

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4675232号
(P4675232)

(45) 発行日 平成23年4月20日 (2011. 4. 20)

(24) 登録日 平成23年2月4日 (2011. 2. 4)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 31/353 (2006. 01)	A 6 1 K 31/353
A 6 1 P 25/00 (2006. 01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 O 1
C O 7 D 311/64 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 O 7
請求項の数 1 (全 5 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2005-501576 (P2005-501576)	(73) 特許権者	000163006
(86) (22) 出願日	平成15年10月23日 (2003. 10. 23)		興和株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/013544		愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号
(87) 国際公開番号	W02004/037246	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成16年5月6日 (2004. 5. 6)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	平成18年4月7日 (2006. 4. 7)	(74) 代理人	100068700
(31) 優先権主張番号	特願2002-309373 (P2002-309373)		弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成14年10月24日 (2002. 10. 24)	(74) 代理人	100077562
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 高野 登志雄
(31) 優先権主張番号	特願2002-350933 (P2002-350933)	(74) 代理人	100096736
(32) 優先日	平成14年12月3日 (2002. 12. 3)		弁理士 中嶋 俊夫
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100117156
前置審査			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経線維再生促進剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

3, 4 - ジヒドロ - 8 - (2 - ヒドロキシ - 3 - イソプロピルアミノ) プロポキシ - 3 - ニトロキシ - 2 H - 1 - ベンゾピランを有効成分とする視神経線維再生促進剤 (緑内障自体の治療剤を除く) 。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、優れた神経線維再生促進効果を有する神経線維再生促進剤に関する。

【背景技術】

脊椎動物の神経組織は、神経管 (n e u r a l t u b e) 由来の中枢神経系と神経堤 (あるいは神経冠: n e u r a l c r e s t) 由来の末梢神経系に二分される。中枢神経系は脳、脊髄と網膜からなり、末梢神経系には脳神経、脊髄神経、末梢神経節、副腎髄質などが含まれる。このように2つの神経系は発生学的にも解剖学的にも区別されるが、哺乳動物においては切断された神経線維 (軸索) が再生するか否かという点においても異なっている。

成熟した哺乳動物の中枢神経系の神経線維は切断されると再生しないが、末梢神経系の神経線維は条件が整えば再生してくる。この違いは中枢神経系の細胞 (神経細胞: n e u r o n) と末梢神経系の細胞 (神経節細胞: g a n g l i o n c e l l) の性質の違いではなく、それらを取りまく環境、とりわけ神経線維の皮膜である髄鞘を形成する細胞 (中枢では希突起膠細胞、末梢では S c h w a n n 細胞) の違いによる。

10

20

神経線維、特に中枢神経線維の損傷に伴う疾患としては、脳、脊髄、視神経における外傷その他の原因による多くの疾患があり、神経線維の再生による治療が望まれている。

中枢神経線維の再生の試みは、末梢神経を移植して、軸索再生細胞を逆行性標識により検出するという手法が広く知られている (A. J. AGUAYO: in Synaptic Plasticity, C. W. COTMAN ed., Guilford, 1985年, p. 457 - 484)。また、軸索再生による機能回復の検証においては、動物の視神経を切断し末梢神経の自家移植によって中枢と架橋することにより、対光縮瞳反射 (S. J. O. WHITELEY et al.: Exp. Neurol., 1999年, 第154巻, p. 560) や、回避行動 (H. SASAKI et al.: Exp. Neurol., 1999年, 第159巻, p. 377) 等の機能が回復することが報告されている。

10

しかし、これらの機能回復にも克服すべき課題は多く、例えば上述したような視神経の再生の場合、末梢神経を移植して軸索再生を促しても、脳内に広く軸索終末を広げて、シナプスを形成するまでには至っていない。とりわけ再生線維の数は極端に少なく、視神経を例にとれば全視神経線維の4%以下が再生するだけである。軸索が再生するためには、神経細胞が軸索を切断されても生存することが必須であるが、生存の促進が直接的に軸索再生の促進につながる訳ではない (Goldberg J L, Barres BA: Annu. Rev. Neurosci., 2000年, 第23巻, p. 579 - 612, Lup Pet al.: J. Comp. Neurol., 2001年, 第436巻, p. 456 - 470, Watanabe M et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2000年, 第41巻, S190)。我々も後記実施例と同一系において、神経栄養因子とfolskolinの眼球内注入は生存細胞数を増加させるものの、軸索再生を促進するには至らなかった結果を得ている。従って、薬剤により中枢神経の軸索再生を促すためには、生存細胞を増加させ、且つ軸索再生をも促進する効果が薬剤に求められる。しかし、このような作用を有し、中枢神経の軸索再生を促進し、治療に用いることができるような薬剤の存在は、これまで知られていなかった。

20

一方、3, 4 - ジヒドロ - 8 - (2 - ヒドロキシ - 3 - イソプロピルアミノ) プロボキシ - 3 - ニトロキシ - 2H - 1 - ベンゾピラン (一般名: ニブラジロール) は優れたβ遮断作用を有し、高血圧症、狭心症等の循環系疾患治療剤として有用であることが知られている (特公昭60 - 54317号公報、特公平01 - 53245号公報)。しかし、ニブラジロールが神経線維の再生に対してどのような作用をするかは全く知られていない。

30

【発明の開示】

従って、本発明の目的は、神経線維再生促進効果を有する神経線維再生促進剤を提供することにある。

上記のような実情を勘案し、本発明者は鋭意研究を行った結果、全く意外にも、高血圧・狭心症の治療に用いられるβ遮断剤として知られているニブラジロールに、神経線維再生促進作用があることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、ニブラジロールを有効成分とする神経線維再生促進剤を提供するものである。

また、本発明は、ニブラジロールの、神経線維再生促進剤製造のための使用を提供するものである。

40

さらに、本発明は、ニブラジロールの有効量を投与することを特徴とする神経系疾患患者における神経線維再生促進方法を提供するものである。

本発明によれば、優れた神経線維再生促進効果を有する神経線維再生促進剤を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

本発明において使用するニブラジロールは、前記のように特公昭60 - 54317号公報記載の方法により製造でき、後記実施例に示すようにネコ視神経切断モデルにおいて優れた神経線維再生促進作用を示すので、神経線維再生促進剤として有用である。

本発明の神経線維再生促進剤は、ニブラジロールを有効成分とするものであり、経口剤

50

又は非経口剤、例えば、経口剤、注射剤、坐剤、軟膏剤、貼付剤、点眼剤などとして、投与形態に適した組成物として、薬学的に許容される担体を配合し、当業者に公知慣用の製剤方法により製造できる。

経口用固形製剤を調製する場合は、例えば、ニブラジロールに賦形剤、必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤等を加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等を製造することができる。そのような添加剤としては、当該分野で一般的に使用されているものでよく、例えば、賦形剤としては、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、微結晶セルロース、珪酸等を、結合剤としては水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等を、崩壊剤としては乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、乳糖等を、滑沢剤としては精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ砂、ポリエチレングリコール等を、矯味剤としては白糖、橙皮、クエン酸、酒石酸等を例示できる。

10

経口用液体製剤を調製する場合は、例えば、ニブラジロールに矯味剤、緩衝剤、安定化剤、矯臭剤等を加えて常法により内服液剤、シロップ剤、エリキシル剤等を製造することができる。この場合矯味剤としては上記に挙げられたもので良く、緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム等が、安定化剤としてはトラガント、アラビアゴム、ゼラチン等が挙げられる。

20

注射剤を調製する場合は、例えば、ニブラジロールにpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉及び静脈内注射剤を製造することができる。この場合のpH調整剤及び緩衝剤としてはクエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等が挙げられる。安定化剤としてはピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA、チオグリコール酸、チオ乳酸等が挙げられる。局所麻酔剤としては塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等が挙げられる。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖等が例示できる。

他の剤型においても公知の方法に準じて同様に製剤化することができる。

このようにして得られる本発明の神経線維再生促進剤は、軸索損傷を生じるかそれを伴うあらゆる中枢神経系の損傷又は疾患、すなわち脳、脊髄あるいは視神経を含む任意の部分の損傷又は疾患の治療に有効である。特に受傷直下損傷、反受傷直下損傷、貫通外傷、神経外科手術あるいはその他の処置の間に生じる外傷等の外傷や、出血性卒中、虚血性卒中等の卒中や、視神経ニューロパシー、緑内障等に伴う視神経損傷の治療等に有効である。

30

本発明の神経線維再生促進剤の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状、投与形態及び投与回数等によって異なるが、通常は成人に対してニブラジロールとして一日0.01~1000mg、好ましくは0.1~1000mgを1回または数回に分けて経口投与又は非経口投与するのが好ましい。

【実施例】

40

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

神経線維再生促進作用は、以下の手順に従って評価した。

1. 麻酔

成ネコを笑気(0.5L/min)、ハロセン(1~1.5%)、酸素(1L/min)の混合気体で麻酔し、脳定位固定装置に固定した。硫酸アトロピン4mgとベニシリン20万単位を腹腔内と皮下にそれぞれ注射した。

2. ニブラジロールの注入

左眼球の鋸状縁後方の強膜に25Gの注射針で小孔を開けた。硝子体の体積を平均2.

50

7 ml として、ニブラジロールの硝子体内濃度が $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ になるよう、濃度を調整してリンゲル液に溶解した。10 μL ハミルトン注射筒で水溶液 10 μL を、小孔から硝子体内に注入した。なおコントロールとして、ニブラジロールを注入しない群を用意した。

3. 視神経の切断と末梢神経移植

総腓骨神経 (40 ~ 50 mm 長) を同一個体の大腿部から取り出した。4. の標識の便宜のために、中枢端から 10 mm と 20 mm の位置に 10 - 0 縫合糸で印をつけた。

ニブラジロールを注入して 30 ~ 60 分後に、視神経を眼球の直後で完全に切断し、断端に総腓骨神経を縫合した。他端は筋肉内に留置した。

4. 再生細胞の標識

末梢神経を移植して 24 日後 (4 週目の 4 日前)、又は 38 日後 (6 週目の 4 日前) に、麻酔下で移植神経を剖出した。10 - 0 縫合糸を手がかりに、移植神経を接合部から 20 mm の所を切断し、断端に赤い蛍光色素の dextran - rhodamine の粉末を置き、10 - 0 縫合糸で閉じた。2 日後 (実験処理の 2 日前) に、移植神経を接合部から 10 mm の所を切断し、断端に黄色の蛍光色素の dextran - fluorescein の粉末を置き、10 - 0 縫合糸で閉じた。

5. 全細胞数推測

末梢神経を移植して 4 週間又は 6 週間後、ネコをネブタールで深麻酔し、左眼球を摘出した。Ames 培養液中で網膜を摘出し、3% パラフォルムアルデヒド - リン酸緩衝液で固定した。

網膜を PermaFluor に封入して進展標本を作製し、蛍光顕微鏡で全細胞数と二重標識率を求めた。すなわち、480 μm 四方内にある fluorescein 標識細胞 (軸索を 10 ~ 20 mm 伸長した細胞、10R) および fluorescein と rhodamine の両方に標識された細胞 (軸索を 20 mm 以上伸長した細胞、20R) を、1 mm 間隔で数えて全細胞数を推測した。20R / 10R を二重標識率とし、軸索伸長速度の目安とした。全細胞数の結果及び二重標識率の結果を表 1 に示す。

表 1

投与薬物	n	全再生細胞数 (個) (平均値 $\pm$ 標準偏差)	20R / 10R (%) (平均値 $\pm$ 標準偏差)
なし (コントロール) (4 週後)	6	2139 $\pm$ 795	17 $\pm$ 4
ニブラジロール 10^{-7} mol/L (4 週後)	2	8963	38
なし (コントロール) (6 週後)	7	3678 $\pm$ 313	65 $\pm$ 10
ニブラジロール 10^{-7} mol/L (6 週後)	4	11278 $\pm$ 5568	77 $\pm$ 14

表 1 に示すように、コントロールの全細胞数は、末梢神経を移植して 4 週間後及び 6 週間後にそれぞれ 2139 $\pm$ 795 個、3678 $\pm$ 313 個であるのに対し、ニブラジロール (終濃度: 10^{-7} mol/L) の硝子体内注入により、全細胞数は 4 週間後で平均 8963 個、6 週間後で 11278 $\pm$ 5568 個に増加した。さらに、20R / 10R は軸索を 10 mm 以上再生した細胞の中で 20 mm 以上再生した割合を示すが、表 1 に示すように、コントロール網膜の 20R / 10R は、4 週間後及び 6 週間後にそれぞれ 17 $\pm$ 4% 及び 65 $\pm$ 10% であるのに対し、ニブラジロール (終濃度: 10^{-7} mol/L) を硝子体内に注入した網膜では、4 週間後及び 6 週間後にそれぞれ 38% 及び 77 $\pm$ 14% に上昇した。表 1 の結果から、ニブラジロールによる軸索再生の促進が確認された。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 D 311/64

(72)発明者 渡部 眞三
愛知県春日井市高森台 7 丁目 1 番 4 号

審査官 新留 素子

(56)参考文献 特開昭 5 7 - 1 0 6 6 1 9 (J P , A)
特開昭 5 7 - 0 0 7 4 8 1 (J P , A)
Current Eye Research , 2 0 0 2 年 , Vol.24, No.2 , pp.114-122
中沢徹 , 軸索切断による網膜神経節細胞死に対するNipradilolの保護作用 , 日眼会誌 , 2 0 0 1
年 , 第105巻 臨時増刊号 , p.223
第21回日本眼薬理学会 第13回国際眼研究会議日本部会 合同会議 プログラム・講演抄録集 ,
2 0 0 1 年 , p.90
日本の眼科 , 2 0 0 1 年 , 第72巻 , 第3号 , pp.323-326
IOL & RS , 2 0 0 1 年 , Vol.15, No.2 , pp.120-122

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 31/353
A61P 25/00
A61P 27/02
A61P 43/00
C07D 311/64
CAplus(STN)
REGISTRY(STN)
MEDLINE(STN)
BIOSIS(STN)
EMBASE(STN)
JSTPlus(JDreamII)
JMEDPlus(JDreamII)
JST7580(JDreamII)