

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 6 月 21 日(21.06.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/081713 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/155 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 25/18 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) A61P 25/26 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/079266

(22) 国際出願日: 2011 年 12 月 12 日(12.12.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2010-277027 2010 年 12 月 13 日(13.12.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人福岡大学 (Fukuoka University) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目 1 9 番 1 号 Fukuoka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高田 芙友子 (TAKATA, Fuyuko) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目 1 9 番 1 号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 道具 伸也 (DOHGU, Shinya) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目 1 9 番 1 号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 片岡 泰文 (KATAOKA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目 1 9 番 1 号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 松本 純一 (MATSUMOTO, Jun-ichi) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目 1 9

番 1 号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP). 金嶋修司 (KANESHIMA, Syuji) [JP/JP]; 〒8140180 福岡県福岡市城南区七隈八丁目 1 9 番 1 号 学校法人福岡大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒1408776 東京都品川区東品川 2 丁目 2 番 2 4 号 天王洲セントラルタワー Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION SYNDROME

(54) 発明の名称: 血液脳関門障害症候群治療薬

(57) Abstract: A medicinal agent or a pharmaceutical composition, each of which comprises a biguanide drug or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient, and which can potentiate blood-brain barrier functions including tight junction capability and transcellular transport capability of a brain capillary endothelial cell and therefore can treat blood-brain barrier disruption syndrome.

(57) 要約: ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする医薬又は医薬組成物によって、脳血管内皮細胞の密着結合能や経細胞輸送能などを含む血液脳関門機能を強化し、血液脳関門障害症候群を治療する。



WO 2012/081713 A1

明 細 書

発明の名称 血液脳関門障害症候群治療薬

技術分野

[0001]

本発明は、血液脳関門障害症候群治療薬に関する。更に詳細には、本発明は血液脳関門機能を強化することにより種々の疾患を治療又は予防するための、ピグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬に関する。

背景技術

[0002]

血液脳関門 (Blood-Brain Barrier (BBB)) は脳血管内皮細胞を実体とする循環血液と脳実質を隔てる障壁であり薬物等の物質脳移行を制限している。さらに、脳血管内皮細胞が脳ペリサイト、グリア細胞と共に構成する血液脳関門は、脳神経細胞と共に高度なネットワーク機能から成る「脳神経血管機構」を形成して高次脳機能を維持している。この血液脳関門機能の障害は、様々な脳機能障害の病態形成に関与する (非特許文献1)。

[0003]

血液脳関門機能低下などの血液脳関門機能障害により生じる病態としては、例えば、(i) 薬物の脳内移行量の増加、(ii) 血中アルブミンの脳浸潤による脳浮腫、(iii) 白血球の脳内浸潤による脳症、(iv) アミロイドベータタンパク質 ($A\beta$) 等の生理活性ペプチドの脳クリアランス異常、等がある。前記の病態により、(1) 薬物有害事象 (副作用) の発生、(2) 脳梗塞、脳外傷、(3) 脳神経変性疾患、(4) アルツハイマー病、等の血液脳関門機能障害を素因とする疾患 (血液脳関門障害症候群) の発症又は悪化が起こる。

[0004]

慢性骨髄性白血病等の治療薬であるイマチニブが、血液脳関門透過性を抑制することで脳梗塞を抑制することが、知られている (非特許文献2)。また、気管支喘息等の治療薬であるプラナルカストが、血管透過性亢進抑制剤として毛細血管の管腔及び管腔構造を構成する血管内皮細胞に作用し、毛細血管内の血漿成分や血球等が組織に漏出することを防ぐことが、知られている (特許文献1)。

[0005]

しかし、現在、血液脳関門機能を強化して血液脳関門障害症候群を治療する医薬品として、実用化されているものはない。

先行技術文献

特許文献

[0006]

特許文献1 特開2009-221217号公報

非特許文献

[0007]

非特許文献1 Neuron, 2008, 57, 178~201

非特許文献2 Nature Medicine, 2008, July, 14 (7), 731~737

非特許文献3 Nicolas W., Florence M., Sylvie C., Pierre-Olivier C., 「The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases」、Biochimica et Biophysica Acta、2009、1778、p. 842~857

非特許文献4 Nishioku T., Yamauchi A., Takata F., Watanabe T., Furusho K., Shuto H., Dohgu S., Kataoka Y., 「Disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritis

ic mice」、Neuroscience Letters. 2010、October 4、482 (3)、p. 208~211

非特許文献5 Yamauchi A., Dohgu S., Takata F., Watanabe T., Nishioku T., Matsumoto J., Ohkubo Y., Shuto H., Kataoka Y.、「Partial hepatectomy aggravates cyclosporin A-induced neurotoxicity by lowering the function of the blood-brain barrier in mice」、Life Sciences、2011、March 14、88 (11-12)、p. 529~534

非特許文献6 Dohgu S., Sumi N., Nishioku T., Takata F., Watanabe T., Naito M., Shuto H., Yamauchi A., Kataoka Y.、「Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function」、European Journal of Pharmacology、2010、October 10、644 (1-3)、p. 5~9

非特許文献7 Dohgu S., Nishioku T., Sumi N., Takata F., Nakagawa S., Naito M., Tsuruo T., Yamauchi A., Shuto H., Kataoka Y.、「Adverse effect of cyclosporin A on barrier functions of cerebral microvascular endothelial cells after hypoxia-reoxygenation damage in vitro」、Cellular and Molecular Neurobiology、2007、November、27 (7)、p. 889~899

非特許文献8 Takata F., Dohgu S., Yamauchi A., Sumi N., Nakagawa S., Naito M., Tsuruo T., Shuto H., Kataoka Y.、「Inhibition of transforming growth factor-beta production in brain pericytes contributes to cyclosporin A-induced dysfunction of the blood-brain barrier」、Cellular and Molecular Neurobiology、2007、May、27 (3)、p. 317~328

非特許文献9 Yamauchi A., Shuto H., Dohgu S., Nakano Y., Egawa T., Kataoka Y.、「Cyclosporin A aggravates electroshock-induced convulsions in mice with a transient middle cerebral artery occlusion」、Cellular and Molecular Neurobiology、2005、August、25 (5)、p. 923~928

非特許文献10 Dohgu S., Yamauchi A., Nakagawa S., Takata F., Kai M., Egawa T., Naito M., Tsuruo T., Sawada Y., Niwa M., Kataoka Y.、「Nitric oxide mediates cyclosporine-induced impairment of the blood-brain barrier in cocultures of mouse brain endothelial cells and rat astrocytes」、European Journal of Pharmacology、2004、November 28、505 (1

-3)、p. 51~59

非特許文献11 Yamauchi A., Oishi R., Kataoka Y.、
「Tacrolimus-induced neurotoxicity and nephrotoxicity is ameliorated by administration in the dark phase in rats」、Cell Mol Neurobiol、2004、October、24 (5)、p. 695~704

非特許文献12 Fujisaki Y., Yamauchi A., Dohgu S., Sunada K., Yamaguchi C., Oishi R., Kataoka Y.、
「Cyclosporine A-increased nitric oxide production in the rat dorsal hippocampus mediates convulsions」、Life Sciences、2002、December 20、72 (4-5)、p. 549~556

非特許文献13 Tominaga K., Kai M., Yamauchi A., Dohgu S., Toda K., Oishi R., Kataoka Y.、
「Subchronic treatment with cyclosporin A decreases the binding properties of the GABA receptor in ovariectomized rats」、Life Sciences、2002、December 20、72 (4-5)、p. 425~430

非特許文献14 Kanoski SE, Zhang Y., Zheng W., Davidson TL、
「The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat」、Journal of Alzheimer's Disease、2010、January、21 (1)、p. 207~219

非特許文献15 Ueno M, Sakamoto H, Tomimoto H, Aiguchi I, Onodera M, Huang CL, Kanenishi K.、
「Blood-brain barrier is impaired in the hippocampus of young adult spontaneously hypertensive rats.」、Acta Neuropathologica、2004、June、107 (6)、p. 532-538

非特許文献16 Honda M., Nakagawa S., Hayashi K., Kitagawa N., Tsutsumi K., Nagata I., Niwa M.、
「Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5」、Cellular and Molecular Neurobiology、2006、26 (2)、p. 109~118

非特許文献17 Jin R., Yang G., Li G.、
「Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator」、Neurobiol of Disease、2010、Jun、38 (3)、p. 376~385

非特許文献18 Abu Fanne R., Nassar T., Yarovoi S., Rayan A., Lamensdorf I., Karakoveski M., Vadim P., Jammal M., Cines D. B., Higazi A. A.、
「Blood-brain barrier permeability and tPA-mediated neurotoxicity」、Neuropharma

c o l o g y、2010、J u n、58 (7)、p. 972~980

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008]

本発明の目的は、血液脳関門機能を強化することにより種々の疾患を治療又は予防するための医薬組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009]

鋭意研究の結果、本発明者は、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする医薬又は前記医薬を含有する医薬組成物が脳血管内皮細胞の密着結合能や経細胞輸送能などを含む血液脳関門機能を強化することにより、脳毛細管内に存在するアルブミンや密着結合能マーカーであるフルオレセインナトリウムの脳組織側への漏出を抑制することを見出し、本発明を完成した。

[0010]

なお、本明細書及び特許請求の範囲において使用する「強化」という用語は、先天的に又は後天的に低下している機能の強化の他、正常の機能の強化も意味し、さらに、先天的に又は後天的に低下している機能を改善する、「再構築」による機能の強化も意味する。さらにまた、機能が低下することの「抑制」も意味する。

その他、外的又は内的要因によって機能が強化することの「促進」も意味する。

したがって、密着結合能や経細胞輸送能などを含む血液脳関門機能の強化には、血液脳関門機能の強化ばかりではなく、血液脳関門機能の再構築も、血液脳関門機能の低下の抑制も、血液脳関門機能の強化・再構築・低下の抑制の促進も、含まれるものと解釈される。

[0011]

すなわち、本願は、血液脳関門機能を強化するためのビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする医薬又は医薬組成物である血液脳関門障害症候群治療薬を提供する。

より具体的には、本願は、脳梗塞の悪化又は再発を予防するための、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を提供する。また、本願は、脳梗塞に伴う脳浮腫を予防、抑制又は改善するための、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を提供する。また、本願は、敗血症に伴う脳症を予防、抑制又は改善するための、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を提供する。また、本願は、多発性硬化症における白血球脳内浸潤を予防、抑制又は改善するための、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を提供する。また、本願は、アルツハイマー病におけるアミロイドベータタンパク質 ($A\beta$) の脳内での蓄積を予防、抑制又は改善するための、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を提供する。

さらにまた、本願は、薬物の脳移行を予防又は抑制することにより、動物又はヒトの中枢神経性有害症状を予防、抑制又は改善するための、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を提供する。

[0012]

いくつかは上記と重複するが、本発明を以下に記す。

(発明1)

血液脳関門機能を強化するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする医薬。

(発明2)

前記血液脳関門機能の強化が血液脳関門機能の低下の予防、抑制又は抑制の促進である、発明1のいずれか一項に記載の医薬。

(発明3)

前記血液脳関門機能の低下が、糖尿病、肥満、高血圧、脳梗塞、脳外傷、敗血症、多発性硬化症、アルツハイマー病又はその組合せからなる群から選ばれる疾患によるものである、又は中枢性副作用誘発物質によるものである、発明2に記載の医薬。

(発明 4)

前記中枢性副作用誘発物質が免疫抑制薬又は血栓溶解薬である、発明 3 に記載の医薬。

(発明 5)

脳梗塞若しくは脳外傷に伴う脳浮腫を予防、抑制又は改善するための薬物と併用される、発明 1 に記載の医薬。

(発明 6)

前記薬物が血栓溶解薬である、発明 5 に記載の医薬。

(発明 7)

前記血栓溶解薬が組織型プラスミノゲン・アクチベーター (t-PA) である、発明 6 に記載の医薬。

(発明 8)

前記医薬が薬物の脳移行を予防又は抑制する、発明 1 の医薬。

(発明 9)

前記薬物が動物又はヒトの中枢神経での作用を期待しない薬物である、発明 8 に記載の医薬。

(発明 10)

前記薬物の脳移行を予防又は抑制することにより、前記医薬が動物又はヒトの中枢神経性作用の有害症状を予防、抑制又は改善する、発明 8 又は 9 に記載の医薬。

(発明 11)

前記有害症状が、振戦、痙攣、白質脳症、頭痛、眠気、意識障害、異常行動、せん妄、幻覚、妄想、てんかん及びそれらの組み合わせから選ばれる、発明 10 に記載の医薬。

(発明 12)

前記ビグアナイド系薬剤がメトホルミン又はブホルミンである、発明 1～11 のいずれか一項に記載の医薬。

(発明 13)

前記ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩がメトホルミン塩酸塩又はブホルミン塩酸塩である、発明 12 に記載の医薬。

(発明 14)

有効成分投与量が 125～3000 mg/人/日である、発明 1～13 のいずれか一項に記載の医薬。

(発明 15)

疾患を予防、抑制又は改善するための方法であって、

前記疾患が、振戦、痙攣、白質脳症、頭痛、眠気、意識障害、異常行動、せん妄、幻覚、妄想、てんかん、脳梗塞、脳外傷、敗血症、アルツハイマー病、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

前記方法が、必要としている者に発明 1 に記載の医薬を投与する工程を含む、

方法。

(発明 16)

血液脳関門障害症候群を治療するための方法であって、

前記方法が、必要としている者にビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分として含む医薬を投与して、血液脳関門機能を強化する工程を含む、

方法。

さらに、いくつかは上記と重複するが、本発明を以下に記す。

(発明 1a)

薬物の脳移行を予防又は抑制するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 2a)

前記薬物が動物又はヒトの中枢神経での作用を期待しない薬物である、発明 1a に記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 3a)

前記薬物の脳移行を予防又は抑制することにより、動物又はヒトの中枢神経性作用の有害症状を予防、抑制又は改善するための、発明 1 a 又は 2 a に記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 4 a)

前記有害症状が、振戦、痙攣、白質脳症、頭痛、眠気、意識障害、異常行動、せん妄、幻覚、妄想、てんかん及びそれらの組み合わせから選ばれる、発明 3 a に記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 5 a)

脳梗塞若しくは脳外傷に伴う脳浮腫を予防、抑制又は改善するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 6 a)

敗血症に伴う脳症を予防、抑制又は改善するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 7 a)

多発性硬化症における白血球脳内浸潤を予防、抑制又は改善するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 8 a)

アルツハイマー病におけるアミロイドベータタンパク質 ($A\beta$) の脳内での蓄積を予防、抑制又は改善するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 9 a)

脳梗塞の悪化又は再発を予防又は抑制するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 10 a)

血液脳関門機能を強化するための、ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 11 a)

前記血液脳関門機能の強化が血液脳関門機能の低下の予防、抑制又は抑制の促進である、発明 10 a に記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 12 a)

前記血液脳関門機能の低下が、糖尿病、肥満、高血圧又はその組合せからなる群から選ばれる疾患によるものである、発明 11 a に記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 13 a)

前記ビグアナイド系薬剤がメトホルミン又はブホルミンである、発明 1 a ～ 12 a のいずれか一つに記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 14 a)

前記ビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩がメトホルミン塩酸塩又はブホルミン塩酸塩である、発明 13 a に記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

(発明 15 a)

有効成分投与量が 125 ～ 3000 mg / 人 / 日である、発明 1 a ～ 14 a のいずれか一つに記載の血液脳関門障害症候群治療薬。

発明の効果

[0013]

本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬は、脳血管内皮細胞の密着結合能や経細胞輸送能などを含む血液脳関門機能の強化により、血液脳関門障害を素因とする疾患又は症状を予防、抑制又は改善する効果を有している。

図面の簡単な説明

[0014]

図1 *in vitro* BBBモデル試験の概略図である。

図2 本発明がアルブミン透過を抑制したことを示すグラフである。

図3 本発明がフルオレセインナトリウム透過を抑制したことを示すグラフである。

図4 CsAによる血液脳関門機能低下に対して、本発明がフルオレセインナトリウム透過を抑制したことを示すグラフである。

図5 t-P Aによる血液脳関門機能低下に対して、本発明がフルオレセインナトリウム透過を抑制したことを示すグラフである。

図6 t-P Aによる血液脳関門機能低下に対して、本発明がアルブミン透過を抑制したことを示すグラフである。

図7 脳梗塞モデルマウスの脳の写真である。

図8 t-P Aによる脳梗塞モデルマウスの血液脳関門機能低下に対して、本発明がフルオレセインナトリウム透過を抑制したことを示すグラフである。

図9 t-P Aによる脳梗塞モデルマウスの血液脳関門機能低下に対して、本発明がアルブミン透過を抑制したことを示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0015]

本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬は、脳血管内皮細胞の密着結合能や経細胞輸送能などを含む血液脳関門機能を強化する。その結果、本発明の医薬又は医薬組成物は、血液脳関門機能障害により生じる前記病態を予防、抑制又は改善することにより、前記疾患等の血液脳関門機能障害を素因とする疾患又は症状の予防、抑制又は改善に貢献する。

[0016]

本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬の有効成分としては、例えば、メトホルミン、ブホルミンなどのビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩が挙げられる。

[0017]

本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬がビグアナイド系薬剤の医薬的に許容される塩を有効成分とする場合において、その塩の種類は、限定されない。無機酸塩でも有機酸塩でもよい。無機酸塩のための無機酸として、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、ホウ酸等が挙げられる。有機酸塩のための塩として、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸、安息香酸、シュウ酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸等が挙げられる。好ましい塩として、塩酸塩が挙げられる。なお、メトホルミン塩酸塩並びにブホルミン塩酸塩は、血糖降下剤として市販されている。

[0018]

本発明のビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩は、製造方法に限定されず、公知の方法により製造できる。

また、そのまま、又は、公知の薬学的に許容される医薬用担体と組合せて常法に従って製剤化することが出来る。

[0019]

本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬に関し、投与方法は限定されない。例えば、経口投与、静脈内注射による投与、筋肉内注射による投与、腹腔内注射による投与、皮下又は皮内注射による投与、直腸内投与、経粘膜投与、経気道投与等が挙げられる。好ましい投与方法として、経口投与が挙げられる。

[0020]

本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬に関し、剤形は限定されない。経口投与用の剤形として、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤等が挙げられる。非経口投与用の剤形として、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などが挙げられる。

[0021]

前記剤形の医薬組成物を製造するために、公知の薬学的に許容される医薬用担体を使用出来る。例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定化剤、着色剤、矯味矯臭剤等を使用出来る。

賦形剤としては、例えばアクリル酸デンプン、アラビアゴム、乳糖、コーンスターチ、

白糖、ブドウ糖、ソルビット、結晶セルロース、二酸化ケイ素、ケイ酸カルシウム、ケイ酸マグネシウムなどが挙げられる。結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、クエン酸カルシウム、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、デキストリン、ポリリン酸ナトリウム、ペクチンなどが挙げられる。崩壊剤としては、例えばクロスポビドン、クロスカルメロースナトリウム、カルメロースカルシウム等のスーパー崩壊剤と称される崩壊剤；ヒドロキシプロピルセルロース；カルボキシメチルスターチナトリウム；コーンスターチなどが挙げられる。滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、ステアリン酸アルミニウム、乳糖、炭酸マグネシウム、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、硬化植物油などが挙げられる。安定化剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエンなどが挙げられる。着色剤としては、例えばカラメル、食用黄色5号、食用赤色2号、食用青色2号等の食用色素や食用レーキ色素、ベンガラなどが挙げられる。矯味矯臭剤としては、例えば塩酸、オレンジ油、ウイキョウ、ココア末、ハッカ脳、芳香酸、ハッカ油、ケイヒ油などが挙げられる。錠剤や顆粒剤には糖衣、ゼラチン衣、その他必要に応じてコーティングすることもできる。

[0022]

本発明に係る医薬又は医薬組成物は、ヒトに、メトホルミン塩酸塩として125～3000mg/人/日で投与出来る。例えば、250mg/人/日でも、500mg/人/日でも、750mg/人/日でも、850mg/人/日でも、1500mg/人/日でも、1700mg/人/日でも、2250mg/人/日でも、2550mg/人/日でも、投与出来る。

[0023]

上述したように、血液脳関門機能障害は、様々な病態の発症や病態増悪や再発を引き起こし、血液脳関門機能障害に関連する疾患の発症や悪化又は再発などの素因となっている。例えば、敗血症により血液脳関門機能が低下することで、血液中の神経毒が脳内に入り、脳症が引き起こされると考えられている（非特許文献3）。また、血液脳関門を構成する脳血管内皮細胞上の接着分子の発現が増えることで、白血球が血液脳関門を透過しやすくなり、多発性硬化症が進展すると考えられている（非特許文献3及び4）。また、血液脳関門機能の不良によりアミロイドベータタンパク質（A β ）が脳内に蓄積することがアルツハイマー症を進展させると考えられている（非特許文献3）。

したがって、本発明の血液脳関門機能強化薬は、血液脳関門機能障害を素因とする前記疾患又は症状の予防、抑制又は改善に有用である。

[0024]

例えば、脳梗塞の悪化又は再発を予防又は抑制するために、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を使用出来る。また、脳梗塞に伴う脳浮腫を予防、抑制又は改善するために、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を使用出来る。また、脳外傷に伴う脳浮腫を予防、抑制又は改善するために、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を使用出来る。また、敗血症に伴う脳症を予防、抑制又は改善するために、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を使用出来る。また、多発性硬化症における白血球脳内浸潤を予防、抑制又は改善するために、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を使用出来る。また、アルツハイマー病におけるアミロイドベータタンパク質（A β ）の脳内での蓄積を予防、抑制又は改善するために、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を使用出来る。

[0025]

本発明の他の実施態様として、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を、薬物の脳移行を予防又は抑制するために使用出来る。前記薬物は、動物又はヒトの中枢神経での作用を期待しない薬物であってもよい。また、前記薬物が動物又はヒトの中枢神経での作用を期待する薬物であり、且つ、期待を超える量の脳移行を抑制するためにも、本発明の医薬又は医薬組成物を使用してもよい。

また、前記薬物の脳移行を予防又は抑制することにより、動物又はヒトの中枢神経性の有害症状を予防、抑制又は改善するために、本発明の医薬又は医薬組成物を使用出来る。

[0026]

例えば、シクロスポリン、タクロリムス等の免疫抑制薬による血液脳関門機能低下とそれに伴う血液脳関門透過を原因とする、振戦、痙攣、白質脳症、頭痛等の、中枢性副作用による有害症状が知られている（非特許文献5～12）。本発明は血液脳関門機能低下を抑制、血液脳関門機能を強化又は再構築することによって上記有害症状を予防、抑制又は改善することが出来る。

また、本発明は、組織型プラスミノゲン・アクチベーター等の血栓溶解薬による血液脳関門機能低下を予防、抑制又は改善することが出来る。また、本発明は、前記血液脳関門機能低下に伴う出血性梗塞を予防、抑制又は改善することが出来る。また、本発明は、脑梗塞の治療の際の前記血栓溶解薬の使用時における治療可能時間（therapeutic window）の拡張に用いることが出来る。そのため、本発明は、前記血栓溶解薬と併用して、脑梗塞治療薬として用いることが出来る。

その他、本発明は、抗ヒスタミン薬による眠気や、タミフルによる意識障害、異常行動、せん妄、幻覚、妄想、痙攣等や、インターフェロン・インフリキシマブ・抗うつ薬・ニューキノロン系抗菌薬による痙攣・てんかんや、カルモフル・テガフル・フルオロウラルシルによる白質脳症を予防、抑制又は改善することが出来る。

[0027]

本発明の他の実施態様として、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を、血液脳関門機能の低下を予防、抑制又は改善するために、本発明の医薬又は医薬組成物を使用出来る。

例えば、糖尿病、肥満、高血圧等により血液脳関門機能が低下する可能性があることが知られている（非特許文献14、15）。そのため、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を、糖尿病、肥満、高血圧等による血液脳関門機能の低下を予防、抑制又は改善するために使用出来る。前記血液脳関門機能の低下を予防、抑制又は改善は、脑梗塞の悪化又は再発を予防すること、薬物の脳移行を予防又は抑制すること、等へつながる。

また逆に、血液脳関門機能の低下により糖尿病及び／又は肥満が発症又は悪化すると考えられる。そのため、本発明に係る血液脳関門障害症候群治療薬を、血液脳関門機能の低下に起因する上記疾患の予防、抑制又は改善するためにも使用出来る。

[0028]

さらにまた、上記各作用又は用途のための動物試験用試薬としても、ビグアナイド系薬剤若しくはその塩又はそれを有効成分とする物質又は組成物を使用出来る。前記動物としては、例えば、メダカ、カエル、トカゲ、ニワトリ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、サルなどから選択することができる。

実施例

[0029]

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものでない。

[0030]

(例1)

(例1-1)

— *in vitro* BBBモデルの作成 —

脳血管内皮細胞（RBE C）を下記参考文献1に従って単離した。詳細は下記の通りである。

3週齢のWistar系ラットをエーテル麻酔後、断頭し大脳を摘出し氷上のディッシュに入れた。髄膜を剥がした後に氷上のディッシュにて大脳皮質を細断し、collagenase（CLS2）（1mg/ml；Worthington）とdeoxyribonuclease I（50units/ml；Sigma）で37℃、1.5時間振

とう (200 rpm) し、酵素処理を行った。遠心分離後、得られたペレットに 20 % bovine serum albumin (BSA) -DMEMを加え、遠心分離 (1000×g、20分) することでニューロンやグリア細胞を取り除いた。その後 collagenase/dispase (1mg/ml; Boehringer Mannheim) と deoxyribonuclease I (50 units/ml; Sigma) で 37℃、30分振とう (200 rpm) して酵素処理をした。遠心分離後、得られたペレットを少量のDMEMで懸濁し、あらかじめ 4℃、30000×g、1時間で密度勾配を形成させておいた、33 % percoll (GE healthcare) 溶液に加え、遠心分離することで脳毛細血管片を単離した。

上記の方法で単離した脳毛細血管片を、コラーゲン及びフィブロネクチンでコーティングした culture dish を用いて 37℃、5% CO₂/95% 大気下で、plasma derived serum (PDS) 10%、gentamicin 50 µg/ml、L-glutamine 1mM、heparin 1mg/ml、bFGF 1.5 ng/ml、insulin 5 µg/ml、transferrin 5 µg/ml、selenium 5 ng/ml、puromycin 4 µg/ml を含む DMEM/F12 (RBEC 培養液 I) にて培養した。48時間後に、puromycin を除去した RBEC 培養液 I (RBEC 培養液 II) に置換し、さらに培養することで脳血管内皮細胞 (RBEC) を得た。

Transwell (登録商標) (24-well type、Costar、MA) を用いて、上記の方法で得られた RBEC から RBEC 単層培養系である monolayer の in vitro BBB モデルを作製した。

すなわち、Polycarbonate membrane (0.4 µm pore size) をコラーゲン及びフィブロネクチンでコーティングした Transwell インサート (12-well type、Costar、MA) を 24-well culture plate (Costar、MA) の well に設置し、RBEC (5.0 × 10⁴ cells/well) を前記インサートの内側に播種した (monolayer)。RBEC を播種した翌日、hydrocortisone (500 nM) を含む RBEC 培養液 II に交換し、その 2 日後に完成した in vitro BBB モデルを用いて実験を行った。

[0031]

(例 1-2)

—透過実験—

メトホルミンの BBB 機能への影響は、フルオレセインナトリウム (Na-F) (Sigma、St. Louis、MO) 及び Evans blue-albumin (アルブミン) ((Evans blue; Sigma、E2129) (Bovine serum albumin; Sigma、A7906)) の透過係数を指標として、確認された。

なお、血管弛緩因子である adrenomedullin は血液脳関門機能を強化することにより、in vitro 及び in vivo においてフルオレセインナトリウムの透過を抑制する (非特許文献 16、発明者未発表データ)。つまりフルオレセインナトリウムの透過に関する in vitro 試験と in vivo 試験は正の関係である。

試験サンプルとして、PDS を除去した RBEC 培養液 II に溶解した 0.1 mM メトホルミン (メトホルミン塩酸塩; Sigma、D15, 095-9)、0.5 mM メトホルミン (同)、1 mM メトホルミン (同) を用いた。対照群として、PDS を除去した RBEC 培養液 II を用いた。上記で完成した in vitro BBB モデル中の培養液を全て取り除き、試験サンプルで置換し、24時間後に透過性の試験を行った。

フルオレセインナトリウム (100 µg/ml) 又はアルブミン (0.04 g/ml) を含んだ physiological buffer (0.1 ml) をインサートの血管側に添加した後、10、20、30、60、120、180 分後に well (脳側) からサンプル (0.4 ml) を採取し、新たに physiological buffer を

同量加えた。蛍光プレートリーダー (CytoFluor (登録商標) Series 4000, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) を用いてフルオレセインナトリウムの蛍光強度を測定し (励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm)、吸光プレートリーダー (Sunrise (登録商標)、TECAN, Mannedorf, Switzerland) を用いてアルブミンの吸光強度を測定し (波長 630 nm)、検量線よりフルオレセインナトリウム及びアルブミンの濃度を算出した。

クリアランスと透過係数 (P) の算出は下記参考文献 1 及び 2 に従った。クリアランスは、血管側の chamber から脳実質側の chamber に移行したフルオレセインナトリウム及びアルブミンの量を μL で表し、血管側に入れたフルオレセインナトリウム及びアルブミンの初濃度 $[C]_L$ と脳実質側に移行したフルオレセインナトリウム及びアルブミンの最終濃度 $[C]_A$ から、以下の式より算出した。

$$\text{Clearance } (\mu\text{l}) = [C]_A \times V_A / [C]_L$$

(V_A : 脳実質側 chamber の容積 (1.5 ml))

透過係数 P (cm/min) は以下の式より求めた。

$$1 / PS_{app} = 1 / PS_{membrane} + 1 / PS_{trans}$$

PS は時間に対してクリアランスをプロットした直線の傾きで、(透過係数) $\times$ (membrane の表面積) を表している。P_{app} はみかけの透過係数、P_{trans} は真の透過係数を表す。P_{membrane} は、チャンパーの membrane のみの透過係数を表す。

[0032]

上記試験の概略図を図 1 に示す。

[0033]

上記試験に関しては、上記の各先行技術文献や下記の各参考文献を参考にした。

[参考文献 1] Isobe, I., Watanabe, T., Hazemoto, N., Yamagata, K., Ueki, T., Nakanishi, K., Asai, K., Kato, T., 「Astrocytic contributions to blood-brain barrier (BBB) formation by endothelial cells: a possible use of aortic endothelial cell for in vitro model」、Neurochemistry International、1996、28、p. 523-533

[参考文献 2] Dehouck, M.-P., Jolliet-Riant, P., Bree, F., Fruchart J.-C., Cecchelli, R., Tillement, J.-P., 「Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models」、Journal of Neurochemistry、1992、58、p. 1790-1797

[参考文献 3] Hayashi Y., Nomura M., Yamagishi S., Harada S., Yamashita J., Yamamoto H., 「Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes」、Glia、1997、19、p. 13-26

[参考文献 4] Takata F, Sumi N, Nishioku T, Harada E, Wakigawa T, Shuto H, Yamauchi A, Kataoka Y., 「Oncostatin M induces functional and structural impairment of blood-brain barriers comprised of rat brain capillary endothelial cells」、Neuroscience Letters、2008、441 (2)、p. 163-166

[0034]

対象群を用いた試験結果（透過係数）を100%としたときの、各濃度（0.1 mM、0.5 mM及び1 mM）のメトホルミンを用いた試験結果を図2及び図3に示す。図2には、アルブミン透過係数の測定結果を、図3にはフルオレセインナトリウム透過係数の測定結果を示す。

[0035]

アルブミン透過係数の測定試験において、4群の一元ANOVA法での有意確率Pは0.0009であり、有意水準0.05として有意差があった。さらに、対照群と各メトホルミン群を、有意水準0.05とするDunnett多重比較検定法を用いて有意差検定を行った結果、1 mMメトホルミン群に有意差があった。図2中ではその群に*印を付した。

[0036]

フルオレセインナトリウム透過係数の測定試験において、4群の一元ANOVA法での有意確率Pは0.0001未満であり、有意水準0.05として有意差があった。さらに、対照群と各メトホルミン群を、有意水準0.05とするDunnett多重比較検定法を用いて有意差検定を行った結果、0.5 mMメトホルミン群及び1 mMメトホルミン群に有意差があった。図3中ではそれらの群に*印を付した。

[0037]

図2及び図3に示すように、対照群に比べて有意に、メトホルミンが脳毛細管内に存在するアルブミンや密着結合能マーカーであるフルオレセインナトリウムの脳組織側への漏出を抑制した。

[0038]

(例2)

中枢性副作用誘発薬物（CsA）による血液脳関門機能低下に対するメトホルミンの保護作用

免疫抑制薬 cyclosporin A (CsA) は、移植の成功率を向上させる有益な医薬品である。一方で副作用も多く、振戦・痙攣などの中枢性副作用が発現すると投与中止を余儀なくされる。これまでに我々は、中枢性副作用発現にCsAの血液脳関門機能低下作用に伴うCsAの脳移行増大が関与することを明らかにした。そこで、CsAによる血液脳関門機能低下に対するメトホルミンの作用について検討した。

[0039]

(例2-1)

例1-1にしたがって、in vitro BBBモデルを作成した。

[0040]

(例2-2)

例1-2と同様に、透過実験を行った。ただし、薬物の刺激方法が異なる。

試験サンプルとして、エタノールに溶解したCsA及びPDSを除去したRBEC培養液IIに溶解した1 mMメトホルミン（メトホルミン塩酸塩；Sigma、D15, 095-9）を用いた。対照群として、エタノール及びPDSを除去したRBEC培養液IIを用いた。上記で完成したin vitro BBBモデル中の培養液を全て取り除き、試験サンプルで置換し、24時間後に透過性の試験を行った。

[0041]

この試験結果を図4に示す。図に示されるように、CsAを負荷したところ、フルオレセインナトリウム透過性は上昇したが、メトホルミンの併用により、CsAによる血液脳関門機能低下が抑制されて、フルオレセインナトリウムの透過性上昇が有意に抑制された。

[0042]

(例3)

中枢性副作用誘発薬物（t-PA）による血液脳関門機能低下に対するメトホルミンの作

用 (in vitro)

脳梗塞に対する血栓溶解薬「組織型プラスミノゲン・アクチベーター (t-PA)」は、発症から3～4.5時間までの静脈投与で極めて良好な効果が示されている。しかし、t-PAによる血栓溶解療法には問題点が存在する。虚血病態化でのt-PA使用に伴う血液脳関門障害により、出血性梗塞を合併することがあるため（非特許文献17及び18）、治療可能時間 (therapeutic window) が脳梗塞後3時間と極めて短いことがその一つである（非特許文献2）。そこで、in vitro BBBモデルに虚血及びt-PAを負荷した、「t-PA BBB障害モデル」を作製し、メトホルミンの血液脳関門機能保護作用について検討した。

[0043]

(例3-1)

例1-1にしたがって、in vitro BBBモデルを作成した。

[0044]

(例3-2)

例1-2と同様に、透過実験を行った。ただし、薬物の刺激方法が異なる。

試験サンプルとして、t-PA注射剤（アクチバシン；協和発酵）及びPDSを除去したRBE C培養液Iに溶解した1mMメトホルミン（メトホルミン塩酸塩；Sigma、D15, 095-9）を用いた。対照群として、PDSを除去したRBE C培養液Iを用いた。上記で完成したin vitro BBBモデル中の培養液を全て取り除き、試験サンプルで置換し、N₂95%/CO₂5%（虚血）条件下で48時間放置した後に透過性の試験を行った。

[0045]

この試験結果を図5及び図6に示す。両図に示されるように、虚血状態でt-PAを負荷したところ、フルオレセインナトリウム及びアルブミン (Evans blue-albumin: EBA) の透過性は上昇したが、メトホルミンの併用により、t-PAによる血液脳関門機能低下が抑制されて、フルオレセインナトリウム及びアルブミンの透過性上昇が有意に抑制された。

[0046]

(例4)

中枢性副作用誘発薬物 (t-PA) による血液脳関門機能低下に対するメトホルミンの作用 (in vivo)

[0047]

(例4-1)

t-PAによるin vivo BBB障害モデルの作製

ddyマウスの両側の総頸動脈を30分間結紮 (2VO) して脳梗塞モデルマウスを作製した。血管を再開通した後に鎖骨下静脈よりt-PA (10mg/kg) を投与し24時間放置したマウスを、t-PAによるBBB障害モデルマウスとして用いた。

メトホルミンはt-PAと同時に100mg/kgを投与した。対照群として、薬物を投与していない脳梗塞モデルマウスを用いた。

[0048]

(例4-2)

BBB機能評価

t-PAを投与して、又はt-PA及びメトホルミンを投与して24時間後に、フルオレセインナトリウム (Na-F) (6mg/mL) 及びEvans blue (EB) (20mg/mL) の混合液200μLを鎖骨下静脈に投与して60分放置した後に全脳を摘出した。BBB機能は全脳の写真及びホモジナイズした全脳のNa-F及びEB濃度を用いて評

価した。

[0049]

結果

脳梗塞モデルマウスに t-P A を負荷すると脳が青く染まり、血管から E B が脳全体に漏れ出ているのが認められた (図 7 真ん中)。これにメトホルミンを併用すると脳の青色は薄くなったことから (図 7 右)、血管外への E B 漏出が抑制されたことがわかる。このことより t-P A 負荷による B B B 機能障害がメトホルミン併用により抑制されたと考えられる。

脳梗塞モデルマウスに t-P A を負荷すると N a - F 及び E B の脳内移行量はそれぞれ 16 % 及び 20 % 上昇した (図 8 及び 9)。メトホルミン併用により N a - F 及び E B の上昇は 78 % 及び 66 % 抑制された (図 8 及び 9)。

請 求 の 範 囲

[請求項 1]

血液脳関門機能を強化するための、ビッグアニド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分とする医薬。

[請求項 2]

前記血液脳関門機能の強化が血液脳関門機能の低下の予防、抑制又は抑制の促進である、請求項 1 のいずれか一項に記載の医薬。

[請求項 3]

前記血液脳関門機能の低下が、糖尿病、肥満、高血圧、脳梗塞、脳外傷、敗血症、多発性硬化症、アルツハイマー病又はその組合せからなる群から選ばれる疾患によるものである、又は中枢性副作用誘発物質によるものである、請求項 2 に記載の医薬。

[請求項 4]

前記中枢性副作用誘発物質が免疫抑制薬又は血栓溶解薬である、請求項 3 に記載の医薬

。

[請求項 5]

脳梗塞若しくは脳外傷に伴う脳浮腫を予防、抑制又は改善するための薬物と併用される、請求項 1 に記載の医薬。

[請求項 6]

前記薬物が血栓溶解薬である、請求項 5 に記載の医薬。

[請求項 7]

前記血栓溶解薬が組織型プラスミノゲン・アクチベーター（t-PA）である、請求項 6 に記載の医薬。

[請求項 8]

前記医薬が薬物の脳移行を予防又は抑制する、請求項 1 の医薬。

[請求項 9]

前記薬物が動物又はヒトの中枢神経での作用を期待しない薬物である、請求項 8 に記載の医薬。

[請求項 10]

前記薬物の脳移行を予防又は抑制することにより、前記医薬が動物又はヒトの中枢神経性作用の有害症状を予防、抑制又は改善する、請求項 8 又は 9 に記載の医薬。

[請求項 11]

前記有害症状が、振戦、痙攣、白質脳症、頭痛、眠気、意識障害、異常行動、せん妄、幻覚、妄想、てんかん及びそれらの組み合わせから選ばれる、請求項 10 に記載の医薬。

[請求項 12]

前記ビッグアニド系薬剤がメトホルミン又はブホルミンである、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の医薬。

[請求項 13]

前記ビッグアニド系薬剤又はその医薬的に許容される塩がメトホルミン塩酸塩又はブホルミン塩酸塩である、請求項 12 に記載の医薬。

[請求項 14]

有効成分投与量が 125 ～ 3000 mg / 人 / 日である、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の医薬。

[請求項 15]

疾患を予防、抑制又は改善するための方法であって、

前記疾患が、振戦、痙攣、白質脳症、頭痛、眠気、意識障害、異常行動、せん妄、幻覚、妄想、てんかん、脳梗塞、脳外傷、敗血症、アルツハイマー病、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され、

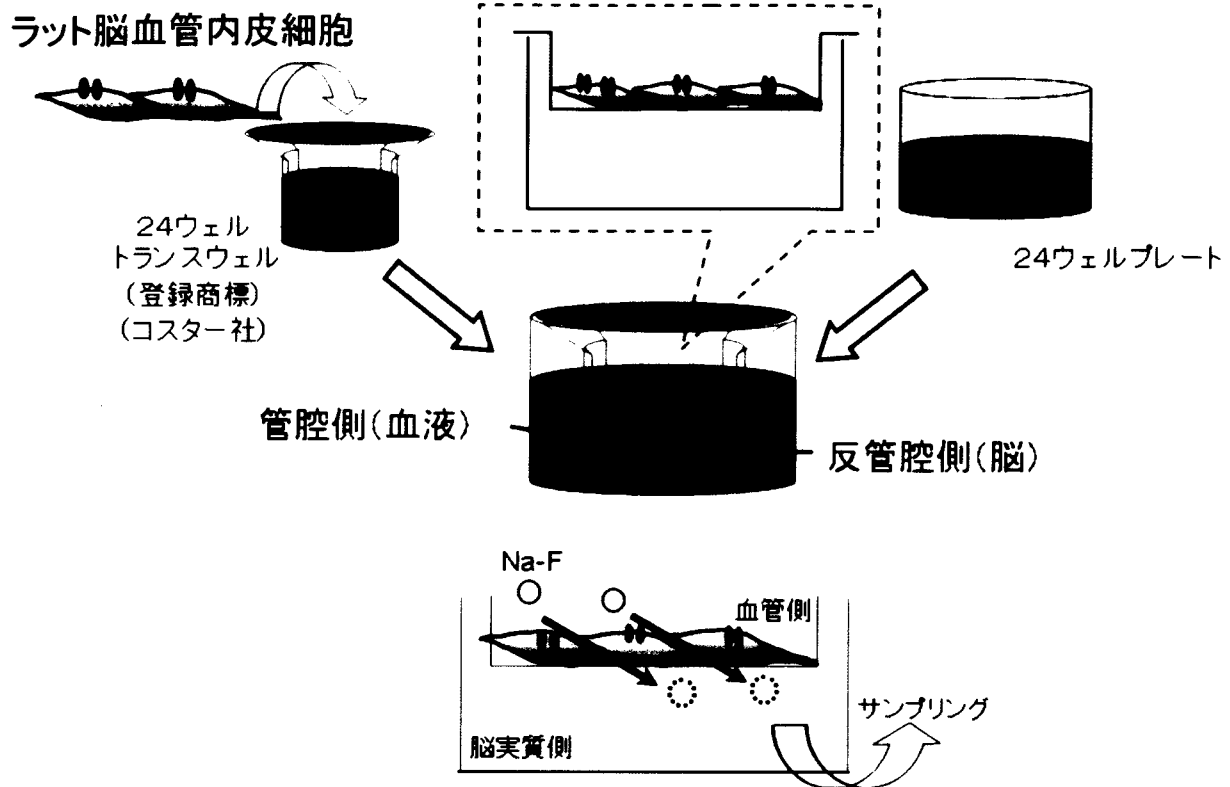
前記方法が、必要としている者に請求項 1 に記載の医薬を投与する工程を含む、方法。

[請求項 16]

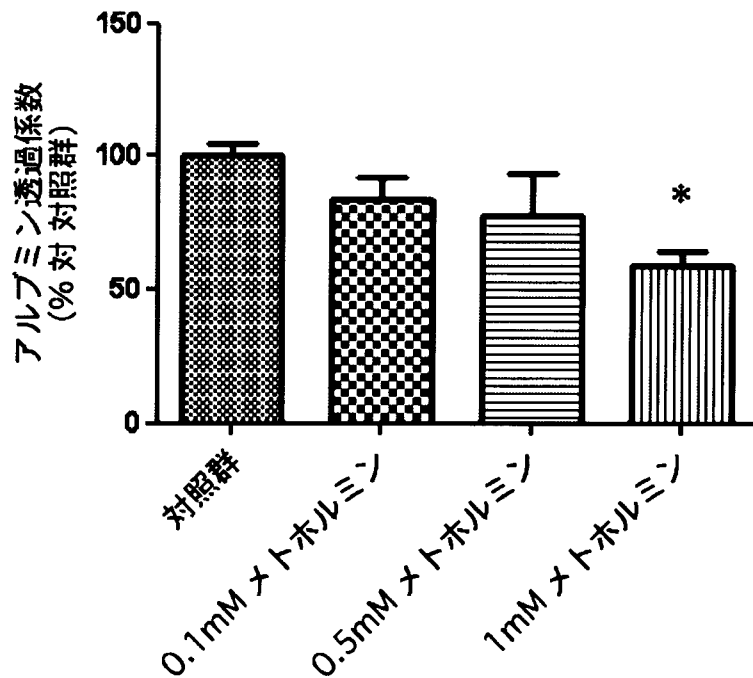
血液脳関門障害症候群を治療するための方法であって、
前記方法が、必要としている者にビグアナイド系薬剤又はその医薬的に許容される塩を有効成分として含む医薬を投与して、血液脳関門機能を強化する工程を含む、
方法。

[図 1]

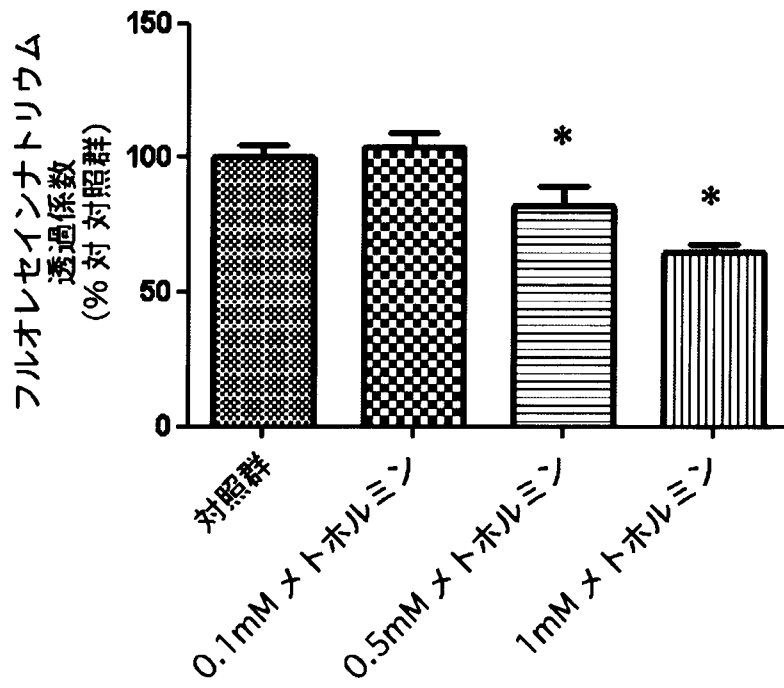
In Vitro BBB モデル



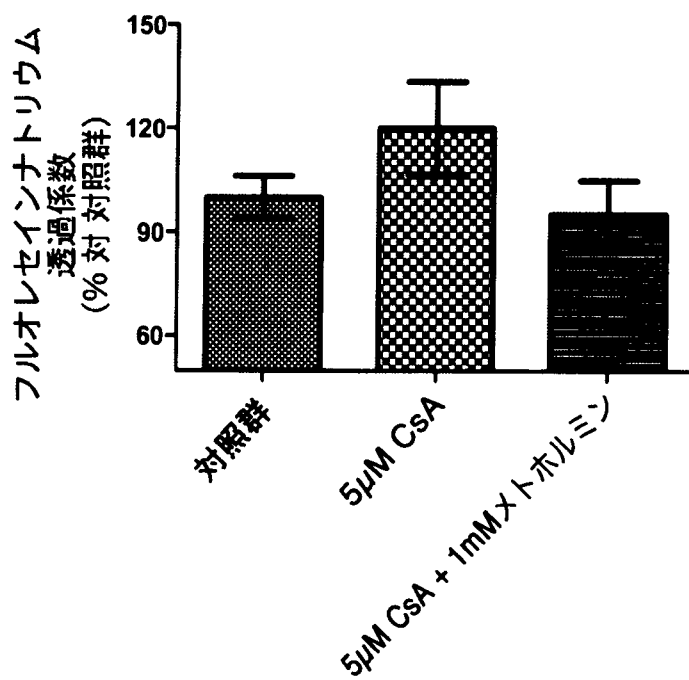
[図 2]



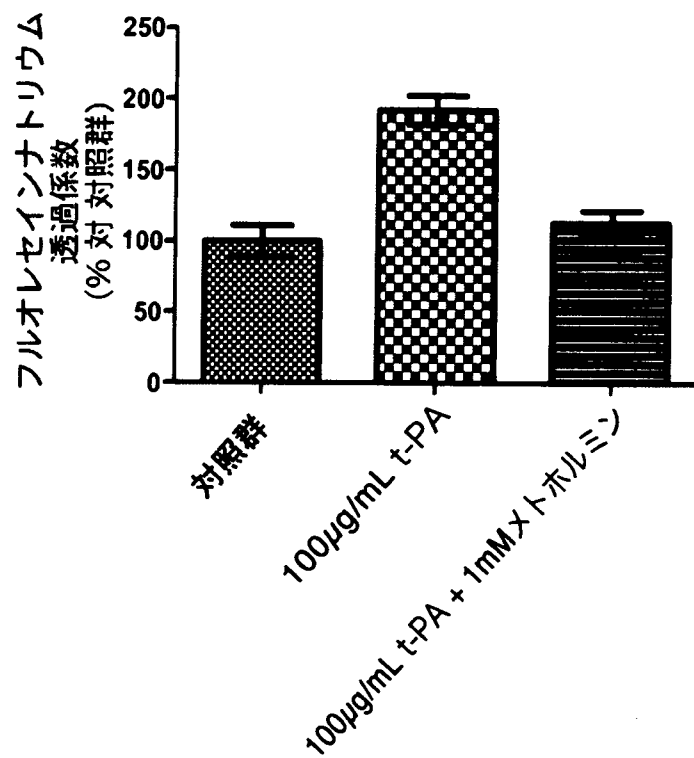
[図 3]



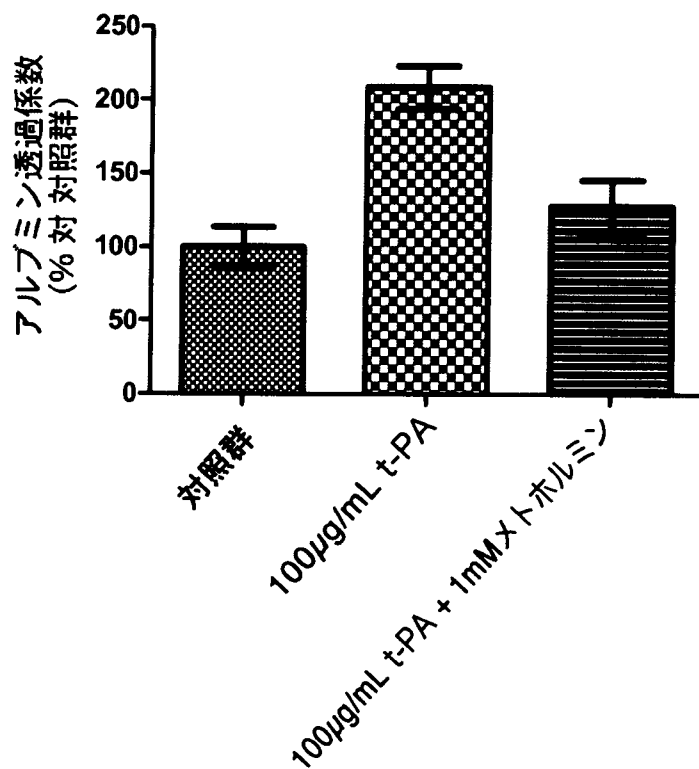
[図 4]



[図 5]



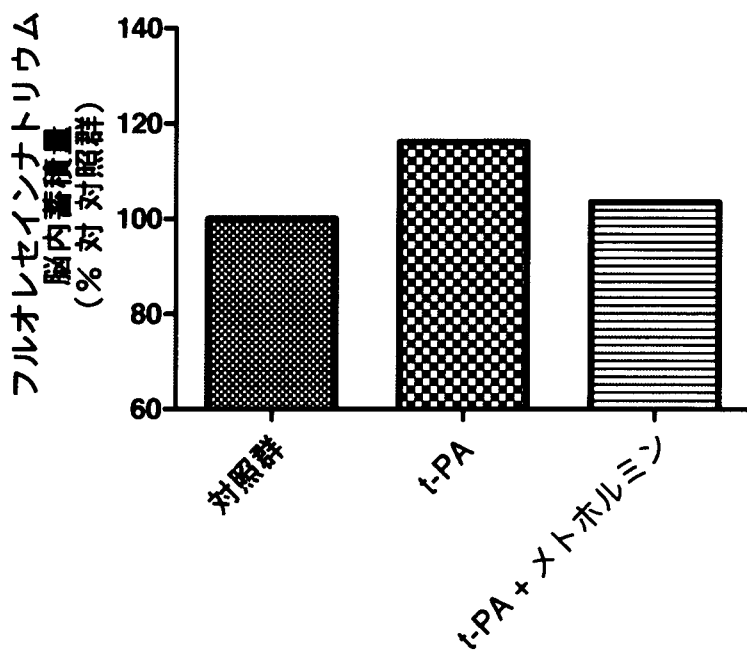
[図 6]



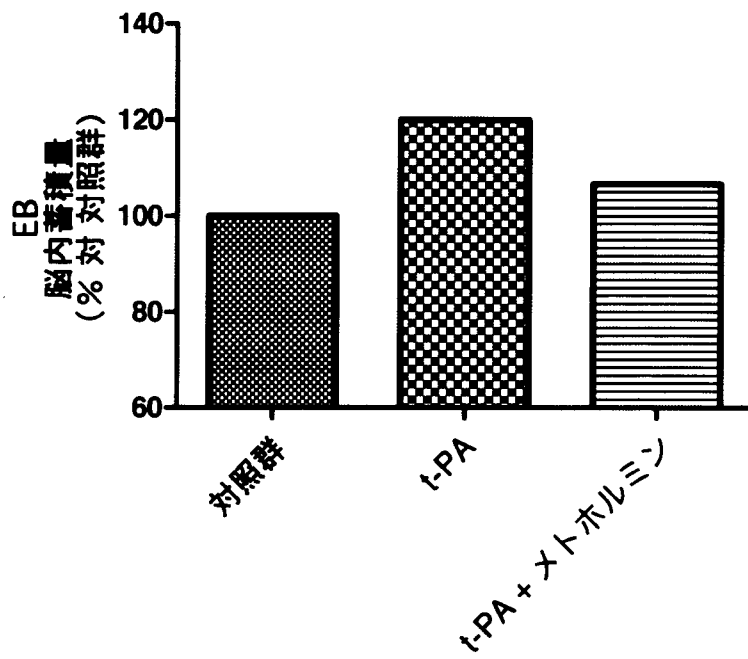
[図 7]



[図 8]



[図 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079266

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/155(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/12(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/08(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i, A61P25/26(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/155, A61K45/00, A61P3/04, A61P3/10, A61P9/12, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/18, A61P25/26, A61P25/28, A61P31/04

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YOKOYAMA, Y. et al, Regulation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression by metformin in HepG2 cells, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2009, Vol.32, No.7, p.1160-1165, Abstract	1-14
Y	Takayuki MATSUMOTO, "A Therapeutic Target for Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor Signaling in Diabetic Vascular Complication", Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 01 June 2010 (01.06.2010), vol.130, no.6, pages 777 to 784, abstract; page 781, left column, line 16 to right column, line 3; page 782, right column, lines 1 to 10	1-14

☒ 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 application or patent 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
09 February, 2012 (09.02.12)

Date of mailing of the international search report
21 February, 2012 (21.02.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079266

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DOHGU, S. et al, Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function, European Journal of Pharmacology, 2010, Vol.644, No.1-3, p.5-9, ABSTRACT	1-14
Y	SU, E.J. et al, Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke, Nature Medicine (New York, NY, United States), 2008, Vol.14, No.7, p.731-737, Abstract	1-14
A	WO 2007/124308 A1 (LUDBIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH), 01 November 2007 (01.11.2007), page 52; example 7 & US 2007/0265203 A1 & EP 2021028 A	1-14
A	SHARMA, R.V. et al, Metformin attenuates agonist-stimulated calcium transients in vascular smooth muscle cells, Clinical and Experimental Hypertension, 1995, Vol.17, No.6, p.913-29, Abstract	1-14
A	LEYBAERT, L. et al, Inositol-trisphosphate-dependent intercellular calcium signaling in and between astrocytes and endothelial cells, Glia, 1998, Vol.24, No.4, p.398-407, Abstract	1-14
A	CHARLES, M.A. et al, Effect of weight change and metformin on fibrinolysis and the von Willebrand factor in obese nondiabetic subjects: the BIGPRO1 Study. Biguanides and the Prevention of the Risk of Obesity, Diabetes care, 1998, Vol.21, No.11, p.1967-72, Abstract	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079266

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

A61P31/04(2006.01) i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/079266

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 15, 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15 and 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ 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 (I P C))

Int.Cl. A61K31/155(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i,
A61P9/12(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/08(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i,
A61P25/26(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/155, A61K45/00, A61P3/04, A61P3/10, A61P9/12, A61P25/00, A61P25/08, A61P25/18, A61P25/26,
A61P25/28, A61P31/04

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

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

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	YOKOYAMA,Y. et al, Regulation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression by metformin in HepG2 cells, Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2009, Vol.32, No.7, p.1160-1165 Abstract	1 - 1 4

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 9 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一

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

4 C

9 2 8 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	松本 貴之, 糖尿病性血管合併症における内皮由来過分極因子の重要性と治療戦略へのアプローチ, 薬学雑誌, 2010.06.01, Vol.130 , No.6, p.777-784 Abstract; 第 781 ページ左欄第 16 行～右欄第 3 行; 第 782 ページ右欄 1～10 行	1 - 1 4
Y	DOHGU,S. et al, Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function, European Journal of Pharmacology, 2010, Vol.644, No.1-3, p.5-9 ABSTRACT	1 - 1 4
Y	SU,E.J. et al, Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke, Nature Medicine(New York, NY, United States), 2008, Vol.14, No.7, p.731-737 Abstract	1 - 1 4
A	WO 2007/124308 A1 (LUDBIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 2007.11.01, p.52,Example 7 & US 2007/0265203 A1 & EP 2021028 A	1 - 1 4
A	SHARMA,R.V. et al, Metformin attenuates agonist-stimulated calcium transients in vascular smooth muscle cells, Clinical and Experimental Hypertension, 1995, Vol.17, No.6, p.913-29 Abstract	1 - 1 4
A	LEYBAERT,L. et al, Inositol-trisphosphate-dependent intercellular calcium signaling in and between astrocytes and endothelial cells, Glia, 1998, Vol.24, No.4, p.398-407 Abstract	1 - 1 4

C（続き）． 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	CHARLES,M.A. et al, Effect of weight change and metformin on fibrinolysis and the von Willebrand factor in obese nondiabetic subjects: the BIGPRO1 Study. Biguanides and the Prevention of the Risk of Obesity, Diabetes care, 1998, Vol.21, No.11, p.1967-72 Abstract	1 － 1 4

第Ⅱ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（PCT17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. ☒ 請求項 1 5, 1 6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 5, 1 6 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ 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. ☐ 請求項 _____ 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Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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ろ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項について作成した。
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項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項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項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。