

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5069000号  
(P5069000)

(45) 発行日 平成24年11月7日(2012.11.7)

(24) 登録日 平成24年8月24日(2012.8.24)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z

請求項の数 29 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-528743 (P2006-528743)	(73) 特許権者 304026386 関山 敦生 大阪府吹田市江坂町4丁目32-1
(86) (22) 出願日 平成17年6月29日(2005.6.29)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2005/011933	(74) 代理人 100080791 弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号 W02006/003927	(74) 代理人 100117743 弁理士 村田 美由紀
(87) 国際公開日 平成18年1月12日(2006.1.12)	(72) 発明者 関山 敦生 大阪府吹田市江坂町4丁目32番1号
審査請求日 平成20年6月26日(2008.6.26)	審査官 加々美 一恵
(31) 優先権主張番号 特願2004-193712 (P2004-193712)	
(32) 優先日 平成16年6月30日(2004.6.30)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2005-23978 (P2005-23978)	
(32) 優先日 平成17年1月31日(2005.1.31)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非炎症性ストレス応答の指標剤およびその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

副腎におけるスーパーオキシドが介在する非炎症性ストレス応答の指標剤であって、IL-18とさらにP38MAPキナーゼを含有してなる指標剤。

【請求項2】

前記IL-18が血中に存在する活性型IL-18である請求項1に記載の指標剤。

【請求項3】

前記P38MAPキナーゼがリン酸化されたものである請求項1または2に記載の指標剤。

【請求項4】

前記P38MAPキナーゼがマウス由来であり、当該キナーゼのリン酸化部位がThr180またはTyr182である請求項3に記載の指標剤。

【請求項5】

前記P38MAPキナーゼがヒト由来であり、当該キナーゼのリン酸化部位がThr185またはTyr187である請求項3に記載の指標剤。

【請求項6】

さらにカスパーゼ-11を含有してなる請求項1~5いずれか1項に記載の指標剤。

【請求項7】

さらにカスパーゼ-1を含有してなる請求項1~6いずれか1項に記載の指標剤。

【請求項8】

前記カスパーゼ - 1 が活性化カスパーゼ - 1 である請求項 7 に記載の指標剤。

【請求項 9】

前記非炎症性ストレスが精神的ストレスである請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項 に記載の指標剤。

【請求項 10】

前記精神的ストレスが拘束ストレスである請求項 9 に記載の指標剤。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 いずれか 1 項 に記載の指標剤を検出するための副腎における非炎症性ストレス応答の可視化剤であって、少なくとも IL - 18 抗体を含有する可視化剤。

【請求項 12】

IL - 18 抗体および P 3 8 M A P キナーゼ抗体を含有する請求項 11 に記載の可視化剤。

10

【請求項 13】

前記 IL - 18 抗体が活性型 IL - 18 を特異的に認識するものである、請求項 12 に記載の可視化剤。

【請求項 14】

前記 P 3 8 M A P キナーゼ抗体が抗リン酸化 P 3 8 M A P キナーゼ抗体である請求項 12 に記載の可視化剤。

【請求項 15】

前記抗リン酸化 P 3 8 M A P キナーゼ抗体がリン酸化 Thr180 もしくは Tyr182 を有する P 3 8 M A P キナーゼ、またはリン酸化 Thr185 もしくは Tyr187 を有する P 3 8 M A P キナーゼを認識するものである請求項 14 に記載の可視化剤。

20

【請求項 16】

さらにカスパーゼ - 1 1 抗体を含有する請求項 11 ~ 15 いずれか 1 項 に記載の可視化剤。

【請求項 17】

さらにカスパーゼ - 1 抗体またはカスパーゼ - 1 の基質を含有する請求項 11 ~ 16 いずれか 1 項 に記載の可視化剤。

【請求項 18】

前記カスパーゼ - 1 抗体が活性化カスパーゼ - 1 を特異的に認識するものである、請求項 17 に記載の可視化剤。

30

【請求項 19】

請求項 1 ~ 10 いずれか 1 項 に記載の指標剤の量または活性を測定することを特徴とする非炎症性ストレスの程度を測定する方法。

【請求項 20】

前記非炎症性ストレスが精神的ストレスである請求項 19 に記載の測定方法。

【請求項 21】

前記精神的ストレスが拘束ストレスである請求項 20 に記載の測定方法。

【請求項 22】

請求項 11 ~ 18 いずれか 1 項 に記載の可視化剤を用いることを特徴とする、請求項 19 ~ 21 いずれか 1 項 に記載の測定方法。

40

【請求項 23】

請求項 11 ~ 18 いずれか 1 項 に記載の可視化剤を、ヒトを除く動物に適用することを特徴とする、非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態の変動を予防、改善または予想する方法。

【請求項 24】

前記動物がヒトを除く脊椎動物である請求項 23 に記載の予防、改善または予想方法。

【請求項 25】

請求項 11 ~ 18 いずれか 1 項 に記載の可視化剤を含む非炎症性ストレスの測定キット。

【請求項 26】

50

請求項 1 ~ 10 いずれか 1 項に記載の指標剤の量または活性を低減させるための、非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態変動の治療剤であって、下記からなる群より選ばれる治療剤：

IL - 18抗体および抗IL - 18受容体抗体。

【請求項 27】

前記有効成分がIL - 18抗体であり、当該IL - 18抗体が活性型IL - 18に特異的に結合するものである請求項 26 に記載の治療剤。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 10 いずれか 1 項に記載の指標剤の量または活性を測定することを特徴とする、精神的ストレスにより発症、悪化若しくは再発する疾患に対する治療効果、改善効果若しくは予防効果を有する物質をスクリーニングする方法。

10

【請求項 29】

請求項 1 ~ 10 いずれか 1 項に記載の指標剤の量または活性を測定することを特徴とする、酸化ストレスに対する抑制効果若しくは防止効果を有する物質をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非炎症性ストレス応答の指標剤およびその利用に関するものである。詳しくは、分子生物学的にストレスを解明してメンタルヘルス分野の科学的発展に寄与するものである。

20

【背景技術】

【0002】

精神的および/または肉体的ストレスは、神経、内分泌および免疫系を含む宿主の防御に影響を及ぼす（非特許文献1および2を参照）。種々のサイトカイン（例えば、IL - 1、IL - 6、TNF - など）は、ストレスによってアップレギュレートする（非特許文献1および3を参照）。このことは、サイトカインが宿主防御の妨害に関与している可能性を示唆する（非特許文献4を参照）。しかしながら、ストレスが宿主防御を損なうサイトカインを誘導する分子機構は、十分に理解されていない。

【0003】

30

インターロイキン - 18 (IL - 18) は、インターフェロン - (IFN - ) 誘導因子として発見されたサイトカインである（非特許文献5および特許文献1を参照）。IL - 18 は、 Fas リガンドの誘導、T細胞の細胞溶解活性の上昇（非特許文献6を参照）ならびにIL - 4 およびIL - 13 の産生（非特許文献7を参照）を初めとする多彩な生物活性を有する（非特許文献8を参照）。IL - 18 は、Toll - like レセプター - 2 を活性化させ（非特許文献9を参照）、骨髄分化タンパク質 (Myd) - 88 を活性化させる（非特許文献10を参照）。これらの活性化はIL - 6 の誘導に必要である（非特許文献11を参照）。したがって、IL - 18 は、Th1 およびTh2 両サイトカインの産生に関与している（非特許文献12を参照）。

【0004】

40

IL - 18 は、24 kD の前駆体タンパク質として産生され、IL - 1 変換酵素 (ICE、またはカスパーゼ - 1 とともいう) により、18 kD の成熟活性型にプロセッシングされる（非特許文献13を参照）。カスパーゼ - 1 は、不活性型前駆体タンパク質プロカスパーゼ - 1 として誘導され、カスパーゼ - 1 1 によって活性化される（非特許文献14を参照）。カスパーゼ - 1 1 mRNA の発現は、NF - B のトランス活性化を必要とし（非特許文献15を参照）、この活性化はP38MAPキナーゼが媒介することが報告されている（非特許文献16を参照）。カスパーゼ - 1 1 mRNA のLPS (リポポリサッカリド) による誘導ならびにその後のカスパーゼ - 1 の活性化は、神経膠腫細胞株C6において、P38MAPキナーゼ阻害剤であるSB203580により抑制されることが報告されている（非特許文献17を参照）。

50

## 【 0 0 0 5 】

最近の研究では、IL-18 mRNAは副腎において副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）および寒冷ストレスに反応して発現することが報告されている（非特許文献18を参照）。また、副腎と免疫細胞とではIL-18 mRNAについては異なるプロモーターを使用していることが報告されている（非特許文献19を参照）。しかしながら、成熟型のIL-18の誘導は、前記両研究では示されていない。他方、精神医学的患者において、血漿中のIL-18の上昇が報告されている（非特許文献20を参照）。

## 【 0 0 0 6 】

現代社会においては、ヒトは様々なストレスに曝されて労働し、生活している。一般に、ストレスの感じ方には個人差があり、ストレスの有無や強弱について明確な指標がなかった。これまでの研究では、ストレスがIL-18などのサイトカインの上昇を招いているのかどうか、ならびにIL-18がストレスにより誘導される宿主防御の障害に役割を果たしているのかどうかは明らかにされていない。

【特許文献1】特開平8-193098号公報

【非特許文献1】Dugue, B. et al. Scand. J. Clin. Invest. 53, 555-561 (1993)

【非特許文献2】Kiecolt-Glaser, J. K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3043-3047 (1996)

【非特許文献3】Endocrinology 133, 2523-2530 (1993) 20

【非特許文献4】Schubert, C. et al. Psychosom. Med. 61, 876-882 (1999)

【非特許文献5】Zhou, D. et al. Nature 378, 88-91 (1995)

【非特許文献6】Nakanishi, K. et al. Annu. Rev. Immunol. 19, 423-474 (2001)

【非特許文献7】Hoshino, T. et al. J. Immunol. 162, 5070-5077 (1999)

【非特許文献8】Dinarello, C. A. et al. J. Leukoc. Biol. 63, 658-664 (1998) 30

【非特許文献9】Blease, K. et al. Inflamm. Res. 50, 552-560 (2001)

【非特許文献10】Adachi, O. et al. Immunity 9, 143-150 (1998)

【非特許文献11】Takeuchi, O. et al. J. Immunol. 165, 5392-5396 (2000)

【非特許文献12】Hoshino, T. et al. J. Immunol. 166, 7014-7018 (2001)

【非特許文献13】Gu, Y. et al. Science 275, 206-209 (1997) 40

【非特許文献14】Wang, S. et al. Cell 92, 501-509 (1998)

【非特許文献15】Schauvliege, R. et al. J. Biol. Chem. 277, 41624-41630 (2002)

【非特許文献16】Vanden Berghe, W. et al. J. Biol. Chem. 273, 3285-3290 (1998)

【非特許文献17】Hur, J. et al. FEBS Lett. 507, 157-162 (2001)

【非特許文献18】Conti, B. et al. J. Biol. Chem. 50

272, 2035-2037 (1997)

【非特許文献19】Suganuma, S. et al. J. Immunol. 165, 6287-6292 (2000)

【非特許文献20】Kokai, M. et al. J. Immunother. 25, 68-71 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、ストレスに曝された生体内の事象を分子生物学的に可視化し、定量的に検出できる系を提供することにある。本発明の別の目的は、ストレスによる身体障害を管理回避可能な手段を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、拘束ストレスを受けたマウスにおけるサイトカインの発現を調べるに際し、IL-18前駆体タンパク質のプロセッシングと血漿中への成熟型IL-18の放出に焦点を定めて研究を進めていったところ、ストレスによりIL-18を活性化させる生体内のカスケードが誘導されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本発明は、

[1] スーパーオキシドが介在する非炎症性ストレス応答の指標剤であって、非炎症性ストレスカスケードに関与する成分を含有してなる指標剤、

20

[2] 前記非炎症性ストレスカスケードに関与する成分が、IL-18、活性型IL-18、P38MAPキナーゼ、リン酸化P38MAPキナーゼ、カスパーゼ11、カスパーゼ1、活性化カスパーゼ1からなる群から選択される1または2以上のタンパク質を含有することを特徴とする上記[1]記載の指標剤、

[3] 前記非炎症性ストレスカスケードに関与する成分が、IL-18である上記[1]記載の指標剤、

[4] 前記IL-18が血中に存在する活性型IL-18である上記[3]に記載の指標剤、

[5] さらにP38MAPキナーゼを含有してなる上記[3]または[4]に記載の指標剤、

30

[6] 前記P38MAPキナーゼがリン酸化されたものである上記[5]に記載の指標剤、

[7] 前記P38MAPキナーゼがマウス由来であり、当該キナーゼのリン酸化部位がThr180またはTyr182である上記[6]に記載の指標剤、

[8] 前記P38MAPキナーゼがヒト由来であり、当該キナーゼのリン酸化部位がThr185またはTyr187である上記[6]に記載の指標剤、

[9] さらにカスパーゼ-11を含有してなる上記[3]～[8]いずれかに記載の指標剤、

[10] さらにカスパーゼ-1を含有してなる上記[3]～[9]いずれかに記載の指標剤、

40

[11] 前記カスパーゼ-1が活性化カスパーゼ-1である上記[10]に記載の指標剤、

[12] 前記非炎症性ストレスが精神的ストレスである上記[3]～[11]いずれかに記載の指標剤、

[13] 前記精神的ストレスが拘束ストレスである上記[12]に記載の指標剤、

[14] 上記[1]～[13]いずれかに記載の指標剤を検出するための非炎症性ストレス応答の可視化剤、

[15] IL-18抗体を含有する上記[14]に記載の可視化剤、

[16] 前記IL-18抗体が活性型IL-18を特異的に認識するものである、上記[

50

- 15]に記載の可視化剤、
- [17]さらにP38MAPキナーゼ抗体を含有する上記[15]または[16]に記載の可視化剤、
- [18]前記P38MAPキナーゼ抗体が抗リン酸化P38MAPキナーゼ抗体である上記[17]に記載の可視化剤、
- [19]前記抗リン酸化P38MAPキナーゼ抗体がリン酸化Thr180もしくはTy r 182を有するP38MAPキナーゼ、またはリン酸化Thr185もしくはTy r 187を有するP38MAPキナーゼを認識するものである上記[18]に記載の可視化剤、
- [20]さらにカスパーゼ-11抗体を含有する上記[15]~[19]いずれかに記載の可視化剤、 10
- [21]さらにカスパーゼ-1抗体またはカスパーゼ-1の基質を含有する上記[15]~[20]いずれかに記載の可視化剤、
- [22]前記カスパーゼ-1抗体が活性化カスパーゼ-1を特異的に認識するものである、上記[21]に記載の可視化剤、
- [23]上記[1]~[13]いずれかに記載の指標剤の量または活性を測定することを特徴とする非炎症性ストレスの程度を測定する方法、
- [24]指標剤が、IL-18または活性型IL-18である上記[23]記載の方法。
- [25]上記[14]~[22]いずれかに記載の可視化剤を用いることを特徴とする上記[23]または[24]に記載の方法、 20
- [26]前記非炎症性ストレスが精神的ストレスである上記[23]~[25]のいずれかに記載の方法、
- [27]前記精神的ストレスが拘束ストレスである上記[26]に記載の方法、
- [28]上記[14]~[22]いずれかに記載の可視化剤を含む非炎症性ストレスの測定キット。
- [29]前記可視化剤がIL-18抗体を含有する上記[28]記載のキット、
- [30]前記IL-18抗体が活性型IL-18を認識するものである上記[29]記載のキット、
- [31]上記[14]~[22]いずれかに記載の可視化剤を動物に適用することを特徴とする、非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態の変動を予防、改善または予想する方法 30
- [32]前記動物がヒトを除く脊椎動物である上記[31]に記載の予防、改善または予想方法、
- [33]上記[1]~[13]いずれかに記載の指標剤の量または活性を低減させるための非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態変動の治療剤、
- [34]前記治療剤の有効成分がIL-18抗体または抗IL-18受容体抗体である上記[33]に記載の治療剤、
- [35]前記有効成分がIL-18抗体であり、当該IL-18抗体が活性型IL-18に特異的に結合するものである[34]に記載の治療剤、
- [36]前記治療剤の有効成分がスーパーオキシドジムスターゼまたはビタミンEである 40
- [37]上記[1]~[13]いずれかに記載の指標剤の量または活性を測定することを特徴とする、非炎症性ストレスにより発症、悪化若しくは再発する疾患に対する治療効果、改善効果若しくは予防効果を有する物質をスクリーニングする方法、
- [38]前記指標剤が、IL-18または活性型IL-18である上記[37]記載の方法。
- [39]前記疾患が、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、気管支喘息、乾癬、脳虚血、脳変性、脳炎、関節リウマチ、月経異常、子宮内膜症または性欲低下である上記[37]または[38]記載の方法、
- [40]上記[1]~[13]いずれかに記載の指標剤の量または活性を測定することを 50

特徴とする、酸化ストレスに対する抑制効果若しくは防止効果を有する物質をスクリーニングする方法、  
に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明の指標剤によれば、IL-18成分、および非炎症性ストレスにより発生したスーパーオキシドが介在するP38MAPキナーゼを開始点とするカスケード（以下、ストレスカスケードと称する）レベルが明らかになり、個々の生体が受ける非炎症性ストレスの程度のみならず、宿主防御崩壊の危険を評価または予測する指標として役立つ。

【0011】

また、本発明の指標剤によれば、ストレスカスケードに関与する成分を含むことから、これらの成分および活性を減少させる物質のスクリーニングに利用することができ、かかる物質を有効成分とする医薬品ならびに保健機能食品（特定保健用食品および栄養機能食品）の開発に役立つ。

【0012】

本発明の可視化剤によれば、IL-18およびストレスカスケードのレベルを定量することができ、制御が困難であった非炎症性ストレスを制御する途を開くことができる。

【0013】

本発明の非炎症性ストレスの程度を測定する方法によれば、個々の生体が受けるストレスの程度を容易に定量することが可能であり、特に労働者のメンタルヘルスに配慮した対策を講じるために有用である。

【0014】

本発明の非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態の変動を予防、改善または予想する方法によれば、家畜または愛玩動物等の動物に適用することによって、人工的に飼育することがストレスを負荷することにつながりやすい畜産またはペット産業の分野において、動物の免疫状態を良好に維持し、病気に罹りにくい動物を飼育できるという効果を発揮する。

【0015】

本発明の免疫状態変動の治療剤によれば、非炎症性ストレスにより発症、悪化または再発する疾患の治療に役立つ。

【0016】

ケラチノサイトは、表皮を形成しているので、IL-18の放出は皮膚の炎症と免疫に重大な影響を与えると考えられる。実際に、本発明者はIL-18を発現しないマウスでは紫外線による炎症、免疫低下が乏しく、また皮膚硬化と肥厚が起きないことを確認している。よって、本発明の治療剤によれば、IL-18の放出、ひいては皮膚の炎症、免疫変動、分化・増殖の調節異常を防ぐことができる。これは全くの新概念であり、紫外線などによる皮膚障害、また、IL-18が関与することが推測されているアトピー性皮膚炎、乾癬、尋常性挫創、天疱瘡、魚鱗癬、光線過敏症のほか、皮膚における炎症性変化を病態に含む熱傷、放射線皮膚障害、創傷治癒などに対しても、本発明の治療剤が有効である。さらに本発明の可視化剤を用いることが病態の解明、創薬開発、治療モデル開発に役立つ。

【0017】

マイクログリアやアストロサイトは中枢神経系に分布し、神経細胞の生存や中枢神経系における炎症や生体防御システムの中核をになっている。IL-18は、急性に作用した場合炎症を引き起こすなどの効果を持つので、これによりマイクログリアやアストロサイトが関与する脳の炎症、神経細胞の脱落、脳機能異常に対して本発明の治療剤が適用可能である。たとえば、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆、びまん性レビー小体病、ピック病、ピンスワンガー病、パーキンソン氏病、パーキンソン症候群、脳虚血、脳虚血・再還流性障害、一酸化炭素中毒、シンナー中毒、新生児出血性脳症、低酸素脳症、高血圧性脳症、てんかん、多発性硬化症、HIV脳症、脳循環障害、脳血管障害などの疾

10

20

30

40

50

患に対して適用可能である。また、アストロサイトやマイクログリアは視床下部・下垂体などの内分泌関連箇所においても存在し、神経内分泌の制御に関与しているので、日リズム異常、食欲異常、アジソン病や末端肥大症や性腺発達障害などの下垂体機能異常症、甲状腺機能異常症、肥満、血糖制御異常、二次的には原発性アルドステロン症、クッシング病などの副腎機能異常症、さらに消化管運動の制御や骨形成の異常などに対してもそれらグリア細胞からのIL-18は関与しており、本発明の治療剤によって、非炎症ストレスによって上記の疾患や機能異常症が発症悪化するプロセスを回避制御できる。

【0018】

マクロファージは生体のいたるところに存在し、血管中から組織中に遊走するなどして生体防御反応・炎症の制御の中心的役割をになっている。本発明の治療剤によれば、非炎症ストレスが関与してマクロファージ、IL-18が介在するあらゆる炎症性疾患と自己免疫性疾患、生体防御系の調節異常を回避制御できる。

10

【0019】

滑膜細胞は関節包を形成し、特に関節リウマチにおいては滑膜細胞とマクロファージが関与した炎症が病態の中核をなすことが知られている。また、関節炎などによって滑膜細胞において炎症が発生した場合は、肥厚変形によって関節機能の障害や可動域制限が生じる。これらの現象にはサイトカインの関与が示唆されていたが、サイトカイン放出カスケードの下流にあるサイトカインを制御することでは炎症の制御に限界があり、リバウンドによる炎症の激化などが問題であった。本発明の治療剤によれば、マクロファージに加えて滑膜組織からのIL-18の放出を抑制回避でき、それに続くサイトカインの放出や炎症機転を制御できる。これにより、関節リウマチや痛風や関節炎などの関節の炎症を病態の中核とする疾患が寒冷や精神的ストレス、睡眠不足や血流障害、物理的重量の負荷などの非炎症性ストレスによって発症・再発・増悪することを、本発明の可視化剤・指標剤を制御することで回避制御できる。

20

【0020】

腎尿細管上皮細胞は体液調節において重要な役割を持ち、その局所における障害は腎不全、体液調節の異常、カリウム・ナトリウム・塩素イオンのバランスの崩壊、浮腫、糖尿病などの耐糖能障害、るいそう、痙攣、心不全、肺水腫、低蛋白血症、出血傾向などを招く。本発明の治療剤によれば、感染や毒物、腎尿細管を傷害するシスプラチン・カルボプラチンなどの抗ガン剤によって、あるいは特発性の機序をもって腎尿細管上皮細胞の脱落、炎症を病態の中核とする疾患の発症増悪を回避制御できる。

30

【0021】

また、血中IL-18の上昇が、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体刺激ホルモン(LH)の血中レベルの変動を惹き起こすことから、本発明の治療剤によって、血中IL-18の放出をコントロールすることにより、月経異常、子宮内膜症、性欲低下などの下垂体機能異常に起因する疾患が寒冷や精神的ストレス、睡眠不足や血流障害、物理的重量の負荷などの非炎症性ストレスによって発症・再発・増悪することを、本発明の可視化剤・指標剤を制御することで回避制御できる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1A】拘束ストレスによりアップレギュレートされる血漿中IL-18およびACTHレベルを示す図である。

40

【図1B】拘束ストレスによりアップレギュレートされる血漿中IL-18レベルが抗ACTH抗体またはデキサメタゾンにより抑制されることを示す図である。

【図1C】拘束ストレスによりアップレギュレートされる副腎中IL-18が抗ACTH抗体またはデキサメタゾンにより抑制されることを示す図である。

【図1D】ACTHを投与した後の血漿中IL-18と拘束ストレス負荷後の血漿中IL-18とを比較した図である。

【図1E】ACTHを投与した後の副腎中IL-18と拘束ストレス負荷後の副腎中IL-18とを比較した図である。

50

【図 1 F】副腎（レーン 1 - 3）および血漿（レーン 4 - 6）中の I L - 1 8 タンパク質をウエスタンブロッティングにより調べた結果を示す図である。レーン 1 および 4 は対照、レーン 2 および 5 は A C T H 投与した後、レーン 3 および 6 は拘束ストレスを負荷した後を示す。

【図 2 A】副腎中のプロカスパーゼ - 1 をウエスタンブロッティングにより調べた結果を示す図である。レーン 1 は対照、レーン 2 は A C T H 投与後、レーン 3 は拘束ストレス負荷後である。

【図 2 B】拘束ストレスによりアップレギュレートされる副腎中カスパーゼ - 1 活性がカスパーゼ - 1 阻害剤 Y V A D - C H O により抑制されることを示す図である。

【図 2 C】拘束ストレスによりアップレギュレートされる血漿中 I L - 1 8 が Y V A D - C H O により抑制されることを示す図である。

10

【図 2 D】拘束ストレスによりアップレギュレートされる副腎中 I L - 1 8 は Y V A D - C H O により抑制されないことを示す図である。

【図 2 E】拘束ストレスによりアップレギュレートされる副腎中カスパーゼ - 1 活性がカスパーゼ - 1 阻害剤 Z - F A - f m k により抑制されることを示す図である。

【図 2 F】拘束ストレスによりアップレギュレートされる血漿中 I L - 1 8 活性がカスパーゼ - 1 阻害剤 Z - F A - f m k により抑制されることを示す図である。

【図 3 A】拘束ストレスによりアップレギュレートされるカスパーゼ - 1 前駆体が P 3 8 M A P キナーゼ阻害剤である S B 2 0 3 5 8 0 により抑制されることを示す図である。

【図 3 B】拘束ストレスにより誘導されるカスパーゼ - 1 活性が S B 2 0 3 5 8 0 により抑制されることを示す図である。

20

【図 3 C】拘束ストレスにより誘導される血漿中 I L - 1 8 が S B 2 0 3 5 8 0 により抑制されることを示す図である。

【図 3 D】副腎中のリン酸化 P 3 8 M A P キナーゼをウエスタンブロッティングにより調べた結果を示す図である。レーン 1 はストレスなし、レーン 2 はストレス負荷、レーン 3 は Y V A D - C H O を添加、レーン 4 は Z - F A - f m k を添加、レーン 5 はストレス負荷したカスパーゼ - 1 K O マウスの場合を示す。

【図 3 E】ストレス負荷マウスの副腎の免疫組織化学を用いた染色の結果を示す写真である。副腎皮質の網状帯の重複した領域で、I L - 1 8（パネル 1）、プロ/カスパーゼ - 1（パネル 2）、プロ/カスパーゼ - 1 1（パネル 3）、および活性化（リン酸化）P 3 8 M A P キナーゼ（パネル 4）の誘導を示す。

30

【図 3 F】カスパーゼ阻害剤の存在下で活性化（リン酸化）P 3 8 M A P キナーゼの発現を示す写真である。パネル 1 は Z - F A - f m k を添加、パネル 2 は Y V A D - C H O を添加した場合を示す。

【図 4 A】拘束ストレスによりアップレギュレートされる活性化（リン酸化）P 3 8 M A P キナーゼが S O D により抑制されることを示す図である。

【図 4 B】拘束ストレスによりアップレギュレートされるプロカスパーゼ - 1 1 が S O D により抑制されることを示す図である。

【図 4 C】拘束ストレスにより誘導されるカスパーゼ - 1 活性が S O D により抑制されることを示す図である。

40

【図 4 D】拘束ストレスによりアップレギュレートされる血漿中 I L - 1 8 が S O D により抑制されることを示す図である。

【図 4 E】拘束ストレスによりアップレギュレートされる副腎中 I L - 1 8 が S O D により抑制されないことを示す図である。

【図 4 F】拘束ストレスによりアップレギュレートされる血漿中 I L - 1 8 が D P I により抑制されることを示す図である。

【図 5 A】ストレス負荷したマウスにおける血漿中 I L - 6 レベルを示す図である。

【図 5 B】ストレス負荷した野生型マウスにおいて、アップレギュレートされる血漿中 I L - 6 レベルがカスパーゼ - 1 阻害剤、S O D および抗 I L - 1 8 抗体により抑制されることを示す図である。

50

【図6】MRL/lprマウスにおいて、ストレス負荷によるループス腎炎の増悪が抗IL-6抗体または抗IL-18受容体抗体投与により抑制されることを示す図である

【図7A】パラコート刺激によるケラチノサイトからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(SOD)の効果を示す図である。

【図7B】パラコート刺激によるケラチノサイトからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(ビタミンE)の効果を示す図である。

【図7C】UV-B線照射によるケラチノサイトからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(SOD)の効果を示す図である。

【図7D】UV-B線照射によるケラチノサイトからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(ビタミンE)の効果を示す図である。

10

【図8A】パラコート刺激によるマイクログリア細胞からのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(SOD)の効果を示す図である。

【図8B】パラコート刺激によるマイクログリアからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(ビタミンE)の効果を示す図である。

【図9A】パラコート刺激によるアストロサイトからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(SOD)の効果を示す図である。

【図9B】パラコート刺激によるアストロサイトからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(ビタミンE)の効果を示す図である。

【図10A】パラコート刺激によるマクロファージからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(SOD)の効果を示す図である。

20

【図10B】パラコート刺激によるマクロファージからのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(ビタミンE)の効果を示す図である。

【図11A】パラコート刺激による滑膜組織からのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(SOD)の効果を示す図である。

【図11B】パラコート刺激による滑膜組織からのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(ビタミンE)の効果を示す図である。

【図12A】パラコート刺激による腎尿細管上皮細胞からのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(SOD)の効果を示す図である。

【図12B】パラコート刺激による腎尿細管上皮細胞からのIL-18放出に対するスーパーオキシドの抑制剤(ビタミンE)の効果を示す図である。

30

【図13A】IL-18投与により惹き起こされる血漿中ACTH濃度の変動を示す図。

【図13B】IL-18投与により惹き起こされる血漿中FSH濃度の変動を示す図。

【図13C】IL-18投与により惹き起こされる血漿中LH濃度の変動を示す図。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明は、非炎症性ストレスにより誘導されるスーパーオキシドが介在する新規カスケード(ストレスカスケード)を見出し、かかる知見から非炎症性ストレスを可視化および管理することを可能ならしめたものである。

【0024】

以下、本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定〔IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)〕、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

40

【0025】

本明細書において「タンパク質」または「(ポリ)ペプチド」には、特定のアミノ酸配列(配列番号: 2、4、6、8または10)で示される「タンパク質」または「(ポリ)ペプチド」だけでなく、これらと生物学的機能が同等であることを限度として、その同族体(ホモログやスプライズバリエーション)、変異体、誘導体、成熟体及びアミノ酸修飾体な

50

どが包含される。ここでホモログとしては、ヒトのタンパク質に対応するマウスやラットなど他生物種のタンパク質が例示でき、これらはHomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>)により同定された遺伝子の塩基配列から演繹的に同定することができる。また変異体には、天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、及び人為的に欠失、置換、付加および挿入されることによって改変されたアミノ酸配列を有する変異体が包含される。なお、上記変異体としては、変異のないタンパク質または(ポリ)ペプチドと、少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを挙げることができる。またアミノ酸修飾体には、天然に存在するアミノ酸修飾体、天然に存在しないアミノ酸修飾体が包含され、具体的にはアミノ酸のリン酸化体が挙げられる。

10

**【0026】**

従って本明細書において「IL-18タンパク質」または単に「IL-18」といった用語を用いる場合、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列(配列番号2)で示されるヒトIL-18やその同族体、変異体、誘導體、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号:2(GenBank Accession No. NM\_001562)に記載のアミノ酸配列を有するヒトIL-18や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

**【0027】**

また本明細書において「P38MAPキナーゼタンパク質」または単に「P38MAPキナーゼ」といった用語を用いる場合、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列(配列番号4)で示されるヒトP38MAPキナーゼやその同族体、変異体、誘導體、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号:4(GenBank Accession No. NM\_138957)に記載のアミノ酸配列を有するヒトP38MAPキナーゼや、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

20

**【0028】**

また本明細書において「カスパーゼ-11タンパク質」または単に「カスパーゼ-11」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列(配列番号6)で示されるマウスカスパーゼ-11やその同族体、変異体、誘導體、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号:6(GenBank Accession No. MMCASP11)に記載のアミノ酸配列を有するマウスカスパーゼ-11や、そのヒトホモログ、ラットホモログなどが包含される。

30

**【0029】**

また本明細書において「カスパーゼ-1タンパク質」または単に「カスパーゼ-1」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列(配列番号8)で示されるヒトカスパーゼ-1やその同族体、変異体、誘導體、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号:8(GenBank Accession No. NM\_033292)に記載のアミノ酸配列を有するヒトカスパーゼ-1や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

40

**【0030】**

また本発明において「IL-6タンパク質」または単に「IL-6」といった用語を用いる場合も、配列番号で特に指定しない限り、特定アミノ酸配列(配列番号10)で示されるヒトIL-6やその同族体、変異体、誘導體、成熟体及びアミノ酸修飾体などを包含する趣旨で用いられる。具体的には、配列番号:10(GenBank Accession No. NM\_000600)に記載のアミノ酸配列を有するヒトIL-6や、そのマウスホモログ、ラットホモログなどが包含される。

**【0031】**

本発明における「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、またはFabフラグメントやFab発現ライブラリーによって生成されるフラグメントなどのように抗原結合性を有する上記抗体の一部が包含される。

50

## 【 0 0 3 2 】

また、本発明において、「生体防御系」とは、免疫系機能による防御系、神経・内分泌系機能による防御系、特に、大脳皮質 - 視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系と自律神経系による防御系、並びにサイトカインを介した神経、内分泌及び免疫系による宿主の防御系を指す。

## 【 0 0 3 3 】

本明細書において「非炎症性ストレス」とは、感染、腫瘍などによる炎症性ストレスを除くストレスをいい、スーパーオキシドが介在する、いわゆる酸化ストレスをも含むものであり、以下、単に「ストレス」と省略する場合がある。非炎症性ストレスとしては、具体的には、高温、低温、高圧、低圧、騒音、放射線、紫外線などによる物理的ストレス、酸素欠乏、重金属、ヒ素などの有害化学物質による化学的ストレス、怒り、不安、恐怖、緊張、拘束などによる精神的ストレスが例示できるが、本発明においては物理的ストレス、化学的ストレス、精神的ストレスが好ましく、精神ストレスとしては拘束ストレスがより好ましく、特に長時間の拘束ストレスが好ましい。ここで、長時間とは生物や個体差により一概には言えないが、動物の場合で6時間以上が例示される。物理的ストレスとしては、紫外線照射によるストレスが好ましく、化学的ストレスとしては、有害化学物質曝露によるストレス、特にパラコート曝露によるストレスが好ましい。

10

## 【 0 0 3 4 】

本明細書において「非炎症性ストレス応答」とは、非炎症性ストレスに曝された生体のストレスに対する生体内反応をいう。

20

## 【 0 0 3 5 】

本明細書において「スーパーオキシド」とは、生体内で生じる活性酸素の一種をいい、スーパーオキシドアニオンまたはラジカルが代表的であり、体内でスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)により除去されたり、他の物質と反応することが知られているが、本発明ではスーパーオキシドの代謝産物を含めた意味で用いられる。

## 【 0 0 3 6 】

本発明の「指標剤」とは、スーパーオキシドが介在する非炎症性ストレス応答の指標となるものであって、以下の知見に基づいて本発明者により初めて明らかにされた「非炎症性ストレスにおけるサイトカインカスケード(ストレスカスケードと称する)」の発見によって完成されたものである。

30

## 【 0 0 3 7 】

動物に拘束ストレスを与えると、副腎では24kDのIL-18前駆体タンパク質を、および血漿中では18kD成熟型のレベルを増加させる(図1)。このような増加は、ストレスによって血漿中の副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)が上昇した後に起こる。このことは、副腎中ではIL-18前駆体の誘導にACTHが関与することを示す。これは、抗ACTH抗血清投与が成熟型および前駆体型IL-18の両方のレベルの増加を阻害することと、ストレスにより誘導されたACTH放出がデキサメタゾンによって阻害され、それにより成熟型および前駆体型IL-18も阻害されることの発見から支持される。これらの結果は、拘束ストレスがACTHを誘導し、次に副腎中のIL-18前駆体を誘導することを示す。

40

## 【 0 0 3 8 】

ストレス負荷された動物の副腎では、IL-18前駆体タンパク質のみならず成熟型IL-18も誘導され(図1F)、ストレスによって前駆体型から成熟型への変換が生じていることを示唆する。ACTHによる副腎中のIL-18前駆体誘導を阻害すると、血漿中のIL-18レベルの抑制につながる。以上まとめると、ACTHによって誘導される副腎中のIL-18前駆体は成熟型に変換されて血漿中に分泌されることが示唆される。IL-18前駆体の成熟型への変換は、ストレス負荷された動物で血漿中の成熟IL-18の蓄積における重要な制御過程である。

## 【 0 0 3 9 】

カスパーゼ-1前駆体とその活性は、LPSによって副腎で誘導されることが報告され

50

ている。本発明では、カスパーゼ - 1 前駆体はストレスによっても副腎で誘導されることが示された (図 2 A)。カスパーゼ - 1 阻害剤である Y V A D - C H O は、血漿 I L - 1 8 の上昇を阻害する (図 2 B) が、副腎の I L - 1 8 前駆体誘導は阻害しない (図 2 D)。ストレス負荷したカスパーゼ - 1 ノックアウト (K O) 動物では、I L - 1 8 前駆体は副腎でアップレギュレートされるが、血漿 I L - 1 8 は検出不可能であった。これらの結果から、ストレスにより誘導されたカスパーゼ - 1 は、血漿中の成熟 I L - 1 8 の蓄積に関して副腎中の I L - 1 8 前駆体のプロセッシングを生じさせていることが示唆される。

#### 【 0 0 4 0 】

カスパーゼ - 1 1 は、カスパーゼ - 1 を活性化させることが報告されている。本発明では、カスパーゼ - 1 1 の阻害剤である Z - F A - f m k がストレスによって活性化されるカスパーゼ - 1 の活性化を阻害したことから、ストレス負荷動物のカスパーゼ - 1 活性化におけるカスパーゼ - 1 1 の関与が示唆される。カスパーゼ - 1 1 前駆体の誘導は、N F - B のトランス活性化を必要とすること、および P 3 8 M A P キナーゼが N F - B のトランス活性化を媒介することが報告されている。さらに、P 3 8 M A P キナーゼ阻害剤である S B 2 0 3 5 8 0 がカスパーゼ - 1 1 の誘導をダウンレギュレートすることが報告されている。

#### 【 0 0 4 1 】

本発明者は、前記 S B 2 0 3 5 8 0 がストレスにより誘導されたカスパーゼ - 1 1 のタンパク質レベル (図 3 A)、カスパーゼ - 1 活性 (図 3 B) および血漿 I L - 1 8 レベル (図 3 C) それぞれの増加を阻害していることを発見した。カスパーゼ - 1 阻害剤 Y V A D - C H O とカスパーゼ - 1 1 阻害剤 Z - F A - f m k は、P 3 8 M A P キナーゼのリン酸化に影響を与えることなく、血漿 I L - 1 8 レベルのストレスによって誘導される上昇を抑制する (図 3 D および 3 F)。P 3 8 M A P キナーゼタンパク質のストレスによって誘導されるリン酸化は、カスパーゼ - 1 K O 動物でも野生型動物でも起こった (図 3 C)。これらの結果から、P 3 8 M A P キナーゼはカスパーゼ - 1 1 の上流にあり、P 3 8 M A P キナーゼ カスパーゼ - 1 1 カスパーゼ - 1 カスケードを形成して、副腎で I L - 1 8 前駆体から成熟型への変換をもたらし、ストレス負荷動物で血漿中に活性型 (成熟型) I L - 1 8 を放出することが示唆される。

#### 【 0 0 4 2 】

活性酸素種は、肺の繊維芽細胞、好中球および単球において P 3 8 M A P キナーゼのリン酸化を媒介していることが報告されている。本発明においては、スーパーオキシドディスムターゼ (S O D) が P 3 8 M A P キナーゼの活性化 (図 4 A)、カスパーゼ - 1 1 の誘導、副腎でのカスパーゼ - 1 の活性化および血漿中の I L - 1 8 レベルの上昇 (図 4 B, C, D) を阻害した。しかしながら、副腎での I L - 1 8 前駆体の誘導は S O D によって影響されなかった (図 4 E)。これらの結果より、ストレスがスーパーオキシドを誘導し、これが P 3 8 M A P キナーゼカスケードを活性化させることが示唆される。したがって、ストレス負荷動物における血漿中の I L - 1 8 が生成する過程は以下のようにまとめられる。ストレスが視床下部 - 下垂体 - 副腎 (H P A) 軸を活性化して A C T H を誘導する。また、ストレスはスーパーオキシドを生成させ、これが P 3 8 M A P キナーゼのリン酸化 (T h r 1 8 0 / T y r 1 8 2) を誘導し、リン酸化された M A P キナーゼがカスパーゼ - 1 1 を誘導し、カスパーゼ - 1 1 が今度はカスパーゼ - 1 を活性化する。このように活性化されたカスパーゼ - 1 が副腎で I L - 1 8 前駆体をプロセッシングして成熟型にし、この成熟型が血漿中に分泌される。このような経路を「非炎症性ストレスにおけるサイトカインカスケード (ストレスカスケード)」と称する。

#### 【 0 0 4 3 】

I L - 1 8 は、I L - 6 の誘導に必要な T L R 2 および M y d 8 8 を活性化させることから、I L - 1 8 が I L - 6 を誘導する可能性が示唆される。本発明者は、ストレス負荷した野生型動物で血漿中の I L - 6 レベルが上昇するが I L - 1 8 K O 動物では上昇しないことを見出した (図 5 A)。このことは、I L - 6 が I L - 1 8 依存的に誘導されることを示唆する。これは、カスパーゼ - 1 阻害剤と S O D で動物を処理すると血漿中の I L

10

20

30

40

50

- 18およびIL-6のストレスによって誘導される上昇が阻害されたという結果、ならびにストレス負荷動物で抗IL-18抗体がIL-6レベルを抑制するという結果により支持される。このような結果は、非炎症性ストレスがIL-18依存的に血漿中のIL-6レベルを上昇させるという最初の実証である。

【0044】

すなわち、本発明のスーパーオキシドが介在する非炎症性ストレス応答の指標剤は、非炎症性ストレスにおけるサイトカインカスケードに関与する成分を含有することを特徴とする。サイトカインカスケードに関与する成分は、IL-18、活性型IL-18、P38MAPキナーゼ、リン酸化P38MAPキナーゼ、カスパーゼ11、カスパーゼ1、活性化カスパーゼ1からなる群から選択される1または2以上のタンパク質を含有することが好ましく、IL-18を含有することがさらに好ましい。前記IL-18は、ヒトまたはマウスにおいては24kD前駆体または18kD成熟体（または活性型ともいう）タンパク質として存在するが、前記知見から、血中、より好ましくは血漿中に存在する活性型IL-18であることが好ましい。前記活性型IL-18は、ヒトの場合、配列番号2のアミノ酸配列において、37~193番目のアミノ酸配列を有するものが例示される。

10

【0045】

本発明の指標剤は、IL-18に加えて、前記知見から、P38MAPキナーゼを含有することが好ましい。前記P38MAPキナーゼは、リン酸化されたものであることがより好ましく、前記P38MAPキナーゼのリン酸化部位は、マウスの場合Thr180またはTyr182であること、またはヒトの場合Thr185またはTyr187であることがさらに好ましい。

20

【0046】

本発明の指標剤は、IL-18およびP38MAPキナーゼに加えて、前記知見から、カスパーゼ-11を含有することが好ましい。

【0047】

本発明の指標剤は、IL-18、P38MAPキナーゼおよびカスパーゼ-11に加えて、前記知見から、カスパーゼ-1を含有することが好ましい。前記カスパーゼ-1は、プロカスパーゼ-1であっても活性化カスパーゼ-1（成熟体）であってもよいが、IL-18前駆体のプロセッシングを生じさせることから、活性化カスパーゼ-1が好ましい。前記活性化カスパーゼ-1は、ヒトの場合、配列番号8のアミノ酸配列において、120~404番目のアミノ酸配列を有するものが例示される。

30

【0048】

本発明の指標剤は、少なくともIL-18を含有していれば、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ-11およびカスパーゼ-1の1種または2種以上を含有するものであってもよいが、指標剤を構成する前記サイトカインおよび酵素は、別々の容器に格納されていることが好ましい。また、本発明の指標剤は、前記サイトカインおよび酵素を主成分とする限り、他の成分を含有していてもよい。他の成分としては、緩衝液、生理食塩水等の溶媒、安定化剤、静菌剤、防腐剤などがあげられるが、これに限定されるものではない。

【0049】

本発明の指標剤は、非炎症性ストレス、好ましくは物理的ストレス、化学的ストレス、精神的ストレスおよび酸化ストレス、より好ましくは紫外線照射によるストレス、化学物質暴露によるストレス、拘束ストレスおよびこれらに起因する酸化ストレス、特に好ましくは拘束ストレスに動物が曝され、応答していることの指標となるものである。特に動物の血中、好ましくは血漿中の活性型IL-18を指標とすることにより、ストレスの程度を容易かつ定量的に知ることができる。血漿中のIL-18の量は、例えばマウスの場合、ストレス負荷前は100pg/ml以下であったものが1時間のストレス負荷の後5時間での値が120~200pg/ml、6時間のストレス負荷後には1000pg/mlを超える値となり、ストレスの負荷が増すにつれてIL-18の量も増加する。さらに、IL-18の半減期は、約10時間であることから、IL-18を含有する指標剤が非炎症性ストレス応答の指標として好適である。IL-18に加え、副腎中のP38MAP

40

50

キナーゼのリン酸化の上昇、カスパーゼ - 11の量の増大またはカスパーゼ - 1の活性の上昇も非炎症性ストレス応答の指標となる。具体的には、本発明の指標剤に含まれるIL - 18の濃度を正常値から弱いストレスないしは強いストレスの場合の濃度までのものを準備し、検体と比較できるようにしておくことが好ましい。

【0050】

また、本発明の指標剤は、IL - 18を始めとするストレスカスケードに關与する成分を含むことから、これらの成分および活性を減少させる物質のスクリーニングに利用することができる。本発明の指標剤を用いるスクリーニング方法としては特に限定されるものではないが、例えば、ストレス負荷した動物に種々の物質を投与し、血中の活性型IL - 18の量を有意に減少させる物質を選択する方法があげられる。かかるスクリーニング方法によって選別された物質は、ストレスを管理可能な医薬品または保健機能食品の有効成分として使用することができる。

10

【0051】

本発明の非炎症性ストレス応答の可視化剤は、前記指標剤を検出するためのものである。したがって、本発明の可視化剤は、IL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11およびカスパーゼ - 1の少なくとも1種または2種以上を検出するものであれば特に制限されるものではなく、前記サイトカインまたは酵素に特異的に結合する各種化合物、前記酵素の特異的基質を含有するものがあげられる。

【0052】

本発明の可視化剤は、IL - 18を検出するためには、IL - 18抗体を含有することが好ましく、前記IL - 18抗体は活性型IL - 18を特異的に認識するものであることがより好ましい。

20

【0053】

本発明の可視化剤は、IL - 18抗体に加え、さらにP38MAPキナーゼ抗体を含有することが好ましく、当該P38MAPキナーゼ抗体は、抗リン酸化P38MAPキナーゼ抗体であることがより好ましい。前記抗リン酸化P38MAPキナーゼ抗体は、マウスの場合リン酸化Thr180またはTyr182を有するP38MAPキナーゼを認識するものであり、ヒトの場合リン酸化Thr185またはTyr187を有するP38MAPキナーゼを認識するものであることがより好ましい。

【0054】

本発明の可視化剤は、IL - 18抗体およびP38MAPキナーゼ抗体に加え、さらにカスパーゼ - 11抗体を含有することが好ましい。

30

【0055】

本発明の可視化剤は、IL - 18抗体、P38MAPキナーゼ抗体およびカスパーゼ - 11に加え、さらにカスパーゼ - 1抗体を含有することが好ましい。前記カスパーゼ - 1抗体は、活性化カスパーゼ - 1を特異的に認識するものであることがより好ましい。

【0056】

本発明の可視化剤は、IL - 18抗体、P38MAPキナーゼ抗体およびカスパーゼ - 11に加え、さらにカスパーゼ - 1活性を測定可能な基質を含有することが好ましい。前記基質は、検出を容易にするため、酵素で切断されると蛍光を発するものであることがより好ましい。このような基質としては、例えば、実施例に記載されているAc - YVAD - MCAがあげられる。

40

【0057】

本発明の可視化剤は、少なくともIL - 18抗体を含有しているものが好ましく、さらにP38MAPキナーゼ抗体、カスパーゼ - 11抗体、カスパーゼ - 1抗体およびカスパーゼ - 1基質の1種または2種以上を含有するものであってもよいが、可視化剤を構成する前記抗体または基質は、別々の容器に格納されていることが好ましい。また、本発明の可視化剤は、前記抗体または基質を主成分とする限り、他の成分を含有していてもよい。他の成分としては、緩衝液、生理食塩水等の溶媒、安定化剤、静菌剤、防腐剤などがあげられるが、これに限定されるものではない。

50

## 【 0 0 5 8 】

前記抗体または基質は、被験者における前記指標剤の有無またはその程度を検出することによって、該被験者が非炎症性ストレスに曝されているか否かまたはそのストレス応答の程度を測定することのできるツール（ストレスマーカー）として有用である。

## 【 0 0 5 9 】

また前記抗体は、後述する非炎症性ストレスに基づく免疫状態の変動の予防、改善または予想において、IL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11およびカスパーゼ - 1のいずれかの発現変動を検出するためのツール（ストレスマーカー）としても有用である。

## 【 0 0 6 0 】

前記抗体は、その形態に特に制限はなく、IL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11およびカスパーゼ - 1のいずれかを免疫抗原とするポリクローナル抗体であっても、またそのモノクローナル抗体であってもよい。さらにこれらタンパク質のアミノ酸配列のうち少なくとも連続する、通常8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、より好ましくは20アミノ酸からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も、本発明の抗体に含まれる。

## 【 0 0 6 1 】

これらの抗体の製造方法は、公知であり、前記抗体も常法に従って製造することができる（Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13(2000)）。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したIL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11またはカスパーゼ - 1を用いて、あるいは常法に従ってこれらタンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したIL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11もしくはカスパーゼ - 1、またはこれらタンパク質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドをマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

## 【 0 0 6 2 】

抗体の作製に免疫抗原として使用され、かつ本発明の指標剤に含まれるIL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11またはカスパーゼ - 1は、本発明により提供される遺伝子の配列情報（配列番号1、3、5、7）に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法（Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)）などに準じて行うことができる。

## 【 0 0 6 3 】

具体的には、IL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11またはカスパーゼ - 1をコードする遺伝子が所望の宿主細胞中で発現できる組み換えDNA（発現ベクター）を作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養して、得られる培養物から、目的タンパク質を回収することによって、本発明抗体の製造のための免疫抗原としてのタンパク質を得ることができる。また、これらIL - 18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11またはカスパーゼ - 1の部分ペプチドは、本発明により提供されるアミノ酸配列の情報（配列番号2、4、6、8）に従って、一般的な化学合成法（ペプ

10

20

30

40

50

チド合成)によって製造することもできる。抗リン酸化P38MAPキナーゼ抗体を製造するためには、リン酸化されたThrまたはTyrを含むペプチドを合成すればよい。

【0064】

本発明の非炎症性ストレスの程度を測定する方法は、本発明の指標剤の量または活性を測定することを特徴とする。指標剤としては、IL-18が好ましく、活性型IL-18がさらに好ましい。

【0065】

上記方法において「非炎症性ストレス」としては、好ましくは物理的ストレス、化学的ストレス、精神的ストレスおよび酸化ストレス、より好ましくは、紫外線照射によるストレス、化学物質暴露によるストレス、拘束ストレス、およびこれらに起因する酸化ストレス、特に好ましくは拘束ストレスを挙げることができる。

10

【0066】

本方法の測定対象としては、動物から採取された血液、体液、組織、細胞、排泄物またはそれらの抽出物や、培養細胞から得られる細胞抽出液(抽出物)、細胞培養液等を挙げることができるが、動物から採取した血液や、培養細胞の培養液が好ましい。前記動物としては、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ハムスター、ニワトリ等を挙げることができる。前記培養細胞としては、IL-18を産生する能力を有する細胞が好ましく、例えば、滑膜細胞、腎尿細管上皮細胞、マイクログリア、アストロサイト、マクロファージ、ケラチノサイト等を挙げることができる。

20

【0067】

上記方法において、指標剤の検出、定量等は、従来公知の方法がいずれも使用可能であるが、本発明の可視化剤を用いることが好ましく、これら可視化剤を用いて、例えば、ELISA法、ウェスタンブロット解析法等およびこれに準ずる方法に従い行うことができる。前記可視化剤は、IL-18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ-11またはカスパーゼ-1に特異的に結合する性質を有することから、動物の組織内に発現した前記サイトカインまたは酵素を特異的に検出することができる。

【0068】

上記方法は、例えば、IL-18を指標とする場合、血中または血漿中に放出された活性型IL-18を検出すればよいので、測定が容易である。前述したように、血漿中のIL-18の量は、例えばマウスの場合、ストレス負荷前は100pg/ml以下であったものが1時間のストレス負荷の後5時間での値が120~200pg/ml、6時間のストレス負荷後には1000pg/mlを超える値となり、ストレスの負荷が増すにつれてIL-18の量も増加する。さらに、IL-18の半減期は、約10時間であることから、IL-18を含有する指標剤が非炎症性ストレス応答の指標として好適である。動物の代わりに培養細胞を用いて、培地(または培養液)中に放出されたIL-18を検出、定量してもよい。

30

【0069】

また、カスパーゼ-11またはカスパーゼ-1の場合、前記した基質との反応により生じた生成物を検出することによっても、ストレスの程度を測定することができる。具体的には、例えば、切断されると蛍光を発するようにしたカスパーゼ-11またはカスパーゼ-1の基質を動物に投与し、副腎中で切断されて血中に放出された蛍光を検出することができる。動物の代わりに培養細胞を用いた場合には、細胞抽出液中の蛍光を検出、定量することができる。検出された蛍光の強度から前記酵素活性の上昇の程度がわかり、あらかじめ決定しておいた基準値と比較することにより、非炎症性ストレスの程度を測定することができる。あるいは、上記抗体に蛍光剤、放射性分子または金属を結合させたものを動物に投与し、副腎での蛍光、放射性分子または金属の蓄積をCT(computed tomography)、MRI(magnetic resonance imaging)、PET(positron emission tomography)またはSPECT(single photon emission computed tomography)を用いて測定することができる。

40

50

ography)などを用いて調べ、IL-18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ-11またはカスパーゼ-1を検出することができる。検出された蓄積量からこれらストレス応答指標剤の各成分の有無またはその量の多少がわかり、あらかじめ決定しておいた基準値と比較することにより、検体におけるストレスの程度を測定することができる。

【0070】

本発明によれば、上記可視化剤を含む非炎症性ストレスの測定キットが提供される。

【0071】

本発明のキットに含まれる可視化剤としては、IL-18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ-11およびカスパーゼ-1の少なくとも1種または2種以上を検出するものであれば特に制限されるものではなく、前記サイトカインまたは酵素に特異的に結合する各種化合物、前記酵素の特異的基質を含有するものを挙げるができるが、IL-18抗体を含有することが好ましく、前記IL-18抗体は活性型IL-18を特異的に認識するものであることがより好ましい。本発明のキットによれば、測定対象の非炎症性ストレスの程度を簡便かつ迅速に測定することが可能となる。また、本発明の測定キットには、本発明の可視化剤のほか、測定、検出を実施するに際して必要な任意の他の試薬を更に包含することができる。具体的には、例えば、蛍光標識したIL-18や活性型IL-18、アッセイ緩衝液等を例示することができる。

【0072】

上記キットにおいて「非炎症性ストレス」としては、好ましくは物理的ストレス、化学的ストレス、精神的ストレスおよび酸化ストレス、より好ましくは、紫外線照射によるストレス、化学物質暴露によるストレス、拘束ストレス、およびこれらに起因する酸化ストレス、特に好ましくは拘束ストレスを挙げるができる。

【0073】

非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態の変動の診断に際しては、動物の種類に応じて血中のIL-18の正常値(対照値)を決定しておき、診断対象の血中のIL-18の量を測定して正常値と比較して判定することが好ましい。測定値が正常値(対照値)と比べて有意に高い場合、免疫状態の変動が起きていると判断することができる。

【0074】

本発明においては、スーパーオキシドが介在する非炎症性ストレス応答が免疫状態の変動を起こしていることから、前記測定方法、測定キットにおいて、または下記予防、改善または予想方法において、スーパーオキシドによりもたらされる血液、髄液、尿または唾液中の過酸化物をさらに測定することが好ましい。

【0075】

前記過酸化物としては、特に限定されるものではないが、脂質の過酸化反応によって生成するアクロレイン、4-ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒド、4-ヒドロキシ-2-ヘキセナール、クロトンアルデヒド等の過酸化脂質、メチルグリオキザール等の過酸化糖質、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン等の酸化塩基があげられる。過酸化物の有意な上昇と本発明による指標剤の有意な上昇とが確認された場合、動物が免疫状態の変動を起こしていること的有力な証拠となり、好ましい。

【0076】

前記可視化剤のうち、抗体を含有する可視化剤は、動物に適用することによって、非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態の変動を予防、改善または予想することができ、本発明はかかる方法を提供する。

【0077】

前記動物は、ヒトを除く脊椎動物であることが好ましく、特にウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、イヌ、ネコ等の家畜または愛玩動物が好ましい。本発明の予防、改善または予想方法を家畜または愛玩動物に適用することによって、人工的に飼育することがストレスを負荷することにつながりやすい畜産またはペット産業の分野において、動物の免疫状態を良好に維持し、病気に罹りにくい動物を飼育できるという効果を発揮する。

【0078】

10

20

30

40

50

本発明は、前記指標剤の量または活性を低減させるための非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態変動の治療剤を提供する。

【0079】

本発明の治療剤は、前記指標剤の量または活性を低減させるためのものである。したがって、本発明の治療剤は、IL-18、P38MAPキナーゼ、カスパーゼ-11およびカスパーゼ-1の少なくとも1種または2種以上の量または活性を低減させるものであれば特に制限されるものではなく、前記サイトカインまたは酵素に特異的に結合する各種化合物またはスーパーオキシドの抑制剤（抗酸化物質、抗酸化剤ともいう。）を有効成分として含有するものがあげられる。

【0080】

前記化合物としては、前記各種抗体があげられ、好ましくはIL-18抗体または抗IL-18受容体抗体であり、より好ましくは活性型IL-18に特異的に結合する抗体である。

【0081】

前記スーパーオキシドの抑制剤としては、チオール化合物、抗酸化ペプチド・アミノ酸、植物由来の各種ポリフェノール、大豆レシチン、コレステロール、クロロフィル、ハーブ抽出物（例えば、Carnosol）、ワサビ抽出物、スルフォラファン（sulforaphane）およびその誘導体アナログ、イソチオシアネート（isothiocyanate）およびその誘導体アナログ、6-(meththylsulfinyl)hexyl isothiocyanate、カロチノイド、ビタミンB2、ビタミンE、亜鉛、グルタチオン、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ、クルクミン、ゴマリグニン、ビタミンC（アスコルビン酸誘導体を含む）、カロテン類（例えば、 $\beta$ -カロチン、リコピン）、キサントフィル類（例えば、アスタキサンチン）、エイコサペンタエン酸（EPA）、コエンザイムQ<sub>10</sub>、ピクノジェノール、オレイン酸、リノール酸などの食品成分、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、ジフェニレンヨードニウムクロリド（DPI）、ミエロパーオキシダーゼ/NADPHオキシダーゼ抗体などの酵素由来成分、インスリン、エストロゲン、メラトニン、IGF（インスリン様成長因子）などのホルモン、脳保護剤（例えば、エダラボン（商品名））、DETA NONOate（diethylenetriamine NONOate）などのNO（一酸化窒素）供与化合物などがあげられる。また、二次的な抑制剤として、キナクリンなどのフォスフォリパーゼ抑制剤、インドメタシンなどのアラキドン酸遊離抑制剤、プロブコールなどの高脂血症治療薬、AT1ブロッカー、ACEインヒビターなどの経口血糖降下剤、マイナートランクライザーなどの精神安定剤が挙げられ、好ましくはSOD、ビタミンE、コエンザイムQ<sub>10</sub>であり、より好ましくはSODまたはビタミンEである。

【0082】

本発明の治療剤は、前記有効成分そのままであってもよく、公知の薬学的に許容される担体（賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤などが含まれる）や慣用の添加剤などと混合して医薬組成物として調製したものであってもよく、当該医薬組成物は、目的に応じて各種の形態、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口投与剤；注射剤、点滴剤、外用剤、坐剤などの非経口投与剤等に調製してもよい。

【0083】

上記担体としては、例えば乳糖、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロピルアルコール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、カルメロースカルシウム、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、タルク、ステアリン酸塩、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 4 】

さらに錠剤については、必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶性被包錠、フィルムコーティング錠あるいは二層錠、多層錠とすることができる。

## 【 0 0 8 5 】

丸剤の形態に成形するに際しては、担体として従来この分野で公知のものを広く使用できる。その例としては、例えば結晶セルロース、乳糖、デンプン、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン等の結合剤、カルメロースカルシウム、カンテン等の崩壊剤等が挙げられる。

## 【 0 0 8 6 】

カプセル剤は、常法に従い通常有効成分化合物を上記で例示した各種の担体と混合して、硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調製される。

## 【 0 0 8 7 】

注射剤として調製する場合、液剤、乳剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましく、これらの形態に成形するに際しては、希釈剤としてこの分野において慣用されているもの、例えば水、エタノール、マクロゴール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用することができる。この場合等張性の溶液を調製するのに必要な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを医薬製剤中に含有させてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。

## 【 0 0 8 8 】

坐剤の形態に成形するに際しては、担体として従来公知のものを広く使用することができる。その例としては、例えば半合成グリセライド、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ポリエチレングリコール等を挙げるることができる。

## 【 0 0 8 9 】

さらに必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を医薬製剤中に含有させることもできる。本発明のこれらの医薬製剤中に含有されるべき有効成分化合物の量は、特に限定されずに広範囲から適宜選択されるが、通常製剤組成物中に約 1 ~ 70 重量%、好ましくは約 5 ~ 50 重量%とするのがよい。

## 【 0 0 9 0 】

本発明のこれら医薬製剤の投与方法は特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、疾患の程度およびその他の条件に応じた方法で経口投与または非経口投与することができる。例えば、錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤およびカプセル剤の場合には、経口投与され、注射剤の場合は、単独でまたはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、さらに必要に応じて単独で筋肉内、皮下もしくは腹腔内投与される。

坐剤の場合は直腸内投与される。

## 【 0 0 9 1 】

また、投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象または患者の年齢、体重、症状などによって異なり一概に規定できないが、通常、1日投与用量として、数mg ~ 2g程度、好ましくは数十mg程度を、1日1 ~ 数回にわけて投与することができる。

## 【 0 0 9 2 】

治療目的である疾患（非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患）または状態は、スーパーオキシドが介在する非炎症性ストレス応答により生じた免疫変動に基づくものであれば特に限定されるものではなく、これにはIL - 18およびIL - 18が誘導するサイトカイン群が関与して発症、悪化、または再発する疾患も含まれる。具体的には、自己免疫疾患、自己免疫疾患の悪化もしくは再発、精神的疾患、悪性腫瘍などを挙げることができる。

## 【 0 0 9 3 】

具体的な非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患としては、虫垂炎、

10

20

30

40

50

消化性潰瘍、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、腹膜炎、膵炎、潰瘍性、偽膜性、急性および虚血性の大腸炎、憩室炎、喉頭蓋炎、アカラシア、胆管炎、胆嚢炎、肝炎、クローン病、腸炎、ホイップル病、(気管支)喘息、アレルギー、アナフィラキシーショック、免疫複合体疾患、臓器の虚血、再灌流傷害、臓器の壊死、枯草熱、セプシス、敗血症、エンドトキシンショック、悪液質、異常高熱症、好酸球性肉芽腫、肉芽腫症、サルコイドーシス、敗血性流産、精巣上体炎、膣炎、前立腺炎、尿道炎、気管支炎、肺気腫、肺水腫、鼻炎、嚢胞性線維症、肺炎、肺塵症、肺胞炎、細気管支炎、咽頭炎、胸膜炎、副鼻腔炎、インフルエンザ、呼吸器合胞体ウイルス感染、ヘルペス感染、HIV感染、B型肝炎ウイルス感染、C型肝炎ウイルス感染、播種性菌血症、デング熱、カンジダ症、マラリア、フィラリア症、アメーバ症、包虫嚢胞、火傷、皮膚炎、皮膚筋炎、日焼け、じんま疹、いぼ、膨疹、血管炎、脈管炎、心内膜炎、動脈炎、アテローム性動脈硬化症、血栓性静脈炎、心外膜炎、心筋炎、心筋虚血、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆、びまん性レピー小体病、ピック症、ピンスワンガー病、パーキンソン氏病、パーキンソン症候群、脳虚血、脳虚血・再還流性障害、新生児出血性脳症、てんかん、HIV脳症、脳循環障害、脳血管障害、セリアック病、鬱血性心不全、成人呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、多発性硬化症、脳梗塞、脳卒中、ギラン・バレー症候群、神経炎、神経痛、脊髄損傷、麻痺、ブドウ膜炎、関節炎疹、関節痛、骨髄炎、筋膜炎、パジェット病、関節リウマチ、関節炎、痛風、歯周病、リウマチ様関節炎、滑膜炎、重症筋無力症、甲状腺炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、グッドパスチャー症候群、ベーチェット症候群、同種移植の拒絶反応、移植片対宿主病、I型糖尿病、強直性脊椎炎、パーカー病、II型糖尿病、強直性脊椎炎、パーカー病、ライター症候群、ホジキン病、肝硬変、腎不全、アレルギー性喘息、腎炎、心筋梗塞、シェーグレン症候群、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、鬱病、摂食障害、異食症、味覚障害、尋常性坐瘡、天疱瘡、魚鱗癬、乾癬、熱傷、光線過敏症、紫外線皮膚障害、創傷治癒、または放射性障害、一酸化炭素中毒、シンナー中毒、低酸素症もしくはそれらの二次性障害、子宮内膜症、副腎機能異常、月経異常、心筋症、心身症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、精子減少、性欲低下、下垂体機能低下症、下垂体機能異常症などがあげられる。

#### 【0094】

前記自己免疫疾患または精神的疾患としては、虫垂炎、消化性潰瘍、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、腹膜炎、膵炎、潰瘍性、偽膜性、急性および虚血性の大腸炎、憩室炎、喉頭蓋炎、アカラシア、胆管炎、胆嚢炎、肝炎、クローン病、腸炎、ホイップル病、喘息、アレルギー、アナフィラキシーショック、免疫複合体疾患、臓器の虚血、再灌流傷害、臓器の壊死、枯草熱、セプシス、敗血症、エンドトキシンショック、悪液質、異常高熱症、好酸球性肉芽腫、肉芽腫症、サルコイドーシス、敗血性流産、精巣上体炎、膣炎、前立腺炎、尿道炎、気管支炎、肺気腫、鼻炎、嚢胞性線維症、肺炎、肺塵症、肺胞炎、細気管支炎、咽頭炎、胸膜炎、副鼻腔炎、インフルエンザ、呼吸器合胞体ウイルス感染、ヘルペス感染、HIV感染、B型肝炎ウイルス感染、C型肝炎ウイルス感染、播種性菌血症、デング熱、カンジダ症、マラリア、フィラリア症、アメーバ症、包虫嚢胞、火傷、皮膚炎、皮膚筋炎、日焼け、じんま疹、いぼ、膨疹、血管炎、脈管炎、心内膜炎、動脈炎、アテローム性動脈硬化症、血栓性静脈炎、心外膜炎、心筋炎、心筋虚血、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、アルツハイマー病、セリアック病、鬱血性心不全、成人呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、多発性硬化症、脳梗塞、脳卒中、ギラン・バレー症候群、神経炎、神経痛、脊髄損傷、麻痺、ブドウ膜炎、関節炎疹、関節痛、骨髄炎、筋膜炎、パジェット病、痛風、歯周病、リウマチ様関節炎、滑膜炎、重症筋無力症、甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、ベーチェット症候群、同種移植の拒絶反応、移植片対宿主病、I型糖尿病、強直性脊椎炎、パーカー病、II型糖尿病、強直性脊椎炎、パーカー病、ライター症候群、ホジキン病、SLE、肝硬変、腎不全、アレルギー性喘息、腎炎、心筋梗塞、シェーグレン症候群、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、鬱病、摂食障害、異食症、味覚障害、尋常性坐瘡、天疱瘡、魚鱗癬、乾癬、熱傷、光線過敏症、紫外線皮膚障害、または放射性障害、一酸化炭素中毒、低酸素症もしくはそれらの二次性障害などがあげられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 5 】

悪性腫瘍としては、急性白血病、慢性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症などの造血器腫瘍の他、大腸癌、脳腫瘍、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、膵癌、膵島細胞癌、腎細胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、前立腺癌、睾丸腫瘍、卵巣癌、子宮癌、絨毛癌、甲状腺癌、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、網膜芽細胞腫などの固形腫瘍を挙げることができる。

## 【 0 0 9 6 】

血中においてIL - 18が上昇すると、それに引き続いて各種のサイトカインが放出される。なかでもIL - 6は、数多くの炎症性疾患に関与し増悪因子として注目されている。全身性にこれらのサイトカインが上昇することで引き起こされるあるいは増悪することが知られている疾患としては、上記した疾患群のなかでも、虫垂炎、腹膜炎、膵炎、潰瘍性・偽膜性・急性および虚血性の大腸炎、憩室炎、喉頭蓋炎、胆管炎、胆嚢炎、肝炎、精巣上体炎、膣炎、前立腺炎、尿道炎、気管支炎、肺炎、肺塵症、肺炎、細気管支炎、咽頭炎、胸膜炎、副鼻腔炎、皮膚炎、皮膚筋炎、血管炎、脈管炎、心内膜炎、動脈炎、アテローム性動脈硬化症、血栓性静脈炎、心外膜炎、心筋炎、心筋虚血、結節性動脈周囲炎、骨髄炎、筋膜炎、リウマチ熱、髄膜炎、脳炎、バジレット病、痛風、歯周病、甲状腺炎、神経炎、ブドウ膜炎、I型糖尿病、胃潰瘍、消化性潰瘍、十二指腸潰瘍などの炎症性メカニズムが関与する疾患の他、クローン病、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、多発性硬化症、ギランバレー症候群、皮膚筋炎、全身性エリテマトーデス、気管支喘息、免疫複合体疾患、好酸球性肉芽腫、肉芽腫症、サルコイドーシス、関節リウマチ、結節性動脈周囲炎、強直性脊椎炎、ベーチェット症候群、同種移植の拒絶反応、移植片対宿主病、悪性異常高熱症、習慣性流産、子宮内膜症などサイトカインや自己免疫機構の関与が知られる疾患、さらに枯草熱、インフルエンザ、呼吸器合胞体ウイルス感染、ヘルペス感染、HIV感染、B型肝炎ウイルス感染、C型肝炎ウイルス感染、播種性菌血症、デング熱、カンジダ症、マラリア、フィラリア症、アメーバ症、包虫嚢胞などの感染症、加えて、病態が完全に明らかにはなっていないが上記サイトカインの関与が示されているアカラシア、ホイップル病、火傷、日焼け、じんま疹、いぼ、膨疹、血管炎、脈管炎、心内膜炎、動脈炎、アルツハイマー病、セリアック病、鬱血性心不全、成人呼吸窮迫症候群、脳梗塞、脳卒中、痛風、重症筋無力症、筋萎縮性側索硬化症、甲状腺炎、パーカー病、II型糖尿病、肥満、ライター症候群、ホジキン病、肝硬変、腎不全、心筋梗塞、シェーグレン症候群、鬱病、摂食障害、異食症、味覚障害などがあげられる。

## 【 0 0 9 7 】

IL - 18およびそれによって放出されるサイトカイン群が関与して発症、悪化、または再発する他の疾患・状態としては、神経・内分泌系の制御異常である日周リズム異常、食欲異常、アジソン病や末端肥大症、性腺発達障害などの下垂体機能異常症、甲状腺機能異常症、肥満、血糖制御異常、二次的には原発性アルドステロン症、クッシング病や、関節リウマチ、痛風および関節炎などの関節の炎症を病態の中核とする疾患の寒冷や精神的ストレス、睡眠不足、血流障害、物理的重量の負荷等の非炎症性ストレスによる発症、再発または増悪、感染や毒物、腎尿細管を傷害するシスプラチン・カルボプラチン等の抗癌剤による、あるいは特発性の機序による腎尿細管上皮細胞の脱落を挙げることができる。

## 【 0 0 9 8 】

本発明の治療剤は上記いずれの疾患の治療、改善に有効と考えられるが、自己免疫疾患、皮膚病、中枢神経系疾患、下垂体機能障害に起因する諸疾患等にさらに有効であり、全身性エリテマトーデス(SLE)、ループス腎炎、多発性硬化症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、乾癬、脳虚血、脳変性、脳炎、関節リウマチ、月経異常、子宮内膜症、性欲低下などにさらに有効であり、ループス腎炎に特に有効である。

## 【 0 0 9 9 】

さらに、本発明によれば、上記指標剤の量または活性を測定することを特徴とする、非炎症性ストレスにより発症、悪化若しくは再発する疾患に対する治療効果、改善効果若し

10

20

30

40

50

くは予防効果を有する物質、または酸化ストレスに対する抑制効果若しくは防止効果を有する物質をスクリーニングする方法が提供される。本発明の方法によれば、非炎症性ストレスが直接的または間接的に関与する疾患に対する治療、改善または予防効果を有する物質のスクリーニングを大量、迅速かつ簡便に行うことができる。かかる方法によりスクリーニングされた物質は、非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患に対する治療薬、改善薬または予防薬として有効である。また、本スクリーニング方法によれば、酸化ストレスに対する抑制効果または防止効果を有する物質をスクリーニングすることができる。非炎症性ストレスにおけるサイトカインカスケード上流にスーパーオキシドが介在しているため、本スクリーニング方法によれば、酸化ストレスに対する抑制効果または防止効果を有する物質を、前述の指標剤を指標にしてスクリーニングすることができ、かかる物質を有効成分とする医薬品ならびに保健機能食品（特定保健用食品および栄養機能食品）の開発に役立つ。

10

#### 【0100】

本発明のスクリーニング方法は、具体的には例えば以下の工程、

- 1) 培養細胞を被検物質存在条件下で培養する、または、動物を被検物質投与条件下で飼育する工程、
- 2) 前記培養細胞または前記動物から調製した検体中の指標剤を定量する工程、および、
- 3) 被検物質存在条件下または被検物質投与条件下における指標剤の量を被検物質非存在条件下または被検物質非投与条件下における指標剤の量と比較し、有意に指標剤の量を減少または増加させた前記被検物質を、非炎症性ストレスにより発症、悪化若しくは再発する疾患に対する治療効果、改善効果若しくは予防効果を有する物質と判定する工程、または酸化ストレスに対する抑制効果若しくは防止効果を有する物質と判定する工程、を含む。

20

#### 【0101】

本スクリーニング方法で使用される動物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ハムスター、ニワトリ等を挙げることができるが、操作が容易である点で、特にマウスやラットが好ましい。また、非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患のモデル動物、トランスジェニック動物を用いてもよい。使用される前記培養細胞としては、サイトカインを産生する能力を有する細胞、特に、IL-18を産生する能力を有する細胞が好ましく、例えば、滑膜細胞、腎尿管上皮細胞、マイクログリア、アストロサイト、マクロファージ、ケラチノサイト、腸管腺細胞等を挙げることができる。

30

#### 【0102】

また、動物および培養細胞は、非炎症性ストレスを予め負荷しているもの、負荷していないものいずれを用いてもよい。例えば、非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患に対する治療効果および改善効果を有する物質をスクリーニングする場合には、あらかじめ培養細胞または動物に非炎症性ストレスを負荷し、その後被検物質を投与等してもよい。一方、前記疾患に対する予防効果を有する物質をスクリーニングする場合には、培養細胞または動物に非炎症性ストレスを負荷する前に被検物質を投与等してもよい。ここで、非炎症性ストレスとしては、物理的ストレス、化学的ストレス、精神的ストレスおよび酸化ストレスが好ましく、紫外線照射ストレス、化学物質暴露ストレスまたは拘束ストレスおよびこれらに起因する酸化ストレスがさらに好ましく、拘束ストレスが特に好ましい。

40

#### 【0103】

前記被検物質としては、例えば、ペプチド、タンパク質、合成化合物、細胞や植物の抽出物等を挙げることができ、これらは、新規物質であっても、公知物質であってもよい。酸化ストレスに対する抑制効果または防止効果を有する物質をスクリーニングする場合の被検物質としては、例えば、各種ビタミン類、チオール化合物、植物由来の各種ポリフェノール、抗酸化ペプチド・アミノ酸類、高脂血症治療薬として用いられるプロブコール、降圧剤として用いられるカプトプリルや前述のスーパーオキシド抑制剤を挙げることがで

50

きる。

【0104】

培養細胞または動物から調製した検体としては、細胞培養液、細胞抽出液、あるいは動物から採取された血液、体液、組織、細胞、排泄物またはそれらの抽出物等を挙げることができるが、前記動物から採取した血液または前記培養細胞の培養液を用いることが好ましい。

【0105】

前記指標剤としては、IL-18、活性型IL-18が好ましく、特に活性型IL-18が好ましい。検体中の指標剤の定量は、従来公知の方法がいずれも使用できるが、本発明の可視化剤を用いることが好ましく、これら可視化剤を用いて、例えば、ELISA法、ウェスタンブロット解析法等およびこれに準ずる方法に従い行うことができる。

10

【0106】

上記非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患としては、前述の自己免疫疾患、皮膚病、種々の感染症、精神的疾患、循環器系疾患、下垂体機能障害に起因する諸疾患、悪性腫瘍等を挙げることができるが、本スクリーニング方法は、好ましくは自己免疫疾患、皮膚病、虚血性疾患、精神的疾患、循環器系疾患、下垂体機能障害に起因する諸疾患、さらに好ましくは、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、アトピー性皮膚炎、乾癬、脳虚血、脳変性、脳炎、関節リウマチ、多発性硬化症、気管支喘息、心筋症、月経異常、子宮内膜症、性欲低下、特に好ましくはループス腎炎、に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質をスクリーニングする場合に好適に用いることができる。

20

【0107】

培養細胞としてケラチノサイトを使用した場合、紫外線などによる皮膚障害、アトピー性皮膚炎、乾癬、尋常性挫創、天疱瘡、魚鱗癬、光線過敏症のほか、皮膚における炎症性変化を病態に含む熱傷、放射線皮膚障害、創傷治癒などの疾患に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質を好適にスクリーニングすることができる。

【0108】

培養細胞としてマイクログリアやアストロサイトを使用した場合、脳の炎症、神経細胞の脱落、脳機能異常、たとえば、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆、びまん性レビー小体病、ピック病、ピンスワンガー病、パーキンソン氏病、パーキンソン症候群、脳虚血、脳虚血・再還流性障害、一酸化炭素中毒、シンナー中毒、新生児出血性脳症、低酸素脳症、高血圧性脳症、てんかん、多発性硬化症、HIV脳症、脳循環障害、脳血管障害などの疾患に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質や、日周リズム異常、食欲異常、アジソン病や末端肥大症や性腺発達障害などの下垂体機能異常症、甲状腺機能異常症、肥満、血糖制御異常、二次的には原発性アルドステロン症、クッシング病などの副腎機能異常症、さらに消化管運動の制御や骨形成の異常などに対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質を好適にスクリーニングすることができる。

30

【0109】

培養細胞としてマクロファージを使用した場合、例えば、非炎症ストレスが関与してマクロファージ、IL-18が介在するあらゆる炎症性疾患と自己免疫性疾患、生体防御系の調節異常に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質を好適にスクリーニングすることができる。

40

【0110】

滑膜細胞を用いた場合には、関節リウマチや痛風や関節炎などの関節の炎症を病態の中核とする疾患が寒冷や精神的ストレス、睡眠不足や血流障害、物理的重量の負荷などの非炎症性ストレスによって発症・再発・増悪に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質を好適にスクリーニングすることができる。

【0111】

腎尿細管上皮細胞を用いた場合には、感染や毒物、腎尿細管を傷害するシスプラチン・カルボプラチンなどの抗ガン剤によって、あるいは特発性の機序をもって腎尿細管上皮細

50

胞の脱落、炎症を病態の中核とする疾患の発症、増悪に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質を好適にスクリーニングすることができる。

【0112】

本スクリーニング方法は、例えば以下のように行われる。

【0113】

培養細胞を用いる場合には、ストレス状態にある培養細胞を被検物質存在条件下で培養し、細胞から培養液中に放出されたIL-18を本発明の可視化剤を用いて検出、定量し、被検物質存在条件下におけるIL-18の放出量を被検物質非存在条件下におけるIL-18の放出量と比較し、有意にIL-18の放出量を減少または増加させた前記被検物質を非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質と判定することにより行う。動物を用いる場合には、ストレス状態にある動物を被検物質投与条件下で飼育し、前記動物の血液中に含まれるIL-18の濃度を測定し、これを被検物質非投与条件下で飼育した場合のIL-18の血中濃度と比較し、有意にIL-18の血中濃度を減少または増加させた前記被検物質を非炎症性ストレスにより発症、悪化、または再発する疾患に対する治療効果、改善効果または予防効果を有する物質と判定することにより行う。

10

【実施例】

【0114】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら制限されるものではない。

20

【0115】

[動物]

雄性C57B6マウスは、Seac Yoshitomiより購入した。IL-18ノックアウト(KO)マウス(C57/B6バックグランド、Immunity, 8, 383-390 (1998))およびカスパーゼ-1ノックアウト(KO)マウス(Balb/Cバックグランド、Science, 267, 2000-2003 (1995))は、それぞれ竹田博士および杭田博士より供与された。MRL/MpJ UmmCrj-lpr/lpr(MRL/lpr)マウスは、日本チャールスリバー株式会社より購入した。マウスは、20でケージ当たり1匹格納された。マウスを用いる実験は、10時に開始した。

30

【0116】

[試薬]

抗ACTH抗血清はProgen Biotechnik(ドイツ)製、抗マウスIL-18モノクローナル抗体はMBL(日本)製、抗マウスカスパーゼ-1抗体(sc-515)はSanta Cruz(米国)製、抗マウス/ラットカスパーゼ-1抗体はBIOMOL(米国)製、および抗リン酸化(Thr180/Tyr182)P38 MAPキナーゼ抗体はCell Signaling Technology(米国)製を使用した。抗マウスIL-6ポリクローナル抗体は、ケミコン社製を使用した。抗マウスIL-18受容体抗体は、常法にしたがって、マウスIL-18受容体の膜貫通領域直近の親水性領域の部分ペプチド(20アミノ酸)を合成し、ウサギに免疫し、得られた抗血清を使用した。

40

【0117】

合成ACTH(1-24アミノ酸)は、Peninsula Laboratories Inc.(米国)より購入した。Ac-YVAD-CHOおよびAc-YVAD-MCAは、ペプチド研究所より購入した。Z-FA-fmk(J. Biol. Chem., 276, 21153-21157(2000))はCalbiochem-Novabiochem(米国)より、SB203580はBIOMOLリサーチ研究所よりそれぞれ購入した。ジフェニレンヨードニコチンクロリド(DPI)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(NADPH)オキシダーゼ阻害剤およびスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)-1は、シグマ(米国)から購入した。

50

## 【 0 1 1 8 】

## [ 拘束ストレス ]

拘束ストレスとして、マウスを拘束器 ( 2 7 m m の直径の丸型プラスチックチューブ ) 中に 1、3 または 6 時間置き、I L - 1 8 レベルを測定した。I L - 6 の分析に関しては、マウスを前述のように拘束し、次いで元のケージに 6 時間収容した後に測定した。

## 【 0 1 1 9 】

## [ サイトカインのアッセイ ]

拘束後、マウスをジエチルエーテルで麻酔し、血液を E D T A 含有チューブに採血した。血漿は、4、1 0 0 0 0 × g で 1 0 分間遠心分離により分離し、- 8 0 で保存した。I L - 1 8 および I L - 6 は、それぞれ Q u a n t i k i n e T M イムノアッセイキット ( R & D システムズ ) および O p t E I A T M ( B D - P h a r m i n g e n ) を用いる E L I S A で分析した。

10

## 【 0 1 2 0 】

## [ 統計学的分析 ]

すべての実験データは、3 回以上の独立した実験の平均 ± S . D . として示した。異なる処理間の統計学的比較は、G r a p h P a d P r i s m プログラム ( G r a p h P a d S o f t w a r e I n c . ) を用いる S t u d e n t の t 検定により行った。0 . 0 5 未満の P 値を統計学的に有意であると見なした。図に表された符号は、以下の通りである。

\* ; 対照に対して  $P < 0 . 0 5$

20

\*\* ; 対照に対して  $P < 0 . 0 1$

\*\*\* ; 対照に対して  $P < 0 . 0 0 1$

# ; ストレス負荷に対して  $P < 0 . 0 1$  ( n = 4 - 9 )

ストレス負荷に対して  $P < 0 . 0 5$  ( n = 4 - 9 ) ( 図 4 の場合 )

野生型に対して  $P < 0 . 0 5$  ( 図 5 の場合 )

## ; ストレス負荷に対して  $P < 0 . 0 0 1$  ( n = 4 - 9 )

ストレス負荷に対して  $P < 0 . 0 1$  ( n = 4 - 9 ) ( 図 4 の場合 )

野生型に対して  $P < 0 . 0 1$  ( 図 5 の場合 )

+ ; ストレス負荷した野生型に対して  $P < 0 . 0 1$  ( n = 6 ) 。

## 【 0 1 2 1 】

30

## [ 実施例 1 ]

拘束ストレスマウスにおける血漿 I L - 1 8 タンパク質レベルの測定  
抗 A C T H 抗血清 ( 5 0 μ l、1 : 1 )、デキサメタゾン ( 1 n g / 5 0 μ l P B S ( - ) ) または抗 I L - 1 8 抗体 ( 5 0 μ l、1 : 1 ) をマウスの腹腔内に投与し、1 0 分経過後、拘束チューブ中に 6 時間置いた。合成 A C T H ( 2 5 0 μ g / 5 0 μ l P B S ( - ) ) を左肢に注入し、6 時間経過後マウスを実験に供した。結果を図 1 に示す。

## 【 0 1 2 2 】

( 1 ) 血漿中の A C T H レベルの上昇は、血漿中の I L - 1 8 レベルの増加に先行する  
図 1 A より、拘束ストレスに曝されたマウスの血漿中の I L - 1 8 レベルは、4 3 ± 3 4 . 3 p g / m l ( ストレス負荷前 )、3 3 0 ± 6 4 . 3 p g / m l ( ストレス負荷後 3 時間 ) および 1 0 5 9 ± 3 0 . 0 2 2 p g / m l ( ストレス負荷後 6 時間 ) であった。血漿中の A C T H は、I L - 1 8 よりも迅速に増加し、ストレス負荷後 1 時間以内に約 5 0 0 p g / m l に到達したが、3 時間で元のレベルに減少した。このことより、血漿中の A C T H レベルの上昇は、血漿中の I L - 1 8 レベルの増加に先行していることがわかる。なお、血漿中の A C T H レベルの上昇は、視床下部 - 下垂体 - 副腎 ( H P A ) 軸の活性化を表している。

40

## 【 0 1 2 3 】

( 2 ) A C T H が血漿 I L - 1 8 のストレス誘導的上昇に関与する  
A C T H は、I L - 1 8 m R N A の副腎特異的発現を引き起こすことが知られている。よって、A C T H が血漿 I L - 1 8 のストレス誘導的上昇に関与するかどうかについて調

50

べた。マウスを抗ACTH抗血清またはデキサメタゾンで処置し、血漿中または副腎中のIL-18レベルを分析した。図1Bおよび図1Cより、抗ACTH抗血清およびデキサメタゾンは、血漿中(図1B)および副腎(図1C)においてストレスにより誘導されたIL-18レベルの増加を阻害することがわかった。片方の副腎を摘出したマウスでは、ストレス後のIL-18レベルは擬似操作したマウスよりも低かった。これらの結果から、ストレスにより誘導されたACTHによって血漿および副腎中のIL-18レベルの上昇が引き起こされることが示唆された。

#### 【0124】

(3) ACTHは、まず副腎中のIL-18タンパク質レベルに影響を及ぼす

ACTHを投与すると、血漿中のIL-18レベルが上昇するが、ストレス負荷の場合よりも程度が低い(図1D)。副腎中のIL-18レベルは、ストレス負荷の場合と同じ程度に上昇した(図1E)。これらの結果から、ストレス負荷マウスでは、ACTHは主として副腎中のIL-18のストレス誘導性上昇を招くが、血漿IL-18レベルの上昇には他の因子が関与していることが示唆される。

10

#### 【0125】

(4) IL-18タンパク質の性状

IL-18タンパク質のウエスタンブロッティングによる分析の結果、IL-18は血漿中では18kDの成熟型タンパク質で存在し(図1F、レーン1-3)、一方、副腎中では主として24kDの前駆体型で存在している(図1F、レーン4-6)ことがわかった。これらの結果から、副腎中のIL-18前駆体がプロセッシングされ、血漿中に放出

20

#### 【0126】

##### [実施例2]

ストレスにおけるカスパーゼ-1の役割

マウスを拘束器中に1時間置き、Ac-YVAD-CHO(200 $\mu$ M / 50 $\mu$ l PBS(-))、Z-F A-fmk(100 $\mu$ M / 50 $\mu$ l PBS(-))およびSB-203580(マウスあたり100 $\mu$ g / 50 $\mu$ l PBS(-))を腹腔内に投与した。拘束開始後1および3時間で、SOD-1(20U)およびDPI(30 $\mu$ g)をマウス腹腔内に投与し、ウエスタンブロッティングにより解析した。結果を図2に示す。

#### 【0127】

カスパーゼ-1は、副腎でACTH(図2A、レーン2)およびストレス(図2A、レーン3)により誘導された。副腎中のカスパーゼ-1活性は、ストレス負荷後10倍高くなった(図2B)。カスパーゼ-1の阻害剤YVAD-CHOは、血漿中のIL-18レベルのストレス誘導性増加を有効に阻害した(図2C)が、副腎中のIL-18前駆体タンパク質レベルを阻害しなかった(図2D)。カスパーゼ-1ノックアウト(KO)マウスにおいて、ストレス前後に血漿中にIL-18が検出されなかったが、ストレス負荷後にIL-18前駆体レベルが増加した。これらの結果から、カスパーゼ-1は副腎においてIL-18前駆体のプロセッシングに必須であり、ストレス負荷マウスにおいて血漿IL-18の上昇に必須であることが示唆される。

30

#### 【0128】

##### [実施例3]

ウエスタンブロッティングによるカスパーゼ-1およびMAPキナーゼの解析

副腎組織中のIL-18およびリン酸化P38MAPキナーゼのウエスタンブロット分析は、以下のように行った。副腎組織を、プロテアーゼ阻害剤混合液(ロシュダイアグノスティックス製)を含む免疫沈降(IP)緩衝液(50mM Tris pH7.4、150mM NaCl、0.5%NP-40および0.5%ナトリウムデオキシコレート)中でポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。得られたホモジネート(100 $\mu$ gタンパク質)をプロテインA/Gアガロース(Exalpha Biologicals, Inc.)で前もって清澄化させ、抗マウスIL-18モノクローナル抗体または抗リン酸化(Thr180/Tyr182)P38MAPキナーゼ抗体とプロテインA/

40

50

Gアガロース(50 μl)とでインキュベートし、遠心分離(13000 × gで25分間、4 )した。沈殿物をボイルして副腎タンパク質を回収し、10 - 20 % SDS - ポリアクリルアミド勾配ゲル中で電気泳動し、Hybond ECL (Amersham製)ニトロセルロース膜に電氣的に移した。前記膜を、抗体(IL - 18、リン酸化(Thr180 / Tyr182)P38 MAPキナーゼ、カスパーゼ - 1またはカスパーゼ - 11)とともにインキュベートし、反応したタンパク質をECLプラスシステム(Amersham biosciences製)で検出した。プロカスパーゼ - 11および活性化P38 MAPキナーゼは、Science Lab 99 イメージアナリシシステム(Fujifilm製)を用いて定量化した。

【0129】

(1)カスパーゼ - 1活性のアップレギュレーションにおけるカスパーゼ - 11の関与  
カスパーゼ - 1がカスパーゼ - 11により活性化されることが報告されているので、血漿中IL - 18レベルにおけるカスパーゼ - 11阻害剤Z - FA - fmkの影響を調べた。結果を図2Eおよび2Fに示す。

【0130】

Z - FA - fmkは、副腎におけるストレス誘導性カスパーゼ - 1活性の増加を抑制し(図2E)、および血漿IL - 18レベルを抑制する(図2F)ことがわかった。このことから、カスパーゼ - 11は副腎中のカスパーゼ - 1のストレス誘導性活性化に関与していることが示唆される。

【0131】

(2)カスパーゼ - 1活性のアップレギュレーションにおけるP38MAPキナーゼの関与

LPSによるカスパーゼ - 11の誘導はNF - Bの活性化を必要とし、NF - Bの活性化はP38MAPキナーゼにより媒介されることが報告されている。インビトロでは、カスパーゼ - 11の誘導がP38MAPキナーゼ阻害剤SB203580で抑制されることが報告されている。本発明においては、インビボで、すなわち、ストレス負荷したマウスでカスパーゼ - 11の誘導におけるSB203580の影響を調べた。結果を図3に示す。

【0132】

SB203580は、プロカスパーゼ - 11タンパク質のストレスにより誘導された増加を阻害した(図3A)。SB203580処理したマウスでは、副腎におけるカスパーゼ - 1活性(図3B)および血漿中IL - 18レベルも、対照マウス(図3C)に比べて低かった。SB203580とZ - FA - fmkとを併用した処理では、カスパーゼ - 1の活性(図3B)、血漿IL - 18レベル(図3C)および副腎中の24kD IL - 18前駆体レベル(図示せず)のさらなる減少が起らなかった。YVAD - CHOまたはZ - FA - fmkのいずれも、副腎中のP38MAPキナーゼのリン酸化に影響を与えなかった(図3D)。P38MAPキナーゼのリン酸化は、野生型マウス(図3D、レーン2)と同様に、カスパーゼ - 1KOマウス(図3D、レーン5)でストレスにより誘導された。したがって、かかるリン酸化は、カスパーゼ - 1に依存しなかった。

【0133】

[実施例4]

免疫組織化学によるIL - 18、カスパーゼ - 1、カスパーゼ - 11およびP38MAPキナーゼの局在

副腎をホルマリン固定し、パラフィンで包埋し、4 μmの切片に切断した。前記組織切片を抗体(P38 MAPキナーゼ、カスパーゼ - 11、カスパーゼ - 1(前三者は200倍希釈)またはIL - 18(400倍希釈))とともにインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体(Santa Cruz製)およびジアミノベンジン(DBA)を用いて、発色させた。対照として、一次抗体なしの切片およびストレスなしのマウス由来の切片を用いた。結果を図3Eおよび3Fに示す。

【0134】

10

20

30

40

50

ストレス負荷されたマウスにおいて、IL-18、カスパーゼ-1、カスパーゼ-11および活性化P38MAPキナーゼは、副腎皮質の網状帯に共に局在していた(図3E)が、対照マウスではいずれも検出されなかった。カスパーゼ-1の阻害剤(図3F、パネル1)およびカスパーゼ-11の阻害剤(図3F、パネル2)は、副腎皮質においてリン酸化されたP38MAPキナーゼの蓄積には影響なかった。

【0135】

上記実施例3(2)および実施例4の結果より、P38MAPキナーゼは、カスパーゼ-11の誘導を介して血漿IL-18レベルのストレスにより誘導された上昇に関与し、これが次にはカスパーゼ-1を活性化することが示される。

【0136】

[実施例5]

カスパーゼ-1活性の分析

副腎中のカスパーゼ-1活性を、カスパーゼアッセイキット(BD-Pharmingen製)を用いて測定した。簡潔に記載すると、副腎組織のホモジェネートをカスパーゼ-1蛍光基質であるAc-YVAD-MCA(acetyl-L-tyrosyl-L-valyl-L-alanyl-L-aspartic acid 4-methyl-coumaryl-7-amide)とインキュベートし、前記基質から遊離したMCAを、蛍光プレートリーダー(励起波長380nm、放射波長420-460nm)を用いて測定した。

【0137】

[実施例6]

P38MAPキナーゼのアップレギュレーションにおけるスーパーオキシドの関与  
活性酸素種は、肺の繊維芽細胞、好中球および単球においてP38MAPキナーゼのリン酸化を媒介することが報告されている。ストレスを負荷したマウスにおいて、P38MAPキナーゼのリン酸化に対するSODの影響を調べた。結果を図4に示す。

【0138】

SODは、副腎においてP38MAPキナーゼのリン酸化を約70%阻害することがわかる(図4A)。また、SODは、ストレス負荷したマウスでは、プロカスパーゼ-11(図4B)、カスパーゼ-1活性(図4C)および血漿IL-18(図4D)のレベルをも低下させたが、副腎IL-18前駆体タンパク質(図4E)のレベルは低下させなかった。SODとSB203580、Z-FA-fmkまたはYVAD-CHOとの併用処理は、それぞれ、プロカスパーゼ-11、カスパーゼ-1または血漿IL-18のレベルをさらに低下させる結果にはならなかった。血漿IL-18のストレスによる誘導は、DPI、すなわちNADPHオキシダーゼ阻害剤により抑制された(図4F)。これは、P38MAPキナーゼリン酸化を介する血漿IL-18のストレスによる誘導にスーパーオキシドアニオンが関与しているという見解を支持する。

【0139】

[実施例7]

ストレス負荷したマウスの血漿IL-6レベルの制御におけるIL-18の関与

IL-18欠損マウスを用いて、もうひとつのストレス関連サイトカインであるIL-6と、IL-18との間の関連性を調べた。ストレスなしでは、IL-6はWTおよびIL-18KOで検出不可能であったが、3時間のストレスの後に、IL-6レベルはWTで230pg/mlおよびIL-18KOで25pg/mlであった(図5A)。ストレスから開放された後、WTでは血漿IL-6は約80pg/mlに維持されたが、IL-18KOでは5pg/mlに減少した(図5A)。YVAD-CHO、SODおよび抗IL-18抗体での処理は、WTで血漿IL-6レベルのストレスにより誘導された増加を70%阻害した(図5B)。これらの結果から、ストレスがIL-18依存的に血漿中IL-6を誘導することが示唆される。

【0140】

[実施例8]

### IL-18 受容体抗体投与によるループス腎炎の治療

10週令のMRL/lprマウスに3時間の拘束ストレスを負荷し、血漿中のIL-6の濃度を調べた。また、前記マウスにストレス負荷10分前に抗IL-18受容体抗体を投与し、IL-6の濃度の変化を調べた。その結果、ストレス負荷6時間後における血漿中IL-18の濃度は、1132、882および793 pg/mlまで上昇しており、血漿中IL-6の濃度の上昇は、ストレス負荷後3時間でピークに達した。ストレス負荷後のMRL/lprマウスは、血漿中IL-6の上昇が見られたが、ストレス負荷しないマウスではIL-6は検出されなかった。抗IL-18受容体抗体を投与したマウスにストレスを負荷すると、IL-6の上昇は抑制された。

#### 【0141】

MRL/lprマウスは、ループス腎炎を自然発症している。12週令のMRL/lprマウスを3週間に亘って2日毎(3回/週)に6時間の拘束ストレスを負荷した。前記マウスをストレスのみの群、抗IL-6抗体投与群、および抗IL-18受容体抗体投与群に分け、一日尿中のアルブミン量(タンパク尿)を調べた。対照として、ストレスを負荷しないMRL/lprマウスについても調べた。結果を図6に示す。

#### 【0142】

図6より、MRL/lprマウスは、ストレスを負荷することによってタンパク尿が増加し、ループス腎炎の増悪が見られた。しかし、抗IL-6抗体または抗IL-18受容体抗体を投与することにより、MRL/lprマウスは、ストレスによるループス腎炎の増悪が抑制されていることがわかる。特に、抗IL-18受容体抗体の投与が有効であった。

#### 【0143】

##### [実施例9]

ヒト初代培養皮膚角化細胞(ケラチノサイト)を、6cm径の細胞培養用ペトリ皿にケラチノサイト用基礎培地中、 $1.0 - 2.0 \times 10^6 / \text{dish}$  になるように培養した。これを活性酸素発生剤であるパラコート $1 \mu\text{M}$  含む同培地中で15分培養した後でパラコート非含有培地に交換し、さらに1時間培養した後で培地を採取し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。また、パラコート処理時に、活性酸素除去剤であるSODもしくは水溶性ビタミンEをSOD(1, 2.5, 5, 10, 20 U/ml), ビタミンE(100 nM, 1, 2.5, 5, 10 mM/ml)を含む培地中で細胞を培養し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。ケラチノサイトにおいて、活性酸素分子種によるIL-18の活性化と放出が認められた。さらに、これらは活性酸素除去剤であるSOD、あるいは活性酸素を中和するビタミンEによって、用量依存的に抑制された(図7Aおよび7B)。

#### 【0144】

ヒト初代培養皮膚角化細胞(ケラチノサイト: CAMBREX 社から購入)を、6cm径の細胞培養用ペトリ皿にてケラチノサイト用基礎培地中、 $1.0 - 2.0 \times 10^6 / \text{dish}$  になるように培養した。これに紫外線B線(UV-B線)を100 mJ 照射し、その後1時間培養した後で培地を採取して、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。また、UV-B線処理後に、活性酸素除去剤であるSODもしくは水溶性ビタミンEをSOD(1, 2.5, 5, 10, 20 U/ml), ビタミンE(100 nM, 1, 2.5, 5, 10 mM/ml)を含む培地中で細胞を培養し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。ケラチノサイトにおいて、活性酸素分子種によるIL-18の活性化と放出が認められた。さらに、これらは活性酸素除去剤であるSOD、あるいは活性酸素を中和するビタミンEによって、用量依存的に抑制された(図7Cおよび7D)。

#### 【0145】

##### [実施例11]

マウス新生児脳から、Hassanらの方法(Hassan NF, Rifat S, Campbell DE, McCawley LJ, Douglas SD.

10

20

30

40

50

J. Leukoc Biol. 1991 Jul; 50(1): 86-92)で単離した脳マイクログリアを $1.5 - 2.0 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように培養した。これを活性酸素発生剤であるパラコートを $100 \text{ nM}$ 含むダルベッコミニマムエッセンシャル培地中で1時間培養した後でパラコート非含有培地に交換。さらに3時間培養した後で培地を採取し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。また、パラコート処理後に活性酸素除去剤であるSODもしくは水溶性ビタミンEをSOD (1, 2.5, 5, 10, 20 U/ml)、ビタミンE (100 nM, 1, 2.5, 5, 10 mM/ml)含む培地中で細胞を培養し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。マイクログリアにおいて、活性酸素分子種によるIL-18の活性化と放出が認められた。さらに、これらは活性酸素除去剤であるSOD、あるいは活性酸素を中和するビタミンEによって、用量依存的に抑制された(図8Aおよび8B)。

10

## 【0146】

## [実施例12]

マウス新生児脳から、Yangらの方法(Yang P, Hernandez MR. Brain Res Brain Res Protoc. 2003 Oct; 12(2): 67-76)で単離した脳アストロサイトを $1.5 - 2.0 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように調製した。これを活性酸素発生剤であるパラコートを $100 \text{ nM}$ 含むダルベッコミニマムエッセンシャル培地中で1時間培養した後でパラコート非含有培地に交換。さらに3時間培養した後で培地を採取し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。また、パラコート処理後に、活性酸素除去剤であるSODもしくは水溶性ビタミンEをSOD (1, 2.5, 5, 10, 20 U/ml)、ビタミンE (100 nM, 1, 2.5, 5, 10 mM/ml)含む培地中で細胞を培養し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。アストロサイトにおいて、活性酸素分子種によるIL-18の活性化と放出が認められた。さらに、これらは活性酸素除去剤であるSOD、あるいは活性酸素を中和するビタミンEによって、用量依存的に抑制された(図9Aおよび9B)。

20

## 【0147】

## [実施例13]

Hamiltonらの方法(Hamilton TA, Weiel JE, Adams DO. J Immunol. 1984 May; 132(5): 2285-90)でマウスから単離した腹腔マクロファージを $1.0 - 2.0 \times 10^5 / \text{dish}$ になるようダルベッコミニマムエッセンシャル培地中で培養した。培地を、活性酸素発生剤であるパラコートを $100 \text{ nM}$ 含む同培地に交換して15分培養した後でパラコート非含有培地に交換し、さらに3時間培養した後で培地を採取して、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。また、パラコート処理時に、活性酸素除去剤であるSODを(1, 2.5, 5, 10, 20 U/ml)含む培地中で細胞を培養し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。マクロファージにおいて、活性酸素分子種によるIL-18の活性化と放出が認められた。さらに、これらは活性酸素除去剤であるSOD、あるいは活性酸素を中和するビタミンEによって、用量依存的に抑制された(図10Aおよび10B)。

30

40

## 【0148】

## [実施例14]

関節リウマチ患者の病変部位の関節滑膜から採取した滑膜組織をTanakaらの方法(Tanaka M, Harigai M, Kawaguchi Y, Ohts S, Sugiura T, Takagi K, Ohsako-Higami S, Fukasawa C, Hara M, Kamatani N. J Rheumatol. 2001 Aug; 28(8): 1779-87)でウシ胎児血清10%含有RPMI-1640培地中で組織培養した。活性酸素発生剤であるパラコートを $100 \text{ nM}$ 含む同培地に交換して15分培養した後、パラコート非含有培地に交換し、さらに1時間培養した後で培地を採取して、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。ま

50

た、パラコート処理時に、活性酸素除去剤であるSOD (1, 2.5, 5, 10, 20 U / ml)を含む培地中で細胞を培養し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。滑膜組織において、活性酸素分子種によるIL-18の活性化と放出が認められた。さらに、これらは活性酸素除去剤であるSOD、あるいは活性酸素を中和するビタミンEによって、用量依存的に抑制された(図11Aおよび11B)。

#### 【0149】

##### [実施例15]

ヒト初代培養腎近位尿管上皮細胞(CAMBREX社から購入)を、6 cm径の細胞培養用ペトリ皿に腎尿管細胞用基本培地:内容 10  $\mu$ g/ml hEGF(組換えヒト上皮細胞成長因子) 0.5 ml、5 mg/ml インシュリン 0.5 ml、0.5 mg/ml ヒドロコルチゾン 0.5 ml、FBS(ウシ胎児血清) 2.5 ml、0.5 mg/ml エピネフリン 0.5 ml、6.5  $\mu$ g/ml トリヨードチロニン 0.5 ml、10 mg/ml トランスフェリン 0.5 ml、50 mg/ml ゲンタマイシン、50  $\mu$ g/ml アンホテリシン-B 0.5 ml)中 $1.0 - 2.0 \times 10^6$  / dishになるように培養した。これを活性酸素発生剤であるパラコートを100 nM含む同培地中で15分培養し、その後でパラコート非含有同培地に交換した。さらに1時間培養した後で培地を採取し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。また、パラコート処理時に、活性酸素除去剤であるSODもしくは水溶性ビタミンEをSOD (1, 2.5, 5, 10, 20 U / ml), ビタミンE (100 nM, 1, 2.5, 5, 10 mM / ml)を含む培地中で細胞を培養し、培地中のIL-18蛋白の濃度を測定した。腎尿管細胞において、活性酸素分子種によるIL-18の活性化と放出が認められた。さらに、これらは活性酸素除去剤であるSOD、あるいは活性酸素を中和するビタミンEによって、用量依存的に抑制された(図12Aおよび12B)。

#### 【0150】

##### [実施例16]

IL-18は、ACTH、FSH、LHの放出を惹き起す

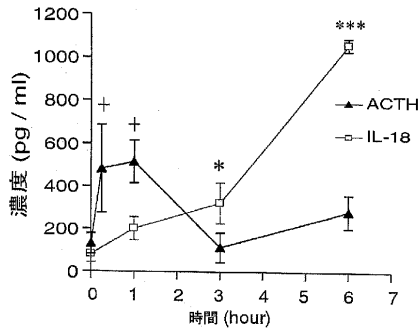
遺伝子組換え技術により作製したIL-18をC57B/6マウスに1.5  $\mu$ g 静脈注射し、以後の血中のACTH、FSHおよびLHのレベルを調べた。図13Aに示すように、血中ACTH濃度はIL-18の投与によって上昇した。図13B、13CにIL-18投与1時間後のマウスから採取した血漿中FSHおよびLHのレベルを示す。IL-18の投与により、FSHおよびLHの血漿中濃度が上昇することが示された。このことから、血中にIL-18の上昇が起きることでACTH、FSH、LHの血中レベルに変動が起きることが理解され、ストレスや活性酸素による血中IL-18の上昇が全身状態を大きく左右することがわかる。

#### 【産業上の利用可能性】

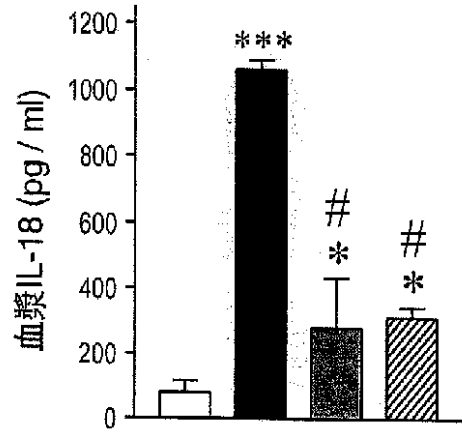
#### 【0151】

本発明は、非炎症性ストレス応答の指標剤、可視化剤、治療剤およびその利用に関し、生体が受ける非炎症性ストレスの程度の測定、非炎症性ストレス応答に基づく免疫状態変動の予防、改善または予想、非炎症性ストレスにより発症、悪化若しくは再発する疾患の予防または治療、非炎症性ストレスにより発症、悪化若しくは再発する疾患に対する治療効果、改善効果若しくは予防効果を有する物質、または酸化ストレスに対する抑制効果若しくは防止効果を有する物質のスクリーニング等に適用できる。

【図 1 A】

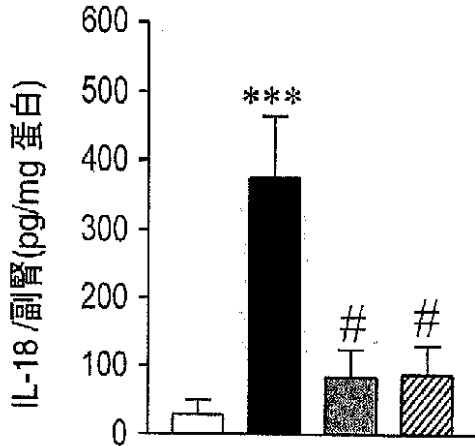


【図 1 B】



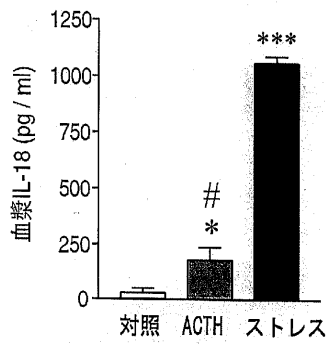
ストレス	-	+	+	+
抗-ACTH 抗体	-	-	+	-
デキサメタゾン	-	-	-	+

【図 1 C】

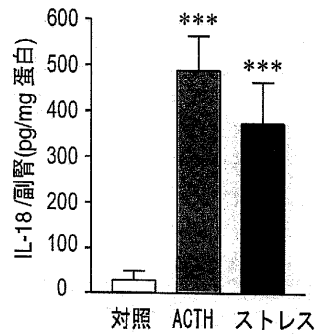


ストレス	-	+	+	+
抗-ACTH 抗体	-	-	+	-
デキサメタゾン	-	-	-	+

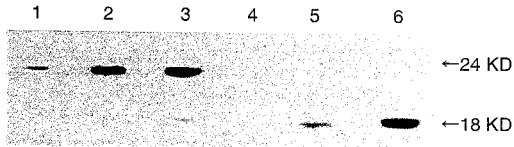
【図 1 D】



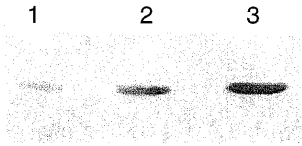
【図 1 E】



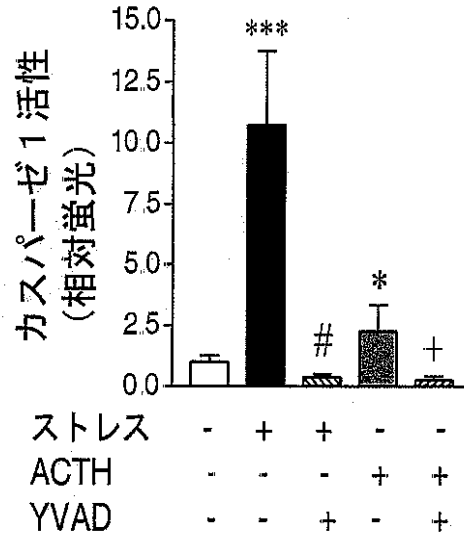
【図 1 F】



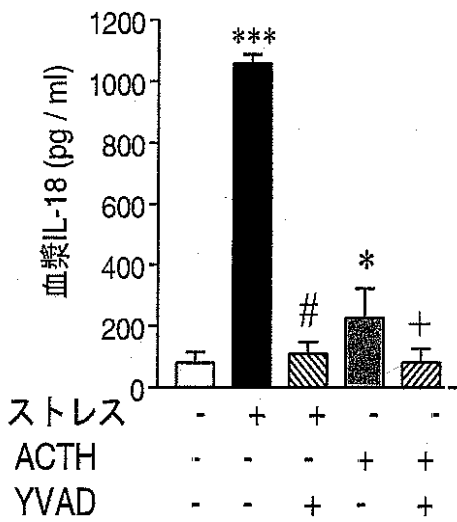
【図 2 A】



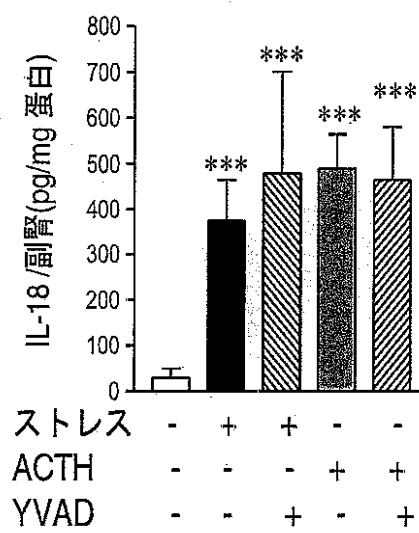
【図 2 B】



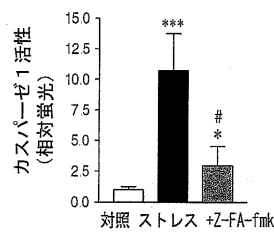
【図 2 C】



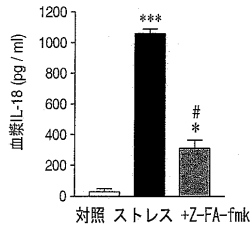
【図 2 D】



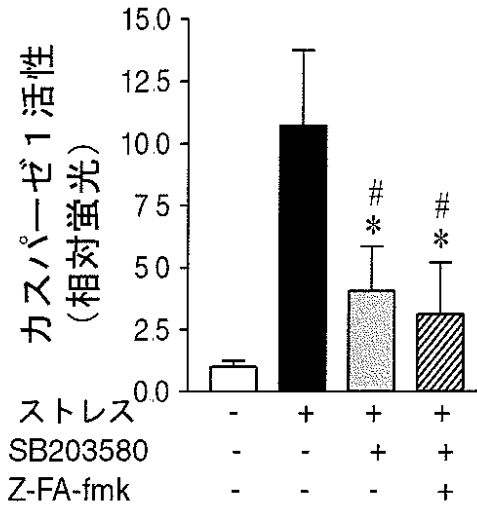
【図 2 E】



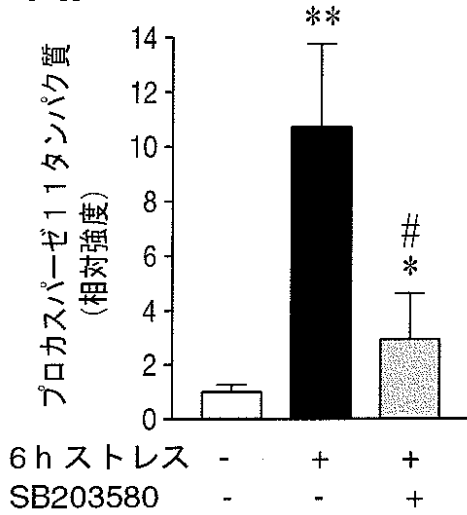
【図 2 F】



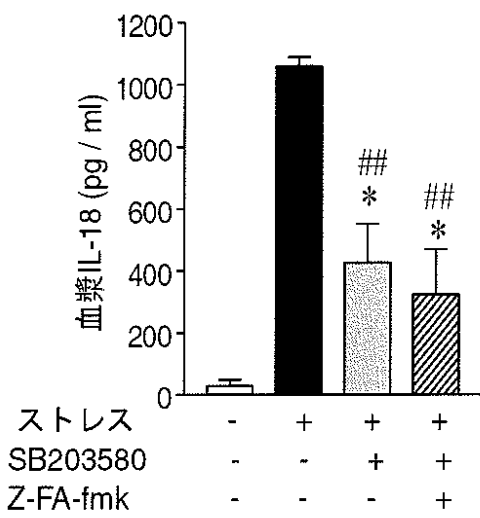
【図 3 B】



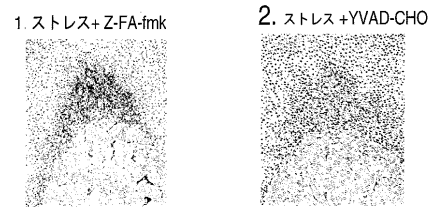
【図 3 A】



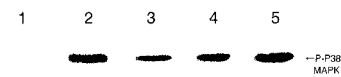
【図 3 C】



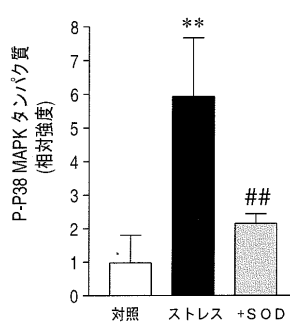
【図 3 F】



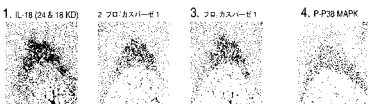
【図 3 D】



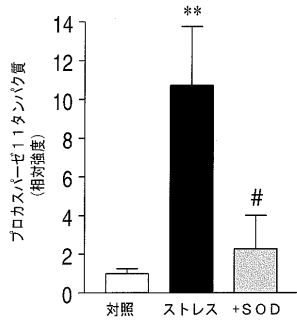
【図 4 A】



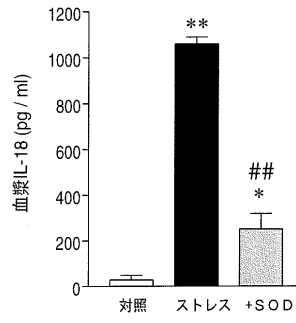
【図 3 E】



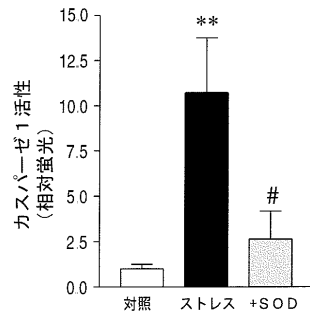
【図4B】



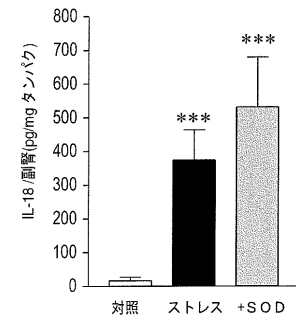
【図4D】



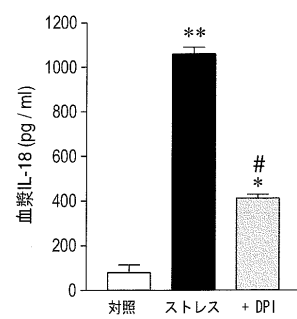
【図4C】



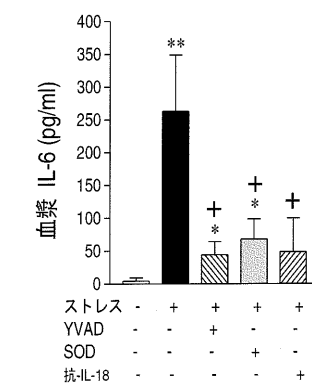
【図4E】



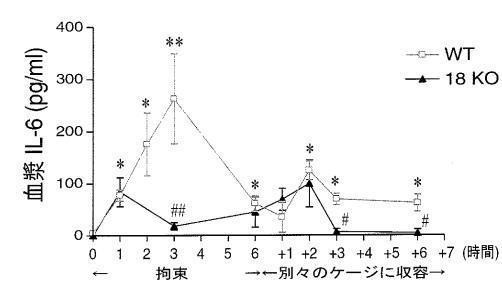
【図4F】



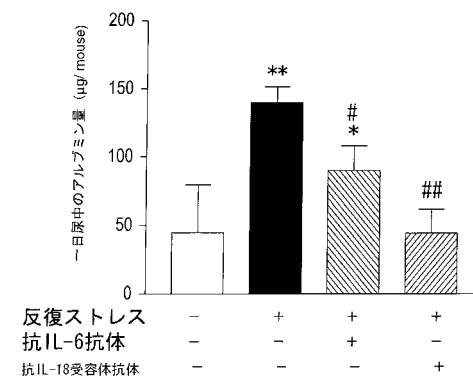
【図5B】



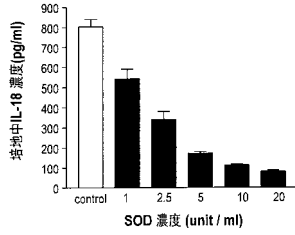
【図5A】



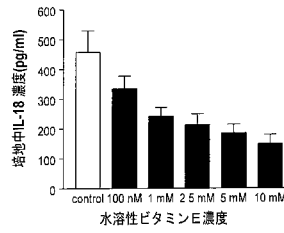
【図6】



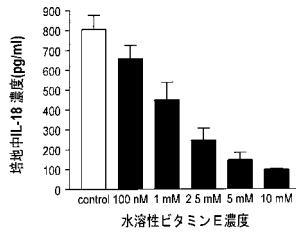
【図7A】



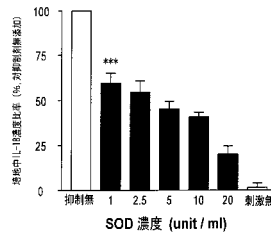
【図7D】



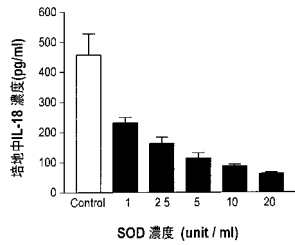
【図7B】



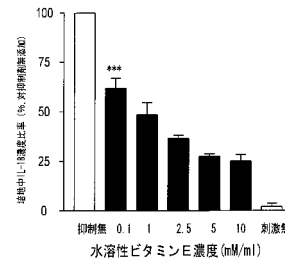
【図8A】



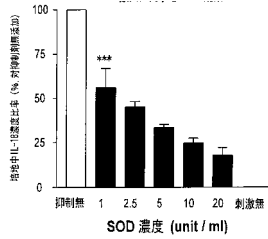
【図7C】



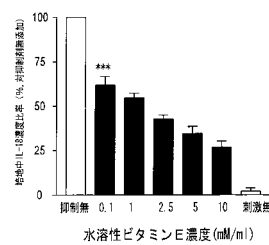
【図8B】



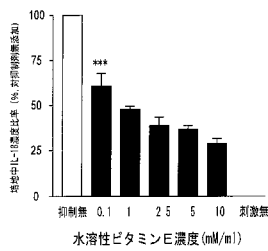
【図9A】



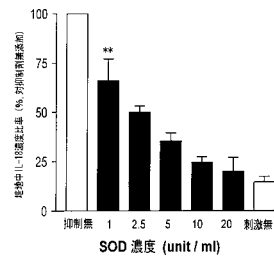
【図10B】



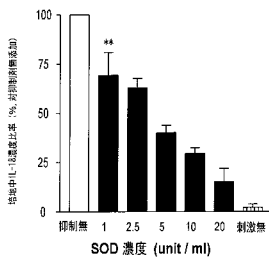
【図9B】



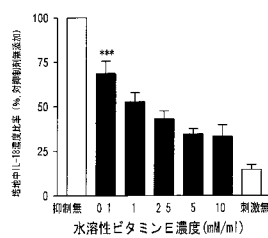
【図11A】



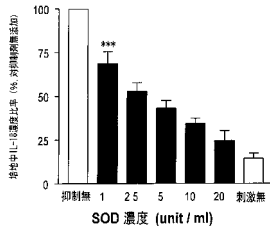
【図10A】



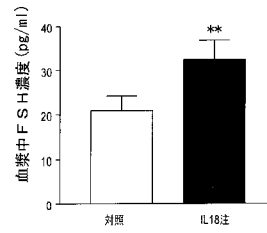
【図11B】



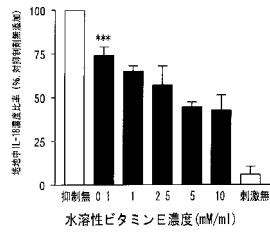
【図 1 2 A】



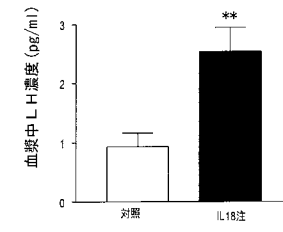
【図 1 3 B】



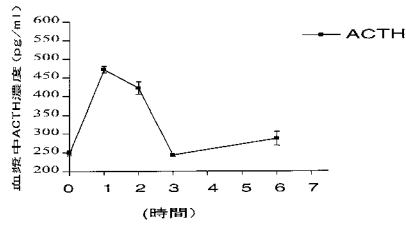
【図 1 2 B】



【図 1 3 C】



【図 1 3 A】



【配列表】

000506900000001.app

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I  
 C 1 2 Q 1/37 (2006.01) C 1 2 Q 1/37

- (56) 参考文献 国際公開第 2 0 0 4 / 0 2 0 5 5 2 ( W O , A 1 )  
 国際公開第 2 0 0 3 / 0 1 3 4 3 8 ( W O , A 1 )  
 国際公開第 0 1 / 0 8 0 8 9 1 ( W O , A 1 )  
 特表 2 0 0 4 - 5 0 0 0 8 6 ( J P , A )  
 関山敦生 他, 活性酸素によって惹起されるカスパーゼ1活性化が, ストレス負荷マウスにおいて血清IL-18上昇を起こす, 日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 2 0 0 4 年 1 1 月 2 5 日, Vol.27th, Page.500  
 関山敦生, 岡村春樹, 「機能性消化管障害」拘束ストレス負荷マウス血中IL-18レベル変化の検討, 日本心療内科学会学術大会プログラム・抄録集, 2 0 0 5 年 1 月 2 9 日, Vol. 9 th, Page.32  
 SEKIYAMA A. et al., IL-18; a cytokine translates a stress into medical science, J. Med. Invest., 2 0 0 5 年, Vol.52 No. Supplement, Page.236-239  
 MARTINON, F. et al., Inflammatory Caspases: Linking an Intracellular Innate Immune System to Autoinflammatory Diseases, Cell (Camb. Mass.), 2 0 0 4 年, Vol.117, No.5, p.561-574  
 CHOI, W. et al., Phosphorylation of p38 MAPK Induced by Oxidative Stress Is Linked to Activation of Both Caspase-8- and -9-mediated Apoptotic Pathways in Dopaminergic Neurons, J. Biol. Chem., 2 0 0 4 年, Vol.279, No.19, p.20451-20460  
 洲鎌秀永 他, ストレスとLPS投与によるIL-18発現調節, 日本内分泌学会雑誌, 2 0 0 4 年 4 月 2 0 日, Vol.80 No.1, Page.144  
 LEE, J. et al., Differences in signaling pathways by IL-1 and IL-18, Proc Natl Acad Sci USA, 2 0 0 4 年 6 月 8 日, Vol.101, No.23, p.8815-8820  
 Kang S.J. et al., Dissociation between neurodegeneration and caspase-11-mediated activation of caspase-1 and caspase-3 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, J. Neurosci., 2 0 0 3 年, Vol.23(13), p.5455-60  
 羽室淳爾, インターロイキンの足跡 IL-18, Biotherapy, 2 0 0 3 年, Vol.17 No.3, Page.291-311

## (58) 調査した分野(Int. Cl., D B 名)

G01N 33/48-33/98  
 G01N 33/15  
 C12Q 1/37  
 C12Q 1/48  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	非炎症应激反应的指标及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP5069000B2</a>	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	JP2006528743	申请日	2005-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	关山Atsushisei		
申请(专利权)人(译)	关山Atsushisei		
当前申请(专利权)人(译)	关山Atsushisei		
[标]发明人	関山敦生		
发明人	関山 敦生		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/15 G01N33/50 C12Q1/48 C12Q1/37		
CPC分类号	A61P1/02 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/00 A61P15/02 A61P15/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/12 A61P17/16 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/08 A61P21/02 A61P21/04 A61P23/00 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/10 A61P25/12 A61P25/16 A61P25/20 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/04 A61P33/06 A61P33/10 A61P35/00 A61P35/02 G01N33/573 G01N33/6869 G01N2333/54 G01N2333/5412 G01N2333/90283 G01N2800/52 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.P G01N33/573.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12Q1/48.Z C12Q1/37		
代理人(译)	高岛肇		
优先权	2004193712 2004-06-30 JP 2005023978 2005-01-31 JP		
其他公开文献	JPWO2006003927A5 JPWO2006003927A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了一种能够分子生物可视化和定量检测暴露于应激的生物体中的事件的系统和一种能够管理压力的装置。用于由超氧化物介导的非炎症应激反应的指示剂，其包含IL-18，用于检测上述指示剂的非炎症应激反应的可视化试剂，测量非炎症应激程度的方法，其包括使用前述可视化试剂，基于非炎症应激反应预防，改善或预测免疫状态变化的方法，其包括将上述可视化试剂应用于动物，和基于免疫状态改变的治疗剂。用于减少上述指示剂的量或活性的非炎症应激反应。

