

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4981036号
(P4981036)

(45) 発行日 平成24年7月18日(2012.7.18)

(24) 登録日 平成24年4月27日(2012.4.27)

(51) Int. Cl.		F I	
CO8B	11/08	(2006.01)	CO8B 11/08
CO8B	11/02	(2006.01)	CO8B 11/02
A61K	31/717	(2006.01)	A61K 31/717
A61P	25/02	(2006.01)	A61P 25/02
A61P	25/14	(2006.01)	A61P 25/14

請求項の数 7 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-512153 (P2008-512153)
 (86) (22) 出願日 平成19年4月20日(2007.4.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2007/058566
 (87) 国際公開番号 W02007/123187
 (87) 国際公開日 平成19年11月1日(2007.11.1)
 審査請求日 平成21年3月5日(2009.3.5)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-117294 (P2006-117294)
 (32) 優先日 平成18年4月20日(2006.4.20)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000118497
 伊藤ハム株式会社
 兵庫県神戸市灘区備後町3丁目2番1号
 (73) 特許権者 504157024
 国立大学法人東北大学
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 (74) 代理人 110000556
 特許業務法人 有古特許事務所
 (72) 発明者 堂浦 克美
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内

審査官 熊谷 祥平

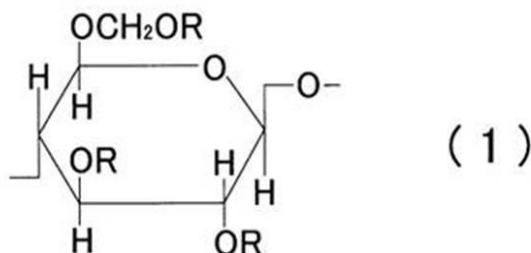
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コンフォメーション病医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式(1)〔式中、少なくとも1つのRはCH₃、C₂H₅、CH₂CH₂OH、CH₂CH(OH)CH₃、CH₂COOMから選ばれ、他のRはHであり、MはH、Na、K、Caから選ばれる。〕で表される構造単位を有するセルロースエーテル、前記セルロースエーテルのアルカリ金属塩、前記セルロースエーテルの脂肪族酸エステル、およびこれらの混合物から選ばれる一種以上のセルロースエーテル類を有効成分として含有することを特徴とするコンフォメーション病の予防及び治療薬。



【請求項2】

前記セルロースエーテル類が、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースおよびメチルセルロースから選ばれる一種以上であることを特徴とする請

求項 1 記載のコンフォメーション病の予防及び治療薬。

【請求項 3】

ヒトを含む哺乳動物に投与可能に製剤化されたものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のコンフォメーション病の予防及び治療薬。

【請求項 4】

注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、酒精剤、エリキシル剤、リモナーデ剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、チンキ剤、ローション剤、リニメント剤、エアゾール剤、坐剤から選ばれた剤型に製剤化されたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項 に記載のコンフォメーション病の予防及び治療薬。

10

【請求項 5】

コンフォメーション病が、ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease; CJD) ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 (Gerstmann-Straussler-Scheinkersyndrome)、致死性家族性不眠症 (Fatal familial insomnia)、ウシにおけるウシ海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy ; BSE)、ヒツジにおけるスクレイピー (scrapie)、シカにおける慢性消耗性疾患のいずれかのプリオン病であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれか 1 項 に記載のコンフォメーション病の予防及び治療薬。

【請求項 6】

コンフォメーション病が、アルツハイマー病であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のコンフォメーション病の予防及び治療薬。

20

【請求項 7】

コンフォメーション病が、アミロイドーシスであることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のコンフォメーション病の予防及び治療薬。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、コンフォメーション病医薬組成物、特に、コンフォメーション病の予防、治療効果のある医薬組成物に関する。

【背景技術】

30

【0002】

コンフォメーション病とは、特定の宿主蛋白質についてその立体構造 (コンフォメーション) が変化されて難溶性となって細胞や組織に蓄積し病的状態をもたらす疾患群であり、各種疾患例が報告されている [非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3 参照]。これには、アルツハイマー病、プリオン病、ポリグルタミン病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症に代表される神経難病が含まれる。

【0003】

コンフォメーション病では、特定の蛋白質が本来のコンフォメーションとは異なるシート構造と呼ばれる構造成分に富むコンフォメーションをとって難分解性となる。コンフォメーション病のうちこのような異常なコンフォメーションをとった蛋白質が細胞外の組織に蓄積して難溶性物質 (「アミロイド」と呼ばれる) を形成する疾患群はアミロイドーシスと呼ばれる。一方、このような異常なコンフォメーションをとった蛋白質が細胞内に蓄積して難溶性物質 (「インクルージョン・ボディ (封入体) 」と呼ばれる) を形成する疾患群もある。前者には各種アミロイドーシスの疾患が含まれ、後者にはポリグルタミン病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、びまん性レピー小体病、ハンチントン病、ピック病、進行性核上性麻痺、前頭側頭型痴呆などが含まれる。また、どちらも見られるものとしてはアルツハイマー病やプリオン病などがある。これらのコンフォメーション病の原因蛋白質は疾患によって異なり、蛋白質の一次構造上の共通点はないものの、コンフォメーションの異常化のメカニズムや異常化蛋白質の沈着を促進するメカニズムには共通の因子が関与していると考えられており、コンフォメーション病全般あるいは複数のコンフ

40

50

オメーション病に共通した治療化合物の開発が可能である〔非特許文献4、非特許文献5参照〕。実際に、これまでにアルツハイマー病、アミロイドーシス全般、プリオン病に共通する薬効を示すことが期待される薬物開発の報告が多数ある〔例えば、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8、非特許文献9参照〕。

【0004】

しかし、これらコンフォメーション病については、原因及びその作用機構が徐々に解明されつつあるが、現在まで予防および治療に決定的に有効な医薬品は見出されていない。

これまで、プリオン病を対象として予防、治療効果のある医薬品として、例えば、ラミニン結合部位を構成するアミノ酸配列からの6個の連続するアミノ酸残基から成る人為的に設計されたペプチド〔特許文献1参照〕、キノリン環やナフチリジン環などの含窒素複素環に、キノリン環、キニクリジン環、ピリジン環などの含窒素複素環式基、または芳香族アミン、ヒドラゾンなどの含窒素側鎖を有する化合物〔特許文献2参照〕などが、アルツハイマー病を対象として、例えばコオウレン属植物、バシクルモン属植物、ニチニチソウ、アヤメ属植物など特定の植物およびその抽出液〔特許文献3参照〕、ミリセチン、モリン、カテキン、エピカテキンなどのポリフェノール類〔特許文献4参照〕などが、また、アルツハイマー病を含むアミロイドーシスを対象として、グルコース・ペントスルフェートのようなアニオン置換基を含有する糖〔特許文献5参照〕、アミロイドーシスを含む疾病を対象として、熱ショック蛋白質を誘導するゲラニルゲラニオール〔特許文献6参照〕、コンフォメーション病を対象として、例えば特定のアミノ酸配列を有する蛋白質〔特許文献7参照〕、神経保護作用を有する神経ペプチド〔特許文献8参照〕、下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ペプチド、血管作動性腸管ペプチドなど血流促進、血圧低下作用をもつ生理活性ペプチド〔特許文献9参照〕などが提案されている。

【0005】

【特許文献1】特開2005-192415号公報

【特許文献2】特開2004-099553号公報

【特許文献3】特開2005-350391号公報

【特許文献4】特開2005-104850号公報

【特許文献5】特表2001-513569号公報

【特許文献6】特開2001-172171号公報

【特許文献7】特開2001-275687号公報

【特許文献8】国際公開2003/051387号パンフレット

【特許文献9】国際公開2004/048401号パンフレット

【非特許文献1】Robin W Carrell, David A Lomas, The Lancet, 1997年、350号、134-138頁

【非特許文献2】石原得博(監修)、池田修一(編集)、「アミロイドーシスの基礎と臨床」2005年3月金原出版(株)発行、第8頁~13頁

【非特許文献3】岩坪威、細胞工学、2001年、20巻11号、1474-1477頁

【非特許文献4】Jarrett JT, Lansbury PT Jr, Cell, 1993年、73巻、1055-1058頁

【非特許文献5】Gervais F, Morissette C, Kong X, Curr. Med. Chem. - Immun., Endoc. & Metab. Agents, 2003年、3巻、361-370頁

【非特許文献6】Watson JD, Lander DA, Selkoe JD, The Journal of Biological Chemistry, 1997年、50巻、31617-31624頁

【非特許文献7】Kisilevsky R, Nature Medicine, 1995年、1巻、143-148頁

【非特許文献8】Zhu H, Yu J, Kindy MS, Molecular Medicine, 2001年、7巻、517-522頁

10

20

30

40

50

【非特許文献9】堂浦克美、ファルマシア、2002年、7巻、635 - 639頁

【発明の開示】

【0006】

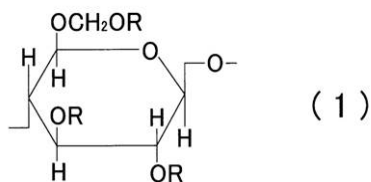
かかる状況を鑑み、本発明の目的は、アルツハイマー病、プリオン病、アミロイドーシスに代表されるコンフォメーション病に対して予防、治療効果を示す医薬品を提供することにある。

【0007】

上記目的を達成するため、本発明のコンフォメーション病医薬組成物は、一般式(1)〔式中、少なくとも1つのRは CH_3 、 C_2H_5 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 CH_2COOM から選ばれ、他のRはHであり、MはH、Na、K、Caから選ばれる。〕で表される構造単位を有するセルロースエーテル、前記セルロースエーテルのアルカリ金属塩、前記セルロースエーテルの脂肪酸エステル、およびこれらの混合物から選ばれる一種以上のセルロースエーテル類を有効成分として含有することを特徴とする。

10

【0008】



20

【0009】

このような、コンフォメーション病医薬組成物において、セルロースエーテル類が、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースおよびメチルセルロースから選ばれる一種以上であることが好ましく、また、医薬組成物がヒトを含む哺乳動物に投与可能に製剤化されたものであることが好適であり、特に、医薬組成物が、注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、酒精剤、エリキシル剤、リモナーデ剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、チンキ剤、ローション剤、リニメント剤、エアゾール剤、坐剤から選ばれた剤型に製剤化されたものであることが好ましい。そして、以上のような医薬組成物は、コンフォメーション病予防薬、又はコンフォメーション病治療薬であることが好適であり、また、コンフォメーション病が、ヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease; CJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome)、致死性家族性不眠症(Fatal familial insomnia)、ウシにおけるウシ海綿状脳症(bovine spongiform encephalopathy; BSE)、ヒツジにおけるスクレイピー(scrapie)、シカにおける慢性消耗性疾患のいずれかのプリオン病であることが好ましく、また、コンフォメーション病がアルツハイマー病であることが好適であり、さらには、コンフォメーション病が、アミロイドーシスであることが好ましい。

30

40

【0010】

本発明によるセルロースエーテル類は、プリオン病、アルツハイマー病、アミロイドーシス等の代表的なコンフォメーション病において、徐放性の顕著な治療、予防効果を発揮するものであり、かつこれらの化合物は、工業的には広く使用され、また食品の添加物や医薬品の製剤成分としても日常的に使われており、安全性が高いものである。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】プリオン病の原因蛋白質であるプリオンに対するHPMCのプリオン形成抑制効果についてインビトロ評価を行った結果を示すウェスタンブロットによる電気泳動像の図

50

面代用写真である（実施例 1）。

【図 2】HPMC の投与時期と、プリオン病に対する治療効果の関連をインビボで検討した結果を示すグラフである（実施例 2）。

【図 3】HPMC の投与回数と、プリオン病に対する治療効果の関連をインビボで検討した結果を示すグラフである（実施例 3）。

【図 4】HPMC の投与量と、プリオン病に対する治療効果の関連をインビボで検討した結果を示すグラフである（実施例 4）。

【図 5】感染前の HPMC 単回投与によるプリオン病に対する治療予防効果をインビボで検討した結果の一例を示すグラフである（実施例 5）。

【図 6】感染前の各種セルロースエーテル類単回投与によるプリオン病に対する治療予防効果をインビボで検討した結果を示すグラフである（実施例 6）。

【図 7】感染前の HPMC 複数回投与によるプリオン病に対する治療予防効果に加乗効果がみられるかどうかをインビボで検討した結果のグラフである（実施例 7）。

【図 8】各種セルロースエーテル類について、プリオン病に対する治療効果をインビボで比較検討した結果を示すグラフである（実施例 8）。

【図 9】HPMC の末梢静脈内投与におけるプリオン病に対する治療効果を検討した結果を示すグラフである（実施例 9）。

【図 10】HPMC を脳室内に直接投与してプリオン病に対する治療効果を検討した結果を示すグラフである（実施例 10）。

【図 11】図 10 とは別の HPMC、あるいはペントサンポリサルフェート（PPS）を脳室内に直接投与してプリオン病に対する治療効果を検討した結果を示すグラフである（実施例 11）。

【図 12】HPMC を皮下投与と腹腔内投与の組み合わせで同時に投与した際のプリオン病に対する治療効果について検討した結果を示すグラフである（実施例 12）。

【図 13】HPMC を皮下投与と脳室内投与の組み合わせで同時に投与した際のプリオン病に対する治療効果について検討した結果を示すグラフである（実施例 13）。

【図 14】末梢からのプリオン感染に対しての、HPMC のプリオン病の予防効果を検討した結果の一例を示すグラフである（実施例 14）。

【図 15】シリアンハムスターに対しての HPMC 投与量と、プリオン病に対する治療効果の関連を検討した結果を示すグラフである（実施例 15）。

【図 16】シリアンハムスターに対しての HPMC 投与時期と、プリオン病に対する治療効果の関連を検討した結果を示すグラフである（実施例 15）。

【図 17】RML 株（マウスで継代されているスクレイピーのプリオン株）に対するセルロースエーテル類のプリオン病に対する治療効果をインビボで検討した結果を示すグラフである（実施例 16）。

【図 18】福岡 1 株（マウスで継代されているヒトのプリオン病のプリオン株）に対するセルロースエーテル類のプリオン病に対する治療効果を検討した結果を示すグラフである（実施例 17）。

【図 19】マウスで継代されている別のスクレイピーのプリオン株である 22L 株に対してのセルロースエーテル類のプリオン病に対する治療効果を検討した結果を示すグラフである（実施例 18）。

【図 20】セルロースエーテル類におけるメトキシ基とヒドロキシプロポキシ基の含量、およびセルロースエーテル類分子量についてのプリオン病に対する治療効果を検討した結果を示すグラフである（実施例 19）。

【図 21】セルロースエーテル類分子量のプリオン病に対する治療効果に及ぼす影響についてさらに詳細に検討した結果を示すグラフである（実施例 20）。

【図 22】低分子量である 6 糖セルロースエーテル類のプリオン病に対する治療効果を調べた結果を示すグラフである（実施例 21）。

【図 23】加水分解により低分子化した HPMC のプリオン病に対する治療効果への影響を検討した結果を示すグラフである（実施例 22）。

10

20

30

40

50

【図 2 4】セルロースエーテル類と近似するその他化合物について、プリオン病に対する治療効果を検討した結果を示すグラフである（実施例 2 3）。

【図 2 5】マウスの脳における海馬近傍を説明する断面図である（実施例 2 4）。

【図 2 6】海馬近傍での異常プリオン蛋白の蓄積を示す弱拡大顕微鏡写真である（実施例 2 4）。

【図 2 7】図 2 6 のうち海馬と大脳皮質に挟まれた白質領域の強拡大顕微鏡写真である（実施例 2 4）。

【図 2 8】図 2 6 で観察したのと同じ部位の G F A P 免疫染色の顕微鏡写真である（実施例 2 4）。

【図 2 9】図 2 8 のうち海馬の錐体細胞層を含む視野の強拡大顕微鏡写真である（実施例 2 4）。

【図 3 0】マウスの脳における下丘を説明する断面図である（実施例 2 4）。

【図 3 1】下丘の異常プリオン蛋白の蓄積を示す弱拡大顕微鏡写真である（実施例 2 4）。

【図 3 2】下丘の異常プリオン蛋白の蓄積を示す強拡大顕微鏡写真である（実施例 2 4）。

【図 3 3】図 3 1 で観察したのと同じ部位の G F A P 免疫染色の強拡大顕微鏡写真である（実施例 2 4）。

【図 3 4】H P M C を皮下投与して血管内（血清）の抗プリオン活性を測定した結果の一例を示すウェスタンブロットによる電気泳動像の図面代用写真である（実施例 2 5）。

【図 3 5】血清中の抗プリオン活性因子（アルブミンを除去していない）について温度に対する感受性を検討した結果を示すウェスタンブロットによる電気泳動像の図面代用写真である（実施例 2 6）。

【図 3 6】血清中の抗プリオン活性因子（アルブミン除去）について温度に対する感受性を検討した結果を示すウェスタンブロットによる電気泳動像の図面代用写真である（実施例 2 6）。

【図 3 7】限外濾過膜を用いて H P M C 投与ハムスター血清中の抗プリオン活性因子の分子サイズを推定した結果の一例を示すウェスタンブロットによる電気泳動像の図面代用写真である（実施例 2 7）。

【図 3 8】H P M C 投与ハムスター血清中の抗プリオン活性因子について分解酵素処理に対する感受性を検討した結果の一例を示すウェスタンブロットによる電気泳動像の図面代用写真である（実施例 2 8）。

【図 3 9】標識化 H P M C をマウス尾静脈内に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 2 9）。

【図 4 0】標識化 H P M C をマウス尾静脈内に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 2 9）。

【図 4 1】標識化 H P M C をマウス尾静脈内に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 2 9）。

【図 4 2】標識化 H P M C をマウス尾静脈内に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 2 9）。

【図 4 3】標識化 H P M C をマウス尾静脈内に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 2 9）。

【図 4 4】標識化 H P M C をマウス尾静脈内に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 2 9）。

【図 4 5】標識化 H P M C をマウス背部皮下に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 3 0）。

【図 4 6】標識化 H P M C をマウス背部皮下に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 3 0）。

【図 4 7】標識化 H P M C をマウス背部皮下に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである（実施例 3 0）。

10

20

30

40

50

【図48】標識化HPMCをマウス背部皮下に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである(実施例30)。

【図49】標識化HPMCをマウス背部皮下に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである(実施例30)。

【図50】標識化HPMCをマウス背部皮下に単回投与後における、各組織内放射能濃度の経時的变化を示すグラフである(実施例30)。

【図51】標識化HPMCをマウス尾静脈内に単回投与後における、右側矢状断面(right axis aspect)凍結乾燥切片(上段)の各組織内放射能濃度を示すラジオリノグラム(下段)である(実施例31)。

【図52】標識化HPMCをマウス尾静脈内に単回投与後における、正中矢状断面(central axis aspect)凍結乾燥切片(上段)の各組織内放射能濃度を示すラジオリノグラム(下段)である(実施例31)。

10

【図53】標識化HPMCをマウス尾静脈内に単回投与後における、左側矢状断面(left axis aspect)凍結乾燥切片(上段)の各組織内放射能濃度を示すラジオリノグラム(下段)である(実施例31)。

【図54】セルロースエーテル類(HPCL)のA 蛋白凝集阻害活性の検討結果を示すグラフである(実施例32)。

【図55】セルロースエーテル類(MC)のA 蛋白凝集阻害活性の検討結果を示すグラフである(実施例32)。

【図56】セルロースエーテル類(HPMC)のA 蛋白凝集阻害活性の検討結果を示すグラフである(実施例32)。

20

【図57】セルロースエーテル類(0.3%塩酸加水分解HPMC)のA 蛋白凝集阻害活性の検討結果の一例を示すグラフである(実施例32)。

【図58】セルロースエーテル類(40%塩酸加水分解HPMC)のA 蛋白凝集阻害活性の検討結果を示すグラフである(実施例32)。

【図59】セルロースエーテル類[HPCL]の凝集A に対する神経細胞保護効果の検討結果を示すグラフである(実施例33)。

【図60】セルロースエーテル類[MC(SM-4)]の凝集A に対する神経細胞保護効果の検討結果を示すグラフである(実施例33)。

【図61】セルロースエーテル類[HPMC(TC-5RW)]の凝集A に対する神経細胞保護効果の検討結果を示すグラフである(実施例33)。

30

【図62】セルロースエーテル類[0.3%塩酸による加水分解HPMC]の凝集A に対する神経細胞保護効果の検討結果を示すグラフである(実施例33)。

【図63】セルロースエーテル類[40%塩酸による加水分解HPMC]の凝集A に対する神経細胞保護効果の検討結果を示すグラフである(実施例33)。

【図64】アルツハイマー病疾患マウスに対するセルロースエーテル類の治療効果を検討するプロウイング試験の結果である(実施例34)。

【図65】アルツハイマー病疾患マウスに対するセルロースエーテル類の治療効果を検討するブドウ糖液消費試験の結果である(実施例34)。

【図66】AAアミロイドを末梢臓器に蓄積する動物疾患モデルを用いて、HPMCのアミロイドーシスに対する発病抑制効果を検討した結果であり、肝臓のHE染色標本の図面代用写真である(実施例35)。

40

【図67】図66と同じく動物疾患モデルを用いて、HPMCのアミロイドーシスに対する発病抑制効果を検討した結果であり、肝臓のコンゴ赤染色標本の図面代用写真である(実施例35)。

【図68】同じく動物疾患モデルを用いて、HPMCのアミロイドーシスに対する発病抑制効果を検討した結果であり、肝臓の抗SAA抗体による免疫染色標本の図面代用写真である(実施例35)。

【図69】同じく動物疾患モデルを用いて、HPMCのアミロイドーシスに対する発病抑制効果を検討した結果であり、脾臓のHE染色標本の図面代用写真である(実施例35)

50

。【図70】同じく動物疾患モデルを用いて、HPMCのアミロイドーシスに対する発病抑制効果を検討した結果であり、脾臓のコンゴ赤染色標本の図面代用写真である（実施例35）。

【図71】同じく動物疾患モデルを用いて、HPMCのアミロイドーシスに対する発病抑制効果を検討した結果であり、脾臓の抗SAA抗体による免疫染色標本の図面代用写真である（実施例35）。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明においてコンフォメーション病は、特定の宿主蛋白質のコンフォメーション（立体構造）に変化が生じて細胞や組織に蓄積してもたらされるプリオン病、アルツハイマー病や、AAアミロイドーシスに代表されるアミロイドーシス疾患群の全般を包括している。さらに詳しくは、プリオン病は、プリオン蛋白質に起因すると考えられる疾患群であり、クロイツフェルト-ヤコブ病（Creutzfeldt-Jakob disease；CJD）、牛海綿状脳症（bovine spongiform encephalopathy；BSE）、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群（Gerstmann-Straussler-Scheinker Syndrome；GSS）、致死性家族性不眠症、クール（Kuru）、羊スクレイピー（scrapie）、伝達性ミンク脳症（TME）、シカ慢性消耗性疾患（CWD）などがある。このようなプリオン病に罹患する可能性のある哺乳動物として、ヒト以外には例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジ、シカ、オオジカ、ミンク、ブタ、サル、マウス、ラット、ハムスター、ネコなどが挙げられる。

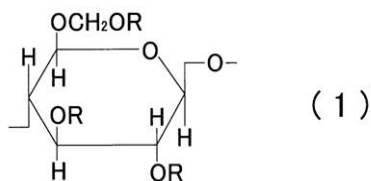
【0013】

アミロイドーシスは、アミロイド線維が緒臓器の細胞外に沈着することにより機能障害を引き起こすと考えられる疾患であり、全身性アミロイドーシス〔免疫グロブリン性アミロイドーシス、反応性AAアミロイドーシス、家族性アミロイドーシス、透析（A₂M）アミロイドーシス、老人性アミロイドーシスなど〕、限局性アミロイドーシス〔脳アミロイドーシス、内分泌アミロイドーシス、皮膚アミロイドーシス、角膜アミロイドーシス、限局性結節性アミロイドーシスなど〕の病型がある。その他、アミロイド類似の繊維状蛋白質の凝集からなる細胞内異常構造物（インクルージョン・ボディ）に起因すると考えられる疾患群があり、アルツハイマー病、パーキンソン病、びまん性レビー小体病、ハンチントン病、前頭側頭葉型痴呆、筋萎縮性側索硬化症などがある（非特許文献2および3）。

【0014】

本発明のコンフォメーション病治療薬は、式（1）で表される構造単位を有するセルロースエーテル類、このセルロースエーテル類のアルカリ金属塩、このセルロースエーテル類の脂肪酸エステル、およびこれらの混合物を有効成分として含有している。式1において、少なくとも1つのRはCH₃、C₂H₅、CH₂CH₂OH、CH₂CH(OH)CH₃、CH₂COOMから選ばれ、他のRはHである。また、CH₂COOMにおけるMは、H、Na、K、Caから選ばれる。

【0015】



【0016】

式（1）で表される構造単位を有するセルロースエーテル類を具体的に挙げれば、例えば、メチルセルロース、エチルセルロース、メチルエチルセルロース、ヒドロキシプロピ

10

20

30

40

50

ルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロースである。このうち、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースは特に顕著な効果を示しており、好ましい選択である。

【0017】

セルロースエーテル類のアルカリ金属塩は、上記のセルロースエーテル類における水酸基（OH基）がアルカリ金属塩となったものであり、具体的にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩が挙げられる。アルカリ金属は、塩一種単独でもよく、二種以上の混合であってよい。

10

【0018】

セルロースエーテル類の脂肪族酸エステルは、上記のセルロースエーテル類における水酸基（OH基）が脂肪族酸によりエステル化されたものであり、脂肪族酸は好ましくは炭素数が18以下の脂肪族酸であり具体的には酢酸、プロピオン酸、コハク酸、オレイン酸、ステアリン酸、クエン酸、乳酸、リンゴ酸が挙げられる。脂肪族酸は、一種単独でもよく、二種以上の混合であってよい。

【0019】

また、セルロースエーテル類は、鉱酸、アルカリ金属水酸化物、酵素による分解物であってよい。ここで分解物は、水中において分解処理されたそのまま、さらにpH調整された分解処理液、分解処理液よりの分画処理液、分解処理液または分画処理液から単離された固形分などいずれの形体でもよい。ここで、鉱酸は代表的には塩酸、硫酸であり、アルカリ金属水酸化物は代表的には水酸化ナトリウム、水酸化カリウムであり、酵素は代表的にはエンド型又はエキソ型のセルラーゼである。

20

【0020】

本発明の医薬組成物とするには、セルロースエーテル類を有効成分として含有するものであり、セルロースエーテル類は一種単独でもよく、または二種以上の混合であってよい。

【0021】

医薬組成物は式(1)で示されるセルロースエーテル類を有効成分として含むが、本発明の効果が損なわれない範囲でこれ以外の成分を配合、または同時に投与されてもよい。また、本発明の医薬組成物は製剤学的に許容される如何なる剤型に製剤化し、薬学的に許容される如何なる投与経路によっても投与可能である。製剤化する剤型としては、例えば、注射剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、酒精剤、エリキシル剤、リモナーデ剤、軟膏剤、硬膏剤、パップ剤、チンキ剤、ローション剤、リニメント剤、エアゾール剤、坐剤などを挙げることができる。有効成分として用いるセルロースエーテル類の種類によっては消化管を介しての吸収率が低いことがあり、この場合には錠剤、散剤、顆粒剤、内用の液剤、シロップ剤、リモナーデ剤、エリキシル剤、懸濁剤や乳剤、及びこれらいずれかを充填したカプセル剤などの経口剤以外の非経口用に製剤化して経口以外の投与経路により投与することが好ましい。また、本発明の医薬組成物は、消化管と同様に皮膚、口腔、咽頭、鼻や肺等の粘膜などを介しての吸収率も概して高くないことが多く、この場合には液剤、チンキ、ローション剤、軟膏剤、硬膏剤などの外用塗布用剤、リニメント剤、パップ剤、エアゾール剤、坐剤などの経皮、経粘膜以外の投与経路により投与することが好ましい。以上のように有効成分として含有させるセルロースエーテル類が消化管、皮膚や粘膜を介して吸収され難い場合には、本発明のコンフォメーション病医薬組成物は水性溶剤又は非水溶剤の溶液状、懸濁液状、乳濁液状の注射剤、或いは用時溶解用の注射剤として、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、鞘内、髄腔内、脳室内、皮内などに注射投与、或いは輸液として又は輸液とともに静脈内に点滴投与することが好ましく、また、浸透圧ポンプなどを用いて持続的に注射投与したり、体内埋入徐放型に製剤化して皮下投与することもできる。本発明のコンフォメーション病医薬組成物には、製剤化する剤型に応じて本発明の効果が損なわれない範囲で安定化

30

40

50

剤、緩衝剤、保存剤、賦形剤などの添加剤を加えることができる。例えば注射剤の場合には、安定化剤として、クエン酸塩や酢酸塩などのpH調整緩衝剤、ピロ亜硫酸ナトリウム、アセトン、アスコルビン酸などの抗酸化剤、皮下、筋肉内用では無痛化剤として、ベンジルアルコールやフェノール、塩酸プロカイン、ブドウ糖などから適宜選定して添加することができ、用時溶解用とする場合にはエタノールやプロピレングリコールなどの溶解補助剤、賦形剤を添加しても良い。

【0022】

セルロースエーテル類の体内への投与量は、コンフォメーション病の種類、投与対象の動物種、投与経路、予防目的か治療目的か、症状などにより異なり一律に限定されず、使用するセルロースエーテル類の種類、投与頻度(間隔)や各耐容量に応じて適宜設定することができる。本発明の医薬組成物は、コンフォメーション病の原因に暴露される前、又は兆候が現れる前に予防薬として投与されれば、コンフォメーション病の発病を抑えることができ、コンフォメーション病の原因に暴露された後又は発病後に投与開始した場合にも、治療薬としてコンフォメーション病の発症を抑えたり発症後の進行を遅らせることができる。

【実施例1】

【0023】

代表的なコンフォメーション病の一つであるプリオン病において、その原因蛋白質であるプリオン(異常型プリオン蛋白)に対するヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)の効果についてインビトロ(in vitro)評価を行った。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC-TC5RW);信越化学工業(株)製、「TC-5RW」(商品名)(メトキシ基含量29.2重量%、ヒドロキシプロポキシ基含量8.9重量%、20における2重量%水溶液の粘度5.81mm²/s、1重量%水溶液のpH6.8)を用いた。

【0024】

〔評価方法〕

プリオン持続感染細胞を用いるイシカワ(Ishikawa)、ドウウラ(Doh-ura)らの検定評価法〔K. Ishikawa, K. Doh-ura, et al., Journal of General Virology, 2004年、85巻、1785-1790頁〕に準じ、抗プリオン効果のインビトロ評価を行った。ここでは神経芽細胞種細胞N2aに、スクレイププリオンであるRML株を持続感染させたScN2a細胞を用い、これを6穴の培養用シャーレにコンフルエントの10%に相当する細胞数をまき、培養液中のHPMC濃度が0.1、または1mg/mLとなるようにHPMC水溶液を加えた。対照(0mg/mL)として滅菌蒸留水を培養液に加えた。細胞培養条件としては、終濃度10%の胎児ウシ血清を加えたOpti-MEM(GibcoBRL社製)を培養液として用いて、5%CO₂雰囲気、37に調整した炭酸ガスインキュベータ内に培養用シャーレを3日間静置することにより行なった。コンフルエントとなった細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した後、細胞溶解バッファー[0.5%ポリオキシエチレン-p-オクチルフェノール(和光純薬工業(株))、「NP-40」(商品名)を使用し)及び0.5%デオキシコール酸ナトリウム添加PBS]で細胞を溶解し、溶解液を軽遠心(5,000×g、5分間)して得られた上清にプロテイナーゼK(PK)(メルク社製)を終濃度10μg/mLとなるように加え37で30分反応(蛋白質分解)させた後、フェニルメタンスルホニルフロライド(PMSF)を終濃度1mMとなるように加えて反応をとめた。その後、超遠心(100,000×g、4、30分間)して異常型プリオン蛋白を沈査として回収し、ウエスタンブロット法にてプリオン蛋白を解析した。ウエスタンブロット法の条件としては、15%トリス・グリシンSDS-PAGEゲルで電気泳動し、電気泳動した蛋白質をナイロンメンブラン(ミリポア社製、PVD Fメンブレイン)にプロットングし、プリオン蛋白に対するマウスモノクローナル抗体(SPI-BIO社製、SAF83(5,000倍希釈))、及びアルカリフォスフ

10

20

30

40

50

アターゼ・コンジュゲートヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体（プロメガ社製（20,000倍希釈）、化学発光検出試薬（アマーシャム社製、CDP-Star detection reagent））を使用してプリオン蛋白の検出を行った。

【0025】

〔結果〕

結果を図1に示す。この結果から、HPMC（TC-5RW）は濃度依存的にプリオン持続感染細胞中の異常型プリオン蛋白（すなわちプリオン）の形成を阻害していることがわかる。

【実施例2】

【0026】

投与時期とプリオン病に対する治療効果の関連をインビボ（in vivo）で検討した。

〔評価方法〕

HPMC（TC-5RW）を用いて、Tg7マウス（ハムスター型プリオン蛋白を過剰発現した遺伝子改変マウス）と263K（ハムスターで継代されているスクレイピーのプリオン株）脳ホモジネートを用いるドウウラ（Doh-ura）らの検定評価法〔Katsumi Doh-ura, et al., Journal of Virology, 2004年、78巻、4999-5006頁〕に準じ、抗プリオン効果のインビボ評価を行った。ここでは、生理食塩水で1%（W/V）濃度とした263K脳ホモジネートの20 μ Lをマウスの脳内に接種し、プリオンに感染させた。接種後14日、21日、28日、35日経過後それぞれについてマウスの背部皮下にHPMC（TC-5RW）75mgを投与した。投与方法としては、粉末状のHPMCをオブラート（旭光社製、三角型フクロ（商品名））1包に包み、皮下に埋入することにより行なった。

14日経過後に投与を開始した群では一週毎に計4回、21日経過後に投与を開始した群では一週毎に計3回、28日経過後に投与を開始した群では一週後の計2回、HPMC（TC-5RW）75mgを皮下に投与した。対照はHPMC非投与群（オブラートのみ投与）である。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹（体重20~25g）を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを一元配置分散分析（one-way ANOVA）及びターキー-クレイマー法（Turkey-Kramer法）による多重比較検定で解析した。

【0027】

〔結果〕

結果を図2に示す。

プリオン脳内感染から14日経過後にHPMC（TC-5RW）の投与を開始した群の潜伏期間は83.3 \pm 14.5日であり、21日経過後に投与を開始した群では72.0 \pm 7.0日、28日日経過後に投与を開始した群では65.3 \pm 6.3日、35日経過後に投与を開始した群では63.2 \pm 6.2日であり、対照群の47.6 \pm 2.7日よりHPMC投与により有意（いずれも $p < 0.01$ ）な潜伏期間延長が見られた。さらに、14日目投与開始群は28日目投与開始群や35日目投与開始群に比して有意（ともに $p < 0.05$ ）に潜伏期間が長く、脳内感染後の投与時期が早いほどプリオン病に対する治療効果は優れていた。

【実施例3】

【0028】

投与回数とプリオン病に対する治療効果の関連をインビボ（in vivo）で検討した。

〔評価方法〕

HPMC（TC-5RW）を、単回の皮下投与と複数回の皮下投与の比較を行った。

実施例2と同様の実験を行い、HPMC（TC-5RW）100mgを脳内感染から1週間経過後に皮下に1回投与した群（単回）と、脳内感染から1週間経過後、2週間経過後、3週間経過後の3回投与した群とで比較を行った。同様にして、HPMC（TC-5

10

20

30

40

50

RW) 100 mg を脳内感染から3週間経過後に皮下に1回投与した群(単回)と、脳内感染から3週間経過後、4週間経過後、5週間経過後の3回投与した群での比較も行った。なお対照群としてHPMC非投与群(オブラートのみ投与)を準備した。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹(体重20~25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータは、実施例2と同様に解析した。

【0029】

〔結果〕

結果を図3に示す。

脳内感染から1週間経過後にHPMCを単回投与した群の潜伏期間は86.0 ± 4.4日であり、脳内感染から1週間経過後より1週毎に3回投与した群の潜伏期間は97.8 ± 5.6日であり、複数回投与で有意(p < 0.01)な潜伏期間延長が見られ、その差は約12日であった。しかし、脳内感染から3週間経過後にHPMCを単回投与した群の潜伏期間84.2 ± 10.4日と、脳内感染から3週間経過後より1週毎に3回投与した群の潜伏期間85.2 ± 6.9日では、有意差はみられなかった。従って、感染早期からの投与では複数回投与は有効であるものの、その効果は大きくはなかった。

【実施例4】

【0030】

投与量とプリオン病に対する治療効果の関係をインビボ(in vivo)で検討した。

〔評価方法〕

実施例2と同様の実験を行い、脳内感染から5日経過後にHPMC(TC-5RW)15、25、50、100、150、200 mgのそれぞれを背部皮下に単回投与した。なお対照群としてHPMC非投与群(オブラートのみ投与)を準備した。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹(体重20~25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータは、実施例2と同様に解析した。

【0031】

〔結果〕

結果を図4に示す。

HPMC(TC-5RW)は100 mgまでは用量依存的に潜伏期間の延長が見られ、100 mg投与では潜伏期間93.0 ± 12.5日、150 mg投与では117 ± 18.6日、200 mg投与では110.7 ± 30.9日であり有意差が認められず、100 mgの投与でほぼ飽和状態となった。なお、200 mg投与群では2匹がこの量のHPMC投与に耐えられずに投与2日目に死亡した。

【実施例5】

【0032】

実施例3の実験より、HPMC(TC-5RW)は単回投与でも長期間にわたりプリオン病に対する治療効果を発揮することが推定されたため、感染以前の単回投与でも発症を予防する効果があるかどうかをインビボ(in vivo)で検討した。

〔評価方法〕

実施例2と同様の実験を行い、脳内感染の74日前、同18日前、同9日前、脳内感染時、および脳内感染から22日経過後のそれぞれのマウス群にHPMC(TC-5RW)75 mgを背部皮下に単回投与した。なお対照群としてHPMC非投与群を準備した。マウスは8週齢以上で、各群内で雄雌を各3匹(体重20~25g)使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0033】

〔結果〕

結果を図5に示す。

対照群であるHPMC非投与では潜伏期間が45.3 ± 1.9日であり、HPMC(TC-5RW)を脳内感染前74日に投与した群では潜伏期間が76.7 ± 9.7日、同18日に投与した群では80.8 ± 8.3日、同9日に投与した群では86.8 ± 6.2日

10

20

30

40

50

、脳内感染時の投与では 85.3 ± 8.9 日、脳内感染から 22 日経過後では 75.1 ± 7.8 日であり、対照群とは有意（いずれも $p < 0.01$ ）に潜伏期間の延長がみられた。特筆すべきデータとして、脳内感染 74 日前、同 18 日前、同 9 日前、脳内感染時のそれぞれの群の間ではプリオン病に対する治療予防効果に有意差が認められなかった。脳内感染以前（実施例 5 の実験では 2 ヶ月以上前であっても）の単回投与で、脳内感染時に投与した場合と同等のプリオン病に対する治療予防効果が見られたことより、HPMC（TC-5RW）は極めて優れた予防的効果を発揮することが明らかとなった。

【実施例 6】

【0034】

実施例 5 より、感染の 2.5 ヶ月前に HPMC（TC-5RW）を単回投与しても、発症を遅らせる効果があったため、その他各種セルロースエーテル類を含めてさらにそれより以前の単回投与の効果をインビボで検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC（TC-5RW）〕；実施例 1 に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC（60SH-50）〕；信越化学工業（株）製、「60SH-50」（商品名）（メトキシシル基含量 28.8%、ヒドロキシプロポキシシル基含量 8.9%、20 における 2 重量%水溶液の粘度 $50.4 \text{ mm}^2/\text{s}$ （HPMC（TC-5RW）の約 9 倍の分子量）、1 重量%水溶液の pH 6.3、）を使用した。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC（60SH-4K）〕；信越化学工業（株）製、「60SH-4000」（商品名）（メトキシシル基含量 29.4%、ヒドロキシプロポキシシル基含量 8.9%、20 における 2 重量%水溶液の粘度 $3860 \text{ mm}^2/\text{s}$ （HPMC（TC-5RW）の約 700 倍の分子量）、1 重量%水溶液の pH 6.7）を使用した。

〔評価方法〕

実施例 2 と同様の実験を行い、脳内感染の 6.5 ヶ月前にマウスに各種セルロースエーテル類 100 mg を背部皮下に単回投与した。なお対照群として HPMC 非投与群を準備した。マウスは 8 週齢以上で、各群内で雄雌を各 7 匹（体重 20 ~ 25 g）使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例 2 と同様に解析した。

【0035】

〔結果〕

結果を図 6 に示す。

対照である HPMC 非投与群では脳内感染から 67 日以内に全例が発症死亡したのに対して、脳内感染後 102 日を経過して HPMC（TC-5RW）投与群および HPMC（60SH-4K）投与群では約 4 割が生存しており、HPMC（60SH-50）投与群では 9 割以上が発症死亡を逃れている。対照群に比較してセルロースエーテル類投与群では有意（いずれも $p < 0.01$ ）な潜伏期間の延長がみられた。特に HPMC（60SH-50）投与は、HPMC（TC-5RW）投与や HPMC（60SH-4K）投与よりも有意（ $P < 0.01$ ）に発症遅延効果が高かった。以上の結果より HPMC、特に HPMC（60SH-50）は半年以上前の投与であっても極めて優れた予防効果を発揮することが明らかとなった。

【実施例 7】

【0036】

実施例 5 および実施例 6 より、感染前の単回投与でプリオン病に対する予防的効果がセルロースエーテル類に認められたため、感染前の複数回投与に加乗効果がみられるかどうかをインビボで検討した。

〔評価方法〕

実施例 2 と同様の実験を行い、脳内感染の 1 週間前、5 週間前、あるいは 1 週間前およ

10

20

30

40

50

び5週間前にHPMC(TC-5RW)の25mg/mL濃度のPBS溶液をマウス腹腔内に0.6mLあるいは1.2mL投与した。なお対照群として脳内感染1週間前に腹腔内にPBS1.2mLを投与した。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹(体重20~25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0037】

〔結果〕

結果を図7に示す。

脳内感染の1週間前と5週間前に2回投与を行っても、1週間前あるいは5週間前に2回分の投与量を1回投与したものと発症遅延効果に差がなく、複数回投与による加乗効果は見られなかった。このことは抗体を介する獲得免疫のような生体防御機構が作用機序に

10

【実施例8】

【0038】

各種セルロースエーテル類について、プリオン病に対する治療効果をインビボ(腹腔内投与)で比較検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5EW)〕；信越化学工業(株)製、「TC-5EW」(商品名)(メトキシル基含量28.9%、ヒドロキシプロポキシル基含量9.0%、20における2重量%水溶液の粘度 $2.9\text{mm}^2/\text{s}$ (TC-5RWの約2分の1の分子量)、1重量%水溶液のpH6.8)を用いた。

20

・メチルセルロース〔MC(SM-4)〕；信越化学工業(株)製、「SM-4」(商品名)(メトキシル基含量29.5%、20における2重量%水溶液の粘度 $3.93\text{mm}^2/\text{s}$ 、1重量%水溶液のpH6.9)を用いた。

・ヒドロキシプロピルセルロース〔HPC(L)〕；日本曹達(株)製、「HPC-SSL」(商品名)(ヒドロキシプロポキシル基含量62.4%、20における2重量%水溶液の粘度 $2.7\text{mm}^2/\text{s}$ 、1重量%水溶液のpH5.5)を用いた。

【0039】

〔評価方法〕

実施例2と同様の実験を行い、HPMC(TC-5RW)、HPMC(TC-5EW)、MC、HPC(L)のそれぞれを25mg/mL濃度のPBS溶液とし、脳内感染から5日経過後のマウス腹腔内に1mL単回投与した。なお対照群として同様に腹腔内にPBS1mLを単回投与した。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹(体重20~25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

30

【0040】

〔結果〕

結果を図8に示す。図中、〔TC-5EW〕、〔TC-5RW〕、〔SM-4〕、〔HPC(L)〕、〔PBS〕は、それぞれHPMC(TC-5EW)、HPMC(TC-5RW)、MC(SM-4)、HPC(L)、PBSを示している。

40

HPMC(TC-5RW)の潜伏期間が 75.4 ± 10.6 日、HPMC(TC-5EW)が 74.0 ± 5.0 日、MC(SM-4)が 79.3 ± 8.5 日で、これらの群間ではプリオン病に対する治療効果に有意差はみられなかった。一方、HPC(L)の潜伏期間は 56.3 ± 3.2 日であり、前の3つの群とは有意($p < 0.01$)に治療効果が低かった。しかし、HPC(L)群は、対照群であるPBSの潜伏期間 48.0 ± 3.5 日と比較して約8日程度の延長ではあるが、PBSとは有意($p < 0.01$)な差があった。

【0041】

なお、同一実験で検討していないが、HPMC(TC-5RW)では、投与量が同じ(

50

25 mg)であれば、腹腔内投与で潜伏期間が 75.4 ± 10.6 日(対照群では 48.0 ± 3.5 日)、皮下投与で潜伏期間が 72.4 ± 3.1 日(対照群では 46.0 ± 1.7 日、図4のデータ参照)と、同程度の治療効果が観察されている。また、HPMC(TC-5EW)とHPMC(TC-5RW)で治療効果に差がないことより、HPMCでは分子量が2分の1程度に小さくてもプリオン病に対する治療効果に影響しないことが判明した。さらに、メチルセルロースはHPMCと同程度の効果であり、ヒドロキシプロピルセルロースに比較して効果が高いことがわかった。

【実施例9】

【0042】

末梢静脈内投与でのプリオン病に対する治療効果について検討した。

10

〔評価方法〕

実施例8と同様にして実験を行った。ただし、HPMC(TC-5RW)の25 mg/mL PBS溶液を、脳内感染の6時間前に尾静脈内に300 µL単回投与した。対照群は、同様に尾静脈内にPBSを300 µL単回投与した。マウスは、8週齢以上の雄各6匹(体重約25 g)を一群として、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。

【0043】

〔結果〕

結果を図9に示す。対照群の潜伏期間 49.8 ± 2.6 日に対し、HPMC投与群では 64.2 ± 4.5 日であり、HPMC投与群で有意な($P < 0.01$)発症遅延効果を示した。この結果は、末梢静脈内への単回投与でもHPMCが有効であることを示している。

20

【実施例10】

【0044】

プリオンが標的とする主要な臓器である脳に、HPMCの直接投与を行い、その治療効果を検討した。

〔評価方法〕

実施例8と同様にして実験を行った。ただし、4週間連続注入が可能なアルゼット(Alzet)浸透圧ポンプ〔デュレクト社(DURECT Corporation)製、「Model 2004」(型番)]を用い、ポンプをカニューレに接続し、カニューレの先端をマウス的大脑の第3脳室に挿入してマウス脳室内に4週間連続的に注入した。浸透圧ポンプをマウス背部皮下に留置し、ここでは、HPMC(TC-5RW)の0.25 mg/mL、2.5 mg/mL、25 mg/mL濃度の各PBS溶液、およびPBSのみ(対照群)をそれぞれ充填したポンプから、脳内感染から8日経過したマウスの脳室内に送り込み、HPMC(TC-5RW)を1日あたり1.5 µg、15 µg、150 µg、および0 µg(対照群)投与した。マウスは8週齢以上の雄各6匹(体重約25 g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

30

【0045】

〔結果〕

結果を図10に示す。

40

対照群の潜伏期間が 54.0 ± 5.7 日に対し、HPMC投与群では、1.5 µg/日の投与で 68.6 ± 9.7 日、15 µg/日の投与で 80.8 ± 4.4 日、150 µg/日の投与で 128.8 ± 17.0 日となり、有意(それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$)な治療効果を示し、かつ投与濃度依存的に効果が増大した。検討した限りの投与濃度では、マウスに障害を起こさず効果の飽和状態は観察されなかったが、150 µg/日投与群の治療効果は、HPMC皮下投与で得られた効果の飽和状態〔図4における100 mg(潜伏期間： 93.0 ± 12.5 日)、200 mg(潜伏期間： 110.7 ± 30.9 日)に近いと考えられる。

【実施例11】

【0046】

50

実施例10の結果を踏まえ、脳室内投与においてHPMC(TC-5RW)と他のHPMCとの比較や、これまでに顕著な治療効果が報告されているペントサンポリサルフェート(PPS)との比較を行った。

〔評価に用いたセルロースエーテル類および比較の薬剤〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロースHPMC(60SH-400)；信越化学工業(株)製、「60SH-400」(商品名)(メトキシル基含量29.1重量%、ヒドロキシプロピルメチル基含量9.0重量%、20における2重量%水溶液の粘度450mm²/s(TC-5RWの約80倍の分子量)、1重量%水溶液のpH6.8)を使用した。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロースHPMC(HPMC602)；信越化学工業(株)製、「HPMC602」(商品名)(メトキシル基含量29.1%、ヒドロキシプロピルメチル基含量9%、20における2重量%水溶液の粘度1.68mm²/s(TC-5RWの約3.5分の1の分子量)、1重量%水溶液のpH6.8)を使用した。

・ペントサンポリサルフェート(PPS)；ペントサンポリサルフェートナトリウム〔オーストラリア・バイオフาร์ม社(Biopharm Australia Pty Ltd.)製、「Cartrophen Vet」(商品名)〕を使用した。

〔評価方法〕

実施例10と同様にして実験を行った。用いたHPMCはHPMC類は、PBS液で25mg/mL濃度に調製し、PPSは、PPSナトリウム注射液から乾固してアルコール性防腐剤を除いた後にPBS液で1.25mg/mL濃度に溶解し、それぞれポンプに充填した。0.1%(W/V)濃度の263K脳ホモジネートの20μLをマウスの脳内に接種した後、3日目より試料溶液を脳室内への投与を開始した。マウスは8週齢以上の雄各7匹(体重約25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0047】

〔結果〕

結果を図11に示す。

対照群の潜伏期間が62.0±3.2日、PPS投与群の潜伏期間は109.0±7.2日であった。それに対してHPMC(HPMC602)投与群が138.3±6.5日、HPMC(60SH-400)投与群およびHPMC(TC-5RW)投与群がそれ以上の潜伏期間を示し、224日を経過しても各々14%、20%が発症死亡を逃れており、HPMC類はPPSよりも有意(それぞれp<0.01)に有効である。用いたPPSの製品、調製の仕方は報告例〔Katsumi Doh-ura, et al., Journal of Virology, 2004年、78巻、4999-5006頁〕と全く同じであり、最も治療効果が発揮されたと報告のある濃度にほぼ近い濃度を用いて比較検討した結果であり、HPMCが極めて安全で優れた治療効果を発揮することを示している。

【実施例12】

【0048】

これまでの実施例でセルロースエーテル類が皮下、腹腔、静脈内、脳室内のいずれの投与経路でもプリオン病に対する治療効果を発揮することが明らかになっている。そこで、複数の投与経路から同時に投与した際の治療効果について検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・メチルセルロース〔MC(SM-4)〕；実施例8に記載。

〔評価方法〕

皮下投与は実施例2と同様に、脳室内投与は実施例8と同様にして実験を行った。ただし、1%(W/V)濃度の263K脳ホモジネートの20μLをマウスの脳内に接種した後に、MC(SM-4)の50mg/mL水溶液を0.5mLまたは1.0mL腹腔内投

10

20

30

40

50

与、あるいは25mgまたは50mgを皮下投与した。重複投与群には、0.5mLの腹腔内投与と25mgの皮下投与を行った。対照群には蒸留水0.5mLの腹腔内投与とオブラートのみの皮下投与を行った。マウスは8週齢以上の雄各4匹(体重約25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0049】

〔結果〕

結果を図12に示す。図中の〔ip〕は腹腔内投与、〔sc〕は皮下投与を示している。25mg腹腔内投与群、50mg腹腔内投与群、25mg皮下投与群、50mg皮下投与群のそれぞれの潜伏期間は77.5±5.8日、83.0±3.9日、82.4±3.1日、89.0±3.2日であるのに対して、25mg腹腔内投与+25mg皮下投与の重複投与群の潜伏期間は129.0±22.6日であった。このことは、異なる投与経路からの重複投与がプリオン病に対する治療効果を顕著に高めることを示している。

10

【実施例13】

【0050】

実施例12の異なる投与経路からの重複投与による治療効果を、さらに皮下投与と脳室内投与の組み合わせで検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

20

〔評価方法〕

皮下投与は実施例2と同様に、脳室内投与は実施例10と同様に行った。0.1%(W/V)濃度の263K脳ホモジネートの20μLをマウスの脳内に接種した後、3日目にHPMC(TC-5RW)50mgを皮下投与あるいはHPMC(TC-5RW)25mg/mL濃度のPBS溶解液をポンプに充填して脳室内投与を開始した。重複投与群には、50mgを皮下投与し、同時に25mg/mL濃度液をポンプに充填して脳室内投与を行った。対照群にはオブラートのみの皮下投与またはPBS液のみをポンプに充填して脳室内投与を行った。マウスは8週齢以上の雄各7匹(体重約25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

30

【0051】

〔結果〕

結果を図13に示す。図中の〔icv〕は脳室内投与、〔sc〕は皮下投与を示している。

50mg皮下投与群の潜伏期間は111.5±14.1日であった。25mg/mL脳室内投与群や25mg/mL脳室内投与+50mg皮下投与の重複投与群では脳内感染後224日を経過しても各々14%、71%のマウスが発症死亡を逃れている。従って、皮下と脳室内への重複投与が皮下あるいは脳室内への単一経路投与よりも明らかに発症遅延効果に優れており、皮下投与と脳室内投与の組み合わせでも重複投与が治療効果を顕著に高めることが確認された。

40

【実施例14】

【0052】

プリオン病の中でも動物のウシ海綿状脳症(BSE)、スクレイピー、シカ慢性消耗性疾患や、ヒトの変異型クロイツフェルト・ヤコブ病などは末梢、特に経口、からプリオン汚染物を摂取する事により感染することが知られている。そこで、末梢からのプリオン感染に対してセルロースエーテル類の治療予防効果を検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

〔評価方法〕

50

実施例 2 と同様に T g 7 マウスと 2 6 3 K 株プリオンを用い、プリオンを腹腔内接種して末梢感染させた。生理食塩水を用い 1 % (W / V) 濃度とした 2 6 3 K 脳ホモジネートを調製し、この 1 0 0 μ L をマウスの腹腔内に接種してプリオン感染させた。なお、試験は腹腔内感染直前にマウスの背部皮下に H P M C (T C - 5 R W) 1 0 0 m g を投与しておき、対照群は H P M C 非投与群 (オブラートのみ) とした。マウスは 8 週齢以上の雄雌各 3 匹 (体重 2 0 ~ 2 5 g) を一群として使用し、腹腔内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。

【 0 0 5 3 】

〔 結果 〕

結果を図 1 4 に示す。

H P M C 非投与群 (対照群) の潜伏期間が 93.0 ± 7.4 日であったのに対し、H P M C 投与群では 6 1 0 日を過ぎてもプリオン病の発病が全く観察されなかった。H P M C は、プリオンの標的臓器である脳に直接感染した際にも、末梢からの投与 (皮下投与や末梢血管内投与や腹腔内投与) で優れた発症遅延効果を発揮したが、プリオンの末梢感染においてはその効果がより一層顕著であった。

【 実施例 1 5 】

【 0 0 5 4 】

動物種を変えて、シリアンハムスターに対してセルロースエーテル類のプリオン病に対する治療効果を検討した。

〔 評価方法 〕

スクレイピープリオン株である 2 6 3 K は、ハムスターでも感染によりプリオン病を起こす。5 ~ 6 週齢の雌のシリアンハムスター (3 匹 / 群) (日本エスエルシーより入手、体重 9 0 g 前後 / 匹) の脳内に、生理食塩水で 1 % (W / V) 濃度とした 2 6 3 K 脳ホモジネート 4 0 μ L を接種してプリオン感染させた。脳内感染させて 8 日経過後、シリアンハムスターの背部皮下に H P M C (T C - 5 R W) を 1 5 0 m g 、 3 0 0 m g 、 4 5 0 m g 、 6 0 0 m g のそれぞれを投与した。また、脳内感染させて 8 日経過後、1 6 日経過後、5 6 日経過後 (発病による明らかな神経症状 (失調症状) の出現が既に見られる時期) にシリアンハムスターの背部皮下に H P M C (T C - 5 R W) を 3 0 0 m g 投与した (投与方法は実施例 2 の場合と同様オブラートに包み皮下に埋入) 。対照群としては H P M C 非投与群 (オブラートのみ) を準備した。脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定し、得られたデータを実施例 2 と同様に解析した。

【 0 0 5 5 】

〔 結果 〕

投与量に関する検討結果を図 1 5 に、投与時期に関する検討結果を図 1 6 に示す。

投与量との関係を見ると、H P M C 非投与群 (対照群) の潜伏期間が 80.0 ± 2.1 日であるのに対し、H P M C 投与群では 1 5 0 m g 投与の群で潜伏期間が 132.0 ± 5.6 日、3 0 0 m g 投与の群で 155.0 ± 12.7 日、4 5 0 m g 投与の群で 154.5 ± 2.1 日、6 0 0 m g 投与の群で 157.5 ± 2.1 日でありいずれも顕著な潜伏期間の延長がみられた (いずれも $p < 0.01$) 。3 0 0 m g 以上では効果は飽和しており、1 5 0 m g の効果は 3 0 0 m g の効果よりも少し劣っていた ($p < 0.01$) 。

投与時期との関係を見ると、H P M C 非投与群 (対照群) の潜伏期間が 80.0 ± 2.1 日に対して、H P M C 投与群では、脳内感染 8 日経過後投与で潜伏期間が 155.0 ± 12.7 日、1 6 日経過後投与で 123.2 ± 4.3 日、5 6 日経過後投与で 85.0 ± 0.3 日となり、感染後の投与時期が早いほど潜伏期間が長くなった (いずれも $p < 0.01$) 。発病後 (脳内感染後 5 6 日目) の単回投与においても程度は小さいものの明らかな生命予後改善効果が観察されたことは特筆すべきことである。

以上の結果は、マウス以外の動物種でもセルロースエーテル類によるプリオン病に対する治療予防効果がみられることを示している。

【 実施例 1 6 】

【 0 0 5 6 】

マウスで継代されているスクレイピーのプリオン株であるRML株に対してのセルロースエーテル類のプリオン病に対する治療効果をインビボ (*in vivo*) で検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (TC-5RW)〕；実施例1に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (TC-5EW)〕；実施例8に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (60SH-50)〕；実施例6に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (60SH-4K)〕；実施例6に記載。

・メチルセルロース〔MC (SM-4)〕；実施例8に記載。

・ヒドロキシプロピルセルロース (HPC L) ；実施例8に記載。

・カルメロースカルシウム (カルボキシメチルセルロースカルシウム)〔CMC (ECG-505)〕；五徳薬品 (株) 製、「ECG-505」 (商品名) を使用した。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート〔HPMCAS (AS-MG)〕；信越化学工業 (株) 製、信越AQOAT「AS-MG」 (商品名) (メトキシシル基含量23.3%、ヒドロキシプロポキシシル基含量7.3%、アセチル基含量8.8%、サクシノイル基含量10.9%、20における2重量%水溶液の粘度 $2.74 \text{ mm}^2 / \text{ s}$) を使用した。

【0057】

〔評価方法〕

生理食塩水で1% (W/V) 濃度とした脳ホモジネートを調製した。このホモジネート $20 \mu\text{L}$ を、C57BL/6マウス (日本エスエルシーより入手) の脳内にRML株を接種してプリオンに感染させた後、HPMC (TC-5EW)、HPMC (TC-5RW)、HPMC (60SH-50)、HPMC (60SH-4K)、MC (SM-4)、HPC L、CMC (ECG-505)、HPMCAS (AS-MG) のそれぞれ 100 mg を、脳内感染直前にマウス背部皮下に単回投与した (投与方法は実施例2の場合と同様オブラートに包み皮下に埋入)。なお対照群として化合物非投与群 (オブラートのみ) を準備した。マウスは8週齢以上の雌5匹 (体重約 20 g / 匹) を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0058】

〔結果〕

結果を図17に示す。図中、[TC-5EW]、[TC-5RW]、[60SH-50]、[60SH-4K]、[SM-4]、[HPC]、[ECG-505]、[AS-MG]は、それぞれHPMC (TC-5EW)、HPMC (TC-5RW)、HPMC (60SH-50)、HPMC (60SH-4K)、MC (SM-4)、HPC L、CMC (ECG-505)、HPMCAS (AS-MG) を示している。

対照群の潜伏期間が 149.3 ± 8.5 日であるのに対し、ここに用いたセルロースエーテル類では、HPMC (TC-5EW) が 174.3 ± 5.9 日、HPMC (TC-5RW) が 202.5 ± 13.4 日、HPMC (60SH-50) が 189.6 ± 4.2 日、HPMC (60SH-4K) が 191.0 ± 9.9 日、MC (SM-4) が 175.7 ± 9.8 日、HPC Lが 181.0 ± 4.2 日、CMC (ECG-505) が 167.5 ± 3.5 日、HPMCAS (AS-MG) が 164 ± 0 日となり、潜伏期間が長くなりプリオン病に対する治療効果を示した (いずれも $p < 0.01$)。ただし、HPMCAS (AS-MG) では、3匹が 100 mg の投与量に耐えられずに投与2日以内に死亡した。

【0059】

HPMC間の比較では、HPMC (TC-5RW)、HPMC (60SH-50)、HPMC (60SH-4K)の間では治療効果に有意差はみられなかったが、これらに比べてHPMC (TC-5EW) はやや効果が低かった ($p < 0.01$)。MC (SM-4)

10

20

30

40

50

とHPCLは、HPMC(TC-5EW)と同程度で有意差はなかった。CMC(ECG-505)とHPMCAS(AS-MG)は、やや効果が劣る傾向にありHPCLとの間に有意差($p < 0.01$)が見られたが、対照群よりも18日あるいは15日の潜伏期間延長があり有意な($p < 0.01$)効果を示した。

この実験系では、HPMC(TC-5RW)の分子量が2分の1程度〔HPMC(TC-5EW)〕になると効果が落ちることが示された。また、メチルセルロースがHPCLと同程度の効果を持ち、HPMC(TC-5RW)より効果が劣る点は263Kプリオン株を用いた結果とは異なる点であった。

【実施例17】

【0060】

マウスで継代されているヒトのプリオン病のプリオン株である福岡1株について調べた。

〔評価方法〕

生理食塩水で1%(W/V)濃度とした福岡1株脳ホモジネート20 μ Lを脳内に接種してプリオンに感染させたC57BL/6マウスにて、実施例16と同様にして実験を行った。

【0061】

〔結果〕

結果を図18に示す。

HPCL群の潜伏期間 183.0 ± 5.7 日とCMC(ECG-505)群の潜伏期間 169.0 ± 3.6 日は、対照群の潜伏期間 171.3 ± 10.7 日と有意差がなかったが、他のセルロースエーテル類では、HPMC(TC-5EW)群の潜伏期間が 204.3 ± 22.5 日、HPMC(TC-5RW)群が 218.0 ± 8.4 日、HPMC(60SH-50)群が 235.5 ± 7.8 日、HPMC(60SH-4K)群が 220.5 ± 14.1 日、MC(SM-4)群が 191.7 ± 11.0 日、HPMCAS(AS-MG)群が 200 ± 0 日であり有意な治療効果を示した(HPMC(TC-5EW)、MC(SM-4)は $p < 0.05$ 、それ以外は $p < 0.01$)。ただし、HPMCAS(AS-MG)では、3匹が100mgの投与量に耐えられずに投与2日以内に死亡した。

【0062】

HPMC(60SH-50)が最も治療効果が高く、HPMC(60SH-4K)も同程度であった。また、HPMC(TC-5RW)($p < 0.01$)やHPMC(TC-5EW)($p < 0.05$)は、HPMC(60SH-50)よりもやや効果が劣った。MC(SM-4)とHPMCAS(AS-MG)では有意差はなく、これらはHPMCよりも効果は低かった(HPMC(TC-5RW)、HPMC(60SH-50)、HPMC(60SH-4K)とは $p < 0.01$ 、HPMC(TC-5EW)とは有意差がなかった)。

以上の結果は、RMLプリオンと同様に福岡1株プリオンに対しても、HPMCが最も有効なセルロースエーテル類であることを示している。

【実施例18】

【0063】

マウスで継代されている別のスクレイピーのプリオン株である22L株に対してのセルロースエーテル類のプリオン病に対する治療効果を検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

〔評価方法〕

生理食塩水で1%(W/V)濃度とした22L株脳ホモジネート20 μ Lを脳内に接種してプリオンに感染させたC57BL/6マウスにて、実施例16と同様にして行った。

【0064】

〔結果〕

10

20

30

40

50

結果を図 19 に示す。

対照群の潜伏期間 150.3 ± 6.2 日に対して、HPMC (TC-5RW) 投与群の潜伏期間は 220.3 ± 15.1 日であり有意な治療効果を示した ($p < 0.01$)。以上の実施例より、セルロースエーテル類は特定のプリオン株に限定されることなく広い範囲のプリオン株に対して効果を示すことが明らかとなった。

【実施例 19】

【0065】

セルロースエーテル類におけるメトキシル基とヒドロキシプロポキシル基の含量、およびセルロースエーテル類分子量について、プリオン病に対する治療効果に及ぼす影響を検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (60SH-4K)〕；実施例 6 に記載。(メトキシル基含量 29.4%、ヒドロキシプロポキシル基含量 8.9%、20 における 2 重量%水溶液の粘度 $3860 \text{ mm}^2/\text{s}$ 、1 重量%水溶液の pH 6.7。)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (90SH-4K)〕；信越化学工業(株)製、「90SH-4000」(商品名)(メトキシル基含量 23.1%、ヒドロキシプロポキシル基含量 9.3%、20 における 2 重量%水溶液の粘度 $4450 \text{ mm}^2/\text{s}$ (60SH-4K と同程度の分子量)、1 重量%水溶液の pH 6.8)を用いた。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (HPMC602)〕；実施例 11 に記載。(メトキシル基含量 29.1%、ヒドロキシプロポキシル基含量 9%、20 における 2 重量%水溶液の粘度 $1.68 \text{ mm}^2/\text{s}$ 、1 重量%水溶液の pH 6.8。)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (HPMC902)〕；信越化学工業(株)製、「HPMC902」(商品名)(メトキシル基含量 22.6%、ヒドロキシプロポキシル基含量 6.7%、20 における 2 重量%水溶液の粘度 $1.87 \text{ mm}^2/\text{s}$ (HPMC602 と同程度の分子量)、1 重量%水溶液の pH 6.8)を用いた。

〔評価方法〕

1% (W/V) 濃度の 263K 株脳ホモジネート $20 \mu\text{L}$ を脳内に接種してプリオンに感染させた Tg7 マウスにて、感染の 3 日前に各セルロースエーテル類 50 mg を皮下に投与した。マウスは 8 週齢以上の雄雌各 3 匹(体重約 25 g) を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例 2 と同様に解析した。

【0066】

〔結果〕

結果を図 20 に示す。

ここでは、水溶液粘度が相対的に高い(高分子量)グループ〔HPMC (60SH-4K) と HPMC (90SH-4K)〕と、水溶液粘度が相対的に低い(低分子量)グループ〔HPMC (HPMC602) と HPMC (HPMC902)〕について、プリオン病に対する治療効果を比較した。水溶液粘度の高いグループでは、HPMC (60SH-4K) 投与群の潜伏期間 99.2 ± 11.5 日に対し HPMC (90SH-4K) 投与群の潜伏期間 99.7 ± 9.5 日であり、それぞれメトキシル基とヒドロキシプロポキシル基含量の相違があってもこの範囲では効果に有意差が見られなかった。水溶液粘度の低いグループにおいては、HPMC (HPMC602) 投与群の潜伏期間 59.8 ± 1.6 日と HPMC (HPMC902) 投与群の潜伏期間 63.3 ± 8.1 日で、それぞれのメトキシル基とヒドロキシプロポキシル基含量の範囲では治療効果に有意差が見られなかった。一方、水溶液粘度の高いグループと低いグループでは、潜伏期間に有意差が見られ、効果に差が認められ、プリオン病に対する治療効果に対してはセルロースエーテル類の分子量がむしろ大きく影響していることがわかる。

【実施例 20】

【0067】

実施例 19 の結果に基づき、セルロースエーテル類の分子量がプリオン病に対する治療

10

20

30

40

50

効果に及ぼす影響についてさらに詳細に検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

ここでは、粘度の異なる各種HPMCを用いた。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(HPMC602)〕；実施例11に記載。(メトキシル基含量29.1%、ヒドロキシプロポキシル基含量9%、20における2重量%水溶液の粘度1.68mm²/s)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5EW)〕；実施例8に記載。(メトキシル基含量28.9%、ヒドロキシプロポキシル基含量9.0%、20における2重量%水溶液の粘度2.9mm²/s)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

(メトキシル基含量29.2重量%、ヒドロキシプロポキシル基含量8.9重量%、20における2重量%水溶液の粘度5.81mm²/s)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(60SH-50)〕；実施例6に記載。

(メトキシル基含量28.8%、ヒドロキシプロポキシル基含量8.9%、20における2重量%水溶液の粘度50.4mm²/s)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(HPMC1657)〕；信越化学工業(株)製、「HPMC1657」(商品名)を用いた。(メトキシル基含量32.2%、ヒドロキシプロポキシル基含量8.5%、20における2重量%水溶液の粘度210mm²/s)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(60SH-4K)〕；実施例6に記載。

(メトキシル基含量29.4%、ヒドロキシプロポキシル基含量8.9%、20における2重量%水溶液の粘度3860mm²/s)

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(60SH-10K)〕；信越化学工業(株)製、「60SH-10000」(商品名)を用いた。(メトキシル基含量29.3%、ヒドロキシプロポキシル基含量9%、20における2重量%水溶液の粘度9730mm²/s)

〔評価方法〕

1%(W/V)濃度の263K株脳ホモジネート20μLを脳内に接種してプリオンに感染させたTg7マウスにて、感染の3日前に各セルロースエーテル類50mgを皮下に投与した。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹(体重約25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0068】

〔結果〕

結果を図21に示す。

セルロースエーテル類の粘度と治療効果の関係はベル型の曲線になり、粘度が増すに従って治療効果が上昇し、100mm²/s付近で最大の効果となり、さらに粘度が増すと逆に治療効果の減少が観察された。試料であるセルロースエーテル類の供給会社の情報に依れば、20における2重量%水溶液の粘度100mm²/sは、分子サイズ(分子量)はおおよそ90kDaである。

【実施例21】

【0069】

実施例20の結果を踏まえ、低分子量である6糖セルロースエーテル類についてその治療効果を調べた。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・メチルヘキサオース(M-6C)；生化学工業(株)製、6糖セルロースエーテル「セロヘキサオース」(カタログ番号、400406)を用い、これにメチル基を付加させ

10

20

30

40

50

てメチル化6糖セルロースエーテル(メトキシル基含量30%)とした。

・ヒドロキシプロピルメチルヘキサオース(HPM-6C);生化学工業(株)製、6糖セルロースエーテル「セロヘキサオース」(カタログ番号、400406)を用い、これにヒドロキシプロピル基とメチル基を付加させてヒドロキシプロピルメチル化6糖セルロースエーテル(メトキシル基含量30%、ヒドロキシプロピルメチル基含量13%)とした。

〔評価方法〕

実施例10と同様にして脳室内投与によりプリオン病に対する治療効果判定実験を行った。

各6糖セルロースエーテル類をPBS液で25mg/mL濃度に調製しポンプに充填してマウスの第3脳室内に投与を行った。対照群はPBS液のみをポンプに充填して同様に脳室内投与を行った。なお、0.1%(W/V)濃度の263K脳ホモジネートの20μLをTg7マウスの脳内に接種した後、2日目より脳室内への投与を開始した。マウスは8週齢以上の雄各8匹(体重約25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0070】

〔結果〕

結果を図22に示す。

対照群、M-6C投与群、HPM-6C投与群の潜伏期間は、それぞれ58.2±1.3日、76.5±3.5日、83.4±4.7日であった。HPM-6C群は、M-6C群及び対照群より有意に(各々p<0.05およびp<0.01)治療効果が見られた。また、M-6C群は対照群より有意に(p<0.01)治療効果が見られた。この結果は、セルロースエーテル類の分子サイズとしては6糖でプリオン病に対して治療効果を発揮できることを示している。

【実施例22】

【0071】

HPMCを末梢に投与した場合には、徐々に吸収され持続的なプリオン形成抑制効果を発現しているものと考えられることより、HPMCを低分子化することで投与部位から血管内への移行や血管内から各組織への移行の効率を上げて治療効果を高めることができる可能性がある。そこで、加水分解によりHPMCの低分子化を行い、HPMCの治療効果への影響をインビボで検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・加水分解HPMC:ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕(実施例1に記載)を使用し、この25mg/mL水溶液に、HPMC(TC-5RW)に対して塩酸0.3重量%、4重量%、40重量%をそれぞれ加え、攪拌しながら90で6時間反応させた。重炭酸ソーダで中和した後に80以上に加熱して析出したHPMCを3MM濾紙〔ワットマン社(Whatman)製〕で濾過して回収した。濾紙上のHPMCを80以上に加熱した滅菌水で3回洗浄した後に凍結乾燥した。

〔評価方法〕

実施例2と同様に、脳内感染から10日経過後に、加水分解HPMC15mgを皮下に単回投与した。比較のため加水分解を行っていないHPMC(TC-5RW)15mg投与群、および化合物非投与群(オブラートのみ)を準備した。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹(体重20~25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0072】

〔結果〕

結果を図23に示す。加水分解していないHPMC(TC-5RW)投与群での潜伏期間が56.7±4.0日に対し、0.3%塩酸による加水分解HPMC投与群の潜伏期間が70.0±2.6日で有意(p<0.01)に治療効果が向上したが、4%塩酸による場合には60.3±3.4日、40%塩酸による場合には52.3±0.6日であり、有

意差は見られなかった。0.3%塩酸での加水分解物が最も効果が高く、塩酸濃度が高くなるに従って効果は明らかに低下した(いずれも $p < 0.01$)が、非投与群(対照)の潜伏期間 47.0 ± 1.6 日と比べると治療効果は明らかに見られた(いずれも $p < 0.01$)。この結果は、加水分解による低分子化がプリオン病に対する治療効果を高めることを示唆しているが、過度に加水分解すると、逆に抗プリオン活性を発揮する構造が損なわれる可能性があることを示唆している。

【実施例23】

【0073】

これまでの実施例で用いたセルロースエーテル類と近似する化合物について、同様なプリオン病に対する治療効果があるかどうかについて検討した。

〔評価に用いた化合物〕

・2糖類；D(+)-セロピオース〔ナカライテスク(株)製、カタログ番号07511-42〕、ラクトース-水和物〔ナカライテスク(株)製、カタログ番号20014-52〕、マルトース-水和物〔ナカライテスク(株)製、カタログ番号21117-82〕、シュクロース〔和光純薬工業(株)製、カタログ番号198-13525〕、D(+)-トレハロース二水和物〔和光純薬工業(株)製、カタログ番号203-02252〕、メチルセロピオース〔焼津水産工業(株)製〕をそれぞれ使用した。

・6糖類；セロヘキサオース〔生化学工業(株)製、カタログ番号400406〕、イソマルトヘキサオース〔生化学工業(株)製、カタログ番号400481〕、マルトヘキサオース〔生化学工業(株)製、カタログ番号400516〕、ラミナリヘキサオース〔生化学工業(株)製、カタログ番号400493〕、ヘキサ-N-アセチルキトヘキサオース〔生化学工業(株)製、カタログ番号400427〕、キトサンヘキサマー〔生化学工業(株)製、カタログ番号400436〕をそれぞれ使用した。

・シクロデキストリン類；アルファシクロデキストリン〔純正化学(株)製、カタログ番号33730-0410〕、ベータシクロデキストリン〔純正化学(株)製、カタログ番号33735-0410〕、ガンマーシクロデキストリン〔純正化学(株)製、カタログ番号33740-0410〕、モノアセチルベータシクロデキストリン〔純正化学(株)製、カタログ番号77016-1610〕、ヘプタキス(2,3,6-トリ-O-ベンゾイル)ベータシクロデキストリン〔SIGMA社製、カタログ番号T3196〕、ヘプタキス(2,3,6-トリ-O-アセチル)ベータシクロデキストリン〔SIGMA社製、カタログ番号T3446〕をそれぞれ使用した。

・メチル基あるいはヒドロキシプロピル基を有するシクロデキストリン類；メチルベータシクロデキストリン〔ALDRICH社製(カタログ番号332615)〕、2-ヒドロキシプロピルアルファシクロデキストリン〔ALDRICH社製、カタログ番号390690〕、2-ヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン〔ALDRICH社製、カタログ番号389145、置換度1.0モル〕、2-ヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン〔ALDRICH社製、カタログ番号332607、置換度0.8モル〕、2-ヒドロキシプロピルベータシクロデキストリン〔ALDRICH社製、カタログ番号332593、置換度0.6モル〕、2-ヒドロキシプロピルガンマーシクロデキストリン〔SIGMA社製、カタログ番号H125〕、ヘプタキス(2,3,6-トリ-O-メチル)ベータシクロデキストリン〔SIGMA社製(カタログ番号H4645)〕、ヘプタキス(2,6-ジ-O-メチル)ベータシクロデキストリン〔SIGMA社製(カタログ番号H0513)〕をそれぞれ使用した。

・キチンあるいはキトサン；キトサン-10〔和光純薬工業(株)、カタログ番号039-16122〕、キトサン-100〔和光純薬工業(株)、カタログ番号032-16092〕、キトサン-1000〔和光純薬工業(株)、カタログ番号039-14422〕、キチン〔和光純薬工業(株)、カタログ番号034-13632〕をそれぞれ使用した。

・セルロース；セルロース〔SIGMA社製、カタログ番号S3504〕を使用した。

・ヒドロキシプロピル基を有するキチンあるいはキトサン；ヒドロキシプロピルキトサ

10

20

30

40

50

ン - 100〔焼津水産工業(株)製〕、ヒドロキシプロピルキチン〔焼津水産工業(株)製〕をそれぞれ使用した。

・メチル基およびヒドロキシプロピル基を有する長鎖アルキル基含有セルロース類；長鎖アルキル基含有ヒドロキシプロピルメチルセルロース(SG-60M)〔大同化成工業(株)製、「サンジェロース-60M」(商品名)〕、長鎖アルキル基含有ヒドロキシプロピルメチルセルロース(SG-60L)〔大同化成工業(株)製、「サンジェロース-60L」(商品名)〕をそれぞれ使用した。

・メチル基を有するセルロース類；実施例8に記載メチルセルロース(MC(SM-4))を使用した。

・ヒドロキシプロピル基を有するセルロース；不溶性低置換度ヒドロキシプロピルセルロース(L-HPC)〔信越化学工業(株)製、「L-HPC(LH-31)」(商品名)、ヒドロキシプロポキシル基含量11%〕を使用した。

・カルボキシル基およびメチル基を有するセルロース類；カルボキシメチルセルロース(CMC)〔SIGMA社製、カタログ番号C5678〕、カルボキシメチルセルロース(CMC(NS300))〔五徳薬品(株)製、「NS-300」(商品名)〕、カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)〔五徳薬品(株)製、「T.P.T」(商品名)〕をそれぞれ使用した。

・メチル基およびヒドロキシエチル基を有するセルロース類；ヒドロキシエチルメチルセルロース(MHEC)〔ALDRICH社製、カタログ番号435015〕を使用した。

・ヒドロキシエチル基を有するセルロース類；ヒドロキシエチルセルロース(HEC)〔FLUKA社製、カタログ番号54290〕、ヒドロキシエチルスターチ〔SIGMA社製、カタログ番号H6382〕、ヒドロキシエチルスターチ70000含有輸液剤〔杏林製薬(株)製、「ヘスパンダー」(商品名)〕をそれぞれ使用した。

・免疫賦活作用を有する医薬多糖類；レンチナン(商品名)〔味の素(株)製〕、ピシバニール(商品名)〔中外製薬(株)製〕、ベスタチン(商品名)〔日本化薬(株)製〕、ソニフィラン(商品名)〔科研製薬(株)製〕をそれぞれ使用した。

〔評価方法〕

1%(W/V)濃度の263K株脳ホモジネート20 μ Lを脳内に接種してプリオンに感染させたTg7マウスにて、感染後5日以内に各化合物を100mg以下で毒性が出ない量を皮下あるいは腹腔内に投与した。皮下投与の際には粉末を、腹腔内投与の際には水溶液の形で投与した。マウスは8週齢以上の雄雌各3匹以上(体重約25g)を一群として使用し、脳内感染から死亡するまでの潜伏期間を測定した。得られたデータを実施例2と同様に解析した。

【0074】

〔結果〕

脳内感染4日目に各化合物50mgをマウス背部皮下に投与した代表的な結果を図24に示す。図中のHPMC(AS-MG)群およびHPMC(TC-5RW)群は陽性対照として、オブラートのみを投与した群を陰性対照として載せている。ヒドロキシプロピルメチルセルロース修飾体である長鎖アルキル基を有するHPMC(SG-60M, SG-60L)やヒドロキシエチルメチルセルロース(MHEC)は有効であるが、カルボキシメチルセルロース類(CMC-Na, CMC(NS300)、CMC)やヒドロキシエチルセルロース(HEC)、不溶性の低置換度ヒドロキシプロピルセルロース(L-HPC)は無効であった。

各種化合物を263Kプリオン脳内感染マウスにおける皮下投与あるいは腹腔内投与による方法にて検定し、プリオン病に対する治療効果を×；無効、；有効、；極めて有効の3段階で評価し、結果を表1にまとめた。

【0075】

【表 1】

化合物群	プリオン病に対する治療効果
2糖類	×
6糖類	×
シクロデキストリン類	×
メチル基あるいはヒドロキシプロピル基を有するシクロデキストリン類	×
キチンあるいはキトサン	×
ヒドロキシプロピル基を有するキチンあるいはキトサン	×
デンプン	×
ヒドロキシエチル基を有するデンプン	×
セルロース類	×
メチル基およびヒドロキシプロピル基を有する長鎖アルキル基セルロース類	◎
メチル基を有するセルロース類	◎
ヒドロキシプロピル基を有するセルロース類	○
カルボキシル基およびメチル基を有するセルロース類	×
メチル基およびヒドロキシエチル基を有するセルロース類	◎
ヒドロキシエチル基を有するセルロース類	×
免疫賦活作用を有する医薬多糖類	×

10

20

【0076】

プリオン病に対する治療効果を発揮するのはメチル基を有するセルロース、メチル基およびヒドロキシプロピル基を有するセルロース、メチル基およびヒドロキシエチル基を有するセルロース、ヒドロキシプロピル基を有するセルロースである。

【実施例 24】

【0077】

これまでの実施例で、セルロースエーテル類がプリオン病感染個体で治療効果を発揮して発症予防や発症遅延をもたらすことを明らかにしてきた。そこで、治療効果がプリオン病の病変の主座である脳における所見を反映しているかどうかを組織病理学的に検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

〔評価方法〕

実施例15と同様にして行った。5～6週齢の雌のシリアンハムスター(6匹)(日本エスエルシーより入手、体重90g前後/匹)の脳内に、1%(W/V)263K脳ホモジネート40μLを接種してプリオン感染させた。脳内感染させて8日経過後、シリアンハムスターの背部皮下にHPMC(TC-5RW)を150mg投与した。対照群(4匹)としてはHPMC非投与群(オブラートのみ)を準備した。脳内感染から64日目、80日目(対照群は病末期状態)にHPMC投与群および対照群のハムスターを各2匹安楽死させた。また脳内感染から136日目(HPMC投与群は病末期状態)に残りのHPMC投与群のハムスター2匹を安楽死させた。各ハムスターより脳を取り出し正中で矢状断に切りバッファー化ホルマリンに浸けて1ヶ月以上固定した。固定した脳を90%以上の蟻酸液に室温で1時間浸漬して感染性を除去した後にパラフィン包埋し、薄切して0.4μmの組織切片を作製した。その組織切片を異常プリオン蛋白の蓄積を検出するためプリオン蛋白に対する抗体で免疫染色を行った。さらに連続する組織切片を神経変性部位で増

30

40

50

生するアストログリアを検出するためグリア線維性酸性蛋白 (GFAP) に対する抗体で免疫染色を行った。免疫染色はドウウラ (Doh-ura) らの方法 [Katsumi Doh-ura, et al., Journal of Virology, 2004年、78巻、4999-5006頁] に従い、以下のように実施した。

内因性ペルオキシダーゼのブロック処理を行った組織切片を、プリオン蛋白免疫染色では1mM塩酸に浸漬して121で10分間処理した。GFAP免疫染色ではこの処理を行わない。組織切片を蒸留水で3回、50mM Tris塩酸 (pH7.5)、0.1% Triton X-100で2回、50mM Tris塩酸 (pH7.5) で1回洗浄した後に抗プリオン蛋白抗体 (免疫生物研究所 (株) 製、18631 (商品番号)、5%正常ヤギ血清加PBSで200倍希釈) あるいは抗GFAP抗体 (DakoCytomation社製、M0761 (商品番号)、0.1%ウシ血清アルブミン加PBSで5000倍希釈) を4で一晩反応させた。50mM Tris塩酸 (pH7.5)、0.1% Triton X-100で2回、50mM Tris塩酸 (pH7.5) で1回洗浄した後に、EnVision+System-HRP Labelled Polymer液 (DakoCytomation社製、K4002あるいはK4006 (商品番号)) を組織切片上に滴下し室温30分反応させた。50mM Tris塩酸 (pH7.5)、0.1% Triton X-100で2回、50mM Tris塩酸 (pH7.5) で1回洗浄した後に、ジアミノベンチジン (DAB) を用いてペルオキシダーゼ反応で抗原抗体複合体を可視化した。

【0078】

〔結果〕

対照群において異常型プリオン蛋白の蓄積や神経変性が目立った部位のうち、顕微鏡写真として結果を示す海馬近傍と下丘の解剖学的局在を各々図25と図30 (「マウスカラーアトラスと写真で見る脳実験マニュアル」黒川衛編集、羊土社、2005年の52頁の矢状断標本拡大図を改変) に示す。なお、図中a~yの符号は各符号を付した各引き出し線先端近傍の部位を指しており、各符号の指す部位名は次に示すとおりである。

- a ; 第四脳室 (Fourth ventricle)
- b ; 小脳VIIII小葉 (Cerebellum VIIII lobula)
- c ; 小脳IX小葉 (Cerebellum IX lobula)
- d ; 小脳髓体 (Cerebellar corpus medullare)
- e ; 小脳VII小葉 (Cerebellum VII lobula)
- f ; 小脳IV・V小葉 (Cerebellum IV・V lobula)
- g ; 小脳III小葉 (Cerebellum III lobula)
- h ; 小脳II小葉 (Cerebellum II lobula)
- i ; 下丘 (Inferior colliculus)
- j ; 上丘 (Superior colliculus)
- k ; 歯状回 (Dentate gyrus)
- m ; アンモン角 (Ammon's horn)
- n ; 背側第三脳室 (Dorsal third ventricle)
- o ; 脳梁 (Callosum)
- p ; 前頭連合野 (Frontal association area)
- q ; 海馬采 (Fimbria)
- r ; 外叢状層 (External plexiform layer)
- s ; 嗅球顆粒細胞層 (Olfactory bulb granule cell layer)
- t ; 前交連 (Anterior commissure)
- u ; 乳頭体視床束 (Fasciculus mamillothalamic)
- v ; 視索 (Optic tract)
- w ; 乳頭体 (Corpus mammillare)

x ; 視床下部 (Hypothalamus)
y ; 橋核 (Pontine nucleus)

海馬近傍での異常プリオン蛋白の蓄積を示す弱拡大の顕微鏡写真を図26に、同部位の一部である海馬と大脳皮質に挟まれた白質領域の強拡大の顕微鏡写真を図27に示す。写真は図25中の矢印から見た方向で示している。対照群では既に脳内感染64日目で海馬と大脳皮質に挟まれた白質領域に異常プリオン蛋白の蓄積があり、病末期の脳内感染80日目には同領域での異常型プリオン蛋白の蓄積が増している。それに対してTC-5RW投与群では脳内感染64日目および80日目に異常プリオン蛋白の蓄積は見られない。そしてTC-5RW投与群で病末期である脳内感染136日目では、異常型プリオン蛋白の蓄積が極軽度に観察された。

10

GFAPI免疫染色で描出されるアストログリア細胞は正常脳でも白質に存在しており、神経変性が起こると変性部位の灰白質や白質でGFAPI陽性のアストログリア細胞の数が増えとともに活性化されるため、GFAPI免疫染色は神経変性を評価するために使われる簡便な方法である。図26で観察したのと同じ部位のGFAPI免疫染色の顕微鏡写真を図28に示す。また、同部位の一部である海馬の錐体細胞層を含む視野の強拡大の顕微鏡写真を図29に示す。対照群では既に脳内感染64日目で海馬と大脳皮質に挟まれた白質領域から海馬にかけて広汎にアストログリア細胞の増生が観察され、病末期の脳内感染80日目にはその程度は高度に増悪している。それに対してTC-5RW投与群では脳内感染64日目および80日目にアストログリア細胞の増生は見られない。そしてTC-5RW投与群で病末期である脳内感染136日目では、白質領域から海馬にかけてアストログリア細胞の増生が極軽度に観察された。

20

以上の所見は、下丘においてもほぼ同様であった。下丘の異常プリオン蛋白の蓄積を示す弱拡大の顕微鏡写真を図31に、強拡大の顕微鏡写真を図32に示す。写真は図30中の矢印から見た方向で示している。対照群では既に脳内感染64日目で下丘に異常プリオン蛋白の蓄積があり、病末期の脳内感染80日目にはその程度はやや増している。それに対してTC-5RW投与群では脳内感染64日目および80日目に異常プリオン蛋白の蓄積は見られない。そしてTC-5RW投与群で病末期である脳内感染136日目では異常型プリオン蛋白の蓄積が観察されたが、その程度は対照群の病末期に比べてやや軽い。図31で観察したのと同じ部位のGFAPI免疫染色の強拡大の顕微鏡写真を図33に示す。対照群では既に脳内感染64日目で下丘にアストログリア細胞の増生が観察されている。それに対してTC-5RW投与群では脳内感染64日目および80日目にアストログリア細胞の増生は見られず、TC-5RW投与群で病末期である脳内感染136日目でアストログリア細胞の増生が観察された。

30

以上の結果より、HPMCはプリオン病の病変の主座である脳において異常プリオン蛋白の蓄積と神経変性を抑えることにより治療効果を発揮していることが確認された。

【実施例25】

【0079】

実施例9と実施例10の結果より、皮下に投与したHPMCは血管内に吸収され、血管内から脳実質に移行してプリオン病に対する治療効果を発揮する可能性がある。さらに実施例3と実施例5の結果より、HPMCは単回投与で十分に治療効果が持続し、分解排泄されるのに時間がかかると考えられる。これらの可能性を検証するため、HPMCを皮下投与して血管内の抗プリオン活性を測定した。

40

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

〔評価方法〕

5～6週齢の雌のシリアンハムスター15匹(体重90g前後/匹)の背部皮下にHPMC(TC-5RW)400mgを投与した(投与方法は実施例2の場合と同様オブラートに包み皮下に埋入)。対照としてHPMC非投与(オブラートのみ)のものを6匹準備

50

した。HPMC投与してから1.5週間経過後、3週間経過後、4.5週間経過後のそれぞれにHPMC投与群の5匹、非投与群の2匹より全血液を採取し、血清を分離した。得られた血清中の抗プリオン活性の存在を実施例1のインビトロ(*in vitro*)評価方法で検定した。24穴細胞培養シャーレにコンフルエントの10%に相当する細胞数のScN2a細胞を撒き、1mL培養液中に採取したハムスター血清50 μ Lを加えて培養を続けた。細胞がコンフルエントとなった時点で、実施例1の方法で細胞溶解液より異常型プリオン蛋白(プリオン)を調製し、ウエスタンブロット法で解析した。

【0080】

〔結果〕

結果を図34に示す。図中の[TC-5RW]はHPMC(TC-5RW)投与群、[cont]は非投与群についてそれぞれ個別のハムスター血清で処理したScN2a細胞由来の異常型プリオン蛋白シグナルを示している。[no]はハムスター血清で処理していない対照群である。

10

検討した中ではHPMC(TC-5RW)投与後1.5週間経過したハムスター血清中に最も強い抗プリオン活性が見られた。同3週間経過後では抗プリオン活性は下がるものの、同4.5週間経過後でもほぼ同程度かあるいは若干低い抗プリオン活性が血清中には存在していた。この結果は、単回投与であってもHPMCに由来する抗プリオン活性が長期間にわたり血清中に存在することを示している。

【実施例26】

【0081】

血清中の抗プリオン活性因子について温度に対する感受性を検討した。

20

〔評価方法〕

実施例25におけるHPMC(TC-5RW)投与して1.5週間経過したハムスター血清(図34の[TC-5RW]の1レーン目の検体)と、同じ時期に採取した対照のハムスター血清(図34の[cont]の1レーン目の検体)を用いた。

HPMC(TC-5RW)投与ハムスター血清10 μ LおよびHPMC(TC-5RW)加対照血清(対照ハムスター血清にHPMC(TC-5RW)を終濃度4.2mg/mL加えたもの)10 μ Lを35、50、65、80、95で10分間処理を行い、冷却後に遠心(13,000 \times g、5分間)を行って上清を分取した。24穴細胞培養シャーレにコンフルエントの10%に相当する細胞数のScN2a細胞を撒き、1mL培養液中に分取した上清を加えて培養を続けた。細胞がコンフルエントとなった時点で、実施例1の方法で細胞溶解液より異常型プリオン蛋白(プリオン)を調製し、ウエスタンブロット法で解析した。

30

また、モンタージュ・アルブミン・デプリート・キット(Montage Albumin Deplete Kit)(ミリポア社(Millipore)製)を用いてハムスター血清からアルブミンを除去した検体について同様に温度処理の影響を検討した。

【0082】

〔結果〕

アルブミンを除去していないときの結果を図35に示す。[cont]は何も添加していないScN2a細胞の異常型プリオン蛋白を示している。HPMC(TC-5RW)投与ハムスター血清では80以上の温度処理で抗プリオン活性が若干低下していたが、HPMC(TC-5RW)加対照ハムスター血清ではもともと加えたHPMC(TC-5RW)の濃度では抗プリオン活性が低いためか同様な変化は明らかではなかった。HPMC(TC-5RW)は80や95で10分間程度の温度処理では分解・修飾されないため、この結果はHPMC(TC-5RW)投与ハムスター血清中の抗プリオン活性因子はHPMC(TC-5RW)やHPMC(TC-5RW)様のものでない可能性を示すことになる。しかし、血清は80以上の温度処理で血清中に含まれる多量のアルブミン等の蛋白質が熱変性を起こし巨大な沈殿物を形成し、抗プリオン活性因子の一部がこの沈殿物にトラップされて上清中の活性が低下した可能性がある。

40

【0083】

50

アルブミンを除去した検体の結果を図36に示す。図中、[cont]は何も添加していないScN2a細胞の異常型プリオン蛋白であり、[albumin +]はアルブミンを除去していないHPMC(TC-5RW)投与ハムスター血清を用いたもの、[albumin -]はアルブミンを除去したHPMC(TC-5RW)投与ハムスター血清を用いたものを示している。温度処理をしていないもの([heat -])、65で処理したもの([heat 65])、95で処理したもの([heat 95])の間で抗プリオン活性に明らかな差はみられなかった。この結果から、HPMC(TC-5RW)投与ハムスター血清中の抗プリオン活性は、HPMC(TC-5RW)と同様な熱耐性を有していると解される。

【実施例27】

10

【0084】

次に、分子篩い分け効果を持つフィルター(限外濾過膜)を用いてTC-5RW投与ハムスター血清中の抗プリオン活性因子の分子サイズ(分子量)を推定した。

〔評価方法〕

HPMC(TC-5RW)投与ハムスターの血清10 μ L、HPMC(TC-5RW)加対照の血清(対照ハムスター血清にHPMC(TC-5RW)を終濃度20mg/mL加えたもの)10 μ Lをそれぞれバイオマックス-30・フィルター(BIOMAX-30 Filter Unit)[ミリポア社(Millipore)製、「UFC 3BTK00」(型番)、分子量約3万Daをカット)、あるいはバイオマックス-100・フィルター(BIOMAX-100 Filter Unit)[ミリポア社製、「UFC 3BHK00」(型番)、分子量約10万Daをカット]で濾過処理を行い、濾過液([filtrate])と濾過できなかった残留液([retentate])を分取した。24穴細胞培養シャーレにコンフルエントの10%に相当する細胞数のScN2a細胞を撒き、1mL培養液中に分取した濾過液あるいは残留液を加えて培養を続けた。細胞がコンフルエントとなった時点で、実施例1の方法で細胞溶解液より異常型プリオン蛋白(プリオン)を調製し、ウエスタンブロット法で解析した。

20

【0085】

〔結果〕

結果を図37に示す。図中、[control]は無添加のScN2a細胞の異常型プリオン蛋白、[no filter]は濾過前のHPMC(TC-5RW)投与ハムスターの血清、あるいはHPMC(TC-5RW)加対照の血清を用いたもの、[30K]はバイオマックス-30・フィルターで処理したもの、[100K]はバイオマックス-100・フィルターで処理したもの、[filtrate +]は濾過液を用いたもの、[retentate +]は濾過できなかった残留液を用いたものを示している。HPMC(TC-5RW)投与ハムスター血清中の抗プリオン活性因子は、対照ハムスター血清に加えたHPMC(TC-5RW)と同様の挙動を示し、約10万Daの分子量のフィルターを透過しなかった。

30

【実施例28】

【0086】

HPMC投与ハムスター血清中の抗プリオン活性因子について、分解酵素処理に対する感受性を検討した。

40

〔評価方法〕

HPMC(TC-5RW)投与ハムスターの血清10 μ L、およびHPMC(TC-5RW)加対照の血清(対照ハムスター血清にHPMC(TC-5RW)を終濃度20mg/mLとなるように加えたもの)10 μ Lのそれぞれをモンタージュ・アルブミン・デプリート・キット(Montage Albumin Deplete Kit)[ミリポア社(Millipore)製]でアルブミンを除いた後に、 α -アミラーゼ(α -amylase)[シグマ社(Sigma)製、「A3176」(商品番号)]を終濃度0.1mg/mLとなるように、アミログルコシダーゼ(amyloglucosidase)[シグマ社製、「A9228」(商品番号)]を終濃度0.1mg/mLとなるように

50

、リパーゼ (lipase) [和光純薬工業 (株) 製、「548-00212」(商品番号)] を終濃度 0.1 mg/mL となるように、デオキシリボヌクレアーゼ I (deoxyribonuclease I) [シグマ社製、「DN25」(商品番号)] を終濃度 0.1 mg/mL となるように、リボヌクレアーゼ A (ribonuclease A) [シグマ社製、「R4875」(商品番号)] を終濃度 0.05 mg/mL となるように加え、37、1 時間反応させた。その後プロテナーゼ K を終濃度 0.1 mg/mL となるように加えて 37 でさらに 1 時間反応させた。95 で 5 分間処理した後に冷却し、遠心 (13,000 × g、5 分間) して上清を分取した。24 穴細胞培養シャーレにコンフルエントの 10% に相当する細胞数の ScN2a 細胞を撒き、1 mL 培養液中に分取した上清を加えて培養を続けた。細胞がコンフルエントとなった時点で、実施例 1 の方法で細胞溶解液より異常型プリオン蛋白 (プリオン) を調製し、ウエスタンブロット法で解析した。

10

【0087】

〔結果〕

結果を図 38 に示す。図中、[control] は無添加の ScN2a 細胞の異常型プリオン蛋白、[albumin +] はアルブミンを除去していない HPMC (TC-5RW) 投与ハムスター血清を用いたもの、[albumin -] はアルブミンを除去した HPMC (TC-5RW) 投与ハムスター血清を用いたものを示している。[heat denate +] は 95 5 分間の処理をしたもの、[heat denate -] は 95 5 分間の処理をしていないもの、[digestion +] は上記 6 種の酵素で処理をしたもの、[digestion -] は酵素処理していないものを示している。HPMC (TC-5RW) 投与ハムスター血清中の抗プリオン活性は、対照ハムスター血清に加えた HPMC (TC-5RW) による抗プリオン活性と同様の挙動を示し、上記 6 種の酵素処理に対して影響を受けなかった。

20

以上実施例 25 ~ 28 のいずれの結果も、HPMC (TC-5RW) 投与ハムスター血清中の抗プリオン活性因子は HPMC (TC-5RW) と同じ性状を有することを示しており、抗プリオン活性因子は HPMC (TC-5RW) そのもの、あるいは HPMC (TC-5RW) が一部修飾 (分解) されたものである可能性がある。

【実施例 29】

【0088】

実施例 25 ~ 28 の結果を踏まえ、HPMC (TC-5RW) を動物 (マウス) の末梢に投与した際の組織内推移について放射性同位元素 (炭素 14) で標識した HPMC を用いて詳細に検討した。まず、HPMC (TC-5RW) をマウス尾静脈より単回投与した際の組織内推移について調べた。

30

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・標識化 HPMC ; HPMC (TC-5RW) (実施例 1 に記載) を使用し、これをアルカリ塩とした後、[¹⁴C] ヨウ化メチル、ヘキサン (溶剤) とともに封管し、40 ~ 45 で 20 時間保持した。未反応のヨウ化メチルおよびヘキサンを蒸発除去した後、残渣を水に溶解してイオン交換樹脂 (H⁺ と OH⁻ の混床型) カラムを通して精製し、溶出液を濃縮、乾燥して炭素 14 メチル基を導入した標識化 HPMC (比活性 ; 74 kBq / mg) とした。

40

〔評価方法〕

標識化 HPMC を、表 2 に記載の用量で尾静脈より単回投与した動物 (Tg7 マウス) を、所定時間にエーテル麻酔下、下大静脈より採血致死させ、所定の組織を摘出し、組織内放射能濃度および分布率を求め、各組織への放射能分布および経時的变化について調べた。

【0089】

< 試験条件 >

【表 2】

試験群	投与経路	投与量 (HP MC換算)	測定時間	測定検体数	使用動物数
第1群	静脈内	2. 5 mg / b o d y	投与後5分	各1検体/組織	1群3匹 (計12匹)
第2群			投与後2時間		
第3群			投与後24時間		
第4群			投与後72時間		

【0090】

< 評価組織 >

Tg7マウス(ハムスター型プリオン蛋白を過剰発現した遺伝子改変マウス)の血漿(Plasma)、血液(Blood)、大脳(Cerebrum)、小脳(Cerebellum)*、下垂体(Pituitary gland)**、眼球(Eyeball)*、ハーダー腺(Harderian gland)*、甲状腺(Thyroid gland)**、顎下腺(Mandibular gland)*、胸腺(Thymus)*、心臓(Heart)*、肺(Lung)*、肝臓(Liver)*、腎臓(Kidney)*、副腎(Adrenal gland)**、脾臓(Spleen)*、膵臓(Pancreas)*、白色脂肪(Fat)、骨格筋(Skeleton muscle)*、皮膚(Skin)、骨髄(Bone marrow)**、大動脈(Aorta)**、精巣(Testis)*、精巣上体(Epididymis)*、前立腺(Prostate gland)**、膀胱(Urinary bladder)*、胃(Stomach)*、小腸(Small intestine)*、大腸(Large intestine)*[*:分布率を求めた。なお、血液および骨格筋については、血液全量を体重の7.78%(参考文献;田嶋嘉雄編集,実験動物学各論,東京,朝倉書店,1972,12頁)、骨格筋を体重の45%(参考文献;Gerlowski LE, Jain RK, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1983年72巻10号,1103-1127頁)として計算した。]**:3例分を合して測定した。]のそれぞれから試料を採取した。

【0091】

< 試料採取および調製方法 >

血液および骨格筋以外で分布率を求める組織については、すべて全重量を測定した。肝臓は胆嚢を取り除いた後、その全重量を測定した。骨髄は大腿骨より採取し、その全重量を測定した。白色脂肪は腎臓周辺部より、皮膚は腋下部より、骨格筋は大腿部より採取した。膀胱および消化管は秤量に際し、内容物を除去後生理食塩液で十分に洗浄を行い、小腸は十二指腸から回腸までを、大腸は盲腸から結腸までを採取した。

a) 血液; 下大静脈よりヘパリン処理したシリンジを用いて血液を採取した。血液はその100μLをバイアルに採取し、組織溶解剤“SOLUENE-350”(商品名)[Perkin Elmer社製]2mLを加えて溶解後、過酸化ベンゾイル飽和のベンゼン溶液0.4mLを加えて脱色した。

b) 血漿; 放射能測定分を除く残余の血液を遠心分離(8000×g、4、5分間)し、得られた血漿はその100μLをバイアルに採取し、組織溶解剤“SOLUENE-350”(商品名)2mLを加えて溶解した。

c) 大脳および腎臓; 大脳は2分割して片方をバイアルに採取しその重量を測定した後、組織溶解剤“SOLUENE-350”2mLを加えて加温・溶解した。腎臓は片方をバイアルに採取し、その重量を測定した後、組織溶解剤“SOLUENE-350”(商品名)2mLを加えて加温・溶解した。

d) 肝臓; ポリ容器に採取して全重量の約2倍量の生理食塩液を加えて再び重量を測定し、細かく碎片化してからホモジネートを調製した。調製後のホモジネート0.5mLをバイアルに採取してその重量を測定した後、組織溶解剤“SOLUENE-350”(商品名)2mLを加えて加温・溶解した。

10

20

30

40

50

e) 胃、小腸、大腸；採取した全量に 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を 3 mL 加えて加温・溶解後水を加えて 5 mL に希釈し、それぞれその 1 mL をバイアルに採取した。

f) 白色脂肪；約 50 mg をバイアルに移し、組織溶解剤“SOLUENE-350”（商品名）2 mL を加えて加温・溶解した。

g) 眼球および皮膚；眼球は両眼，皮膚は約 150 mg を燃焼用カップ濾紙に秤取した。

h) その他の組織；約 150 mg（全量が約 150 mg に満たない場合は全量）をバイアルに移し，組織溶解剤“SOLUENE-350”（商品名）2 mL を加えて加温・溶解した。

【0092】

<放射能測定方法>

a) 眼球および皮膚（燃焼法）；燃焼用カップ濾紙に採取した試料は、恒温器を用いて 40℃ で 24 時間以上乾燥させてから自動燃焼装置で燃焼し、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を CO_2 吸収剤“CARBO-SORB E”（商品名）〔Perkin Elmer 社製〕6 mL に吸収させ、さらにシンチレーター“PERMAFLUOR E+”（商品名）〔Perkin Elmer 社製〕12 mL を加え、液体シンチレーションカウンター（LSC）〔Perkin Elmer 社製、「2700TR」（商品名）〕を用いて放射能の計測を行った。なお，燃焼法による測定値は、サンプルオキシダイザー用 ^{14}C 標準試料〔Perkin Elmer 社製、「SPEC-CHEC ^{14}C 」（商品名）〕0.2 mL を用いて次式より求めた燃焼時の回収率で補正した後，組織内放射能濃度及び分布率を算出した。

回収率 (%) = [標準試料燃焼後に回収された放射能 (dpm)] / [燃焼に供した標準試料の放射能 (dpm)] × 100

b) 眼球および皮膚以外の組織（溶解法）；調製後の各試料にはそれぞれシンチレーター“HIONIC-FLUOR”（商品名）〔Perkin Elmer 社製〕10 mL を加え、LSC を用いて放射能の計測を行い、得られた値より組織内放射能濃度および分布率を算出した。

【0093】

〔結果〕

結果を図 39～44 に示す。組織内放射能濃度は大動脈、精巣および膀胱が投与後 2 時間に、皮膚は投与後 72 時間に、他の組織は最初の測定時間である投与後 5 分にそれぞれ最高濃度を示した。いずれの測定時間においても大脳および小脳の放射能濃度は低かった。投与後 5 分では血漿 (1489031 ng eq./mL) に最も高い放射能濃度が認められ、次に腎臓 (1121869 ng eq./g) および血液 (763832 ng eq./mL) にそれぞれ血漿の 0.75 倍および 0.51 倍の放射能濃度が認められた。他の組織内放射能濃度は血漿の 0.13 倍以下であった。投与後 24 時間では皮膚に最高濃度の 75% が認められた。精巣、白色脂肪、胸腺、脾臓、副腎、眼球、ハーダー腺、甲状腺、精巣上体、胃、顎下腺、骨格筋、骨髄、膵臓、肝臓、前立腺、膀胱および大腸の放射能濃度はそれぞれの最高濃度の 47%～22% に、他の組織はそれぞれの最高濃度の 20% 以下に減少した。投与後 72 時間では皮膚に最高濃度 (42338 ng eq./g) が認められた。白色脂肪、精巣、脾臓、副腎、ハーダー腺、大動脈、骨格筋、甲状腺、顎下腺、肝臓、胸腺、膵臓、膀胱、眼球、精巣上体、前立腺、胃、大腸、心臓および骨髄の放射能濃度はそれぞれの最高濃度の 41%～11% に、他の組織はそれぞれの最高濃度の 9% 以下に減少した。大脳および小脳での放射能濃度は測定した組織の中では最も低いものであり、その時間的な推移のパターンはほぼ血液や血漿と一致していた。

【実施例 30】

【0094】

標識化 HPMC をマウス背部の皮下に単回投与した際の組織内推移について調べた。

〔評価方法〕

実施例 29 と同様にして調製した標識化 HPMC (比活性；74 kBq/mg) を、表

10

20

30

40

50

3の用量で単回投与した動物(Tg7マウス)を所定時間にエーテル麻酔下、下大静脈より採血致死させ、所定の組織を摘出し、組織内放射能濃度および分布率を求め、各組織への放射能分布および経時的変化について調べた。

【0095】

<試験条件>

【表3】

試験群	投与経路	投与量 (HPMC換算)	測定時間	測定検体数	使用動物数
第5群	皮下	2.5 mg / body	投与後2時間	各1検体/組織	1群3匹 (計9匹)
第6群			投与後24時間		
第7群			投与後336時間		

10

【0096】

〔結果〕

結果を図45～50に示す。標識化HPMCを雄性Tg7マウスに2.5 mg / bodyの用量で単回皮下投与した際の組織内放射能濃度は血漿、血液、大脳、小脳、下垂体、心臓、肺、肝臓、腎臓、白色脂肪、骨格筋、皮膚、骨髄、大動脈、精巣上体、膀胱、胃、小腸および大腸は投与後24時間に、他の組織は投与後336時間に最高濃度を示した。いずれの測定時間においても大脳および小脳の放射能濃度は低かった。投与後2時間では血漿(17822 ng eq. / mL)に最も高い放射能濃度が認められた。次に腎臓(13106 ng eq. / g)および血液(9294 ng eq. / mL)にそれぞれ血漿の0.74倍および0.52倍の放射能濃度が認められた。他の組織内放射能濃度は血漿の0.39倍以下であった。投与後24時間では、血漿(154071 ng eq. / mL)に最も高い放射能濃度が認められ、次に血液(69708 ng eq. / mL)および皮膚(299291 ng eq. / g)にそれぞれ血漿の0.45倍および0.39倍の放射能濃度が認められた。他の組織内放射能濃度は血漿の0.19倍以下であった。投与後336時間では眼球、ハーダー腺、甲状腺、顎下腺、胸腺、副腎、脾臓、膵臓、精巣および前立腺の放射能濃度は、この時点で最高濃度を示しており、これらの組織へ標識化HPMC由来の放射能が蓄積していることを示唆する結果が得られた。さらに血液および血漿以外の組織についてもそれぞれ最高濃度の87%～37%を示し、各組織からの消失が遅いことも明らかとなった。これらの結果は、HPMC(TC-5RW)が皮下より徐々に血液中に吸収され、各組織に分布して一部の組織では蓄積する傾向にあること、各組織から標識化HPMCが消失するまでにかなりな時間を要することを示唆している。

20

30

【実施例31】

【0097】

さらに、マウスの静脈内に単回投与した際の標識化HPMCに由来する放射能の体内での分布を視覚化して、詳細な局在を調べた。

〔評価方法〕

標識化HPMC(比活性; 74 kBq / mg)を、表4に示す用量で単回投与した動物(Tg7マウス)を所定時間にエーテル麻酔死させた後、全身オートラジオグラムを作製し、各組織への放射能分布について検討した。

40

【0098】

<試験条件>

【表4】

試験群	投与経路	投与量 (HPMC換算)	作製時間	使用動物数
第8群	静脈内	2.5 mg / body	投与後2時間	1群1匹 (計1匹)

50

【 0 0 9 9 】

< 作製方法 >

所定時間に動物をエーテル麻酔死させ、速やかに被毛を刈り取り、鼻腔および肛門を4% CMC - Na で塞いだ。ついでドライアイス・アセトン中で凍結し、得られた凍結屍体より前後肢および尾を切り離れた後、4% CMC - Na で包埋し、ドライアイス・アセトン中で凍結後クライオマイクロトームに固定した。作成した凍結ブロックに接着テープ〔住友スリーエム(株)製、「No. 810」(型番)〕を貼り付け、クライオマイクロトームにより、厚さ30 μmの凍結切片を作製し、凍結乾燥した。乾燥後の切片を保護膜〔三菱ポリエステルフィルム(株)製、「ダイアホイル」(商品名)、厚さ: 4 μm〕で被った後、イメージングプレート〔富士写真フィルム(株)製、「TYPE BAS SR2040」(商品名)〕と密着させ、室温下で鉛製シールドボックス内で一定期間露出した。露出後、イメージングプレート上の放射能像をBAS〔Bio - imaging Analyzer System、富士写真フィルム(株)製、「FUFIX - BAS2500」(商品名)〕により読み取り、ラジオルミノグラムを作製した。

10

【 0 1 0 0 】

〔 結果 〕

結果を図51~53に示す。図中、符号1~28は各符号を付した各引き出し線矢印近傍の組織を指しており、各符号の指す組織名は次に示す通りである。

- 1 ; 副腎 (Adrenal gland)
- 2 ; 血液 (Blood)
- 3 ; 骨髄 (Bone marrow)
- 4 ; 脳 (Brain)
- 5 ; 褐色脂肪 (Brown fat)
- 6 ; 精巣上体 (Epididymis)
- 7 ; 白色脂肪 (Fat)
- 8 ; 胃内容物 (Gastric contents)
- 9 ; ハーダー腺 (Harderian gland)
- 10 ; 心臓 (Heart)
- 11 ; 腸内容物 (Intestinal contents)
- 12 ; 腸 (Intestine)
- 13 ; 腎臓 (Kidney)
- 14 ; 肝臓 (Liver)
- 15 ; 肺 (Lung)
- 16 ; 顎下腺 (Mandibular gland)
- 17 ; 膵臓 (Pancreas)
- 18 ; 下垂体 (Pituitary gland)
- 19 ; 前立腺 (Prostate gland)
- 20 ; 骨格筋 (Skeleton muscle)
- 21 ; 皮膚 (Skin)
- 22 ; 脾臓 (Spleen)
- 23 ; 胃 (Stomach)
- 24 ; 精巣 (Testis)
- 25 ; 胸腺 (Thymus)
- 26 ; 甲状腺 (Thyroid gland)
- 27 ; 膀胱 (Urinary bladder)
- 28 ; 膀胱中の尿 (Urine in bladder)

20

30

40

標識化HPMCを雄性Tg7マウスに2.5 mg / bodyの用量で単回静脈内投与後2時間における組織内分布について全身オートラジオグラムにより検討したところ、膀胱内尿に最も高い放射能が認められ、次いで血液に高い放射能が認められた。肺、副腎、肝

50

臓、腎臓、腸、下垂体、甲状腺、精巣上体、顎下腺、膀胱、胃、心臓、褐色脂肪、骨髄、膵臓、ハーパー腺、皮膚、前立腺、腸内容物、脾臓、胸腺、精巣には血液より低い放射能が、胃内容物、骨格筋、脳には更に低い放射能が認められた。白色脂肪の放射能は最も低かった。脳での放射能の分布は均一ではなく、放射能シグナルは脳の血管の局在に一致していることが示唆された。

実施例 29 ~ 31 の結果を考え合わせると、以下の 3 点が示唆される。

(1) 皮下に投与した HPMC は、そのものあるいはその分解修飾産物が徐々に血液中に吸収され体内の各組織に分布し、同時に主に尿中に排泄される。

(2) 各組織中に分布した HPMC あるいはその分解修飾産物はきわめて徐々に分解あるいは組織外へ放出される。

(3) HPMC あるいはその分解修飾産物が脳血液関門を越えて脳実質内に直接移行している可能性はきわめて低い。

【実施例 32】

【0101】

代表的コンフォメーション病の一つであるアルツハイマー病においては、その主な病気の原因の一つは脳内での A β 蛋白の凝集沈着と凝集 A β による神経細胞障害である。そこでセルロースエーテル類の A β 蛋白の凝集への阻害効果をインビトロで検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC (TC - 5RW)〕；実施例 1 に記載。

・メチルセルロース〔MC (SM - 4)〕；実施例 8 に記載。

・ヒドロキシプロピルセルロース (HPC L)；実施例 8 に記載。

・0.3% 塩酸による加水分解 HPMC；実施例 22 に記載。

・40% 塩酸による加水分解 HPMC；実施例 22 に記載。

〔評価方法〕

使用直前に蒸留水で溶かしたモノマー型 A β (1 - 40)〔(株)ペプチド研究所製、「4379 - v」(カタログ番号)〕1mM 溶液 0.6 μ L を、セルロースエーテル類の PBS (pH 7.5) 溶液と混合して、全量を PBS で 40 μ L に調製し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させた。A β の終濃度は 15 μ M であり、各セルロースエーテル類の終濃度を 0.4、2、10、50 μ g/mL とした。A β のアミロイド化の程度をナイキ (Naiki)、ナカクキ (Nakakuki) によるチオフラビン T (Thioflavin T) 法〔Naiki H, Nakakuki K., Laboratory Investigation 1996 年、74 巻、2 号、374 - 383 頁〕に基づいて測定した。A β と化合物の混合反応液にチオフラビン T を終濃度が 5 μ M になるように混合して蛍光・吸光マイクロプレートリーダー〔モレキュラダイナミクス社 (Molecular Dynamics) 製、「Biolumin - 960」(型番)、励起波長 450 nm / 蛍光強度測定波長 485 nm) で蛍光を測定した。なおチオフラビン T を混合する前に化合物と A β 蛋白の混合反応液の蛍光を測光しておき、その値をチオフラビン T を混合後の蛍光測光値から除算した。測定値は対照 (化合物なし) 群を 100% として相対値 (%) に換算した。

【0102】

〔結果〕

結果を図 54 ~ 58 に示す。図中、[HL]、[SO]、[TO]、[T1]、[T3] はそれぞれ HPC L、MC (SM - 4)、HPMC (TC - 5RW)、0.3% 塩酸による加水分解 HPMC (TC - 5RW)、40% 塩酸による加水分解 HPMC (TC - 5RW) を示す。HPC L (IC₅₀ = 5.1 μ g/mL) と MC (SM - 4) (IC₅₀ = 5.3 μ g/mL) は、ほぼ同程度の A β 蛋白凝集阻害活性を示した。0.3% 塩酸による加水分解 HPMC (TC - 5RW) (IC₅₀ = 13.8 μ g/mL) は HPC L、MC (SM - 4) よりは活性はやや低かった。一方、加水分解未処理の HPMC (TC - 5RW) や 40% 塩酸加水分解 HPMC (TC - 5RW) は HPC L、MC (SM - 4)

10

20

30

40

50

より阻害効果がきわめて弱かった。

【実施例 3 3】

【0103】

セルロースエーテル類について、凝集 A による神経細胞障害に対する保護効果を神経細胞・グリア細胞混合培養系で検討した。

〔評価方法〕

16穴スライドチャンバーで培養を行った *Wistar* ラット胎仔由来神経細胞・グリア混合培養系に凝集 A 1 - 40 (35 μ M) と実施例 3 2 で検討したセルロースエーテル類の PBS 溶液 (8, 40, 200 μ g/mL) を添加して 2 日間インキュベートを行った (各 n = 3)。その後、細胞を固定して神経細胞の細胞体や樹状突起に存在する微小管結合蛋白 (MAP2) に対する免疫染色を行った。標本は格子を付けた接眼レンズを装着した顕微鏡下 (対物レンズ X 20 接眼レンズ X 10) で MAP2 陽性細胞数を算定した。算定部位は各ウエルの中心部 1 箇所を設定した。*Wistar* ラット胎仔由来神経細胞・グリア混合培養は妊娠 18 - 19 日目の雌 *Wistar* ラットの胎児を用いて、「島中寛、津久井弘子、実験医学別冊 神経生化学マニュアル (1990) p129 - 135

中枢諸神経核神経細胞の培養」の方法に基づき神経細胞とアストログリア細胞を調整した。神経細胞 10^6 / mL の密度に抗生物質混合液 (Sigma, カタログ番号 A9909) を添加した 10% FBS / Neurobasal medium (GIBCO, カタログ番号 21103 - 049) で希釈したものを、アストログリア細胞が confluent に増殖した 16 穴スライドチャンバー内に分注し (100 μ L / well) CO₂ インキュベーター中で培養を行った。混合培養開始 3 日後に培地を B27 サプリメント (Invitrogen, カタログ番号 17504 - 044) 添加 Neurobasal medium に交換し実験に供した。A 凝集体は、A 1 - 40 [(株) ペプチド研究所製、4379 - v (カタログ番号)] を 1 mM の濃度で Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [Invitrogen 社製、11885 - 084 (商品番号)] に溶解させ、2 週間 CO₂ インキュベーターでインキュベートさせて作製し、DMEM で希釈して実験に用いた。MAP2 に対する免疫染色は以下のように行った。

細胞を PBS で洗浄した後に、-30℃ に冷やした 5% 酢酸添加 95% エタノールに細胞を 10 分間浸漬して細胞を固定した。PBS で十分に洗浄した後に、内因性ペルオキシダーゼのブロック処理を行った。1% ウシ血清アルブミン加 PBS で 15 分間反応させた後、PBS で 3 回に洗浄を行い、抗 MAP2 抗体 [SIGMA 社製、「M - 1406」(商品番号)、1% ウシ血清アルブミン加 PBS で 400 倍希釈] を 4℃ で一晩反応させた。PBS で 5 回洗浄後にホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体 [Amersham 社製、「NA93IV」(商品番号)、1% ウシ血清アルブミン加 PBS で 100 倍希釈] を室温で 1 時間反応させた。PBS で 5 回洗浄した後に、ジアミノベンチジン (DAB) を用いてペルオキシダーゼ反応で抗原抗体複合体を可視化した。

【0104】

〔結果〕

結果を図 59 ~ 63 に示す。図中の [HL]、[SO]、[TO]、[T1]、[T3] はそれぞれ HPC L、MC (SM - 4)、HPMC (TC - 5 RW)、0.3% 塩酸による加水分解 HPMC (TC - 5 RW)、40% 塩酸による加水分解 HPMC (TC - 5 RW) を示す。セルロースエーテル類を 8, 40, 200 μ g/mL 濃度で添加した際に、40 μ g/mL までの濃度ではいずれのセルロースエーテル類も濃度依存的に A に対する神経細胞保護効果を示した。40% 塩酸加水分解 HPMC (TC - 5 RW) はやや効果が低かった。40 μ g/mL 濃度においては、HPC L と MC (SM - 4) と HPMC (TC - 5 RW) はほぼ同程度の神経細胞保護効果を示した。200 μ g/mL 濃度では MC (SM - 4) や加水分解 HPMC (TC - 5 RW) でさらに効果の上昇が見られたのに対して、HPC L や HPMC (TC - 5 RW) では 40 μ g/mL 濃度よりやや効果が

下がる傾向があった。この結果はA の凝集阻害効果の結果とそれほど矛盾しないものであった。

【実施例34】

【0105】

実施例32および実施例33よりアルツハイマー病の治療効果が期待されることより、アルツハイマー病の疾患モデル動物(マウス)を用いてセルロースエーテル類の効果を検討した。

〔評価に用いたセルロースエーテル類〕

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(TC-5RW)〕；実施例1に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(60SH-50)〕；実施例6に記載。

・ヒドロキシプロピルメチルセルロース〔HPMC(60SH-400)〕；実施例11に記載。

〔評価方法〕

疾患モデルマウスとして変異型アミロイド前駆体蛋白と変異型タウ蛋白を発現しているAPP/Tauトランスジェニックマウス〔Taconic社製、600902(商品番号)〕を用いた。一群は同じ週齢の雌五匹で構成し、セルロースエーテル類は25mg/mL濃度のPBS溶液とし、対照にはPBSのみを用いた。実施例10と同様にして浸透圧ポンプに各溶液を充填して第15週齢時より4週間の脳室内への投与を開始した。第20週齢時からはセルロースエーテル類25mg/mL濃度の各溶液0.25mLをそれぞれのマウスの腹腔内に1週おきに投与を行い第30週齢時まで投与を継続した。第39週齢時よりブドウ糖液消費試験を開始した。また、第40週齢時よりブラウイング(burrowing)試験を開始した。両試験はボーシェ(Boche)らの方法〔D.Boche, C.Cunningham, et al., Neurobiology of Disease, 2006年, 22巻, 638-650頁〕に準じ、週一回の割合で朝9時より翌日朝9時まで実施した。ブラウイング試験では、パイプ(直径76mm、長さ200mm、床から入り口の高さ30mmの塩化ビニールパイプ)にペレット状のエサを190g入れ、次の日パイプに残っているエサの重さを測定し、移動させた量を計算した。ブドウ糖液消費試験では5%ブドウ糖液〔D(+)-glucose、和光純薬工業(株)製、「041-00595」(カタログ番号)〕を蒸留水で溶解)を調製し、給水ビンに充填してマウスに自由給水させた。次の日残量を測定し、ブドウ糖液の消費量を計算した。

【0106】

〔結果〕

ブラウイング試験の結果を図64に示す。HPMC(60SH-50)投与群もHPMC(60SH-400)投与群も、対照群に比して有意に(それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)成績が良好であった。また、ブドウ糖液消費試験の結果を図65に示す。HPMC(60SH-50)投与群もHPMC(60SH-400)投与群も、対照群に比して有意に(ともに $p < 0.05$)成績が良好であった。以上の結果は、セルロースエーテル類がインビボにおいてもアルツハイマー病に対して治療効果を発揮し得ることを示している。

【実施例35】

【0107】

アミロイドーシスもコンフォメーション病を代表する疾患群であるが、リュウマチやクローン病等の慢性炎症性疾患に付随して末梢臓器に蓄積するAAアミロイドの動物疾患モデルにおいてセルロースエーテル類の発病抑制効果をインビボで検討した。この動物疾患モデルで得られた成果は、AAアミロイドーシスへの適応だけではなく、他のアミロイドーシスやアルツハイマー病などへの適応の応用が可能であることが知られている(非特許文献5、7及び8)。

〔評価方法〕

10

20

30

40

50

このモデルではマウスに起炎剤を投与してヒトの病態と同様に炎症反応蛋白である血清アミロイドA蛋白 (serum amyloid A protein; SAA) の血中濃度を亢進させ、SAAから切り出されるアミロイド形成蛋白であるアミロイドA蛋白 (amyloid A protein; AA) が凝集して末梢臓器 (脾臓、肝臓が最も好発) に蓄積する。単に炎症だけ惹起するとマウスにアミロイドが蓄積するまで1ヶ月以上の期間がかかるが、起炎剤の投与と同時にまたはそれ以前にAAアミロイド蓄積組織ホモジネート (amyloid enhancing factor; AEF) を投与するとアミロイドが蓄積するまでの期間を数日に短縮できることが知られている。

【0108】

6ヶ月齢以上の雌のICRマウス (日本クレアより入手、近交系Jcl: ICRマウス、体重約30g/匹) の背部皮下にHPMC (TC-5RW)、MC (SM-4)、HPC Lを50mgあるいは75mgあるいは100mgを投与した (投与方法は実施例2の場合と同様にオブラートに包み皮下に埋入)。化合物非投与群 (オブラートのみ) を対照とした。各群1匹を用いた。投与してから1.5ヶ月後あるいは4ヵ月後にAEFと起炎剤を投与しアミロイドーシスを発症させた。AEFは、既にアミロイドが十分に蓄積したAAアミロイドマウスの脾臓、肝臓の混合物に重量の3倍のPBSを添加し、ポリトロンホモジナイザーを使ってホモジナイズして調製した。これをPBSでさらに2倍に希釈したものを0.5mLをマウスの腹腔内に投与した。起炎剤は、アゾカゼイン [シグマ社 (Sigma) 製] を滅菌水で溶解して10%溶液を作製し、Freund's Complete Adjuvant (GIFCO社製) を等量添加して冷やしながらかポリトロンホモジナイザーでホモジナイズして乳液状とした。これを1匹あたり0.5mL背部の皮下に投与した。1週間後にマウスより肝臓、脾臓を取り出し、バッファー化ホルマリンに1週間浸けて固定した後にパラフィン包埋し、0.4μmの組織切片を作製した。その組織切片にコンゴ赤染色を行い、偏光顕微鏡下で緑色複屈折を呈するアミロイドを検出した。また、連続する組織切片をSAAに対する抗体で免疫染色を行いAA (アミロイド) の沈着を検出した。免疫染色は、以下のように実施した。

内因性ペルオキシダーゼのブロック処理を行った組織切片を98%蟻酸で室温5分間処理した。組織切片をTris塩酸 (pH7.5) 50mMで2回、蒸留水で1回洗浄した後に0.1%・N-ドデシルサルコシン酸ナトリウム (Sarkosyl)、25mM・NaOH、2%・NaCl液で室温10分間処理した。流水、蒸留水、Tris塩酸50mMで十分に洗浄した後に抗SAA抗体 (Santa Cruz Biotechnology社製、sc-20651 (商品番号)、0.1%ウシ血清アルブミン加PBSで500倍希釈) を室温で1時間反応させた。Tris塩酸50mMで十分に洗浄した後に、HISTOFINE (株式会社ニチレイバイオサイエンス製) 液を組織切片上に滴下し室温30分反応させた。Tris塩酸50mMで十分に洗浄した後に、ジアミノベンチジン (DAB) を用いてペルオキシダーゼ反応で抗原抗体複合体を可視化した。

【0109】

〔結果〕

結果を表5および図66~71に示す。表中、[-]はアミロイドあるいはAAの蓄積を認めないこと、[±]はごく一部にアミロイドあるいはAAの蓄積を認めること、[+]はアミロイドあるいはAAの蓄積を広汎に認めることを示している。

【0110】

10

20

30

40

【表 5】

アミロイド作製の1.5ヶ月前に化合物投与				
	コンゴ赤染色		SAA免疫染色	
	肝臓	脾臓	肝臓	脾臓
コントロール	+	±	+	+
SM-4 50mg	±	±	+	+
SM-4 75mg	±	±	+	±
TC-5RW 50mg	-	-	±	±
TC-5RW 75mg	±	±	±	±
HPCL 50mg	-	-	±	±
HPCL 75mg	-	-	-	-

10

アミロイド作製の4ヶ月前に化合物投与				
	コンゴ赤染色		SAA免疫染色	
	肝臓	脾臓	肝臓	脾臓
コントロール	+	+	+	+
SM-4 75mg	±	±	+	+
SM-4 100mg	±	±	+	+
TC-5RW 75mg	±	±	+	+
TC-5RW 100mg	-	-	-	-
HPCL 75mg	-	-	±	+
HPCL 100mg	-	-	-	±

20

【0111】

図66～71はアミロイド作製4ヶ月前にHPMC(TC-5RW)100mgを投与したマウスの標本と化合物非投与の対照マウスの標本であり、[HE]はヘマトキシエオジン染色、[Congo Red]はコンゴ赤染色、[SAA]は抗SAA抗体による免疫染色を示している。MC(SM-4)は、アミロイドあるいはAAの蓄積をほとんど抑制しなかったが、HPMC(TC-5RW)やHPCLではアミロイドあるいはAAの蓄積を顕著に抑制した。このことは、HPMC(TC-5RW)やHPCLがアミロイド

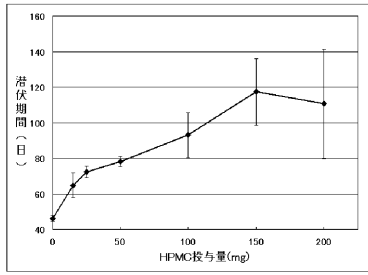
30

【産業上の利用可能性】

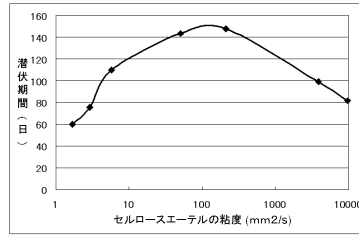
【0112】

本発明は、身近にあり、かつ安全な化合物を用いて、これまで難病といわれたコンフォメーション病に対する予防、治療薬となるものであり、人に対しては、これらの疾患の発症を予防し、また発症後の生命予後を改善することにより福祉の向上や医療経済の負担軽減に大いに貢献する。また、動物、特に家畜においては、これらの疾患の発症を予防することにより商品価値を失うことなく安全性が確保される。

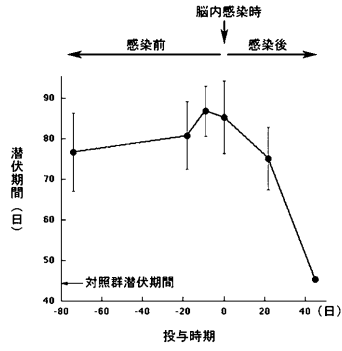
【図4】



【図21】

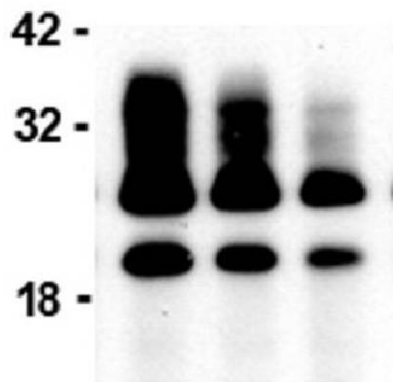


【図5】

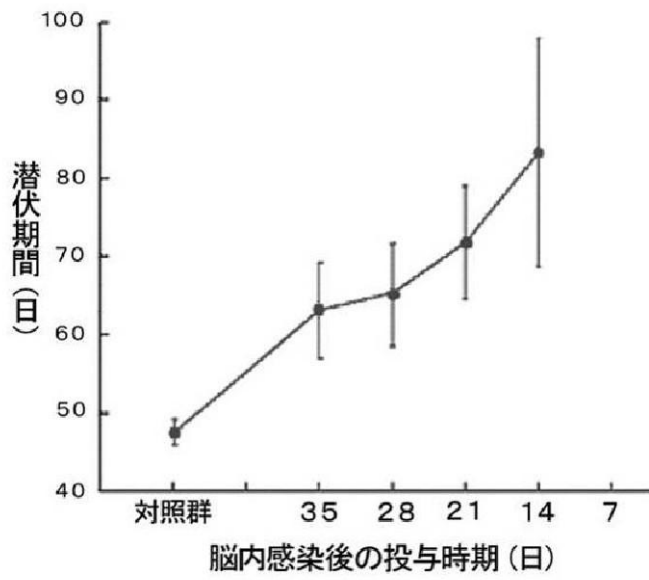


【図1】

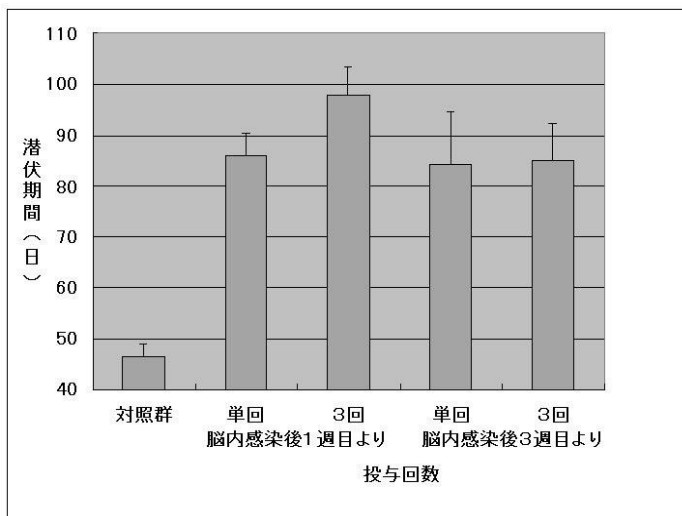
0 0.1 1 mg/ml



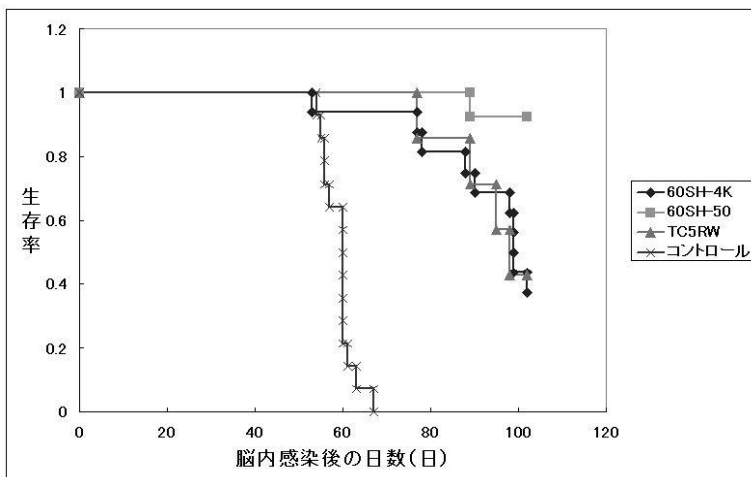
【 図 2 】



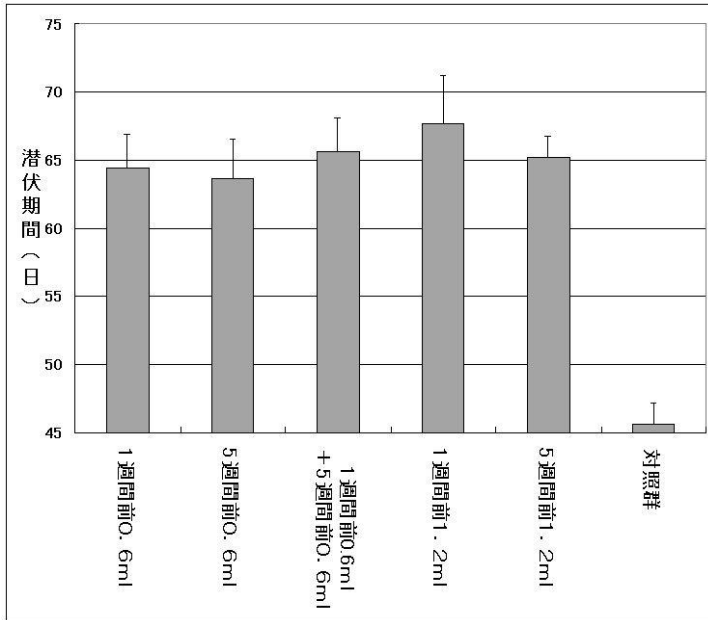
【 図 3 】



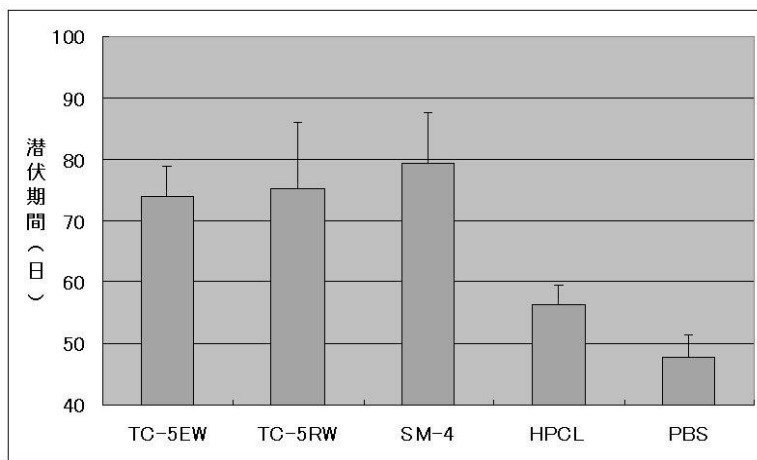
【 図 6 】



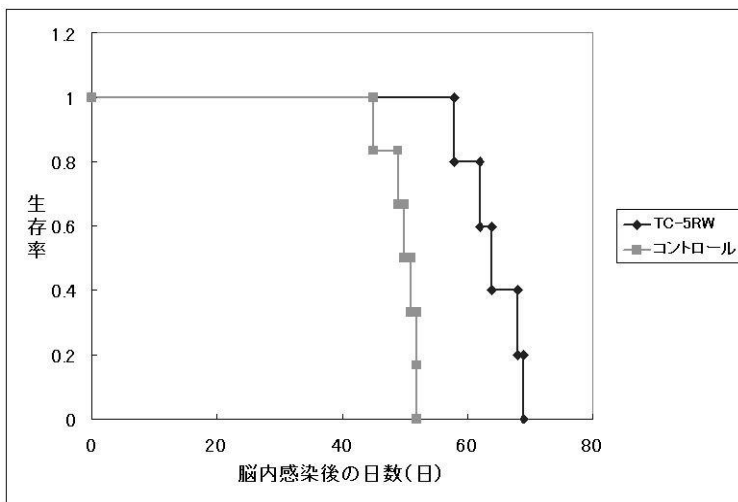
【 図 7 】



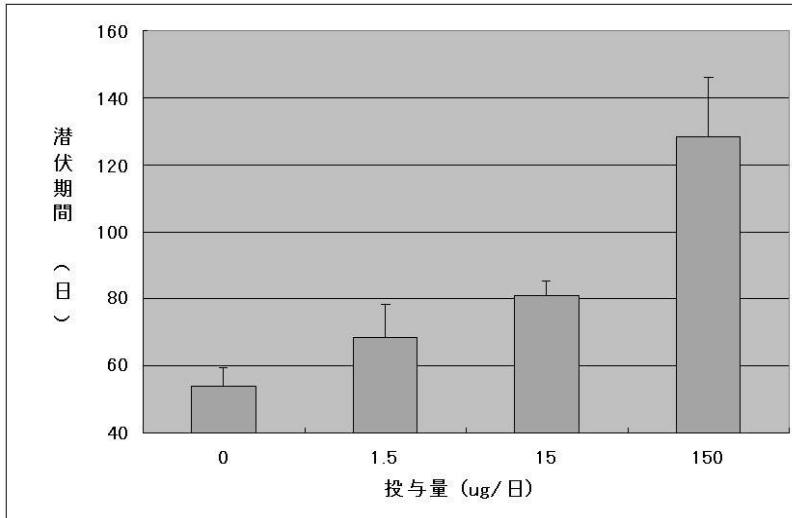
【 図 8 】



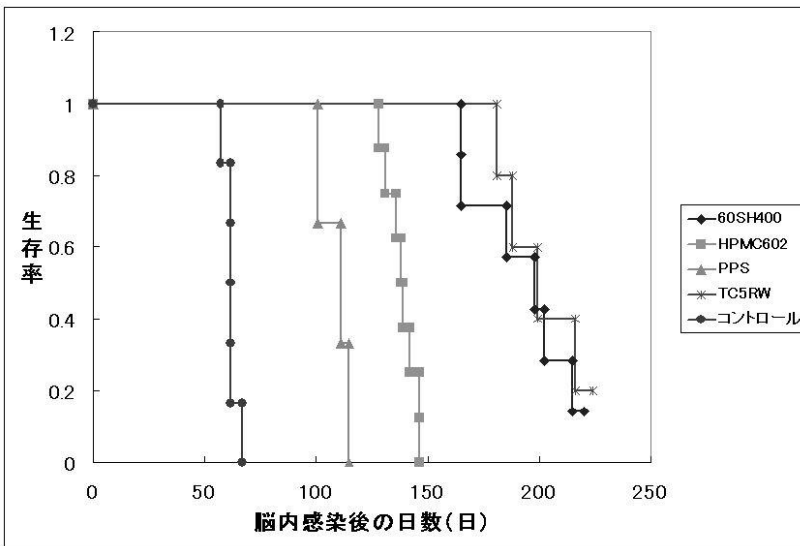
【 図 9 】



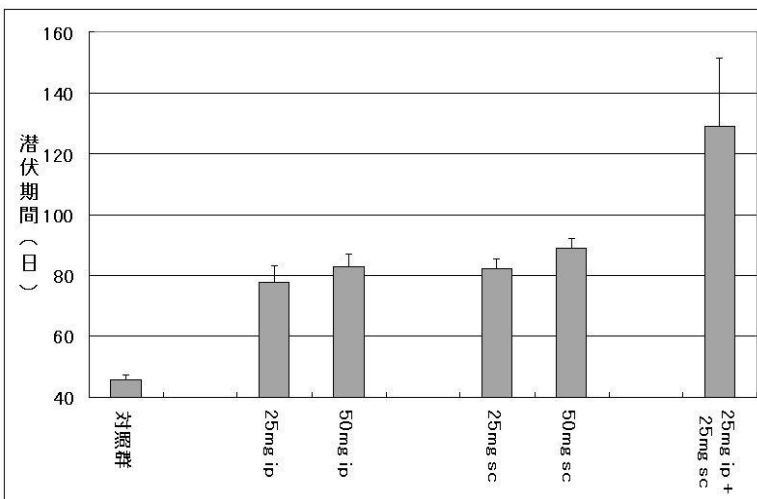
【図10】



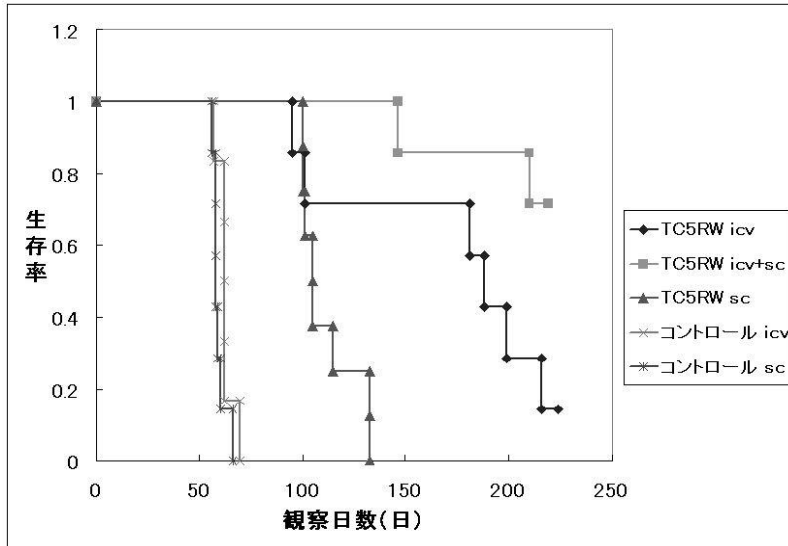
【図11】



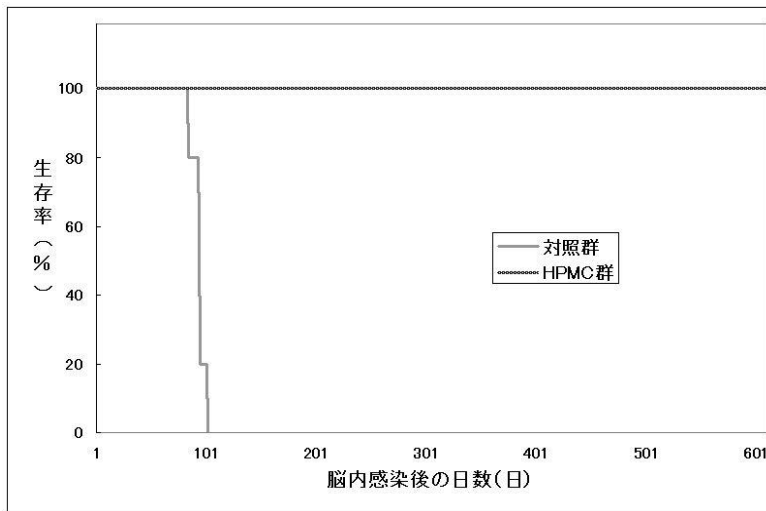
【図12】



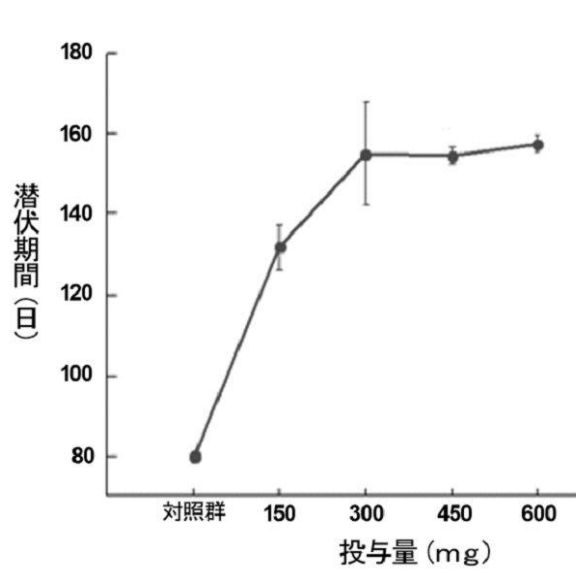
【図13】



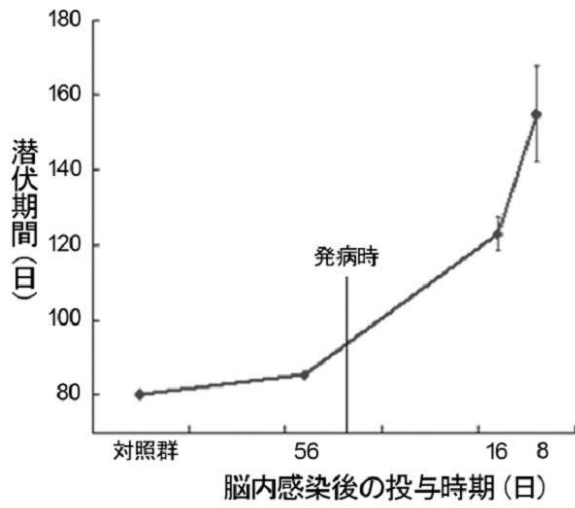
【図14】



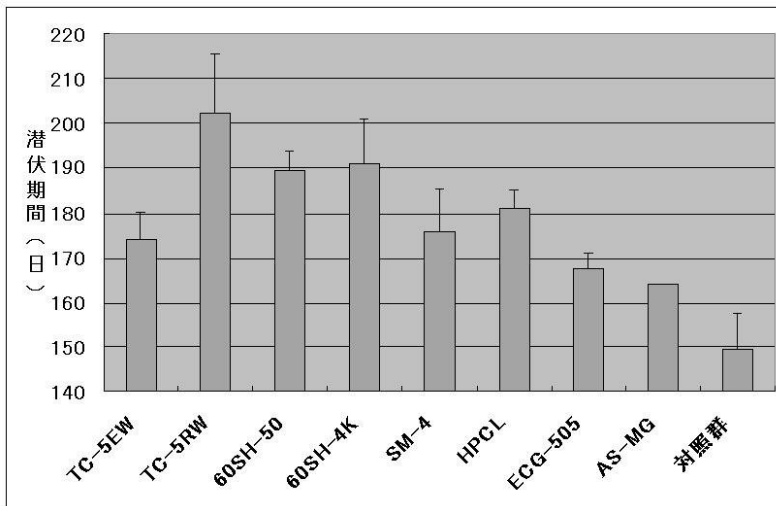
【図15】



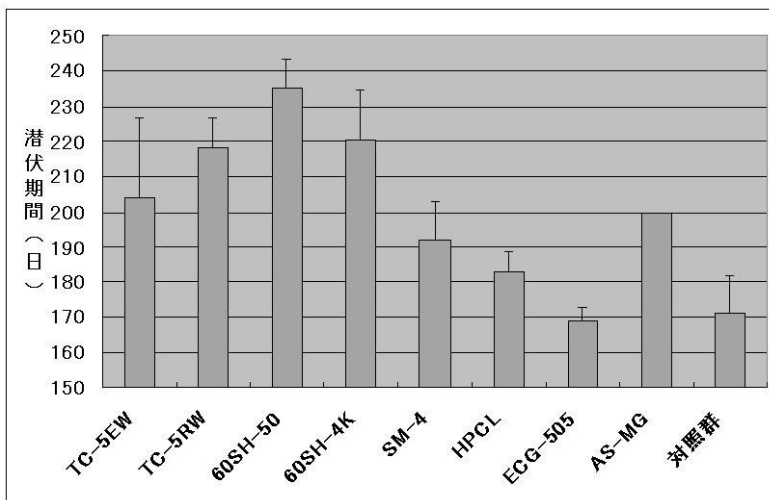
【図16】



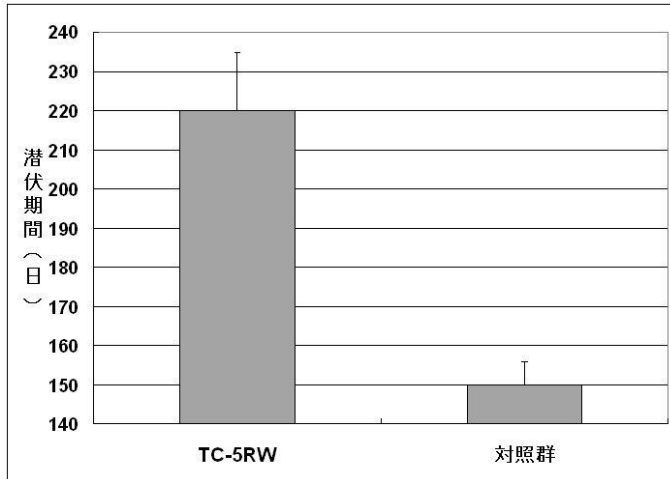
【図17】



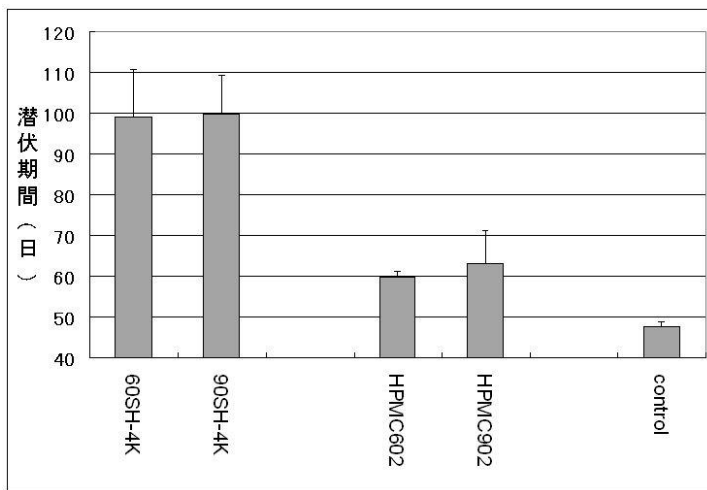
【図18】



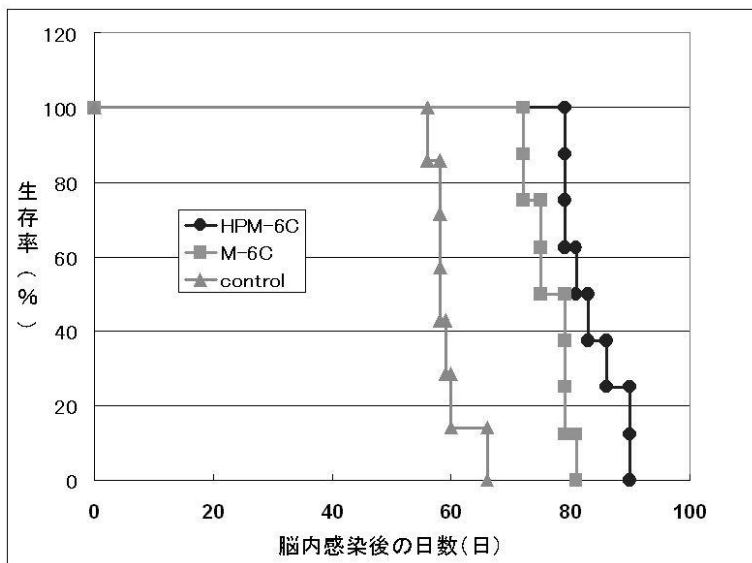
【図19】



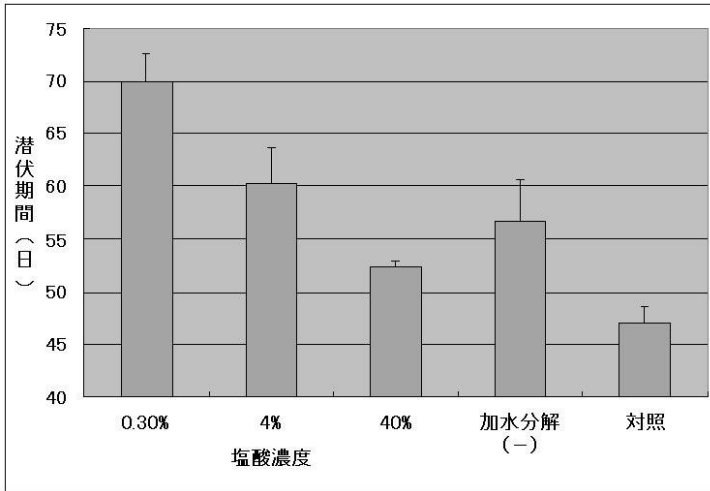
【図20】



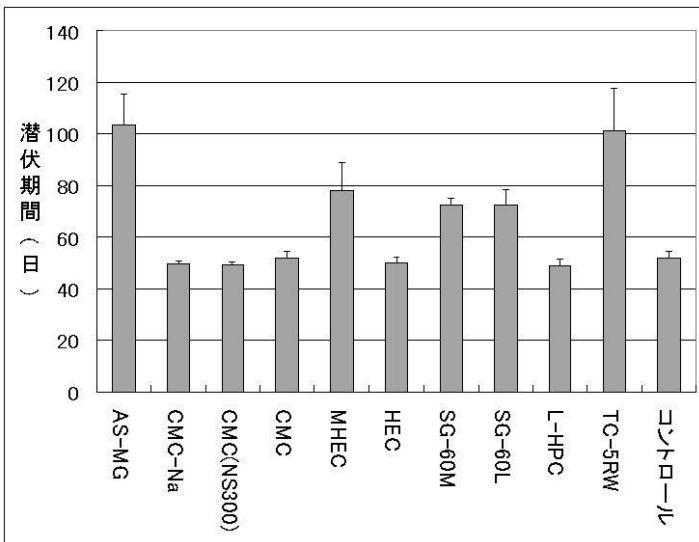
【図22】



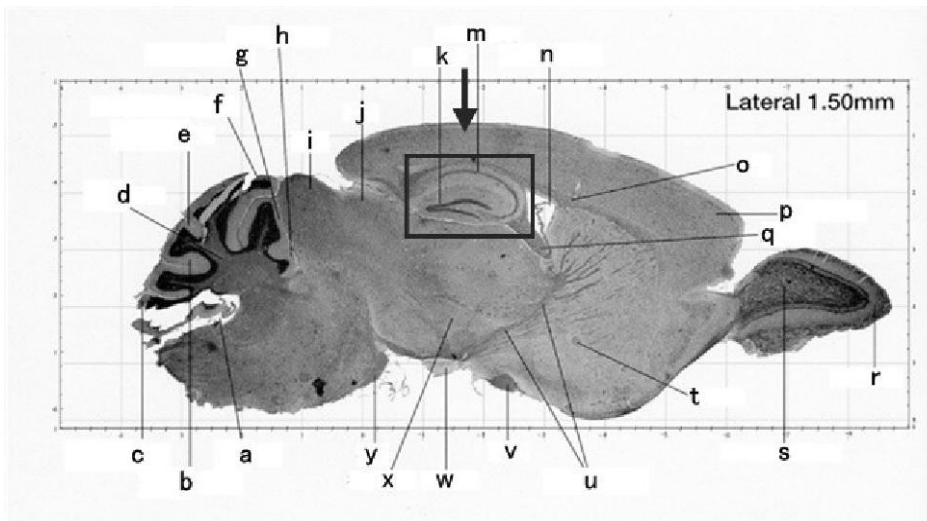
【図 2 3】



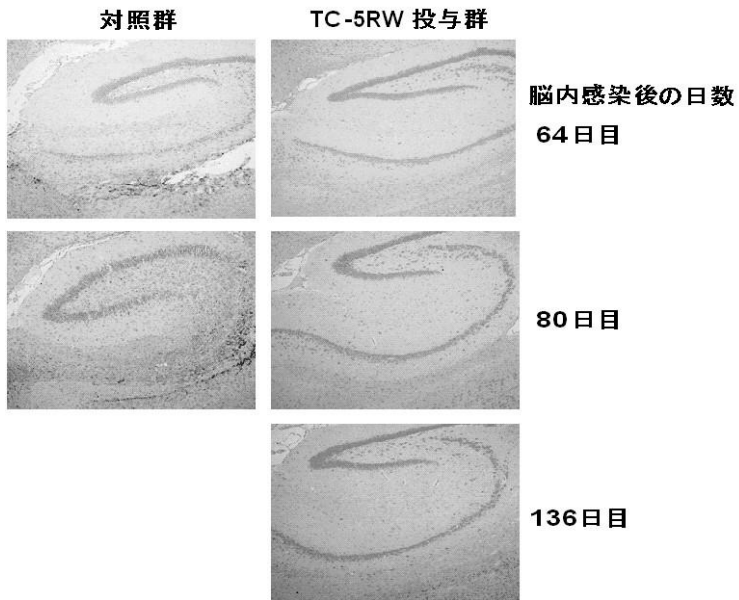
【図 2 4】



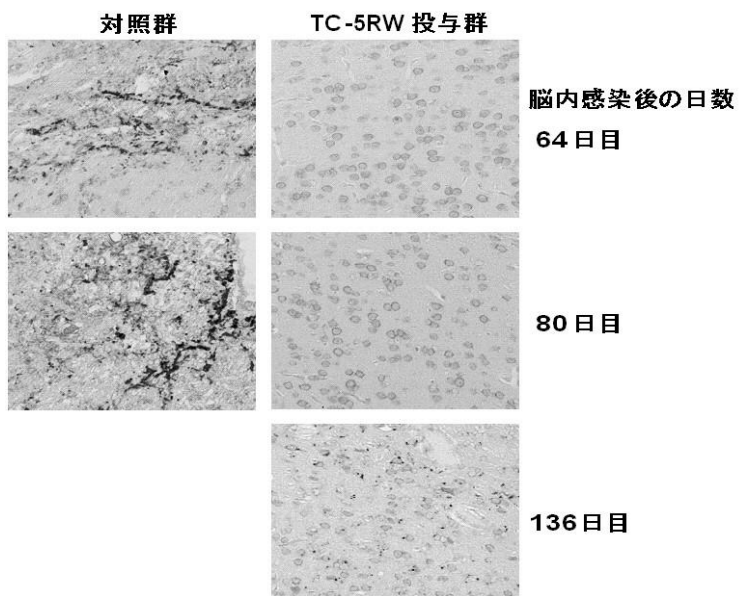
【図 2 5】



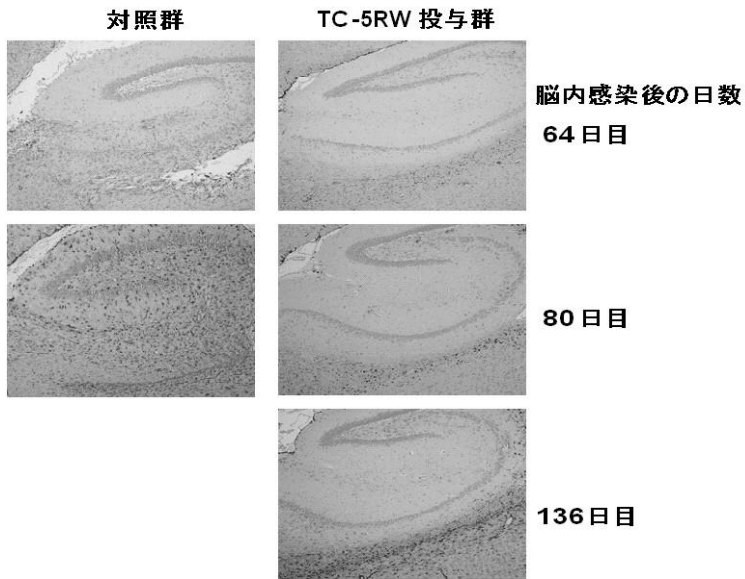
【図26】



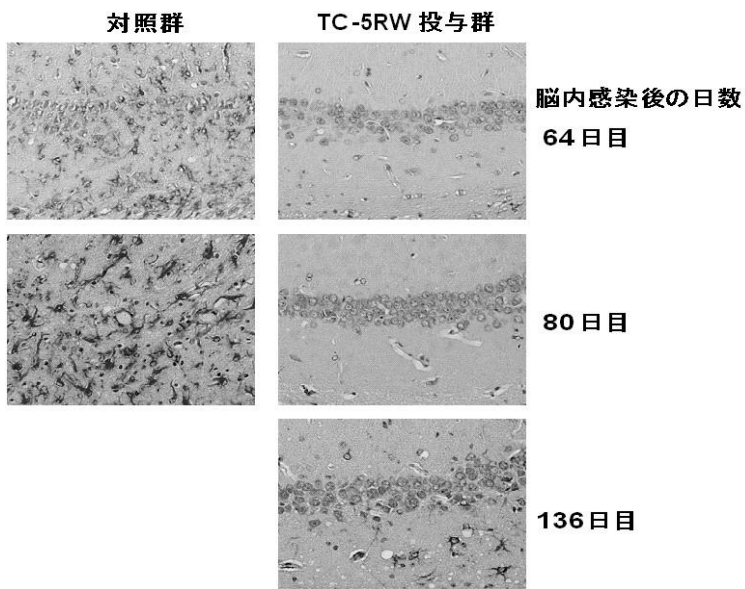
【図27】



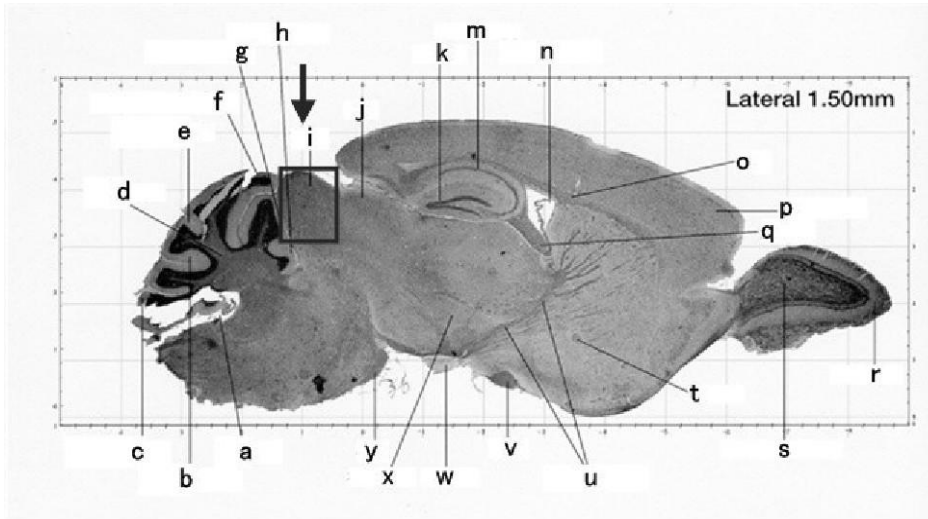
【図28】



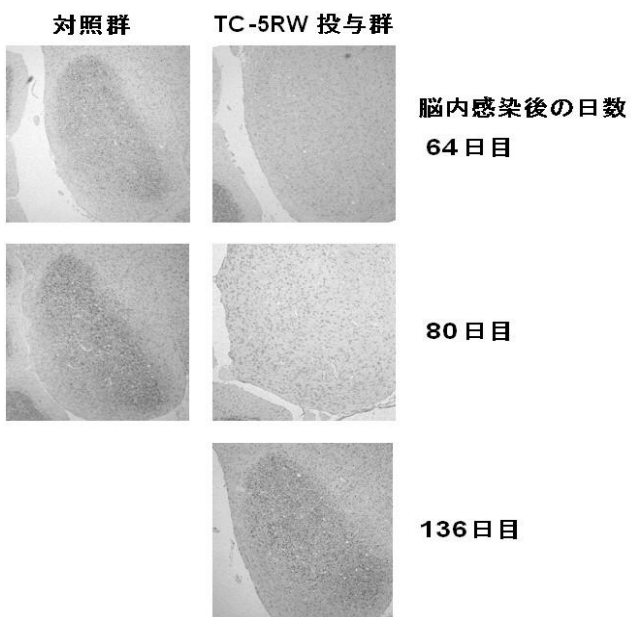
【図29】



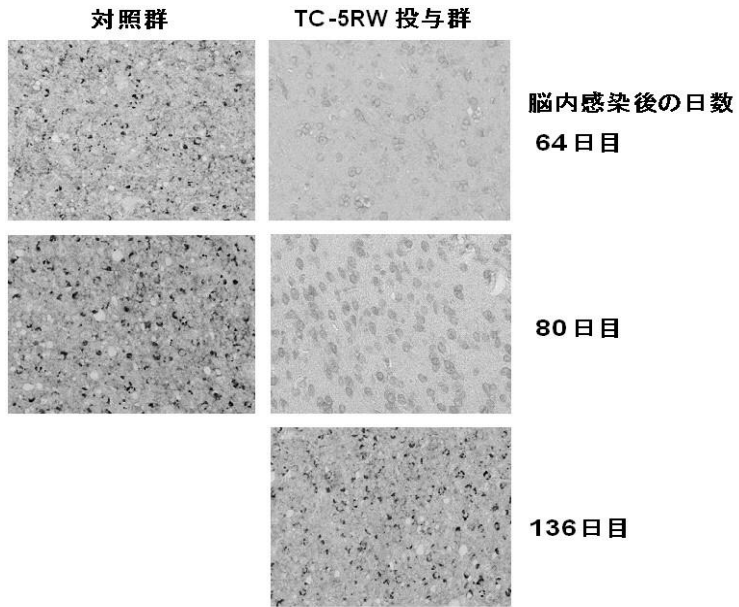
【図30】



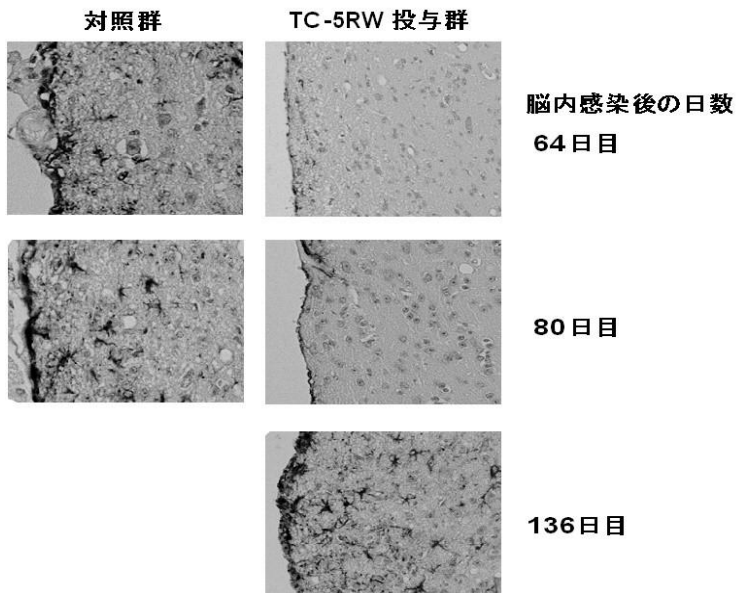
【図31】



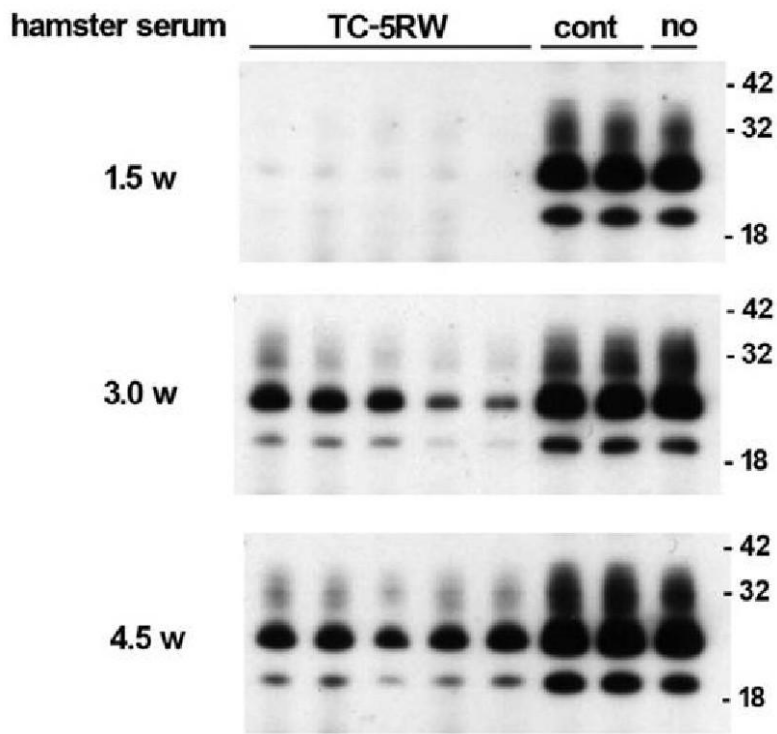
【図32】



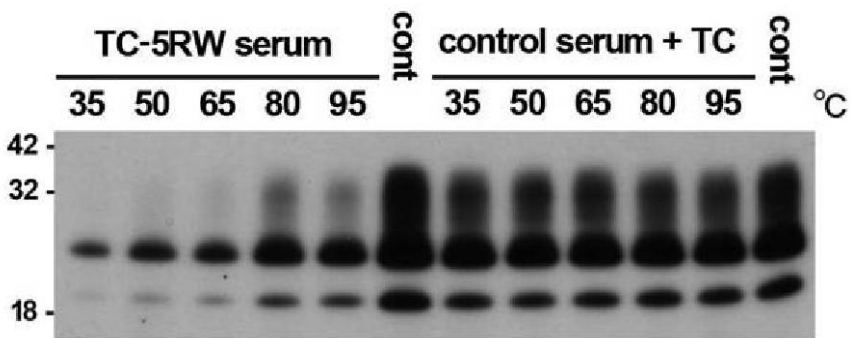
【図33】



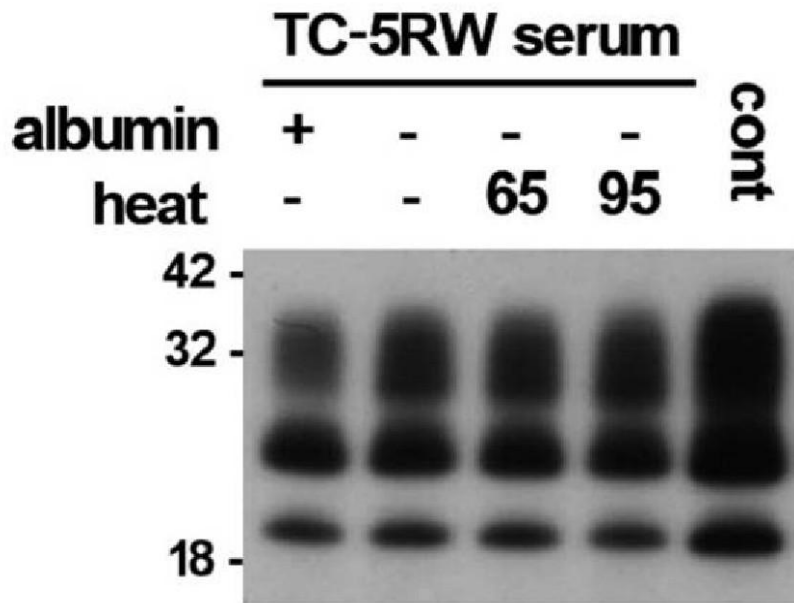
【 図 3 4 】



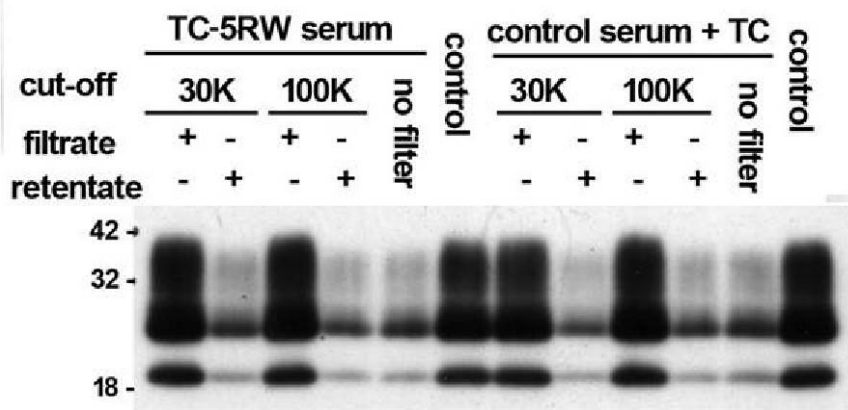
【 図 3 5 】



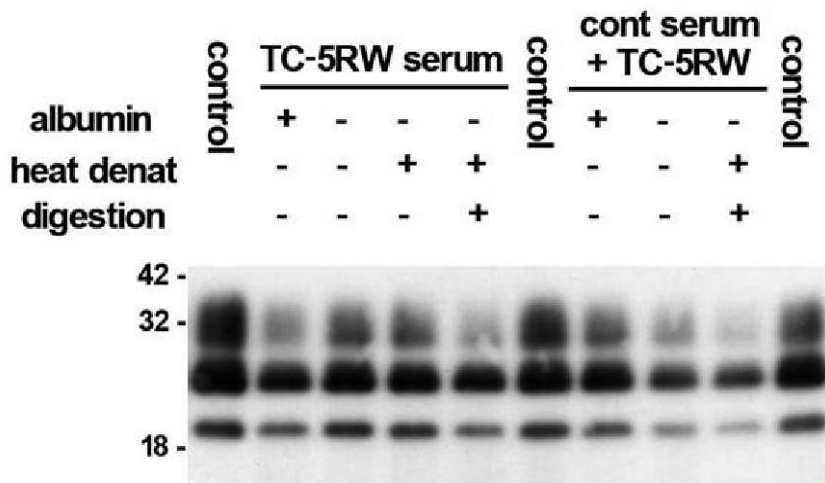
【 図 3 6 】



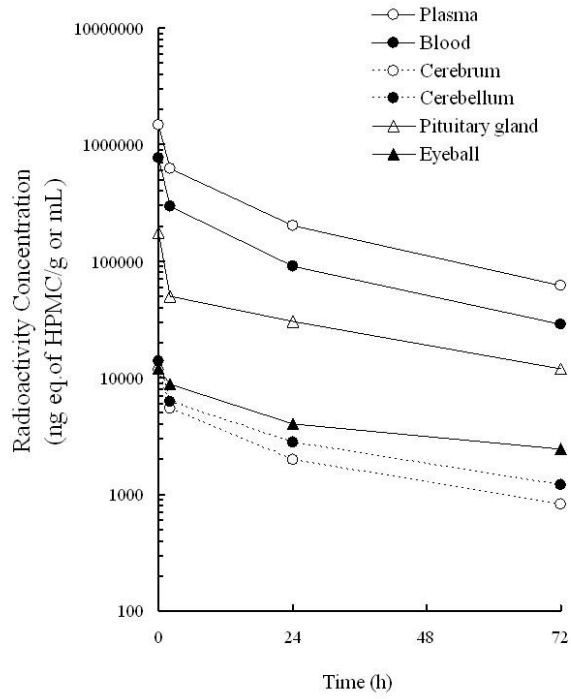
【 図 3 7 】



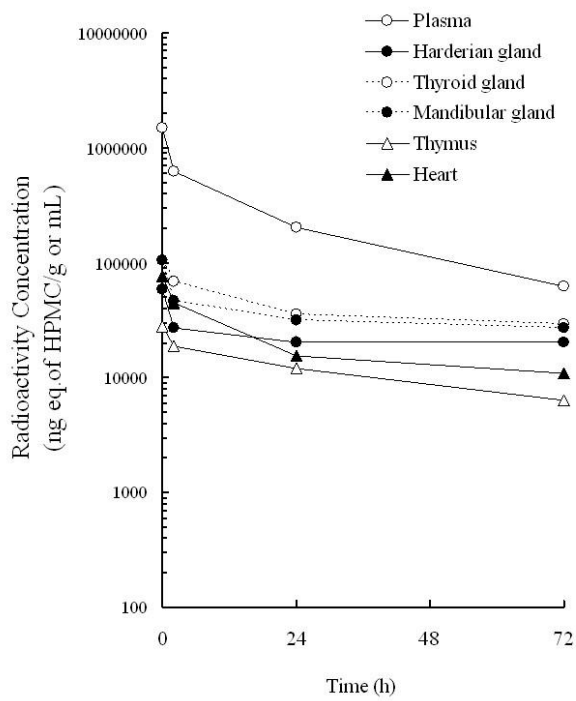
【 図 3 8 】



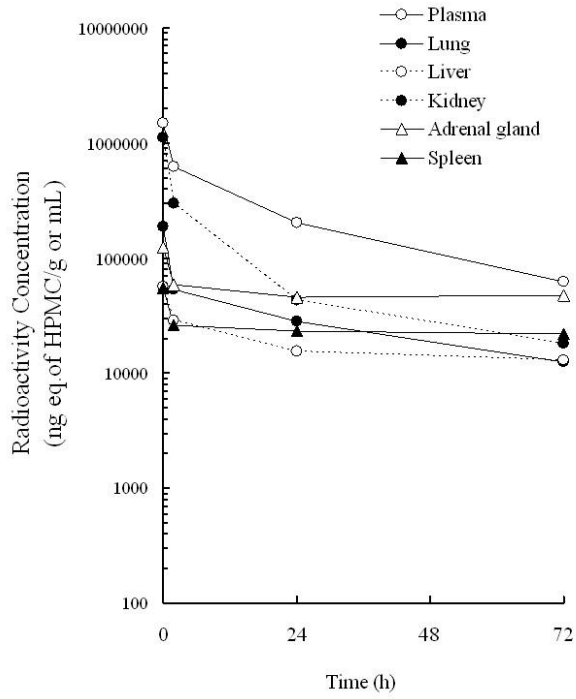
【 3 9 】



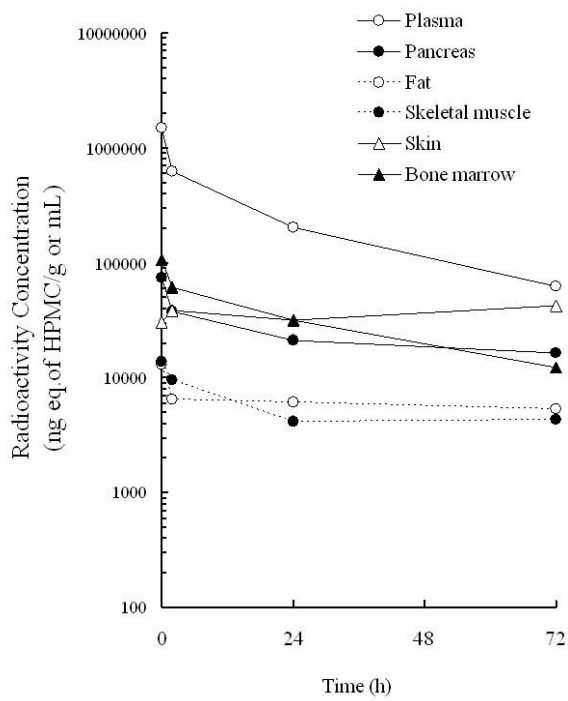
【 4 0 】



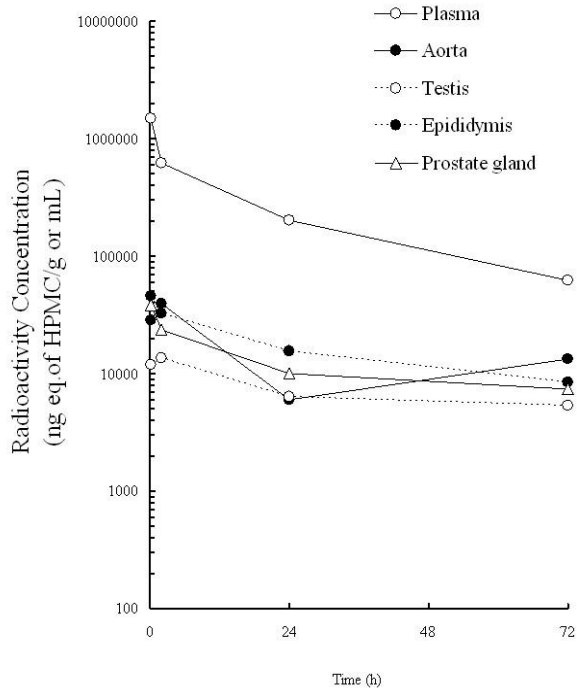
【 4 1 】



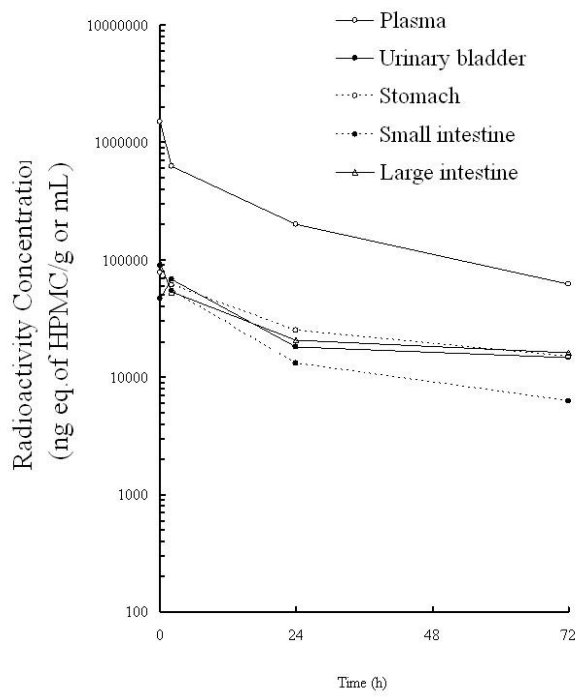
【 4 2 】



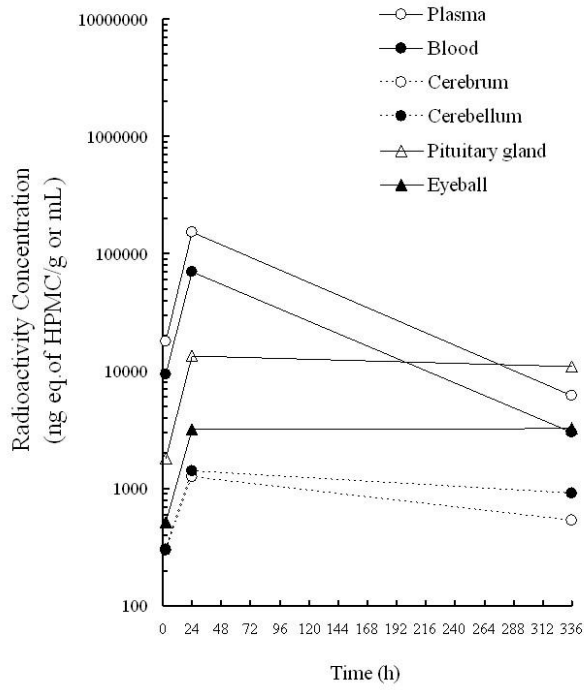
【 4 3 】



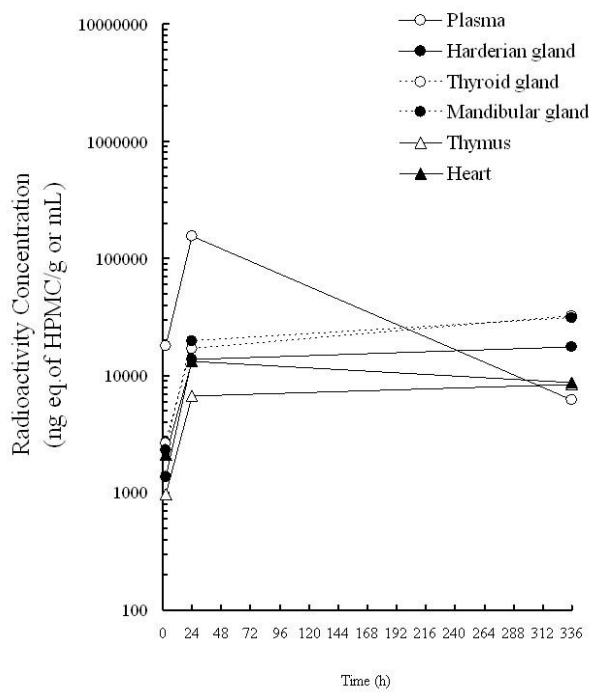
【 4 4 】



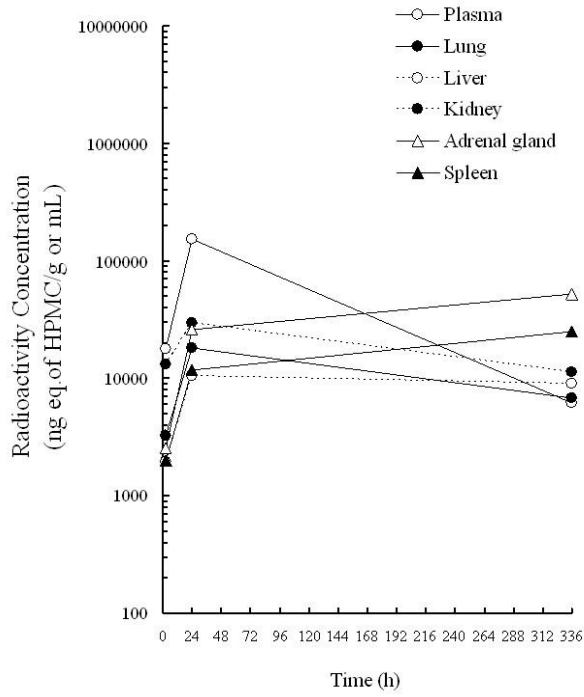
【 4 5 】



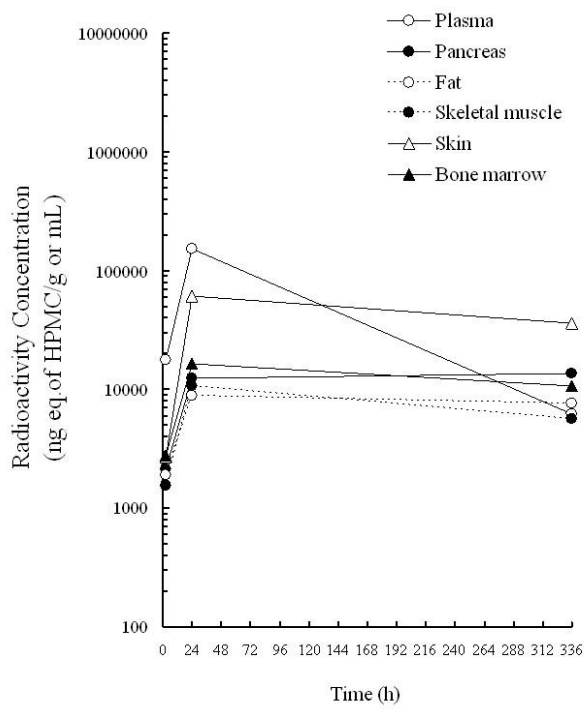
【 4 6 】



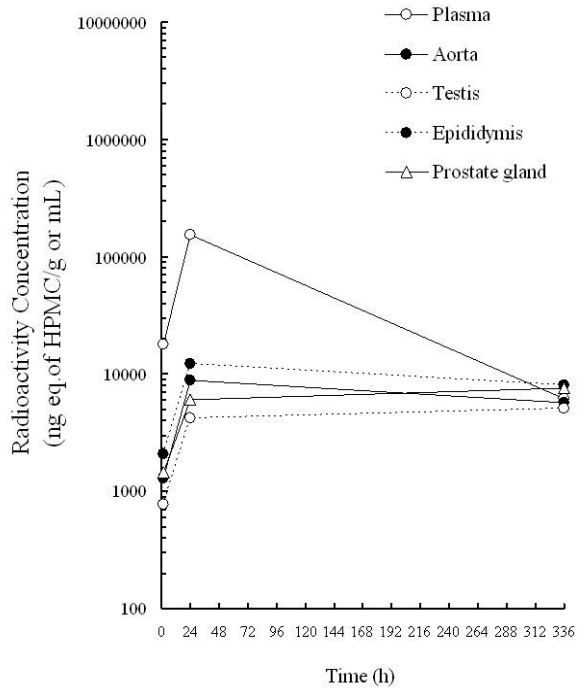
【 4 7 】



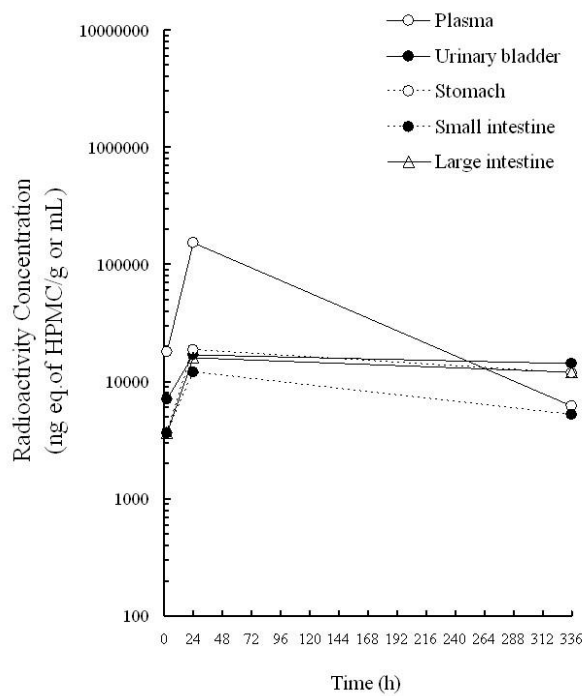
【 4 8 】



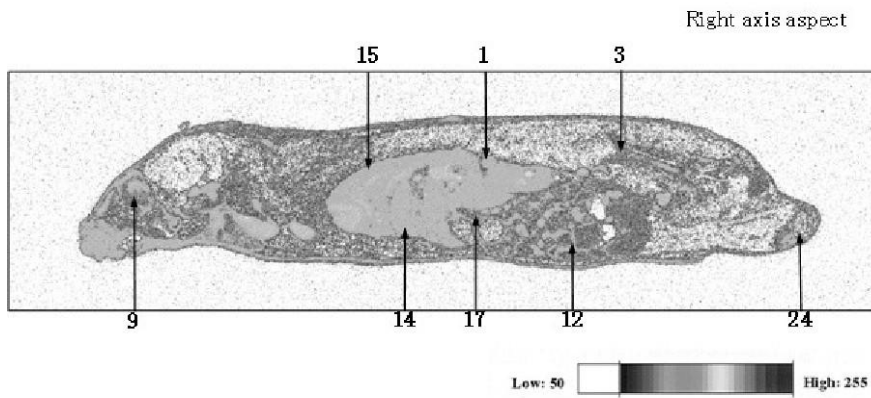
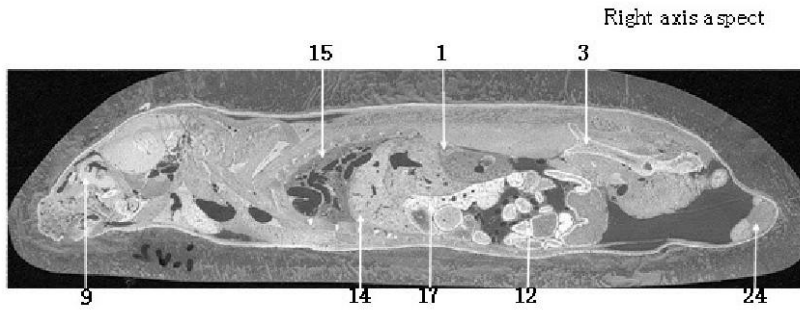
【 49 】



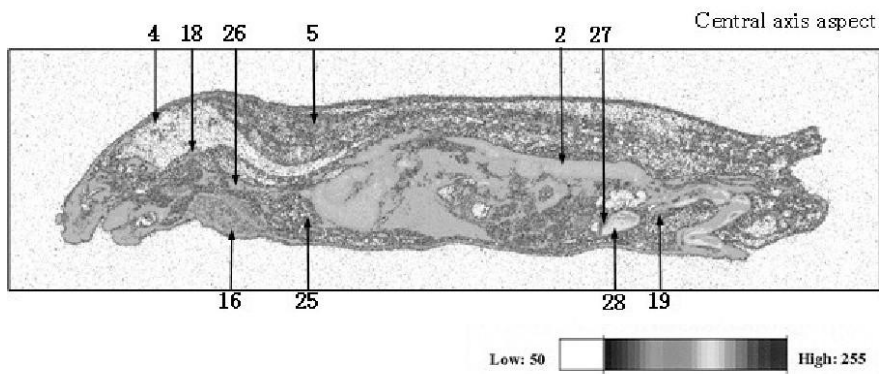
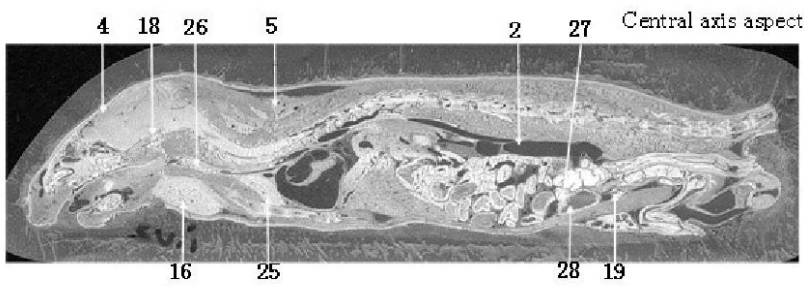
【 50 】



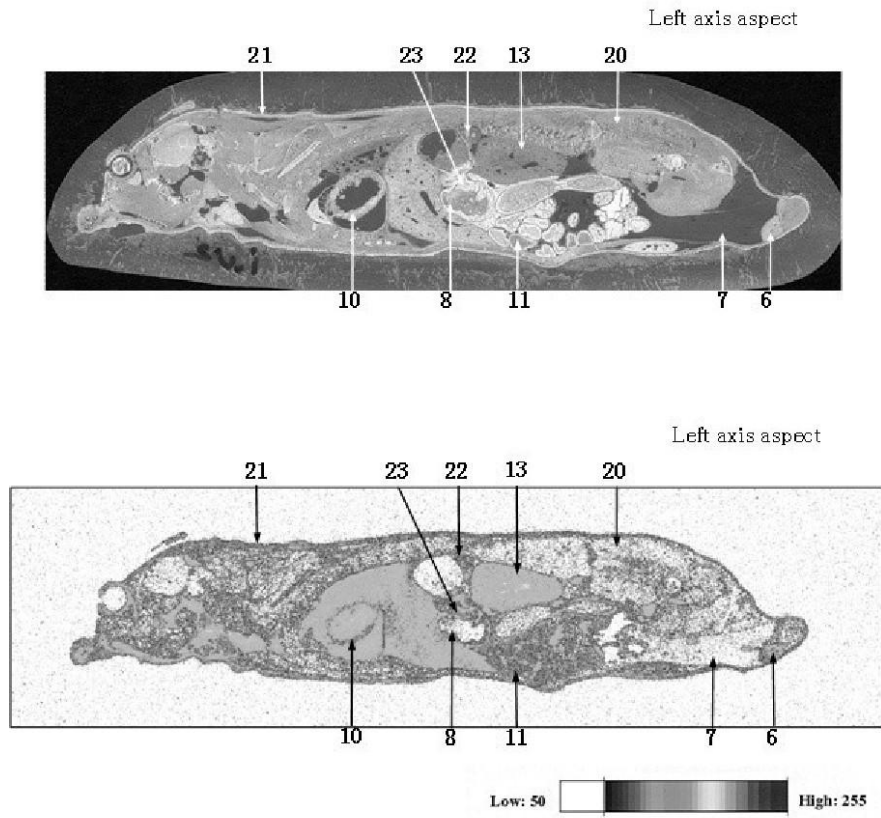
【 図 5 1 】



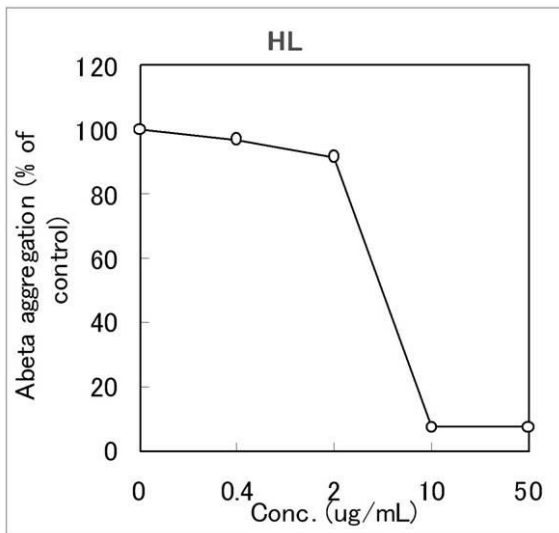
【 図 5 2 】



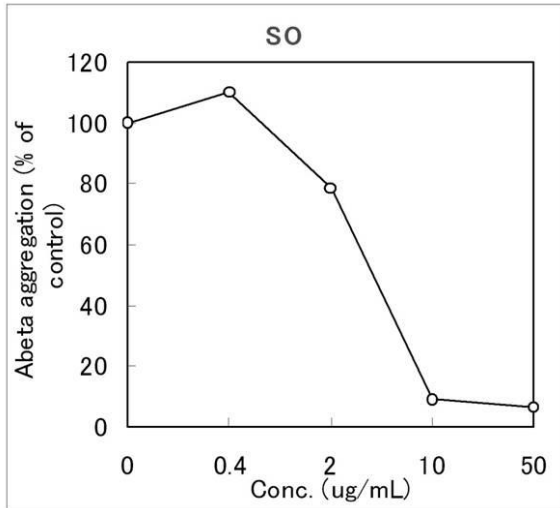
【 5 3 】



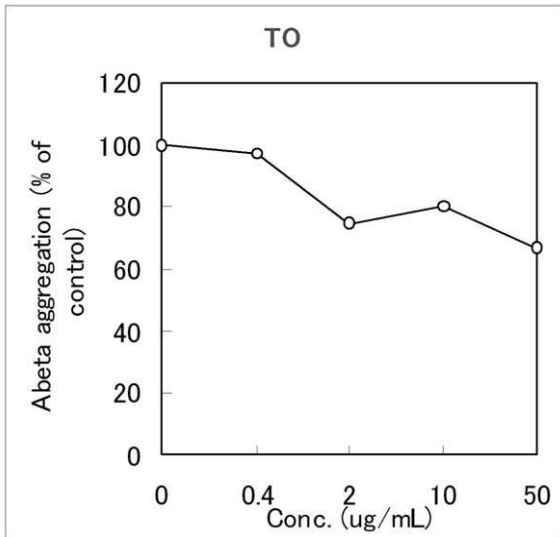
【 5 4 】



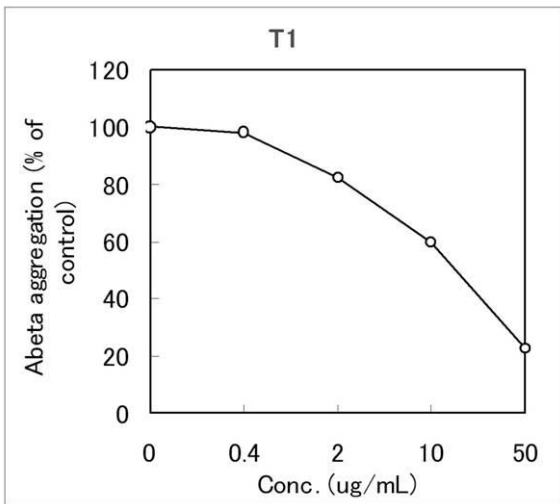
【 5 5 】



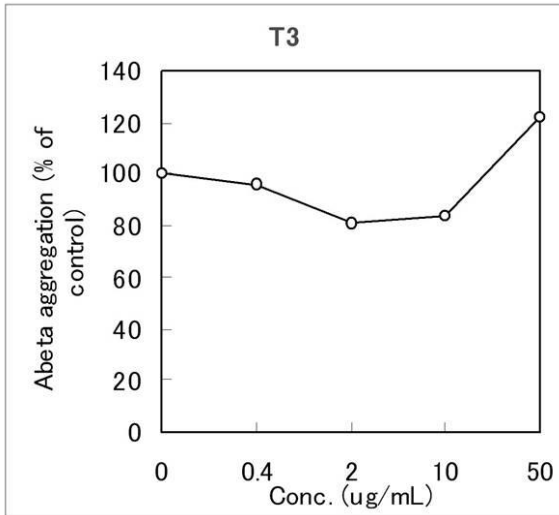
【 5 6 】



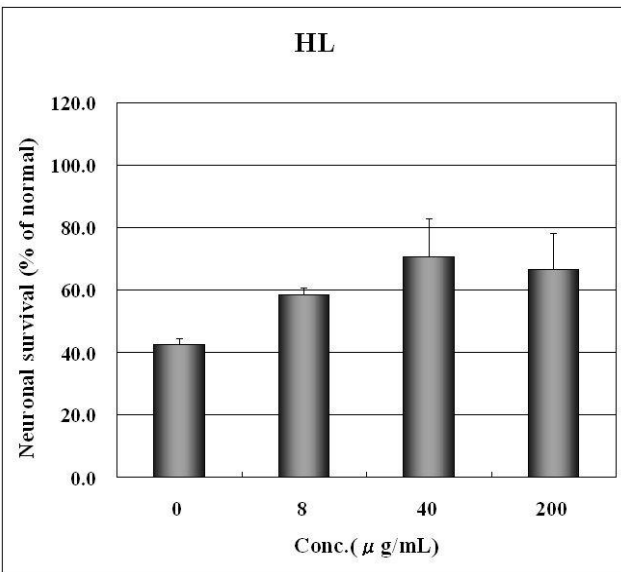
【 5 7 】



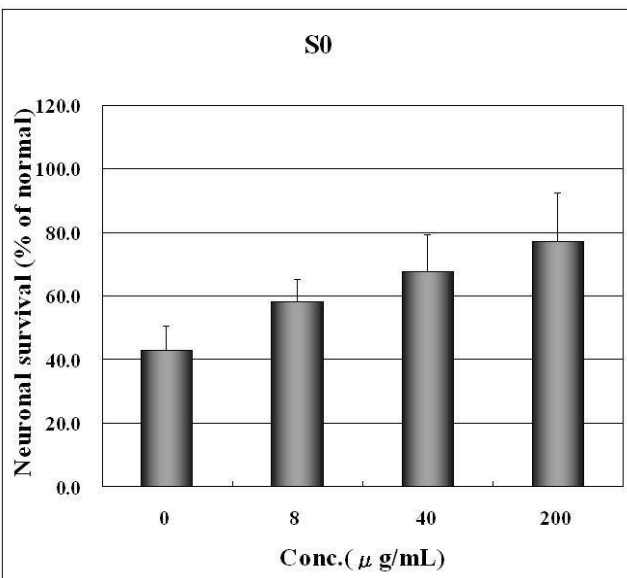
【 図 5 8 】



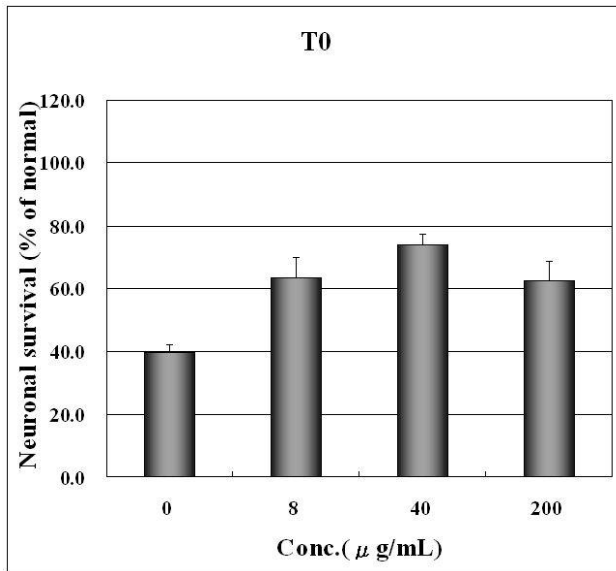
【 図 5 9 】



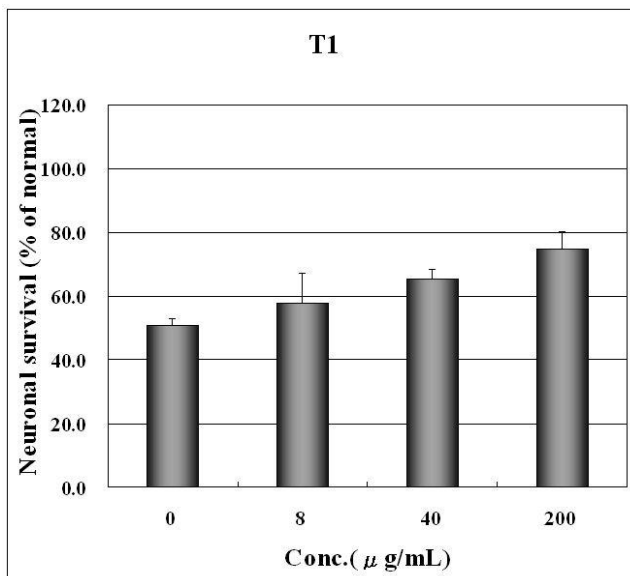
【 図 6 0 】



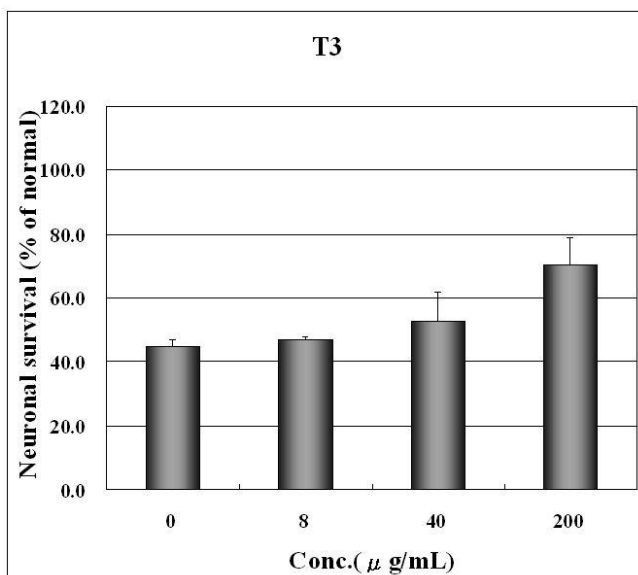
【 図 6 1 】



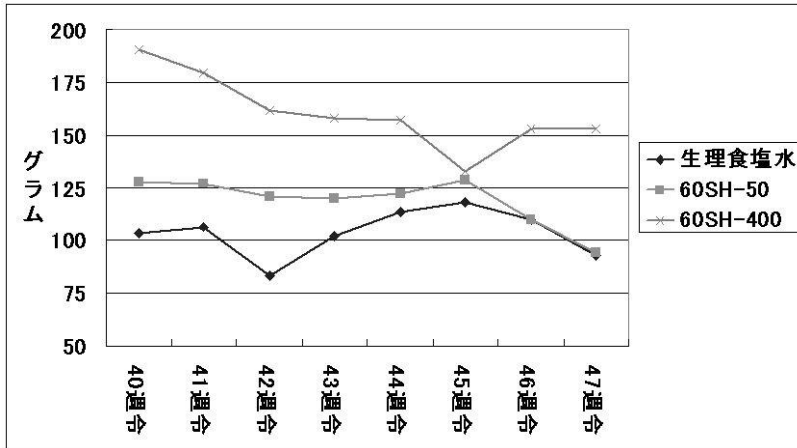
【 図 6 2 】



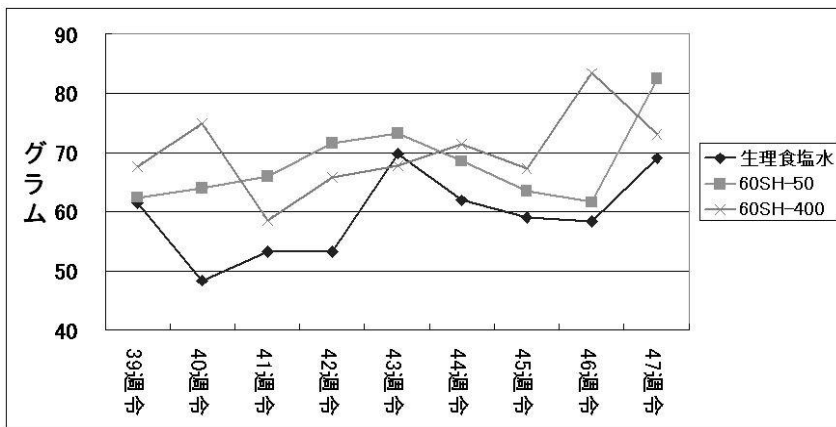
【 図 6 3 】



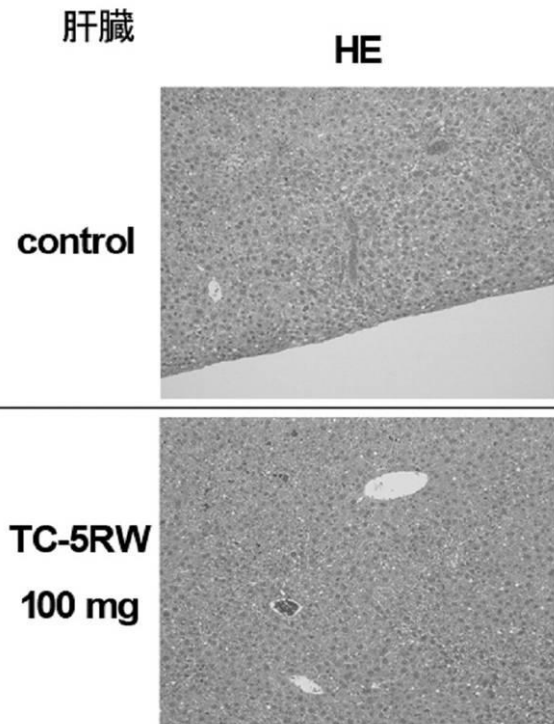
【 図 6 4 】



【 図 6 5 】



【 図 6 6 】

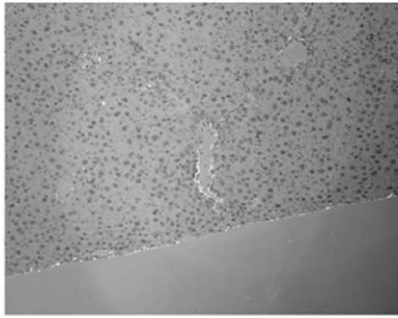


【 図 6 7 】

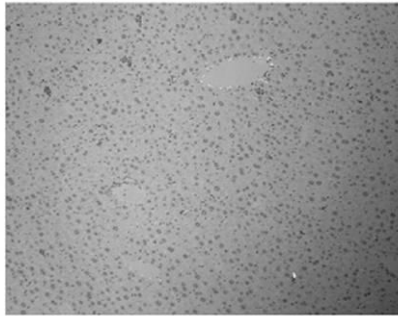
肝臓

Congo Red

control



TC-5RW
100 mg

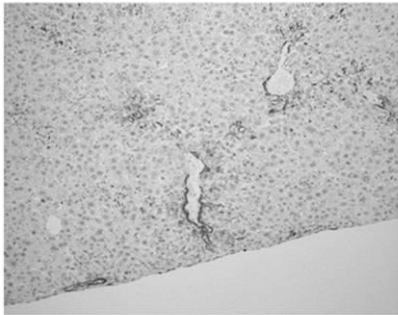


【 図 6 8 】

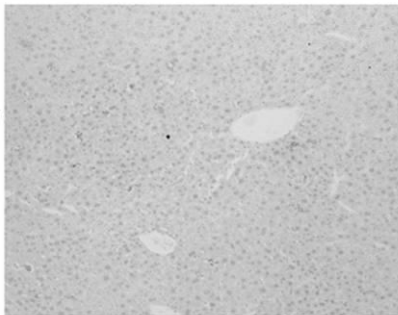
肝臓

SAA

control



TC-5RW
100 mg

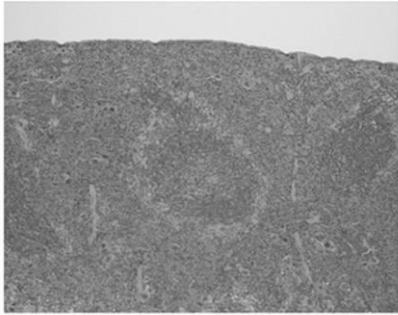


【 図 6 9 】

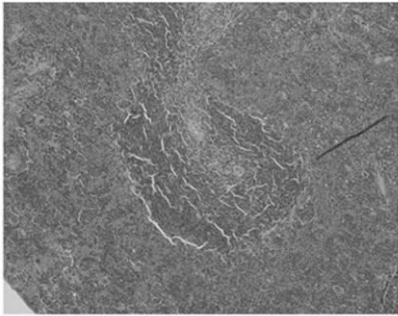
脾臓

HE

control



TC-5RW
100 mg

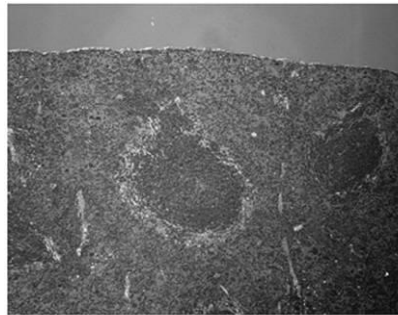


【 図 7 0 】

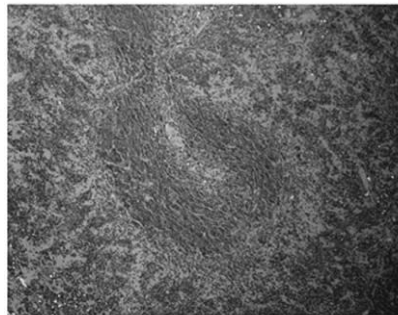
脾臓

Congo Red

control



TC-5RW
100 mg

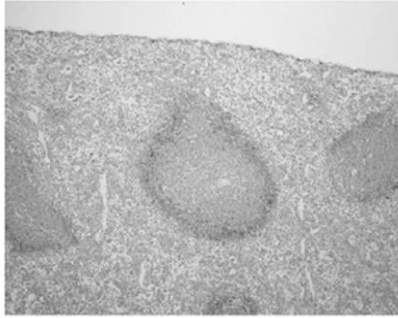


【図 7 1】

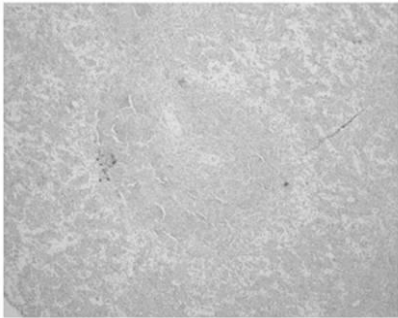
脾臓

SAA

control



TC-5RW
100 mg



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 25/16 (2006.01) A 6 1 P 25/16
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28

(56)参考文献 特開2003-40778(JP,A)
特開2003-267874(JP,A)
特表2001-513569(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B 11/08
A61K 31/717
A61P 25/02
A61P 25/14
A61P 25/16
A61P 25/28
C08B 11/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)