(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3737523号
(P3737523)
(45)発行日　平成18年1月18日(2006.1.18)　(24)登録日　平成17年11月4日(2005.11.4)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| A61K 31/155 | (2006.01) | A61K | 31/155 | |
| A61P 3/08 | (2006.01) | A61P | 3/08 | ADP |
| A61P 9/00 | (2006.01) | A61P | 9/00 | |

請求項の数 1　(全 15 頁)

| | |
|---|---|
| (21)出願番号 | 特願平5-38572 |
| (22)出願日 | 平成5年2月26日(1993.2.26) |
| (65)公開番号 | 特開平6-9380 |
| (43)公開日 | 平成6年1月18日(1994.1.18) |
| 審査請求日 | 平成12年1月12日(2000.1.12) |
| 審判番号 | 不服2004-5462(P2004-5462/J1) |
| 審判請求日 | 平成16年3月18日(2004.3.18) |
| (31)優先権主張番号 | 843387 |
| (32)優先日 | 平成4年2月28日(1992.2.28) |
| (33)優先権主張国 | 米国(US) |

(73)特許権者　591003183
ワシントン　ユニバーシティー
アメリカ合衆国ミズーリ州，セント　ルイス，ブルッキングス　ドライブ　ナンバー　1
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】一酸化窒素生成の阻害方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

メチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを有効成分として含む糖尿病誘発の血管機能不全または糖尿病合併症を治療するための医薬。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は、温血哺乳動物における一酸化窒素の生成を阻害する方法、さらに詳しく言うと、一酸化窒素の生成のインヒビターとしてのメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンの投与に関する。

【０００２】

【従来の技術】

一酸化窒素シンターゼは、Ｌ－アルギニンからＬ－シトルリン及び一酸化窒素の混合された機能酸化を触媒する（ＮＯ・、１、２）。ＮＯ・は、酵素のイソフォームに応じてシグナル分子またはエフェクター分子のいずれかとして機能すると考えられる。一酸化窒素シンターゼの機能的イソフォームは、グアニル酸シクラーゼを活性化しその結果内皮依存弛緩（２）及び神経伝達（３）の媒介となるｃＧＭＰを生成させる少量のＮＯ・を生成する。ＮＯ・は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイン及び内毒素誘発可能なイソフォームより大量に生成され、大食細胞中では、標的細胞上で大食細胞の細胞毒作用の媒介となると考えられるエフェクター分子として機能する（４）。ＮＯ・は、強力な血管拡張神経薬で

あり、血液流を増加させるので、そして、ＮＯ･生成を刺激する血管作用薬（ヒスタミン及びブラジキニンのような）は、血液流及び血管浸透性の両者を増加させるので、ＮＯ･は糖尿病及び高められたグルコースにより誘発される血液流及び血管浸透性の増加の媒体の候補者となり得る（５）。

【０００３】

近年、インターロイキン－１（ＩＬ－１）が、ランゲルハンス島中の一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームの表現を誘導することが示された。ＮＯ･の生成は、ＩＬ－１がランゲルハンス島機能に与える阻害影響を媒介するエフェクター分子となり得ることが提案されている（６、７）。$N^G$－モノメチル－Ｌ－アルギニン（ＮＭＭＡ）により妨げられるＩＬ－１誘発されたＥＰＲ検出可能な鉄－ニトロシル複合体の生成を利用して、ランゲルハンス島による一酸化窒素の生成が確認されている（８）。また、タンパク質合成インヒビターであるシクロヘキシミドは、ＩＬ－１誘発される亜硝酸塩の生成、ｃＧＭＰの蓄積及びランゲルハンス島によるＥＰＲ検出可能な鉄－ニトロシル複合体の生成を阻害することが知られており、従って、ＩＬ－１は、ランゲルハンス島内の一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームを誘導することが確立されている。

【０００４】

糖尿病合併症の病因は、ソルビトール、ミオイノシトール及び１、２－ジアシル－ｓｎ－グリセロールの代謝の不均衡及び細胞内及び細胞外の成分の非酵素的グリケーションに関連する。このグリケーションとの関連は、アミノグアニジン、求核性ヒドラジン化合物がそれらのグリケーション生成物の生成を妨げ、いくつかの糖尿病誘発された血管（５、９）、神経（１０）及びコラーゲン変化（１１）の進展を軽減するという証拠によって支持される。バカラらは（１２）最近、グリケーションされたアルブミンによるインビトロのＮＯ･のクエンチがアミノグアニジン（アルブミンがグリケーション剤に接触したときに存在する）により軽減されることを報告し、グリケーション生成物が、ＮＯ･活性を軽減することにより内皮依存弛緩を損い得ることを提案した。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】

本発明によれば、温血哺乳動物において一酸化窒素の生成を阻害する新規な方法が提供される。

【０００６】

【課題を解決するための手段】

本発明の方法は、少量であるが有効量のメチルグアニジンまたはジメチルグアニジンを温血哺乳動物に投与して、一酸化窒素の生成を阻害することを含む。

これらの化合物の薬学的に許容され得る塩、例えばＨＣｌ及び硫酸塩も哺乳動物に投与することができることが理解される。

目下のところ、糖尿病合併症の病因は未だはっきりしておらず、それを予防し得ることが示された薬物療法は未だ存在しない。糖尿病合併症は、血糖濃度及びグリケートされたヘモグロビンにより影響されるので糖尿病の重症度に著しく関連するが、血糖濃度を通常にする努力により糖尿病合併症を防止及び／または逆転する試みの効果は、未だ報告されていない。

【０００７】

本出願人による１９９１年１２月１６日に出願された同時継続中の米国出願第０７／８０７，９１２号には、動脈血圧を実質的に高めずに一酸化窒素の生成を阻害する量のアミノグアニジンを温血哺乳動物に投与することを特徴とする方法が開示されている。本発明によれば、通常のラットに静脈内注射した場合に動脈血圧が増加したことによって証明されたように、メチルグアニジンは構造性及びサイトカイン誘発されたＮＯ生成の強力なインヒビターであることが発見された。しかしながら、アミノグアニジンとは対照的に、メチルグアニジンは高次のグリケーション最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の成長により証明されるグルコース誘発された高次グリケーション生成物を阻害することにおいて比較的

非有効である。従って、糖尿病により誘発された血管機能不全のメチルグアニジンによる予防は、高次グリケーション最終生成物の生成よりもＮＯ生成物を阻害する能力に帰することが明らかである。

【０００８】

本明細書は、本発明を形成すると考えられる主題を特に指摘し明確に権利を主張する特許請求の範囲で終結すると同時に、添付の図面に関連して説明される本発明の好適具体例の下記の説明によって、より明らかとなるであろう。

図１は、メチルグアニジン（ＭＧ）、アミノグアニジン（ＡＧ）または$N^G$－モノメチル－Ｌ－アルギニン（ＮＭＭＡ）のボーラス静脈内注射により誘発された平均動脈血圧（ＭＡＰ）の変化を示すグラフであり、ＭＡＰの変化は、基底線より高い圧力の上昇により％で記録され、ボーラス注射投与量はμｍｏｌ／ｋｇで記録されている。

図２は、Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞によるＩＬ－１β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン（ＭＧ）、アミノグアニジン（ＡＧ）または$N^G$－モノメチル－Ｌ－アルギニン（ＮＭＭＡ）の影響を示すグラフであり、亜硝酸塩生成に与える影響は、ＩＬ－１β誘発された亜硝酸塩生成の％で記録され、試験化合物の濃度はμＭで記録されている。

図３は、図２と同様に、Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞によるＩＬ－１β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン（ＭＧ）、ジメチルグアニジン（ＤＭＧ）及びアミノグアニジン（ＡＧ）の影響を示すグラフである。

図４は、グルコース－６－ホスフェート／リジン（Ｇ－６－Ｐ／リジン）中で６日間、メチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドをインキュベートした後の、蛍光性生成物の相対的な生成を示す棒グラフである。

【０００９】

構造性（血管の）一酸化窒素シンターゼの活性に与えるメチルグアニジンの影響は、麻酔状態の通常のラットにおけるメチルグアニジンの静脈内注射後の平均動脈血圧（ＭＡＰ）の変化を監視することによって評価した。メチルグアニジン、アミノグアニジン及びＮＭＭＡの用量作用を図１に示す。

メチルグアニジンは、Ｌ－アルギニン及び一酸化窒素シンターゼの拮抗インヒビター、即ちＮＭＭＡに強力な構造類似性を有しているので、これらの化合物は、２つの化学的に均等なグアニジド窒素基を有しており、Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞による亜硝酸塩及びｃＧＭＰのＩＬ－１β誘発される生成に与えるメチルグアニジンの影響を調べて、同様の試験におけるＮＭＭＡの効果と比較した（図２）。また類似の試験において、メチルグアニジン及びその近接類似物ジメチルグアニジンをそれぞれアミノグアニジン（ＡＧ）の影響と比較した（図３）。Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞系は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイニン誘発可能なイソフォームを含むことが示されている齧歯動物β細胞のランゲルハンス島細胞腺腫細胞系である。図２及び３は、５ユニット／ｍｌのＩＬ－１β±示された濃度のメチルグアニジン、ジメチルグアニジン、アミノグアニジン及びＮＭＭＡまたはＡＧとともに１８時間インキュベートしたＲｉｎ－ｍ５Ｆ細胞による亜硝酸塩（一酸化窒素の酸化生成物）のＩＬ－１β誘発された生成物における、メチルグアニジン、ジメチルグアニジン、アミノグアニジン及びＮＭＭＡまたはＡＧの用量作用を示す。

グリケーションに与えるメチルグアニジンの影響は、グルコース－６－ホスフェート／リジン中におけるインキュベート後の蛍光性生成物の成長を測定することによって評価され、アミノグアニジン及びセミカルバジドの相当する効果と比較した。結果を図４に示すが、グリケーションの最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の成長によって証明されるように、メチルグアニジンは、グルコース誘発されるグリケーション生成物の防止において比較的不活性である（アミノグアニジン及びセミカルバジドと比較して）ことを示している。

【００１０】

【実施例】

本発明をさらに説明するために、以下の詳細な実施例を開示するが、本発明は、これらの特定の実施例または本明細書中に記載される詳細部分によって限定されるものではないことを理解されたい。これらの実施例において得られた結果を表１～５及び添付の図面１～

４中に示す。
この実施例は、メチルグアニジンを使用して糖尿病により誘発される血管機能不全を予防して一酸化窒素シンターゼを阻害する方法を説明するものである。
【００１１】
材料及び方法
動物実験
これらの試験において使用した全てのラットを屋内に閉じ込め、「実験動物の愛護飼育に関する大学委員会」及び「実験動物福祉に関するＮＩＨのガイドライン」に従って飼育した。ラットは別個に屋内に入れ、無制限に食糧（標準ラット用飼料；米国インディアナ州リッチモンドのラルストンピュリナ）及び水を与え、１２時間明／暗周期の光を与えた。最初に２２５～２５０ｇ重量であった雄のＳｐｒａｑｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットを４つのグループに分けた：グループ１は、未処理の対照；グループ２は、メチルグアニジン（ｍｇ）処理した対照；グループ３は、未処理の糖尿病；及びグループ４は、ｍｇ処理した糖尿病。糖尿病は、ケタミン麻酔薬を使用してストレプトゾトシン（米国ミズーリ州セントルイスのシグマケミカル社製）を４５ｍｇ／体重１ｋｇ静脈内注射することにより誘発した。メチルグアニジン塩酸塩（シグマケミカル社製）を２５ｍｇ／体重１ｋｇの投与量で１日１回皮下投与した。さらに、糖尿病のラットには１ｇ／Ｌのメチルグアニジンを含む水を与える一方、対照のラットには２．５ｇ／Ｌのメチルグアニジンを含む水を与えた。水の消費量は全てのラットに関して１週間毎に監視した。
体重は一週間毎に測定し、非絶食の朝の血漿グルコース濃度をストレプトゾトシン投与の３日後に評価して（糖尿病の誘発を確認し）、次いでその後２週間毎に、ローリーとパソノーの慣用グルコースオキシダーゼ方法（１４）を使用して評価した。４週間後に、全てのラットを２４時間個々の代謝ケージに入れ、食糧消費（ｇ／体重１００ｇ／２４時間）及び尿排出量（ｍｌ／腎臓／２４時間）を測定した。尿の飼料を尿アルブミン排出量の測定のために－７０℃で保存した（下記参照）。糖尿病誘発の５週間後に、ラットを使用して下記の浸透性及び血流の考察を行った。
【００１２】
試験方法
部位血管アルブミン浸透を、２つの異なるヨウ素同位元素 $^{131}$Ｉ及び $^{125}$Ｉにより標識したウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）の注射投与に基づく同位元素希釈技術を使用して定量した（１５～１７）。 $^{125}$Ｉ－ＢＳＡを使用してトレーサー循環の１０分後に血管アルブミン濾過を定量し、一方、 $^{131}$Ｉ－ＢＳＡは、血管内に含まれるトレーサーの $^{125}$Ｉ－ＢＳＡ組織活性の補正のための血漿容量マーカーとして作用した。
【００１３】
放射線標識されたトレーサーの調製
精製されたモノマーＢＳＡ（２０ｍｇ）を上記に記載のヨウ素同位元素方法（１５）により $^{131}$Ｉまたは $^{125}$Ｉ（米国マサチューセッツ州ボストンのＮＥＮレサーチプロダクツ製）１ｍＣｉによりヨウ化した。 $^{57}$Ｃｏ－ＥＤＴＡを上記のようにして調製し（１５、１６）、 $^{46}$Ｓｃ－ミクロスフェア（１０μｍ径）を使用して、下記の方法で部位血液流を評価した。
【００１４】
外科的方法
ラットをイナクチン（ＦＲＧ、コンスタンツ、バイクガルデン）により麻酔し（～１００ｍｇ／体重１ｋｇ腹膜内投与）、熱灯、３７℃の外科用トレー及び直腸温度探針を使用して、中心体温を３７±０．５℃に維持した。左大腿部静脈、左腸骨動脈、右鎖骨動脈及び右頚動脈に、ヘパリン処理した食塩水（４００Ｕヘパリン／ｍｌ）が充填されたポリエチレン管（０．５８ｍｍ内径）を挿入した。大腿部静脈カニューレを使用してトレーサーを注射投与し、右鎖骨動脈カニューレを血圧の監視のための圧力変換器に接続した。左腸骨動脈を、０．０５５ｍｌ／分の一定速度で排出するために予め設けられたハーバードモデル９４０定速排出ポンプに取り付けられた１ｍｌのシリンジに接続した。右頚動脈中のカ

ニューレの先端を心臓の左心室中に置き、放射線標識されたミクロスフェアの注入に使用した。気管に挿管し、連続的通気を助ける小齧歯動物用の人工呼吸装置に接続した。

【００１５】

試験方法

時間０において、$^{125}$Ｉ－アルブミン（食塩水０．３ｍｌ中）及び$^{57}$Ｃｏ－ＥＤＴＡ（食塩水０．１ｍｌ中～０．１μＣｉ）を静脈内注射し、排出ポンプを同時に始動した。時間０の８分後に、$^{131}$Ｉ－ＢＳＡ０．２ｍｌを注射し、１分後に、$^{46}$Ｓｃ－ミクロスフェアを～３０秒かけてゆっくりと注射した。１０分後に、心臓の全血液流を停止させ、排出ポンプを同時に停止し、種々の組織をγ線分光測定のために採取した。

腎臓、膀胱及び輸尿管を取り出した。目を上記に説明した方法により（１５、１６）切開し、両目から得られた組織をγ線分光測定の前に集めた。全ての組織試料及び動脈血漿試料の重量を計測し、ヒューレットパッカード１０００Ａコンピューターとインターフェースで接続されたγ線分光測定器により計測し、前記コンピューターによりデータがバックグラウンドに対して補正され、次の分析のために保存された。

【００１６】

データの分析

$^{125}$Ｉ－ＢＳＡ組織清掃値の量的指標を既に説明した方法（１５、１６、１７）で算出し、μｇ血漿／ｇ組織重量／分として表現した。非常に簡単に、組織中の$^{125}$Ｉ－ＢＳＡ活性に、試験終了時に得られた動脈血漿試料中の$^{125}$Ｉ－ＢＳＡ／$^{131}$Ｉ－ＢＳＡ活性の比率をかけることによって、$^{125}$Ｉ－ＢＳＡ組織活性を、組織中に含まれるトレーサーに関して補正した。血管－補正された$^{125}$Ｉ－ＢＳＡ組織活性を、時間平均化された$^{125}$Ｉ－ＢＳＡ血漿活性（排出シリンジから得られた血漿の十分に混合された試料から得られた）及びトレーサー循環時間（１０分間）により割り、次いで組織重量１ｇ当りに標準化した。

腎糸球体の濾過速度（ＧＦＲ）を既に説明した方法（１８）により算出した。部位血液流を算出するために、網膜内の$^{46}$Ｓｃの全活性を排出シリンジから得られた参照血液試料中の$^{46}$Ｓｃの全活性で割り、次いで、ポンプ排出速度でかけ、ｍｌ／ｇ組織重量／分として表現した（１９）。

【００１７】

高次グリコシル化最終生成物の調製

リジン－由来の高次グリコシル化生成物を、０．２Ｍリン酸ナトリウム緩衝液、ｐＨ７．４中において、１００ｍＭのグルコース－６－リン酸塩及びＬ－リジンをインキュベートすることにより、バカラらの方法（１２）で調製した。このインキュベートは、滅菌状態を維持して行ない、暗所で室温において～６日間維持され、その時に、パーキン－エルマーのＬＳ－５Ｂ蛍光光度計を用い、３７０ｎｍにおける励起及び４４０ｎｍにおける放射を使用して、グリケーションの指標として相対的蛍光度を測定した。分光光度測定の前に、試料を食塩水で１：１１に希釈した。１０及び１００ｍＭ濃度のメチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドがグリケーションプロセスを阻害する能力を２つの別個の試験において比較した（図４）。

【００１８】

血圧測定

テイル－カフ方法（２０、２１）を使用して、意識のあるラットにおける収縮期の血圧を１週間の間隔をおいて測定した。最初に、動物を拘束装置中に置き、血圧計を数回膨張させることによる方法を採用した。血圧は、浸透性の考察の間に麻酔状態のラットにおける腸骨動脈カニューレからも計測した。

【００１９】

平均動脈血圧に与えるメチルグアニジンの丸薬注射の影響

２５０から３００ｇ重量の通常の雄のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットを、１００ｍｇ／体重１ｋｇのイナクチン、次いで０．１ｍｌ／体重１ｋｇのｄ－ツボクラリン塩化物により麻酔し、左大腿部血管（トレーサー注入のため）及び右腸骨動脈（血圧の監視のた

め）にヘパリン処理された食塩水を充填したポリビニル管（０．８×０．５ｍｍ）を挿入し、気管にカニューレを挿入し、連続的通気を助けるために小齧歯動物用の人工呼吸装置に接続した。動脈血圧が安定した後、増加する量（３．１及び５０μｍｏｌ／ｋｇ体重）のメチルグアニジンまたは$N^G$－モノメチル－Ｌ－アルギニン（ＮＭＭＡ）を、別個の動物において０．５ｍｌの容量で静脈内注射し、ピークの血圧上昇をゴウルドのＲＳ３２００記録装置を使用して記録した。結果を基底線上の血圧上昇の百分率として表現した。

【００２０】

統計的分析

データは平均±１ＳＤとして表現した。分散の分析は、ＳＡＳの一般線形モデル手順を使用して行なった。多重比較に関連する潜在的なタイプ１の誤差を減少するために、各パラメーターに対するグループ間の全体の相違をバンデルベルデンテストにより予め評価した。与えられたパラメーターに対するグループ間に、統計的に著しい相違（ｐ＜０．０５）が認められた場合は、全てのデータの非母数（階数順）ブロン変換の後の最小二乗法により、二重方法の比較を行なった。

【００２１】

実施例２

本実施例は、Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞によるＩＬ－１β－誘発された亜硝酸塩生成における、メチルグアニジンの影響を説明するものである（図２）。ワシントン大学組織培養支援センターから入手したＲｉｎ－ｍ５Ｆ細胞を、トリプシン／ＥＤＴＡ処理により生長フラスコ（５５～８０×$10^6$ 細胞／フラスコ）から取り出し、１ｍｌのペトリ皿中に等分して入れた（１条件当り１～２×$10^6$ Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞）。細胞を、完全ＣＭＲＬ－１０６６組織培養基（１０％熱不活性化された、ウシ胎児血清、２ｍＭＬ－グルタミン、５０ユニット／ｍｌペニシリン及び５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン）またはメチルグアニジン（ＭＧ）、アミノグアニジン（ＡＧ）若しくはＮＭＭＡを補給された完全ＣＭＲＬ－１０６６の１ｍｌ中において、１８時間（９５％空気及び５％$CO_2$ の雰囲気下で）インキュベートした。インキュベートの後、上清を除去し、亜硝酸塩を上記した方法（８、１３）と同じ慣用方法により１００μｌアリコートにおいて測定した。結果をＩＬ－１誘発された亜硝酸塩生成（％）として表わし、１試験当り３回の繰り返しを含む４の個々の試験の±ＳＥＭの平均値である。結果は、一酸化窒素シンターゼのサイトカイン誘発可能なイソフォームによる一酸化窒素生成の阻害において、ＡＧ及びＮＭＭＡの両者は、ＭＧよりも～１０倍大きいことを示している。

【００２２】

実施例３

Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞によるＩＬ－１β－誘発された亜硝酸塩の生成に与えるメチルグアニジン、１，１－ジメチルグアニジン及びアミノグアニジンのそれぞれの影響を、実施例２に記載の方法により試験し、得られた結果を図３に示す。結果は、亜硝酸塩シンターゼのサイトカイン誘発イソフォームの阻害については、ＡＧ＞ＤＭＧ＞ＭＧの順番で大きいことを示している。

【００２３】

下記の表１～５及び添付の図面１～４は、上記実施例において得られた結果を記録したものである。これらの結果は、メチルグアニジン及びジメチルグアニジンが、構造性及びサイトカイン誘発されたＮＯ生成の強力なインヒビターであることを示している。このことは、図１に示されるように通常のラットに静脈内注射した場合のメチルグアニジンによる平均動脈血圧の上昇、並びに図２及び３に示されるようにメチルグアニジン及びジメチルグアニジンによる齧歯動物の細胞腺腫細胞における亜硝酸塩のＩＬ－１β－誘発された増加の阻害により証明される。メチルグアニジンは、グルコース誘発されたグリケーション生成を妨げることにおいて（高次グリケーション最終生成物に特徴的な蛍光性生成物の生成により証明される）、比較的不活性であるので（アミノグアニジンと比較して）（図４）、糖尿病誘発の血管機能不全のメチルグアニジンによる防止は、それがＮＯ生成を阻害する能力に帰するものであると考えられる。従って、メチルグアニジン及びその近接類似

物であるジメチルグアニジンは、ＮＯの生成の増加を伴う炎症性及び免疫性疾患の他、糖尿病の合併症の防止に有効である。

【表１】

表　1

体重、血漿グルコース及び水消費に与える
糖尿病及びメチルグアニジンの影響

| | 対　照 | | 糖尿病 | |
|---|---|---|---|---|
| | 対　照 | ＋mg | 糖尿病 | ＋mg |
| ラット数 | 10 | 11 | 14 | 18 |
| 体　重（g） | | | | |
| 初　期 | 249±20 | 256±16 | 250±19 | 248±18 |
| ２週間後 | 326±25 | 300±31 | 297±23 | 271±23 |
| ４週間後 | 375±41 | 351±37 | 334±45 | 294±50 |
| 血漿グルコース（mg/dL） | 130±15 | 131±28 | 419±120 | 420±87 |
| ヘマトクリット(%) | 43±2 | 42±1 | 42±1 | 42±2 |
| 血　圧（mm Hg） | | | | |
| 意識あり | 125±18 | 121±7 | 123±5 | 126±5 |
| 麻酔状態 | 118±14 | 114±14 | 120±16 | 121±14 |
| 水消費（ml／日） | 46±6 | 32±9 | 108±42 | 93±53 |

【表２】

表 2

$^{125}$Ｉ－アルブミン浸透[a] に与える糖尿病
及びメチルグアニジン(mg)の影響

| | 対照 | 対照 +mg | 糖尿病 | 糖尿病 +mg |
|---|---|---|---|---|
| ラット数 | 10 | 8 | 11 | 9 |
| 目 | | | | |
| 前部ブドウ膜 | 266±77 [b] | 359±146 | 623±109 [a] | 370±60 [b] |
| 後部ブドウ膜 | 328±106 | 312±101 | 742±134 [a] | 358±108 |
| 網膜 | 47±12 | 61±11 | 116±30 [a] | 55±18 |
| 座骨神経 | 47±13 | 47±10 | 121±22 [a] | 50±10 |
| 大動脈 | 62±20 | 60±18 | 155±37 [a] | 85±41 |
| 腎 臓 | 727±239 | 714±214 | 1011±265 [c] | 738±169 |
| 肺 | 1805±532 | 1656±454 | 1405±324 | 1498±487 |
| 横隔膜 | 201±75 | 190±27 | 210±61 | 216±46 |
| 心 臓 | 521±135 | 731±269 | 534±62 | 599±68 |
| 脳 | 5±3 | 4±3 | 5±2 | 6±4 |

[a] μｇ血漿／体重１ｇ／分；試験手順の詳細は実施例１の方法を参照せよ。

[b] 平均±ＳＤ

スチューデントのｔ検定により未処理の対照とは著しく異なる。

：[a]ｐ＜0.００１；[b]ｐ＜0.０５；[c]ｐ＜0.０１.

【表３】

表 3

部位血液流へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

| | (n) | 前部ブドウ膜 | 後部ブドウ膜 | 網膜 | 座骨神経 | 腎臓 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 対照 | (10) | 2.0±0.6 | 3.4±0.6 | 0.43±0.02 | 0.06±0.02 | 6.5±0.3 |
| 対照+mg | (8) | 2.4±0.5 | 3.3±0.6 | 0.45±0.07 | 0.07±0.03 | 4.8±0.3 [a] |
| 糖尿病 | (10) | 2.7±0.3 [b] | 4.2±0.5 [b] | 0.57±0.08 [a] | 0.09±0.01 [a] | 6.0±0.4 [c] |
| 糖尿病+mg | (9) | 2.3±0.6 | 3.9±0.6 | 0.45±0.04 | 0.06±0.02 | 5.8±0.3 [a] |

* ml／分／体重1g；値は放射線標識されたミクロスフェアを使用して測定した平均±1SDである。（～10μm 径）

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。：[a]$p<0.001$；[b]$p<0.005$；[c]$p<0.01$.

【表4】

表 4

GFR* へ与える糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

| | (n) | 全腎臓当り | 腎臓1g当り |
|---|---|---|---|
| 対照 | (10) | 1.33 ± 0.19 | 0.85 ± 0.07 |
| 対照+mg | (8) | 1.53 ± 0.29 | 0.87 ± 0.08 |
| 糖尿病 | (10) | 1.81 ± 0.25 [a] | 0.92 ± 0.14 |
| 糖尿病+mg | (9) | 1.59 ± 0.15 [b, c] | 0.85 ± 0.09 |

* ml/分；値は放射線標識された$^{57}$Co-EDTAを使用して測定した平均±1SDである。

スチューデントのt検定により対照と著しく異なる。：[a]p<0.001;
[b]p<0.005

スチューデントのt検定により糖尿病と著しく異なる。：[c]p<0.05.

【表5】

表 5

組織ソルビトールとミオイノシトールへ与える
糖尿病及びメチルグアニジン(mg)の影響

| | 対照 | | 糖尿病 | |
|---|---|---|---|---|
| | 対照 | +mg | 糖尿病 | +mg |
| ラット数 | 7 | 8 | 11 | 9 |
| 網膜 | | | | |
| ソルビトール | 102±16[a] | 102±31 | 933±275 | 533±265 |
| ミオイノシトール | 1613±516 | 1529±187 | 1564±452 | 1513±402 |
| 座骨神経 | | | | |
| ソルビトール | 183±41 | 194±75 | 1999±334 | 1234±710 |
| ミオイノシトール | 3943±526 | 4263±1587 | 3444±639 | 3308±792 |
| 赤血球 | | | | |
| ソルビトール | 6±1 | 6±2 | 44±9 | 40±8 |
| ミオイノシトール | 131±47 | 104±19 | 109±20 | 103±19 |

[a] 値は平均±ＳＤである。；試験手順については実施例１の方法を参照せよ。

【００２４】
本明細書中において説明した一酸化窒素生成のメチルグアニジン及びジメチルグアニジンインヒビターは、慣用の方法、好ましくは薬学的に許容され得る希釈剤及び担体との処方物として温血哺乳動物へ投与されるように使用されることができる。投与される活性インヒビターの量は、有効量、即ち、医薬的に効果的であるがその使用に伴う利益よりも重い毒性効果を示さない量でなければならない。人間の大人の一日当りの投与量は、通常、体重１キロ当り薬品約１ｍｇ以上の範囲であると考えられる。投与の適当な経路は、カプセル、錠剤、シロップ、エレキシル及びその類似の形態による経口投与であるが、静脈内、腹膜内または皮下のような非経口投与を使用することもできる。生理食塩水のような水性溶液として本薬物を静脈内投与することを例としてあげることができる。治療投与形態物における薬学的に許容され得る希釈剤及び担体中の本薬物の適当な処方物は、例えば米国ペンシルベニア州イーストンのマックパブリシングカンパニーのアーサーオソル編集「レミントンズファーマシューティカルサイエンス」１６版、（１９８０）のような本技術分野における一般的テキストを参考にして調製することができる。

【００２５】
当業者にとっては本明細書を読んだ後、本発明の精神と範囲を逸脱することのない種々のその他の実施例が明らかとなるであろう。そのような実施例の全ては、本明細書中の特許請求の範囲の範囲内に包含されることを意図する。

【００２６】
本明細書中においてカッコ内に引用された参考文献は、下記の通りである。

１．　Ｄ．Ｊ．スチュエール、Ｈ．Ｊ．チョ、Ｎ．Ｓ．ウォン、Ｍ．Ｆ．ウアイス、Ｃ．Ｆ．ナザン、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ」、８８，７７７３（１９９１）。

2．　S．モンカダ、R．M．J．パルマー、E．A．ヒグス、「Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｒｅｖｉｅｗｓ」、４３，１０９（１９９１）。
3．　J．ガースウェイト、「Ｔｒｅｎｄｓ　Ｎｅｕｒｏｌ．Ｓｃｉ．」、１４：６０（１９９１）。
4．　J．B．ヒブス、Ｊｒ．，ら、「Ｎｉｔｒｉｃ　Ｏｘｉｄｅ　ｆｒｏｍＬ－Ａｒｇｉｎｉｎｅ：ａ　Ｂｉｏｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ」、S．モンカダ及びE．ヒグス、Ｅｄｓ．エルゼビエール、ニューヨーク、（１９９０）、ｐｐ　１８９－２２３。
5．　G．パグリーゼ、R．G．チルトン、J．R．ウィリアムソン、「Ｄｉａｂｅｔｅｓ／Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ　Ｒｅｖｉｅｗｓ」、７，３５（１９９１）。
6．　C．サザン、D．シャルスター、I．C．グリーン、「Ｆｅｂｓ　Ｌｅｔｔ．２７６」、４２（１９９０）。
7．　J．A．コルベット、J．L．ウォン、M．A．スウィートランド、J．R．ランカスター、Ｊｒ．，M．L．マクダニエル、「Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｊ．」（ｓｕｂｍｉｔｔｅｄ）。
8．　J．A．コルベット、J．R．ランカスター、Ｊｒ．，M．A．スウィートランド、M．L．マクダニエル、「Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．」、２６６，２１３５１－２１３５４（１９９１）。
9．　J．R．ウィリアムソンら、「Ｄｉａｂｅｔｅ　＆　Ｍｅｔａｂ．」、１６，３３６９（１９９０）。T．ソリス－リパロータ、M．クーパー、D．パパゾグロー、B．クラーク、G．ジェラムス、「Ｄｉａｂｅｔｅｓ」、４０，１３２８（１９９１）。
１０．　M．キハラら、「Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８」、６１０７（１９９１）。
１１．　M．ブラウンリー、A．セラミ、H．ブラッサラ、「Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．」、３１８，１３１５（１９８８）。M．ブラウンリー、H．ブラッサラ、A．クーニー、P．ウルリッヒ、A．セラミ、「Ｓｃｉｅｎｃｅ」、２３２，１６２９（１９８６）。
１２．　R．ブカラ、K．J．トレーシー、A．セラミ、「Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．」、８７，４３２（１９９１）。
１３．　L．C．グリーンら、「Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１２６」、１３１（１９８２）。
１４．　O．H．ローリー、J．V．パソノー（１９７２）「Ａ　Ｆｌｅｘｉｂｌｅ　Ｓｙｓｔｅｍ　ｏｆ　Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ　Ａｎａｌｙｓｉｓ．」、オーランド：アカデミックプレス。
１５．　R．G．チルトン、K．チャン、G．パグリーゼ、D．M．イード、M．A．プロビンス、W．R．シャーマン、C．キロ、J．R．ウィリアムソン、「Ｄｉａｂｅｔｅｓ　３８」、１２５８－１２７０（１９８９）。
１６．　G．パグリーゼ、R．G．チルトン、A．スピーディー、K．チャン、M．A．プロビンス、C．キロ、J．R．ウィリアムソン、「Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ　３９」、６９０－６９７（１９９０）。
１７．　G．パグリーゼ、R．G．チルトン、K．チャン、A．スピーディー、M．プロビンス、D．M．イード、P．E．レイシー、C．キロ、J．R．ウィリアムソン、「Ｄｉａｂｅｔｅｓ　３９」、３２３－３３２（１９９０）。
１８．　Ｙ．Ｉｄｏ，R．G．チルトン、K．チャン、及びJ．R．ウィリアムソン、「Ｋｉｄｎｅｙ　Ｉｎｔ．」、Ｉｎ　ｐｒｅｓｓ，１９９２。
１９．　G．パグリーゼ、R．G．チルトン、A．スピーディー、E．サンタレリ、D．M．イード、M．A．プロビンス、C．キロ、W．R．シャーマン、J．R．ウィリアムソン、「Ｄｉａｂｅｔｅｓ　３９」、３１２－３２２（１９９０）。
２０．　M．J．フレグリー、「Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．」、６２，２２３－２３０（１９６３）。

２１．　Ｊ．Ｍ．フェファー、Ｍ．Ａ．フェファー、Ｅ．Ｄ．フローリッヒ、「Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ　Ｍｅｄ．」、７８，９５７－９６２（１９７１）。

【００２７】

政府の援助に対する謝辞

この研究は、米国国立保健研究所の認可ＤＫ０６１８１、Ｔ３２ＤＫ０７２９６、ＥＹ０６６００、ＨＬ３９９３４及びＤＫ２０５７９により一部援助を受けて行われた。

【図面の簡単な説明】

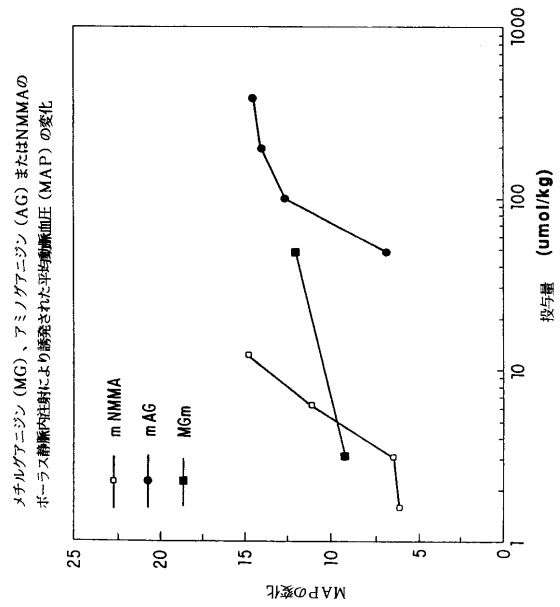
【図１】メチルグアニジン（ＭＧ）、アミノグアニジン（ＡＧ）またはN$^{G}$－モノメチル－Ｌ－アルギニン（ＮＭＭＡ）のボーラス静脈内注射により誘発された平均動脈血圧（ＭＡＰ）の変化を示すグラフである。

【図２】Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞によるＩＬ－１β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン（ＭＧ）、アミノグアニジン（ＡＧ）またはN$^{G}$－モノメチル－Ｌ－アルギニン（ＮＭＭＡ）の影響を示すグラフである。

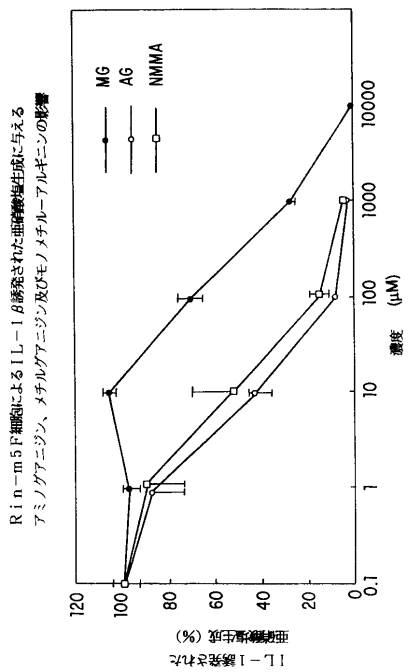
【図３】図２と同様に、Ｒｉｎ－ｍ５Ｆ細胞によるＩＬ－１β誘発された亜硝酸塩生成に与えるメチルグアニジン（ＭＧ）、ジメチルグアニジン（ＤＭＧ）及びアミノグアニジン（ＡＧ）の影響を示すグラフである。

【図４】グルコース－６－ホスフェート／リジン（Ｇ－６－Ｐ／リジン）中で６日間、メチルグアニジン、アミノグアニジンまたはセミカルバジドをインキュベートした後の、蛍光性生成物の相対的な生成を示す棒グラフである。

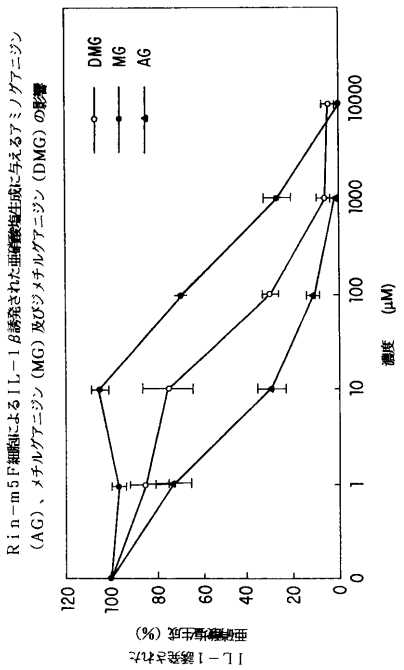
【図１】



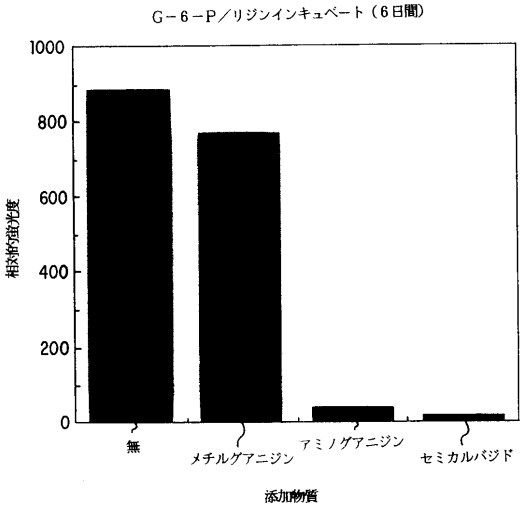

【図２】



【図３】


DMG
MG
AG
濃度 (μM)
IL－1誘発された
亜硝酸塩生成 (%)

【図４】


G－6－P／リジンインキュベート（6日間）
相対的蛍光度
無
メチルグアニジン
アミノグアニジン
セミカルバジド
添加物質

フロントページの続き

(72)発明者 ジョセフ アール. ウイリアムソン
アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイス, エス. ユークリッド ６６０, ワシントン ユニバーシティ スクール オブ メド, デプト オブ パソロジィ 気付
(72)発明者 ジョン エイ. コーベット
アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイス, エス. コークリッド ６６０, ワシントン ユニバーシティ スクール オブ メド, デプト オブ パソロジィ 気付
(72)発明者 マイクル エル. マックダニエル
アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイス, エス. コークリッド ６６０, ワシントン ユニバーシティ スクール オブ メド, デプト オブ パソロジィ 気付
(72)発明者 ロナルド ジー. ティルトン
アメリカ合衆国ミズリー州セント ルイス, エス. コークリッド ６６０, ワシントン ユニバーシティ スクール オブ メド, デプト オブ パソロジィ 気付

合議体
審判長 竹林 則幸
審判官 齋藤 恵
審判官 中野 孝一

(56)参考文献 Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ, １９７２, Ｖｏｌ. ４２, ｐａｇｅｓ ３９５－４０４