

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4490576号  
(P4490576)

(45) 発行日 平成22年6月30日(2010.6.30)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.	F I
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50 Z
<b>GO 1 N 33/15 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/15 Z
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 P
A 6 1 K 31/4015 (2006.01)	A 6 1 K 31/4015
A 6 1 K 31/515 (2006.01)	A 6 1 K 31/515

請求項の数 3 (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-325071 (P2000-325071)	(73) 特許権者	000003698
(22) 出願日	平成12年10月25日(2000.10.25)		富山化学工業株式会社
(65) 公開番号	特開2001-194369 (P2001-194369A)		東京都新宿区西新宿3丁目2番5号
(43) 公開日	平成13年7月19日(2001.7.19)	(73) 特許権者	594040224
審査請求日	平成19年7月10日(2007.7.10)		吉野 横一
(31) 優先権主張番号	特願平11-303345		東京都練馬区旭町2-35-14
(32) 優先日	平成11年10月26日(1999.10.26)	(74) 代理人	100068700
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100101317
			弁理士 的場 ひろみ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経系作用薬のスクリーニング方法及びストレス状態の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

自己免疫疾患を発症した哺乳動物に対して被験化合物を投与し、ストレス負荷を与えた後、該動物の血中インターロイキン-6濃度を測定することを特徴とする中枢神経系作用薬のスクリーニング方法。

【請求項2】

中枢神経系作用薬が、催眠作用、解熱作用、鎮痛作用又は脳機能改善作用を有するものである請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項3】

哺乳動物が、げっ歯類である請求項1または2に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、中枢神経系作用薬をスクリーニングするための方法及び免疫系に異常のある哺乳動物のストレス状態を評価する方法に関する。

【0002】

【従来技術】

従来、動物を用いて中枢神経系に作用する化合物をスクリーニングとする方法としては、例えば、抗てんかん薬評価のための最大電撃けいれん(MES)法及びしきい値法(PTZ法)、抗うつ薬評価のための強制水泳試験、抗不安薬評価のための抗コンフリット試験、

脳機能改善薬評価のための抗ハイポキシア試験、抗痴呆薬評価のための電気痙攣ショック誘発健忘モデル及びシクロヘキシミド誘発健忘モデルを用いる方法が挙げられ、正常動物又は病態モデル動物に薬物を投与することにより各種の中樞神経薬がスクリーニングされている。

#### 【0003】

斯かる中樞神経系作用薬をスクリーニングするための評価系は、殆どが行動観察によるものであり、ダブルブラインドを組み合わせて評価しなければならないことが多く、また、いずれも客観的に薬物を評価できるものではなかった。

また、上記のように薬理作用に応じた中樞神経系作用薬のスクリーニング方法は多数存在するものの、薬理作用に関係なく中樞神経系作用薬を広くスクリーニングする方法について

10

はこれまでに知られていない。一方、ストレス関連生体内物質として、カテコールアミン類およびそれらの代謝物、ステロイドホルモン類等が知られており、これらの濃度を測定し、ストレス状態の指標とすることができる。しかし、それらは共存する測定妨害物質の影響を受けやすいため、必ずしも満足できるものではない。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、中樞神経に作用する薬物を広く且つ簡易にスクリーニングするための方法及び免疫系に異常のある哺乳動物のストレス状態を評価する新たな指標を提供することを目的とする。

20

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、斯かる状況の下、血中インターロイキン - 6 (以下、「IL - 6」という) の濃度と中樞神経作用の相関関係について鋭意検討した結果、免疫系に異常のあるモデル動物において、ある薬物投与後短時間の間に炎症等の免疫異常に基づく症状変化とは無関係に血中IL - 6濃度が変化し、これを指標とすることにより、中樞神経系作用薬を簡易にスクリーニングできること及び血中IL - 6濃度の変化がストレス状態の指標となることを見出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0006】

即ち、本発明は、免疫系に異常のある哺乳動物に対して被験化合物を投与し、該動物の血中IL - 6濃度を測定することを特徴とする中樞神経系作用薬のスクリーニング方法及び免疫系に異常のある哺乳動物の血中IL - 6濃度を測定することにより免疫系に異常のある哺乳動物のストレス状態を評価する方法を提供するものである。

30

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のスクリーニング方法及びストレス状態の評価方法は、免疫系に異常のあるモデル動物を用いて、血中IL - 6濃度を測定することを特徴とするものである。

#### 【0008】

IL - 6は、単球、T細胞、B細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞等種々の細胞から産生され、B細胞の抗体産生細胞への分化誘導、肝細胞からの急性期蛋白質合成誘導、脳神経系細胞の分化誘導、造血系細胞の増殖分化誘導、破骨細胞の分化誘導等の多様な生理活性作用を有するサイトカインであるが(実験医学、7巻、1号、1989年)、近年、IL - 6が急性相蛋白を誘導することが報告され炎症マーカーとして有用であることが示唆され、更に開心術症例における検討から、炎症の初期に血中IL - 6が上昇し、IL - 6を炎症マ - カ - とすることにより初期の炎症を感度よく把握できる可能性が示唆されている(臨床病理、42巻、11号、1151 - 1157頁、1994年)。

40

また、最近では慢性関節リウマチ患者において、笑うことにより、血中IL - 6濃度が低下することが報告されている(ジャ - ナル・オブ・リウマトロジ - (Journal of Rheumatology)、23巻、4号、793 - 794頁、1996年)。

#### 【0009】

50

しかし、免疫系に異常のある哺乳動物において、IL-6と中枢作用全般について詳細に検討された報告はこれまでになく、該哺乳動物の血中IL-6濃度が、催眠作用、解熱作用、鎮痛作用、脳機能改善作用等の作用を有する中枢神経系作用薬によって著しく減少することは全く予期することができなかつた事実である。

【0010】

本スクリーニング方法においては、免疫系に異常のある哺乳動物が使用される。

ここで、「免疫系に異常のある」とは、炎症等によって免疫系が亢進した状態をいい、自己免疫疾患を発症した状態が挙げられる。自己免疫疾患としては、慢性関節リウマチ等の慢性炎症疾患が挙げられ、本スクリーニング方法においては特に関節炎が好ましい。また、当該自己免疫疾患は、特定的手段により誘発させたものでも、自然発症型の自己免疫疾患であってもよい。

10

【0011】

自己免疫疾患の誘導手段としては、アジュバントあるいは化学物質を接種する方法、トランスジェニック動物の使用、移植及び遺伝子ノックアウト等が挙げられる。アジュバントを接種して免疫異常を誘発し、関節炎を発症させる方法としては、例えば、結核死菌を流動パラフィンに懸濁し、ラットの尾根部皮内に接種する方法（アルツナイミッテル-フォ-シュング/ドラッグリサーチ（Arzneim.-Forsch./Drug Res.）、42巻、2号、935-944頁、1992年）等が挙げられる。

また、自然発症型の免疫異常を有する動物としては、例えば、MRL/lprマウス等が挙げられる。

20

【0012】

免疫系に異常のある哺乳動物に更にストレス負荷を与えることにより、血中IL-6濃度を有効に上げることができる。斯かるストレス負荷としては、心理的ストレス及び/または物理的ストレス等の如何なる方法を用いてもよいが、例えば、強制水泳、強い光や音の照射、拘束、水浸拘束、過密飼育、電気ショック、低温及び/または高温等が挙げられる。

【0013】

上記哺乳動物としては、ヒト以外の哺乳動物が挙げられ、好ましくは、マウス及びラット等のげっ歯類が挙げられる。

本発明スクリーニング方法において用いられる好ましいモデル動物としては、関節炎を発症したヒト以外の哺乳動物、特にマウス及びラット等のげっ歯類が挙げられ、更にそれらがストレス負荷された状態である場合が好ましい。

30

【0014】

本発明スクリーニング方法で評価される中枢系作用薬としては、例えば、麻酔作用、催眠作用、鎮静作用、解熱作用、鎮痛作用、抗抑鬱作用、脳機能改善作用又は抗（向）精神神経作用等を有する化合物のスクリーニングに適している。

【0015】

また、血中のIL-6濃度を測定するには、例えば、採取した血液あるいは血液から分離した血漿又は血清を使用し、全血中、血漿中又は血清中のIL-6濃度をRIA法、EIA法、ELISA法、バイオアッセイ法等通常用いられる方法により測定すればよい。

40

【0016】

本発明スクリーニング方法は、具体的には、（1）免疫系に異常のある哺乳動物に無毒性量の化合物を経口又は非経口に投与し、（2）ストレスが負荷されない又は負荷された一定時間後の血液を採取し、（3）血液中のIL-6濃度を測定することにより実施できる。特に、炎症を惹起された哺乳動物に被験化合物を投与し、ストレス負荷により血中IL-6の誘導が見られるストレス負荷の至適時間後に血液を採取し、血中IL-6濃度を測定することが好ましい。

尚、血中のIL-6濃度の比較は、同一群を用いてもよいし、化合物投与群及び非投与群で比較してもよい。

この様に測定された血中IL-6の濃度を被験化合物の投与前後で比較し、その濃度が低

50

下した場合に、被験化合物が中枢神経系作用薬であると判断することができる。

【0017】

一方、免疫系に異常のある哺乳動物にストレス負荷を与えることにより、血中IL-6濃度が上昇することから、免疫系に異常のある哺乳動物の血中IL-6濃度を測定することにより、免疫系に異常のある哺乳動物のストレス状態を測定することができる。

【0018】

免疫系に異常のある哺乳動物のストレス状態を評価するための血中IL-6濃度の測定法は、上記した本発明のスクリーニング方法と同様の方法を使用すればよい。すなわち、採取した血液あるいは血液から分離した血漿又は血清を使用し、全血中、血漿中又は血清中のIL-6濃度をRIA法、EIA法、ELISA法、バイオアッセイ法等通常用いられる方法により測定すればよい。

10

【0019】

ストレス状態の評価は、具体的には、(1)免疫系に異常のある哺乳動物に無毒性量の中枢神経系作用薬を経口又は非経口に投与し、(2)一定時間後の血液を採取し、(3)血液中のIL-6濃度を測定する、(4)測定されたIL-6の濃度を化合物の投与前後で比較することにより実施できる。特に、炎症を惹起された哺乳動物に催眠作用、解熱作用、鎮痛作用又は脳機能改善作用を有する化合物、とりわけ、催眠作用又は脳機能改善作用を有する化合物を投与し、至適時間後に血液を採取し、血中IL-6濃度を測定し、比較することが好ましい。

【0020】

20

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

【0021】

実施例1

結核死菌(M.tuberculosis H37Ra、ディフコ社製)を流動パラフィン(メルク社製)に懸濁し(6 mg/mL)、ラット(ルイス系、6-7週齢、雄)の尾根部皮内に0.1 mL接種した[アルツナイミッテル-フォーシュング/ドラッグリサーチ(Arzneim.-Forsch./Drug Res.,)42巻、2号、935-944頁、1992年]。

18日後に、プレチスモメーター ウゴ・バシル7150(PLETHYSMO METER Ugo Basile 7150)で測定した足蹠容積が均等になるように一群5又は6匹に群分けした。ストレス負荷群は、東大薬作型ストレスケージに入れ、23 の水槽内に胸部まで浸して、ストレス負荷した[薬物活性の前臨床的評価法、96-97頁、藤村・福田編、薬事日報社]。30分後、エーテル麻酔下、採血し、血清分離剤入スピッツ(セパクリーン、栄研器材)により血清を分離した。各血清中のIL-6濃度をMH60・BSF2細胞[ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.)、18巻、951-956頁、1988年]による増殖活性により測定し、既知量のIL-6の増殖活性をもとに血清中のIL-6量を算出した。尚、血清中IL-6は、ストレスを負荷した関節炎ラットのIL-6濃度(units/ml)を100%として相対的(T/C:%)に示した。また、ELISAキットを用いて、血清中のコルチゾール濃度を測定した。

30

結果を表1に示す。

40

【0022】

【表1】

群	ストレス負荷	血清中 I L - 6 (units/mL)	血清中コルチゾール (ng/mL)
正 常	無	検出不可	7.2
関節炎	無	88	4.2
関節炎	有	186	17.9

10

## 【 0 0 2 3 】

上記の結果は、免疫異常状態を起こしたアジュバント関節炎ラットに水浸拘束ストレスを負荷することにより血清中 I L - 6 の上昇と同時にストレスマーカーとして知られている血清中コルチゾールが上昇していることを示している。すなわち、この結果は、免疫系に異常のある哺乳動物において、血中 I L - 6 濃度は、ストレス状態の指標となりうることを示している。

## 【 0 0 2 4 】

## 実施例 2

結核死菌 (M.tuberculosis H37Ra、ディフコ社製) を流動パラフィン (メルク社製) に懸濁し (6mg/mL)、ラット (ルイス系、6 - 7 週齢、雄) の尾根部皮内に 0.1mL 接種した [アルツナイミッテル - フォーシュング / ドラッグリサーチ (Arzneim.-Forsch./Drug Res.,) 42 巻、2号、935-944頁、1992年]。 20

18日後に、プレチスモメーター、ウゴ・パシル7150 (PLETHYSMO METER、Ugo Basile 7150) で測定した足蹠容積が均等になるように一群6又は7匹に群分けした。各被験化合物を投与し、60分後に東大薬作型ストレスケージに入れ、23 の水槽内に胸部まで浸して、ストレス負荷した [薬物活性の前臨床的評価法、96-97頁、藤村・福田編、薬事日報社]。30分後、エーテル麻酔下、採血し、血清分離剤入スピッツ (セパクリーン、栄研器材) により血清を分離した。

各血清中の I L - 6 濃度を MH60・BSF2 細胞 [ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.)、18巻、951-956頁、1988年] による増殖活性により測定し、既知量の I L - 6 の増殖活性をもとに血清中の I L - 6 量を算出した。尚、血清中 I L - 6 は、ストレスを負荷した関節炎ラットの I L - 6 濃度 (units/ml) を 100% として相対的 (T/C: %) に示した。 30

被験化合物としては、催眠作用を有するペントバルビタールナトリウム (PE)、シナプス伝達効率改善作用、脳内アセチルコリン系神経調節作用及び脳エネルギー代謝改善作用を有するアニラセタム (AN) を用い、ペントバルビタールナトリウムは、ストレス負荷直前に投与した。

結果を表 2 に示す。

## 【 0 0 2 5 】

## 【表 2】

40

群	被験化合物	用量・用法	ストレス負荷	血清中 I L - 6 (T/C : %)
正 常	—		無	検出不可
正 常	—		有	検出不可
関節炎	—		無	79
関節炎	—		有	100
関節炎	PE	25mg/kg i.p.	有	32
関節炎	AN	30mg/kg p.o.	有	44
関節炎	AN	300mg/kg p.o.	有	28

10

## 【 0 0 2 6 】

免疫異常状態を起こしたアジュバント関節炎ラットでは、ストレス無負荷の群でも血清中 I L - 6 は検出されたが、ストレス負荷により血清中 I L - 6 濃度は更に上昇した。これに対し、ペントバルビタールナトリウム及びアニラセタムを投与した群では、血清中 I L - 6 の低下が見られた。

20

## 【 0 0 2 7 】

## 【 発 明 の 効 果 】

本発明のスクリーニング方法を用いれば、中枢神経系に作用する薬物を広く且つ簡易にスクリーニングすることができ、新規な中枢神経系作用薬の開発及び副作用として中枢作用を有する薬物のスクリーニングが可能となる。また、本発明の評価方法は、免疫系に異常のある哺乳動物のストレス状態を見るための有用な手段の一つとなる。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 25/04 (2006.01) A 6 1 P 25/04  
A 6 1 P 25/20 (2006.01) A 6 1 P 25/20  
A 6 1 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28

(72)発明者 吉野 横一  
東京都練馬区旭町 2 - 3 5 - 1 4

(72)発明者 相川 幸彦  
富山県富山市水橋中村町 2 3 0

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開平 0 8 - 2 4 5 4 1 4 ( J P , A )  
特開平 0 6 - 0 6 5 0 6 8 ( J P , A )  
特開平 1 0 - 2 1 8 7 7 0 ( J P , A )  
特開平 1 0 - 0 8 1 6 2 9 ( J P , A )  
特開平 0 7 - 2 8 7 0 0 8 ( J P , A )  
THEISEN-POPP,P. et al. , Interleukin-6 (IL-6) in adjuvant arthritis of rats and its pharmacological modulation , Int.J.Immunopharmacol. , 1 9 9 2 年 , Vol.14, No.4 , p.565-71  
MAES,M. et al. , The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety , Cytokine , 1 9 9 8 年 , Vol.10, No.4 , p.313-8

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/50

G01N 33/15

G01N 33/53

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	筛选中枢神经系统激动剂的方法和评估应激状态的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4490576B2</a>	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	JP2000325071	申请日	2000-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	富山化学工业株式会社 吉野真一		
申请(专利权)人(译)	富山化工有限公司 吉野真一		
当前申请(专利权)人(译)	富山化工有限公司 吉野真一		
[标]发明人	吉野 禎一 相川幸彦		
发明人	吉野 禎一 相川 幸彦		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 A61K31/4015 A61K31/515 A61P25/04 A61P25/20 A61P25/28		
FI分类号	G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.P A61K31/4015 A61K31/515 A61P25/04 A61P25/20 A61P25/28		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/CB17 2G045/DA80 4C086/AA02 4C086/BC08 4C086/BC42 4C086/NA14 4C086/NA20 4C086/ZA02 4C086/ZA05 4C086/ZA07 4C086/ZA08 4C086/ZA15		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	1999303345 1999-10-26 JP		
其他公开文献	JP2001194369A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决方案：这种中枢神经系统激动剂的筛选方法的特征在于给予具有免疫系统异常的哺乳动物的测试化合物并测量动物的血液白细胞介素6浓度，以及筛选中枢神经系统激动剂的方法。评估方法。【效果】可以广泛且容易地筛选作用于中枢神经系统的药物，筛选具有中枢作用的药物作为新型中枢神经系统激动剂的发展和副作用，免疫系统异常的哺乳动物的压力对状态的评估成为可能。

群	ストレス負荷	血清中IL-6 (units/mL)	血清中コルチゾール (ng/mL)
正 常	無	検出不可	7.2
関節炎	無	88	4.2
関節炎	有	186	17.9