

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年7月10日 (10.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/055481 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/4172, C07D 233/64, A61P 1/16, 1/18, 9/00, 11/00, 13/00, 17/00, 19/00, 35/00, 43/00

崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13420

(74) 代理人: 石田 康昌, 外(ISHIDA, Yasumasa et al.); 〒222-0033 神奈川県 横浜市港北区新横浜 3丁目20番 12号望星ビル7階 加藤内外特許事務所 Kanagawa (JP).

(22) 国際出願日: 2002年12月24日 (24.12.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-392464 2001年12月25日 (25.12.2001) JP
特願2002-77603 2002年3月20日 (20.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都中央区京橋 1丁目15番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀江 孝 (HORIE, Takashi) [JP/JP]; 〒210-0801 神奈川県 川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 中條 恵 (NAKAJOH, Megumi) [JP/JP]; 〒210-0801 神奈川県 川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 惣中 一郎 (SONAKA, Ichiro) [JP/JP]; 〒210-0801 神奈川県 川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 石崎 園子 (ISHIZAKI, Sonoko) [JP/JP]; 〒210-0801 神奈川県 川

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ORGAN FIBROSIS INHIBITORS

(54) 発明の名称: 臓器線維化抑制剤

(57) Abstract: It is intended to provide organ fibrosis inhibitors, in particular, liver fibrosis inhibitors which contain as the active ingredients histidine, preferably together with cysteine and/or cystine. Owing to the combined use, a remarkable effect of inhibiting organ fibrosis, in particular, liver fibrosis can be established. These substances are usable as the desired active ingredients in the forms appropriate for using in drugs, foods and drinks. It is also intended to provide organ fibrosis inhibitors comprising the active ingredients as described above either separately or as a combination of one of them with a mixture of the other two ingredients. Thus, it is possible to present organ fibrosis inhibitors such as liver fibrosis inhibitors which are applicable in the forms appropriate for using not only in drugs for various organ diseases caused by fibrosis (liver diseases, etc.) but also in foods with health claims for improving and maintaining liver functions and foods and drinks for sick persons.

[続葉有]



WO 03/055481 A1



(57) 要約:

ヒスチジンを、好ましくは、システイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとを有効成分として含む、臓器線維化抑制剤、特に肝線維化抑制剤を提供する。この併用により臓器線維化、特に肝線維化抑制作用を著しく示し、医薬品の形態や飲食品に使用した形態でこの両者を目的とする有効成分として使用することができる。

前記有効成分それぞれ別形態で、或いはその有効成分の1種と2種混合物とをそれぞれ別々に製品化した組み合わせも臓器線維化抑制剤として提供する。

この結果、線維化に起因する各種臓器疾患、例えば肝臓疾患用薬剤等医薬品のみならず、肝機能を改善、維持する保健機能食品、病者用食品等飲食品に使用した形態でも適用可能な肝線維化抑制剤等、臓器線維化抑制剤を提供する。

明 細 書

臓器線維化抑制剤

技術分野

本発明は新規臓器線維化抑制剤（腎線維化抑制剤、脾線維化抑制剤、肺線維化抑制剤、血管線維化抑制剤、皮膚線維化抑制剤、骨髄線維化抑制剤、肝線維化抑制剤等）、より詳しくはヒスチジンを有効成分として、好ましくはシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとを有効成分として、含有する臓器線維化抑制剤に関する。臓器の線維化を有効に抑制し、上記有効成分が全てアミノ酸の一成分であり経口投与又は経口摂取が可能であるところから、線維化に起因する各種臓器疾患用の薬剤、特に肝線維症、肝硬変等肝臓疾患用薬剤（医薬品）の形態で、また、保健機能食品、病者用食品等の飲食品に使用された形態で実施することができる。

更に、本発明は臓器線維化抑制方法（生体内の臓器線維化に起因する疾患の治療、改善、進展防止、予防等のための処置法等含む。）、前記有効成分の臓器線維化抑制剤（医薬品、飲食品等の形態を含む。）製造への使用、前記複数の有効成分を使用する場合それ等有効成分の臓器線維化抑制剤としての組み合わせ或いはそれ等の臓器線維化抑制方法への使用のための組み合わせ等に関する。

背景技術

臓器線維化抑制剤、特に肝線維症、肝硬変等肝臓疾患用薬剤として有効な薬剤（予防、改善及び／又は治療剤）は見当たらない。

例えば、肝硬変はウイルス性やアルコール性肝炎等の慢性肝疾患の終末像であるばかりでなく、高率に肝細胞癌に進行することから、合併症（腹水・浮腫、脳症、黄疸）に対する既存療法他に、肝硬変の病因である肝線維化に対する直接的な治療法の開発が望まれている。

肝線維化はウイルスやアルコール等の外的要因若しくは自己免疫異常が関与す

る内的要因によって惹起される肝細胞壊死と、肝機能を維持するための肝再生とのバランスが崩れた場合に、肝臓組織を修復するためにコラーゲン等の細胞外マトリックスが過剰沈着した結果と考えられている。細胞レベルでは、肝実質細胞の障害、壊死がクッパー細胞や内皮細胞等を活性化し、活性化されたクッパー細胞や内皮細胞等からTNF- α 、TGF- β 、PDGFが放出される。次に、それ等の因子が、肝線維化の主役とされている星細胞を活性化し、細胞増殖とコラーゲンの合成が惹起されるものと考えられている。

更に、肺、腎、脾、皮膚等の臓器においても、肝同様に、各々の臓器に存在する線維芽細胞や各臓器に特異的な間質系細胞（腎メザンギウム細胞、脾星細胞等）が各種サイトカインの刺激により、増殖、細胞外マトリックスの合成異常を呈することにより、臓器線維症が引き起こされるものと考えられている。

そこで、肝線維化に対する直接的で著効を示す薬剤の開発が求められている。更に、それ以外の各種の臓器線維化に有効な薬剤の開発が同様に求められている。

発明の開示

1. 発明が解決しようとする課題

本発明が解決しようとする課題は、臓器線維化抑制作用、特に肝線維化抑制作用を著しく示す成分を開発し、これを使用し肝臓等各種臓器疾患用薬剤等の医薬品のみならず、保健機能食品、病者用食品等飲食品に使用した形態でも適用可能な薬剤を提供することにある。

2. 課題を解決するための手段

本発明者等は上記課題を解決すべく、鋭意検討を進めた結果、ヒスチジン（L-ヒスチジン、D-ヒスチジン、DL-ヒスチジン等）が前記臓器線維化抑制作用、特に肝線維化抑制作用を著しく示し、これを有効成分に使用すると肝臓疾患等の各種臓器疾患用薬剤等の医薬品のみならず、保健機能食品、病者用食品等飲食品に使用した形態でも適用できること、更に上記ヒスチジンに対し特にシステ

イン（L-システイン、D-システイン、DL-システイン等）及び／又はシスチン（L-シスチン、D-シスチン、DL-シスチン等）を有効成分として併用することにより、より強い線維化抑制作用を示すこと等を見出し、これ等の各種知見に基づいて本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、一つの形態として、ヒスチジンを有効成分として、好ましくはシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとを有効成分として含有することに特徴を有する腎線維化抑制剤、脾線維化抑制剤、肺線維化抑制剤、血管線維化抑制剤、皮膚線維化抑制剤、骨髄線維化抑制剤、肝線維化抑制剤等の臓器線維化抑制剤に存する。システイン、シスチン及びヒスチジンはそれぞれ、L-体、D-体、DL-体何れも使用可能である。また、システイン、シスチン及びヒスチジンはそれぞれ、遊離体のみならず、塩の形態でも使用することができる。塩の形態には酸付加塩や塩基との塩等を挙げることができ、システイン、シスチン及びヒスチジンの医薬品又は飲食品として許容される塩を選択することが好ましい。システイン、シスチン及びヒスチジンに、それぞれ付加して医薬品又は飲食品として許容される塩を形成する酸としては、例えば、塩化水素、臭化水素、硫酸、リン酸等の無機酸、酢酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸又はモノメチル硫酸等の有機酸が挙げられる。システイン、シスチン及びヒスチジンの医薬品又は飲食品として許容される塩基との塩の例としては、例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム等の金属の水酸化物或いは炭酸化物や、アンモニア等の無機の塩基との塩、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、エタノールアミン、モノアルキルエタノールアミン、ジアルキルエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等の有機の塩基との塩が挙げられる。

この臓器線維化抑制剤の使用に関しては線維化に起因する臓器の各種疾患用薬剤として使用することができる。例えば、肝臓疾患用薬剤（肝臓疾患の予防、改善及び／又は治療等に使用する薬剤。）、特に慢性肝炎、肝硬変及び肝臓癌等医薬品の形態で使用することができるし、保健機能食品、病者用食品等飲食品に使用した形態で使用することもできる。

前記ヒスチジンを少なくとも含み、各種臓器のために線維化を抑制する作用、

例えば肝線維化抑制作用を発現する薬剤（飲食品に使用した形態を含む。）は本発明に該当し、従って本発明の目的や本発明で奏する作用（効果）を阻害しない範囲で、前記システイン及び／又はシスチン等や、或いは各種必要なその他の成分等を随時配合、使用することもできる（例えば、後述の補助剤、担体等参照。）。

尚、真田等は、L-ヒスチジンを投与したラットにおいて、D-ガラクトサミン投与による肝障害が軽減されることを報告している（Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 63, 319-322, 1999年参照。）。しかし、ヒスチジンに肝線維化等の臓器線維化抑制作用があることは示されておらず、示唆も無い。

更に、ヒスチジンについて、星細胞への直接作用による活性化抑制や、例えば肝線維化抑制作用等については検討されていない。

システイン及び／又はシスチンを併用する場合、システイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとの含有比率（モル比率）については、遊離体換算でシステイン及び／又はシスチン：ヒスチジン＝1：0.1～10、好ましくは1：0.2～8、より好ましくは1：0.3～6になるように各成分を配合することが望ましい。この場合、シスチンについてはシステインのモル比に換算して算定するとよい。

システイン及び／又はシスチンを併用する場合、臓器線維化抑制剤としてシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとをそれぞれ分離して別の形態、例えば2種製剤等にそれぞれを含めてセットで使用してもよい。従って、有効成分に使用する全てのアミノ酸を同一製剤或いは同一飲食品等の形態に含めて使用することもできるし、有効成分に使用するアミノ酸を二つ又はそれ以上の形態、例えば二つ又は三つの製剤及び／又は飲食品等の形態に分離して使用することもできる。例えば、一つのアミノ酸が医薬品で、他のアミノ酸が飲食品というような形態での使用も可能である。

本発明は、別の形態として、臓器線維化抑制剤に使用することに特徴を有するシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとの組み合わせにも存する。

組み合わせる複数の有効成分を、代表的には混合状態で一つの形態、例えば合

剤として使用することができる。また、システイン又はシスチンと、ヒスチジンとを、それぞれ分離した形態、例えば別形態の製剤或いは飲食品の形態で；又は、システイン、シスチン及びヒスチジンの3種それぞれを、若しくはその何れか2種混合物と他の1種とを、相互に分離した形態、例えば別形態の製剤或いは飲食品の形態で使用することもできる。

但し、システイン、シスチン及びヒスチジンは、それぞれL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、また塩の形態でもよい。

一つの有効成分について非経口製剤で、他の有効成分について経口製剤であるような組み合わせや、一つが医薬製剤で、他が飲食品の形態であるような組み合わせや、一つが非経口製剤、もう一つが経口製剤、三つ目の有効成分については飲食品であるような3種成分の組み合わせも可能である。

この発明は前記本発明の臓器線維化抑制剤を含むので、本明細書中前記本発明についての説明は全てこの発明の説明に適用される。この発明は有効成分単位で別々に医薬品として或いは飲食品として製品化されたものをも含み、それぞれ同時に摂取又は投与する前記本発明に対し、この発明においては本発明で使用する有効成分の1種又は2種をそれぞれ別々の摂取又は投与形態で、また時と所を異にして摂取又は投与できるようにしたものであり、前記本発明に対する明細書の説明を参考に、同様にこの発明を実施することができる。

尚、このようなシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとの併用による臓器線維化抑制作用についてはこれまでに報告されておらず、また示唆も無い。

本発明は、別の形態として、ヒスチジンを、好ましくはシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとを生体内に投与することに特徴を有する臓器線維化抑制方法（臓器線維化に起因する疾患の治療、改善、進展防止、予防等のための処置法等含む。）に存する。有効成分として上記複数のアミノ酸を生体内に投与する場合、これ等複数のアミノ酸の相対的な投与時期には特に制限は無い。例えば、これ等アミノ酸を全て同時に投与することもできるし、その中の1種のみ別個に投与したり、又は3種を使用する場合3種に分離して別々に時間をおいて生体内に投与することもできる。

但し、ヒスチジンはL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、また塩の形態でもよい。システイン及びシスチンは、それぞれL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、またそれぞれ塩の形態でもよい。

当該投与の形態としては、前記本発明の臓器線維化抑制剤の中から選択することができる。

本発明は、更に別の形態として、ヒスチジン、好ましくはシステイン及び／又はシスチン、並びにヒスチジンの臓器線維化抑制剤製造への使用に存する。

但し、システイン、シスチン及びヒスチジンは、それぞれL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、またそれぞれ塩の形態でもよい。

併用する場合複数の有効成分を、代表的には混合状態で一つの形態、例えば合剤として使用することができる。また、併用するシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとをそれぞれ分離し、又は別の形態、例えば複数の医薬品製剤及び／又は飲食品等の別形態で使用してもよい。上記有効成分として使用するアミノ酸の当該臓器線維化抑制剤製造への使用形態としては、前記本発明の臓器線維化抑制剤の中から選択することができる。

図面の簡単な説明

[図1]

図1は、実施例1において、肝ハイドロキシプロリン (Hyp) 量を測定した結果を示す。

normal : 無処置群 ;

平均値±標準偏差 normal (N=4) 、 Control (N=7) 、 His投与群 (N=8) ;

* : $p < 0.05$ Dunnet多重検定。

[図2]

図2は、実施例2において、血小板由来増殖因子刺激による星細胞のDNA合成能を測定した結果を示す。

平均値±標準偏差 (N=3) ; * : $p < 0.05$ T検定。

[図3]

図3は、実施例3において、血小板由来増殖因子刺激による星細胞のDNA合成能を測定した結果を示す。

平均値+標準偏差 (N=3) ; * : $p < 0.05$ T検定。

[図4]

図4は、実施例4において、血小板由来増殖因子刺激による星細胞のDNA合成能を測定した結果を示す(ラット肝星細胞PDGF刺激DNA合成能に対するCys及びHisの配合効果)。

平均値+標準偏差 (N=3) ; * : $p < 0.05$ T検定。

[図5]

図5は、実施例5において、細胞へのBrdU取り込み量の測定結果を示す。

図5a : PDGF添加 ; 図5b : FCS添加。

平均値+標準偏差 (N=3) ; * : $p < 0.05$ T検定。

[図6]

図6は、実施例6において、細胞へのBrdU取り込み量の測定結果を示す(FCS添加)。

平均値+標準偏差 (N=3) ; * : $p < 0.05$ T検定。

発明の実施の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

(臓器線維化抑制剤)

本発明の薬剤においては、各種臓器の線維化を抑制する作用、好ましくは肝線維化抑制作用を付与するために有効成分に、ヒスチジンを使用し、好ましくはシステイン及び/又はシスチンと、ヒスチジンとを使用し、医薬品の形態や飲食品に使用した形態で実施することができる。

適用の対象としては、肝臓に関しては、肝線維化抑制作用を利用してウイルス性、アルコール性等の慢性肝炎、その他の肝炎(非アルコール性脂肪性肝炎(NAFLD)等)、肝線維症、肝硬変、及び肝臓癌等、肝臓疾患を予防、改善及び/又は治療する動物、特にヒト(肝臓疾患患者等)であり、またその作用を利用して飲

食品、飼料等を通じて肝臓の働きを強化、維持することを期待する健常者、家畜等である。

腎臓に関しては、その線維化抑制作用を利用して、糖尿病性腎症、糸球体腎炎、腎硬化症等、腎線維化を示す腎疾患を予防、改善及び／又は治療する動物、特にヒト（腎疾患患者等）であり、またその作用を利用して、飲食品、飼料等を通じて腎臓の働きを強化、維持することを期待する健常者、家畜等である。

脾臓に関しては、その線維化抑制作用を利用して、脾線維症等、脾疾患を予防、改善及び／又は治療する動物、特にヒト（脾疾患患者等）であり、またその作用を利用して、飲食品、飼料等を通じて脾臓の働きを強化、維持することを期待する健常者、家畜等である。

肺に関しては、その線維化抑制作用を利用して、肺線維症等、肺疾患を予防、改善及び／又は治療する動物、特にヒト（肺疾患患者等）であり、またその作用を利用して、飲食品、飼料等を通じて肺臓の働きを強化、維持することを期待する健常者、家畜等である。

血管に関しては、その線維化抑制作用を利用して、動脈硬化症、PTCA施行やシャント挿入等、血管再開処置後の再狭窄等の線維性血管変性疾患を予防、改善及び／又は治療する動物、特にヒト（血管変性疾患患者等）であり、またその作用を利用して、飲食品、飼料等を通じて血管の働きを強化、維持することを期待する健常者、家畜等である。

皮膚、骨髄又はその他の臓器に対しては、その線維化抑制作用を利用して、例えば、強皮症、ケロイド、骨髄線維症、全身性硬化症等の疾患を予防、改善及び／又は治療する動物、特にヒト（線維性臓器変性疾患患者等）であり、またその作用を利用して、飲食品、飼料等を通じて該当する臓器の働きを強化、維持することを期待する健常者、家畜等である。

システイン、シスチン及びヒスチジンをを使用する場合の入手経路について、調製する場合その調製法は特に困難は無く、何れも従来技術に基づいて容易に行うことができるし、それ等のL-体、D-体、DL-体については市販品が存在するので、これ等を購入使用するのが簡便である。

システイン、シスチン及びヒスチジンを塩の形態で使用する場合には、従来から知られている造塩工程を利用して遊離体から目的とする塩（医薬品又は飲食品として許容される塩）を容易に調製することができる。前記の通り各種の塩、例えば、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、ナトリウム塩、ジエタノールアミン塩等を挙げることができる。

本発明で使用する前記有効成分を各種の薬剤、例えば肝臓疾患用薬剤として使用する場合、製剤の形態には特に制限は無く、経口剤でも非経口剤（注射剤）でもよい。飲食品に使用する場合、通常は経口摂取となるが、経口ではない特別（経管等）の摂取手段も考えられる。本発明で使用する全有効成分を同時に含む製剤の形態でも、また前述の如く有効成分のそれぞれを別々の製剤に調製することもできる。

有効成分の使用量については、例えば肝臓疾患用薬剤（医薬品製剤）に使用する場合、例えば患者の症状やその程度、剤形の種類等により適宜選択すればよい。ヒスチジンを投与するとき、経口投与の場合で通常、ヒスチジンの遊離体換算で1日当たり好ましくは10mg～50g程度、より好ましくは100mg～200g程度、更に好ましくは1～10g程度使用することができる。また、静脈等への注射剤として使用する場合、前記経口投与用製剤に使用する場合の前記有効成分使用量の二十分の一～二分の一程度の使用量で十分である。一方、システイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとを併用投与するとき、経口投与の場合で通常、システインとヒスチジンとの1：0.1～10（モル比、遊離体換算）の混合組成の場合、遊離体換算で1日当たり好ましくは10mg～50g程度、より好ましくは100mg～200g程度、更に好ましくは1～10g程度使用することができる。また、静脈等への注射剤として使用する場合、前記経口投与用製剤に使用する場合の前記有効成分使用量の二十分の一～二分の一程度の使用量で十分である。尚、シスチンをシステインに代えて、又はシステインと共に使用する場合、前記システインの使用量を参考に対応する使用量を容易に選択することができる。当然のことながら、ヒスチジン単独投与の場合に比較して、ヒスチジンとシステイン等との併用投与の場合にはより効果が高いので、より少ない投与

量で前者の場合と同一の効果を上げることができる。

上記有効成分の使用量に関し、勿論、重篤な場合には更に増量することもできる。投与の回数、時期については、数日に1回でも、また1日1回でも可能であるが、通常は1日当たり数回、例えば2～4回に分けて、好ましくは食後に投与される。

一方、飲食品に使用する場合、上記経口投与量を基準にその有効成分の飲食品中への配合量を決めることができる。

製剤の調製については、薬理学的に許容し得る各種の製剤用物質（補助剤等として）を含むこともできる。製剤用物質は製剤の剤形により適宜選択することができるが、例えば、賦形剤、希釈剤、添加剤、崩壊剤、結合剤、被覆剤、潤滑剤、滑走剤、滑沢剤、風味剤、甘味剤、可溶化剤等を挙げることができる。更に、製剤用物質を具体的に例示すると、炭酸マグネシウム、二酸化チタン、ラクトース、マンニトール及びその他の糖類、タルク、牛乳蛋白、ゼラチン、澱粉、セルロース及びその誘導体、動物及び植物油、ポリエチレングリコール、及び溶剤、例えば滅菌水及び一価又は多価アルコール、例えばグリセロールを挙げることができる。

本発明の薬剤は、前述の如く公知の又は将来開発される様々な医薬製剤の形態、例えば、経口投与、経腸投与、経皮的投与、吸入投与等各種の投与形態に調製することができる。本発明の薬剤をこれら様々な医薬製剤の形態に調製するためには公知の又は将来開発される方法を適宜採用することができる。

これ等様々な医薬製剤の形態として、例えば適当な固形又は液状の製剤形態、例えば顆粒、粉剤、被覆錠剤、錠剤、（マイクロ）カプセル、坐剤、シロップ、ジュース、懸濁液、乳濁液、滴下剤、注射用溶液、活性物質の放出を延長する製剤等を挙げることができる。

以上に例示した製剤形態にある本発明の薬剤には、薬効を奏するに有効な量の前記成分（L-ヒスチジン、並びに併用する場合L-システイン/L-シスチン及びL-ヒスチジン等）を含有すべきことは当然のことである。

それ以外の成分を使用する場合でも、これ等に基づき或いは知られている製剤

技術を利用して、また各種の剤形に応じて必要な製剤を調製することができる。

一方、飲食品への用途についても前記経口用薬剤その他の説明を参考にして容易に実施することができる。

本発明の臓器線維化抑制剤で使用する有効成分をそれぞれ別々に製品化（医薬品製剤、飲食品等）する場合や有効成分の2種混合物と1種成分とで別々に製品化する場合（本発明の前記組み合わせ）にも、前記説明を基に同様に実施することができる。

（その他の発明）

前記の通り本発明は、それぞれ別の形態として、

（イ）臓器線維化抑制剤に使用することに特徴を有するシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとの組み合わせ、或いは臓器線維化抑制剤としてのシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとの組み合わせ；

（ロ）ヒスチジンを、好ましくはシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンを生体内に投与することに特徴を有する臓器線維化抑制方法（臓器線維化に起因する疾患の治療、改善、進展防止、予防等のための処置法等含む。）；

（ハ）ヒスチジンの、好ましくはシステイン及び／又はシスチン、並びにヒスチジンの臓器線維化抑制剤製造への使用；等にも存する。

これ等の発明については、何れも前記本発明の臓器線維化抑制剤についての説明や、後述の実施例等に基づいて、また必要により従来から知られている技術を参考にするにより、容易に実施をすることができる。

好適な実施の形態

以下に、実施例及び比較例を示して本発明を詳細に説明するが、本発明はこれ等の実施例に限定されるものではない。

（実施例1）

9週齢SD系雄性ラットに10mg/kgのジメチルニトロソアミン（DMN）を週3回腹腔内に3週間投与して肝線維化を惹起した。市販飼料又は、被験物としてL

ーヒスチジン (His) を、それぞれ0.2、0.5、1.0、及び2.0%添加した実験食を、DMN投与開始日より供餌した。DMN投与開始21日目に肝臓を採取し、肝線維化の指標として肝臓中ハイドロキシプロリン (Hyp) 量をアミノ酸分析機を用いて測定した。この結果を図1に示した。この図1から明らかのように、DMNの投与によりおよそ6倍に増加した肝臓中のHypは、Hisの経口投与により有意に減少した。

(実施例2)

ウイスター (Wistar) 系雄性ラット肝より、プロナーゼE、コラーゲナーゼ肝灌流法にて星細胞を単離・培養し、8-14日目の星細胞を10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有培地で一晚培養後、0.1%FCS含有培地に交換し更に48時間培養した。その後、被検物質としてL-ヒスチジンを1~30mMになるように添加し、更に、血小板由来増殖因子 (PDGF) を終濃度25ng/mlとなるように加え、24時間星細胞を培養した。培養終了6時間前にブロモデオキシウリジン (BrdU) を培養系に加え、培養終了後、細胞へのBrdU取り込み量をELISA法 (enzyme-linked immunosorbent assay法) で測定した。コントロールとして培地中にPDGF (終濃度25ng/ml) のみを添加した。コントロールのBrdU取り込みを100%としたときの各群の値を図2に示した。その結果、L-ヒスチジンはPDGFによる星細胞のDNA合成を用量依存的に強く抑制した。

(実施例3)

実施例2と同様の方法により、L-ヒスチジンとD-ヒスチジン (それぞれ、30mM) の星細胞DNA合成に対する効果を比較した。コントロール群のBrdU取り込みを100%としたときの各群の値を図3に示した。その結果、L-ヒスチジン及びD-ヒスチジン共にPDGFによる星細胞のDNA合成を強く抑制し、その抑制は同程度であった。

(実施例4)

ウイスター (Wistar) 系雄性ラット肝より、プロナーゼE、コラーゲナーゼ肝灌流法にて星細胞を単離・培養し、8-14日目の星細胞を10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有培地で一晚培養後、0.1%FCS含有培地に交換し更に48時間

培養した。その後、被検物質としてL-システイン、L-ヒスチジン或いはL-システインとL-ヒスチジンの組成物を添加し、更に、血小板由来増殖因子 (PDGF) を終濃度25ng/mlとなるように加え、24時間星細胞を培養した。培養終了6時間前にブロモデオキシウリジン (BrdU) を培養系に加え、培養終了後、細胞へのBrdU取り込み量をELISA法 (enzyme-linked immunosorbent assay法) で測定した。コントロールとして培地中にPDGF (終濃度25ng/ml) のみを添加した。コントロールのBrdU取り込みを100%としたときの各群の値を図4に示した。この結果から、L-システイン、或いはL-ヒスチジンそれぞれ単独の場合に比較して、L-システイン及びL-ヒスチジンの組成物はPDGFによる星細胞のDNA合成を強く抑制していることが理解される。

(実施例5)

ヒト正常肺線維芽細胞 (HLF-1細胞) を10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有培地で一晚培養後、0.1%FCS含有培地に交換し更に24時間培養した。その後、被検物質としてL-ヒスチジン (His) を10又は30mMになるように添加し、更に、血小板由来増殖因子 (PDGF) を終濃度25ng/ml或いはFCSを終濃度5%となるように加え、24時間HLF-1細胞を培養した。培養終了6時間前にブロモデオキシウリジン (BrdU) を培養系に加え、培養終了後、細胞へのBrdU取り込み量をELISA法 (enzyme-linked immunosorbent assay法) で測定した。コントロールとして培地中にPDGF (終濃度25ng/ml) 或いはFCS (終濃度5%) のみを添加した。コントロールのBrdU取り込みを100%としたときの各群の値を図5に示した。その結果から、L-ヒスチジンはPDGF或いはFCSによるヒト正常肺線維芽細胞のDNA合成を強く抑制することが分かった。

(実施例6)

ヒト腎メザンギウム細胞を10%ウシ胎児血清 (FCS) 含有培地で一晚培養後、0.1%FCS含有培地に交換し更に24時間培養した。その後、被検物質としてL-ヒスチジン (His) を10又は30mMになるように添加し、更に、FCSを終濃度5%となるように加え、24時間メザンギウム細胞を培養した。培養

終了6時間前にブロモデオキシウリジン (BrdU) を培養系に加え、培養終了後、細胞へのBrdU取り込み量をELISA法 (enzyme-linked immunosorbent assay法) で測定した。コントロールとして培地中に5% FCSのみを添加した。コントロールのBrdU取り込みを100%としたときの各群の値を図6に示した。その結果から、L-ヒスチジンはFCSによるヒト腎メザンギウム細胞のDNA合成を強く抑制することが分かった。

発明の効果

本発明においては、ヒスチジンを有効成分として、好ましくはシステイン及び/又はシスチンと、ヒスチジンを有効成分として含有する優れた、臓器線維化抑制剤、特に肝線維化抑制剤を提供し、例えば慢性肝炎、肝線維症、肝硬変及び肝臓癌等肝臓疾患用の薬剤 (医薬品) の形態で使用できる外に、食品の分野でも、特に有効成分のアミノ酸にL-体を使用时保健機能食品、病者用食品等飲食品に使用した形態でも適用することができる。

ヒスチジンは、特に好ましくはシステイン及び/又はシスチンとの併用により、臓器線維化、特に肝線維化抑制作用を著しく示し、故にヒスチジンを、また併用する場合両者を同時に又は別々に、医薬品の形態や飲食品に使用した形態で目的とする有効成分として使用することができる。

本発明によれば、有効成分を併用する場合更にシステイン及び/又はシスチンと、ヒスチジンとがそれぞれ分離した形態、例えば別形態の製剤或いは飲食品の形態で;又は、システイン、シスチン及びヒスチジンの3種それぞれが、若しくはその2種混合物と他の1種とが相互に分離した形態、例えば別形態の製剤或いは飲食品の形態でも提供することができる。

更に、本発明は、臓器線維化抑制方法 (生体内の臓器線維化に起因する疾患の治療、改善、進展防止、予防等のための処置法等含む。)、前記有効成分の臓器線維化抑制剤 (医薬品、飲食品等の形態を含む。) 製造への使用、前記複数の有効成分を使用する場合それ等有効成分の臓器線維化抑制剤としての組み合わせ或いはそれ等の臓器線維化抑制方法への使用のための組み合わせ等をも提供する。

従って、本発明は医薬品、食品分野等において広く実施することができ、故に工業的に極めて有用である。

請求の範囲

1. ヒスチジンを有効成分として含有することを特徴とする臓器線維化抑制剤。

但し、ヒスチジンはL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、また塩の形態でもよい。

2. 更に、システイン及び／又はシスチンを有効成分として含有する請求の範囲1記載の臓器線維化抑制剤。

但し、システイン及びシスチンは、それぞれL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、またそれぞれ塩の形態でもよい。

3. 腎線維化抑制剤、脾線維化抑制剤、肺線維化抑制剤、血管線維化抑制剤、皮膚線維化抑制剤、骨髄線維化抑制剤及び肝線維化抑制剤の何れかである請求の範囲1又は2記載の臓器線維化抑制剤。

4. 肝線維化抑制剤である請求の範囲1又は2記載の臓器線維化抑制剤。

5. 肝臓疾患用薬剤の形態にある請求の範囲4記載の臓器線維化抑制剤。

6. 当該肝臓疾患用薬剤が慢性肝炎、肝線維症、肝硬変、肝臓癌、及びNASHの少なくとも1種用である請求の範囲5記載の臓器線維化抑制剤。

7. 飲食品に使用した形態にある請求の範囲1又は2記載の臓器線維化抑制剤。

8. 経口用又は非経口用である請求の範囲1又は2記載の臓器線維化抑制剤。
。

9. システイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとの含有比率（モル比率）が遊離体換算でシステイン及び／又はシスチン：ヒスチジン＝1：0.1～1.0である請求の範囲2記載の臓器線維化抑制剤。

尚、シスチンについてはシステインのモル比に換算して算定する。

10. 臓器線維化抑制剤に使用することを特徴とするシステイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとの組み合わせ。

但し、システイン、シスチン及びヒスチジンは、それぞれL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、またそれぞれ塩の形態でもよい。

11. システイン又はシスチンと、ヒスチジンとがそれぞれ分離した形態にあり；又は、システイン、シスチン及びヒスチジンの3種それぞれが、若しくはその2種混合物と他の1種とが相互に分離した形態にある請求の範囲10記載の組み合わせ。

12. ヒスチジンを生体内に投与することを特徴とする臓器線維化抑制方法。

但し、ヒスチジンはL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、また塩の形態でもよい。

13. システイン及び／又はシスチンを当該生体内に投与する請求の範囲12記載の方法。

但し、システイン及びシスチンは、それぞれL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、またそれぞれ塩の形態でもよい。

14. 当該投与の形態が請求の範囲1～9何れか記載の臓器線維化抑制剤の形態にある請求の範囲12又は13記載の方法。

15. ヒスチジンの臓器線維化抑制剤製造への使用。

但し、ヒスチジンはL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、また塩の形態でもよい。

16. システイン及び／又はシスチン、並びにヒスチジンの臓器線維化抑制剤製造への使用。

但し、システイン、シスチン及びヒスチジンは、それぞれL-体、D-体及びDL-体何れでもよく、またそれぞれ塩の形態でもよい。

システイン及び／又はシスチンと、ヒスチジンとをそれぞれ相互に分離した形態で使用してもよい。

17. 当該臓器線維化抑制剤製造への使用形態が請求の範囲1～9何れか記載の臓器線維化抑制剤の形態にある請求の範囲15又は16記載の使用。

図 1

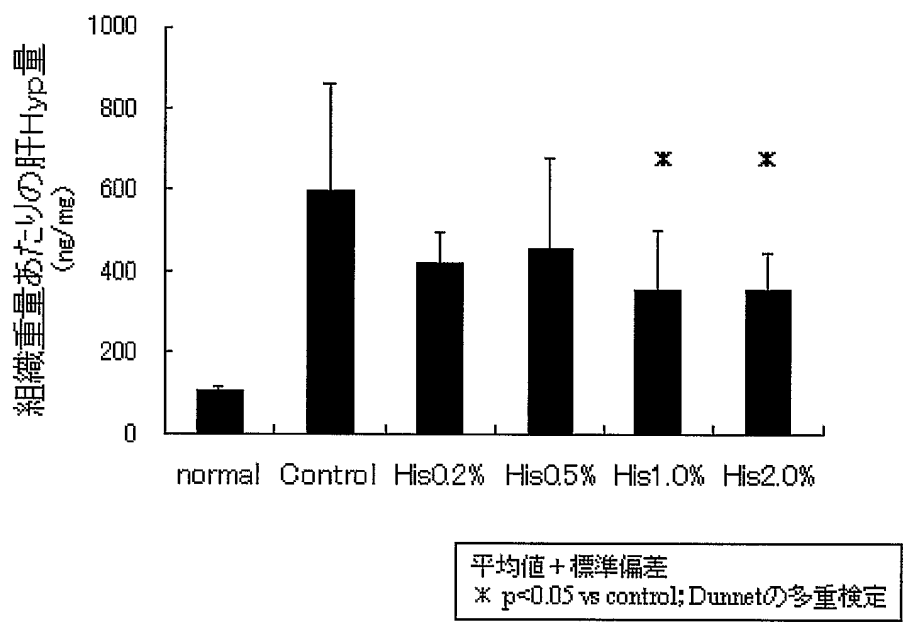
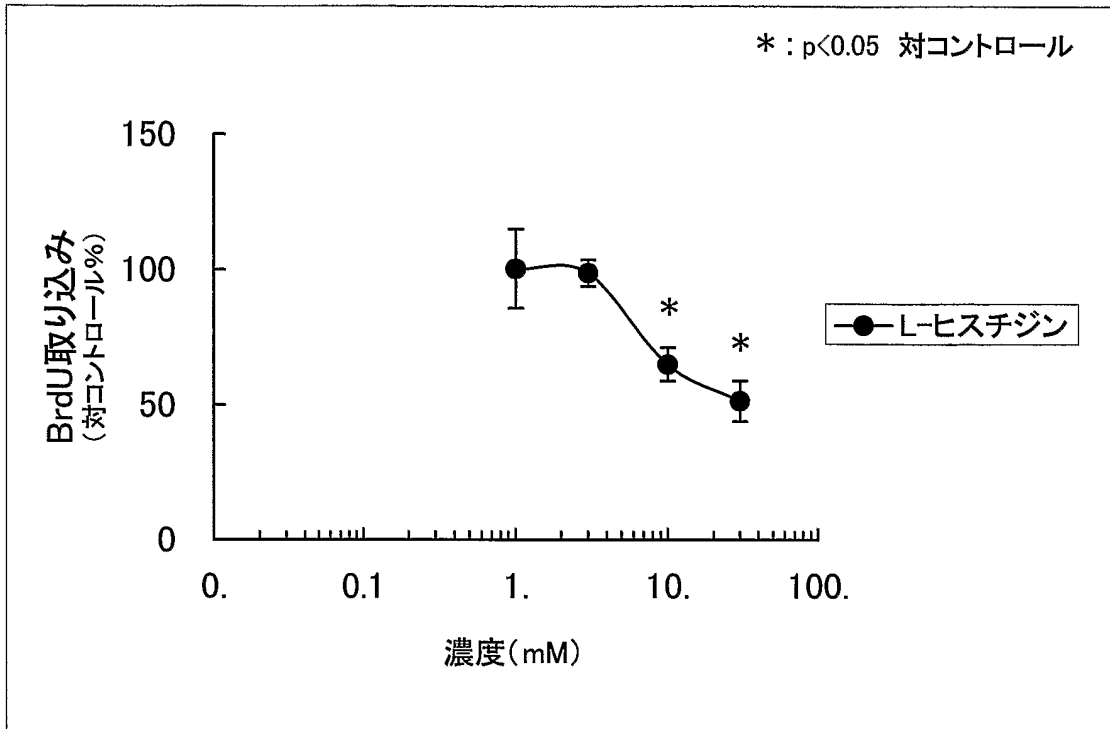
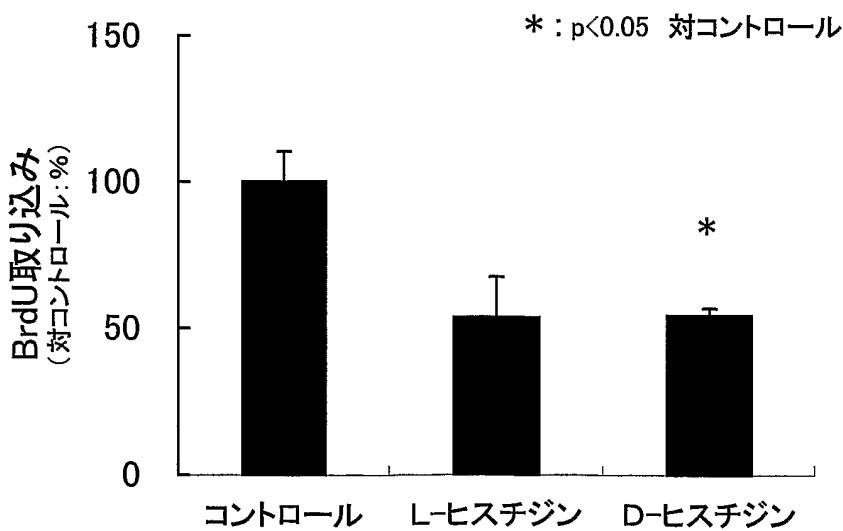


図 2



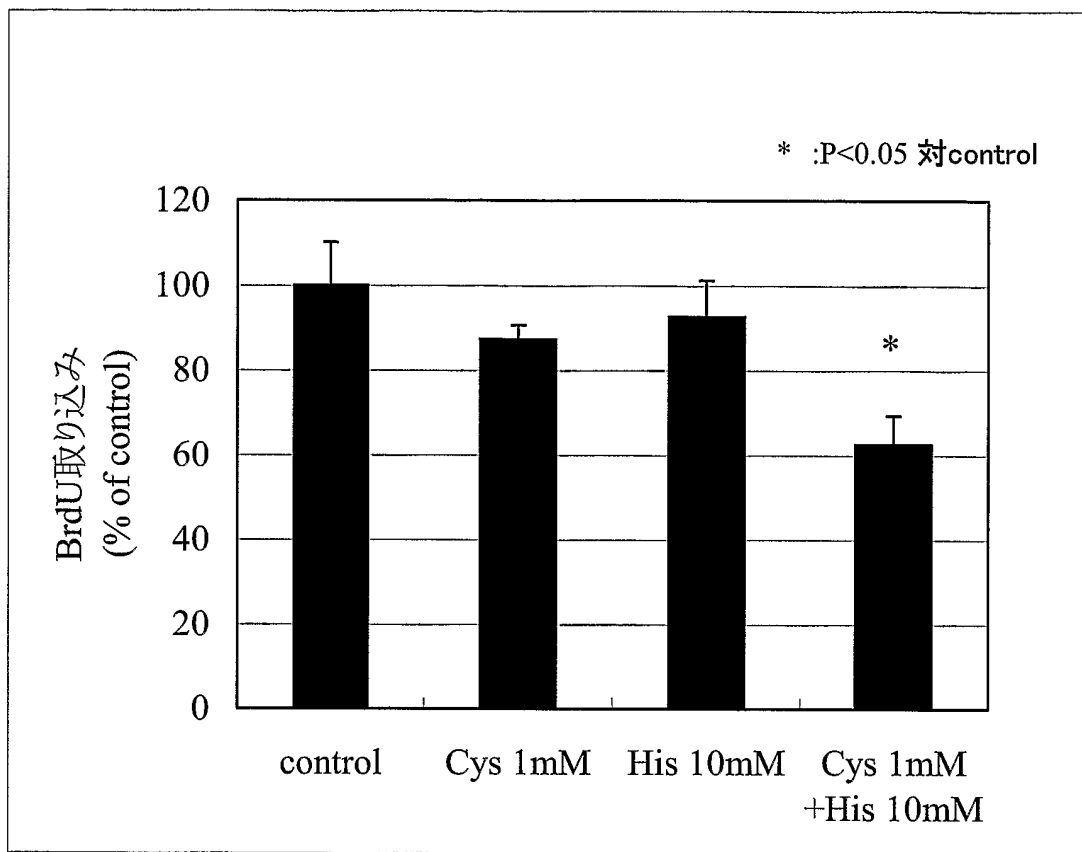
平均値±標準偏差

図 3



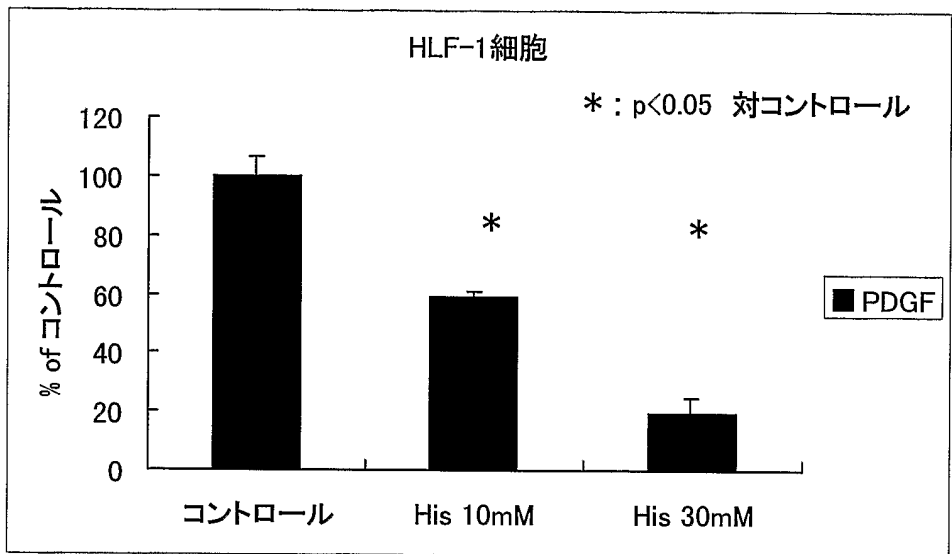
平均値±標準偏差

図 4



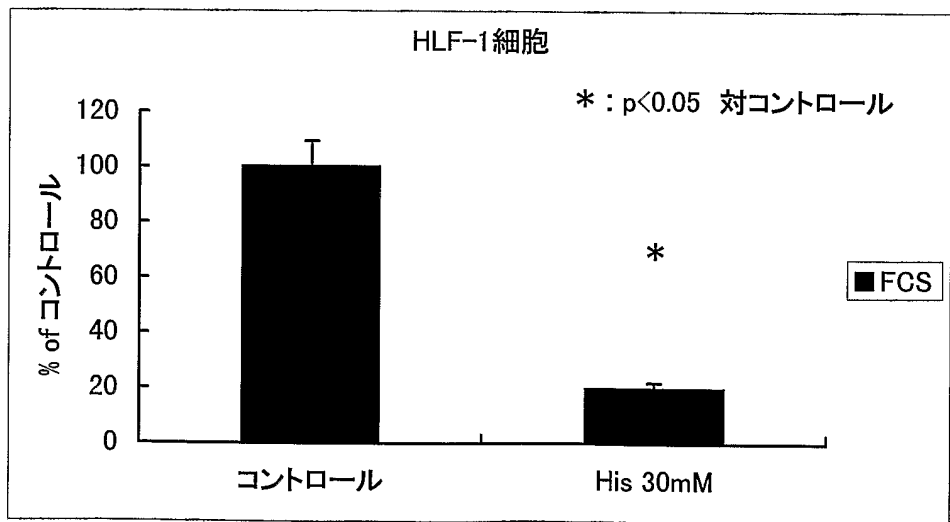
平均値+標準偏差 n=3

図 5 a



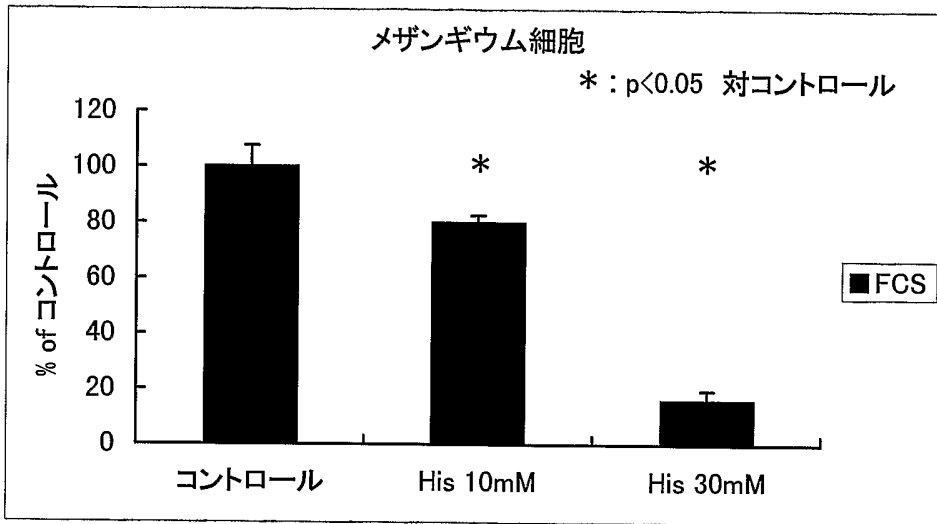
平均値+標準偏差 n=3

図 5 b



平均値+標準偏差 n=3

図6



平均値+標準偏差 n=3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ A61K31/4172, C07D233/64, A61P1/16, 1/18, 9/00, 11/00,
 13/00, 17/00, 19/00, 35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ A61K31/4172, C07D233/64

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5352691 A (PETER G. THOMAS), 04 October, 1994 (04.10.94), & EP 686033 A & WO 94/18969 A	1, 3, 7-8, 15, 17 2, 4-6, 9-11, 16
A	US 5719133 A (NOVARTIS NUTRITION AG), 17 February, 1998 (17.02.98), & EP 7055542 A	1-11, 15-17

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

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 04 March, 2003 (04.03.03)	Date of mailing of the international search report 18 March, 2003 (18.03.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13420

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 12-14

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

Claims 12 to 14 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K31/4172, C07D233/64, A61P1/16, 1/18, 9/00, 11/00, 13/00, 17/00, 19/00, 35/00, 43/00

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K31/4172, C07D233/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A A	US 5352691 A (PETER G. THOMAS), 1994. 10. 04 & EP 686033 A & WO 94/18969 A US 5719133 A (NOVARTIS NUTRITION AG), 1998. 02. 17 & EP 7055542 A	1, 3, 7-8, 15, 17 2, 4-6, 9-11, 16 1-11, 15-17

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
 04. 03. 03

国際調査報告の発送日
 18.03.03

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JJP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 弘 實 謙 二
 印
 4 P 7 4 3 3
 電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 12-14 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 12-14 は、実質的に治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。