(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2006-305345
(P2006-305345A)
(43)公開日　平成18年11月9日(2006.11.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61M 1/14	(2006.01)	A61M	1/14	523	4B024
A61M 1/28	(2006.01)	A61M	1/14	525	4B063
A61K 45/00	(2006.01)	A61M	1/28	ZNA	4C077
A61K 31/155	(2006.01)	A61K	45/00		4C084
A61K 31/4415	(2006.01)	A61K	31/155		4C086

審査請求 有　請求項の数 12　ＯＬ　（全 31 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-113192 (P2006-113192)
(22)出願日　平成18年4月17日 (2006.4.17)
(62)分割の表示　特願2000-565926 (P2000-565926)の分割
原出願日　平成11年8月23日 (1999.8.23)
(31)優先権主張番号　特願平10-237108
(32)優先日　平成10年8月24日 (1998.8.24)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願平11-155393
(32)優先日　平成11年6月2日 (1999.6.2)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　597142387
黒川　清
東京都新宿区市谷柳町４９市ヶ谷ヒルズ４０１
(71)出願人　597142376
宮田　敏男
神奈川県伊勢原市桜台２丁目１６－２５　エクセル伊勢原１０２号
(71)出願人　000125369
学校法人東海大学
東京都渋谷区富ヶ谷２丁目２８番４号
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】カルボニルストレス状態改善剤、および腹膜透析液

(57)【要約】　（修正有）
【課題】腹膜透析におけるカルボニル化合物による腹膜内蛋白の修飾を抑制し、腹膜透析に伴う腹膜障害を改善のための方法、透析液、薬剤の提供。
【解決手段】アミノグアニジンなどのカルボニル化合物トラップ剤によって、腹膜透析液中に生成・蓄積するカルボニル化合物が不活性化、あるいは除去される。腹膜透析液の液滅菌中および保存中に生成したカルボニル化合物は、予めトラップ剤と接触させることにより除去される。またトラップ剤を腹膜透析液に添加したり、カルボニル化合物トラップ用カートリッジを用いて循環させることで、腹膜透析に伴い腹腔内に流出する患者血液由来のカルボニル化合物の除去も可能となる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析における腹腔内のカルボニルストレス状態改善剤。
【請求項２】
カルボニル化合物トラップ剤が、不溶性の担体に固定化されている請求項１に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
【請求項３】
カルボニル化合物トラップ剤が、腹膜透析液に混入させるためのものである請求項１に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
【請求項４】
カルボニル化合物トラップ剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、ビグアナイド化合物、またはＳＨ基含有化合物、あるいはそれらの誘導体からなる群から選択される化合物である、請求項１～３のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤。
【請求項５】
カルボニル化合物トラップ剤が、メイラード反応阻害剤である、請求項１～３のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤。
【請求項６】
カルボニル化合物トラップ剤が、カルボニル化合物を吸着することができる腹膜透析液に不溶性の化合物である、請求項１に記載のカルボニルストレス状態改善剤。
【請求項７】
請求項２および／または請求項６のカルボニル化合物トラップ剤を充填した腹膜透析液中のカルボニル化合物トラップ用カートリッジ。
【請求項８】
請求項７に記載のカルボニル化合物トラップ用カートリッジに腹膜透析液を通過させる工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法。
【請求項９】
次の工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法。
ａ）請求項２および／または請求項６に記載のカルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液とを接触させる工程、および
ｂ）カルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液を分離する工程
【請求項１０】
カルボニル化合物トラップ剤を含む腹膜透析液。
【請求項１１】
第１室および第２室からなる分画された容器に収容された腹膜透析液において、第１室に還元糖が収容され、第２室にカルボニル化合物トラップ剤が収容されているものである、請求項１０に記載の腹膜透析液。
【請求項１２】
カルボニル化合物トラップ剤が腹膜透析液とともに腹腔内に投与するためのものである、請求項１０に記載の腹膜透析液。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、腎不全患者の治療に用いられる腹膜透析液に関する。
【背景技術】
【０００２】
慢性腎不全患者に行われる透析には、血液透析と腹膜透析とがある。腹膜透析とは、腹腔内に透析液を一定時間蓄留させ、体内の老廃物を腹膜を通して透析液中へ排泄させた後、透析液を回収することにより行われる透析方法である。腹膜透析は、間欠的腹膜透析法（IPD）と持続的外来腹膜透析法（CAPD：continuous ambulatory peritoneal dialysis）

に大別される。CAPD法は、IPD法の長所を取り入れ、腹腔内に注入する灌流液の貯留時間を長くして、１日４回程度の液交換とする腹膜透析法である。

【０００３】

腹膜透析は簡便で時間的な拘束が少ないなどの長所を持つが、腹膜透析を長期間続けていると次第に除水能が低下し、腹部のタンパク質の変性や硬化、腹膜融合などが起きる場合があることが知られている。

【０００４】

これらの原因の一部は、腹膜透析液に含まれるグルコースにあると考えられる。現在、使用されている腹膜透析液の多くは、浸透圧調節剤としてグルコースを含有する。グルコースは熱に対して不安定で、滅菌時に一部が分解し、タンパク質を修飾し得る反応性の高いカルボニル化合物が分解産物として生成すると考えられる。また、グルコースを含む腹膜透析液は、滅菌後、保存中にも分解産物が生成・蓄積すると考えられる。

【０００５】

一般にグルコースの分解は、中性付近から塩基性側で生じ易いことから、通常の腹膜透析液では、グルコースの安定性を考慮して、酸性側（pH 5.0～5.4）のpHを与える緩衝系が用いられることが多い。ところが、このような酸性の腹膜透析液は、腹腔マクロファージの免疫防御機構の低下や細菌の進入による腹膜炎の発生、腹膜中皮細胞への傷害性などが危惧される。このような相反する問題点を解消するために、中性付近における腹膜透析液中のグルコースの分解に由来するカルボニル化合物生成防止、あるいはカルボニル化合物の除去が切望されていた。

【０００６】

一方、高濃度のグルコースが配合された腹膜透析液は、タンパク質を修飾するなど、腹膜にとって好ましくないとの観点から、より分解物の生成が低いグルコースポリマーを用いた腹膜透析液が開発されている（特許文献１、非特許文献１）。

【０００７】

さらに同様の視点から浸透圧調節剤としてグルコースに代えてシクロデキストリン（特許文献２）、二糖類（特許文献３）、アミノ酸(非特許文献２)を使用した腹膜透析液も提案されている。また、システインを添加してグルコースの分解を抑制した腹膜透析液も開示されている（特許文献４）。

【０００８】

これらの方法はいずれも、腹膜透析液中の高濃度グルコースに起因する不都合の改善を目的としたものである。

【０００９】

ところで、慢性腎不全の患者では、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGE（Advanced glycation end products）が著しく蓄積していることが報告されている（非特許文献３～６）。腎不全においては、非酵素的生化学反応によりカルボニル化合物が高負荷の状態（カルボニストレス）となり、タンパク質修飾が亢進される病態が存在しており、糖・脂質からカルボニル化合物が生成されタンパク質を修飾するためであると考えられる(非特許文献７)。カルボニルストレスは、単にコラーゲンやフィブロネクチンなどのマトリックスタンパク質の構築を変化させるという問題のみならず、カルボニル化合物の持つ各種の細胞に対する生理活性のために、腹膜透過性の亢進・炎症の惹起等にも関係すると考えられる。

【００１０】

腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用がある。そのため腹膜透析液中のカルボニル化合物濃度の高いカルボニルストレスの状態がもたらされ、腹腔内のタンパク質がカルボニル修飾を受けて腹膜の機能が低下し、腹膜硬化症の進展に関与すると考えられる 。

実際に、腹膜透析患者において、腹腔内が導入されたグルコースによってカルボニルストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明された（非

特許文献８、非特許文献９、Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press、Combet, S. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press、Inagi, R. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press）。

【００１１】

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【特許文献１】特開平１０－９４５９８号
【特許文献２】特開平８－７１１４６号
【特許文献３】特開平８－１３１５４１号
【特許文献４】特開平５－１０５６３３号
【非特許文献１】Wilkie, M.E. et al., Perit. Dial. Int., 17: S47-50 (1997)
【非特許文献２】Faller, B. et al., Kidney Int., 50(suppl.56), S81-85 (1996)
【非特許文献３】Miyata, T. et al., Kidney Int., 51: 1170-1181 (1997)
【非特許文献４】Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206 (1996)
【非特許文献５】Miyata, T. et al., Kidney Int., 54:1290-1295(1998)
【非特許文献６】Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 9: 2349-2356(1998)
【非特許文献７】Miyata, T. et al., Kidney Int., 55: 389-399,(1999)
【非特許文献８】Yamada, K. et al., Clin. Nephrol., 42: 354-361 (1994)
【非特許文献９】Nakayama, M. et al., Kidney Int., 51: 182-186 (1997)

【発明の開示】

【００１２】

本発明は、腹膜透析におけるカルボニル化合物による障害、すなわちカルボニルストレス状態の改善のための方法、並びにこの方法を実現するための透析液や薬剤の提供を課題とする。本発明におけるカルボニル化合物とは、腹膜透析を受ける患者に由来するカルボニル化合物、腹膜透析液自体がその製造中または保存中に生成したカルボニル化合物、並びに腹膜透析中に腹腔内で生成されるカルボニル化合物が対象となる。これらのカルボニル化合物による透析患者に対する障害を、できるだけ小さくすることが本発明の課題である。

【００１３】

本発明者は、患者の腹腔内に注入された腹膜透析液中に含まれる反応性の高いカルボニル化合物は、もともとの腹膜透析液に由来するものだけではないという知見を得た。即ち、腹膜透析患者から回収された腹膜透析排液中のグルコース以外のカルボニル化合物は、透析前の５倍となり、増加分は血液由来のカルボニル化合物と考えられた（図１）。このことから、腹腔内の腹膜透析液中のカルボニル化合物は、腹膜透析液の加熱滅菌の過程で生じるカルボニル化合物、あるいは腹膜透析液の保存中に生成・蓄積したカルボニル化合物に加え、血液由来のカルボニル化合物および腹腔内で生成・蓄積するカルボニル化合物の存在も無視できないことがわかった。実際、免疫染色法を用いた腹膜透析患者の腹膜組織の検査においても、カルボニル修飾蛋白が組織内に局在していた（図２）。したがって、腹膜透析に伴い血液より腹腔内に流出するカルボニル化合物をも除去することができれば、カルボニルストレス状態の改善がより一層効果的に行われるものと推測される。

【００１４】

本発明者は、腎不全においては生体内タンパク質修飾を亢進する病態が存在しており、腹膜透析のように腹腔内に持続的に高濃度のグルコースを注入する場合、腹腔内のカルボニル化合物が蓄積した腹膜透析液によって、腹腔タンパク質は一層、非酵素的に修飾を受け易い状態に置かれるのではないかと考えた（図７）。

【００１５】

以上のような背景のもとで、本発明者は腹膜透析液に由来するカルボニル化合物を軽減する透析液を作成するためにカルボニル化合物トラップ剤が有効であることを見出し、本発明を完成した。更に本発明者は、血中に蓄積するカルボニル化合物を重視し、カルボニルストレスによるタンパク質修飾を中心として腹膜透析合併症を阻害することができる薬剤が有用であることを見出し本発明を完成した。

【００１６】
すなわち本発明は、カルボニルストレス状態改善剤とそれを応用した腹膜透析液、並びに薬剤に関し、より具体的には、
〔１〕 カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析における腹腔内のカルボニルストレス状態改善剤、
〔２〕 カルボニル化合物トラップ剤が、不溶性の担体に固定化されている〔１〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤、
〔３〕 カルボニル化合物トラップ剤が、腹膜透析液に混入させるためのものである〔１〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤、
〔４〕 カルボニル化合物トラップ剤が、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、またはＳＨ基含有化合物、あるいはそれらの誘導体からなる群から選択される化合物である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤、
〔５〕 カルボニル化合物トラップ剤が、メイラード反応阻害剤である、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のカルボニルストレス状態改善剤、
〔６〕 カルボニル化合物トラップ剤が、カルボニル化合物を吸着することができる腹膜透析液に不溶性の化合物である、〔１〕に記載のカルボニルストレス状態改善剤、
〔７〕 〔２〕および／または〔６〕のカルボニル化合物トラップ剤を充填した腹膜透析液中のカルボニル化合物トラップ用カートリッジ、
〔８〕 〔７〕に記載のカルボニル化合物トラップ用カートリッジに腹膜透析液を通過させる工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法、
〔９〕 次の工程を含む、カルボニル化合物含有量が低減された腹膜透析液の調製方法、
ａ）〔２〕および／または〔６〕に記載のカルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液とを接触させる工程、および
ｂ）カルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液を分離する工程
〔１０〕 カルボニル化合物トラップ剤を含む腹膜透析液、
〔１１〕 第１室および第２室からなる分画された容器に収容された腹膜透析液において、第１室に還元糖が収容され、第２室にカルボニル化合物トラップ剤が収容されているものである、〔１０〕に記載の腹膜透析液、
〔１２〕 カルボニル化合物トラップ剤が腹膜透析液とともに腹腔内に投与するためのものである、〔１０〕に記載の腹膜透析液、
に関する。

【００１７】
あるいは本発明は、腹腔内のカルボニルストレス状態改善方法におけるカルボニル化合物トラップ剤の使用に関する。本発明は、腹膜透析治療におけるカルボニル化合物トラップ剤の使用にも関する。更に本発明は、カルボニルストレス改善剤の製造方法におけるカルボニル化合物トラップ剤の使用に関する。

【００１８】
本発明において、トラップの対象となるカルボニル化合物とは、例えば腹膜透析液の製造過程、ならびに保存中に生成するカルボニル化合物を挙げることができる。先に述べたとおり、浸透圧調節剤としてグルコースを高濃度で含む腹膜透析液には、常にカルボニル化合物生成の可能性が伴う。この種のカルボニル化合物としては、たとえば以下のような物質が知られている(Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853 (1984))。
・3-デオキシグルコソン
・5-ヒドロキシメチルフルフラール（5-hydroxymethylfurfural、以下5-HMFと省略する）
・ホルムアルデヒド
・アセトアルデヒド
・グリオキサール
・メチルグリオキサール
・レブリン酸

・フルフラール
・アラビノース
【００１９】
本発明では、カルボニル化合物トラップ剤を透析施行中を通じて使用することにより、腹膜透析液の製造過程や保存中に生成するカルボニル化合物のみならず、腎不全患者の血中に蓄積し、腹膜透析にともなって腹腔内に輸送される以下のようなカルボニル化合物の除去をも達成することができる。
アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物：
・デヒドロアスコルビン酸
炭水化物、脂質、またはアミノ酸に由来するカルボニル化合物：
・グリオキサール、
・メチルグリオキサール、
・3-デオキシグルコソン
・ヒドロキシノネナール
・マロンジアルデヒド
・アクロレイン
【００２０】
本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤としては、これら全てのカルボニル化合物に対し、化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物のタンパク質に対する修飾活性を失わせる、または低下させるものであることが望ましいが、これらのカルボニル化合物の中で主要なもののみに対して有効な場合も含まれる。たとえばメチルグリオキサールは、カルボニル化合物の中でも比較的反応性が高いとされており(Thornalley, R.J., Endocrinol. Metab. 3: 149-166 (1996)、Inagi, R. et al., J. Am. Soc. Nephrol. in press、および実施例３参照）、その活性を奪うことは病態生理学的な意義が大きい。したがって、メチルグリオキサールに対して有効な化合物は、本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤として望ましいと言うことができる。具体的には、実施例にも示すように、活性炭、グアニジン、アミノグアニジン、ビグアナイド剤、システイン、あるいはアルブミン等の化合物は、メチルグリオキサールに対して特に有効なカルボニル化合物トラップ剤である。
【００２１】
浸透圧調節剤として用いる炭水化物には、グルコースよりも安定性に優れたものも報告されているが、加熱滅菌や保存中にこれらのカルボニル化合物の生成を完全に抑制することは容易ではない。したがって、グルコース以外の炭水化物を用いる場合であっても、カルボニル化合物トラップ剤の使用には意味がある。グルコース以外に腹膜透析の浸透圧調節剤として用いることが可能な炭水化物には、トレハロース（特開平７－３２３０８４）、加水分解でんぷん（特開平８－８５７０１）、マルチトールやラクチトール（特開平８－１３１５４１）、あるいは非還元性オリゴ糖や非還元性多糖（特開平１０－９４５９８）等が知られている。
【００２２】
本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤としては、カルボニル化合物との化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物の透析患者に対する障害活性を失わせる化合物、あるいは低下させる化合物であって、その化合物そのものは透析患者に対して安全である物質を用いる。このような化合物には、例えば以下のようなものが知られている。なお、本発明のカルボニル化合物トラップ剤は、単独で用いるほか、２種類以上の配合剤として使用してもよい。
・アミノグアニジン(Foote, E. F. et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 420-425 (1995))
・±2-イソプロピリデネヒドラゾノ-4-オクソ-チアゾリジン-5-イルアセタニリド(±2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide: OPB-9195)(S.Nakamura,1997,Diabetes.46:895-899)
【００２３】

さらにカルボニル化合物トラップ剤としては、例えば以下のような化合物またはそれらの誘導体であって、カルボニル化合物トラップ剤として機能する化合物を用いることができる。なお、誘導体とは、化合物のいずれかの位置で原子または分子の置換が起きている化合物を指す。

【００２４】

(1)メチルグアニジンなどのグアニジン誘導体（特開昭６２－１４２１１４号、特開昭６２－２４９９０８号、特開平１－５６６１４号、特開平１－８３０５９号、特開平２－１５６号、特開平２－７６５号、特開平２－４２０５３号、特開平６－９３８０号、特表平５－５０５１８９号）。

(2)スルホニルヒドラジンなどのヒドラジン誘導体。

(3)ピラゾロン（特開平６－２８７１７９号）、ピラゾリン（特開平１０－１６７９６５号）、ピラゾール（特開平６－１９２０８９号、特開平６－２９８７３７号、特開平６－２９８７３８号）、イミダゾリジン（特開平５－２０１９９３号、特開平６－１３５９６８号、特開平７－１３３２６４号、特開平１０－１８２４６０号）、ヒダントイン（特開平６－１３５９６８号）などの２個の窒素原子を有する５員複素環式化合物。

(4)トリアゾール（特開平６－１９２０８９号）などの３個の窒素原子を有する５員複素環式化合物。

(5)チアゾリン（特開平１０－１６７９６５号）、チアゾール（特開平４－９３７５号、特開平９－５９２５８号）、チアゾリジン（特開平５－２０１９９３号、特開平３－２６１７７２号、特開平７－１３３２６４号、特開平８－１５７４７３号）などの１個の窒素原子と１個の硫黄原子を有する５員複素環式化合物。

(6)オキサゾール（特開平９－５９２５８号）などの１個の窒素原子と１個の酸素原子を有する５員複素環式化合物。

(7)ピリジン（特開平１０－１５８２４４号、特開平１０－１７５９５４号）、ピリミジン（特表平７－５００８１１号）などの含窒素６員複素環式化合物。

(8)インダゾール（特開平６－２８７１８０号）、ベンゾイミダゾール（特開平６－３０５９６４号）、キノリン（特開平３－１６１４４１号）などの含窒素縮合複素環式化合物。

(9)ベンゾチアゾール（特開平６－３０５９６４号）などの含硫含窒素縮合複素環式化合物。

(10)ベンゾチオフェン（特開平７－１９６４９８号）などの含硫縮合複素環式化合物。

(11)ベンゾピラン（特開平３－２０４８７４号、特開平４－３０８５８６号）などの含酸素縮合複素環式化合物。

(12)カルバゾイル（特開平２－１５６号、特開平２－７５３号）、カルバジン酸（特開平２－１６７２６４号）、ヒドラジン（特開平３－１４８２２０号）などの窒素化合物。

(13)ベンゾキノン（特開平９－３１５９６０号）、ヒドロキノン（特開平５－９１１４号）などのキノン類。

(14)脂肪族ジカルボン酸（特開平１－５６６１４号、特開平５－３１０５６５号）。

(15)ケイ素含有化合物（特開昭６２－２４９７０９号）。

(16)有機ゲルマニウム化合物（特開平２－６２８８５号、特開平５－２５５１３０号、特開平７－２４７２９６号、特開平８－５９４８５号）。

(17)フラボノイド類（特開平３－２４０７２５号、特開平７－２０６８３８号、特開平９－２４１１６５号、ＷＯ９４／０４５２０）。

(18)アルキルアミン類（特開平６－２０６８１８号、特開平９－５９２３３号、特開平９－４０６２６号、特開平９－１２４４７１号）。

(19)アミノ酸類（特表平４－５０２６１１号、特表平７－５０３７１３号）。

(20)アスコクロリン（特開平６－３０５９５９号）、安息香酸（ＷＯ９１／１１９９７）、ピロロナフチリジニウム（特開平１０－１５８２６５号）などの芳香族化合物。

(21)ポリペプチド（特表平７－５００５８０号）。

(22)ピリドキサミンなどのビタミン類（ＷＯ９７／０９９８１）。

(23)グルタチオン、システイン、Ｎ-アセチルシステインなどのＳＨ基含有化合物。
(24)還元型アルブミンなどのＳＨ基含有蛋白。
(25)テトラサイクリン系化合物（特開平６－２５６２８０号）。
(26)キトサン類（特開平９－２２１４２７号）。
(27)タンニン類（特開平９－４０５１９号）。
(28)第４級アンモニウムイオン含有化合物。
(29)フェンホルミン、ブホルミン、あるいはメトホルミン等のビグアナイド剤。
(30)イオン交換樹脂。
(31)活性炭、シリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物。

【００２５】

以上のような化合物には、一般にメイラード反応阻害剤として知られている化合物が含まれる。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖とアミノ酸やタンパク質との間に生じる非酵素的な糖化反応であり、1912年にメイラード（Maillard）がアミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した（Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599 (1912)）。このメイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変化、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。

【００２６】

ところが、1968年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン（HbA1c）が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明し（Rahbar. S., Clin. Chim. Acta, 22: 296(1968)）、それを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症や老化の進行との関係が注目されるようになってきた。そして、このような生体内のメイラード反応を阻害する物質の探索が精力的に行われ、前述の化合物類がメイラード反応阻害剤として見出された。

【００２７】

しかし、このようなメイラード反応阻害剤が、腹膜透析液や血中由来のカルボニル化合物を排除して腹膜透析患者のカルボニルストレス状態を改善し、カルボニルストレスに起因する腹膜透析合併症を阻害することができるということは、全く知られていなかった。

【００２８】

また、本発明のカルボニル化合物トラップ剤には、前述のメイラード反応阻害剤に代表される有機化合物の他、イオン交換樹脂などの高分子化合物、あるいは活性炭やシリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物も使用できる。これらの化合物は腹膜透析液に対して不溶性のカルボニル化合物トラップ剤であり、そのカルボニル化合物吸着能を利用してカルボニル化合物をトラップすることができる。これらはクロマトグラフィーの充填剤として知られているものであるが、カルボニルストレス状態の改善に有用であることは知られていない。

【００２９】

従来、活性炭を使用した吸着型血液浄化器が、薬物中毒や肝性昏睡時の血液浄化や、多臓器不全としての急性腎不全発症の初期に増加する内因性・外因性の各種トキシンや血管作動性物質の除去を目的とした血液透析の補助療法として使用されている。しかしながら、かかる吸着型血液浄化器が腹膜透析液中あるいは透析中に腹腔に蓄積するカルボニル化合物の除去に有効であるということは全く知られていなかった。

【００３０】

また、特開昭５８－１６９４５８号公報には、固体粒子状吸収剤を含有する腹膜透析液および該腹膜透析液を用いた腹膜透析方法に関する発明が記載されている。しかし、同公報によれば、固体粒子状吸収剤は、クレアチニンや低分子量の代謝産物の除去のために添加されており、このものが腹膜透析液中あるいは透析中に腹腔に蓄積するカルボニル化合物の除去に有効であるとする記載は全くない。また、該腹膜透析方法を用いることによって、腹膜透析患者のカルボニルストレス状態が改善されるといったことは、示唆も教唆もされていない。

【００３１】
本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤を添加するベースとなる腹膜透析液の組成は、公知のものとすればよい。一般的な腹膜透析液は、浸透圧調節剤、緩衝剤、および無機塩類などで構成されている。浸透圧調節剤には先に列挙したような糖類が用いられる。緩衝剤としては、主としてグルコースの安定性を考慮して酸性側(pH5.0-5.4)のpHを与える緩衝系が用いられることが多い。もちろん、浸透圧調節剤にグルコースを加えないものでは、より生理的なpHである7.0前後のpHを与える緩衝剤が利用できる。また、グルコースを用いながら中性域のpHを利用できるように、使用時にpHを調節するための緩衝系を別に包装する商品形態も考案されている。なお、本発明では、加熱滅菌や長期保存時のグルコースの分解に由来するカルボニル化合物が除去されるため、従来グルコースの分解のために製剤学的に調製が困難であった中性域のpHを与える緩衝系を好適に用いることができる。更に腹膜透析液には、通常、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、あるいは塩化マグネシウムのような無機塩類が添加される。これらの塩類は、腹膜透析を生理的な条件に近づけ、生体適合性の向上を期待して添加されるものである。

【００３２】
本発明のカルボニル化合物トラップ剤は、このような公知の処方に対して、腹膜透析液の配合時に添加し、そのまま密封して加熱滅菌することができる。そうすることによって、加熱滅菌処理に伴う、これら主成分からのカルボニル化合物の生成に対して予防的な作用を期待できる。また、第１室および第２室からなる分画された容器に腹膜透析液を収容し、第１室に還元糖を収容し、第２室にカルボニル化合物トラップ剤を収容し、使用直前に混合してもよい。この場合、滅菌時および保存時に生成したカルボニル化合物は、混合されたカルボニル化合物トラップ剤と速やかに結合する。そして、腹腔内に投与された後、余剰のカルボニル化合物トラップ剤が血中由来のカルボニル化合物を捕捉する。腹膜透析液に添加されるカルボニル化合物トラップ剤は、単独であっても良いし、複数種を混合して用いることもできる。

【００３３】
一方、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体や自身腹膜透析液に不溶性のカルボニル化合物トラップ剤と腹膜透析液との接触方法としては、種々の形態が考えられる。例えば、カルボニル化合物トラップ剤を内部に固定化した容器、あるいは粒子や繊維のような担体に固定したカルボニル化合物トラップ剤入りの容器に腹膜透析液を収容し、保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物をトラップさせることができる。後者においては、不溶性担体を濾過などによって腹膜透析液から分離することができる。またカルボニル化合物トラップ剤を固定化したビーズ状や繊維状等の担体、あるいは自身が不溶性のカルボニル化合物トラップ剤をカラムに充填してカルボニル化合物トラップ用カートリッジとし、このカートリッジに腹膜透析液を接触させた後に腹腔内に導入することもできる。かかるカートリッジは、腹膜透析開始時の空気混入を防ぐために、予め蒸留水などを充填しておくのが好ましい。腹腔導入時にカルボニル化合物トラップ用カートリッジに接触させる場合、透析中に蓄積する患者由来のカルボニル化合物を除去することはできないが、透析液中のカルボニル化合物の除去は可能である。あるいは腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、循環回路中にカルボニル化合物トラップ剤を固定化した前記カルボニル化合物トラップ用カートリッジを設置することにより、腹膜透析液のみならず、透析中に腹腔内に蓄積するカルボニル化合物の除去をも達成することができる。

【００３４】
本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤を固定化する担体としては、人体に対して無害なもの、腹膜透析液に直接接触する材料として安全性および安定性を有するものであれば特に制限はなく、例えば、合成または天然の有機高分子化合物や、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの無機材料、およびこれらの表面に多糖類、合成高分子などをコーティングしたものなどが挙げられる。カルボニル化合物トラップ剤を固定化するための担体や自身腹膜透析液に対し不溶性のカルボニル化合物トラップ剤は、公知の修

飾、改質または変性などを施すことにより、物質透過性、薬液適合性、保護強度、吸着能力、またはカルボニル化合物に対する特異性を高めることができる。

【００３５】

高分子化合物からなる担体としては、例えば、ポリメチルメタクリレート系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、ポリスルフォン系重合体、ビニル系重合体、ポリオレフィン系重合体、フッ素系重合体、ポリエステル系重合体、ポリアミド系重合体、ポリイミド系重合体、ポリウレタン系重合体、ポリアクリル系重合体、ポリスチレン系重合体、ポリケトン系重合体、シリコン系重合体、セルロース系重合体、キトサン系重合体などが挙げられる。具体的には、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類およびそれらの誘導体、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルフォン、ポリエーテルスルフォン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアリルエーテルスルフォン、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリカーボネート、アセチル化セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ポリエーテルウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体などが挙げられる。これらの高分子材料は単独、あるいは２種以上を組み合わせて使用され得る。２種以上組み合わせる場合は、そのうち少なくとも１種にカルボニル化合物トラップ剤が固定化される。固定化されるカルボニル化合物トラップ剤は、単独で固定化するほか、２種類以上を固定化してもよい。また、上記の高分子材料は、単一のポリマーとして用いられるほか、異種ポリマーとの共重合体とすることもできる。さらに、適当な改質剤を添加したり、放射線架橋、過酸化物架橋などの変性処理を施してもよい。

【００３６】

担体の形状に制限はなく、例えば膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状などが挙げられる。これらの担体は、厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、および／または大きさを種々変えることにより、腹膜透析液との接触面積を制御することができる。更に、腹膜透析液を収容する容器の内壁や、腹膜透析液循環回路の内部などにカルボニル化合物トラップ剤を固定することもできる。

【００３７】

上記担体にカルボニル化合物トラップ剤を固定化するには、公知の方法、例えば、物理的吸着法、生化学的特異結合法、イオン結合法、共有結合法、グラフト化などを用いればよい。また必要によりスペーサーを担体とカルボニル化合物トラップ剤の間に導入してもよい。カルボニル化合物トラップ剤に毒性がある場合など、担体からの溶出が問題となる場合には、溶出量をできるだけ少なくするためにカルボニル化合物トラップ剤は担体に共有結合で固定化されていることが好ましい。カルボニル化合物トラップ剤を担体に共有結合するには、担体に存在する官能基を用いればよい。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、ヒドロキシル基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基等が挙げられるが、これらに制限されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。

【００３８】

カルボニル化合物トラップ剤が固定化された担体としては、例えば、スルホニルヒドラジン基を有するポリスチレン担体（PS-TsNHNH2, ARGONAUT TECHNOLOGIES社）などの市販のものを用いることもできる。

【００３９】

本発明に基づくカルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体の滅菌は、公知の滅菌法から、カルボニル化合物トラップ剤や担体などの種類により適当な滅菌法が選択される。滅菌処理には高圧蒸気滅菌、ガンマ線照射滅菌、ガス滅菌などが挙げられる。不溶性のカルボニル化合物トラップ剤や担体に結合されたカルボニル化合物トラップ剤を充填したカートリッジを用意し、これを腹膜透析液を収容した容器に接続した状態で両者を同時に滅菌することもできる。

【００４０】
腹膜透析液と接触するカルボニル化合物トラップ剤が少ないと、腹膜透析液中のカルボニル化合物を十分に除去することができなくなるケースが予想される。一般には腹膜透析中のカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のカルボニル化合物トラップ剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。カルボニル化合物トラップ剤の用量は、担体へのカルボニル化合物トラップ剤の固定化量、またはカルボニル化合物トラップ剤が固定化された担体の使用量を変更して調整することができる。
【００４１】
あるいは、適当な混注用コネクターを装備した腹膜透析回路に、カルボニル化合物トラップ剤を注入することもできる。この場合は、滅菌時および保存時に生成したカルボニル化合物は、回路中で捕捉される。
【００４２】
さらに、カルボニル化合物トラップ剤を直接腹腔内に投与して、腹腔内で腹膜透析液と混合することもできる。このとき腹膜透析液由来および血中由来のカルボニル化合物は、腹腔内で不活性化される。
【００４３】
また、腹膜透析液を患者へ注入する前または腹腔内貯留中に、カルボニル化合物トラップ剤を静脈注射等によって腹膜透析患者体内へ投与することによって、腹腔内のカルボニルストレス状態の改善を図ることもできる。
【００４４】
以下に本発明による腹膜透析液の望ましい実施態様を具体的に示す。
まずベースとなる透析液の組成は、一般的には次のような処方が利用される。これらの処方はあくまでも一般的なものであり、実際には患者の症状に合わせてより適切な組成が採用される。

グルコース	1-5%w/v
ナトリウムイオン	100-150meq
カリウムイオン	0-0.05meq
マグネシウムイオン	0-2meq
カルシウムイオン	0-4meq
塩素イオン	80-150meq
緩衝剤	10-50mM

（乳酸、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸等の有機酸）
【００４５】
以上のような基本処方に対して、本発明によるカルボニル化合物トラップ剤の有効量を添加する。たとえばアミノグアニジンを添加する場合には、1mM以上、好ましくは10mM以上、より好ましくは10mM以上100mM以下の濃度となるように添加する。添加量が少ない場合には、製造ならびに保存中に発生するカルボニル化合物にカルボニル化合物トラップ剤が消費されてしまい、実際の透析時に患者の血液や組織から透析液に浸出するカルボニル化合物を処理することができなくなるケースが予想される。特に患者の血液や組織から浸出するカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のカルボニル化合物トラップ剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。アミノグアニジンは、動物に対し低毒性であることが知られている。「化学物質の毒性効果表(Registry of Toxic Effect of Chemical Substances)」（1978）によれば、アミノグアニジンの半致死量は、ラット皮下注射の場合1258mg/kgであり、マウスでは963mg/kgである。また、水溶性にも優れている。この他OPB-9195の場合も同様に、1mM以上、好ましくは10mM以上、より好ましくは10mM以上100mM以下の濃度となるように添加する。
【００４６】
上記のような処方で配合された本発明による腹膜透析液は、適当な密閉容器に充填し、

滅菌処理する。滅菌処理には高圧蒸気滅菌や熱水滅菌などの加熱滅菌が有効である。この場合、高温で有害物質を溶出せず、滅菌後も輸送に耐える強度を備えた容器を用いる。具体的にはポリ塩化ビニルやポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエステル、エチレン酢酸ビニル共重合体などからなる可撓性プラスチックバッグが挙げられる。また、外気の影響による液の劣化を避けるために、腹膜透析液を充填した容器をさらにガスバリアー性の高い包装材で包装してもよい。

【００４７】

加熱滅菌に代えて、濾過滅菌を施すこともできる。例えば、孔径 0.2μm程度のメンブランフィルターを備えた精密濾過器を用いて濾過することにより滅菌する。この場合は、加熱に由来するカルボニル化合物の生成を防止することができる。濾過滅菌された腹膜透析液は、可撓性プラスチックバッグなどの容器に充填された後、密封される。滅菌から輸送にいたる一連の処理は、現行の透析液の製造と何ら変わるところは無いので、同様の工程で本発明による腹膜透析液を製造することができる。

【００４８】

高圧加熱滅菌を含む加熱滅菌により滅菌処理を行う場合、用いられるカルボニル化合物トラップ剤が加熱などの処理に対して十分安定であるならば、腹膜透析液配合時に該カルボニル化合物トラップ剤を予め添加してから、加熱滅菌操作を行うことができる。このようにすれば、加熱時の透析液由来のカルボニル化合物の生成・蓄積を抑制することができる。勿論、保存時や腹膜透析中にも該カルボニル化合物トラップ剤が機能し、カルボニル化合物の生成・蓄積を抑えることができる。

【００４９】

用いるカルボニル化合物トラップ剤が加熱滅菌に安定ではない場合は、加熱を要しない滅菌法を用いることもできる。このような滅菌法には、例えば濾過滅菌などがある。また、予め加熱滅菌した腹膜透析液に、後で該カルボニル化合物トラップ剤を添加してもよい。添加する時期は特に制限されない。例えば、液を滅菌後に該カルボニル化合物トラップ剤を添加すれば、腹膜透析中のみならず、透析前の腹膜透析液保存中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制することができるため好適である。

【００５０】

あるいは、腹膜透析直前または同時に該カルボニル化合物トラップ剤を添加することもできる。例えば、使用直前までベースとなる溶液とカルボニル化合物トラップ剤を前述の軟質プラスチックバッグなどに別々に収容し、腹膜透析開始直前に両者を無菌的に混合する。このためには、特開昭６３－１９１４９号に開示されているような剥離可能な接着部により仕切られた可撓性プラスチックバッグが好適に用いられる。

あるいはまた、腹膜透析回路の途中に混注のためのコネクター部材を設け、該コネクターからカルボニル化合物トラップ剤を注入してもよい。

このような腹膜透析液の調製方法は、熱に不安定なカルボニル化合物トラップ剤のみならず、熱に安定なカルボニル化合物トラップ剤に対しても用いることができる。

さらにまた、腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、回路中のいずれかの箇所にカルボニル化合物トラップ剤を充填した濾過器を装置することもできる。

【００５１】

本発明の腹膜透析液は、現行の腹膜透析液と同様の腹膜透析処置に利用される。すなわち、透析患者の腹腔内に本発明による腹膜透析液を適量注入し、腹膜を通して生体内の低分子量成分を腹膜透析液内に移行させる。腹膜透析液は間欠的に循環させ、患者の症状に応じて透析を継続する。このときカルボニル化合物は、クレアチニンや無機塩類、あるいは塩素イオン等の透析成分とともに、血中や腹膜内から腹膜透析液中へ移行する。同時に、カルボニル化合物トラップ剤の作用により、その生体に対する障害活性がうばわれ、無害化される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００５２】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

【００５３】

[実施例１] 腹膜透析液および腹膜透析排液中のカルボニル化合物量の測定

腹腔内におけるカルボニルストレスの発生を証明するため、以下の実験方法に従い、腹膜透析排液中のカルボニル化合物量を測定した。

【００５４】

１）カルボニル化合物の測定

腹膜透析液（バクスター製、ダイアニールPD-2 2.5）および腹膜透析患者に前記の腹膜透析液を投与し腹腔内に一夜貯留後の腹膜透析排液をそれぞれ400μL採り、1.5mMの2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（2,4-DNPH）（和光純薬製）を0.5N塩酸溶液400μLと混合後、３０分間室温で攪拌し、液中のカルボニル化合物と2,4-DNPHを反応させた。次に1Mのアセトン水溶液40μLを添加し、室温で5分間攪拌して過剰の2,4-DNPHをアセトンと反応させて除去した後、400μLのn-ヘキサンで３回洗浄し、水層について360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計（日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAmax250）で測定した。

【００５５】

２）検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、１）と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル化合物量に対する検量線を作成した。

【００５６】

３）カルボニル化合物の定量

腹膜透析液および腹膜透析排液中のグルコース濃度をグルコース測定キット（和光純薬製、グルコース CII-テストワコー）を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル化合物の量を求めた。液中の総カルボニル化合物の量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、カルボニル化合物の量とした。

【００５７】

得られた結果を図１に示す。腹腔内に一夜貯留された後の腹膜透析排液では、投与前の腹膜透析液と比較してカルボニル化合物量は約５倍となり、血中から腹腔内へのカルボニル化合物の移行が示された。

【００５８】

[実施例２] 腹膜透析液患者の腹膜におけるカルボニル修飾蛋白の組織的局在

腹膜透析患者の腹膜組織中のカルボニル化合物をマロンジアルデヒドを指標とした免疫染色法により調査した。

【００５９】

腹膜透析患者（５０歳男性、腹膜透析歴５年）の腹膜組織について、Horieらの方法（Horie, K. et al., J. Clin. Invest., 100, 2995-3004(1997)）に従い、一次抗体としてマウス抗マロンジアルデヒドモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、剥離した中皮細胞下の結合組織および肥厚した血管壁に強い陽性所見を認めた（図２）。

【００６０】

マロンジアルデヒド（MDA）は過酸化脂質の分解により生成するカルボニル化合物である。そこで、MDA以外の過酸化脂質分解生成物である4-ヒドロキシ-2-ノネナール、および糖酸化反応の結果生成するカルボキシメチルリジンやペントシジンに対する抗体を用いて、同様に免疫染色を行った結果、図２で示された陽性部位と同様の箇所が陽性であった。このことから、腹膜透析患者の腹膜組織は、過酸化脂質分解生成物および糖酸化生成物由来のカルボニル化合物に起因するカルボニルストレスの亢進により、蛋白修飾を受けていることが分かった。

【００６１】

[実施例３] メチルグリオキサールによる腹膜細胞障害

長期間の腹膜透析による腹膜の限外濾過機能の低下は、拡散による物質交換が可能な腹

膜の表面積の増加を証拠付けるものである（Krediet, R.T., 1999, Kidney Int. 55: 341-356; Heimburger, O. et al., 1990, Kidney Int 38: 495-506; Imholz, A.L. et al., 1993, Kidney Int. 43: 1339-1346; Ho-dac-Pannekeet, M.M. et al., 1997, Perit. Dial. Int. 17: 144-150）。すなわち、腹膜透析液中のグルコースが拡散し腹腔内から流出することにより浸透圧勾配による透析機能が低下する。これは、腹膜内の血管表面積の増加により説明することも可能である。そしてこの病態には、血管内皮増殖因子（VEGF）が重要な役割を果たすと考えられる。VEGFは血管の透過性を亢進し（Senger, D.R. et al., 1983, Science 219: 983-985; Connolly, D.T. et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 20017-20024）、NOの合成を刺激し血管を拡張させ（Hood, J.D. et al., 1998, Am. J. Physiol. 274: H1054-1058）、炎症反応を誘導する（Clauss, M. et al., 1990, J. Exp. Med. 172: 1535-1545; Melder, R.J. et al., 1996, Nat. Med. 2: 992-997）。また、VEGFは強力な血管新生因子であり、血管傷害を回復させる機能を持つ（Thomas, K.A., 1996, J. Biol. Chem. 271: 603-606; Ferrara, N. et al., 1997, Endocr. Rev. 18: 4-25; Shoji, M. et al., 1998, Am. J. Pathol. 152: 399-411）。そこで、透析液に含まれるグルコース分解産物がVEGF産生に及ぼす効果を検証した。

【００６２】

＜３－１＞ グルコース分解産物の存在下での腹膜中皮および血管内皮細胞培養におけるVEGF の発現

６週齢の雄CD（SD）IGSラット（Charles-River, Kanagawa, Japan）より腹膜を採取した。中皮細胞は Hjelleらの方法（Hjelle. J.T. et al., 1989, Perit. Dial. Int. 9: 341-347）に基づいて単離し、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）にて培養した。7～10継代目の中皮細胞を、様々な濃度のグルコース分解産物（グリオキサール、メチルグリオキサール（Sigma, St. Louis, MO）、または 3-デオキシグルコソン（Fuji Memorial Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Kyoto, Japan より供与））の存在下、CO_2 インキュベータで3時間培養した。VEGF mRNA の発現の解析は、半的量的RT-PCRにより行った。Rneasy Mini Kit（Qiagen, Germany）を用いて中皮細胞から全RNAを単離した。RNA 5μgをオリゴ（dT）$_{12-18}$プライマー（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）と200 unitsのRNase Hフリーの逆転写酵素（Superscript II: Gibco BRL）を用いて逆転写し、PCR増幅を以前記載した条件にて行った（Miyata, T. et al., 1994, J. Clin. Invest. 93: 521-528）。用いたオリゴヌクレオチドプライマー配列は、ラットVEGFの増幅に使用したプライマーについては 5'-ACTGGACCCTGGCTTTACTGC-3'（配列番号：１）および5'-TTGGTGAGGTTTGATCCGCATG-3'（配列番号：２）で、310bpの増幅産物を得た。ラットグリセロアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ（G3PDH）の増幅に使用したプライマーは 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGCCC-3'（配列番号：３）および5'-GATGTCATCATATTTGGCAGGTT-3'（配列番号：４）であり、322bpの断片を増幅した。G3PDHはRNAの内部標準として使用し、異なる試料間でのRNAレベルの比較を行った。各試料は DNA Thermal cycler（Perkin Elmer Cetus, Norwork, CT）を用いて、94℃ 0.5分、60℃ 1分、72℃ 1.5分の条件で、まず適当なサイクル数を決定した。予備的な実験として、逆転写およびPCR増幅を様々なRNA量を用いて、16、18、21、25、28、31、および34サイクルの条件で行った。その結果、VEGF mRNA の増幅では30サイクル、G3PDH mRNA の増幅では21サイクルの条件で、加えたRNAと定量的に相関したPCR産物のシグナルが得られた。PCR産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、定量プログラム（NIH image）でシグナル強度を測定して定量化した。実験は、それぞれのグルコース分解産物濃度において行った。３連の実験で mRNA を定量し、各実験の平均を求めた。計3～４回の独立した実験を各実験条件にて行った。結果は平均をとり、平均±S.D.で表した。分散分析（ANOVA）により統計的有意性を評価した。この分析により有意な違いが示された場合は、Scheffeのｔ検定により、異なるメチルグリオキサール濃度で得られた結果を比較した。

【００６３】

0～400μMの様々な濃度において、グリオキサールや 3-デオキシグルコソンはVEGFの発

現を変化させなかった（図３AおよびB）。メチルグリオキサールのみが、400μMの濃度でVEGF mRNA の発現を刺激した（P<0.0005）（図３C）。逆転写を行わなかったRNA試料からはPCR産物は生成されなかった。すべての細胞は生存可能であった。中皮細胞を高濃度の 3-デオキシグルコソン（0.625, 2.5, および 5mM）の存在下で培養したところ、細胞の生存率の低下が見られた（細胞生存率は、0.625, 2.5, 5mM の 3-デオキシグルコソン存在下において、それぞれ 80, 55, 8%であった）。細胞の生存率が低下したため、VEGF mRNA 発現の測定はできなかった。これらの観察結果から、メチルグリオキサールのみを以下の実験に用いた。

【００６４】

様々な濃度のメチルグリオキサール存在下で 24時間培養したヒト微小血管内皮細胞の培養上清中へのVEGF蛋白質の放出を、ELISAにより測定した。ヒト微小血管内皮細胞はクラボー（Osaka, Japan）より購入し、VEGF欠失EGM-2培地（Takara, Tokyo, Japan）で培養した。メチルグリオキサールとのインキュベートは上記のラット腹膜中皮細胞と同様に行った。VEGF蛋白質は、２連で調製した培養上清に対し、キット（Quantikine: R&D Systems, Minneapolis, USA）を用いて添付の説明書に従い、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）により定量化した。実験は３回繰り返し、結果を上記と同様に統計解析した。

【００６５】

その結果、培地中へのメチルグリオキサールの添加により、用量依存的にVEGFの増加が認められた（図４）。メチルグリオキサール非存在下では、VEGFの放出は検出されなかった。すなわち、蛋白質レベルでも、メチルグリオキサールの用量依存的にVEGF産生・放出が刺激されることが示された。

【００６６】

次に、様々な濃度（0～400μM）のメチルグリオキサール存在下で培養した内皮細胞のVEGF mRNA の発現を調べた。実験はラット中皮細胞の場合と同様に行った。ただし、ヒトVEGFの増幅には 5'-GGCAGAATCATCACGAAGTGGTG-3'（配列番号：５）および5'-CTGTAGGAAGCTCATCTCTCC-3'（配列番号：６）のプライマーを使用し、増幅された断片は271bpであった。ヒト G3PDH の増幅にはラットと同じプライマーを使用した。解析の結果、VEGF mRNA の発現は用量依存的に増加することが判明した（図５）。

【００６７】

＜３－２＞ メチルグリオキサールを腹腔内投与されたラットの腹膜組織における VEGF発現

メチルグリオキサールが腹膜における VEGF mRNA の発現に及ぼす生物学的影響をさらに in vivo 系にて調べるため、ラットの腹腔に様々な量のメチルグリオキサールを 10日間投与する実験を行った。６週齢の雄CD（SD）IGSラットに、様々な濃度のメチルグリオキサールを含む生理食塩水 50ml/kg を10日間、毎日腹腔内に投与した。腹壁から腹膜を単離しVEGF mRNA の発現を調べた。実験は上記ラット中皮細胞の in vitro 実験と同様に行った。ただし、腹膜組織からのmRNA の抽出には ISOGEN（Nippon Gene, Tokyo, Japan）を用いた。またPCR増幅は、VEGF mRNA の増幅では28サイクル、G3PDH mRNA の増幅では16サイクルの条件で行った。

【００６８】

図６に示すように、メチルグリオキサール濃度により、腹壁腹膜試料のVEGF mRNA 発現は有意に上昇した（P<0.05）。光学顕微鏡観察では、腹膜組織に変化は見られなかった（血管数、血管壁、間隙、および中皮細胞は正常であった）。

【００６９】

＜３－３＞ 長期腹膜透析患者の腹膜組織の VEGFおよびカルボキシメチルリジン(CML)の免疫染色

腹膜透析患者９名の腹膜組織における VEGFおよびカルボキシメチルリジンの分布を免疫組織化学分析により調べた。カルボキシメチルリジンは、グリオキサールや 3-デオキシグルコソンなどのグルコース分解産物に由来する（Miyata, T. et al., 1999, Kidney

Int. 55: 389-399）。従って、抗カルボキシメチルリジン抗体は、グルコース分解産物で修飾された蛋白質に対するマーカーとして用いられる。

【００７０】

インフォームドコンセントを得た後、カテーテル再挿入時に９人の非糖尿病腹膜透析患者より腹膜組織を単離した（表１）。カテーテル再挿入の必要性は、カテーテルの損傷、位置のずれ、および/または閉塞による生じたものである。腹膜炎患者はいなかった。腎機能が正常な男性２名（48および58歳）から、腹部切開時に正常な腹膜組織を単離した。

【００７１】

2μ厚の腹膜組織切片を、3-アミノプロピルトリエトキシシラン（Signa)をコートしたスライドにマウントし、脱パラフィン後、蒸留水を通してから、Pronase（0.5mg/μl:Dako, Glostrup, Denmark）を含むバッファー溶液（0.05M Tris-HCl (pH7.2), 0.1M NaCl）で室温で 15分インキュベートした。スライドは、0.5% Tween20を含むPBSで洗浄し、4%スキムミルクで 2時間ブロッキングを行った後、抗VEGFウサギIgG（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）、または抗AGEマウスIgG（Ikeda, K. et al., 1996, Biochemistry 35: 8075-8083）（カルボキシメチルリジンをエピトープとする: Miyata, T. et al., 1997, Kidney Int. 51: 1170-1181）で一晩、4℃にて、ヒューミッドチェンバー中でインキュベートした。切片を洗浄後、1:100 希釈のペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGまたはペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG（Dako）で２時間室温でインキュベートし、0.003% H_2O_2 を含む 3,3'-ジアミノベンジジン溶液でシグナルを検出した。また、過ヨウ素酸－シッフ染色により組織学的分析を行った。免疫染色は２人で独立に観察して、シグナル強度と分布の評価を行った。

【００７２】

結果は表１に示した。表中「正常1」および「正常2」は腎機能が正常な被験者由来の試料、「PD1」～「PD9」は腹膜透析患者由来の試料を表す。代表的な長期腹膜透析患者の腹膜組織像（表１のPD6）の観察では、間質性のフィブローシス、血管壁の肥厚およびヒアリン症が認められた。中皮細胞および血管壁には、 VEGFとカルボキシメチルリジンが共局在していた。中皮層では、VEGFのシグナルはカルボキシメチルリジンのシグナルよりも弱かった。結果は、他の８人の患者でも同様であった。正常な腹膜試料（表１の正常2）では、腹膜透析試料に比べ、VEGFは血管壁にしか存在しておらず、中皮層では検出されなかった。カルボキシメチルリジンは中皮層では検出されず、血管壁のシグナルも極弱いものであった。これらの観察は他の対照正常試料でも同様であった。正常マウスIgGを用いた場合は、免疫染色は検出されなかった。このように、腹膜透析患者においてのみ、中皮でのVEGF発現とカルボキシメチルリジンの共局在が見られる事実は、腹膜透析により、腹膜透析液中のグルコース分解産物が、尿毒症患者において実際に VEGF産生を増強していることを示唆している。

【００７３】

【表１】
腹膜透析患者腹膜組織におけるCMLおよびVEGFの免疫組織化学的検出

試料	性別	年齢（歳）	腹膜透析期間（月）	CML 中皮層	CML 血管壁	VEGF 中皮層	VEGF 血管壁
正常1	M	48	−	−	±	−	+
正常2	M	58	−	−	±	−	+
PD1	F	53	3	+	+	+	+
PD2	M	44	4	+	+	+	+
PD3	M	43	45	+	+	+	+
PD4	F	54	60	++	++	++	+
PD5	M	52	70	++	++	+	+
PD6	M	51	90	++	++	++	++
PD7	M	45	105	++	++	++	++
PD8	M	62	108	++	++	++	++
PD9	M	66	110	++	++	++	++

−：陰性、 ±：極弱いシグナル、 ＋：陽性、 ＋＋：強く陽性

【００７４】
以上の結果は、腹膜透析患者が、腹膜透析液中のグルコース分解産物等によりカルボニルストレス状態に置かれていることを裏付けるものであり、更に、メチルグリオキサールが腹膜細胞でVEGFの産生を増強することを初めて実証するものである。腹膜透析液に含まれるグルコース分解産物が腹膜の透過性を低下させる原因の少なくとも一部は、VEGF産生の亢進とそれに伴う血管新生の刺激によるものであることが示唆される。

【００７５】
[実施例４] 腹膜透析患者の透析液排液に対するカルボニル化合物トラップ剤の添加効果

＜４－１＞
ペントシジンはAGEの構造体の１つであり、腎不全患者の血中には健常人と比較して約20倍の蓄積が認められている（Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198−1206 (1996)）。腹膜透析患者の排液を37℃でインキュベートした場合に増加するペントシジンおよびタンパク質上に存在するカルボニル基（プロテインカルボニル）に対するアミノグアニジンの添加効果の検討を行った。

【００７６】
腹膜透析患者の一夜貯留排液を遠心後、上清を濾過滅菌(孔径 0.45μm)し、アミノグアニジン（東京化成製）を0、1、10、100 mMの濃度になるように添加し、37℃でインキュベートした。インキュベート期間は、ペントシジンを測定する場合は1乃至2週間、プロテインカルボニルを測定する場合では２週間とした。ペントシジンの測定は、6N HCl中110℃でタンパク質を加水分解した後、HPLC（島津製作所製、LC-10A）で定量した（T.Miyataら,1996,J.Am.Soc.Nephrol,7:1198-1206, T.Miyataら,1996,Proc.Natl.Acad.Aci.USA, 93:2353-2358）。プロテインカルボニルの測定は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(2,4-DNPH)(和光純薬製)と反応させた後、カルボニル基と反応して生成したヒドラゾンの吸光度を測定(日本モレキュラーデバイス製、SPECTRAmax 250)することにより行った（Levine, R. L. et al. , Methods Enzymol., 233, 346-357 (1994)）。

【００７７】
その結果、ペントシジンの生成に対して、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた（図８）。同様に、プロテインカルボニルの生成に対しても、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた（図９）。

【００７８】

＜４－２＞

次に、以下の実験方法に従い、腹膜透析患者の一夜貯留排液中のグルコース以外のカルボニル化合物量に対するアミノグアニジンの添加効果を検討した。

【００７９】

(A)腹膜透析排液のインキュベーション

腹膜透析施行患者の排液を採取し、孔径 0.45μmのフィルターで濾過した後、アミノグアニジン（東京化成製）を0、10、50および250mMの濃度となるように加え、試料溶液とした。試料溶液 1mlを採り、スクリューキャップ付プラスチックチューブに分注した後、37℃で 15時間インキュベートした。なお、試料溶液は、インキュベーション直前まで、-30℃で保存した。

【００８０】

(B)カルボニル化合物の定量

1）試料溶液の測定

試料溶液400μLを採り、1.5mMの 2,4-DNPH（和光純薬製）を 0.5N塩酸溶液 400μLと混合後、30分間室温で攪拌し、試料溶液中のカルボニル化合物と 2,4-DNPHを反応させた。次に、1Mのアセトン水溶液 40μLを添加し、室温で5分間攪拌して過剰の 2,4-DNPH をアセトンと反応させて除去した後、試料溶液を 400μLの n-ヘキサンで3回洗浄し、水層について 360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計（日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAmax250）で測定した。

2）検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、1）と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル化合物量に対する検量線を作成した。

3）カルボニル化合物の定量

試料溶液中のグルコース濃度をグルコース測定キット（和光純薬製、グルコースCII-テストワコー）を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル化合物量を求めた。腹膜透析排液中の総カルボニル化合物の量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、カルボニル化合物の量とした。

その結果を図１０に示す。腹膜透析患者の腹膜透析液排液中のグルコース以外のカルボニル化合物量は、 インキュベートしないものおよび37℃で15時間のインキュベートをしたもの共に、アミノグアニジンの濃度が増加するに従い減少した。

【００８１】

これらの結果から、カルボニル化合物トラップ剤を腹膜透析液に添加、あるいは患者に投与することが、腹腔内に注入された腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制するために有効であることが明らかとなった。それにより、腹腔内に存在する腹膜透析液由来および血中由来のカルボニル化合物が除去され、腹膜透析患者のカルボニルストレス状態が改善される。

【００８２】

[実施例５] 腹膜透析液の加熱滅菌過程におけるカルボニル化合物トラップ剤の添加効果

腹膜透析液中には、浸透圧調節剤として、高濃度(1.35～4.0 w/v%)のグルコースが含まれている。グルコースは熱に対して不安定で、加熱滅菌や保存中に分解する。グルコースの分解物として、 5-ヒドロキシメチルフルフラール(5-hydroxymethylfurfural;5-HMF)、レブリン酸、アセトアルデヒドなどが生成することが報告されている（Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853(1984)、Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993)）。腹膜透析液の加熱滅菌過程におけるアミノグアニジンのカルボニル化合物の生成抑制効果を5-HMF、カルボニル化合物量を測定することにより検討した。なお、グルコースの分解の程度は液のpHの影響を受けることから、滅菌前のpHが酸性（pH5.3）および中性（pH7.0）の2種類の腹膜透析液を調製し、実験に供した。滅菌温度は121℃とした。

【００８３】

＜５－１＞

5-HMFの測定は、高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製、LC-10A)を用いて、測定した（Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993)）。

その結果、酸性環境（図１１）および中性環境（図１２）共に、5-HMFの生成に対して、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた。

【００８４】

＜５－２＞

腹膜透析液中のカルボニル化合物の定量は、実施例１と同様に 2,4-DNPHと反応させた後、吸光度を測定することにより行った（Levine, R. L. et al., Methods Enzymol., 233: 346-357(1994)）。滅菌温度は121℃とした。

その結果、カルボニル化合物量に関しても、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた（図１３）。

【００８５】

これらの結果から、腹膜透析液中にカルボニル化合物の生成を抑える薬剤を添加することが、腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制するために非常に有効であることが明らかとなった。

【００８６】

［実施例６］　腹膜透析液中のペントシジン生成に対するカルボニル化合物トラップビーズの添加効果

架橋したポリスチレン樹脂にスルホニルヒドラジン基を結合したもの（PS-TsNHNH2, ARGONAUT TECHNOLOGIES社）をカルボニル化合物トラップビーズとして用いて、腹膜透析液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。腹膜透析液及びカルボニル化合物トラップビーズを添加した腹膜透析液を37℃でインキュベートし、ペントシジンの形成抑制効果を確認した。カルボニル化合物トラップビーズの入ったチューブに、ジメチルスルホキシド100μlを加え膨潤させた後、腹膜透析液（バクスター製、ダイアニール PD-4,1.5）800μL、水に溶解した150mg/mL濃度のウシ血清アルブミン200μLを添加し、37℃で1週間インキュベートした。インキュベート終了後、ポアーサイズ0.22μmの遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）を用いてビーズを除去した。次に、ビーズを除去した溶液50μlに10%トリクロル酢酸 50μlを加え、遠心して蛋白を沈殿させた。蛋白を300μlの5%トリクロル酢酸で洗浄し、乾固させた。次に、6N HClを100μl添加し、110℃で16時間加熱した後、HPLCでペントシジンを定量した（T. Miyataら, 1996, J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206, T, Miyataら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2353-2358）。

【００８７】

37℃でインキュベートしたときに生成するペントシジン量を図１４に示した。カルボニル化合物トラップビーズの添加により、ペントシジンの生成が著しく抑制されることが判明した。

【００８８】

［実施例７］　腹膜透析液中のカルボニル化合物量に対するカルボニル化合物トラップビーズの添加効果

カルボニル化合物トラップビーズによる腹膜透析液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。カルボニル化合物トラップビーズ（PS-TsNHNH2, ARGONAUT TECHNOLOGIES社）の入ったチューブに、ジメチルスルホキシド100μlを加え膨潤させた後、腹膜透析液（バクスター製、ダイアニール PD-4,1.5）900μLを添加し、ローテーターを用いて室温で16時間撹拌した。次に、カルボニル化合物トラップビーズの入った懸濁液を、ポアーサイズ0.22μmの遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）で濾過し、濾液中のカルボニル化合物量を以下のようにして測定した。

【００８９】

＜カルボニル化合物の定量＞

1）試料溶液の測定

試料溶液200μLと、 2,4-DNPHを 0.5N 塩酸に溶かした溶液（0.025%）200μLを混合後

、30℃で30分間反応させた。次に、1Mのアセトン水溶液 20μLを添加し、30℃で10分間インキュベートした後、200μLの n-ヘキサンで3回洗浄した。さらに、水層に 200μLのオクタノールを加えてヒドラゾンを抽出し、オクタノール層について 360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計（日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAmax250）で測定した。

2）検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、1）と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル化合物量に対する検量線を作成した。

3）カルボニル化合物量の定量

試料溶液中のグルコース濃度をグルコース測定キット（和光純薬製、グルコースCII-ワコー）を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル化合物量を求めた。試料溶液中の総カルボニル化合物量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、試料溶液中のカルボニル化合物の量とした。

その結果を図１５に示す。腹膜透析液に 2mg のカルボニル化合物トラップビーズを添加し、室温で16時間撹拌することにより、カルボニル化合物量は 55%減少した。また、添加するカルボニル化合物トラップビーズの量を 10mgまで増加させた場合、カルボニル化合物量はさらに減少した。。

【００９０】

これらの結果から、カルボニル化合物トラップ剤を固定化した担体を用いて、腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制できることが明らかとなった。

【００９１】

［実施例８］　活性炭によるジカルボニル溶液中のカルボニル化合物トラップ作用

カルボニル化合物トラップ剤として活性炭を用い、ジカルボニル溶液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。活性炭（和光純薬工業製）２５μgまたは５０μgを入れたチューブに、ジカルボニル化合物をリン酸緩衝液（以下PBSと省略する）に溶解したジカルボニル溶液（いずれも１００μM）をそれぞれ９００μl分注した。ジカルボニル化合物としては、グリオキサール、メチルグリオキサール、および3-デオキシグルコソンを用いた。このチューブをローテーターにセットして室温で１９時間撹拌した。撹拌後、チューブ内の溶液をポアーサイズ0.22μmの遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）で濾過し、各ジカルボニル化合物の濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。測定方法は、公知の方法に従った。

【００９２】

結果は図１６に示した。９００μlのジカルボニル溶液に活性炭２５μgを添加した場合、グリオキサール(GO)で71%、メチルグリオキサール(MGO)で94%、そして3-デオキシグルコソン(3DG)では93%が活性炭によってトラップされていた。活性炭を５０μg用いた場合には、グリオキサールで85%、メチルグリオキサールや3-デオキシグルコソンでは98%と、試験した全てのジカルボニル化合物の大部分が活性炭によってトラップされることが確認できた。

【００９３】

［実施例９］　活性炭による腹膜透析液中のカルボニル化合物トラップ作用

カルボニル化合物トラップ剤として活性炭を用い、腹膜透析液中のカルボニル化合物の除去効果を検討した。活性炭（和光純薬工業製）２５μgまたは５０μgを入れたチューブに、腹膜透析液（バクスター製、ダイアニールPD-4,1.5、商品名）を９００μl分注した。このチューブをローテーターにセットして室温で１９時間撹拌した。撹拌後、チューブ内の腹膜透析液をポアーサイズ0.22μmの遠心式濾過チューブ（ミリポア製、UFC30GV00）で濾過し、濾液に含まれるグリオキサール、メチルグリオキサール、および3-デオキシグルコソンの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。測定方法は、公知の方法に従った。

【００９４】

結果は図１７に示した。９００μlの腹膜透析液に活性炭２５μgを添加した場合、活性

炭を加えない腹膜透析液に対して、グリオキサール(GO)で56%、メチルグリオキサール(MGO)で71%、そして3-デオキシグルコソン(3DG)では62%が活性炭によってトラップされていた。活性炭を５０μg用いた場合には、グリオキサールで64%、メチルグリオキサールで78%、そして3-デオキシグルコソンでは77%のジカルボニル化合物が活性炭によってトラップされることが確認できた。

【００９５】

［実施例１０］　グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するグアニジン、アミノグアニジン、ビグアナイド剤のトラップ効果

グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの混合溶液（各1mM）50μl、0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.4）400μl、30mMのグアニジン、アミノグアニジン、またはビグアナイド剤溶液50μlを混合し、37℃でインキュベートした。ビグアナイド剤には、メトホルミン(metformin)、ブホルミン(buformin)、およびフェンホルミン(phenformin)を用いた。インキュベート終了後、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンを、o-フェニレンジアミンを用いてキノキサリン誘導体とし、それぞれの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

【００９６】

結果は図１８（グアニジン）、図１９（メトホルミン）、図２０（ブホルミン）、図２１（フェンホルミン）、図２２（アミノグアニジン）に示した。グアニジン、アミノグアニジン、および、いずれのビグアナイド剤も、特にメチルグリオキサールの濃度を顕著に低下させる効果が確認された。またアミノグアニジンにおいては、メチルグリオキサールに対して劇的に濃度を低下させ、更にその他のビグアナイドでは顕著な濃度低減作用が見られなかった3-デオキシグルコソンに対しても濃度を著しく低下させている。

【００９７】

［実施例１１］　グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するSH剤のトラップ効果

グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの混合溶液（各1mM）50μl、0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.4）400μl、30mMのSH化合物溶液50μlを混合し、37℃でインキュベートした。インキュベートした。SH化合物には、システイン(cystein)、Ｎ－アセチルシステイン(N-acetylcysteine)、および GSH を用いた。インキュベート終了後、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンをo-フェニレンジアミンを用いてキノキサリン誘導体とし、それぞれの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

【００９８】

結果は図２３（システイン）、図２４（Ｎ－アセチルシステイン）、および図２５（GSH）に示した。いずれのSH化合物にも、グリオキサールとメチルグリオキサールの両方に対して、顕著に濃度を低下させる作用が確認された。

【００９９】

［実施例１２］　グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するアルブミンのトラップ効果

グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンの混合溶液（各1mM）50μl、0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.4）400μl、１００mg/mlのウシ血清アルブミン溶液50μlを混合し、37℃でインキュベートした。インキュベート終了後、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンをo-フェニレンジアミンを用いてキノキサリン誘導体とし、それぞれの濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

【０１００】

結果は図２６に示した。ウシ血清アルブミンには、グリオキサールとメチルグリオキサールの濃度を顕著に低下させる作用が確認された。

【０１０１】

［実施例１３］　腹膜透析液にSH化合物を添加し、37℃でインキュベートしたときのペントシジンの生成抑制効果

腹膜透析液（バクスター製　PD-4,1.5）490μl、SH化合物を0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）に溶かした液70μｌ、ウシ血清アルブミンを腹膜透析液（バクスター製　PD-4,1.5）に30mg/mlとなるように溶かした液140μｌを混合し、37℃で1週間インキュベートした。SH化合物には、システイン(cystein)、Ｎ－アセチルシステイン(N-acetylcysteine)、GSH、およびアミノグアニジンを用いた。インキュベート終了後、溶液50μｌに10%トリクロル酢酸50μｌを加え、遠心して蛋白を沈殿させた。蛋白を300μｌの5%トリクロル酢酸で洗浄し、乾固させた。次に、６N　HClを100μ添加し、110℃で16時間加熱した後、高速液体クロマトグラフィーでペントシジンを定量した（T.Miyataら、1996,J.Am.Soc.Nephrol.,7:1198-1206, T.Miyataら, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,93:2353-2358）。

【０１０２】

結果は図２７に示した。SH化合物の添加によって、ペントシジンの生成量が顕著に抑制されることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【０１０３】

本発明によれば、腹膜透析において患者を苦しめていたカルボニル化合物による障害を、簡単に取り除くことができる。公知の腹膜透析液においては、製造中に生じたカルボニル化合物とともに、透析によって生体内から腹腔中に浸出したカルボニル化合物により、透析患者の腹膜は常にカルボニルストレスの状態に置かれていた。これに対して本発明では、腹膜透析液中に生成するカルボニル化合物を効果的に除去することができるので、透析患者のカルボニルストレス改善に貢献する。更に、カルボニル化合物トラップ剤の腹腔内への導入、あるいはカルボニル化合物トラップ用カートリッジへの透析液の循環によって、腹腔中に浸出したカルボニル化合物をも効果的に不活性化、あるいは除去することができる。このように、本発明は腹膜透析に伴うカルボニル化合物に起因する腹膜障害を含む腹膜透析に起因する障害の対策として非常に有効なアプローチを提供するものである。

【０１０４】

また、本発明では、加熱滅菌や長期保存時のグルコースの分解に由来するカルボニル化合物が除去されるため、従来グルコースの分解のために製剤学的に調製が困難であった中性域の pH を有する腹膜透析液を提供することができ、より生理的な腹膜透析療法が可能となる。

【０１０５】

本発明の腹膜透析液は、カルボニル化合物トラップ剤との接触あるいは投与といった簡単な操作のみで実施することができ、特殊な製造設備も要求しない。したがって、本発明によるカルボニル化合物トラップ剤とそれを利用した腹膜透析液、ならびにその製造方法は、腹膜透析治療における新しい治療概念を生み出すものである。

【図面の簡単な説明】

【０１０６】

【図１】腹膜透析液および腹膜透析排液中のカルボニル化合物量を示す図である。

【図２】腹膜透析患者の腹膜におけるカルボニル修飾蛋白の組織的局在を示す写真（上段）およびその模式図（下段）である。図中、Aは剥離した中皮細胞下の結合組織中の陽性箇所を表す。Bは肥厚した血管壁の陽性箇所を表す。

【図３】グリオキサール、メチルグリオキサール、および 3-デオキシグルコソンを添加した中皮細胞におけるVEGF mRNA の発現を示す図である。様々な濃度（0, 100, 200, 400μM）のグリオキサール(A)、3-デオキシグルコソン (B)、および メチルグリオキサール(C) でインキュベートしたラット中皮細胞培養から抽出した全RNAの逆転写を行った。VEGFおよびG3PDH cDNAを、それぞれ 30 および 21 サイクルのPCRにより増幅した。３連で実験を行い平均を求めた。それぞれの実験の平均値に関して、G3PDH mRNA に対する VEGF mRNA の比を計算した。実験は３回行い、その平均±S.D.をグラフにした。*P<0.0005。

【図４】メチルグリオキサール添加による微小血管内皮細胞におけるVEGF蛋白質の産生を示す図である。ヒト微小血管内皮細胞を様々な濃度（0, 200, 400μM）のメチルグリオキサールの存在下で培養し、ELISAにより培養上清中に放出されるVEGF蛋白質を定量した。

３回の実験の代表的な結果を示す。データは平均±rangeで表した。*P<0.05、**P＜0.01。

【図５】メチルグリオキサールを添加した内皮細胞におけるVEGF mRNA の発現を示す図である。ヒト内皮細胞を様々な濃度（0，100，200，400μM）のメチルグリオキサールの存在下で培養し、全mRNAを抽出後に逆転写反応を行った。VEGFおよびG3PDH cDNAを、それぞれ 30 および 21 サイクルのPCRにより増幅した。３連で実験を行い平均を求めた。それぞれの実験の平均値に関して、G3PDH mRNA に対する VEGF mRNA の比を計算した。実験は３回行い、その平均±S.D.をグラフにした。*P<0.05、**P<0.005、***P<0.0001。

【図６】10日間、毎日メチルグリオキサールを腹腔内投与したラット腹腔組織でのVEGF mRNA の発現を示す図である。腹膜でのVEGFおよびG3PDH mRNA の発現を、それぞれ 28 および 16 サイクルのRT-PCRにより増幅した。３連で実験を行い平均を求めた。それぞれの実験の平均値に関して、G3PDH mRNAに対するVEGF mRNA の比を計算した。実験は３回行い、その平均±S.D.をグラフにした。*P<0.05。

【図７】腹膜透析患者の腹腔内でのカルボニルストレスを表す図である。

【図８】腹膜透析排液インキュベーションによるペントシジン生成に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図９】腹膜透析排液インキュベーションによるプロテインカルボニル生成に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図１０】３人の腹膜透析患者（患者Ｉ、患者Ｓおよび患者Ｋ）の腹膜透析(CAPD)排液中のカルボニル化合物量に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図１１】酸性環境における腹膜透析液中の5-HMF生成に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図１２】中性環境における腹膜透析液中の5-HMF生成に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図１３】酸性および中性環境における腹膜透析液中のカルボニル化合物量に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図１４】腹膜透析液へのカルボニル化合物トラップビーズ添加によるペントシジン生成抑制効果を示す図である。

【図１５】腹膜透析液へのカルボニル化合物トラップビーズ添加によるカルボニル化合物除去効果を示す図である。

【図１６】ジカルボニル溶液への活性炭添加によるカルボニル化合物除去効果を示す図である。

【図１７】腹膜透析液への活性炭添加によるカルボニル化合物除去効果を示す図である。

【図１８】グアニジンを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

【図１９】ビグアナイド剤にメトホルミン（Metformin）を用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

【図２０】ビグアナイド剤にブホルミン（Buformin）を用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

【図２１】ビグアナイド剤にフェンホルミン（Phenformin）を用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

【図２２】アミノグアニジンを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

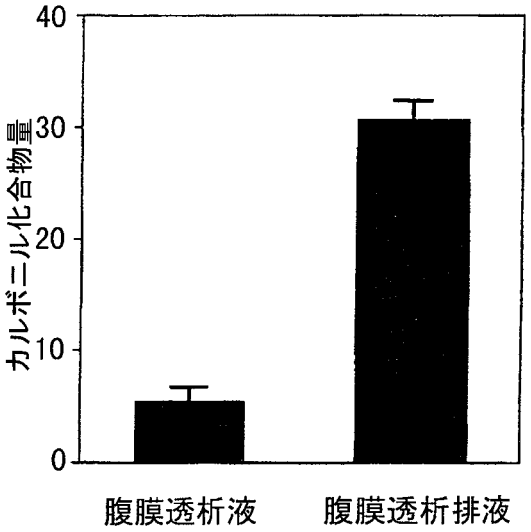
【図２３】SH化合物にシステインを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

【図２４】SH化合物にN-アセチルシステインを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。

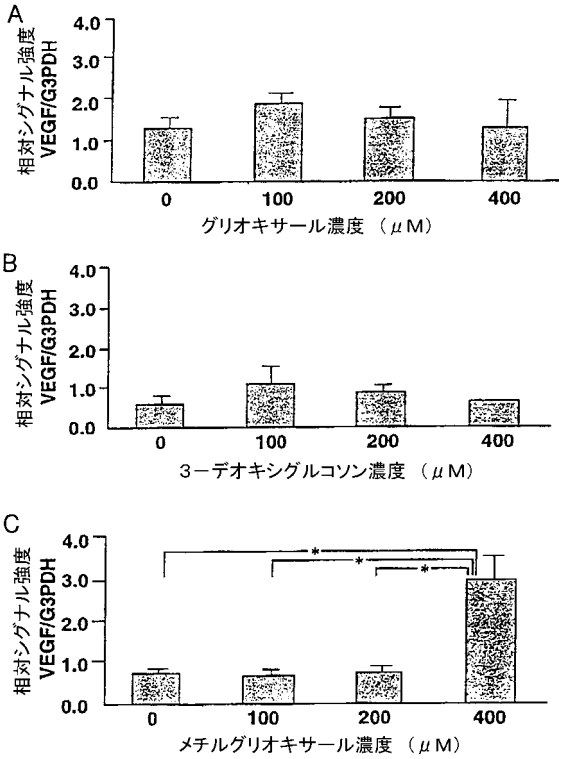
【図２５】SH化合物にGSHを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-

デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。
【図２６】SH化合物にアルブミンを用いたときの、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソンに対するトラップ効果を示す図である。
【図２７】腹膜透析液にSH化合物を添加したときのペントシジンの生成抑制効果を示す図である。

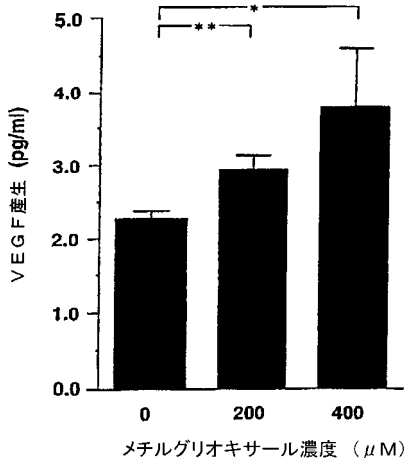
【図１】



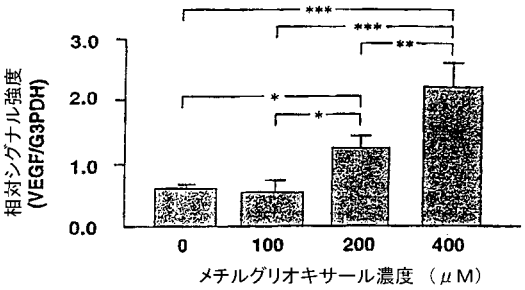
【図３】



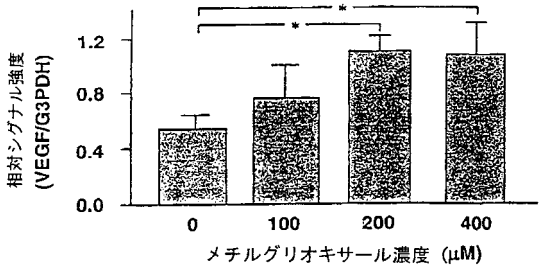
【図４】



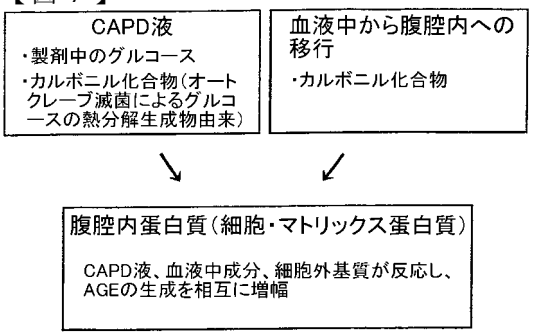
【図５】



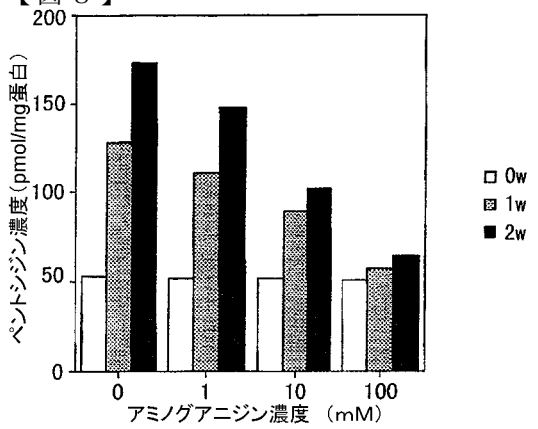
【図６】



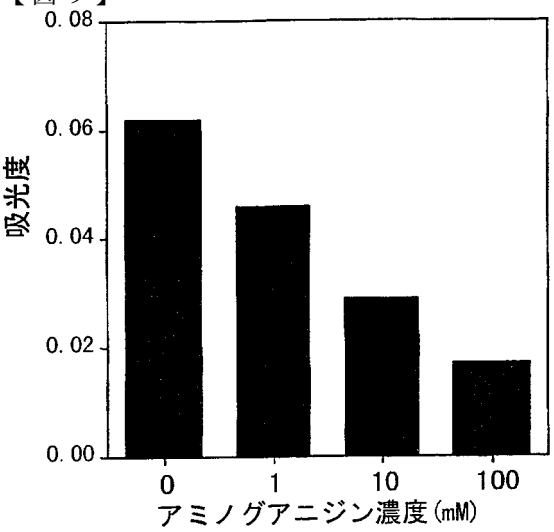
【図７】



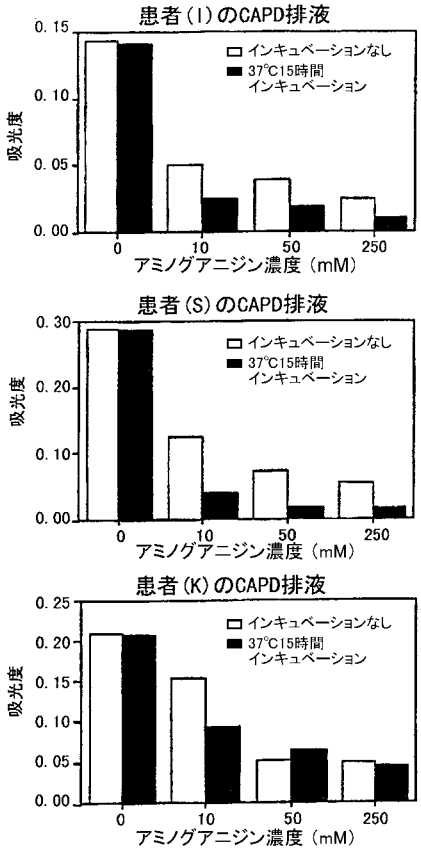
【図８】



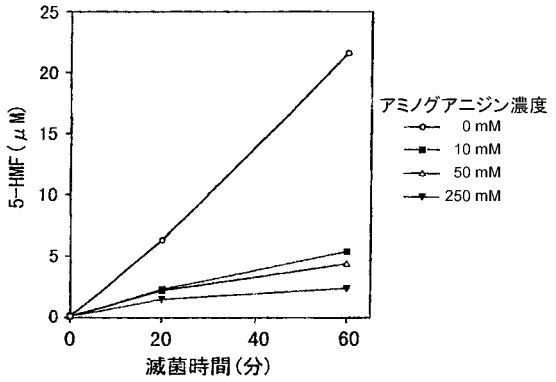
【図９】



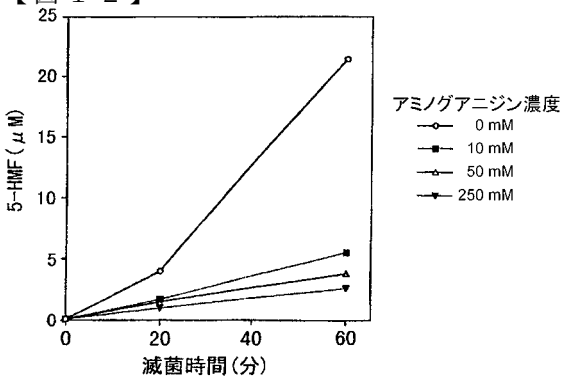
【図１０】



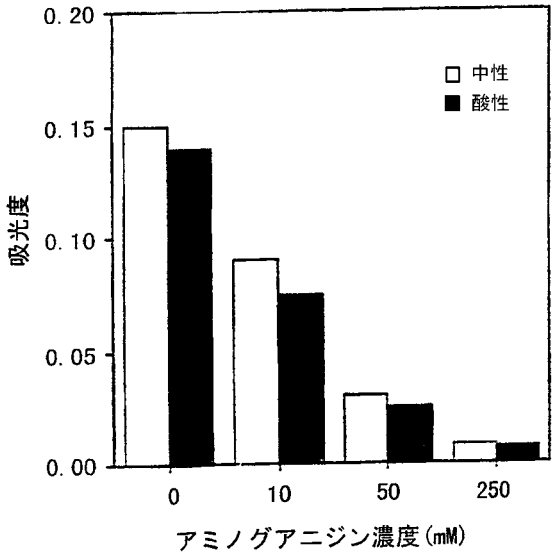
【図１１】



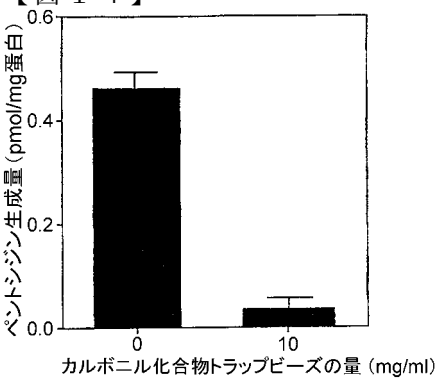
【図１２】



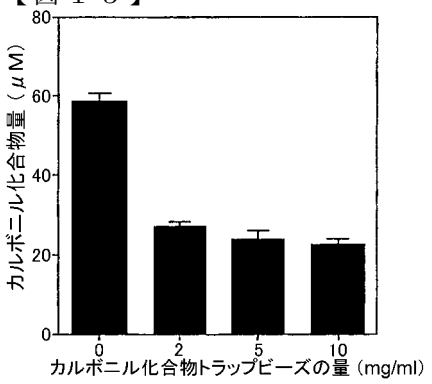
【図１３】



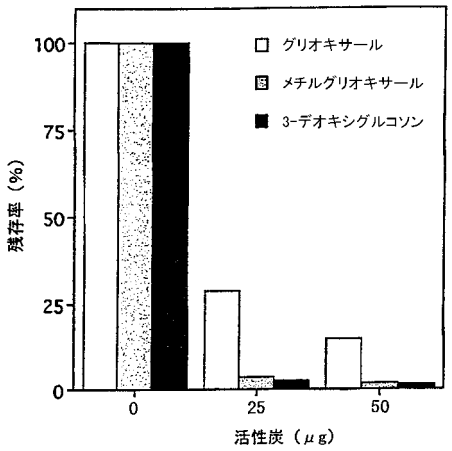
【図１４】



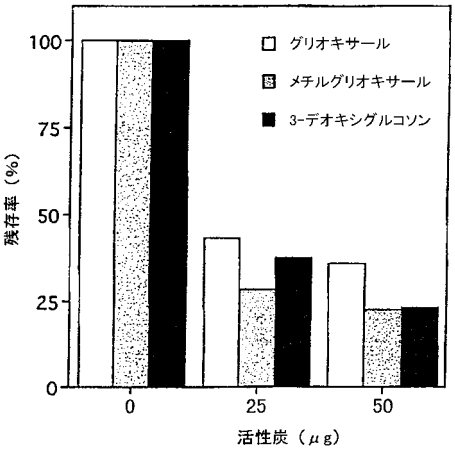
【図１５】



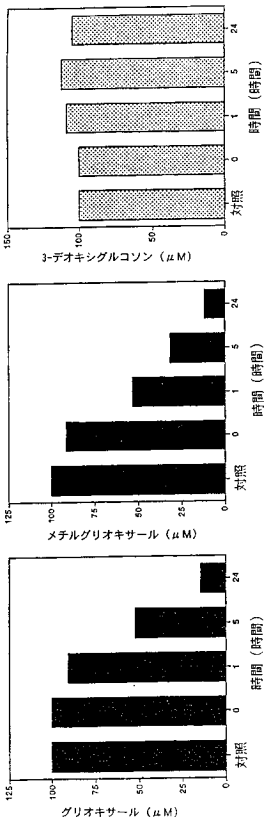
【図１６】



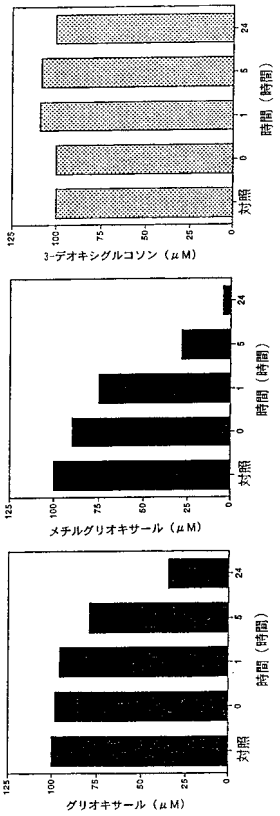
【図１７】



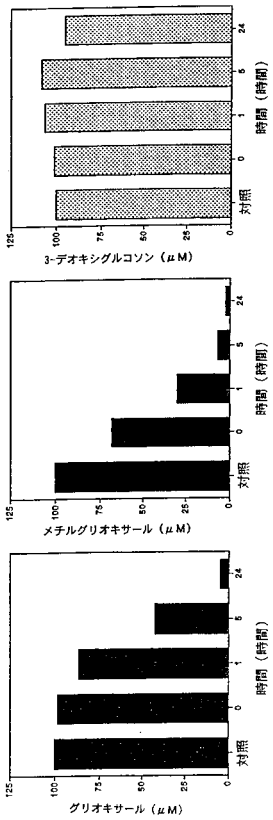
【図１８】



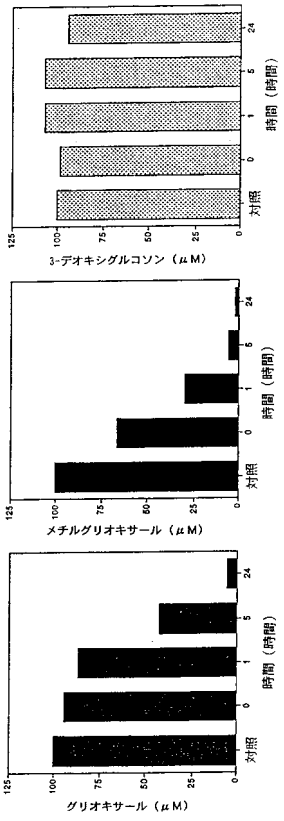
【図１９】



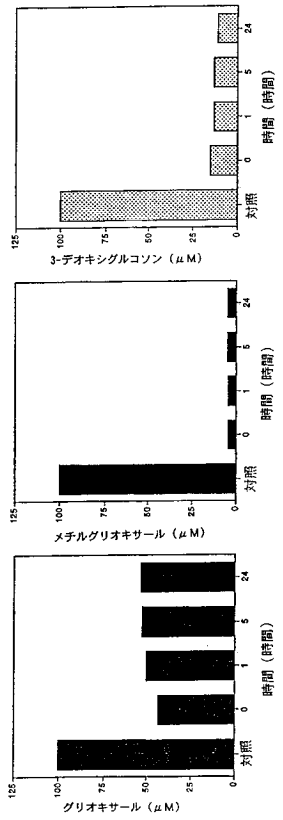
【図２０】



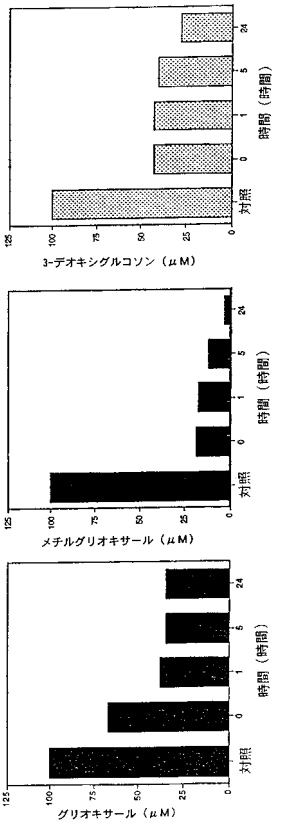
【図２１】



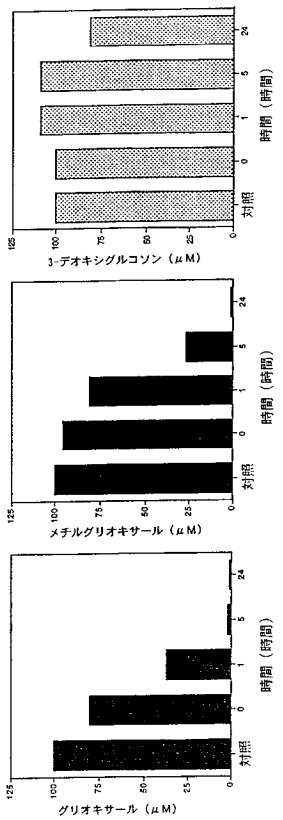
【図２２】



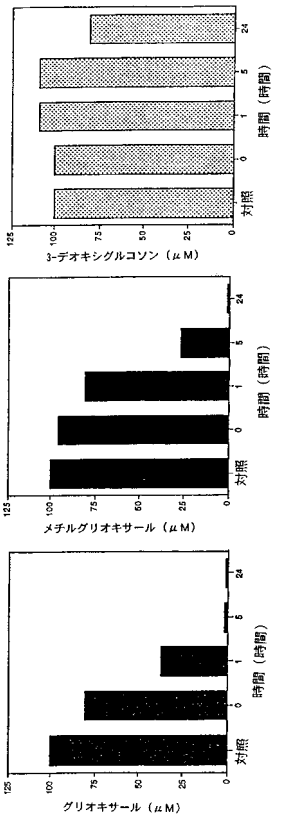
【図２３】



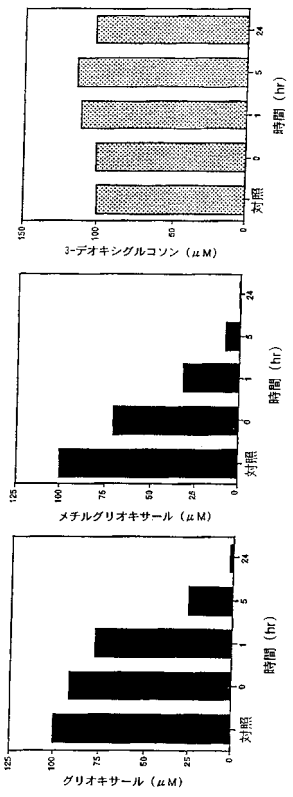
【図２４】



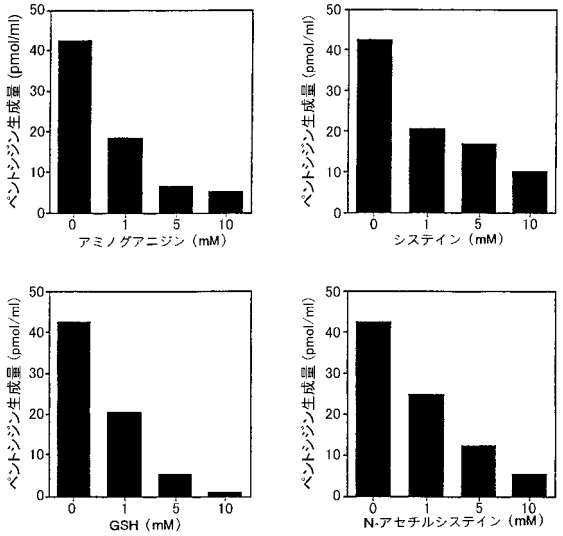
【図２５】



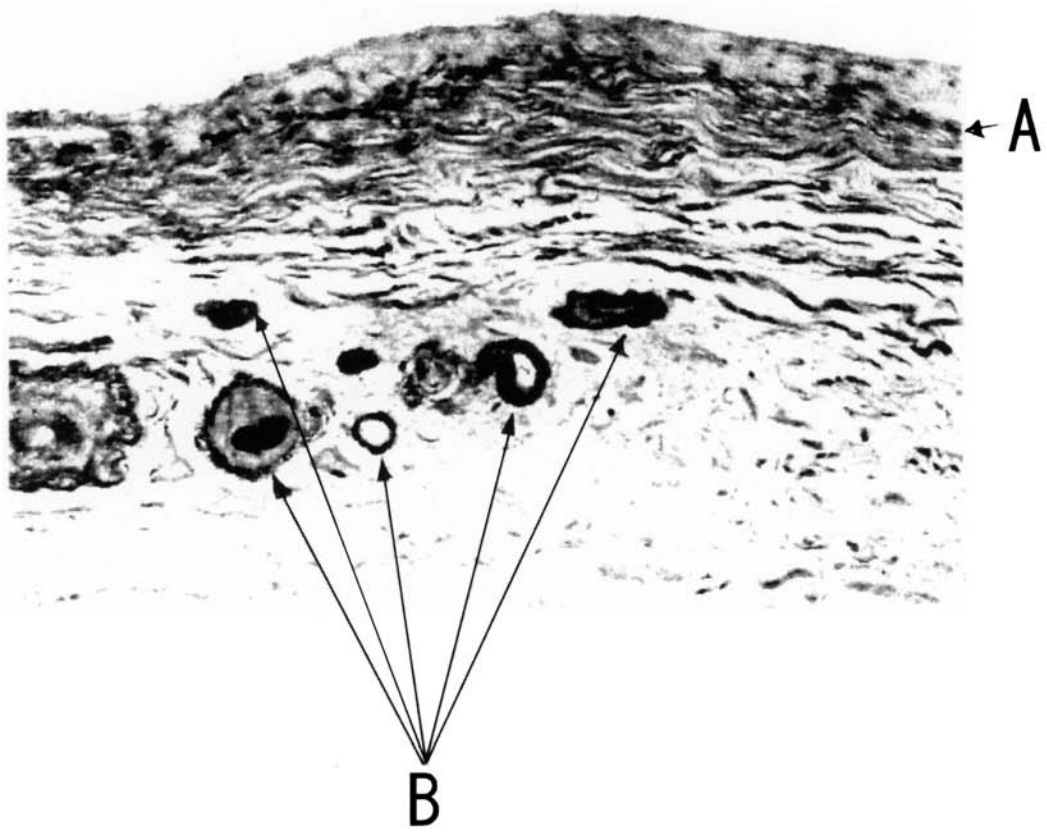
【図２６】

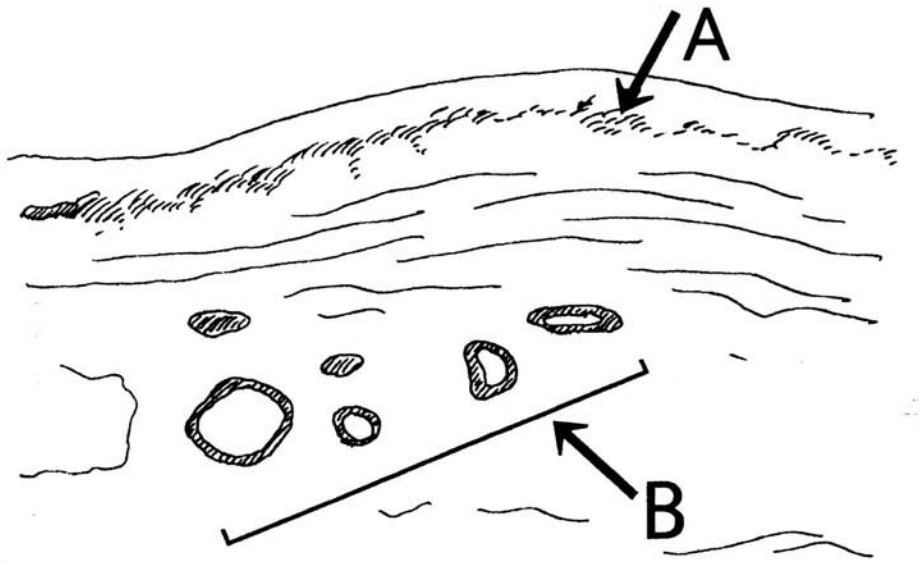


【図２７】



【図２】





【配列表】

2006305345000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***31/15***	***(2006.01)***	A61K	31/4415		4C206
A61K	***33/44***	***(2006.01)***	A61K	31/15		4G066
A61K	***31/198***	***(2006.01)***	A61K	33/44		
A61P	***7/08***	***(2006.01)***	A61K	31/198		
B01J	***20/26***	***(2006.01)***	A61P	7/08		
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	B01J	20/26	H	
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	
			C12Q	1/68	A	

(72)発明者　宮田　敏男
神奈川県伊勢原市桜台２丁目１６－２５　エクセル伊勢原１０２号

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 CA09 CA12 HA12
4B063 QA19 QQ02 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34
QX01
4C077 AA06 BB01 BB02 BB03 EE03 GG14 JJ02 JJ18 KK03 KK13
MM05 MM06 NN14 NN20 PP02 PP08 PP10 PP12 PP13 PP14
PP15 PP16 PP21
4C084 AA02 AA03 AA17 BA42 BA44 BA50 CA62 MA17 NA14 ZA512
ZC372 ZC412
4C086 AA01 AA02 BC18 HA06 MA01 MA04 MA10 NA14 ZA51 ZC37
ZC41
4C206 AA01 AA02 HA03 HA31 JA58 MA01 MA04 MA14 MA30 NA14
ZA51 ZC37 ZC41
4G066 AA45B AA51B AB10B AC14C AD02B CA20 DA11 EA04