

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年2月6日(06.02.2014)

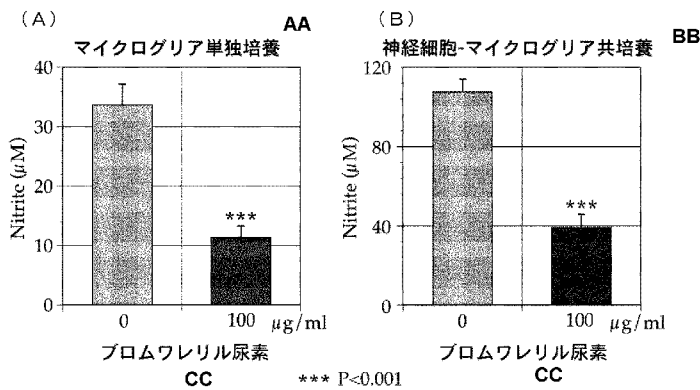


(10) 国際公開番号
WO 2014/021455 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/17 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/071028
- (22) 国際出願日: 2013年8月2日(02.08.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2012-173405 2012年8月3日(03.08.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人愛媛大学(EHIME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市道後樋又10番13号 Ehime (JP).
- (72) 発明者: 田中 潤也(TANAKA Junya); 〒7910295 愛媛県東温市志津川 国立大学法人愛媛大学プロテオ医学研究センター内 Ehime (JP).
- (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町134 京都リサーチパーク1号館301号室 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: IMMUNE CELL ACTIVATION INHIBITOR AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 免疫細胞の活性化抑制剤およびその用途



AA Microglia monoculture
 BB Neuron-microglia coculture
 CC Bromovalerylurea

(57) Abstract: Provided is a medicine which can be widely used for intractable neurological disorders, inflammatory diseases, etc. This immune cell activation inhibitor is characterized in comprising bromovalerylurea or a derivative thereof. This immune cell activation inhibitor can be used as a medicine, for example, for chronic neurological disorders such as Parkinson's disease and Alzheimer, acute neurological disorders such as cerebral infarction and cerebral damage, and inflammatory diseases such as systemic inflammatory response syndrome.

(57) 要約: 難治性神経疾患および炎症性疾患等に広く使用可能な医薬を提供する。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことを特徴とする。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー等の慢性神経疾患、脳梗塞および脳損傷等の急性神経疾患、全身性炎症性反応症候群等の炎症性疾患等の医薬品として使用できる。



WO 2014/021455 A1

明 細 書

発明の名称：免疫細胞の活性化抑制剤およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、免疫細胞の活性化抑制剤に関し、さらに、神経細胞の保護剤、神経疾患用医薬および全身性炎症性反応症候群用医薬に関する。

背景技術

[0002] 脳梗塞、脳損傷、パーキンソン病およびアルツハイマー病等は、神経細胞死を伴う難治性神経疾患として知られている。近年、これらの疾患の増加が問題視されており、予防および治療に関する研究が進められている。しかしながら、現状の医薬では十分といえず、これらの疾患に対して広く優れた治療効果を示す医薬の開発が求められている。

[0003] また、腹膜炎等から続発する敗血症は、非常に致死率の高い疾患として知られている。しかしながら、敗血症に対しては、現状、一般的な呼吸循環機能に対する集中治療が主であり、この他には、抗菌薬法が行われている程度である。このため、敗血症に対して、普遍的に使用可能な速効性および特効性のある医薬の開発が求められている。これは、敗血症だけでなく、その他の全身性炎症反応症候群についても同様である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：望月 秀樹、「パーキンソン病の治療と病態」、臨床神経、2010; 50: 623-627

非特許文献2：Kumar, A. et al., A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: A meta-analytic/meta-regression study. Critical care medicine, 2011; 38: 1651-1664.

非特許文献3：Pieracci, F. M. and Barie, P. S., Management of

severe sepsis of abdominal origin. Scandinavian Journal of Surgery 2007; 96: 184-196.

非特許文献4: Ballard, C, et al. Alzheimer' s disease. Lancet, 2011; 377: 1019-1031

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] そこで、本発明は、難治性神経疾患、全身性炎症反応症候群、炎症性皮膚疾患等に広く使用可能な医薬の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 前記目的を達成するために、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことを特徴とする。

[0007] 本発明の神経細胞の保護剤は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする。

[0008] 本発明の神経疾患用医薬は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする。

[0009] 本発明の炎症性疾患用医薬は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことにより、免疫細胞の活性化を抑制できる。そして、ブロムワレリル尿素またはその誘導体は、このように前記免疫細胞の活性化を抑制できることから、例えば、神経細胞死を伴う神経疾患の治療または炎症性疾患の治療に利用できる。このため、本発明は、医薬の分野において、極めて有用といえる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、実施例1において、培養系における一酸化窒素の産生量を示すグラフであり、(A)は、マイクログリア単独培養系、(B)は、神経細胞-マイクログリア共培養系の結果である。

[図2]図2は、実施例1において、マイクログリア単独培養系における一酸化窒素合成酵素のmRNAの転写量を示すグラフである。

[図3]図3(A)は、実施例1において、神経細胞-マイクログリア共培養系におけるMAP2の発現量を示すグラフであり、図3(B)は、実施例1において、マイクログリア単独培養系における一酸化窒素合成酵素の発現量を示すグラフであり、図3(C)は、実施例1において、神経細胞-マイクログリア共培養系における一酸化窒素合成酵素の発現量を示すグラフである。

[図4]図4(A)は、実施例1において、モデルラットにおけるチロシンヒドロキシラーゼの発現量を示すグラフであり、図4(B)は、実施例1において、前記モデルラットが回転棒から落下するまでに要した回転棒の総回転数を表すグラフである。

[図5]図5は、実施例2において、モデルラットにおける脳の組織喪失の割合を示すグラフである。

[図6]図6(A)は、実施例2において、培養系における一酸化窒素合成酵素の発現量を示すグラフであり、図6(B)は、前記培養系における一酸化窒素の産生量を示すグラフである。

[図7]図7は、実施例2において、培養系における各種因子のmRNAの転写量を示すグラフである。

[図8]図8(A)は、実施例2において、脳損傷のラットの脳の断面写真であり、図8(B)は、前記脳損傷のラットにおける脳の組織喪失の割合を示すグラフである。

[図9]図9は、実施例3において、生存率を示すグラフである。

[図10]図10(A)は、実施例3において、培養系におけるIL-1 β 産生量を示すグラフであり、図10(B)は、前記培養系におけるIL-6産生量を示すグラフである。

[図11]図11(A)は、実施例3において、敗血症モデルラットの血清IL-6産生量を示すグラフであり、図11(B)は、前記敗血症モデルラットの血清クレアチニン量を示すグラフである。

[図12]図12(A)～(C)は、実施例3において、敗血症ラットの小腸を示す写真である。

[図13]図13(A)～(C)は、実施例3において、敗血症ラットの小腸を示す顕微鏡写真である。

[図14]図14(A)は、一酸化窒素合成酵素の発現量を示すグラフであり、図14(B)は、IL-1 β 産生量を示すグラフであり、図14(C)は、IL-6産生量を示すグラフである。

[図15]図15(A)～(E)は、実施例4において、炎症性皮膚疾患の患者の腹部の写真である。

[図16]図16(A)および(B)は、実施例4において、炎症性皮膚疾患の患者の両膝内側皮膚の写真である。

[図17]図17(A)および(B)は、実施例4において、アトピー性皮膚炎モデルマウスの背部皮膚を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0012] (免疫細胞の活性化抑制剤)

本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、前述のように、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことを特徴とする。

[0013] 本発明は、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。ブロムワレリル尿素またはその誘導体は、免疫細胞の活性化を抑制でき、具体的には、例えば、免疫細胞の異常活性化を抑制できる。

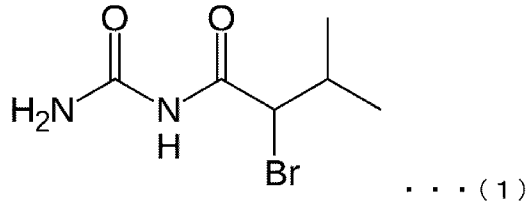
[0014] 本発明者は、鋭意研究の結果、ブロムワレリル尿素が、以下に示すように、種々の免疫細胞の活性化を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。神経細胞死を伴う神経疾患は、脳の免疫細胞であるマイクログリアが強く活性化されることにより、神経細胞傷害性因子である一酸化窒素および起炎症性サイトカインが放出され、さらなる神経細胞死が誘発される。これに対して、ブロムワレリル尿素は、前述のように、免疫細胞であるマイクログリアまたはマクロファージの活性化、すなわち、マイクログリアまたは

マクロファージの神経細胞傷害を抑制できることが、本発明者らによって明らかとなった。このように、ブロムワレリル尿素によれば、マイクログリアまたはマクロファージの活性化を抑制できるため、例えば、前述のような神経細胞傷害性因子である一酸化窒素および起炎症性サイトカインの放出が抑制され、その結果、神経細胞死の誘発が抑制され、後述するような神経疾患を治療できると解される。また、敗血症等の全身性炎症反応症候群（以下、SIRSという）も、免疫細胞が異常に活性化されることにより、多種多量の起炎症性サイトカインが放出され、サイトカインストームと呼ばれる状態が誘発される。この誘発により、さらに、肺、腎臓、心臓等の多くの臓器の機能が急速に悪化し、死に至る場合がある。これに対して、ブロムワレリル尿素は、前述のように、免疫細胞の活性化を抑制できるため、例えば、炎症組織への免疫細胞の集積が抑制し、起炎症性サイトカインの濃度増加が抑制され、その結果、臓器の傷害を低減できると解される。また、前記SIRSの他に、各種炎症性疾患に対しても同様のことがいえる。ブロムワレリル尿素は、例えば、睡眠鎮静薬として公知であるが、本発明における効果は、本発明者が初めて見出したことであり、また、前述のような作用機序により、前記各種疾患に効果を示すことも、本発明者が初めて見出したことである。また、ブロムワレリル尿素は、前述のように、睡眠鎮静薬として承認されていることから、その安全性も信頼性に優れる。

[0015] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、例えば、後述するように、神経細胞の保護剤または神経細胞の細胞死抑制剤として使用できる。また、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、例えば、神経疾患用医薬、および炎症性疾患用医薬として使用できる。前記免疫細胞は、例えば、脳の免疫細胞として、マイクログリアまたはマクロファージがあげられる。

[0016] ブロムワレリル尿素は、下記式（1）で表わされる。ブロムワレリル尿素は、例えば、ブロムバレリル尿素あるいはブロムイソバルともいう。前記ブロムワレリル尿素は、例えば、水和物でもよいし、溶媒和物でもよい。

[化1]



[0017] 前記ブロムワレリル尿素の誘導体は、特に制限されず、例えば、前記式（1）のブロムワレリル尿素の異性体または塩等があげられ、水和物でもよいし、溶媒和物でもよい。以下、ブロムワレリル尿素に関する記載は、前記誘導体に援用できる。

[0018] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、例えば、in vivoで使用してもよいし、in vitroで使用してもよい。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、例えば、研究用試薬として使用することもでき、医薬品として使用することもできる。後者の場合、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、免疫細胞の活性化抑制用の医薬または医薬組成物ということもできる。

[0019] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の投与対象は、特に制限されない。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤をin vivoで使用する場合、前記投与対象は、例えば、ヒト、または、ヒトを除く非ヒト動物があげられる。前記非ヒト哺乳類としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ウマ、ネコ、ヤギ、サル、モルモット等の非ヒト動物等があげられる。前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤をin vitroで使用する場合、前記投与対象は、例えば、細胞、組織、器官等があげられ、前記細胞は、生体から採取した細胞、培養細胞等があげられる。

[0020] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の使用条件は、特に制限されず、例えば、投与対象の種類等に応じて、投与形態、投与時期、投与量等を適宜設定できる。

[0021] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の使用量は、特に制限されない。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤をin vivoで使用する場合、例えば、投与対象の種類、症状、年齢、投与方法等により適宜決定できる。具体例として

、ヒトに投与する場合、1日あたりのブロムワレリル尿素の投与量は、合計が、例えば、100～5000mgであり、好ましくは、500～2500mgであり、1日あたりの投与回数は、例えば、1～5回であり、好ましくは1～3回である。前記活性化抑制剤におけるブロムワレリル尿素の含有量は、特に制限されず、例えば、前述の投与条件に応じて適宜設定できる。

[0022] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の投与形態は、特に制限されない。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を in vivo で投与する場合、例えば、経口投与でもよいし、非経口投与でもよい。前記非経口投与は、例えば、静脈注射、筋肉注射、皮下投与、直腸投与、経皮投与、腹腔内投与、局所投与等があげられる。

[0023] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の剤型は、特に制限されず、例えば、前記投与形態に応じて適宜決定できる。前記剤型は、例えば、液体状、固体状があげられる。経口投与の場合、例えば、錠剤、被覆錠剤、丸剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、液剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等があげられる。非経口投与の場合、前記剤型は、例えば、注射用製剤、点滴用製剤等があげられる。経皮投与の場合、前記剤型は、例えば、貼付剤、塗布剤、軟膏、クリーム、ローション等の外用薬があげられる。

[0024] 本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、例えば、必要に応じて、添加剤を含んでもよく、本発明の活性化抑制剤を医薬として使用する場合、前記添加剤は、薬学上許容される添加剤が好ましい。前記添加剤は、特に制限されず、例えば、基剤原料、賦形剤、着色剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定化剤、保存剤、香料等の矯味矯臭剤等があげられる。本発明において、前記添加剤の配合量は、前記ブロムワレリル尿素の機能を妨げるものでなければ、特に制限されない。

[0025] 前記賦形剤は、例えば、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、ソルビトール等の糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 α デンプン、デキストリン等のデンプン誘導体；結晶セルロース等のセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルラン等の有機系賦形剤；軽質無水珪

酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム等のケイ酸塩誘導体；リン酸水素カルシウム等のリン酸塩；炭酸カルシウム等の炭酸塩；硫酸カルシウム等の硫酸塩等の無機系賦形剤があげられる。前記滑沢剤は、例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム等のステアリン酸金属塩；タルク；ポリエチレングリコール；シリカ；硬化植物油等があげられる。前記矯味矯臭剤は、例えば、ココア末、ハッカ脳、芳香散、ハッカ油、竜脳、桂皮末等の香料、甘味料、酸味料等があげられる。前記結合剤は、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、ポリビニルピロリドン、マクロゴール等があげられる。前記崩壊剤は、例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等のセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン等の化学修飾デンプンおよび化学修飾セルロース類等があげられる。前記安定剤は、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン等のパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコール等のアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾール等のフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；ソルビン酸等があげられる。

[0026] (神経細胞の保護剤)

本発明の神経細胞の保護剤は、前述のように、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする。本発明の神経細胞の保護剤は、例えば、神経細胞の変性抑制剤ということもできる。

[0027] 本発明は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むこと、つまり、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。本発明の神経細胞の保護剤は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の記載を援用できる。

[0028] (神経疾患用医薬)

本発明の神経疾患用医薬は、前述のように、本発明の免疫細胞の活性化抑

制剤を含むことを特徴とする。

[0029] 本発明は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むこと、つまり、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。本発明の神経疾患用医薬は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の記載を援用できる。

[0030] 本発明の神経疾患用医薬は、神経疾患の予防、治療および／または予後の改善等に使用できる。本発明の神経疾患用医薬は、例えば、神経疾患の治療剤、予防剤または改善剤ということもできる。

[0031] 本発明の対象となる神経疾患は、例えば、難治性神経疾患があげられ、具体例として、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、多系統萎縮症、多発性硬化症等の慢性神経疾患、および、脳梗塞、脳損傷、脳出血、脊髄損傷、脊髄虚血等の急性神経疾患あげられる。

[0032] (炎症性疾患用医薬)

本発明の炎症性疾患用医薬は、前述のように、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする。

[0033] 本発明は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を含むこと、つまり、ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。本発明の炎症性疾患用医薬は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の記載を援用できる。

[0034] 本発明の炎症性疾患用医薬は、炎症性疾患の予防、治療および／または予後の改善等に使用できる。本発明において、前記炎症性疾患は、特に制限されず、例えば、前記SIRS、炎症性皮膚疾患等があげられる。

[0035] 本発明において、SIRSとは、例えば、SIRSを引き起こす原因となる疾患、および、播種性血管内凝固症候群(DIC)等のSIRSに伴う疾患の意味も含む。前記疾患としては、例えば、敗血症、敗血症に伴う敗血症性ショック、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、反応性リンパ増殖等があげられる。また、これらの他にも、前記疾患は、大量のサイトカイン産生を伴

う病態として、熱傷、急性膵炎、虚血再灌流傷害、外科手術、多発外傷等があげられる。本発明の炎症性疾患用医薬は、例えば、S I R S用医薬であり、前記疾患の治療剤、予防剤または改善剤ということもできる。

[0036] 本発明において、前記炎症性皮膚疾患は、特に制限されず、例えば、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、乾癬、湿疹、おむつ皮膚炎、脂漏性皮膚炎、ヴィダール苔癬、自家感作性皮膚炎、老人性乾皮症、光線性皮膚疾患、水疱症、ケロイド、紅皮症、薬疹および中毒疹等があげられる。本発明の炎症性疾患用医薬は、例えば、炎症性皮膚疾患用医薬であり、前記疾患の治療剤、予防剤または改善剤ということもできる。

[0037] (免疫細胞の活性化抑制方法)

本発明の免疫細胞の活性化抑制方法は、投与対象に、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を投与することを特徴とする。

[0038] 本発明は、前記本発明の免疫細胞の活性化抑制剤を投与することが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤は、前述の通りである。本発明の免疫細胞の活性化抑制剤の投与条件は、特に制限されず、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤における記載と同様である。

[0039] (神経細胞の保護方法)

本発明の神経細胞の保護方法は、投与対象に、前記本発明の神経細胞の保護剤を投与することを特徴とする。本発明の神経細胞の保護方法は、例えば、神経細胞の変性抑制方法ということもできる。

[0040] 本発明は、前記本発明の神経細胞の保護剤を投与することが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。本発明の神経細胞の保護剤は、前述の通りである。本発明の神経細胞の保護剤の投与条件は、特に制限されず、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤における記載と同様である。

[0041] (治療方法)

本発明の神経疾患の治療方法は、投与対象に、前記本発明の神経疾患用医薬を投与することを特徴とする。

[0042] 本発明は、前記本発明の神経疾患用医薬を投与することが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。本発明の神経疾患用医薬は、前述の通りである。本発明の神経疾患用医薬の投与条件は、特に制限されず、本発明の免疫細胞の活性化抑制剤における記載と同様である。

[0043] 本発明の炎症性疾患の治療方法は、投与対象に、前記本発明の炎症性疾患用医薬を投与することを特徴とする。

[0044] 本発明は、前記本発明の炎症性疾患用医薬を投与することが特徴であって、その他の構成は何ら制限されない。本発明の炎症性疾患用医薬は、前述の通りである。本発明の炎症性疾患用医薬の投与条件は、特に制限されず、本発明の炎症性疾患用医薬における記載と同様である。

[0045] (ブロムワレリル尿素またはその誘導体の使用)

本発明は、前記免疫細胞の活性化抑制のためのブロムワレリル尿素またはその誘導体であり、また、前記神経細胞の保護または変性抑制のためのブロムワレリル尿素もしくはその誘導体であり、また、前記神経疾患の治療のためのブロムワレリル尿素またはその誘導体であり、また、前記炎症性疾患の治療のためのブロムワレリル尿素またはその誘導体である。また、本発明は、前記各種医薬の製造のためのブロムワレリル尿素またはその誘導体の使用である。

[0046] 本発明において、治療は、例えば、疾患の予防、疾患の治療、疾患の予後の改善の意味を含む。

実施例

[0047] つぎに、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は、下記実施例により制限されない。市販の試薬は、特に示さない限り、それらのプロトコールに基づいて使用した。

[0048] [実施例 1]

ブロムワレリル尿素のパーキンソン病に対する効果を確認した。

[0049] (1) 一酸化窒素の放出抑制

以下に示すように、ブロムワレリル尿素およびLPS（リポポリサッカラ

イド)の共存下、ラット新生仔由来一次培養マイクログリア(MG)を培養し、神経細胞傷害因子である一酸化窒素について、MGからの放出量を確認した。

[0050] 培養系として、前記MG単独の系と、前記MGとラット由来一次培養大脳皮質神経細胞との共培養系を準備し、培養を行った。培地は、最終濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のLPSおよび最終濃度 $0.100\mu\text{g}/\text{ml}$ のブロムワレリル尿素を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を基本培地とする無血清培地(pH7.4)を使用した。培養条件は、 37°C 、48時間、5% CO_2 とした。そして、培養終了時における前記培養液中の亜硝酸イオンの濃度を、Griess試薬を用いて測定した。MGから放出された一酸化窒素は、培養液中で酸化されて亜硝酸イオンに変化するため、亜硝酸イオンの測定により、放出された一酸化窒素を間接的に測定した。

[0051] この結果を図1に示す。図1は、各培養系の亜硝酸イオンの濃度($\mu\text{mol}/\text{L}$)を示すグラフであり、図1(A)が、MG単独の培養系の結果であり、図1(B)は、MGと神経細胞との共培養系の結果である。図1(A)に示すように、ブロムワレリル尿素($100\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加することによって、MGから放出される亜硝酸イオンの濃度が有意に減少した。また、MGは、通常、神経細胞と共培養することにより強く活性化され、大量の一酸化窒素を放出するが、図1(B)に示すように、ブロムワレリル尿素の添加によって、有意に放出される亜硝酸イオンの濃度を抑制できた。この結果から、ブロムワレリル尿素によって、細胞傷害性因子である一酸化窒素について、MGからの放出を抑制できることがわかった。

[0052] (2) 一酸化窒素合成酵素の転写抑制

前記(1)における一酸化窒素の放出抑制が、LPSで誘導される一酸化窒素合成酵素(誘導型; iNOS)の転写レベルの抑制であることを確認した。具体的には、前記(1)と同様にして、MG単独培養系について培養を行い、リアルタイム逆転写(RT)-PCRにより、iNOSのmRNAの

転写量を測定した。リアルタイムRT-PCRは、常法にしたがって行った。そして、ブロムワレリル尿素が未添加の培養系のmRNAの転写量を100%として、各培養系について相対値(%)を求めた。

[0053] この結果を図2に示す。図2は、各培養系のiNOSのmRNAの転写量の相対値(%)を示すグラフである。図2に示すように、ブロムワレリル尿素を添加することによって、iNOSのmRNAの転写量が有意に減少した。この結果から、ブロムワレリル尿素による一酸化窒素の産生抑制は、iNOSの転写レベルで生じていることがわかった。

[0054] (3) MAP2発現およびiNOSの発現抑制

前記MGのみの培養系および前記MGと前記神経細胞の共培養系について、神経細胞特異的タンパク質であるMAP2の発現と一酸化窒素を産生するiNOSタンパク質の発現とを測定した。

[0055] 前記(1)と同様にして、培養を行った後、マウス由来MAP2に対する抗体(商品名Mouse monoclonal 抗MAP2抗体(クローンAP20)、Sternberger Monoclonals社製)、マウス由来iNOSに対する抗体(商品名Mouse monoclonal 抗iNOS抗体(クローン6)、BD Biosciences社製)を用いたウェスタンブロットング法により、タンパク質の発現量に相当するMAP2の免疫活性およびiNOSの免疫活性を測定した。各免疫活性は、ブロムワレリル尿素が未添加の培養系の免疫活性を100%として、各培養系について相対値(%)を求めた。

[0056] この結果を図3に示す。図3(A)は、前記共培養系に関するMAP2の免疫活性を示すグラフであり、図3(B)は、前記MG単独の培養系に関するiNOSの免疫活性を示すグラフであり、図3(C)は、前記共培養系に関するiNOSの免疫活性を示すグラフである。図3(A)に示すように、ブロムワレリル尿素を添加することによって、ブロムワレリル尿素未添加と比較して、神経細胞特異的タンパク質であるMAP2の発現量が著しく増加した。この結果から、前記共培養系において、神経細胞の細胞死が抑制されたことがわかる。また、図3(B)および(C)に示すように、ブロムワレ

リル尿素を添加することによって、ブロムワレリル尿素の濃度依存的に、iNOSの発現量が減少した。これらの結果により、ブロムワレリル尿素によれば、LPSで誘導されるiNOSの発現を抑制し、神経細胞の細胞死を抑制できることがわかった。

[0057] (4) パーキンソンモデルラットにおけるドーパミン神経細胞死の抑制

6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)でパーキンソン病を誘発するラットパーキンソン病モデルを使用し、ブロムワレリル尿素による神経細胞死の抑制を確認した。

[0058] 前記モデルラットは、6-OHDAを右側線状体注入することにより右側中脳黒質のドーパミン神経細胞傷害が誘発されるラットのモデルを使用した(Choudhuryら、Brain and Behavior, 1:26-43, 2011参照)。前記モデルラット(n=5)に、ブロムワレリル尿素濃度が500mg/Lである飲料水を、一日1匹当たり平均25mlの飲水量となるようにし、7日間経口投与した。つぎに、経口投与最終日に、前記モデルラットを解剖し、右側および左側の中脳黒質をそれぞれ採取した。そして、前記中脳黒質について、ドーパミン神経細胞マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)の測定を、イムノブロットにより行った。また、コントロールとして、ブロムワレリル尿素を添加した飲料水に代えて、ブロムワレリル尿素を未添加の飲料水を使用して、同様にTHを測定した。そして、各ラット群について、傷害が誘発されない左側の中脳黒質のTHの免疫活性(L)に対する、障害が誘発される右側の中脳黒質のTHの免疫活性(R)の比(%)を、下記式に基づいて算出した。

$$\text{相対値 (\%)} = 100 \times R / L$$

[0059] また、7日間ブロムワレリル尿素を経口投与した前記モデルラットを、さらに3日間飼育し、その後、回転棒試験により運動機能を測定した。

[0060] この結果を図4に示す。図4(A)は、THの免疫活性を示すグラフである。図4(A)に示すように、ブロムワレリル尿素が未添加のコントロールは、右側の中脳黒質のTH免疫活性が著しく低下したのに対して、ブロムワレ

リル尿素を添加した実施例は、右側の中脳黒質のTH免疫活性の低下が、十分に抑制された。この結果から、ブロムワレリル尿素によれば、中脳黒質におけるドーパミン神経細胞の細胞死を抑制できることがわかった。また、図4(B)は、回転棒試験の結果を示すグラフであり、前記モデルラットが、回転棒から落下するまでに要した回転棒の総回転数を表す。ブロムワレリル尿素を投与した前記モデルラットは、ブロムワレリル尿素未添加の前記モデルラットよりも、回転棒により長時間乗ることができた。この結果から、ブロムワレリル尿素によれば、パーキンソン病による運動障害を抑制できることが分かった。

[0061] [実施例2]

ブロムワレリル尿素の脳梗塞に対する効果を確認した。

[0062] (1) 脳梗塞モデルラットにおける組織喪失の抑制

右側中大脳動脈90分間一過性閉塞による脳梗塞モデルラットを使用し、ブロムワレリル尿素による組織喪失の抑制を確認した。

[0063] 前記モデルラットは、Wistar系雄ラットを使用した(Matsumotoら、Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2008) 28: 149-163)。MRI撮像により、十分に脳梗塞を生じているモデルラットのみを選抜し(n=4)、ブロムワレリル尿素濃度が500mg/Lである飲料水を、一日1匹当たり平均25mlの飲水量となるようにし、14日間経口投与した。そして、最後の経口投与日から16日目に、前記モデルラットを解剖し、脳の中大脳動脈灌流領域を採取した。前方から後方にスライスした7層のうち、上から2番目、3番目および4番目の層について、梗塞を生じていない左半球および梗塞を生じている右半球について、それぞれ別々に合計体積を測定し、平均値を求めた(L:左半球の合計体積、R:右半球の合計体積)。そして、下記式に基づいて、組織喪失の割合(%)を算出した。

$$\text{組織喪失の割合(\%)} = 100 \times (L - R) / L$$

[0064] この結果を図5に示す。図5は、脳の組織喪失の割合を示すグラフである。図5に示すように、ブロムワレリル尿素が未添加のコントロールと比較し

て、ブロムワレリル尿素を添加した実施例は、脳の組織喪失の割合を低減できた。この結果から、ブロムワレリル尿素によれば、脳梗塞における脳の組織喪失を抑制できることがわかった。

[0065] (2) iNOSの発現抑制および一酸化窒素の産生抑制

ブロムワレリル尿素による、脳梗塞巣に集積するマクロファージBINCsにおける前記iNOSの発現抑制および一酸化窒素の産生抑制を確認した。前記BINCsについては、Matsumotoら、Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (2008) 28: 149-163を参照した。

[0066] 前記マクロファージとして、中大脳動脈一過性閉塞によるラット脳梗塞巣核心部由来の一次培養脳マクロファージ(BINCs)を使用し、培養を行った。培地は、最終濃度0または100 μ g/mlのブロムワレリル尿素を含む前記DMEMを基本培地とする無血清培地(pH7.4)を使用した。培養条件は、37 $^{\circ}$ C、24時間、5% CO₂とした。そして、培養終了時における前記培養液中の亜硝酸イオンを測定した。また、イムノブロットにより、iNOSおよび β -アクチンを測定し、これらの免疫活性の比(iNOS/ β -アクチン)を算出した。そして、ブロムワレリル尿素が未添加の培養系の比を100%として、各培養系について相対値(%)を求めた。

[0067] この結果を図6に示す。図6(A)は、iNOSの免疫活性を示すグラフであり、図6(B)は、亜硝酸イオン濃度を示すグラフである。図6(A)に示すように、ブロムワレリル尿素を添加することによって、iNOSの発現量が減少した。また、図6(B)に示すように、ブロムワレリル尿素を添加することによって、亜硝酸イオンの産生量、すなわち一酸化窒素の産生量が減少した。これらの結果により、ブロムワレリル尿素によれば、脳梗塞巣に集積するマクロファージBINCsにおけるiNOSの発現を抑制し、一酸化窒素の産生を抑制できることがわかった。

[0068] (3) 炎症性反応の抑制

ブロムワレリル尿素による、脳梗塞巣に集積するマクロファージBINCsにおける炎症性反応の抑制を確認した。

[0069] 前記(2)と同様にして、マクロファージの培養を行った。そして、培養終了後の培地について、各種因子のmRNAの転写量を、RT-PCRにより測定した。そして、ブロムワレリル尿素が未添加の培養系のmRNAの転写量を100%として、各培養系について相対値(%)を求めた。

[0070] この結果を図7に示す。図7は、各種因子のmRNAの転写量の相対値を示すグラフである。図7に示すように、神経細胞傷害因子であるIL-1 β 、IL-6、IFN β およびBakのmRNAの転写量および神経細胞傷害因子である一酸化窒素を生成する酵素iNOSのmRNAの転写量は、ブロムワレリル尿素の濃度依存的に減少した。これに対して、細胞の生育において有用な因子であるHGFおよびIGF-1のmRNAの転写量は、ブロムワレリル尿素の添加によっても減少せず、ブロムワレリル尿素による影響を受けなかった。

[0071] (4) 針刺し損傷に対する脳の組織喪失の抑制

頭蓋外より注射針を刺入することによって脳損傷を起こすラット脳損傷モデルを使用し、ブロムワレリル尿素による組織喪失の抑制を確認した。

[0072] ラットは、Wistar系雄ラットを使用した。ラット大脳の大泉門後方2mm、右外側2mmの部位に、針(18ゲージ注射針)を挿し、前後約120度の角度で扇形の損傷を作成した。そして、前記ラット(n=5)に、ブロムワレリル尿素濃度が500mg/Lである飲料水を、一日1匹当たり平均25mlの飲水量となるようにし、60日間経口投与した。そして、最後の経口投与日から3日目に、前記ラットを解剖し、大脳を採取した。前方から後方にスライスした7層のうち、上から2-5番目の層について、左半球と右半球に分けて体積を測定し、平均値を求めた(L:左半球の体積、R:右半球の体積)。対照実験として、同様に脳損傷を作成したラットについて、前記ブロムワレリル尿素を未添加の飲料水を経口投与し、同様に、脳の体積を測定した。そして、下記式に基づいて、組織喪失の割合(%)を算出した。

$$\text{組織喪失の割合(\%)} = 100 \times (L - R) / L$$

[0073] この結果を図8に示す。図8(A)は、脳の組織喪失を示す写真であり、左が、ブロムワレリル尿素未添加の飲料水の投与群であり、右が、ブロムワレリル尿素添加の飲料水の投与群である。図8(A)に示すように、ブロムワレリル尿素未添加の投与群では、顕著な脳組織喪失がみられたのに対して、ブロムワレリル尿素添加の投与群では、脳組織喪失が抑制された。また、図8(B)は、脳の組織喪失割合を示すグラフである。図8(B)に示すように、ブロムワレリル尿素未添加の投与群(−)と比較して、ブロムワレリル尿素を添加した投与群(+)は、脳の組織喪失の割合を低減できた。これらの結果から、ブロムワレリル尿素によれば、脳損傷による脳の組織喪失を抑制できることがわかった。

[0074] [実施例3]

ブロムワレリル尿素の敗血症に対する効果を確認した。

[0075] (1) 生存率改善効果

Wistar雄8週齢ラット盲腸を結紮し、18ゲージ注射針によって結紮部盲腸に2箇所穿孔を作成し、腹膜炎穿孔からのラット敗血症モデルとした。モデル作製の直後に、最終濃度500 μ g/mlとなるようにブロムワレリル尿素を溶解した、市販の維持輸液(ソリタT3、味の素製薬)10mlを、皮下に注射した。対照群は、ブロムワレリル尿素未添加の前記維持輸液のみを、同量、皮下に注射した。以後、約12時間ごとに、同様に注射をおこなった。また、開腹手術すなわち、皮膚と腹膜の切開を行っただけで、腸管に損傷を与えないラットを、偽手術群とした。前記偽手術群には、皮下注射は行わなかった。そして、切開から8日間にわたって、各群のモデルマットの結果を確認した。

[0076] これらの結果を図9に示す。図9において、■が、偽手術群の結果であり、●が、ブロムワレリル尿素未添加の対照群の結果であり、▲が、ブロムワレリル尿素添加の実施例群である。図9に示すように、前記偽手術群(Sham)は、死亡率0%であった。そして、ブロムワレリル尿素未添加の対象群(Sepsis/control)は、8日目において死亡率80%であったのに対して、ブロムワ

レリル尿素添加の実施例群(Sepsis/BU)は、有意差 $P < 0.0001$ で、死亡率を47%に抑制することができた。この結果から、ブロムワレリル尿素は、有意な救命効果を示すことがわかった。

[0077] (2) 起炎症性インターロイキン産生の抑制

ブロムワレリル尿素による、腹腔マクロファージによるインターロイキンの産生抑制を確認した。

[0078] マクロファージとして、Wistarラットの腹腔内より採取したマクロファージを使用し、培養を行った。培地は、最終濃度0、30、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のブロムワレリル尿素を含む前記DMEMを基本培地とする無血清培地(pH7.4)を使用した。培養条件は、37 $^{\circ}\text{C}$ 、18時間、5% CO_2 とした。そして、培養終了時における前記培養液中のIL-6およびIL-1 β の濃度を、ELISAにより測定した。

[0079] この結果を図10に示す。図10(A)は、IL-1 β の産生量を示すグラフであり、図10(B)は、IL-6の産生量を示すグラフである。図10(A)および(B)に示すように、ブロムワレリル尿素を添加することによって、ブロムワレリル尿素の濃度依存的に、IL-6およびIL-1 β の産生量が減少した。この結果により、ブロムワレリル尿素によれば、炎症を抑制できることがわかった。

[0080] (3) 敗血症モデルラットにおけるIL-6の抑制と腎不全の抑制

敗血症モデルラットを使用し、ブロムワレリル尿素によるIL-6の抑制を確認した。

[0081] 前記敗血症モデルラットは、Wistar雄ラットを使用し、盲腸結紮後に18ゲージ注射針により、2箇所穿孔を設けることにより作成した。前記モデルラット($n=10$)に、ブロムワレリル尿素を最終濃度500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した市販の維持輸液(ソリタT3、味の素製薬)を、1回当たり10ml、一日あたり合計20mlとなるように、午前と午後の2回に分けて、約1日間、合計3回皮下注射した。3回目の皮下注射後、すなわち、腹膜炎穿孔後の敗血症モデル作製の翌日、前記モデルラットの血清

を回収し、血清IL-6をELISAにより測定した。比較例として、前記敗血症ラットに、ブロムワレリル尿素未添加の前記維持輸液を皮下注射し、同様に、血清IL-6を測定した。また、コントロールとして、開腹手術のみを施行した非敗血症ラット（偽手術群）について、同様に、血清IL-6を測定した。さらに、各血清について、腎不全の指標となる血清中のクレアチニン濃度の測定も行った。

[0082] この結果を図11に示す。図11(A)は、血清IL-6を示すグラフである。図11に示すように、ブロムワレリル尿素が未添加の比較例(-)と比較して、ブロムワレリル尿素を添加した実施例は、血清IL-6を著しく低減できた。この結果から、ブロムワレリル尿素によれば、敗血症におけるサイトカインストームを抑制できることがわかった。

[0083] 図11(B)は、血清中のクレアチニン濃度を示すグラフである。ブロムワレリル尿素未添加の比較例(-)では、クレアチニン濃度が有意に上昇し、腎不全を生じた。これに対して、ブロムワレリル尿素添加の実施例(+)は、ブロムワレリル尿素の皮下注射により、クレアチニン濃度が、ほぼ正常レベルにまで回復した。この結果は、敗血症から誘発される腎不全あるいは多臓器不全の発症を、ブロムワレリル尿素が顕著に抑制できることを示すといえる。

[0084] (4) 敗血症モデルラットにおける炎症の抑制

敗血症モデルラットを使用し、ブロムワレリル尿素による小腸の腫れと炎症の抑制を確認した。

[0085] 前記(3)と同じ敗血症モデルラットに、最終濃度500 μ g/mlとなるようにブロムワレリル尿素を溶解した市販の維持輸液(ソリタT3、味の素製薬)を、皮下注射により1日2回投与した。そして、敗血症モデル作製の翌日、前記モデルラットの小腸を開腹により確認した(敗血症/治療群)。また、ブロムワレリル尿素未添加の前記維持輸液を皮下注射した敗血症モデル(敗血症/非治療群)、および開腹手術のみを施行した非敗血症ラット(偽手術群)についても、同様とした。

[0086] これらの結果を図12に示す。図12は、小腸の写真であり、(A)は、偽手術群、(B)は、敗血症／非治療群、(C)は、敗血症／治療群の結果である。図12(B)において、矢印で示すように、ブロムワレリル尿素未添加の敗血症／非治療群は、小腸に腫れが生じた。これに対して、図12(C)において、矢印で示すように、ブロムワレリル尿素添加の敗血症／治療群は、小腸の腫れが顕著に抑制され、図12(A)の偽手術群と同様であった。

[0087] さらに、各群の小腸の顕微鏡写真を、図13に示す。図13において、(A)は、偽手術群、(B)は、敗血症／非治療群、(C)は、敗血症／治療群の結果である。図13(B)に示すように、この小腸の腫れは、リンパ球、マクロファージ、好中球等の白血球が高度に集積するためと解される。この結果から、ブロムワレリル尿素によれば、例えば、小腸リンパ組織の反応性増殖を抑制し、炎症を抑制できることがわかった。

[0088] (5) iNOS誘導およびインターロイキン産生の抑制

ブロムワレリル尿素による、肺胞マクロファージによるiNOS誘導およびインターロイキン産生の抑制を確認した。

[0089] マクロファージとして、Wistarラット肺胞由来のマクロファージを使用し、培養を行った。培地は、最終濃度0、30、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のブロムワレリル尿素を含む、前記DMEMを基本培地とする無血清培地(pH7.4)を使用した。培養条件は、37 $^{\circ}\text{C}$ 、18時間、5% CO_2 とした。そして、培養終了時に肺胞マクロファージの全RNAを集め、iNOS、IL-6およびIL-1 β をコードするmRNAの転写量を定量的リアルタイムRT-PCRにより測定した。ブロムワレリル尿素が未添加の培養系の測定値を100%として、各培養系について相対値(%)を求めた。

[0090] この結果を図14に示す。図14(A)は、iNOSの相対値であり、図14(B)は、IL-1 β の相対値であり、図14(C)は、IL-6の相対値である。図14に示すように、ブロムワレリル尿素を添加することによって、ブロムワレリル尿素の濃度依存的に、iNOS、IL-1 β およびIL-

L-6の各mRNAの転写量が減少した。この結果により、ブロムワレリル尿素によれば、炎症を抑制できることがわかった。また、肺胞マクロファージによる炎症性サイトカインの発現を抑制できることから、例えば、敗血症により併発されるARDS等の抑制も可能と考えられる。

[0091] [実施例4]

ブロムワレリル尿素による、炎症性皮膚疾患における炎症の抑制を確認した。

[0092] (1) 下着ゴムによる接触皮膚炎の炎症の抑制

ヒルドイドソフト軟膏0.3% (マルホ株式会社製) に、1% (w/w) となるように、ブロムワレリル尿素を溶解し、ブロムワレリル尿素軟膏 (BU軟膏) を調製した。次に、下着の着用時、前記下着のゴムにより生じた接触皮膚炎を原発巣とし、自家感作性皮膚炎に発展した炎症性皮膚疾患の患者に対して、腹部の丘疹を含む炎症領域 (約25cm²) に、前記BU軟膏0.5gを塗布した。そして、前記BU軟膏の塗布直前、塗布後25分および3時間において、前記腹部を観察した。さらに、同患者に対して、引き続き、前記BU軟膏を1日2回、10日間、前記炎症領域に塗布した。そして、前記塗布開始から10日目の前記腹部および塗布を中止してから10日目 (塗布開始から20日目) において、前記腹部を同様に観察した。

[0093] この結果を図15に示す。図15は、前記患者の前記腹部の写真である。図15において、(A) は、塗布前、(B) は、塗布後25分、(C) は、塗布後3時間、(D) は、塗布開始から10日目、(E) は、塗布中止から10日目の写真を示す。

[0094] 前記BU軟膏の塗布前、前記患者は、前記腹部の炎症領域に強い掻痒感を感じており、図15 (A) に示すように、患者の腹部には、多数の丘疹 (直径1cm以下の皮膚の隆起) が発生し、前記丘疹上における掻破痕 (図15 (A) 中の矢尻) および新鮮な紅色のびらん (図15 (A) 中の矢印) が確認された。そして、塗布後15分ごろから、前記患者は、前記腹部の炎症領域における掻痒感が治まっており、塗布後25分において、図15 (B) に

示すように、図15(A)で確認された前記丘疹は、消退傾向にあることが確認された。さらに、塗布後3時間において、前記患者は、前記腹部の炎症領域の掻痒感が消失し、図15(C)に示すように、丘疹の消退が顕著となり、図15(A)で確認されたびらんの紅色は退色し(図15(C)の矢印)、前記丘疹上の掻破痕も、図15(A)の状態よりも目立たなくなった(図15(C)の矢尻)。そして、塗布開始から10日目には、前記腹部に赤みは若干残ったものの、前記患者に自覚症状はなく、図15(D)に示すように、丘疹は確認されなかった。また、塗布中止から10日目においても、図15(E)に示すように、丘疹は発生しておらず、炎症の再発は確認されなかった。これらの結果から、ブロムワレリル尿素によれば、接触皮膚炎における炎症を抑制し、炎症性皮膚疾患を治療できることがわかった。

[0095] (2) ストッキングゴムによる接触皮膚炎の炎症の抑制

ストッキングの着用時、前記ストッキングのゴムにより両膝内側に接触皮膚炎を発症した患者に対して、左膝内側の線上の膨疹(約20cm²)に、前記(1)で調製したBU軟膏0.4gを塗布した。そして、前記BU軟膏の塗布直前および塗布後35分において、前記左膝内側を観察した。また、コントロールは、ブロムワレリル尿素未添加の前記ヒルドイドソフト軟膏0.3%(コントロール軟膏)を使用し、同患者の右膝内側の線上の膨疹に塗布した以外は、同様にして前記右膝内側を観察した。

[0096] この結果を図16に示す。図16は、前記患者の膝内側の写真である。図16において、(A)は、塗布前、(B)は、塗布後35分の写真であり、(A)および(B)において、上段が、コントロール軟膏を使用した結果、下段が、BU軟膏を使用した結果である。

[0097] 前記BU軟膏および前記コントロール軟膏の塗布前、図16(A)に示すように、前記患者の両膝内側の皮膚において、ほぼ対称的に紅斑および線状の膨疹(図16(A)上下の写真において実線で囲んだ領域)が発生し、痒みを伴っていた。そして、前記コントロール軟膏を塗布した右膝は、塗布後35分においても、図16(B)の上段に示すように、紅斑および膨疹に変

化はなく（図16（B）上段の写真において実線で囲んだ領域）、痒みも持続していた。他方、前記BU軟膏を塗布した左膝は、塗布後35分において、図16（B）の下段に示すように、紅斑が消失し、膨疹もほとんど消退し、痒みは消失した。これらの結果から、ブロムワレリル尿素によれば、接触皮膚炎における炎症を抑制し、炎症性皮膚疾患を治療できることがわかった。

[0098] （3）アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける炎症の抑制

マウスアトピー性皮膚炎モデルマウスを使用し、ブロムワレリル尿素によるアトピー性皮膚炎における炎症の抑制を確認した。

[0099] NC/Nga雌8週齢マウス（n=6）の背部皮膚に、ダニ虫体成分を含有する軟膏（ビオスタAD、株式会社ビオスタ社製）を塗布し、アトピー性皮膚炎を誘導した。前記軟膏の塗布は、そのマニュアルにしたがって、週2回、合計3週間行った。次に、アトピー性皮膚炎を誘導した前記モデルマウス（n=3）の前記背部皮膚（約7cm²）に、前記BU軟膏0.1gを塗布した。そして、前記BU軟膏の塗布直前および塗布後5時間において、前記背部皮膚を観察した。さらに、前記モデルマウスに対して、引き続き、前記BU軟膏を1日2回、6日間、前記背部皮膚に塗布した。そして、前記塗布開始から6日目の前記背部皮膚および塗布を中止してから6日目（塗布開始から12日目）の前記背部皮膚を観察した。コントロールは、アトピー性皮膚炎を誘導した前記モデルマウス（n=3）に、前記BU軟膏に代えて、前記（2）の前記コントロール軟膏を塗布した以外は、同様にして前記背部皮膚を観察した。

[0100] この結果を図17に示す。図17は、前記モデルマウスの背部皮膚の写真である。図17において、（A）は、前記コントロール軟膏を塗布したモデルマウス（対照群）であり、（B）は、前記BU軟膏を塗布したモデルマウス（BU群）であり、（A）および（B）ともに、上から、塗布前、塗布後5時間、塗布開始6日目、塗布中止6日目の結果である。

[0101] 前記BU軟膏および前記コントロール軟膏の塗布前、図17（A）および

(B) の 1 段目に示すように、前記モデルマウスの前記背部皮膚において、出血（白抜き矢印）および表皮の突起（発疹）が観察された。そして、図 17 (A) に示すように、前記コントロール軟膏を塗布した対照群は、2 段目に示すように、塗布後 5 時間においても、出血（白抜き矢印）が確認され、3 段目に示すように、塗布開始 6 日目には、皮膚の落屑（矢尻）も確認され、4 段目に示すように、塗布中止 6 日目には、無毛部（黒色矢印）が広く残存した。これに対して、図 17 (B) に示すように、前記 BU 軟膏を塗布した対照群は、2 段目に示すように、塗布後 5 時間において、出血が抑制され、発疹が消失し、3 段目に示すように、塗布開始 6 日目に、皮膚の落屑は確認されず、4 段目に示すように、塗布中止 6 日目には、前記背部は全体が毛で覆われていた。なお、図 17 には、対照群の 1 例、BU 群の 1 例の結果を示したが、残りのモデルマウスについても同様の結果が得られた。これらの結果から、ブロムワレリル尿素によれば、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性皮膚炎を治療できることがわかった。

[0102] 以上、実施形態および実施例を参照して本願発明を説明したが、本願発明は、上記実施形態および実施例に限定されるものではない。本願発明の構成や詳細には、本願発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をすることができる。

[0103] この出願は、2012年8月3日に提出された日本出願特願2012-173405を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

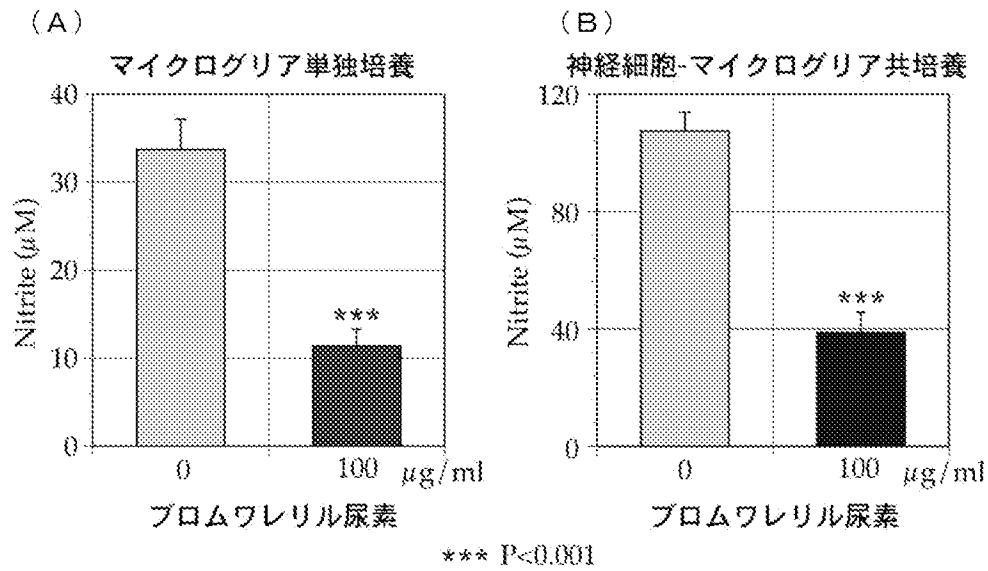
産業上の利用可能性

[0104] 以上のように、本発明によれば、ブロムワレリル尿素を含むことにより、免疫細胞の活性化を抑制できる。そして、ブロムワレリル尿素は、このように前記免疫細胞の活性化を抑制できることから、例えば、神経細胞死を伴う神経疾患の治療、炎症性疾患の治療に利用できる。このため、本発明は、医薬分野において、極めて有用といえる。

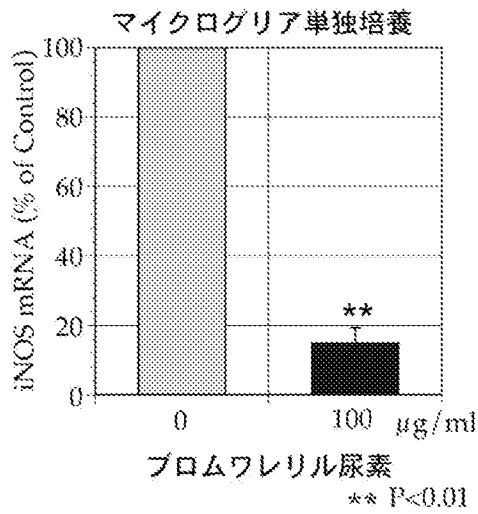
請求の範囲

- [請求項1] ブロムワレリル尿素またはその誘導体を含むことを特徴とする免疫細胞の活性化抑制剤。
- [請求項2] 前記免疫細胞が、マイクログリアまたはマクロファージである、請求項1記載の免疫細胞の活性化抑制剤。
- [請求項3] 請求項1または2記載の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする神経細胞の保護剤。
- [請求項4] 請求項1または2記載の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする神経疾患用医薬。
- [請求項5] 前記神経疾患が、パーキンソン病およびアルツハイマー病の少なくとも一方の変性神経疾患である、請求項4記載の神経疾患用医薬。
- [請求項6] 前記神経疾患が、脳梗塞および脳損傷の少なくとも一方の急性神経疾患である、請求項4記載の神経疾患用医薬。
- [請求項7] 請求項1または2記載の免疫細胞の活性化抑制剤を含むことを特徴とする炎症性疾患用医薬。
- [請求項8] 前記炎症性疾患が、全身性炎症反応症候群である、請求項7記載の炎症性疾患用医薬。
- [請求項9] 前記全身性炎症反応症候群が、敗血症である、請求項8記載の炎症性疾患用医薬。
- [請求項10] 前記炎症性疾患が、炎症性皮膚疾患である、請求項7記載の炎症性疾患用医薬。
- [請求項11] 前記炎症性皮膚疾患が、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、乾癬、湿疹、おむつ皮膚炎、脂漏性皮膚炎、ヴィダール苔癬、自家感作性皮膚炎、老人性乾皮症、光線性皮膚疾患、水疱症、ケロイド、紅皮症、薬疹および中毒疹からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項10記載の炎症性疾患用医薬。

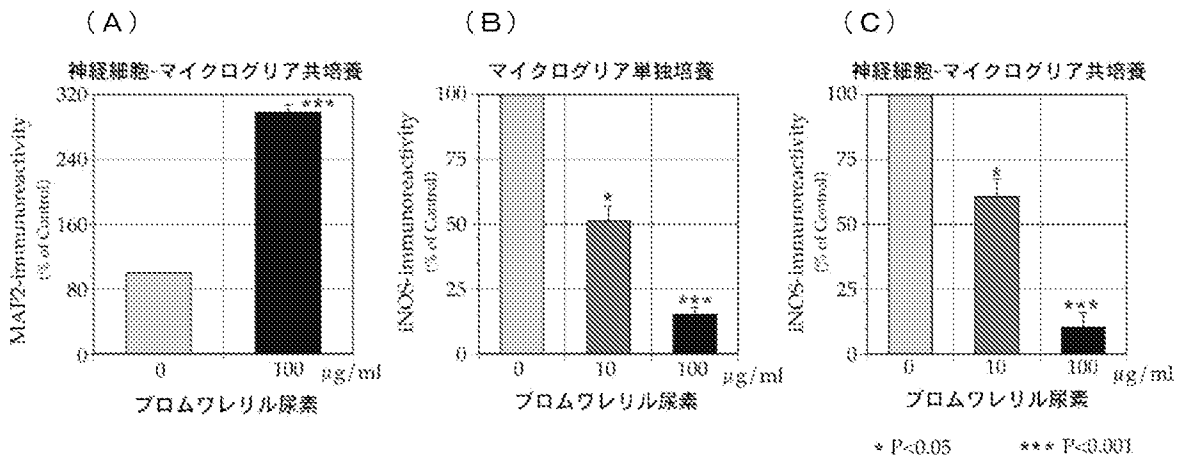
[図1]



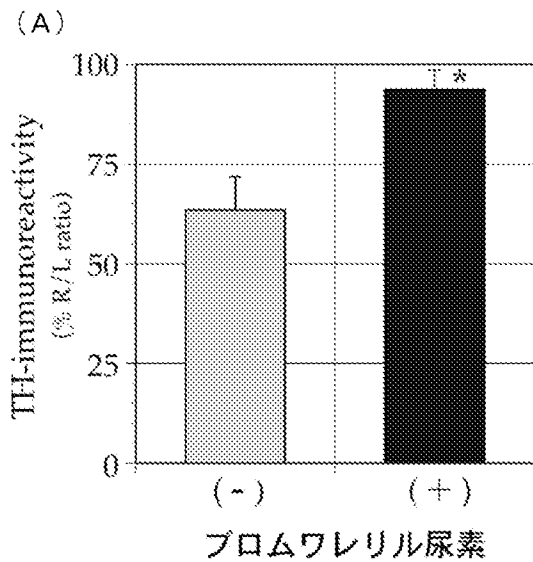
[図2]



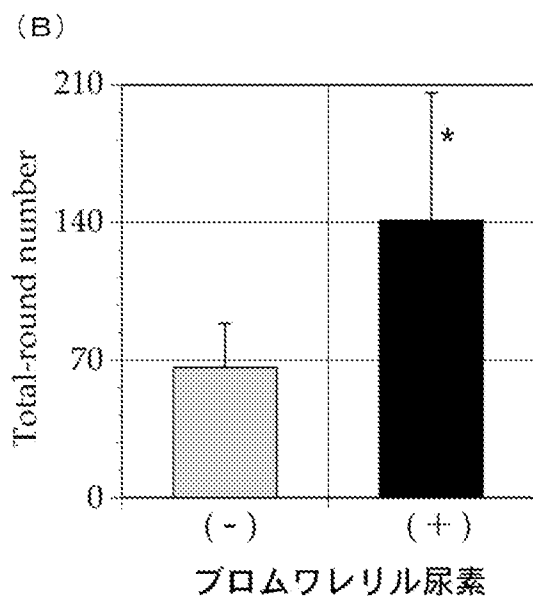
[図3]



[図4]

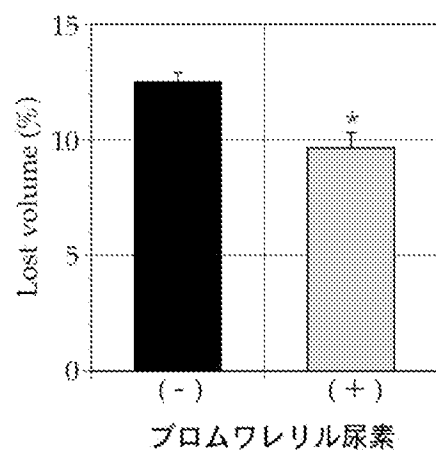


N=5, * P<0.05, ブロムワレリル尿素(+) vs (-)



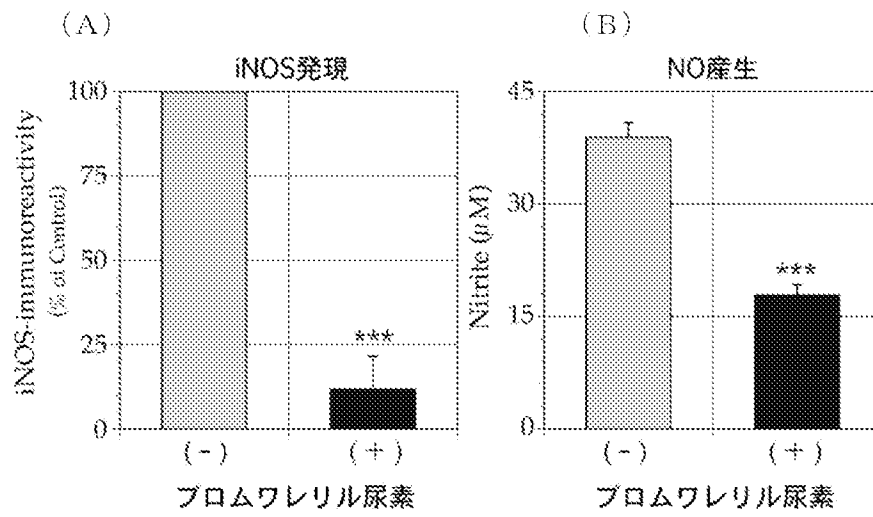
N=5, * P<0.05, ブロムワレリル尿素(+) vs (-)

[図5]



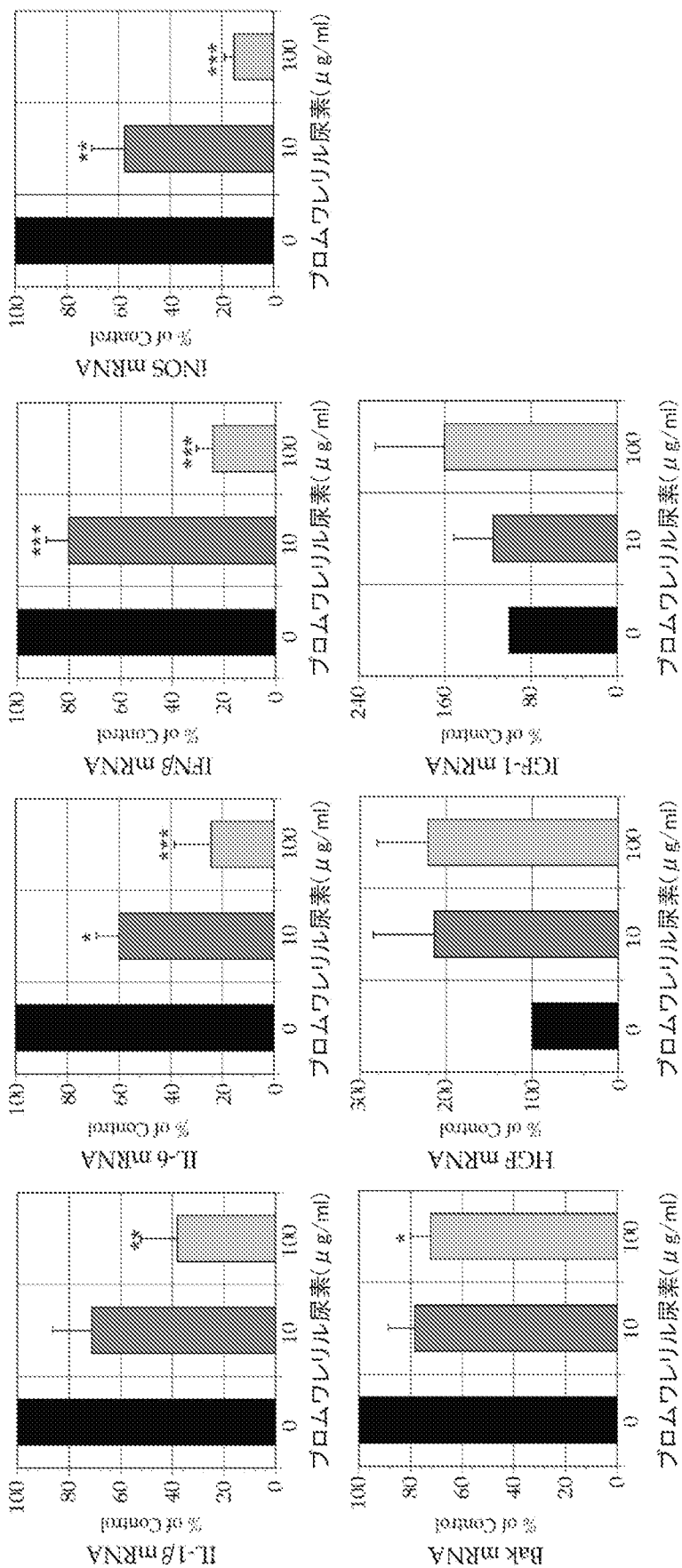
* P<0.05, ブロムワレリル尿素(+) vs (-)

[図6]



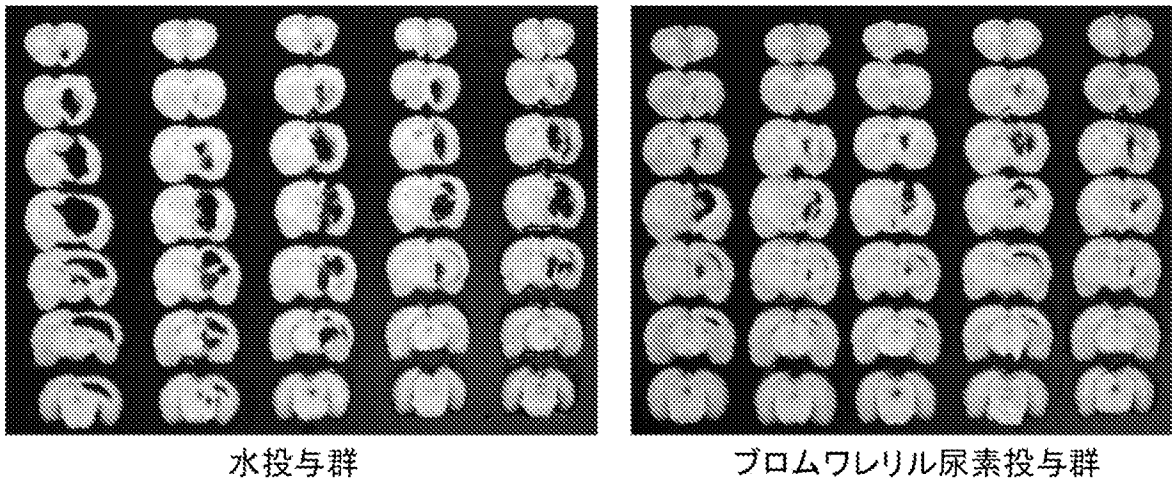
*** P<0.001, ブロムワレリル尿素(+) vs (-)

[図7]

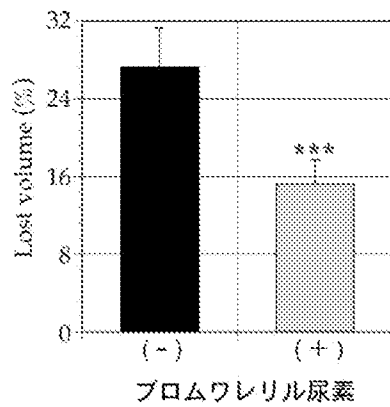


[図8]

(A)

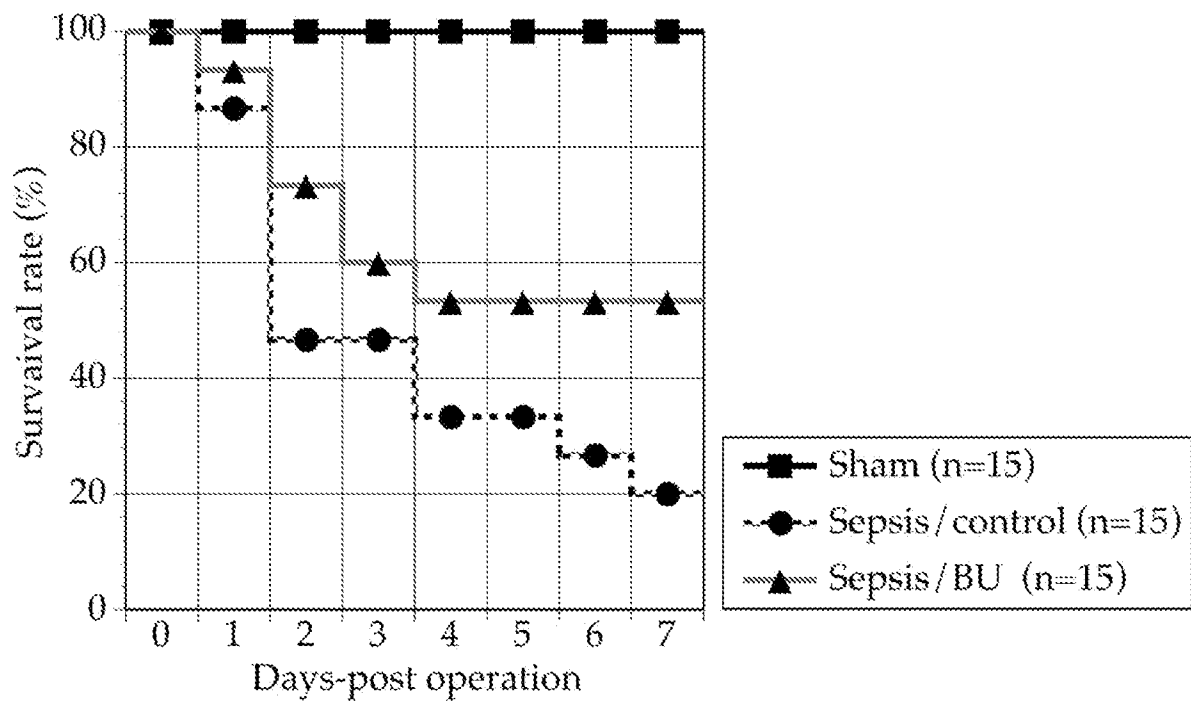


(B)

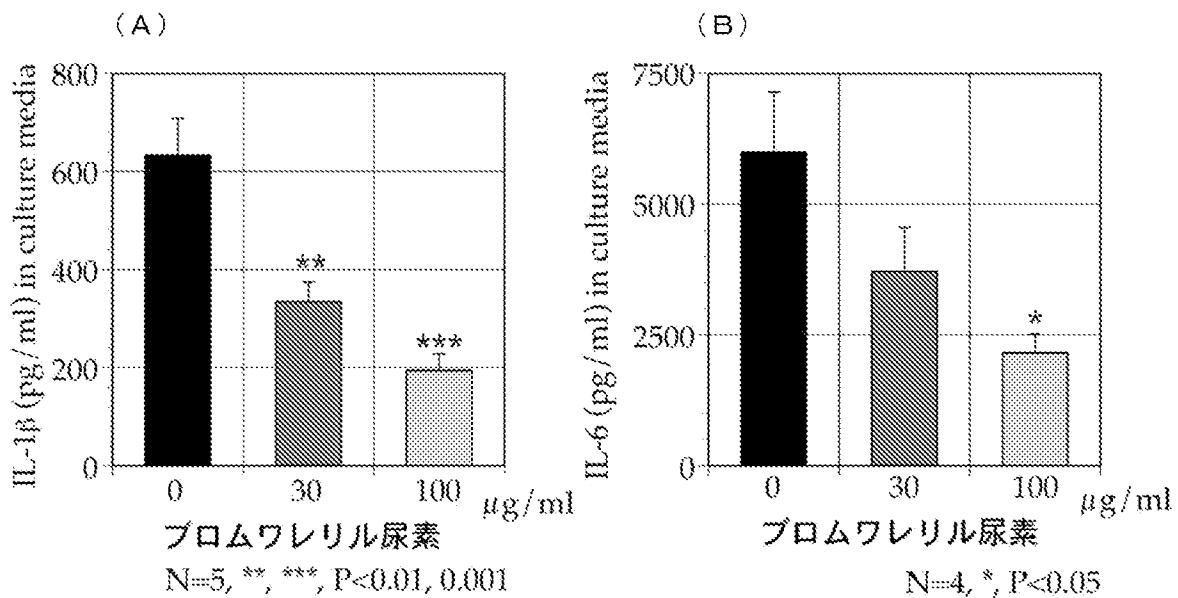


*** P<0.001, ブロムワレリル尿素(+) vs (-)

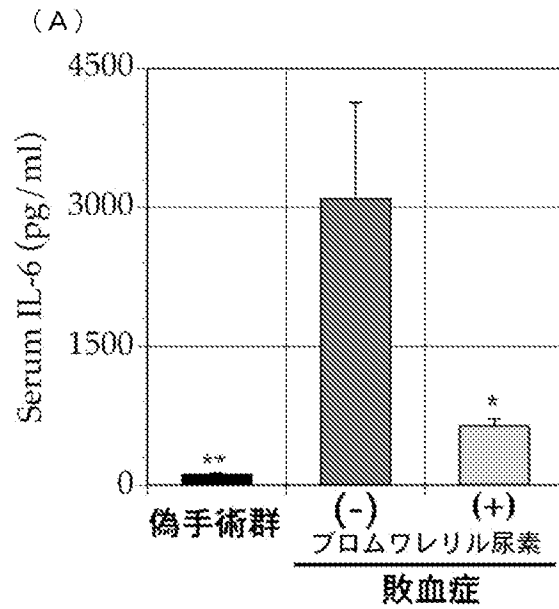
[図9]



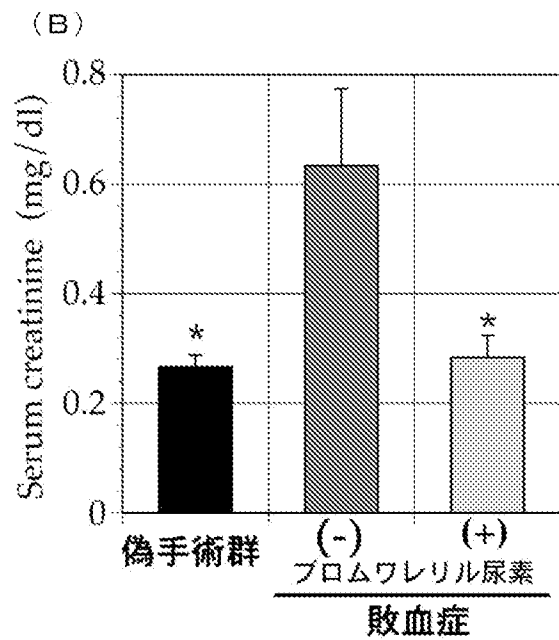
[図10]



[図11]



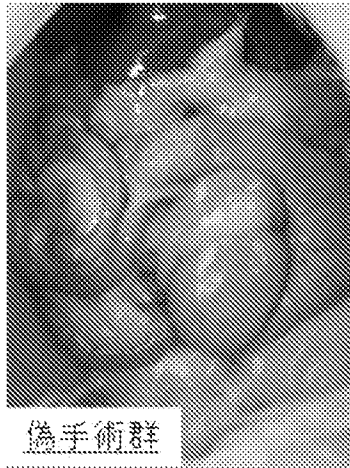
N=10, * P<0.05, ** P<0.01



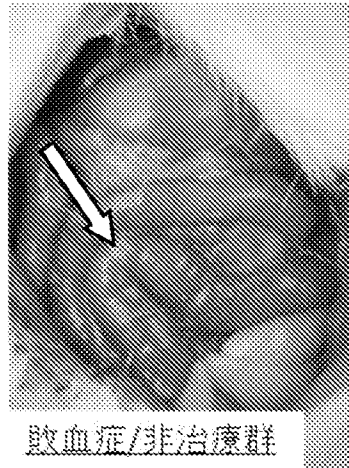
n=6, *, P<0.05 vs Control

[圖12]

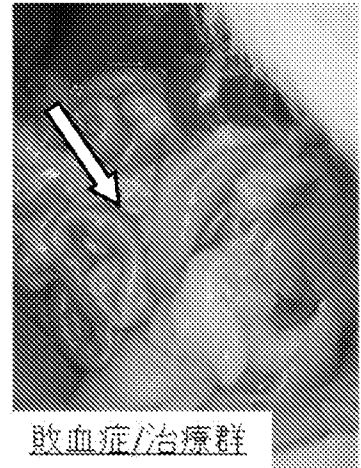
(A)



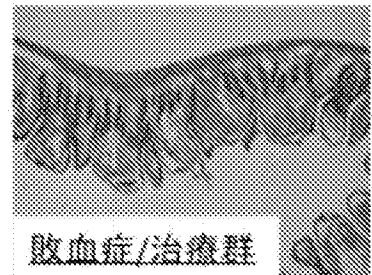
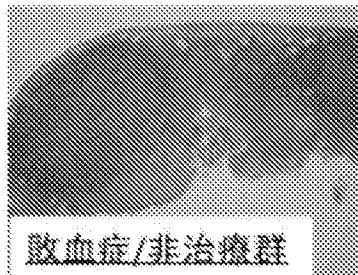
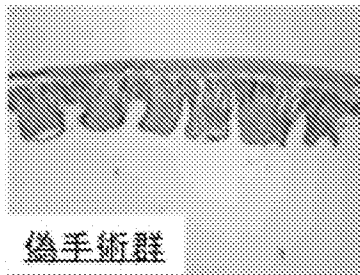
(B)



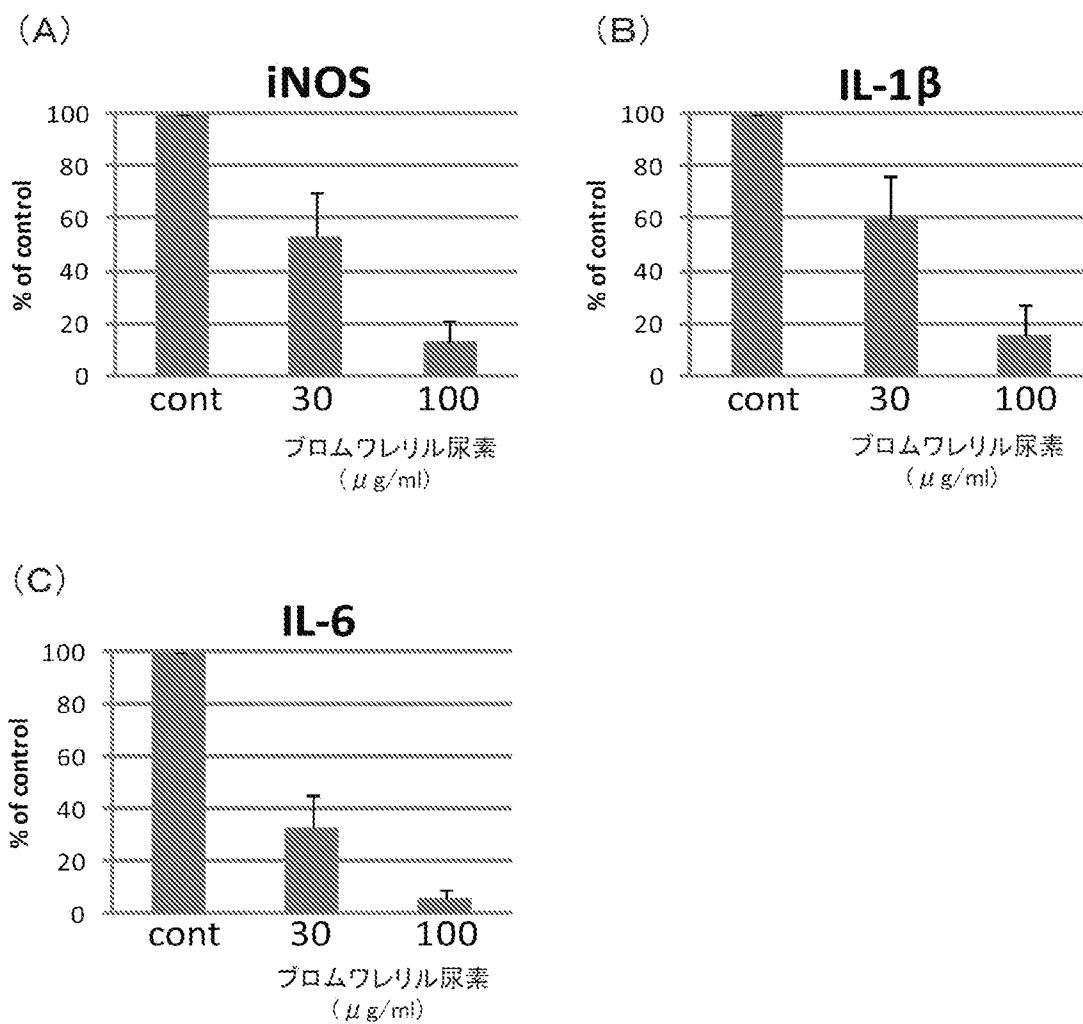
(C)



[圖13]

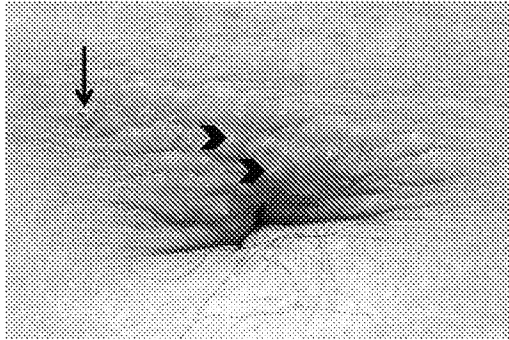


[図14]

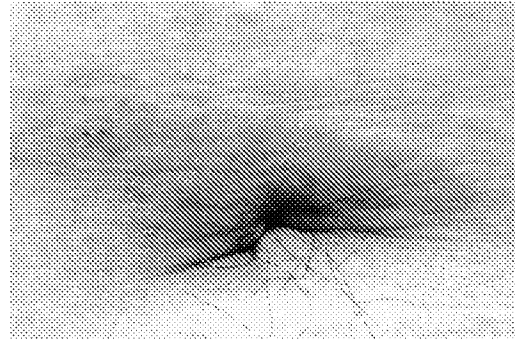


[図15]

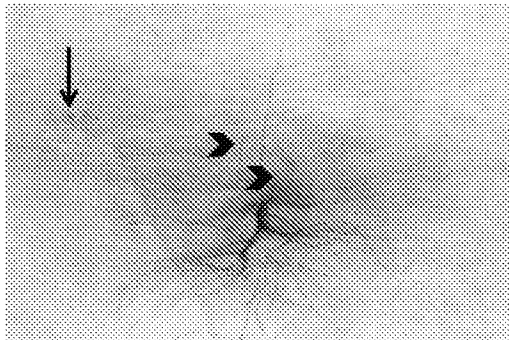
(A) 塗布前



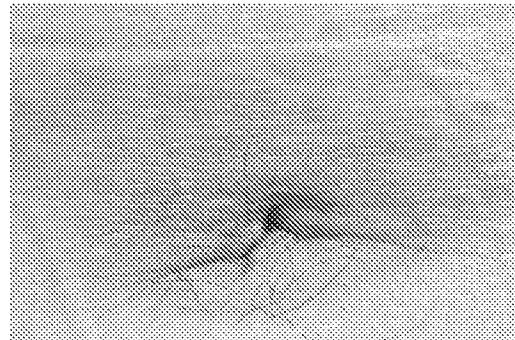
(B) 塗布後25分



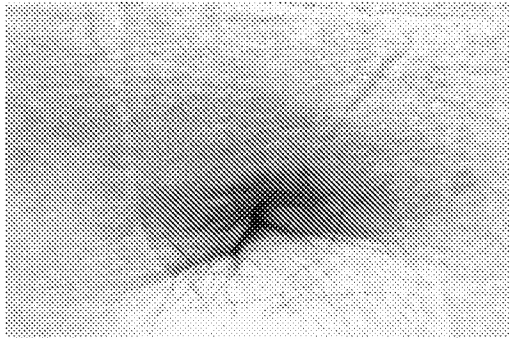
(C) 塗布後3時間



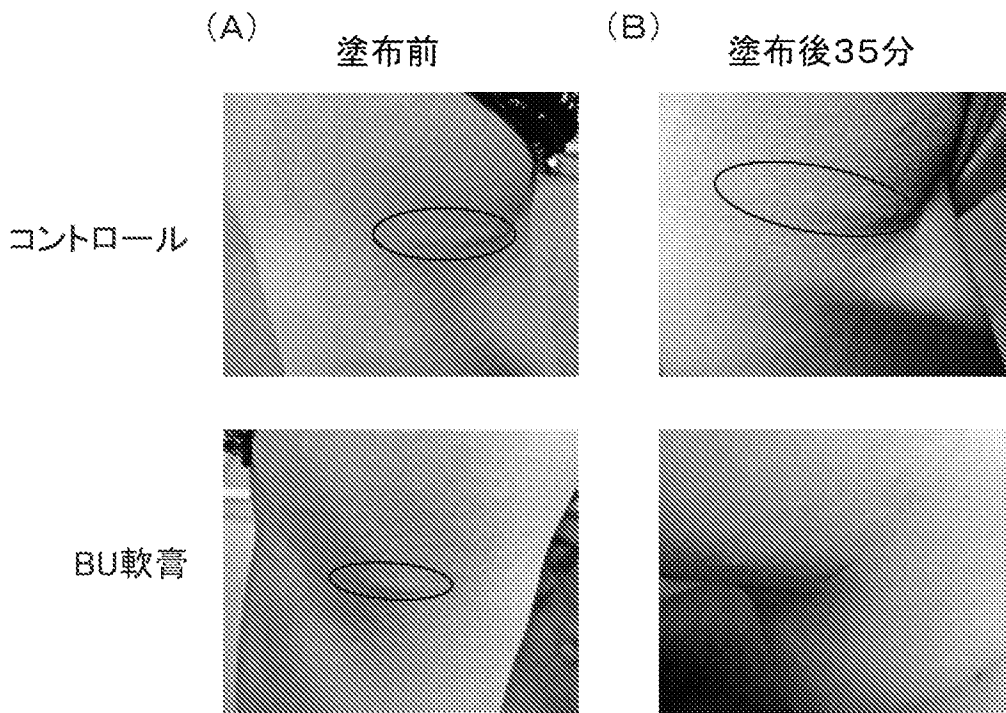
(D) 塗布後10日目



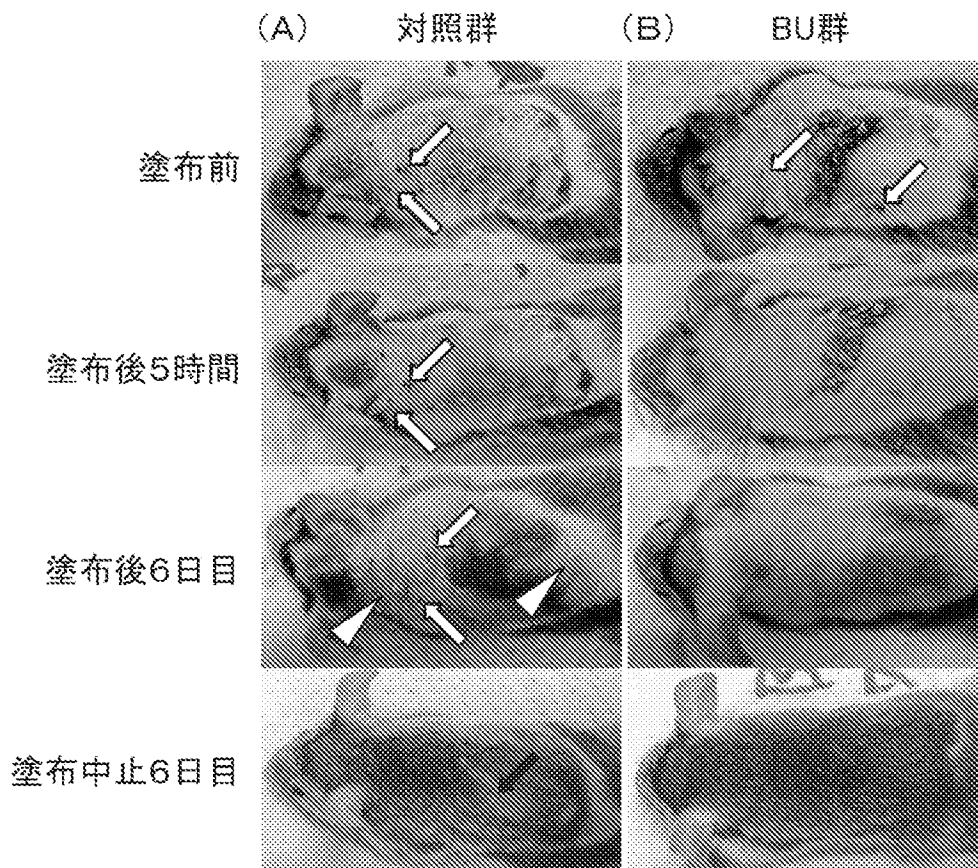
(E) 塗布中止10日目



[図16]



[図17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/071028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/17(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K31/17, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P29/00, A61P31/04, A61P37/06 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 11-139971 A (Sankyo Co., Ltd.), 25 May 1999 (25.05.1999), page 6; test example 2 & JP 2009-73851 A & JP 2009-108075 A	7 1-6, 8-11
Y	WO 03/077832 A2 (PHARMOS CORP.), 25 September 2003 (25.09.2003), abstract; claims; examples 4, 5, 13, 22 & JP 2005-526768 A & US 2005/0137251 A1 & EP 1485083 A & IL 148736 D & CA 2479676 A & AU 2003214608 A & IL 163877 D & ZA 200407182 A & IL 148736 D0	1-6, 8-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 October, 2013 (16.10.13)		Date of mailing of the international search report 29 October, 2013 (29.10.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/071028

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/001356 A2 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT CO. OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM), 31 December 2008 (31.12.2008), abstract; claims & US 2010/0280124 A1 & EP 2185505 A	1-11
P,X	Tasuku NISHIHARA et al., "Bromovalerylurea wa Macrophage no Kasseika o Yokusei shi, Haiketsusho ni Taisuru Chiryo Koka o Motsu", Journal of the Physiological Society of Japan, 2013.03, vol.75, no.2, page 74	1-11
P,X	Hitomi AONO et al., "Kotenteki na Chinsei Saimin'yaku Bromovalerylurea no Parkinson-byo Chiryoyaku to shite no Kanosei", Journal of the Physiological Society of Japan, 2013.03, vol.75, no.2, page 73	1-11

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. A61K31/17(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>Int.Cl. A61K31/17, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, A61P29/00, A61P31/04, A61P37/06</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年</p>											
<p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>JP 11-139971 A (三共株式会社) 1999.05.25, p.6, 【試験例 2】 & JP 2009-73851 A & JP 2009-108075 A</td> <td>7 1-6, 8-11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 03/077832 A2 (PHARMOS CORPORATION) 2003.09.25, Abstract; CLAIMS; Examples 4,5,13&22 & JP 2005-526768 A & US 2005/0137251 A1 & EP 1485083 A & IL 148736 D & CA 2479676 A & AU 2003214608 A & IL 163877 D & ZA 200407182 A & IL 148736 D0</td> <td>1-6, 8-11</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X Y	JP 11-139971 A (三共株式会社) 1999.05.25, p.6, 【試験例 2】 & JP 2009-73851 A & JP 2009-108075 A	7 1-6, 8-11	Y	WO 03/077832 A2 (PHARMOS CORPORATION) 2003.09.25, Abstract; CLAIMS; Examples 4,5,13&22 & JP 2005-526768 A & US 2005/0137251 A1 & EP 1485083 A & IL 148736 D & CA 2479676 A & AU 2003214608 A & IL 163877 D & ZA 200407182 A & IL 148736 D0	1-6, 8-11
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	JP 11-139971 A (三共株式会社) 1999.05.25, p.6, 【試験例 2】 & JP 2009-73851 A & JP 2009-108075 A	7 1-6, 8-11									
Y	WO 03/077832 A2 (PHARMOS CORPORATION) 2003.09.25, Abstract; CLAIMS; Examples 4,5,13&22 & JP 2005-526768 A & US 2005/0137251 A1 & EP 1485083 A & IL 148736 D & CA 2479676 A & AU 2003214608 A & IL 163877 D & ZA 200407182 A & IL 148736 D0	1-6, 8-11									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>16. 10. 2013</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>29. 10. 2013</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官（権限のある職員）</p> <p>瀬下 浩一</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>	<p>4U 9284</p>									

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2009/001356 A2 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 2008.12.31, Abstract; CLAIMS & US 2010/0280124 A1 & EP 2185505 A	1-11
P X	西原 佑 等, ブロムワレリル尿素はマクロファージの活性化を抑制し, 敗血症に対する治療効果を持つ, 日本生理学雑誌, 2013.03, 第 75 巻, 第 2 号, p.74	1-11
P X	青野 仁美 等, 古典的な鎮静催眠薬ブロムワレリル尿素のパーキンソン病治療薬としての可能性, 日本生理学雑誌, 2013.03, 第 75 巻, 第 2 号, p.73	1-11