

(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2015-205835

(P2015-205835A)

(43) 公開日 平成27年11月19日(2015.11.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 33/26 (2006.01)</b>	A 6 1 K 33/26	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 7/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/00	
<b>A 6 1 P 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 39/00	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2014-87177 (P2014-87177)	(71) 出願人	504145320 国立大学法人福井大学 福井県福井市文京3丁目9番1号
(22) 出願日	平成26年4月21日 (2014.4.21)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688 弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743 弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中性子線障害防護剤

(57) 【要約】

【課題】放射線の中でも特に透過性が高く、障害の程度が大きい中性子線による障害から防護する手段を提供すること。

【解決手段】ニトロプルシドまたはその薬理学的に許容される塩を含有する、中性子線障害防護剤を提供することで上記課題を解決する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩を含有する、中性子線障害防護剤。

## 【請求項 2】

中性子線障害が、造血幹細胞障害、造血前駆細胞障害および末梢血血球細胞産生障害からなる群より選択される 1 以上の障害である、請求項 1 に記載の剤。

## 【請求項 3】

ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩を含有する、中性子線による血球系細胞障害からの回復促進剤。

## 【請求項 4】

血球系細胞障害が、造血幹細胞障害、造血前駆細胞障害および末梢血血球細胞産生障害からなる群より選択される 1 以上の障害である、請求項 3 に記載の剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、中性子線障害の防護に有用な医薬等に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

原子力発電所の作業員、非破壊検査員、放射性検査薬を扱う臨床検査技師ならびにレントゲン検査・癌等の放射線療法に従事する医師や診療放射線技師は、わずかな量でも業務中、常に放射線を被ばくしている可能性がある。また、原子力発電所の事故が起きると、作業員の他、周辺地域の住民も一度に大量の放射線を被ばくする可能性がある。放射線の中でも、中性子線は特に透過力が強く、人体への悪影響が懸念されるが、中性子線による障害から人体を防護する医薬品等の開発は進められていない。よって、中性子線障害の防護に有用な医薬品の開発が求められている。

## 【0003】

中性子線等の放射線を被ばくすると、生体を構成する原子の原子核との相互作用により弾性散乱、非弾性散乱、捕獲および原子核反応を誘引し、細胞死、突然変異等の障害を引き起こされる。そして、中性子線の吸収線量に応じて造血・免疫系、消化器系、呼吸器系、中枢神経系等に障害を生じ、これを原因として被ばく者は死亡する場合がある。

## 【0004】

また、中性子捕捉療法などの中性子線を利用した治療を受ける癌患者等は、ホウ素を取り込んだ癌細胞が大きな障害を受けるが、同時にホウ素を取り込んだ正常組織も障害を受ける可能性がある。

## 【0005】

本発明者らはこれまでに、ニトロプルシドが放射線障害の予防または治療に有効で、放射線照射後の個体の生存率を上昇させる効果を有することを見出し（特許文献 1）、その効果が放射線により誘発されるアポトーシスを抑制することによって発揮されることを見出している（特許文献 2）。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0006】

【特許文献 1】特開 2011 - 207841 号公報

【特許文献 2】特願 2013 - 060747 号

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本発明が解決しようとする課題は、透過性が非常に高く防護が困難な中性子線による障害を予防または治療し、中性子線被ばく後の生存率を上げる医薬等を提供することである。

10

20

30

40

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、高血圧症や狭心症の治療薬として広く使用されているニトロプルシドが、中性子線障害の防護に有用であり、中性子線障害を起こした個体の生存率を上昇させることを見出した。また、ニトロプルシドが、中性子線被ばくによって引き起こされる造血幹細胞および末梢血中の血球細胞の減少からの回復を促進する効果を有することを見出した。

## 【0009】

以上の知見に基づき本発明が完成された。即ち、本発明は以下の通りである。

[1]ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩を含有する、中性子線障害防護剤

10

[2]中性子線障害が、造血幹細胞障害、造血前駆細胞障害および末梢血血球細胞産生障害からなる群より選択される1以上の障害である、[1]に記載の剤。

[3]ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩を含有する、中性子線による血球系細胞障害からの回復促進剤。

[4]血球系細胞障害が、造血幹細胞障害、造血前駆細胞障害および末梢血血球細胞産生障害からなる群より選択される1以上の障害である、[3]に記載の剤。

## 【発明の効果】

## 【0010】

本発明によれば、中性子線被ばく後、造血幹細胞および末梢血血球細胞が担う造血および免疫機能等の回復促進効果、延命効果および生存率の向上等の効果が得られ、中性子線障害の予防および治療に有用な中性子線障害防護剤を提供することができる。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】図1は、ニトロプルシドの投与により、中性子線被ばく後のマウスの生存率が上昇することを示す図である。

【図2】図2は、ニトロプルシドの投与により、中性子線被ばく後の骨髓造血幹細胞数および造血前駆細胞数が回復することを示す図である。

【図3】図3は、ニトロプルシドの投与により、中性子線被ばく後の白血球数の回復が促進されることを示す図である。

30

【図4】図4は、ニトロプルシドの投与により、中性子線被ばく後の血小板数の回復が促進されることを示す図である。

【図5】図5は、ニトロプルシドの投与により、中性子線被ばく後の胸骨骨髓細胞障害の回復、胸腺皮質の細胞障害の回復および白脾髄の細胞障害の回復が促進されることを示す図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0012】

本発明は、ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩を含有する、中性子線障害防護剤を提供する。

## 【0013】

本発明におけるニトロプルシドとは、式  $(Fe(CN)_5NO)^{2-}$  で表される化合物である。

40

## 【0014】

ニトロプルシドは一酸化窒素を放出する作用を有する。中性子線に被ばくすると生体を構成する原子の原子核との相互作用により弾性散乱、非弾性散乱、捕獲および原子核反応を誘引し、様々な障害を引き起こす。理論には拘束されないが、一酸化窒素は、中性子線被ばくにより生じる組織障害回復過程を促進するため、ニトロプルシドは中性子線障害防護能を有すると考えられる。

## 【0015】

従って、一酸化窒素を放出する作用を有する物質であれば、中性子線障害に対する防護

50

作用を有する可能性があり、そのような物質の例としては、硝酸イソソルビド、ニトログリセリン、ニコランジル、ニプラジロールなどが挙げられる。

【0016】

ニトロプルシドの薬理的に許容される塩としては、例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩などが挙げられる。

【0017】

無機塩基との塩の好適な例としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

【0018】

有機塩基との塩の好適な例としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、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、ジシクロヘキシルアミン、N, N - ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

【0019】

ニトロプルシドの薬理的に許容される塩の好適な例としては、ニトロプルシドのナトリウム塩 ( $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ ) やカリウム塩 ( $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ ) が挙げられる。

【0020】

ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩は、結晶であってもまた非結晶であってもよく、水和物および/または溶媒和物の形で存在することもあるので、これらの水和物および/または溶媒和物も「ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩」に包含される。化学量論量の水和物および凍結乾燥のような方法によって得られる種々の量の水を含む化合物も本発明の範囲内にある。ニトロプルシドのナトリウム塩やカリウム塩は、通常2水和物の形で利用される。

【0021】

放射線には、放射性物質から放出される  $\alpha$  線、 $\beta$  線、 $\gamma$  線や人工的に作り出した中性子線、X線、陽子線、炭素線、電子線が含まれ、中でも中性子線は非常に透過性が高いため防護することが難しい。荷電粒子線である  $\alpha$  線、 $\beta$  線などは直接に原子の軌道電子あるいは分子の束縛電子に電氣的な力を及ぼして電離を起こさせる直接電離放射線である。一方、 $\gamma$  線、X線などの電磁波、あるいは電荷をもたない中性子線は原子あるいは原子核との相互作用を介して荷電粒子線を発生させ、二次的に発生した荷電粒子線が電離を引き起こす間接電離放射線である。 $\alpha$  線やX線は、原子の束縛電子との相互作用（光電効果およびコンプトン効果）を介して主に電子線を発生させるのに対して、中性子線は、束縛電子との相互作用は小さく、原子核との相互作用により弾性散乱、非弾性散乱、捕獲および原子核反応を引き起こす。人体は多量の水により構成されているため、 $\alpha$  線やX線を被ばくすると原子との反応で生じた電子が水分子と反応して酸素ラジカルが生じ、発生した酸素ラジカルによってDNAなどの細胞の構成分子に様々な障害が引き起こされる。一方、中性子線を被ばくすると水に含まれる水素原子と直接衝突し、弾き跳ばされた水素の原子核（陽子）が周辺の原子、分子を電離させ、DNAなどの細胞の構成分子に障害をもたらす。この中性子線による電離は、 $\alpha$  線やX線によるものより、その飛跡に沿って密に生じる為

、中性子線被ばくによる影響は、 $\alpha$  線やX線によるものよりも大きいとされている。本発明らは、 $\alpha$  線やX線よりも大きな障害をもたらすとされる中性子線による障害に対し、ニトロプルシドが、X線障害からの防護のために使用される用量よりも低用量で中性子線障害に対して防護効果をもたらすことを見出した。従って、本発明は、低用量のニトロプルシド投与による中性子線障害からの防護をも提供する。ニトロプルシドの効果を維持したまま用量を減ずることができれば、血圧低下等のニトロプルシドの好ましくない副作用のリスクを抑えることができる。

【0022】

本発明における中性子線障害とは、例えば、原発事故や核爆発による全身性の中性子線被ばくに起因する急性および/または晩発性中性子線障害、あるいは癌治療等の医療目的

10

20

30

40

50

での中性子線照射または中性子線被ばく事故等による局所性の中性子線被ばくによる急性および/または晩発性中性子線障害が挙げられるが、これらに限定されない。具体的な障害の例として、DNA損傷、造血・免疫系組織障害、消化器系組織障害、呼吸器系組織障害、中枢神経系組織障害、生殖腺障害および皮膚障害等が挙げられ、より具体的には、クラスターDNA損傷、造血幹細胞障害、造血前駆細胞障害、末梢血血球細胞産生障害、小腸幹細胞障害、腸管細胞産生障害等が挙げられるが、これらに限定されない。末梢血血球細胞産生障害は、造血幹細胞および造血前駆細胞が障害を受けることで末梢血血球細胞が供給されなくなる、または生体が恒常性を維持できなくなる程度にその供給が減少する障害を意味し、腸管細胞産生障害は、小腸幹細胞が障害を受けることで腸管細胞が供給されなくなる、または生体が恒常性を維持できなくなる程度にその供給が減少する障害を意味する。

10

**【0023】**

本明細書中「造血幹細胞」は、血球系細胞への分化の方向付けがされていて、かつ、全ての血球系細胞種へ分化可能な未分化細胞を意味し、「造血前駆細胞」は、造血幹細胞よりは分化が進行しているため全ての血球系細胞種への分化はできないが、依然として終末分化には達しておらず複数種の血球系細胞への分化が可能な細胞を意味する。また、「末梢血血球細胞」には、終末分化した血球細胞が含まれ、さらに本明細書中では、末梢血血球細胞は、終末分化に達していないが1種類の血球細胞へ分化が方向づけられた細胞をも意味する。末梢血血球細胞の具体例としては、リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球および血小板等が挙げられる。特段断りのない限り、本明細書中で「血球系細胞」は、造血・免疫系細胞を含む全ての血球系細胞種を意味する。

20

**【0024】**

本明細書中「細胞障害」は、アポトーシスおよびネクローシス等の細胞死を誘発すること、DNAの変異を誘発することで細胞の本来有する機能を喪失または減退させること、DNAの変異により腫瘍の発生を誘発することを包含する。

**【0025】**

本明細書中、用語「防護」には、中性子線障害の予防および治療が含まれる。該予防には、中性子線被ばく前もしくは中性子線被ばく後であって障害が発症していないときにおける本発明の防護剤の投与により、急性および/または晩発性中性子線障害の症状を顕在化させないこと、または顕在化した場合でもその症状が本発明の防護剤を投与しない場合に比べ緩和されていることが含まれる。また、該治療には、急性および/または晩発性中性子線障害の症状を完全に治癒すること、症状を緩和させること、症状を悪化させないことが含まれる。

30

**【0026】**

所望の効果が得られるのであれば、本発明の防護剤の剤形は特に制限されず、非経口投与もしくは経口投与に適した各種剤形を適宜選択できる。

**【0027】**

非経口投与のための製剤としては、例えば、注射剤、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、坐剤、点眼剤等が挙げられ、好ましくは注射剤である。例えば、注射剤の場合は、塩溶液、ブドウ糖溶液または塩水とブドウ糖溶液の混合物からなる担体等を用いて注射用の溶液を調製する。また、非経口投与に適した製剤は、本発明におけるニトロプルシド、またはその薬理学的に許容される塩の粉末または凍結乾燥品を用時溶解する形であってもよく、必要に応じて賦形剤等を添加して使用することができる。

40

**【0028】**

本発明の防護剤には、有効成分であるニトロプルシドに加えて、医薬上許容される添加物、例えば、緩衝剤、等張化剤、溶解補助剤、防腐剤、粘性基剤、キレート剤、清涼化剤、pH調整剤、抗酸化剤などを適宜選択して添加することができる。

緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、アミノ酸などが挙げられる。

等張化剤としては、ソルビトール、グルコース、マンニトールなどの糖類、グリセリン

50

、プロピレングリコールなどの多価アルコール類、塩化ナトリウムなどの塩類、ホウ酸などが挙げられる。

溶解補助剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート（例えば、ポリソルベート 80）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、チロキサポール、プルロニックなどの非イオン性界面活性剤、グリセリン、マクロゴールなどの多価アルコールなどが挙げられる。

防腐剤としては、例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウムなどの第四級アンモニウム塩類、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチルなどのパラオキシ安息香酸エステル類、ベンジルアルコール、ソルビン酸およびその塩（ナトリウム塩、カリウム塩など）、チメロサル（商品名）、クロロブタノール、デヒドロ酢酸ナトリウムなどが挙げられる。

粘性基剤としては、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコールなどの水溶性高分子、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどのセルロース類などが挙げられる。

キレート剤としては、エデト酸ナトリウム、クエン酸などが挙げられる。

清涼化剤としては、l-メントール、ボルネオール、カンフル、ユーカリ油などが挙げられる。

pH調整剤としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ホウ酸またはその塩（ホウ砂）、塩酸、クエン酸またはその塩（クエン酸ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム等）、リン酸またはその塩（リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム等）、酢酸またはその塩（酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等）、酒石酸またはその塩（酒石酸ナトリウム等）等が挙げられる。

抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム、乾燥亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、濃縮混合トコフェロール等が挙げられる。

#### 【0029】

本発明の防護剤のpHは、通常、約6～約8に調整され、好ましくは、メンブレンフィルター等を用いた濾過滅菌などの滅菌処理を行う。

#### 【0030】

一方、本発明の剤が経口投与のための製剤である場合、例えば、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等に製剤化することができる。これらの製剤は、自体公知の調製法、例えば、第14改正日本薬局方、製剤総則に記載された方法で製造することができ、本発明の防護剤に使用され得る上記医薬上許容される添加物の他、製剤分野において通常用いられる賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、水溶性高分子、塩基性無機塩等を含有していても良い。

#### 【0031】

賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、D-マンニトール、でんぷん、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸、酸化チタン等が挙げられる。

滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール、タルク、ステアリン酸等が挙げられる。

結合剤としては、例えば、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、結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、アラビアゴム末、ゼラチン、プルラン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

崩壊剤としては、（1）クロスポピドン、（2）クロスカルメロースナトリウム（FMC-旭化成）、カルメロースカルシウム（五徳薬品）等スーパー崩壊剤と称される崩壊剤、（3）カルボキシメチルスターチナトリウム（例、松谷化学（株）製）、（4）低置換度ヒドロキシプロピルセルロース（例、信越化学（株）製）、（5）コーンスターチ等が挙げられる。該「クロスポピドン」としては、ポリビニルポリピロリドン（PVPP）、

10

20

30

40

50

1 - ビニル - 2 - ピロリジノンホモポリマーと称されているものも含め、1 - エテニル - 2 - ピロリジノンホモポリマーという化学名を有し架橋されている重合物のいずれであってもよく、具体例としては、コリドンCL (BASF社製)、ポリプラスドンXL (ISP社製)、ポリプラスドンXL - 10 (ISP社製)、ポリプラスドンINF - 10 (ISP社製)等である。

水溶性高分子としては、例えば、エタノール可溶性水溶性高分子〔例えば、ヒドロキシプロピルセルロース(以下、HPCと記載することがある)等のセルロース誘導体、ポリビニルピロリドン等〕、エタノール不溶性水溶性高分子〔例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(以下、HPMCと記載することがある)、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のセルロース誘導体、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、アルギン酸ナトリウム、グアーガム等〕等が挙げられる。

塩基性無機塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウムおよび/またはカルシウムの塩基性無機塩が挙げられる。好ましくはマグネシウムおよび/またはカルシウムの塩基性無機塩である。さらに好ましくはマグネシウムの塩基性無機塩である。該ナトリウムの塩基性無機塩としては、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム等が挙げられる。該カリウムの塩基性無機塩としては、例えば、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム等が挙げられる。該マグネシウムの塩基性無機塩としては、例えば、重質炭酸マグネシウム、炭酸マグネシウム、酸化マグネシウム、水酸化マグネシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、珪酸マグネシウム、アルミン酸マグネシウム、合成ヒドロタルサイト〔 $Mg_6Al_2(OH)_{16} \cdot CO_3 \cdot 4H_2O$ 〕および水酸化アルミナ・マグネシウム、好ましくは、重質炭酸マグネシウム、炭酸マグネシウム、酸化マグネシウム、水酸化マグネシウム等が挙げられる。該カルシウムの塩基性無機塩としては、例えば、沈降炭酸カルシウム、水酸化カルシウム等が挙げられる。

#### 【0032】

本発明の防護剤は、ニトロプルシドとの配合により好ましくない相互作用を生じない限り、他の活性成分、例えば、ビタミン成分、有効アミノ酸以外のアミノ酸成分(例:バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、メチオニン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、ヒスチジン、シトルリン、オルニチン、シスチン、タウリン、グリシン)などをさらに含有していてもよい。そのような他の活性成分としては、自体公知の各種薬剤を適宜使用することができる。

#### 【0033】

なお、本発明におけるニトロプルシド、またはその薬理的に許容される塩として、ニトロプルシドナトリウムを有効成分とする血圧降下剤(注射剤)が、すでに臨床において使用されているので〔ニトロプロ(丸石製薬(株)製)、Nitropress(Abbott(株)製)、Nipride(Roche(株)製)〕、本発明の中性子線障害防護剤として、上記市販製剤をそのまま用いることもできる。

#### 【0034】

本発明の中性子線障害防護剤の投与対象は、哺乳動物であり、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ブタ等が挙げられ、好ましくはヒトである。

#### 【0035】

本発明の防護剤は、中性子線被ばくの直前または直後に投与することが好ましく、具体的には、中性子線被ばくの直前または後60分以内、好ましくは30分以内、より好ましくは15分以内、さらに好ましくは10分以内、特に好ましくは5分以内に投与を開始する。また、中性子線被ばくから1日後以降に更に追加投与をすることが、薬効向上の観点から好ましい。該追加投与は、具体的には、中性子線被ばくから1日後以降且つ10日以内(より好ましくは8日以内、特に好ましくは7日以内)に更に1回以上(例えば1回、好ましくは2回、より好ましくは3回、より好ましくは4回、さらに好ましくは5回、特に好ましくは6回、最も好ましくは7回の追加投与)であることが好ましい。投与と投与の

間隔は、通常0.5日以上(例えば1日)であるが、中性子線被ばくの前または後60分以内の単独投与と比較して中性子線障害防護効果が増強される限りこれに限定されない。

【0036】

例えば、追加投与を中性子線被ばくの翌日に行うことが好ましく、中性子線被ばくの翌日と2日後に行うことがさらに好ましい。また、中性子線被ばくの翌日、もしくは翌日と2日後の追加投与に加えて、中性子線被ばくから6~10日後(好ましくは7日後)に、更に追加投与することが薬効を更に向上させる観点から好ましい。具体的な投与スケジュールの例としては、中性子線被ばくの前または後60分以内、中性子線被ばくから1日後、2日後および7日後の計4回の投与を挙げることができる。

【0037】

他の好ましい態様において、追加投与は、中性子線被ばく翌日から7日後まで、1日1回行うことができる。具体的な投与スケジュールの例として、中性子線被ばくの前または後60分以内、中性子線被ばくから1日後~7日後まで1日1回の計8回の投与を挙げることができる。当該投与スケジュールにおいては、ニトロプルシドの効果を損なわずに用量を減じて投与することが可能であり、ニトロプルシド投与による血圧低下等の好ましくない症状を回避する必要がある場合に好適に採用できる。低用量での1回の投与量は、例えば、5~15 $\mu$ M、好ましくは10 $\mu$ Mが挙げられる。「投与量」の定義は、後述する定義に準じる。

【0038】

なお、上記の追加投与の記載は、それ以外の時期に投与することを排除するものではない。

【0039】

本発明の防護剤の投与量は、その用途、患者の年齢や状態などの条件に応じて適宜選択可能であるが、生体内でのニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩の濃度が、投与直後に5~25 $\mu$ M、好ましくは10~20 $\mu$ Mとなるように、投与することが好ましい。具体的に投与量は、ニトロプルシドが細胞外液に均等分配されると仮定して、平均細胞外液量、ニトロプルシドの分子量(251.95、ニトロプルシドナトリウムを用いる場合は297.95)および上記で設定した生体内でのニトロプルシドの投与直後の濃度から算出することができる。また平均細胞外液量は、細胞外液の比重を1.00として、ヒトの場合は体重(kg) $\times$ 0.2、マウスの場合は体重(kg) $\times$ 0.35から得られる。ただし、血圧降下作用が生じないような低用量が好ましく、1回の投与あたり、ニトロプルシドとして0.6~1.5mg/kg、さらに好ましくは0.8~1.5mg/kg、特に好ましくは1.0~1.2mg/kgである。また、投与制限速度は、0.5~1.5 $\mu$ g/kg/分である。

【0040】

一態様において、本発明は、ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩を含有する、中性子線による血球系細胞障害からの回復促進剤を提供する。以下、当該剤を単に「本発明の回復促進剤」と記載する場合がある。

【0041】

ニトロプルシドまたはその薬理的に許容される塩、中性子線、血球系細胞および細胞障害の定義に関しては、上記に準じる。また、本発明の回復促進剤の剤形、添加物、投与量、投与対象、投与方法等も上記に準じる。

【0042】

本発明における「中性子線による血球系細胞障害からの回復促進」とは、本発明の回復促進剤を投与した場合に、投与しない場合と比べて、中性子線被ばくにより減少した血球系細胞数の回復が速いこと、或いは、本発明の回復促進剤を投与しない場合には中性子線被ばく後の血球系細胞数の回復が全くもしくはほとんど認められない場合でも、本発明の回復促進剤を投与することにより、血球系細胞数の回復が認められることを意味する。当該回復は、血球系細胞数が中性子線被ばく前と同等の血球系細胞数にまで回復すること、および該被ばく前よりは血球系細胞数が少ないが、個体が生存可能なレベルにまで血球系

10

20

30

40

50



細胞数が回復することを意味する。

【0043】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【実施例】

【0044】

(材料および方法)

本実施例で使用したマウス(8週齢の雄のjcl:ICRマウス(日本クレア株式会社))は市販固形飼料を与えてSPF環境下で飼育した。

1. 中性子線照射

無麻酔下でアクリル製照射用容器に12匹ずつマウスを収容し、独立行政法人放射線医学総合研究所に設置されている中性子線照射装置(NASBEE)を用いて、線量率0.02Gy/minで3.5Gy照射することで、マウスへの中性子線照射を行った。マウスは照射後も通常の固形飼料および蒸留水を与えてSPF環境下で飼育した。

2. ニトロプルシドナトリウムの投与

投与法1: 中性子線照射直後、1日後、2日後および7日後に体液量換算で最終濃度が20μMとなるようにニトロプルシドナトリウム(丸石製薬株式会社)を腹腔内投与した。ここで、「体液量換算で最終濃度が20μMとなるようにニトロプルシドナトリウムを投与した」とは、ニトロプルシドナトリウムが細胞外液に均等分配されると仮定して、平均細胞外液量、ニトロプルシドナトリウムの分子量(297.95)および設定した生体内でのニトロプルシドナトリウムの投与直後の濃度(20μM)から投与量を算出し、投与したものである。また、平均細胞外液量は、マウスの細胞外液の比重を1.00とし、マウスの体重(kg)×0.35から求めた。

投与法2: 中性子線照射直後から7日後まで、1日1回、体液量換算で最終濃度が10μMとなるようにニトロプルシドナトリウムを腹腔内投与した。投与量の定義は上記に準じる。

ニトロプルシドナトリウム投与後の血圧低下による体温低下に対しては、42に設定したホットプレート上にマウスを置くことにより対処した。

3. マウスの生存率の解析

中性子線照射日を0日目として、照射後30日までマウスの生存匹数を記録し、中性子線照射後のマウスの生存率を求めた。

4. 骨髄の造血幹細胞の解析

中性子線照射後3~24日目にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、左右の大腿骨を摘出して骨髄細胞を採取し、MethoCult(登録商標)(StemCell Technologies社)を用いて増殖能および分化能をもつ造血幹細胞および造血前駆細胞の数を計測した。

5. 末梢血血球細胞の解析

中性子線照射後3、8および14日目に麻酔下(ペントバルビタール・ナトリウムを使用)において、腋窩より末梢血を200μL採取し、生理食塩水で希釈し、動物用全自動血球計算器(MEK-6458(日本光電工業株式会社))を用いて白血球数、赤血球数、血小板数を測定した(n=4)。

6. 胸骨骨髄、胸腺および脾臓の解析

中性子線照射後3~24日目にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、胸骨、胸腺および脾臓を摘出し、中性ホルマリンで固定後パラフィン剤に包埋して薄切し、スライドグラスに固着後脱パラフィン処理を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で観察し、病理組織学的所見を得た。

(結果)

【0045】

実施例1: 中性子線照射後のニトロプルシドナトリウム投与による生存率の改善

上記投与法1により処理したマウス群において、ニトロプルシドナトリウムを投与した

10

20

30

40

50

が、中性子線照射を行わなかったコントロール群（図1、非照射群/薬剤投与群（ $n = 10$ ））では、30日間で死亡するマウスはなく、ニトロプルシドナトリウムを投与せず中性子線を照射したマウス群（図1、照射群（ $n = 48$ ））では、生存率が41.7%であった。一方、中性子線照射後にニトロプルシドナトリウムを投与した群（図1、照射+薬剤投与群（ $n = 48$ ））では、生存率が70%であった。よって、ニトロプルシドナトリウムは、中性子線照射後の生存率を改善させる効果があることが示された。尚、図中SNPはニトロプルシドナトリウムを意味する。

また、上記投与法2により処理したマウス群において、ニトロプルシドを投与せず中性子線を照射したマウス群の生存率は40%であり、中性子線照射後にニトロプルシドナトリウムを投与した群では生存率が70%であることを確認した。

#### 【0046】

実施例2：中性子線照射後のニトロプルシドナトリウム投与による、造血幹細胞および造血前駆細胞（以下、併せて「造血幹細胞等」と略記する場合がある）の数の回復促進

中性子線照射もニトロプルシド投与も行わなかったマウス群（図2、非照射群（各定量毎に $n = 4$ ））およびニトロプルシドの投与は行ったが中性子線照射を行わなかったマウス群（図2、薬剤投与群（各定量毎に $n = 4$ ））では、造血幹細胞等の数はほぼ一定で、解析期間を通して、 $1 \times 10^5$ 個の骨髓細胞あたり、非照射群では $2.6 \pm 0.3 \times 10^2$ 個の造血幹細胞等が、薬剤投与群では $2.6 \pm 0.1 \times 10^2$ 個の造血幹細胞等が認められた。中性子線照射を行いニトロプルシドの投与を行わなかったマウス群（図2、照射群（各定量毎に $n = 4$ ））では、造血幹細胞等が照射後14日目までは検出限界未満で、照射後15日目からわずかな回復が認められ、照射後24日目においても造血幹細胞等の数は $1 \times 10^5$ 個の骨髓細胞あたり $2.0 \pm 0.4 \times 10^1$ 個であった。一方で、中性子線照射後にニトロプルシドの投与を行ったマウス群（図2、照射+薬剤投与群（各定量毎に $n = 4$ ））では、造血幹細胞等が照射後8日目に $1 \times 10^5$ 個の骨髓細胞あたり $2.5 \pm 2.3 \times 10^0$ 個認められ、漸次増加し、照射後24日目には $1 \times 10^5$ 個の骨髓細胞あたり $2.5 \pm 0.2 \times 10^2$ 個認められた。即ち、ニトロプルシドの投与により、中性子線被ばくで減少した造血幹細胞等の数の回復が促進することが示された。

#### 【0047】

実施例3：中性子線照射後のニトロプルシドナトリウム投与による、末梢血白血球細胞数の回復促進

中性子線照射を行わなかったマウスの末梢血中の白血球数は $32.0 \pm 10.5 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{L}$ であった。

中性子線照射を行い、ニトロプルシドナトリウム投与を行わなかったマウス群（図3、照射のみ群（各定量毎に $n = 4$ ））の末梢血においては、白血球数は、照射後3日目で $0.9 \pm 0.1 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{L}$ 、照射後8日目で $0.8 \pm 0.1 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{L}$ 、照射後14日目で $1.8 \pm 0.2 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{L}$ であった。これらの結果より、中性子線照射により末梢血白血球産生障害が起きていることが示された。

一方、中性子線照射後にニトロプルシドナトリウム投与を行ったマウス群（図3、照射+薬剤投与群（各定量毎に $n = 4$ ））の末梢血においては、白血球数は、照射後3日目で $1.1 \pm 0.1 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{L}$ 、照射後8日目で $0.9 \pm 0.1 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{L}$ 、照射後14日目で $3.3 \pm 0.5 \times 10^2$ 個/ $\mu\text{L}$ であった。これらの結果から、中性子線照射による白血球産生障害が、ニトロプルシドナトリウムの投与により顕著に回復することが示された。

さらに、血小板についての解析を行った。中性子線照射を行わなかったマウスの末梢血中の血小板数は $14.4 \pm 1.2 \times 10^5$ 個/ $\mu\text{L}$ であった（図4、正常値）。

中性子線照射を行い、ニトロプルシドナトリウム投与を行わなかったマウス群（図4、照射のみ群（各定量毎に $n = 4$ ））の末梢血においては、血小板数は、照射後3日目で $6.8 \pm 0.3 \times 10^5$ 個/ $\mu\text{L}$ 、照射後8日目で $0.2 \pm 0.01 \times 10^5$ 個/ $\mu\text{L}$ 、照射後14日目で $0.2 \pm 0.02 \times 10^5$ 個/ $\mu\text{L}$ であった。これらの結果から、中性子線照射により末梢血血小板産生障害が起きていることが示された。

10

20

30

40

50

一方、中性子線照射後にニトロプルシドナトリウム投与を行ったマウス群（図4、照射 + 薬剤投与群（各定量毎に  $n = 4$ ））の末梢血においては、血小板数は、照射後3日目で  $8.3 \pm 0.3 \times 10^5$  個/ $\mu\text{L}$ 、照射後8日目で  $0.2 \pm 0.04 \times 10^5$  個/ $\mu\text{L}$ 、照射後14日目で  $0.5 \pm 0.06 \times 10^5$  個/ $\mu\text{L}$ であった。これらの結果から、中性子線照射による血小板産生障害が、ニトロプルシドナトリウムの投与により照射後14日にわずかに回復することが示された。

#### 【0048】

実施例4：中性子線照射後のニトロプルシドナトリウム投与による、胸骨骨髓細胞、胸腺皮質の細胞および白脾髄の細胞の回復促進

胸骨骨髓細胞、胸腺皮質の細胞および白脾髄の細胞の中性子線障害に対するニトロプルシドナトリウムの影響を調べた。胸骨骨髓には造血幹細胞が存在する。胸腺皮質には免疫系の幹細胞が分布し、これらが分化してT細胞となり髄質へ移行する。白脾髄では、B細胞、T細胞および形質細胞などの免疫系細胞の活性化が行われる。

図5から明らかのように、中性子線照射を行っていないマウス（図5、未処理）における胸骨骨髓細胞、胸腺皮質の細胞および白脾髄の細胞に比べ、中性子線照射後14日目のマウス（図5、中性子線（ $3.5\text{ Gy}$ ）照射）では、これらの細胞が大きく障害を受けていることが示された。

一方、中性子線照射後にニトロプルシドナトリウム投与を行ったマウス（図5、中性子線（ $3.5\text{ Gy}$ ）照射 + SNP）では、胸骨骨髓細胞、胸腺皮質の細胞および白脾髄の細胞が未処理のものと同程度にまで回復していることが確認された。

よって、中性子線照射による血球系細胞障害が、ニトロプルシドナトリウムの投与により顕著に回復することが病理組織学的にも示された。

#### 【産業上の利用可能性】

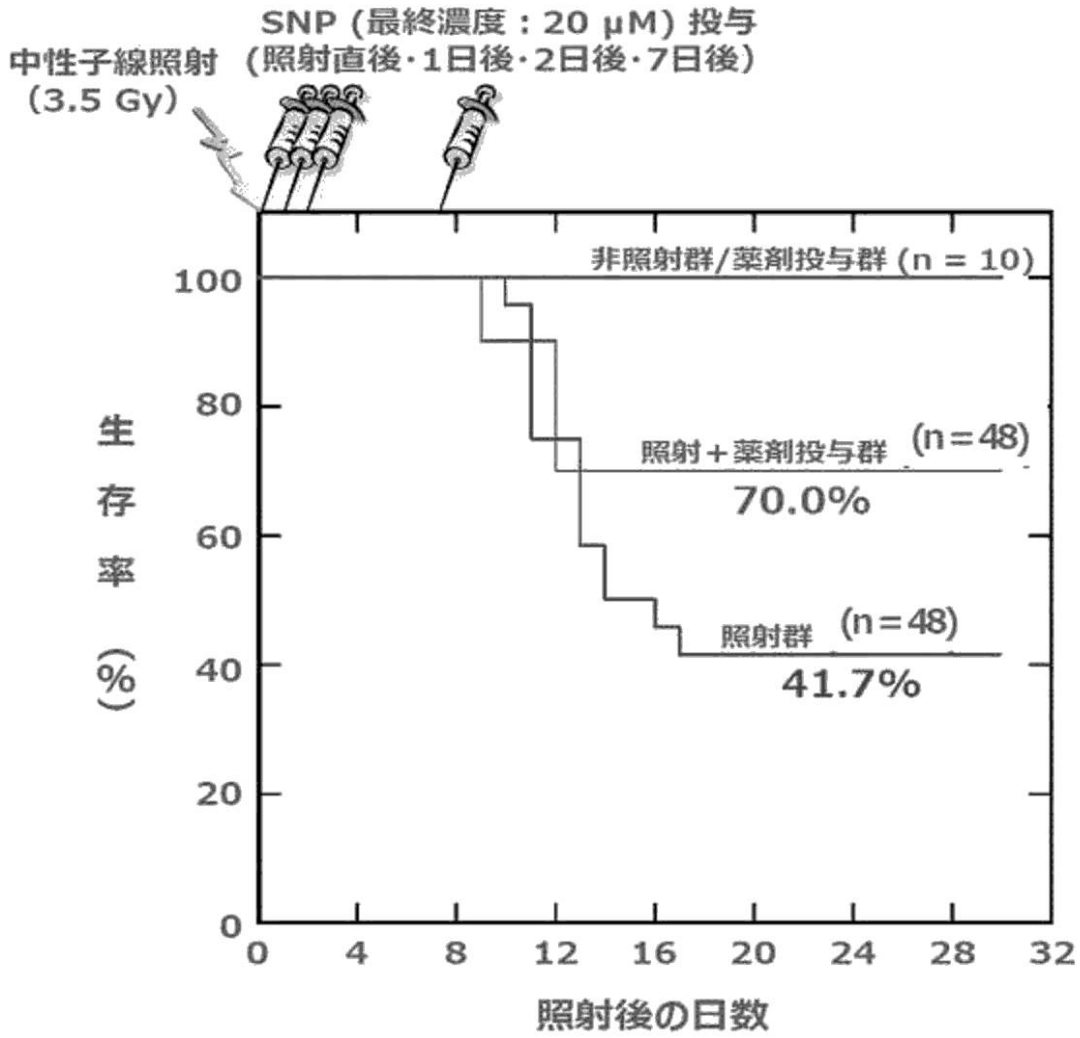
#### 【0049】

本発明によれば、透過性が非常に高いため防護することが難しく、被ばくによる影響が大きい中性子線による障害から生体を効果的に防護することができる。具体的には、造血幹細胞および末梢血血球細胞が担う免疫機能等の回復促進効果、延命効果および生存率の向上等の効果が得られ、中性子線障害を効果的に予防および治療することができる。

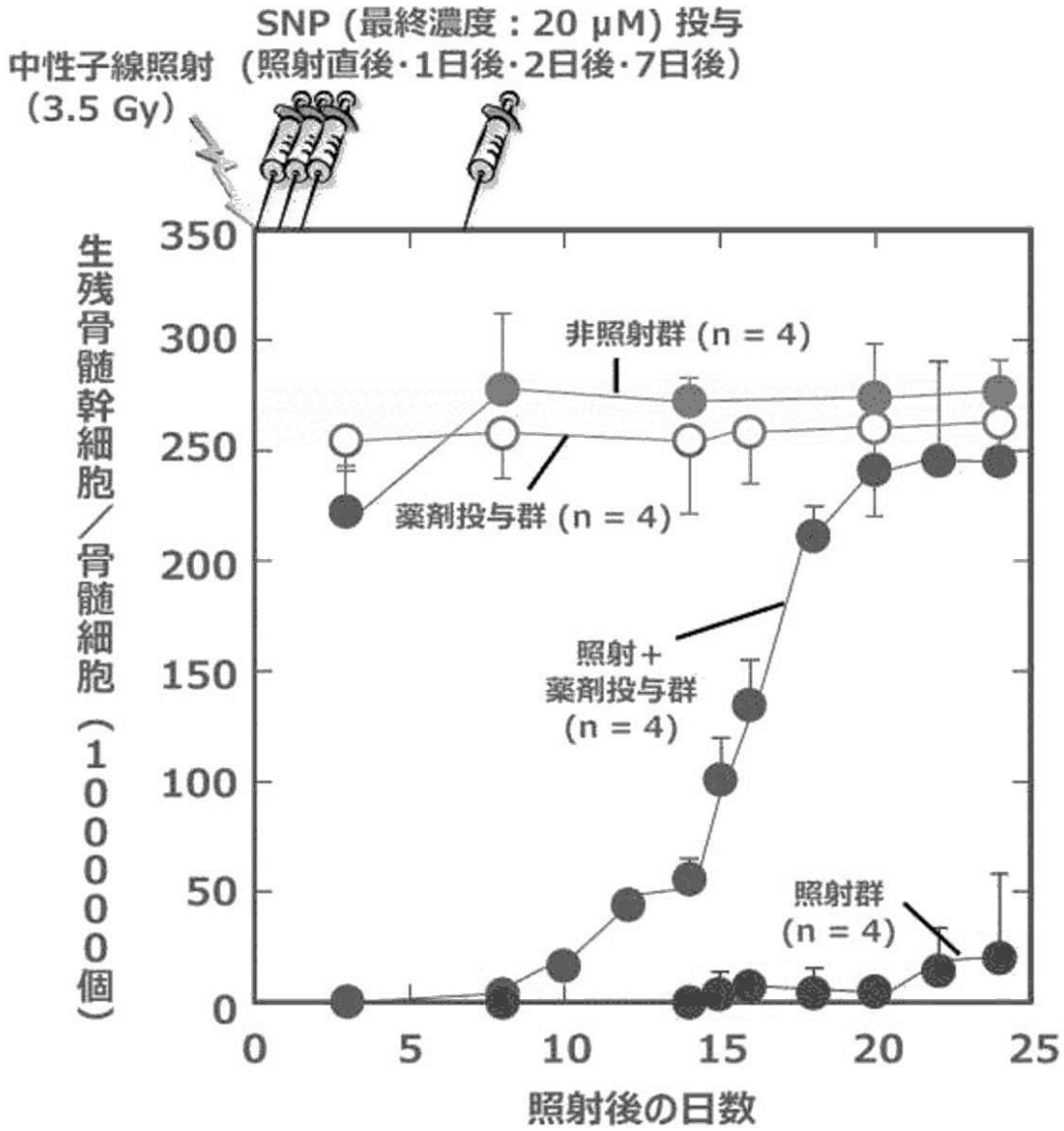
10

20

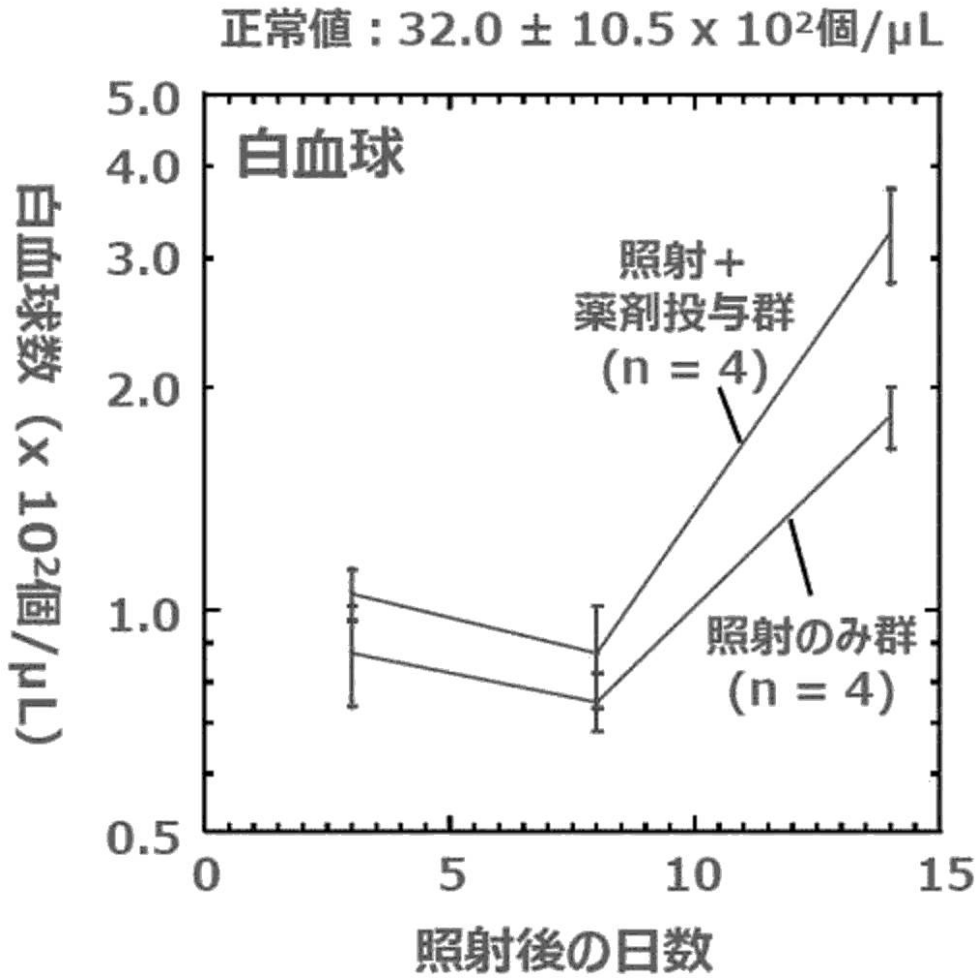
【図1】



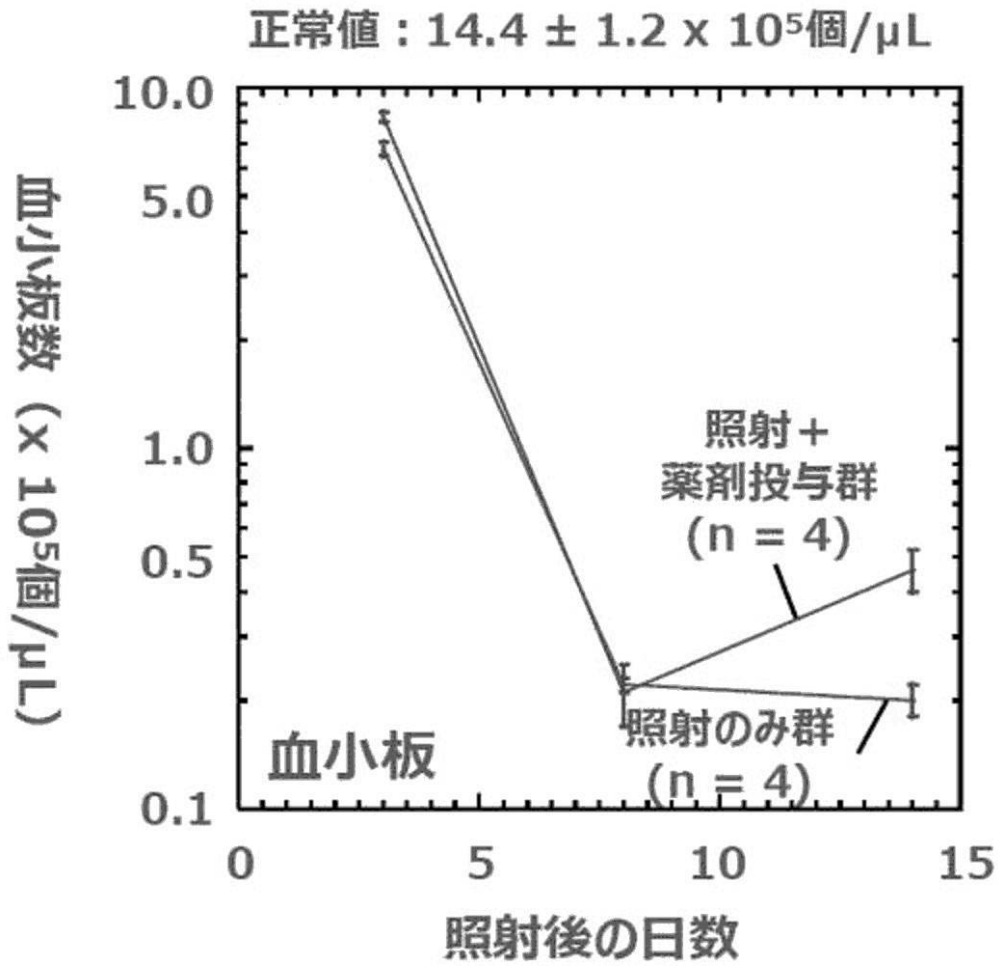
【図 2】



【 図 3 】

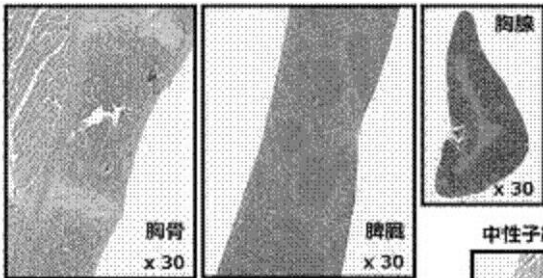


【 図 4 】

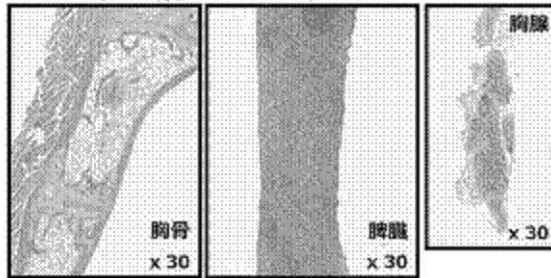


【 図 5 】

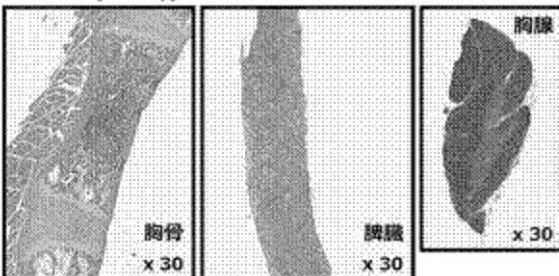
未処理



中性子線(3.5 Gy)照射 (照射後14日目)



中性子線(3.5 Gy)照射+SNP (照射後14日目)



---

フロントページの続き

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 松本 英樹

福井県吉田郡永平寺町松岡下合月2 3号3番地 国立大学法人福井大学内

(72)発明者 上野 涉

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 鶴岡 千鶴

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

(72)発明者 柿沼 志津子

千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目9番1号 独立行政法人放射線医学総合研究所内

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 HA11 MA01 MA04 NA14 ZA51 ZC37