mean	1.0	5.4	6.5	5.4	3.7	2.7	2.1	1.2
Control SEM	0.1	0.4	0.8	1.0	0.7	0.5	0.3	0.06

処理および第４－６日対グループの２－因子ＡＮＯＶＡはｐ＝０．０３であった

（尿素窒素）

IGF-I mean	15.3	74.2	89.9	79.2	49.4	32.8	24.4	19.0
IGF-I SEM	0.6	4.7	12.0	11.2	9.3	6.3	5.5	5.5
Control mean	15.9	87.3	122.4	119.7	94.6	80.3	72.8	14.5
Control SEM	0.7	4.1	12.1	19.5	20.6	21.6	21.3	0.5
p Value	1.0	0.05	0.07	0.07	0.04	0.03	0.02	-
N = (cl, IGF)	11, 13	11, 13	11, 13	11, 13	9, 12	9, 12	9, 12**	2, 6**

処理及び第１－６日対グループの二因子ＡＮＯＶＡはｐ＝０．０３４８であった。

＊：ｐ＜０．０５。正確な値は本文参照

＊＊：対照ウサギ４０及び４２は各々第３及び４日に死亡。処理ウサギ４５は第４日に死亡。死亡前のこの３匹のウサギの最後のクレアチニン測定値は各々１０．００、１１．３０及び７．７０ｍｇ／ｄｌであり、最後の尿素窒素測定値は１５８、２１５及び１４７ｍｇ／ｄｌであり、これらは過度の腎臓顆粒化と細胞壊死を認める組織学的評価と共に、腎不全が死亡原因であることを示す。

＊＊＊：第７日の血清値は２５－３０及び４３－４８のウサギでは計算してない（ＩＧＦ－Ｉ処理はＮ＝３、対照はＮ＝３）。加えて、対照ウサギ＃３６は飼育

前に死亡した。更に対照ウサギ３２のラボでのデータは第７日の尿素窒素レベルは１４ｍｇ／ｄｌで、第６日のレベルは１５０ｍｇ／ｄｌであった。これらの異常に低い値は除外した。この日のクレアチニンレベルのＮは対照ではＮ＝７であるが、それは第７日の値は予期せぬ程に異常ではなかったからである。

^{3}Ｈ－ＰＡＨ

培地内のアニオンに対する組織内の放射性標識アニオンの比率で測定した腎臓組織の外皮切片による有機アニオンPAHの取り込みは、ゼロ時間における最初の０から、90分での7.15±1.78の正常ウサギのレベルに上昇した（Ｎ＝４）。腎臓の閉塞後、アニオン取り込み効率は閉塞対照動物で4.61±0.82の90分取り込み比率に減少した（ｐ＝0.16）。45分および60分での比率は著しく減少し（各々ｐ＝0.052及び0.043）そして二因子ANOVAはｐ＝0.077と殆ど有意であった。閉塞されIGF－Ｉ処理された動物での90分比率は5.09±0.56の値に上昇したが、閉塞された対照グループの90分比率からの有意の差はなかった（ｐ＝0.64）。

des－IGF－Ｉ処理グループはまた対照にくらべて改良された濃縮能力を示すが、いかなる時点においても有意の差は見られなかった。表12及び図10参照。

^{14}Ｃ－ＴＥＡ

有機カチオンTEAの取り込みは、正常ウサギの腎臓外皮切片において90分で7.36±0.50の値に達した。閉塞された対照動物ではこの値は4.83±0.50と顕著に減少し、これは濃縮能力で35％の減少となる。

IGF－Ｉ処理動物では90分での比率は7.21±0.80であり、すべての時点での値は閉塞された対照動物と比較してすべての時点で顕著に増大し、そして時間とグループ対比率の比較の二因子ANOVAはｐ＝0.0014であった。

加えてどの時点でも閉塞されIGF－Ｉ処理比率と正常比率の間には差はなく、そして同様のパラメータを用いた二因子ANOVAは0.71のｐ値を与えた。

des－IGF－Ｉグループの90分比率は8.48±1.04であり、これはまた閉塞された対照動物のTEA取り込み比率にくらべ顕著に増大していた。表12及び図11参照。

表１２

正常、対照閉塞ならびにｄｅｓ－ＩＧＦ－Ｉ及びＩＧＦ－Ｉ－処理動物による有機カチオン及びアニオンの取り込み＊

	0min	15min	30min	45min	60min	99min	N=
グループ							
(^{3}H－ＰＡＨ)							
Normal	0	1.50	2.84	4.22	5.76	7.15	4
SEM	0	0.08	0.46	0.86	1.14	1.78	
ARF Cl.	0	1.08	1.90	2.48*	3.22*	4.61	10
SEM	0	0.14	0.28	0.39	0.54	0.82	
des-IGF-I	0	1.57	2.84	4.08**	4.34	6.68	3
SEM	0	0.10	0.21	0.34	0.23	0.65	
ARF + IGF-I	0	1.31	2.18	3.42	3.57	5.09	10
SEM	0	0.12	0.18	0.33	0.30	0.56	
LAP + IGF-I	0	1.21	2.15	3.09	3.50	4.78	3
SEM	0	0.02	0.15	0.21	0.02	0.54	

＊：両方の値とも正常に比べて著しく低い

＊＊：ｄｅｓ－ＩＧＦ－Ｉ処理の４５分の切片／培地比率は対照に比べて著しく大きい。

(^{14}Ｃ－ＴＥＡ)

Normal	0	2.13	4.04	4.97	6.58	7.36	4
SEM	0	0.31	0.76	0.92	0.95	1.40	
ARC Cl.	0	1.31	2.23	2.86	3.60	4.83	10
SEM	0	0.10	0.19	0.26	0.37	0.50	
ARF + des	0	2.49	3.95	6.11	6.47	8.48	3
SEM	0	0.84	0.88	1.17	0.88	1.04	
ARF + IGF-I	0	2.01	3.25	4.85	5.18	7.21	10
SEM	0	0.15	0.25	0.54	0.32	0.80	
p Value ***		0.0012	0.0049	0.0036	0.0045	0.0192	
LAP + IGF-I	0	1.60	3.41	5.18	5.72	6.80	3
SEM	0	0.19	0.39	0.06	0.29	1.32	

データは、そこに示した時間における組織切片中のイオンの培地内のイオンに対する比率で表してある。

＊＊＊：ＩＧＦ－Ｉ処理グループと対照グループの間の有意差。二因子ＡＮＯＶＡ　ｐ＝０．００１４。ＩＧＦ－Ｉと正常の間に差なし。

組織病理学

17日目まで生存した動物を屠殺し、臓器を組織学的評価のために取得した。（表13）。

表１３

ＡＲＦ＋ＩＧＦ－Ｉ対ＡＲＦ対照ウサギでの腎臓組織的スコア＊

	変質	充血	円柱	腎炎	浮腫	鉱物化	肥大	拡張
ARF（＋）	2.4	0.2	0.9	0.4	1.8	1.8	2.6	1.9
IGF-I(±)	0.5	0.1	0.3	0.2	0.1	0.4	0.2	0.4
ARF	1.5	0.3	1.1	0.8	2.4	2.2	2.4	2.3
Cl.（±）	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3

＊：４を「重篤」、０を「正常」とする０から４までの評価で採点

心臓、脾臓および肝臓組織のグループ間で統計的に有意の差は認められなかった。胸腺重量の大きな増大にも係わらず、11の対照と６つのIGF－Ｉ処理胸腺の評価は顕著な形態学的変化のないことを示した。ARFの動物すべての腎臓切片は尿細管の鉱物化、拡張および変質を示した。

次の存在によってグループを評価した。すなわち、慢性間質結合腎炎、浮腫、亜急性夾膜炎症、骨髄上皮肥大および尿細管の鉱物化学、拡張、変質、充血ならびに硝子様円柱。変化がない、少ない、中程度および顕著または重篤の程度に応じて０から４に分類した。これらの値は各々のカテゴリーごとに平均化し、各々の処理グループの平均を非対比両側Ｔ－検定で比較した。これらのカテゴリーの何れにおいても有意の差は見られなかったが、平均してみれば、IGF－Ｉ処理ウサギにおいては充血、円柱、腎炎、浮腫、鉱物化および拡張が少ない傾向にあり、そして処理されたウサギでは肥大が大きい傾向がみられた。

考察

これらのデータは、IGF－Ｉ及びdes－IGF－Ｉはウサギの虚血腎臓機能に対して明らかに有益な効果を持つことを示唆している。体重減少に対してはdes－IGF－Ｉは好ましい効果をもち、des－IGF－Ｉ処理ウサギでは40%の改善があった（ｐ＝0.048）。体重減少に対するIGF－Ｉの効果は印象的ではないし統計的に有意でもない。

蛋白同化効果の多くの場合においてdes－IGF－Ｉは配列の完全なIGF－Ｉに比べて少なくとも３倍の活性増大がみられる。しかしここでの実験で用いた用量での補償的の2/3減少においてすら、des－IGF－Ｉ処理ウサギは７日間のあいだに対照のウサギよりも50%大きい腎臓重量を示した（ｐ＝0.0004）。IGF－Ｉ処理腎臓は同様な腎臓質量増加を示さず、IGF－Ｉとdes－IGF－Ｉは両方とも腎臓の快復を高めた。腎臓再生におけるIGF－Ｉの有益な効果が臓器サイズの大きな変化なしに見られたので、これは重要なことである。

壊死、顆粒化学および一般細胞損傷のグループにおいて広く知られた証拠がある。腎臓のうちあるものは細胞死に由来する石灰化領域を示し、両方のグループでの浮腫を起こさせる蛋白沈着の細胞外の兆候がある。組織学的試験から、IGF－Ｉ処理動物はより少ない腎不全およびより多い腎臓再生の証拠がある。

これらのデータは単に脾臓、胸腺および腎臓重量の増大を示すのみならず、またクレアチニンと尿素窒素の血清測定はdes－IGF－Ｉ及びIGF－Ｉ処理グループの腎臓機能の特異的な改善を示唆する。IGF－Ｉで処理したグループは、対照のウサギと比較して著しく低いレベルの血清クレアチニン及び尿素窒素を示した。IGF－Ｉ処理ウサギでは、尿素窒素レベルは第２－６日で対照の値よりも平均50%低かった。過剰の尿素窒素は好ましくなく、なるべく早期に正常レベルに戻るのが正の反応と考えられ得る。IGF－Ｉ処理動物はまた対照よりも血清クレアチニンの正常レベルへの復帰がより迅速であり、そしてこれはまた

IGF－Ｉ処理が腎臓による濾過とその後の超濾過操作の改善を示唆する。des－IGF－Ｉ処理ウサギにおいては、血清クレアチニンレベルは対照グループにおけるよりも低くはなかった。しかし血清尿素窒素レベルは著しく低かった（ｐ＝0.058）。すなわちこれらのデータはIGF－Ｉは、血清レベルの減少に必要な増大した機能的腎臓量における切除された蛋白よりも効果的であることを示唆する。IGF－Ｉは、24時間での可能な早期の変化を伴う希釈剤よりも一段と迅速かつ劇的にARFの正常腎臓機能を確実に快復させるようである。

IGF－Ｉの前腎臓的効果はまた有機アニオンやカチオンの研究で見いだされる。上述のように、基礎や頂上の膜によるカチオンやアニオンの腎臓処理は臨床的に重要である。ここでの研究において虚血原因は、正常ウサギと対照の閉塞ウサギの切片と培地の比率の間の顕著な差で証明される点であるところの実験の設定での勾配に対してアニオンとカチオンの両方を濃縮するために腎臓外皮切片の能力を明白に減少させた。単位質量ごとの機能的能力の減少は両方のイオンで35％に降下した。

IGF－Ｉが与えられたとき動物は、アニオンを濃縮するための腎臓組織の能力の顕著な改善を示さなかった（但しその傾向は、対象が多ければ誤差は減少し顕著さが得られることを示唆する）。しかしIGF－Ｉ処理の動物はカチオンに対して劇的に高い切片対培地の比率を示さず、両方のグループは正常の濃縮能力を示した。すなわち急性の発作を伴う７日間にわたるIGF－Ｉの投与は濃縮能力の劇的快復をもたらし、ARF対照と比べて、TEAの取り込みは70％まで上昇し、PAHの取り込みは50％まで上昇した。換言すればIGF－ＩまたはdesーIGF－Ｉを投与したとき、腎臓外皮切片の細胞組成は投与した量あたりのカチオンの輸送体の効果を正常化に戻すような方向に影響を受けた。

IGF－Ｉ処理したラットの高められた試験管内のイオン輸送は、機能的組織の量が増加したことを示唆する。

結論

上記の腎臓虚血のモデルにおいては、傷害の明白な測定可能レベルはウサギに付与され、それは高められた血清クレアチニン及び尿素窒素並びに低下した腎臓機能能力で証明されるところの減少した腎臓機能能力を招いた。加えて、虚血後の体重減少は腎臓機能の有用な尺度であろうと思われる。但し「手術後」の体重減少と言うのが更に適切な用語であろう。

腎臓の発作時の全配列IGF－Ｉでの処置は、低い血清クレアチニン及び血清尿素窒素レベルを与えることによってこの研究においてウサギを益した。IGF－Ｉで処理したウサギはまた増加した胸腺質量と、そして可能性のある但し顕著ではない体重減少を示した。des－IGF－Ｉで処理した動物はまた血清尿素窒素および正常イオン濃縮能力の減少を示した。更にこれらの動物において腎臓と脾臓重量は増加し、そして体重減少は少なくなった。従ってIGF－ＩとdesーIGF－Ｉはウサギの腎臓虚血の予防または軽減に極めて有用な薬剤であり、他の動物モデルにも用い得る。

加えてこれらデータは、処置を受けてない対照のウサギの半数という多くのウサギがdes－IGF－ＩやIGF－Ｉ処置によって死亡したことを示すものである。

実施例　３

ラットの処理

序論

この研究はdes－IGF－Ｉ及びIGF－Ｉが、他の種であるラットの腎臓の損傷を予防するか少なくとも軽減するかどうか、そしてこれら成長因子が腎不全に伴う予期される加速された異化作用を減少させるかどうかを決定すべくデザインされた。

プロトコール

麻酔したオスのSprage－Dawleyラット（Charles River Laboratories,Wilmington,MA）の両方の腎臓をクランプしてARFを外科的に導入した３つの研究をおこなった。麻酔剤（ケタミン／キシラジン、腹腔内、i.p.）を研究中モニターし、手術面を維持するため補充した。手術前の基礎血液サンプルを麻酔下に手術前に採取し、次いで小さな皮下切開を各々の腎臓で縁部において行った。次いで腎臓を、切開により腹壁に露出させた。各々の腎臓

を外に出し腎臓動脈と静脈を探し出し、2.5cmのシュワルツ動脈瘤クリップを使って30又は60分間クリップした。偽手術動物においては、腎臓をクランプしないという点を除いてこれらの手続きを行った。クランプを取り除き、切開部を縫合し、そして動物を加熱パッドの上で回復させた。Monarch 2000 Clinical Chemistry Analyzerを用いて血液化学測定を行った。

研究デザイン

研究1:最初の研究では16匹のラットを各々30分間クランプした。動物は、皮下におかれたアルザ2001浸透圧ミニポンプ（各々のポンプは設置直後に作動するように準備）によって250μg/dayのdes－IGF－Ｉ又はその希釈剤（100mM酢酸、pH4.5）を与えられた。全てのラットはクランプ除去90分後に50μｇのdes－IGF－Ｉ又はその希釈剤を注射された。ラットの体重を測定し、尾部静脈から採血し、そして第７日に屠殺した。

研究2:この研究は、腎臓傷害をおこすのに最も効果的なクランプ時間を見いだすために行った。研究１においては、30分のクランプ時間は単に穏和な腎臓傷害をおこすのみであることが明らかであった。16匹のラットを30分間、６匹の60分間クランプし、そして残りの４匹を「偽」処理の対照とした。ラットの体重を測定し、尾部静脈から採血し、そして第４日に屠殺した。

研究3:18匹のラットを各々60分間クランプし、残りの４匹を「偽」処理対照とした。16匹のラットは、皮下に置かれたアルザ2001浸透圧ミニポンプ（これらポンプは設置後ただちに作動するように準備）を使って各々264μg/dayのdes－IGF－Ｉ、436μg/dayのIGF－Ｉ又は希釈剤を投与した。すべてのラットは、クランプを取り除いたときにはdes－IGF－Ｉ、IGF－Ｉ又はその希釈剤を100μｇ皮下注射されたいた。毎日ラットの体重を測定し、尾部静脈から採血し、そして第７日に屠殺した。

結果

図12は下垂体切除ラットの腎臓成長促進剤としてのIGF－ＩとIGF－Ｉの比較である。先端欠損IGF－Ｉは腎臓成長因子としてはIGF－Ｉより９倍も活性であった。des－IGF－Ｉのこのような活性効果の故に、腎臓傷害の動物モデルにはIGF－ＩとIGF－Ｉの両方が用いられた。

研究1:対照およびdes－IGF－Ｉ処理ラットにおける30分間の腎臓動脈の閉塞を伴う腎不全の経過を、それぞれ体重増加,BUNおよびクレアチニンについて図13－15に示した。傷害のあと第５日から、処理グループにおいて顕著な体重増加が見られた。

両方の傷害グループにおいてBUNは類似の程度に上昇したが、処理グループではその後はより低いレベルに留まった。des－IGF－Ｉのこの効果は第６及び７日において統計的有意性に到達し、分子の同化効果を反映している。両方のグループで類似の態様で血清クレアチニンは上昇しそして下降した。これは傷害の穏和な自己限定的進行を反映する。血清クレアチニンは腎臓機能の尺度、実際的には糸状体濾過速度の間接的尺度として採用された。BUNは、ラットの腎臓機能と異化状態の両方の尺度として採用された。

研究2:30分または60分の腎臓動脈閉塞を伴う腎不全の過程を観察し、致死的でない重篤な腎臓傷害を与えるようなクランプ時間を得た。図16－18参照。体重増加は全てのグループにおいて手術で顕著に影響をうけたが、60分間クランプされた動物のみが異化作用を維持した。

BUNは、60分間クランプしたグループにおいてのみ劇的な上昇を示した。60分間のクランピングの効果の激しい性質はまた血清クレアチニンレベルにおいても見られた。

明白なことには、腎臓動脈の60分間のクランピングは30分間のクランピングに比べて激しい腎臓疾患をひきおこすが研究期間中では致死的ではなかった。従って60分のモデルをそれ以降の実験に使用した。

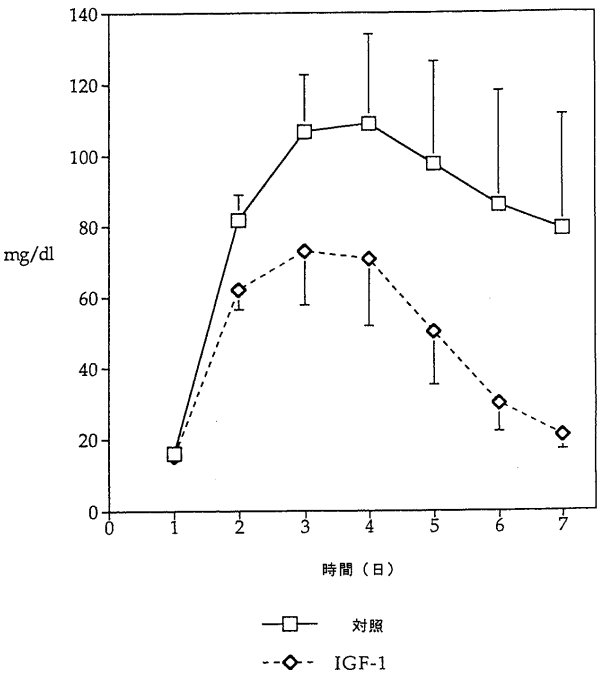
研究3:60分間の腎臓動脈の閉塞を伴う腎臓疾患の経過は、希釈剤またはdes－IGF－ＩまたはIGF－Ｉを投与するミニポンプを受ける動物において引き継がれた。図19－21参照。

非処理の腎臓疾患ラットは体重が増加することはなかった。それと対照的に、des－IGF－Ｉ治療の３日後には体重増加が見られた。比較すれば、同じ用量ではIGF－Ｉの効果は小さかった。

BUNはクランプしたグループでは類似の程度であった。しかしdes－IGF－Ｉ処理は、BUNレベルにおいて更に急な低下を伴った。
血中クレアチニンレベルもまた全てのクランプグループで上昇したが、des－IGF－Ｉ処理は他のクランプグループと比べて、より迅速な降下を起こすようであった。
要約
60分間の腎臓動脈のクランピングはラットにおいて重篤なARFを起こした。クランプ時のdes－IGF－Ｉ及びIGF－Ｉでの処置は、虚血性腎不全にかかっている腎臓の顕著な傷害を防ぐようであった。des－IGF－Ｉは、少なくとも部分的には腎臓機能の回復を促進する成長因子の故に、ARFの若いラットにおいて蛋白同化的成長促進効果を示すようであった。使用した用量ではIGF－Ｉは、より低用量のdes－IGF－Ｉで見られたような腎臓回復や身体成長に対する優れた効果は持っていなかった。しかしながら、使用したIGF－Ｉの用量や投与方法を調節すればラットでの腎臓回復に大きな効果が得られるであろう。何故ならばこのものはウサギにおいてそのような効果を示しているからである。
これらの結果は、IGF－ＩはARFの危険性のある哺乳動物のための予防薬として作用し著しい腎臓傷害の発生を防ぐことを示唆する。IGF－Ｉは長期投与において対象患者に対し更に大きな効果を持つという特性がある。
ここでのウサギやラットでのデータは、一般の獣医学的や臨床的方法により体重補正を行ってウマ、ニワトリその他の哺乳動物にも応用できることが合理的に期待される。標準的なプロトコールや方法を用いて、獣医や臨床医は、処置されるべき所望の哺乳動物において最大の効果を得るためにIGF－Ｉやその変種の投与量、計画および方法を調節することが出来る。ヒトもまた同様にこのように反応するものと信じられる。

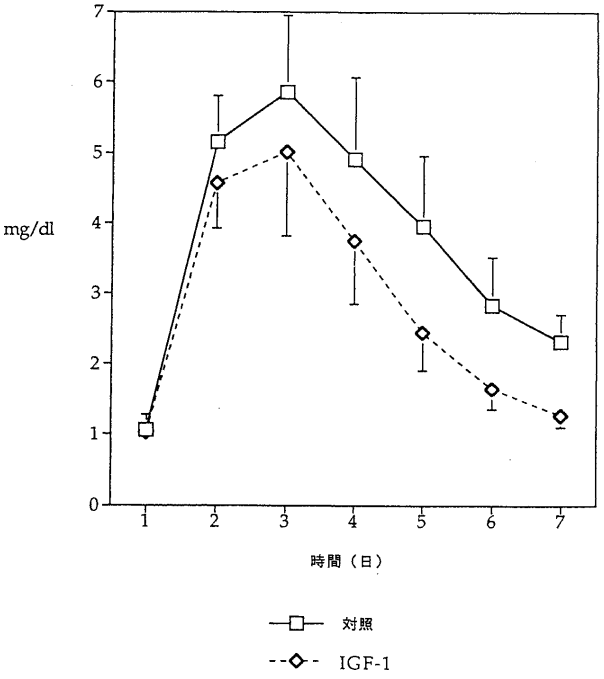
【図１】

Figure 1



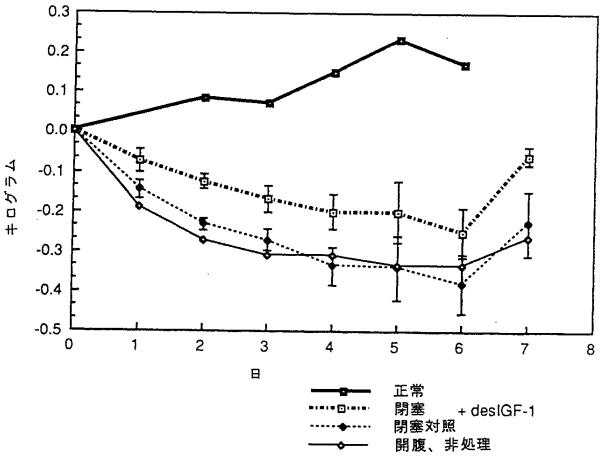
【図２】

Figure 2



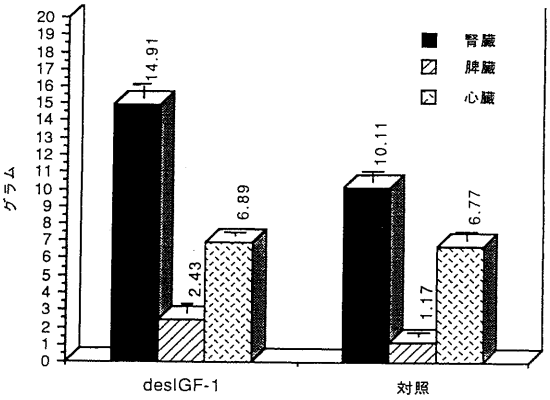
【図３】

Figure 3



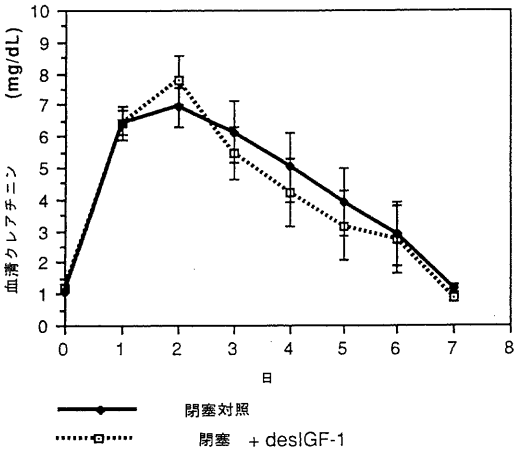
【図４】

Figure 4



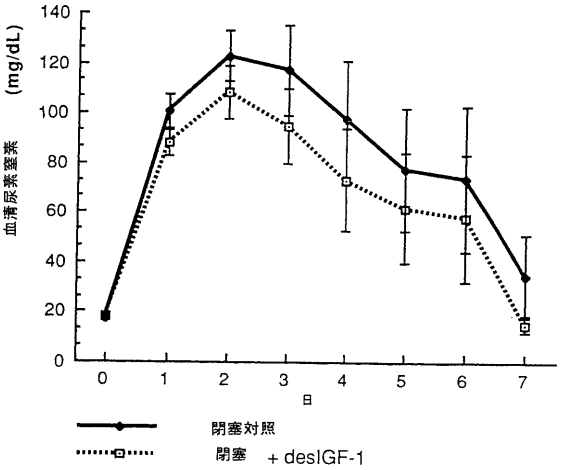
【図５】

Figure 5



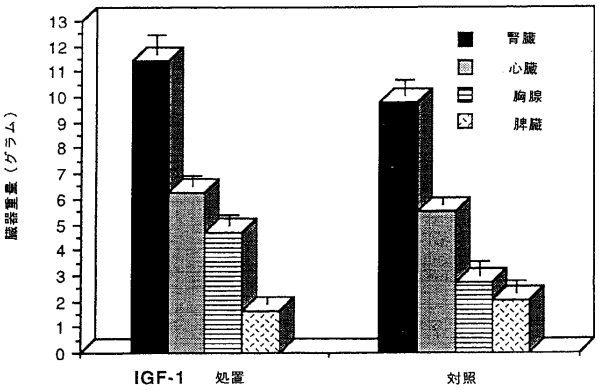
【図６】

Figure 6



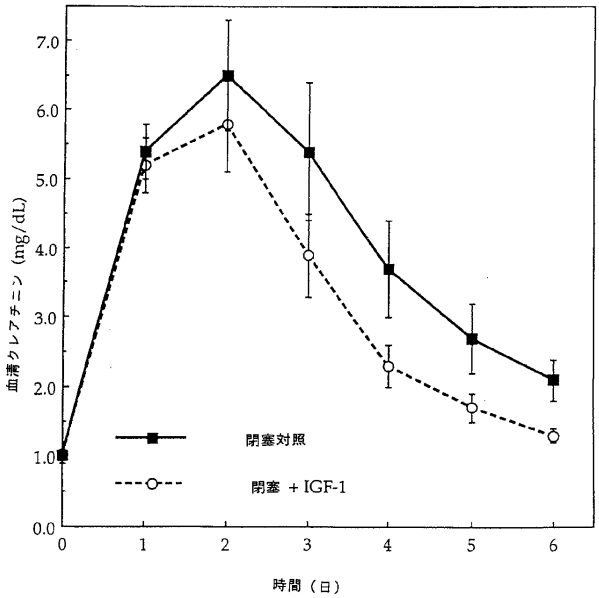
【図７】

Figure 7



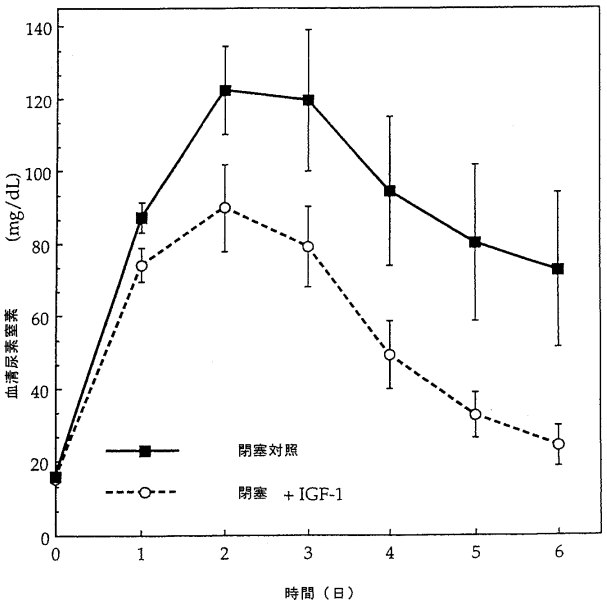
【図８】

Figure 8



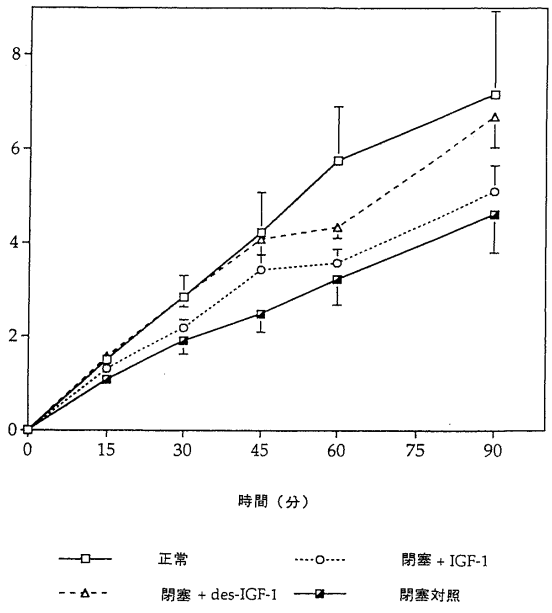
【図９】

Figure 9



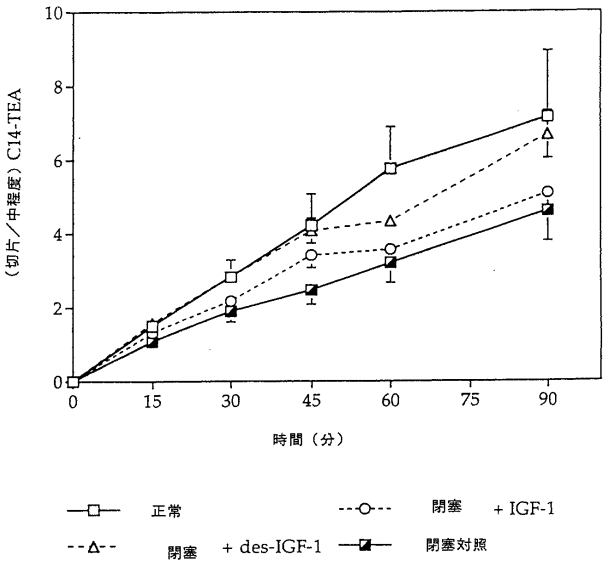
【図１０】

Figure 10



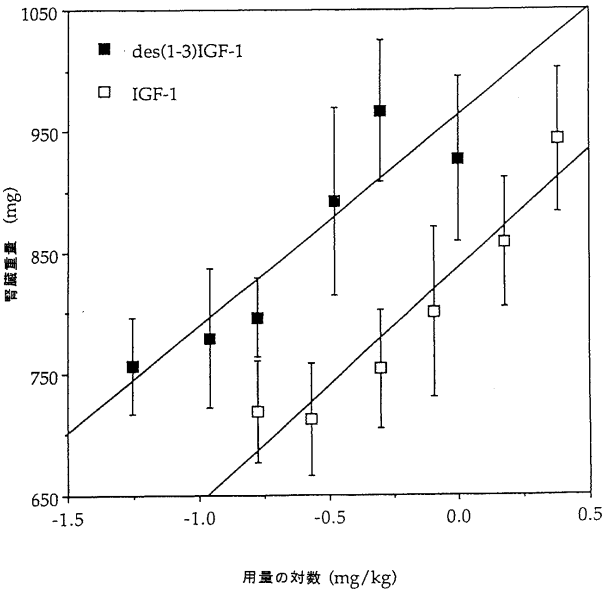
【図１１】

Figure 11



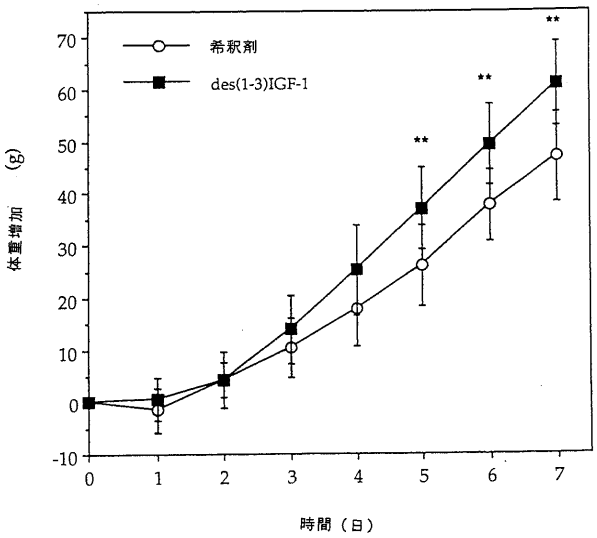
【図１２】

Figure 12



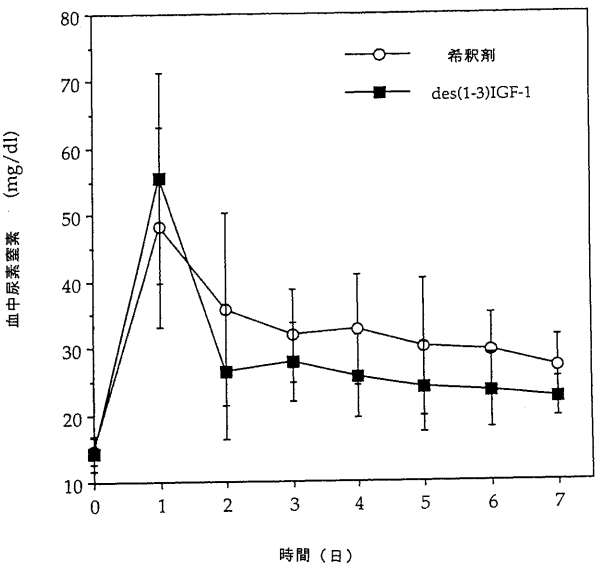
【図１３】

Figure 13



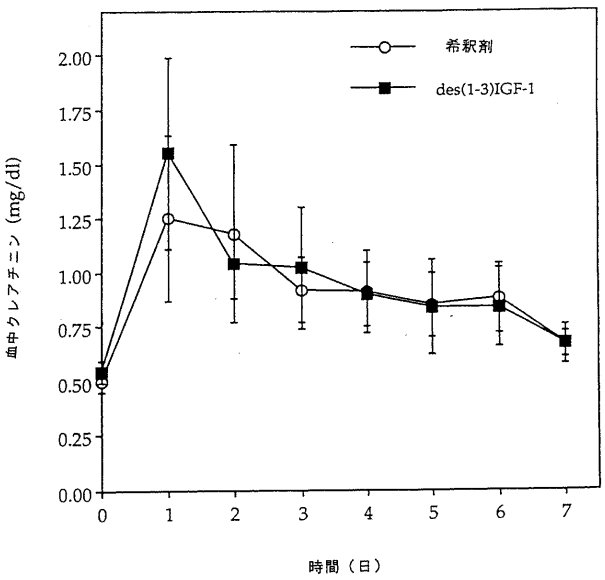
【図１４】

Figure 14



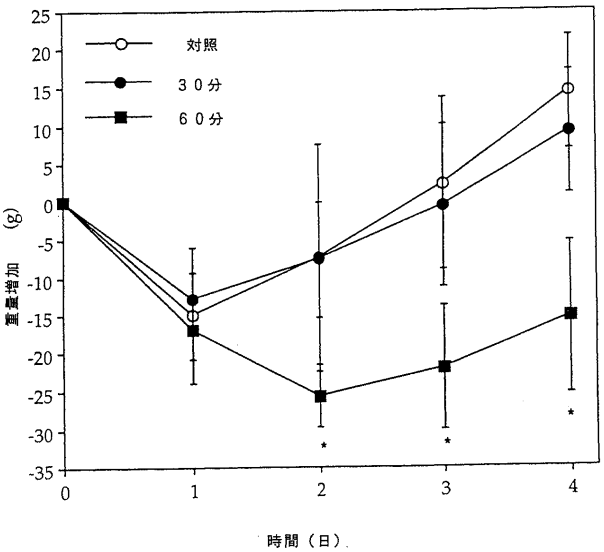
【図１５】

Figure 15



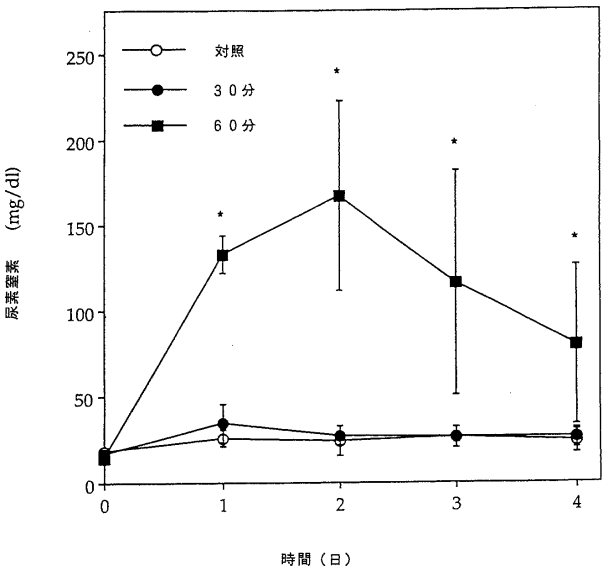
【図１６】

Figure 16



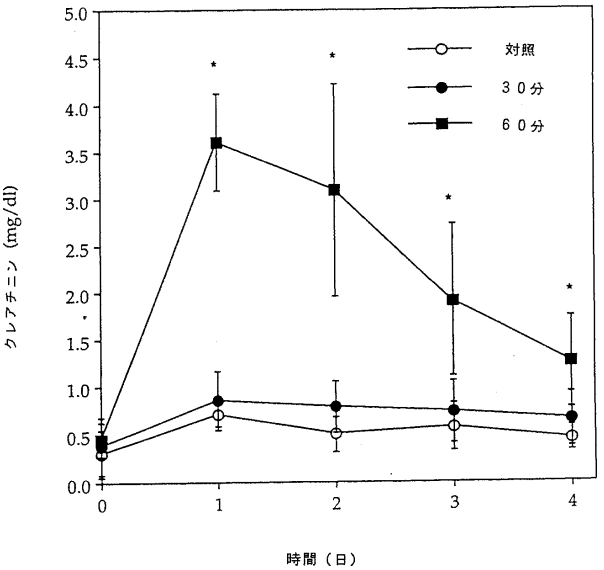
【図１７】

Figure 17



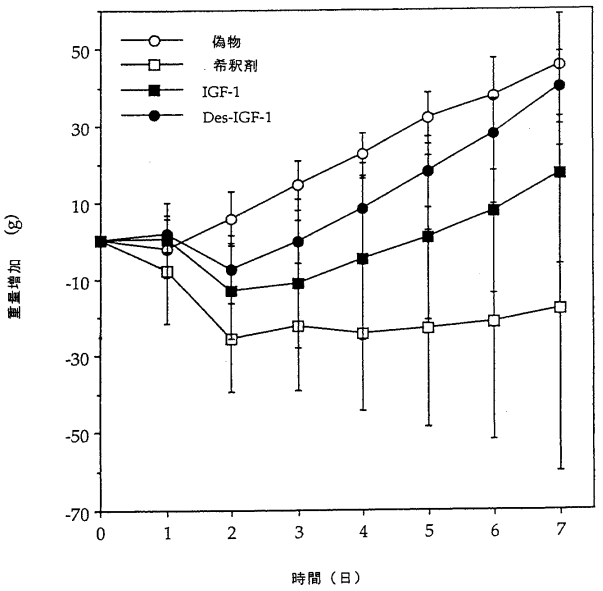
【図１８】

Figure 18



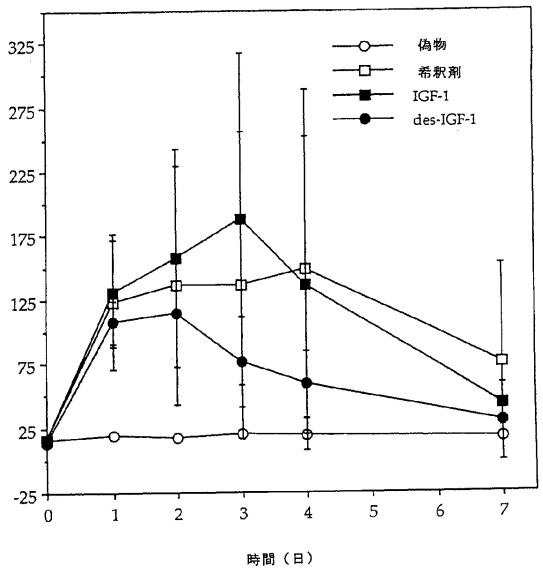
【図１９】

Figure 19



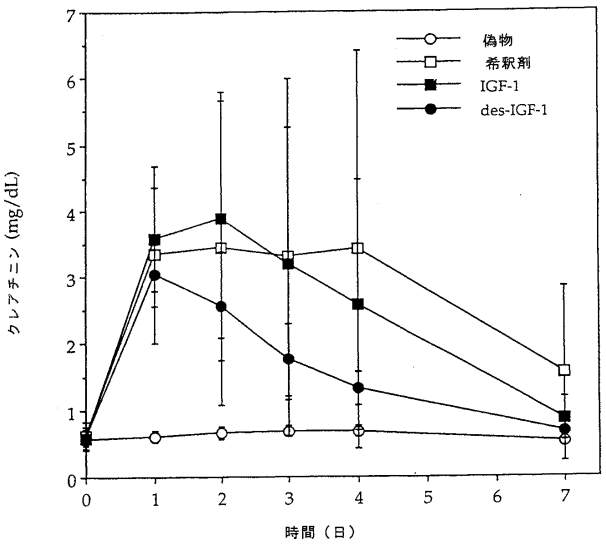
【図２０】

Figure 20



【図２１】

Figure 21



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平０１－２２６８２７（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９２／０１３５５６（WO，Ａ１）
国際公開第９１／０１８６２１（WO，Ａ１）
JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETYN OF NEPHLOROGY,September 1992,Vol.3,No.3,713

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
A61K 38/27
A61P 13/12
BIOSIS(STN)
CAPLUS(STN)
MEDLINE(STN)
EMBASE(STN)