(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 8 月 28 日(28.08.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/129653 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/054528

(22) 国際出願日: 2014 年 2 月 25 日(25.02.2014)

(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 2013-034570 2013 年 2 月 25 日(25.02.2013) JP

(71) 出願人: 浜松ホトニクス株式会社(HAMAMATSU PHOTONICS K.K.) [JP/JP]; 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町１１２６番地の１ Shizuoka (JP).

(72) 発明者: 山内 豊彦(YAMAUCHI Toyohiko); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町１１２６番地の１ 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP). 平川 聡史(HIRAKAWA Satoshi); 〒4313192 静岡県浜松市東区半田山１丁目２０番１号 国立大学法人浜松医科大学内 Shizuoka (JP). 山下 豊(YAMASHITA Yutaka); 〒4358558 静岡県浜松市東区市野町１１２６番地の１ 浜松ホトニクス株式会社内 Shizuoka (JP). 戸倉 新樹(TOKURA Yoshiki); 〒4313192 静岡県浜松市東区半田山１丁目２０番１号 国立大学法人浜松医科大学内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番１号丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ（明治安田生命ビル） ９階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (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, IR, IS, 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, SA, 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)）

WO 2014/129653 A1

(54) **Title**: EVALUATION METHOD FOR VASCULAR HYPERPERMEABILITY REGULATION ACTION

(54) 発明の名称 : 血管透過性亢進抑制作用の評価方法

(57) **Abstract**: A method that uses the peak height of endothelium cells in a test substance as an indicator of vascular hyperpermeability regulation action in the endothelium cells, and which comprises: a step in which the test substance is brought in contact with the endothelium cells; a step in which a drug that exacerbates vascular permeability in endothelium cells is brought in contact with the endothelium cells; and a step in which the peak height of the endothelium cells is measured.

(57) 要約: 被験物質を血管内皮細胞に接触させる工程と、血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤を血管内皮細胞に接触させる工程と、血管内皮細胞の頂点高さを測定する工程とを備え、血管内皮細胞の頂点高さを被験物質の血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用の指標とする方法。

明　細　書

発明の名称 ： 血管透過性亢進抑制作用の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、血管透過性亢進抑制作用の評価方法に関する。

背景技術

[0002] Ｉ型アレルギー反応は、以下の機序で生じる。アレルゲンが体内に侵入し、肥満細胞の細胞表面のＩｇＥとアレルゲンが結合すると、肥満細胞はヒスタミン等の生理活性物質を放出する。これにより、血管拡張及び血管透過性亢進などが起こり、浮腫及び掻痒等の症状が引き起こされる。

[0003] 血管透過性亢進（ｖａｓｃｕｌａｒ　ｈｙｐｅｒ－ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｔｙ）とは、血管内皮細胞がヒスタミンに応答して、細胞間の間隙が広がり、血管の透過性が上昇する現象である。この現象は、血管内皮細胞の二次元画像を撮影し、細胞間の間隙の拡大を測定することによって評価されてきた（非特許文献１及び２）。抗ヒスタミン剤は、ヒスタミン刺激による血管透過性亢進を抑制する作用を有することから、抗ヒスタミン剤の薬効評価に細胞間の間隙の拡大の抑制を測定する評価系が利用可能である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Wysolmerskiら, The American Journal of Pathology, 132(1), 28-37 (1988).

非特許文献2：Killackeyら, The American journal of pathology, 122(1), 50-61 (1986).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、細胞間の間隙の拡大は、ヒスタミン刺激から約３０分経過しなければ観察することができず、迅速な測定を行うことが困難であった。

[0006] また、血管内皮細胞によっては、細胞の接着力が強いため、細胞間の間隙

の拡大が起きない場合があり、正確な評価を行えない可能性があることを本発明者らは見出した。

[0007] 本発明の課題は、迅速かつ正確な測定が可能な、血管透過性亢進の抑制作用の評価方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、ヒスタミン刺激後の血管内皮細胞を三次元的に観察したところ、ヒスタミン刺激の直後から血管内皮細胞の形態が変化することを初めて見出した。具体的には、ヒスタミン刺激の直後に、細胞の頂点高さが高くなり、その後しばらく経ってから細胞の接着面積が小さくなっていくという形態変化を血管内皮細胞は示すことが分かった。さらに、血管内皮細胞の接着力が強く、最終的に接着面積に変化が見られない場合であっても、ヒスタミン刺激直後には細胞の頂点高さが高くなることを、本発明者らは見出した。これらの知見に基づき、細胞の頂点高さの変化を利用することで、迅速かつ正確に血管透過性亢進の抑制作用の評価することが可能であると本発明者らは考え、発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本発明は、被験物質の血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用を評価する方法であって、被験物質を血管内皮細胞に接触させる工程と、血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤を血管内皮細胞に接触させる工程と、血管内皮細胞の頂点高さを測定する工程とを備え、血管内皮細胞の頂点高さを被験物質の血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用の指標とする方法を提供する。

[0010] 上記指標は、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも低い場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性亢進を抑制すると判断する指標とすることができる。

[0011] 上記方法は、血管内皮細胞の接着面積を測定する工程をさらに備え、血管内皮細胞の頂点高さ及び接着面積を、被験物質の、血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用の指標とすることが好ましい。頂点高さに加えて、接着面

積も指標とすることで、より正確な評価を行うことが可能となる。この場合、上記指標は、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも低く、かつ被験物質の存在下における血管内皮細胞の接着面積が被験物質の非存在下における血管内皮細胞の接着面積よりも大きい場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性亢進を抑制すると判断する指標とすることができる。

[0012] 上記方法において、血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤はヒスタミンであることが好ましい。本来のリガンドであるヒスタミンを用いることで、実際の生体内に近い反応を観察することが可能となる。

[0013] 上記方法において、血管内皮細胞の頂点高さ及び／又は接着面積の測定を定量位相顕微鏡で行うことが好ましい。定量位相顕微鏡を用いることで、正確かつ簡便に頂点高さ及び／又は接着面積の測定することが可能となる。

発明の効果

[0014] 本発明の血管透過性亢進の抑制作用の評価方法は、迅速かつ正確な測定が可能である。この評価方法を利用することで、抗ヒスタミン剤の薬効評価を行うことが可能である。また、この評価方法を利用することで、抗ヒスタミン剤のスクリーニングを行うことが可能である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]ヒスタミン刺激による血管内皮細胞の形態変化を模式的に表した図である。（ａ）ヒスタミン刺激前の細胞、（ｂ）ヒスタミン刺激直後の細胞、（ｃ）ヒスタミン刺激から約１０分後の細胞、（ｄ）ヒスタミン刺激から約１５分後の細胞。

[図2]前処理なしでヒスタミン刺激した場合の、血管内皮細胞の形態変化を表す図である。（ａ）２７０秒後、（ｂ）４０２秒後、（ｃ）、１００２秒後（ｄ）１１７０秒後。ヒスタミン刺激は３００秒後に行った。

[図3]レボセチリジンによる前処理後にヒスタミン刺激した場合の、血管内皮細胞の形態変化を表す図である。（ａ）２７０秒後、（ｂ）４０２秒後、（ｃ）、１００２秒後（ｄ）１１７０秒後。ヒスタミン刺激は３００秒後に行

った。

[図4]前処理なしでヒスタミン刺激した場合の、単一の血管内皮細胞の形態変化を表す図である。ヒスタミン刺激は３００秒後に行った。

[図5]レボセチリジンによる前処理後にヒスタミン刺激した場合の、単一の血管内皮細胞の形態変化を表す図である。ヒスタミン刺激は３００秒後に行った。

[図6]ヒスタミン刺激による血管内皮細胞の頂点高さ及び接着面積の変化を表す図である。（ａ）前処理なし、（ｂ）レボセチリジンによる前処理あり。ヒスタミン刺激は３００秒後に行った。

[図7]前処理なしでヒスタミン刺激した場合の、血管内皮細胞の頂点高さ及び接着面積の変化を表す図である。（ａ）接着力が弱く剥がれ易い細胞、（ｂ）接着力が強く剥がれ難い細胞。ヒスタミン刺激は３００秒後に行った。

[図8]デキストロセチリジンによる前処理後にヒスタミン刺激した場合の、血管内皮細胞の形態変化を表す図である。（ａ）２７０秒後、（ｂ）１１７０秒後。ヒスタミン刺激は３００秒後に行った。

[図9]ラセミ体のセチリジンによる前処理後にヒスタミン刺激した場合の、血管内皮細胞の形態変化を表す図である。（ａ）２７０秒後、（ｂ）１１７０秒後。ヒスタミン刺激は３００秒後に行った。

[図10]ヒスタミン刺激による、血管内皮細胞の頂点高さの変化を表す図である。縦軸は、ヒスタミン刺激時の頂点高さで標準化した頂点高さの変化を表す。横軸は、ヒスタミン刺激時を０秒としたときの経過時間（秒）を表す。（ａ）前処理なし、（ｂ）レボセチリジンによる前処理あり、（ｃ）デキストロセチリジンによる前処理あり、（ｄ）ラセミ体のセチリジンによる前処理あり。

[図11]ヒスタミン刺激による、血管内皮細胞の頂点高さの変化（平均値）を表す図である。縦軸は、ヒスタミン刺激時の頂点高さで標準化した頂点高さの変化を表す。横軸は、ヒスタミン刺激時を０秒としたときの経過時間（秒）を表す。

[図12]ヒスタミン刺激時の血管内皮細胞の頂点高さで標準化した、ヒスタミン刺激から８分後の血管内皮細胞の頂点高さのボックスプロットを表す図である。

発明を実施するための形態

[0016] （ヒスタミン刺激による、血管内皮細胞の形態変化）

ヒスタミン刺激による血管内皮細胞の形態変化を図１に沿って説明する。図１（ａ）はヒスタミン刺激前の血管内皮細胞を表す。図１（ｂ）はヒスタミン刺激直後の血管内皮細胞を表す。ヒスタミン刺激によって、まずは細胞の頂点高さが高くなる。細胞の接着面積は、ヒスタミン刺激直後は変化しない。図１（ｃ）はヒスタミン刺激から約１０分後の血管内皮細胞を表す。細胞の頂点高さは維持される。細胞の接着面積が小さくなり始める。図１（ｄ）はヒスタミン刺激から約１５分後の血管内皮細胞を表す。細胞の頂点高さがさらに高くなり、細胞の接着面積が小さくなり、この状態が維持される。

[0017] 一方、抗ヒスタミン剤等の血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用を有する物質で前処理を行った後、血管内皮細胞をヒスタミン刺激すると、細胞の形態変化はおきず、図１（ａ）の状態が維持される。

[0018] この形態変化の差異に基づいて、血管透過性亢進の抑制作用の評価を行う。

[0019] （被験物質の血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用を評価する方法）

抑制作用を評価する被験物質は、どのような物質を用いてもよい。好ましくは、H_1受容体拮抗作用を有することが期待される物質を被験物質として用いる。

[0020] 血管内皮細胞は、マウス、ラット、ウシ及びヒト等の哺乳類由来の血管内皮細胞を用いることができる。ヒトに投与した場合の抗ヒスタミン剤の薬効の評価を適切に行うことが可能であることから、ヒト由来の血管内皮細胞を用いることが好ましい。ヒト由来の血管内皮細胞は、皮膚微小血管内皮細胞、臍帯静脈血管内皮細胞及び大静脈血管内皮細胞等を利用することができる。血管内皮細胞は、成人由来でも新生児由来でも構わない。血管内皮細胞は

、公知の方法により動物から採取し単離することができる。また、細胞バンクから入手することも可能である。血管内皮細胞の培養方法は当業者にとって周知であり、例えば、市販の血管内皮細胞用培地を用いて、３７℃、５％CO_2インキュベーターで、培養することが可能である。

[0021] 血管内皮細胞をディッシュに播種し、十分に接着するまで培養する。培養期間は好ましくは２４時間である。

[0022] 次に、被験物質を培地に添加して、被験物質を血管内皮細胞に接触させる（以下、前処理ともいう）。接触時間は、通常、３０分～６０分である。被験物質は適切な溶媒に溶かした溶液として添加することが好ましい。溶媒は好ましくは培地である。被験物質が培地に溶解し難い場合は、被験物質を溶解する溶媒に溶解した後に培地で希釈してもよい。なお、この際、被験物質を含まない溶媒のみを培地に添加したサンプルをネガティブコントロールとしてもよい。

[0023] 次に、血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤を培地に添加して、血管内皮細胞に接触させる（以下、薬剤刺激ともいう）。血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤は、H_1受容体作動薬であればよく、ヒスタミン、２－メチルヒスタミン及び２－（２－ピリジル）エチルアミン等が挙げられる。H_1受容体本来のリガンドであることから、ヒスタミンを用いることが好ましい。

[0024] 薬剤刺激後、血管内皮細胞の頂点高さを測定する。三次元イメージング装置を用いることで、頂点高さを測定することができる。三次元イメージング装置として、定量位相顕微鏡、低コヒーレンス干渉顕微鏡、デジタルホログラフィ顕微鏡、トモグラフィック位相顕微鏡及び走査型プローブ顕微鏡等が挙げられ、定量位相顕微鏡が好ましい。

[0025] 定量位相型顕微鏡は、例えば特許第４０９０２４４号公報及び特開第２０１０－４８６１９号公報に開示される。定量位相型顕微鏡を用いることにより、位相シフト干渉法を用いて光場の位相を定量的に測定することができる。定量位相顕微鏡を用いることにより、細胞の三次元的な形態を１ミクロン

以下の分解能で得ることができ、それにより細胞の頂点高さ及び接着面積を正確に測定することが可能である。

[0026] 定量位相顕微鏡は位相シフト法を用いることにより、測定対象物を透過した光の受ける位相変化を分布的に求めることができる。光学的な厚さ（ＯＴ：Ｏｐｔｉｃａｌ　Ｔｈｉｃｋｎｅｓｓ）とは、測定対象物を透過した光の受ける位相変化をφとしたときに、（１）式で与えられる指標である。ここでλは光の波長を表す。

ＯＴ＝λ×φ／２π　（１）

[0027] 光学的な厚さは、測定対象物の屈折率をｎ１、測定対象物の周囲の媒質の屈折率をｎ０、測定対象物の高さをｈとしたときに、（２）式で記述される。したがって、光学的な厚さを測定することにより、測定対象物の高さに比例する値を近似的に求めることができる。

ＯＴ＝ｈ×（ｎ１－ｎ０）　（２）

[0028] 細胞の頂点とは、単一の細胞における高さが最も高い点をいう。高さとは、培養容器に接着している細胞の底面から、培養容器に接着していない細胞表面までの距離をいう。細胞の頂点高さは、実高さであっても光学的厚さであってもよい。

[0029] 細胞の頂点高さの測定は、薬剤刺激後の任意の時点で行ってよい。被験物質の前処理なしで薬剤刺激した場合、細胞の頂点高さは刺激直後に上昇し約１０分後まではほぼ同じ高さを維持し、約１５分後にはさらに上昇する。しかしながら、接着力の強い血管内皮細胞の場合には、約１５分後の細胞の頂点高さのさらなる上昇が認められない場合もある。また、測定効率を上げるためには、短時間で測定を行うことが好ましい。したがって、細胞の頂点高さの測定は、薬剤刺激開始から１０分後以内に行うことが好ましい。また、細胞の頂点高さの変動ができるだけ少ない時間帯で細胞の頂点高さを測定する方が、より正確な測定を行える。したがって、細胞の頂点高さの測定は、薬剤刺激開始から３分後～９分後の間に行うことが好ましい。

[0030] 測定した細胞の頂点高さに基づいて、被験物質の血管内皮細胞の血管透過

性亢進の抑制作用を評価する。上記評価方法の指標は、単一の細胞の頂点高さに基づく指標であってもよく、複数の細胞の頂点高さの平均値に基づく指標であってもよい。より具体的には、上記評価方法の指標は、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも低い場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性亢進を抑制すると判断することができる。

[0031] 別の実施形態において、血管内皮細胞の頂点高さの測定に加えて、血管内皮細胞の接着面積の測定を行う。血管内皮細胞の接着面積に基づく評価は、従来の評価方法である細胞間隙の拡大に基づく評価に相当するものであり、血管内皮細胞の頂点高さ単独の場合と比較してより正確な評価が可能となる。血管内皮細胞の接着面積とは、培養容器に接着している細胞の底面の面積をいう。３次元イメージング装置を用いることで、細胞の頂点高さとともに接着面積も測定することができる。細胞の接着面積の測定は、薬剤刺激後の任意の時点で行ってよい。被験物質の前処理なしで薬剤刺激した場合、細胞の接着面積は刺激から約１０分後に小さくなり始め、約１５分後には一定となる。したがって、細胞の接着面積の測定は、薬剤刺激開始から１５分後以降に行うことが好ましい。また、細胞の接着面積の変動ができるだけ少ない時間帯で細胞の接着面積を測定する方が、より正確な測定を行える。また、測定効率を上げるためには、短時間で測定を行うことが好ましい。したがって、細胞の接着面積の測定は、薬剤刺激開始から１５分後～２０分後の間に行うことが好ましい。

[0032] 測定した細胞の頂点高さ及び接着面積に基づいて、被験物質の、血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用を評価する。単一の細胞の頂点高さ及び接着面積に基づく指標であってもよく、複数の細胞の頂点高さの平均値及び接着面積の平均値に基づく指標であってもよい。より具体的には、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも低く、かつ被験物質の存在下における血管内皮細胞の接着面積が被験物質の非存在下における血管内皮細胞の接着面積よりも

大きい場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性亢進を抑制すると判断することができる。

[0033] （被験物質の血管内皮細胞の血管透過性の亢進作用を評価する方法）

他の実施形態において、被験物質の血管内皮細胞の血管透過性の亢進作用を評価する方法であって、被験物質を血管内皮細胞に接触させる工程と、血管内皮細胞の頂点高さを測定する工程とを備え、血管内皮細胞の頂点高さを被験物質の血管内皮細胞の血管透過性の亢進作用の指標とする方法を提供する。この評価方法を利用することで、H_1受容体作動薬のスクリーニングを行うことが可能である。

[0034] 上記指標は、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも高い場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性を亢進すると判断する指標とすることができる。

[0035] 上記方法は、血管内皮細胞の接着面積を測定する工程をさらに備え、血管内皮細胞の頂点高さ及び接着面積を、被験物質の、血管内皮細胞の血管透過性の亢進作用の指標とすることが好ましい。この場合、上記指標は、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも高く、かつ被験物質の存在下における血管内皮細胞の接着面積が被験物質の非存在下における血管内皮細胞の接着面積よりも小さい場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性を亢進すると判断する指標とすることができる。

[0036] 上記方法において、血管内皮細胞の頂点高さ及び／又は接着面積の測定を定量位相顕微鏡で行うことが好ましい。

[0037] 亢進作用を評価する被験物質は、どのような物質を用いてもよい。好ましくは、H_1受容体アゴニスト作用を有することが期待される物質を被験物質として用いる。

[0038] 使用する血管内皮細胞及びその培養方法は上述の通りである。

[0039] 被験物質を培地に添加して、被験物質を血管内皮細胞に接触させる。この

工程は、上述の薬剤刺激に相当する工程となる。

[0040] 薬剤刺激後の血管内皮細胞の頂点高さ及び接着面積の測定は上述の通りである。

実施例

[0041] 材料及び方法

[0042] （１）血管内皮細胞

血管内皮細胞として、ヒト新生児皮膚由来微小血管内皮細胞（ＨＭＶＥＣ）を用いた。継代後、測定直前までの培養液は、ＥＢＭ－２培地５００ｍＬ（Ｌｏｎｚａ社ＣＣ－３１５６）に微小血管内皮細胞添加因子セット－２ＥＧＭ－２ ＭＶ ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔｓ（Ｌｏｎｚａ社ＣＣ－４１４７）を添加したものを用いた。継代後２４時間、３７℃、５％CO_2環境でインキュベートし、前処理の直前に培養液を、ＥＢＭ－２培地に置換した。継代時の培養ディッシュは、無処理のプラスチックディッシュを用いた。

[0043] （２）薬剤

血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤としてヒスタミンを用いた。また、ラセミ体のセチリジン、レボセチリジン（ｌ－セチリジン）及びデキストロセチリジン（ｄ－セチリジン）をヒスタミンの前処理の試薬として用いた。ラセミ体のセチリジン及びレボセチリジンは抗ヒスタミン作用すなわち血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用があることが知られているが、デキストロセチリジンは抗ヒスタミン作用がわずかしかないことが知られている。また、レボセチリジンのH_1受容体の結合能は、デキストロセチリジンと比べて約３３倍であることが知られている。

[0044] （３）前処理

最終濃度が２μＭとなるようにラセミ体のセチリジンを培地に添加し、３０分間、３７℃にてCO_2インキュベータ内に静置した。レボセチリジン及びデキストロセチリジンの場合は、最終濃度を１μＭとする以外は、ラセミ体のセチリジンと同様に前処理した。

[0045] （４）ヒスタミン刺激

細胞を下記の装置にセットし、顕微鏡観察を開始した。観察開始から３００秒後に最終濃度が１００μＭとなるようにヒスタミンを添加し、血管内皮細胞の血管透過性亢進を惹起した。

[0046] （５）血管内皮細胞の頂点高さ及び接着面積を測定する装置

反射型定量位相顕微鏡を、ガラス底面反射による透過モードで用いて、サンプルをタイムラプス撮像した。干渉画像１枚の露光時間＝２５ミリ秒。位相ステップの時間間隔＝１００ミリ秒。位相シフト法＝５点法の往復（合計１０点）。撮像サイクル間の待ち時間＝２秒。タイムラプスの時間間隔＝３秒。観察時間は開始から終了までで２０分～３０分。対物レンズは水没型の２０倍とした（Ｎｉｋｏｎ，ＣＦＩ　Ｆｌｕｏｒ　２０ｘＷ，ＮＡ＝０．５）。

[0047] （実施例１）

レボセチリジンによる前処理の有無により、ヒスタミン刺激後の血管内皮細胞の様子を定量位相顕微鏡で観察した。図２は前処理なしの場合の細胞の様子を表したものであり、図３はレボセチリジンで前処理した場合の細胞の様子を表したものである。図２及び３において、（ａ）、（ｂ）、（ｃ）及び（ｄ）はそれぞれ観察開始から２７０秒後、４０２秒後、１００２秒後及び１１７０秒後の細胞の様子を表している。ヒスタミン刺激は観察開始から３００秒後に行っている。

[0048] 図２（ｂ）から明らかなように、ヒスタミン刺激の直後から、細胞の頂点高さが高くなり始める様子が観察された。また、図２（ｃ）及び（ｄ）から明らかなように、ヒスタミン刺激から約１０分後には、細胞の頂点高さがさらに高くなり、また、細胞の接着面積が小さくなり始める様子が観察された。

[0049] 一方、図３から明らかなように、抗ヒスタミン薬であるレボセチリジンによる前処理を行った場合は、ヒスタミン刺激を行っても細胞の頂点高さも接着面積も変化が認められなかった。

[0050] 単一細胞における細胞の形態変化を図４及び５に示す。図４は前処理なし

の場合の細胞の形態変化を表したものであり、図５はレボセチリジンで前処理した場合の細胞の形態変化を表したものである。図４から明らかなように、ヒスタミン刺激により、まず細胞の頂点高さが高くなり、その後、細胞の接着面積が小さくなる様子が確認された。一方、図５から明らかなように、レボセチリジンによる前処理を行った場合は、ヒスタミン刺激を行っても細胞の形態変化はほとんど認められなかった。

[0051] （実施例２）

実施例１と同様に、レボセチリジンの前処理の有無により、ヒスタミン刺激後の血管内皮細胞の様子を定量位相顕微鏡で観察し、細胞の頂点高さ及び接着面積を測定した。結果を図６（ａ）及び（ｂ）に示す。図６（ａ）から明らかなように、前処理なしの場合は、ヒスタミン刺激の直後に細胞の頂点高さが高くなり、約１０分後にさらに高くなることが確認された。また、前処理なしの場合は、ヒスタミン刺激から約１０分後に細胞の接着面積が小さくなることが確認された。一方、図６（ｂ）から明らかなように、レボセチリジンによる前処理を行った場合は、ヒスタミン刺激を行っても細胞の頂点高さ及び接着面積ともにほとんど変化しなかった。

[0052] （実施例３）

前処理なしでヒスタミン刺激を行った時に、血管内皮細胞によって異なる挙動を示すことが観察された。前処理なしでヒスタミン刺激を行い、血管内皮細胞の様子を定量位相顕微鏡で観察し、異なる血管内皮細胞について、細胞の頂点高さ及び接着面積を測定した。結果を図７（ａ）及び（ｂ）に示す。図７（ａ）は図６（ａ）と同一である。図７（ｂ）では、ヒスタミン刺激直後に細胞の頂点高さが高くなったが、その後は頂点高さも接着面積もほとんど変化しなかった。これは、細胞によって接着力すなわち剥がれ難さが異なることを意味していると推察され、接着力が弱く剥がれ易い細胞は図７（ａ）のような挙動を示し、接着力が強く剥がれ難い細胞は図７（ｂ）のような挙動を示すものと解釈できる。

[0053] 評価に用いる細胞が、接着力が強く剥がれ難い細胞である場合は、細胞の

接着面積の変化を測定するという従来の方法では適切な評価が行えないことを意味する。一方、細胞の頂点高さの変化を測定するという本願発明の方法では、そのような細胞を用いた場合でも適切な評価が可能であることが、図７に示した結果から理解できる。

[0054] （実施例４）

レボセチリジンに代えて、デキストロセチリジン又はラセミ体のセチリジンで前処理し、ヒスタミン刺激後の血管内皮細胞の様子を定量位相顕微鏡で観察し、細胞の頂点高さ及び接着面積を測定した。デキストロセチリジンで前処理した場合の細胞の様子を図８（ａ）及び（ｂ）に示し、ラセミ体のセチリジンで前処理した場合の細胞の様子を図９（ａ）及び（ｂ）に示す。図８及び９において、（ａ）及び（ｂ）はそれぞれ観察開始から２７０秒後及び１１７０秒後の細胞の様子を表している。ヒスタミン刺激は観察開始から３００秒後に行っている。

[0055] 図８（ｂ）から明らかなように、デキストロセチリジンで前処理した場合は、ヒスタミン刺激により、細胞の頂点高さが高くなり、また、細胞の接着面積が小さくなる様子が観察された。この観察結果は、デキストロセチリジンに抗ヒスタミン作用がほとんどないことと一致するものである。

[0056] 図９（ｂ）から明らかなように、ラセミ体のセチリジンで前処理した場合は、ヒスタミン刺激を行っても、細胞の頂点高さも接着面積もほとんど変化しなかった。この結果は、ラセミ体のセチリジンが抗ヒスタミン作用を有することと一致するものである。

[0057] （実施例５）

細胞の頂点高さの変化を複数の細胞（Ｎ＝２５～３７）について測定し、細胞の頂点高さをヒスタミン刺激時の細胞の頂点高さで標準化した結果を図１０にまとめた。図１０（ａ）は前処理なし、（ｂ）はレボセチリジンによる前処理、（ｃ）はデキストロセチリジンによる前処理、（ｄ）はラセミ体のセチリジンによる前処理を行った時の細胞の頂点高さの変化を示すものである。図１０の横軸は、ヒスタミン刺激時を０秒とした場合の経過時間（秒

）を表している。図１０（ａ）及び（ｃ）では、ヒスタミン刺激後に細胞の頂点高さが高くなっているが、図１０（ｂ）及び（ｄ）では、ヒスタミン刺激後に細胞の頂点高さの上昇が図１０（ａ）及び（ｃ）よりも少ない。

[0058] 各処理群での細胞の頂点高さの変化の平均化したものを図１１に示す。図１１から明らかなように、デキストロセチリジンで前処理した場合の細胞の頂点高さは、前処理なしの場合と同様に上昇したのに対して、レボセチリジン又はラセミ体のセチリジンで前処理した場合の細胞の頂点高さはほとんど上昇しなかった。

[0059] ヒスタミン刺激から８分後の細胞の頂点高さをヒスタミン刺激時の細胞の頂点高さを基準に標準化したものを図１２のボックスプロットにまとめた。また、各処理群間でのｔ検定の結果を表１にまとめた。図１２及び表１に示す結果から明らかなように、レボセチリジン又はラセミ体のセチリジンで前処理した場合は、前処理なし又はデキストロセチリジンで前処理した場合と比較して有意に細胞の頂点高さが低く、抗ヒスタミン作用（血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用）と細胞の頂点高さには相関があることが確認できた。

[0060] [表1]

比較群		ｔ検定のｐ値
前処理なし	レボセチリジン	4.99×10^{-7}
前処理なし	ラセミ体セチリジン	4.00×10^{-8}
前処理なし	デキストロセチリジン	0.758
レボセチリジン	デキストロセチリジン	3.10×10^{-7}
レボセチリジン	ラセミ体セチリジン	0.152
デキストロセチリジン	ラセミ体セチリジン	2.93×10^{-8}

請求の範囲

[請求項1] 被験物質の、血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用を評価する方法であって、

被験物質を血管内皮細胞に接触させる工程と、

血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤を血管内皮細胞に接触させる工程と、

血管内皮細胞の頂点高さを測定する工程と、

を備え、

血管内皮細胞の頂点高さを、被験物質の、血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用の指標とする、方法。

[請求項2] 前記指標は、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも低い場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性亢進を抑制すると判断する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 血管内皮細胞の接着面積を測定する工程をさらに備え、

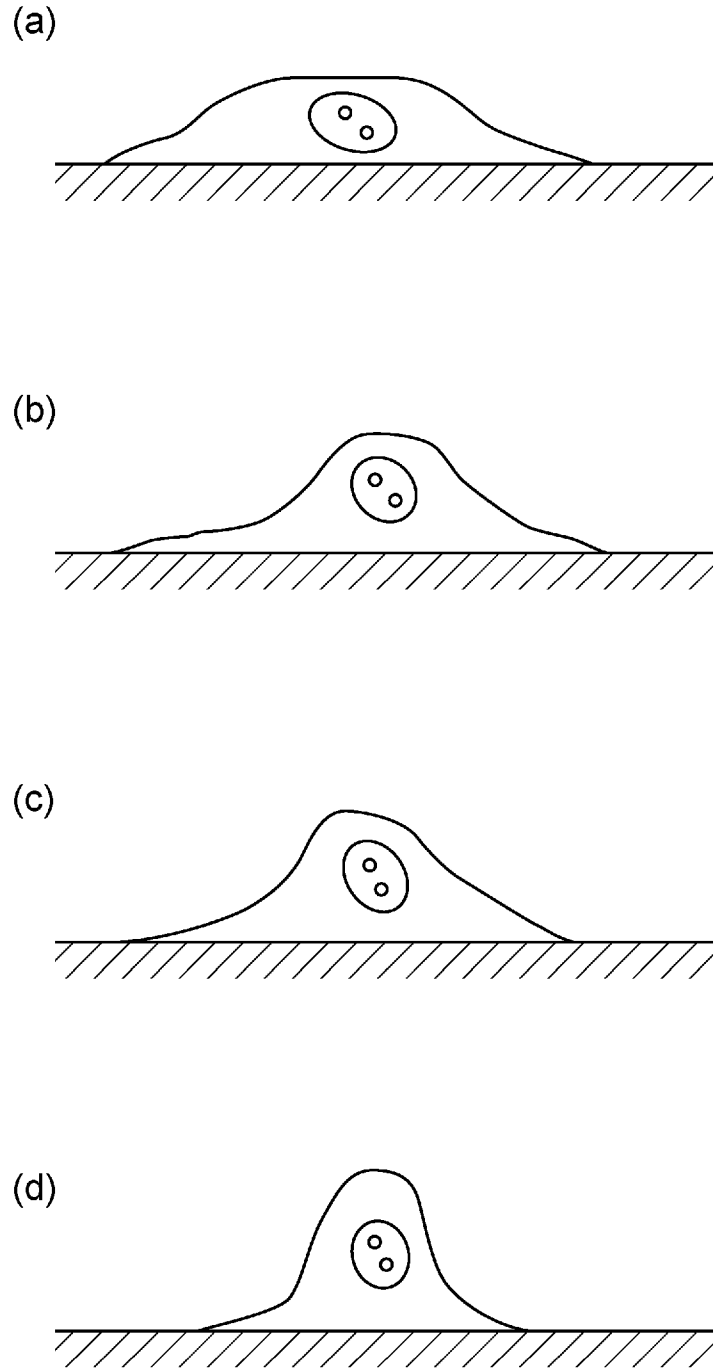
血管内皮細胞の頂点高さ及び接着面積を、被験物質の、血管内皮細胞の血管透過性亢進の抑制作用の指標とする、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記指標は、被験物質の存在下における血管内皮細胞の頂点高さが被験物質の非存在下における血管内皮細胞の頂点高さよりも低く、かつ被験物質の存在下における血管内皮細胞の接着面積が被験物質の非存在下における血管内皮細胞の接着面積よりも大きい場合に、当該被験物質は血管内皮細胞の血管透過性亢進を抑制すると判断する、請求項３に記載の方法。

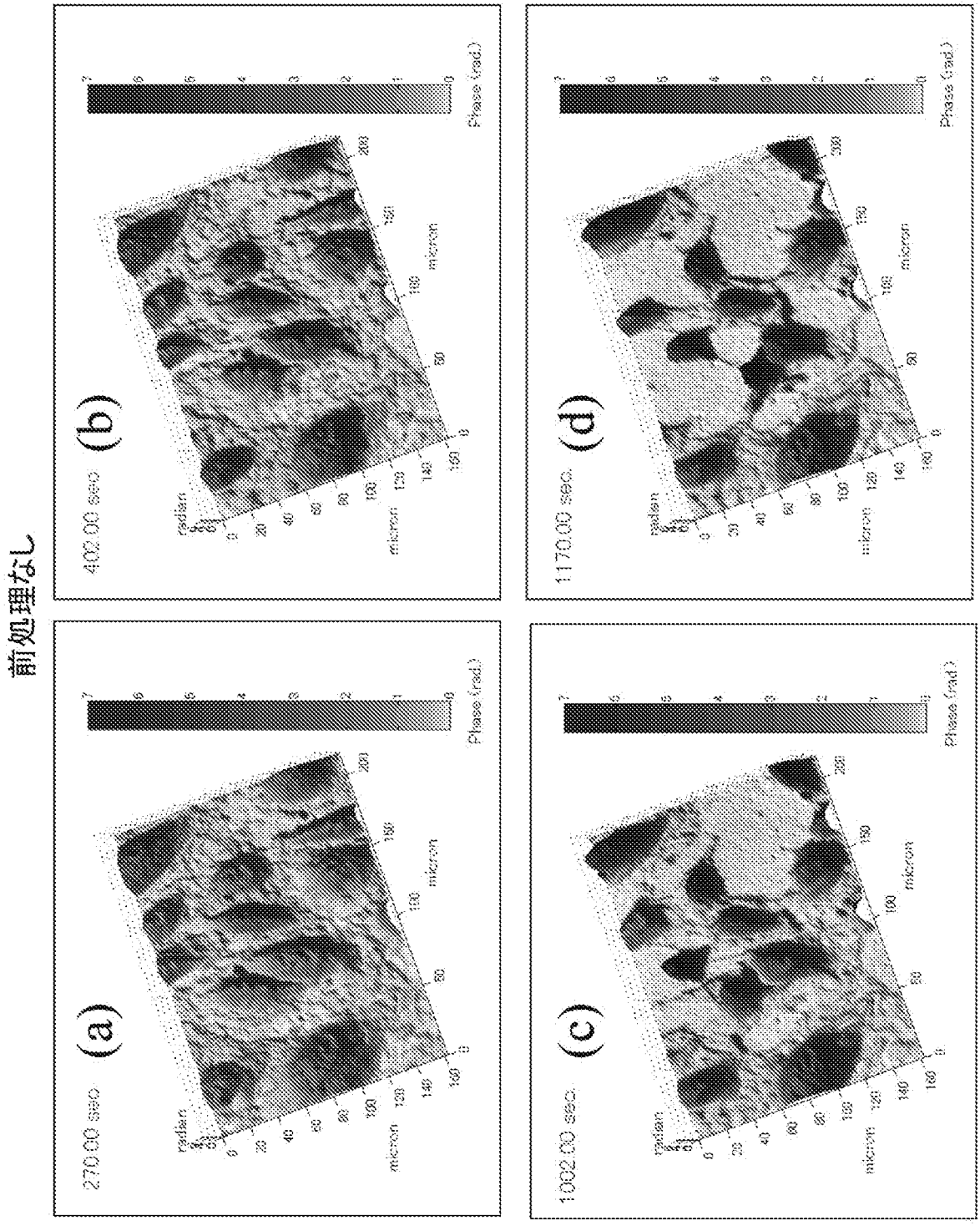
[請求項5] 前記血管内皮細胞の血管透過性を亢進する薬剤がヒスタミンである、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

[請求項6] 血管内皮細胞の頂点高さ及び／又は接着面積の測定を定量位相顕微鏡で行う、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

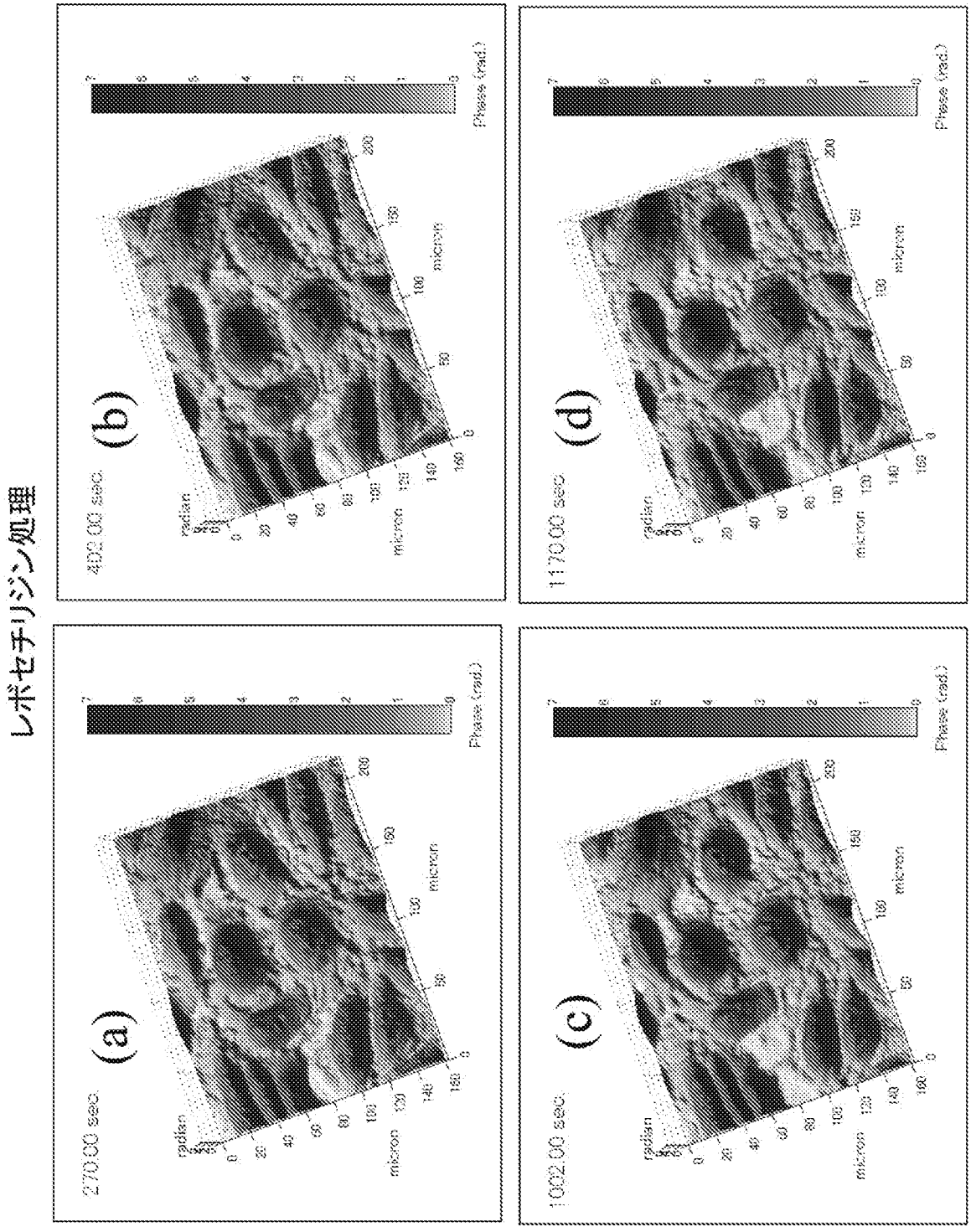
[図1]



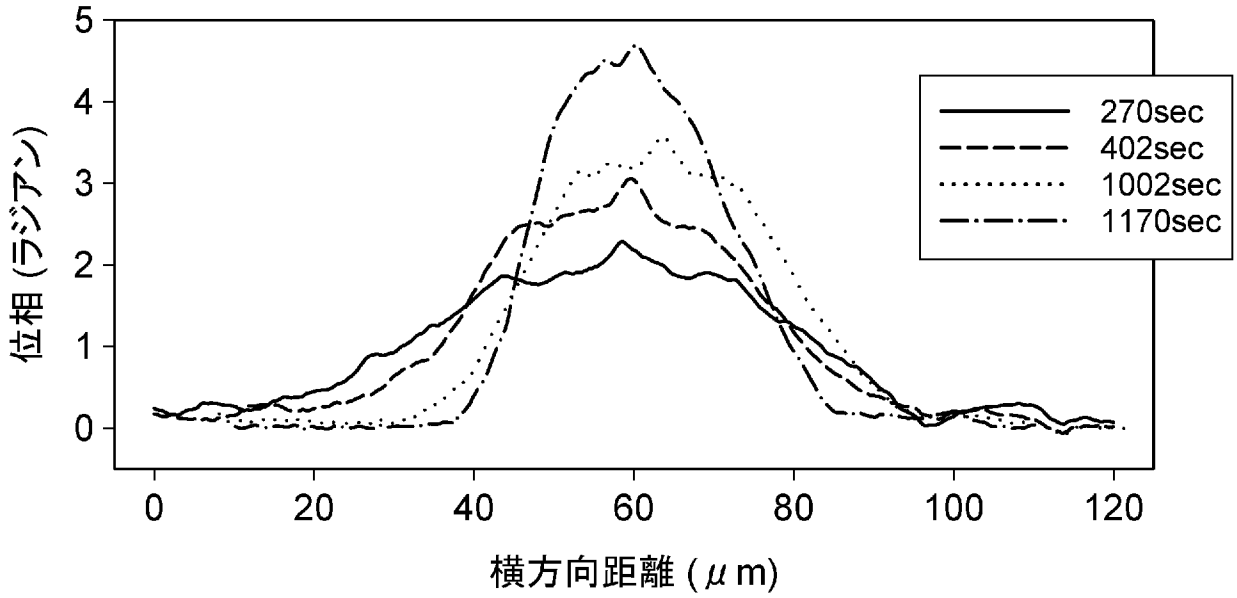
[図2]


前処理なし
270.00 sec.
(a)
402.00 sec.
(b)
1002.00 sec.
(c)
1170.00 sec.
(d)
radian
micron
Phase (rad.)

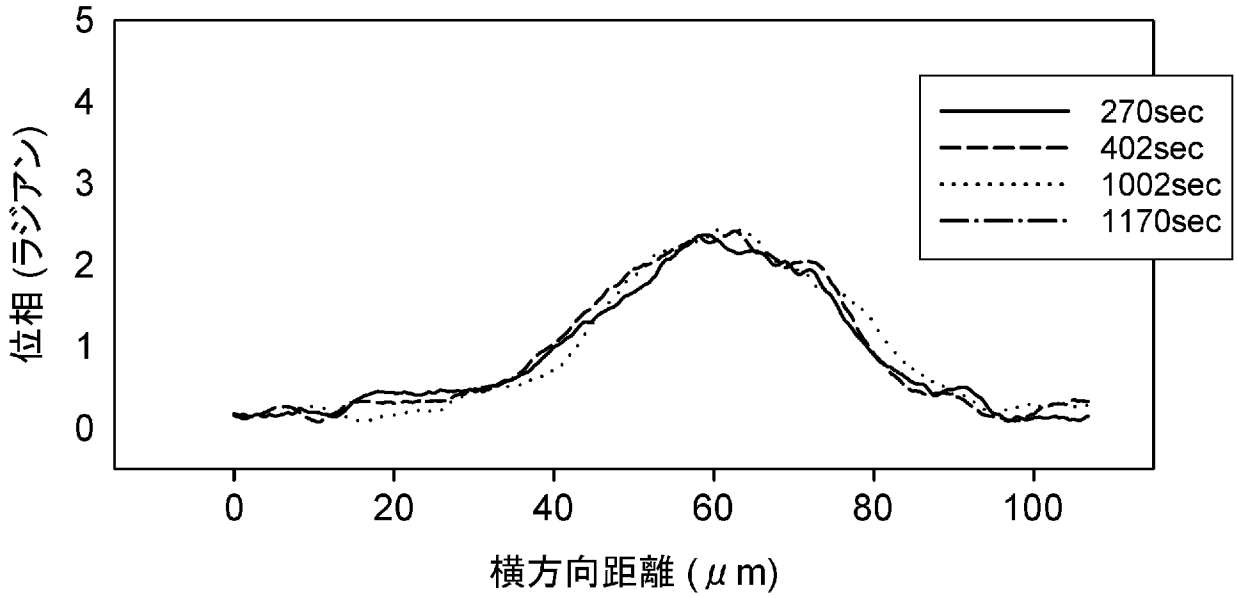
[図3]


レボセチリジン処理
270.00 sec.
(a)
400.00 sec.
(b)
1002.00 sec.
(c)
1170.00 sec.
(d)
radian
micron
Phase (rad.)

[図4]

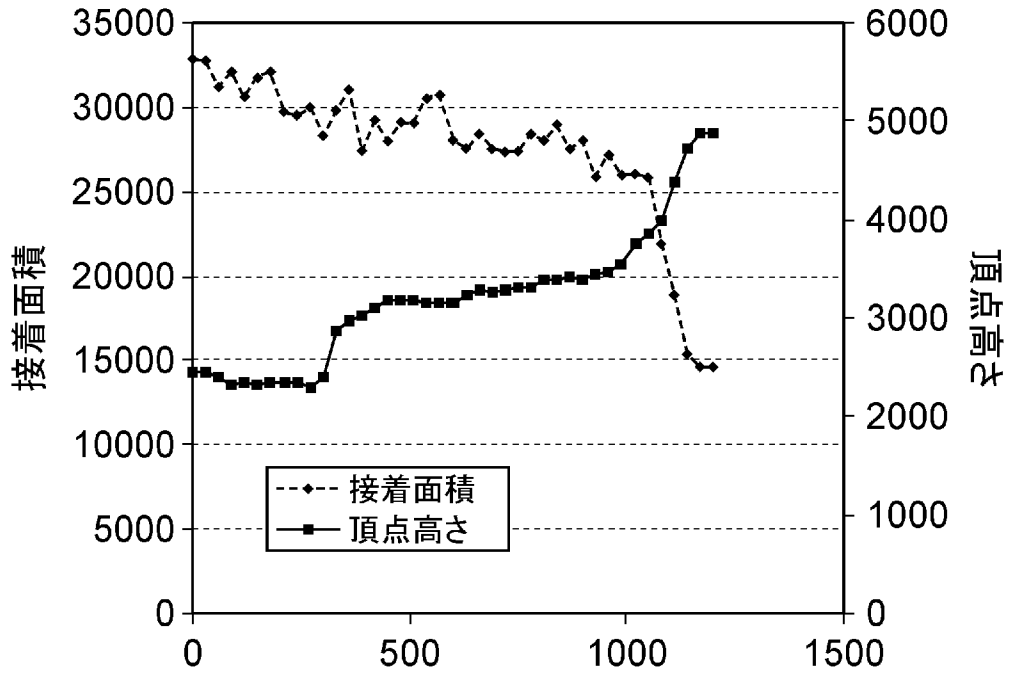

5
4
3
2
1
0
位相 (ラジアン)
0
20
40
60
80
100
120
横方向距離 (μm)
270sec
402sec
1002sec
1170sec

[図5]

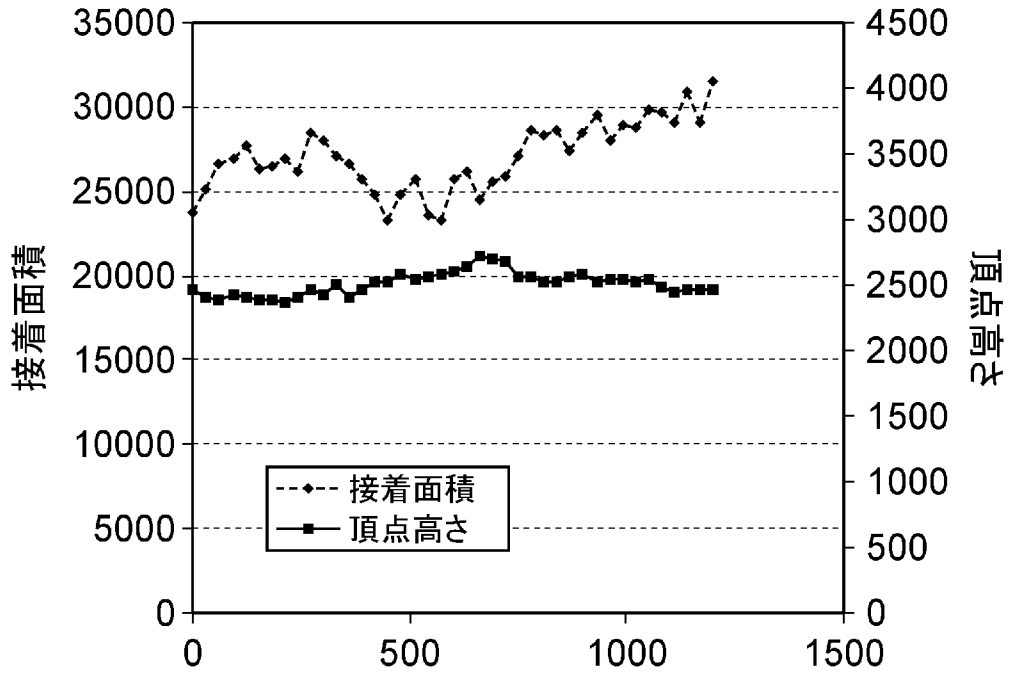

5
4
3
2
1
0
位相 (ラジアン)
0
20
40
60
80
100
横方向距離 (μm)
270sec
402sec
1002sec
1170sec

[図6]

(a)

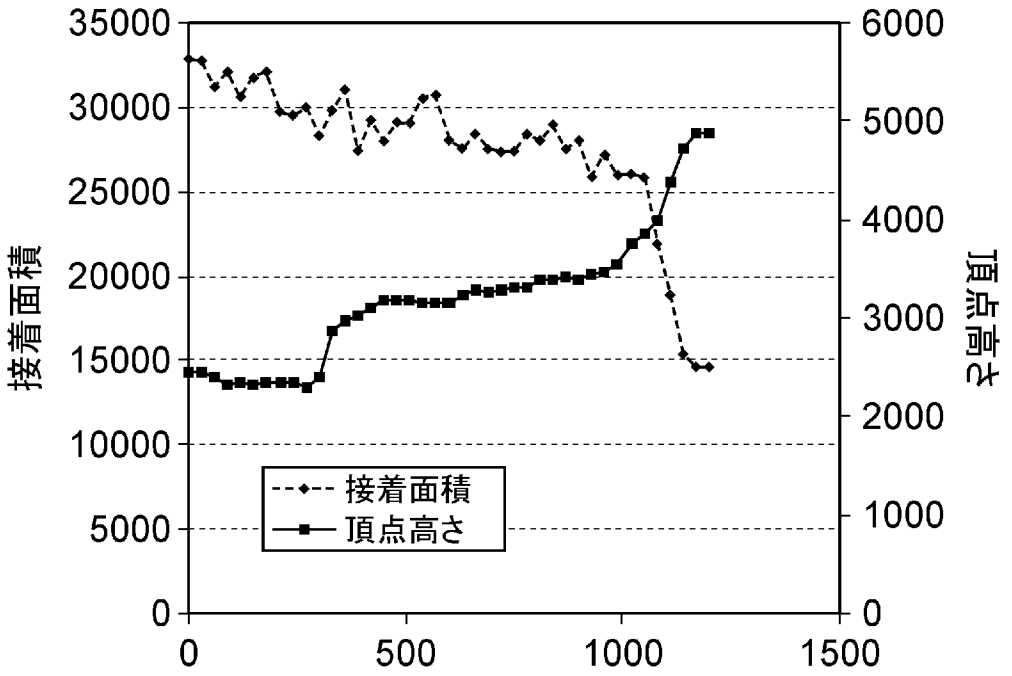

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
500
1000
1500
接着面積
頂点高さ
接着面積
頂点高さ

(b)

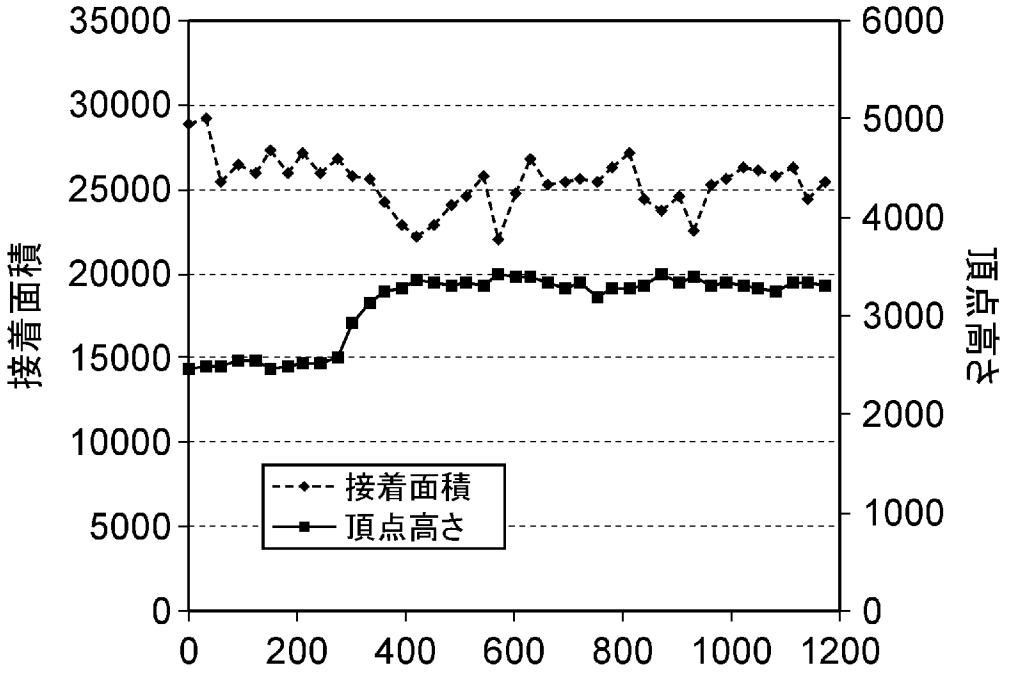

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
500
1000
1500
接着面積
頂点高さ
接着面積
頂点高さ

[図7]

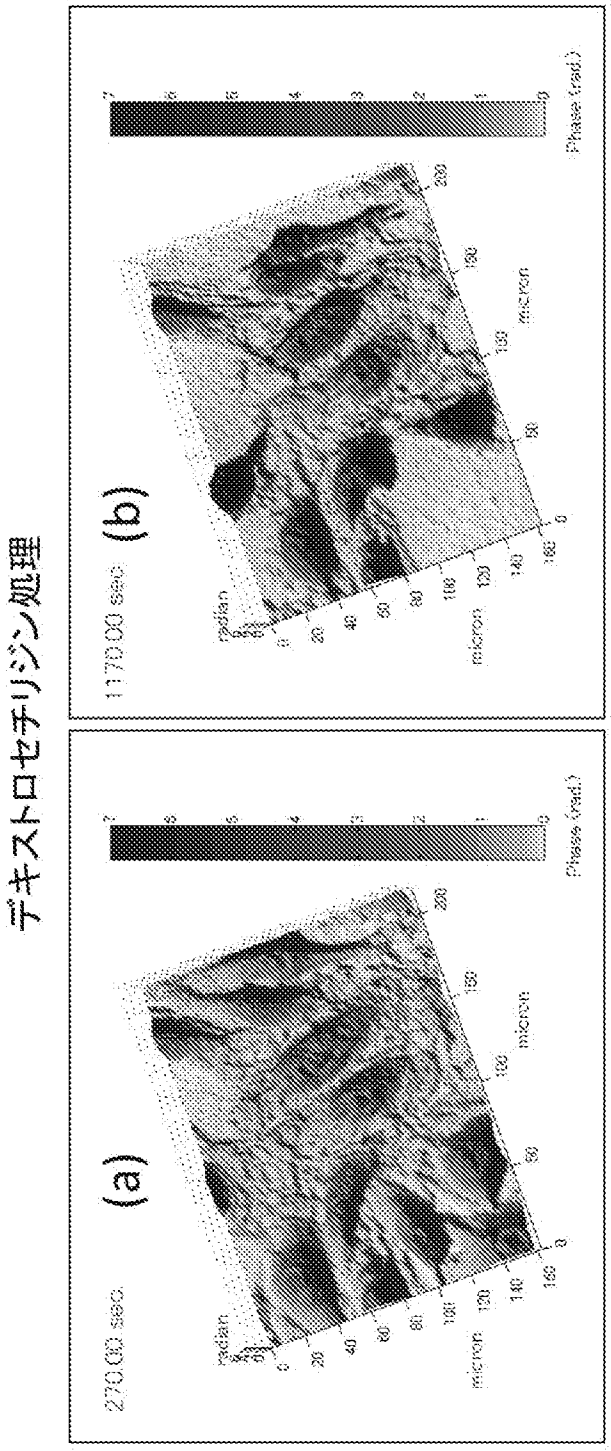
(a)


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
500
1000
1500
接着面積
頂点高さ
接着面積
頂点高さ

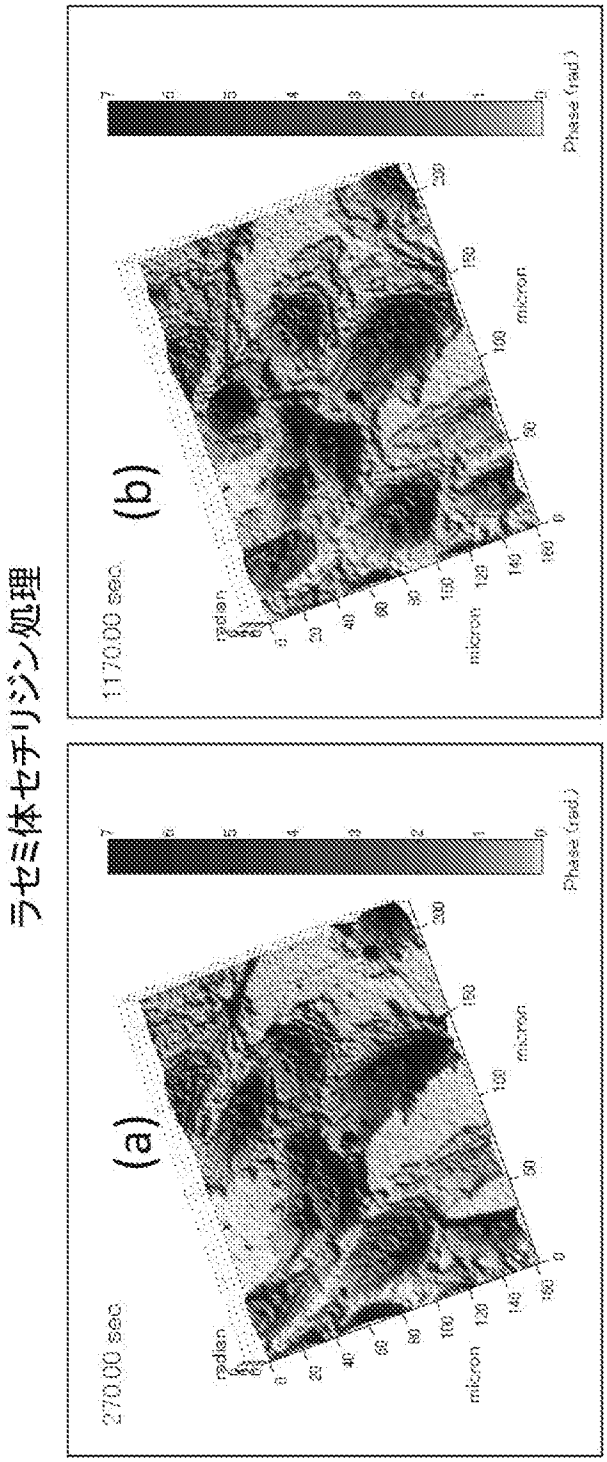
(b)


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
200
400
600
800
1000
1200
接着面積
頂点高さ
接着面積
頂点高さ

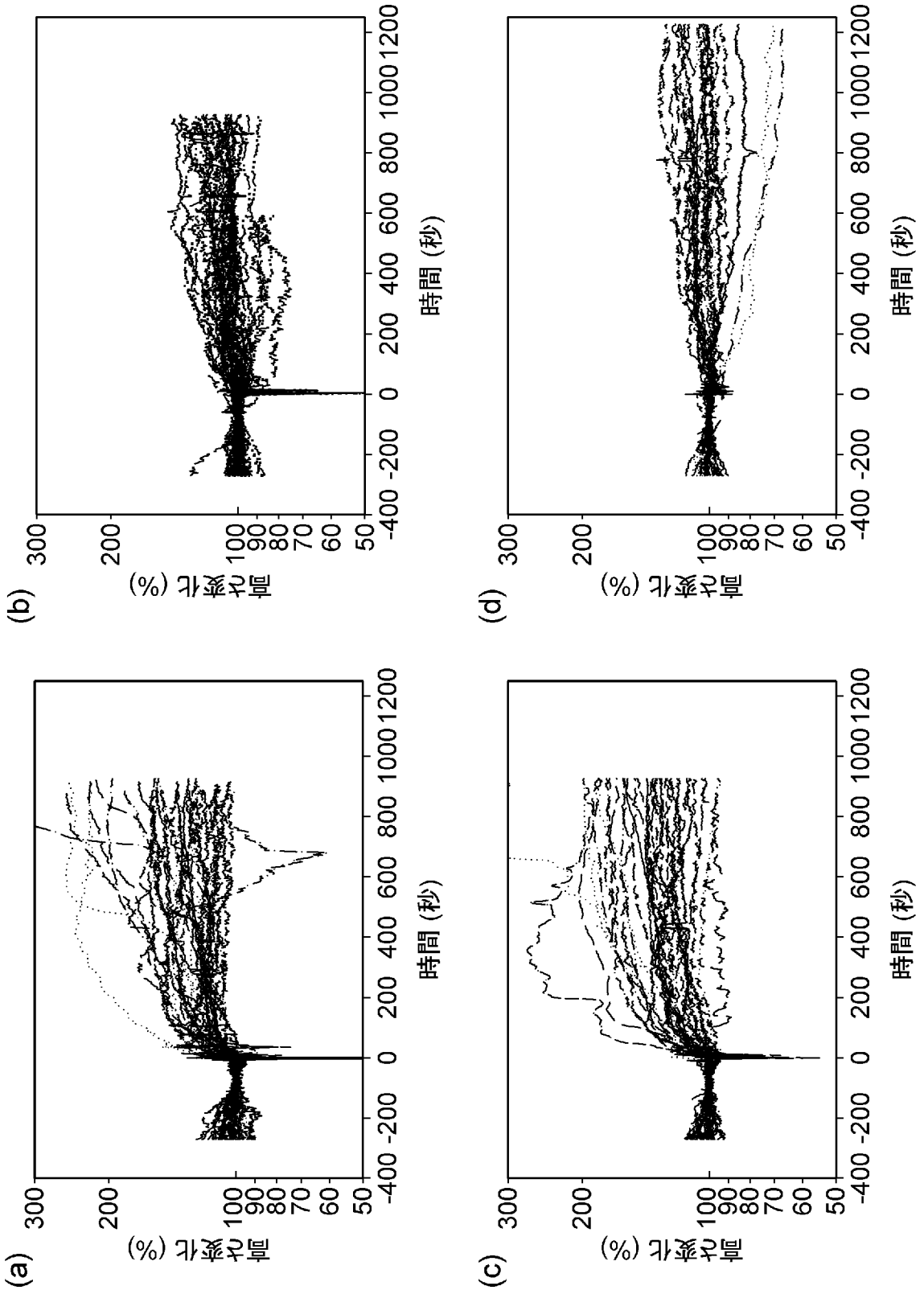
[図8]


デキストロセチリジン処理
(a)
270.00 sec.
(b)
1170.00 sec.
Phase (rad.)
micron
radian

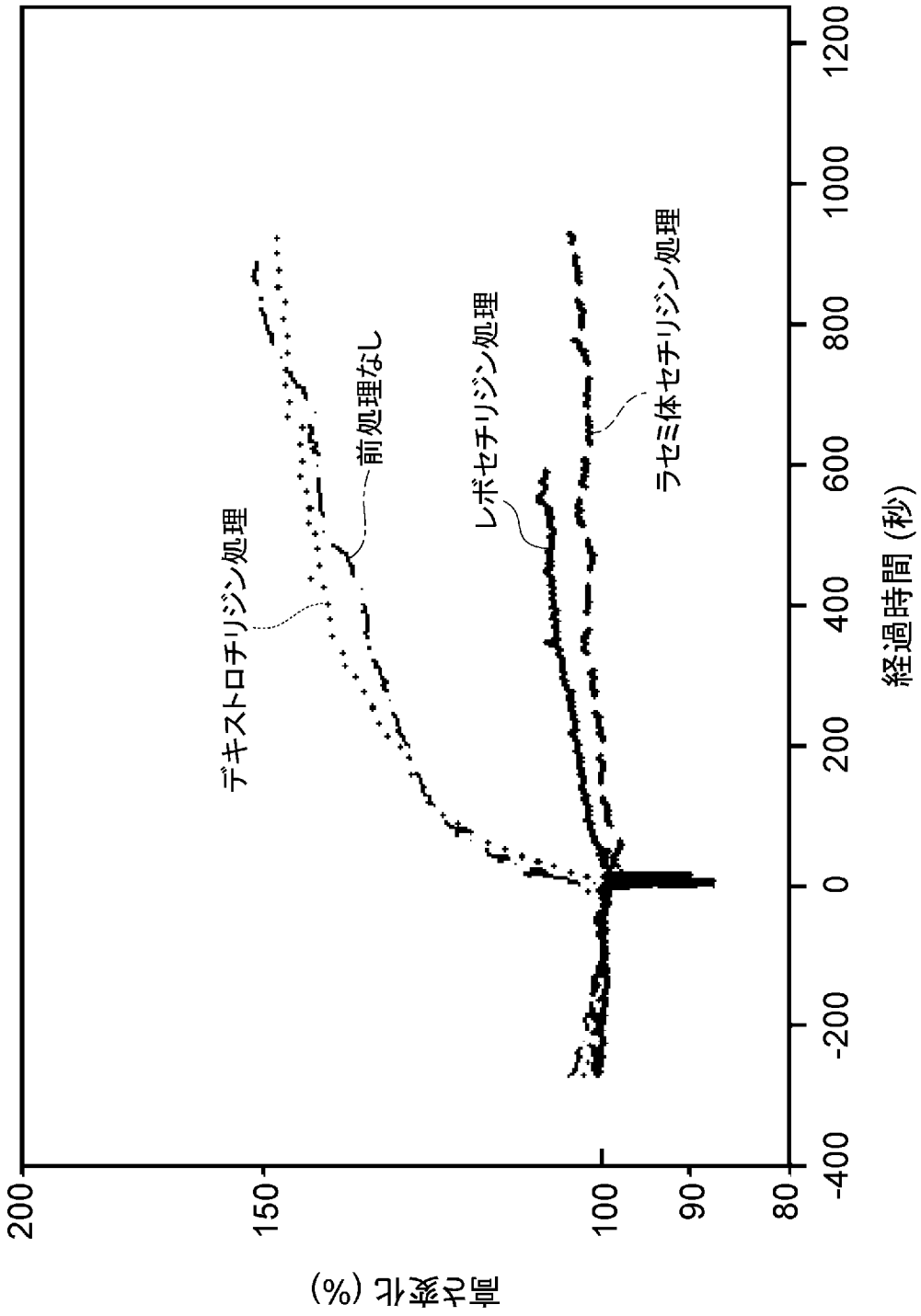
[図9]


ラセミ体セチリジン処理
(a)
270.00 sec
(b)
1170.00 sec
Phase (rad.)
micron
radian

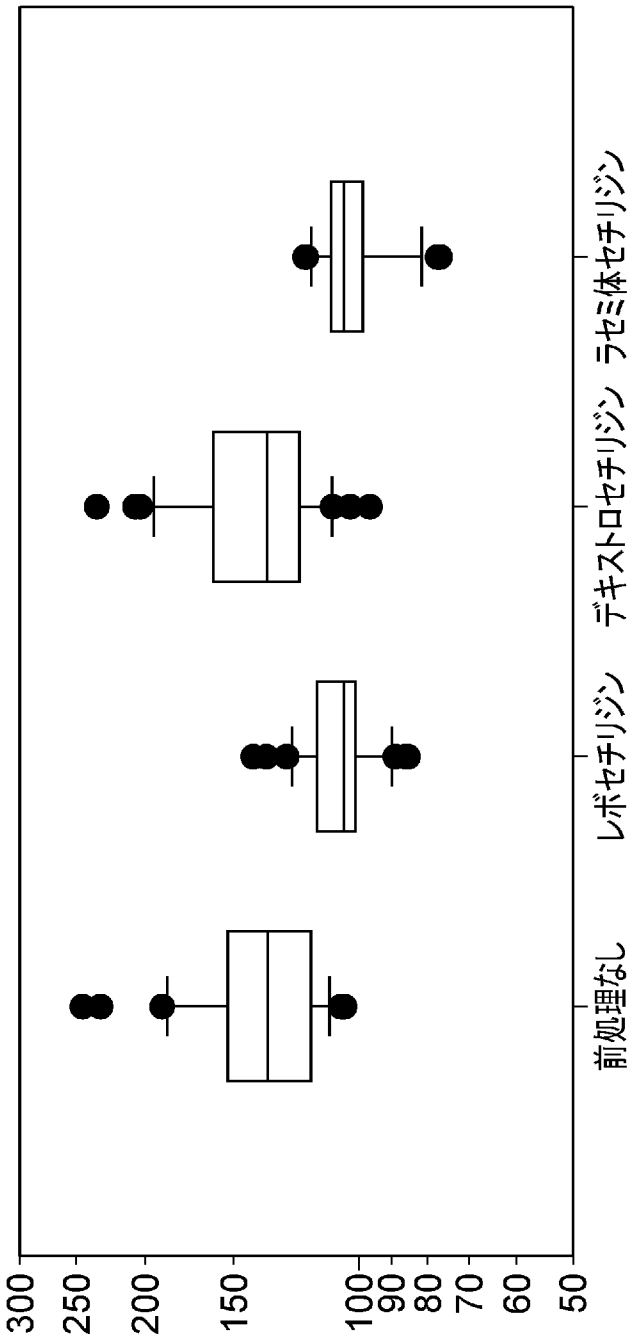
[図10]


(a)
(b)
(c)
(d)
高さ変化 (%)
時間 (秒)
300
200
100
90
80
70
60
50
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200

[図11]


デキストロチリジン処理
前処理なし
レボセチリジン処理
ラセミ体セチリジン処理
200
150
100
90
80
-400
-200
0
200
400
600
800
1000
1200
経過時間 (秒)
高さ変化 (%)

[図12]


300
250
200
150
100
90
80
70
60
50
前処理なし
レボセチリジン
デキストロセチリジン
ラセミ体セチリジン

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/054528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/02(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)
C12Q1/02

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JS, T7580(JDreamIII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-002093 A (Masako NOZAKI), 06 January 2005 (06.01.2005), entire text & JP 2009-221217 A & US 2004/0167161 A1 & US 2007/0054937 A1 & US 2007/0059243 A1 & US 2007/0060611 A1 & US 2007/0066648 A1 & US 2007/0066649 A1 & EP 1424101 A2	1-6
A	JP 2006-506321 A (Children's Medical Center Corp.), 23 February 2006 (23.02.2006), entire text & US 2005/0112063 A1 & US 2005/0203013 A1 & EP 1494699 A & WO 2003/086178 A2	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
27 May, 2014 (27.05.14)	03 June, 2014 (03.06.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/054528

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-524058 A (Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori), 11 October 2012 (11.10.2012), entire text & US 2012/0101261 A1 & EP 2419103 A & WO 2010/119306 A1	1-6
A	JP 2012-530784 A (DMI Acquisition Corp.), 06 December 2012 (06.12.2012), entire text & US 2010/0324005 A1 & US 2012/0077789 A1 & US 2012/0035147 A1 & US 2010/0323991 A1 & EP 2326332 A & EP 2425839 A1 & EP 2554170 A1 & EP 2554171 A1 & EP 2554172 A1 & EP 2554173 A1 & EP 2554174 A1 & EP 2445350 A & WO 2010/151530 A1 & WO 2010/151531 A1	1-6

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０５４５２８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/02(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/02

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

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）

ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ），ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ），ＰｕｂＭｅｄ

Ｃ．　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	JP 2005-002093 A (野崎昌子) 2005.01.06 全文 & JP 2009-221217 A & US 2004/0167161 A1 & US 2007/0054937 A1 & US 2007/0059243 A1 & US 2007/0060611 A1 & US 2007/0066648 A1 & US 2007/0066649 A1 & EP 1424101 A2	１－６

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「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の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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２７．０５．２０１４	０３．０６．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３９６３
福澤　洋光
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	JP 2006-506321 A (チルドレンズ メディカル センター コーポレーション) 2006.02.23 全文 & US 2005/0112063 A1 & US 2005/0203013 A1 & EP 1494699 A & WO 2003/086178 A2	１－６
A	JP 2012-524058 A (フォンダツィオーネ　アイアールシーシーエス　イスティトゥト　ナツィオナーレ　デイ　トゥモリ) 2012.10.11 全文 & US 2012/0101261 A1 & EP 2419103 A & WO 2010/119306 A1	１－６
A	JP 2012-530784 A(ディエムアイ　アクイジション　コーポレイション) 2012.12.06 全文 & US 2010/0324005 A1 & US 2012/0077789 A1 & US 2012/0035147 A1 & US 2010/0323991 A1 & EP 2326332 A & EP 2425839 A1 & EP 2554170 A1 & EP 2554171 A1 & EP 2554172 A1 & EP 2554173 A1 & EP 2554174 A1 & EP 2445350 A & WO 2010/151530 A1 & WO 2010/151531 A1	１－６