

(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
2022年3月10日(10.03.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/050233 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/26 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01) *G01N 21/78* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/031785

(22) 国際出願日: 2021年8月30日(30.08.2021)

(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 2020-148548 2020年9月3日(03.09.2020) JP

(71) 出願人: 黒金化成株式会社 (KUROGANE KASEI CO.,LTD.) [JP/JP]; 〒4600003 愛知県名古屋市中区錦一丁目6番17号 Aichi (JP). 国立大学法人電気通信大学 (THE UNIVERSITY OF ELECTRO-COMMUNICATIONS) [JP/JP]; 〒1828585 東京都調布市調布ケ丘一丁目5番地1 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 仲村 厚志 (NAKAMURA Atsushi); 〒1828585 東京都調布市調布ケ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内 Tokyo (JP). 牧 昌次郎 (MAKI Shojiro); 〒1828585 東京都調布市調布ケ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内 Tokyo (JP). 森屋 亮平 (MORIYA Ryohei); 〒1828585 東京都調布市調布ケ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内 Tokyo (JP). 北田 昇雄 (KITADA Nobuo); 〒1828585 東

京都調布市調布ケ丘一丁目5番地1 国立大学法人電気通信大学内 Tokyo (JP).

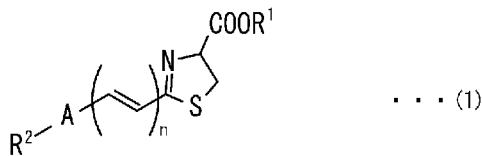
(74) 代理人: 杉 村 憲 司 (SUGIMURA Kenji); 〒1000013 東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 霞が関コモンゲート西館36階 Tokyo (JP).

(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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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).

(54) Title: LIGHT-EMITTING SYSTEM AND CYTOCHROME P450 QUANTIFICATION METHOD

(54) 発明の名称: 発光システム及びシトクロムP450の定量方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a cytochrome P450 light emission system which can easily be made to emit light without the need for excitation light; this purpose is met by a light emitting system characterized by containing cytochrome P450 and a heterocyclic compound represented by general formula (1) or a salt thereof [in the formula, R¹ is a hydrogen or a C1-4 alkyl group, R² is NR⁴₂ or OH; the R⁴s are independently a hydrogen or a C1-6 alkyl group, and two R⁴s of the NR⁴₂s may optionally bond together and form a ring; A is represented by general formula (2) or (3), the R³s are independently CR⁵ or N; R⁵s are independently a hydrogen, a C1-8 alkyl group or a C2-8 alkenyl group, and n is an integer 0-3].

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：本発明の課題は、励起光を必要とせず、簡便に発光させることが可能な、シトクロム P 4 5 0 の発光システムを提供することであり、その解決手段は、下記一般式（1）：〔式中、 R^1 は、水素又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基であり、 R^2 は、 NR^4_2 又は OH であり、ここで、 R^4 は、それぞれ独立して水素又は炭素数 1 ～ 6 のアルキル基であり、また、 NR^4_2 の 2 つの R^4 は、互いに結合して環を形成してもよく、A は、上記一般式（2）又は（3）で表され、 R^3 は、それぞれ独立して CR^5 又は N であり、ここで、 R^5 は、それぞれ独立して水素、炭素数 1 ～ 8 のアルキル基又は炭素数 2 ～ 8 のアルケニル基であり、n は、0 ～ 3 の整数である〕で表される複素環式化合物又はその塩と、シトクロム P 4 5 0 と、を含むことを特徴とする、発光システムである。

明 細 書

発明の名称：発光システム及びシトクロム P 4 5 0 の定量方法 技術分野

[0001] 本発明は、発光システム及びシトクロム P 4 5 0 の定量方法に関するものである。

背景技術

[0002] シトクロム P 4 5 0 は、細菌から植物、哺乳動物に至るまでの殆ど全ての生物に存在する代謝酵素であり、薬物・毒物代謝をはじめ、ホルモンの生合成、脂肪酸の代謝や植物の二次代謝等も担っている。創薬において、薬物がシトクロム P 4 5 0 によって代謝される過程を明らかにすることは、副作用や薬の飲み合わせを検討する上で極めて重要である（非特許文献 1）。

[0003] 従来、シトクロム P 4 5 0 の活性を検出する方法として、蛍光アッセイ及び発光アッセイが知られている。

蛍光アッセイでは、シトクロム P 4 5 0 による代謝後に蛍光産物を生成する基質を用いる。ここで、シトクロム P 4 5 0 の活性を変調させるテスト化合物は、蛍光産物の蓄積量への影響によって同定される。

一方、発光アッセイでは、ホタルルシフェラーゼと、その基質であるホタルルシフェリンによる発光反応を利用する（非特許文献 2）。具体的には、予め、ホタルルシフェラーゼの基質ではないホタルルシフェリンの誘導体を準備しておき、第 1 の反応で、シトクロム P 4 5 0 が該ホタルルシフェリンの誘導体をホタルルシフェリンに変換する。そして、第 2 の反応で、生成したホタルルシフェリンとホタルルシフェラーゼとが反応して発光し、その発光量を測定することで、シトクロム P 4 5 0 を定量する。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献 1：「チトクローム P 4 5 0 を介した薬物相互作用」，ファルマシア，31（9），992－996，（1995）

非特許文献2：「発光アッセイ法を用いたシトクロムP450活性のスクリーニング」，プロメガ社，2006年11月19日

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、前記蛍光アッセイに必要な励起光は、バックグラウンドシグナルを発生させ、これがアッセイ感度に限界を与える。

一方、前記発光アッセイは、励起光を必要としないため、バックグラウンドが低く抑えられ、アッセイ感度が高くなるが、対象物にホタルルシフェラーゼ発現のための遺伝子導入が必要になる。そのため、*in vitro*（生体外の実験）では、ホタルルシフェラーゼを添加作用させる必要があり、*in vivo*（生体内の実験）の場合には、予めホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え生物の作製が必要であり、簡便に発光させることができない。

[0006] そこで、本発明は、上記従来技術の問題を解決し、励起光を必要とせず、簡便に発光させることが可能な、シトクロムP450の発光システムを提供することを課題とする。

また、本発明は、上記発光システムを利用して、簡便に且つ高感度で、シトクロムP450を定量する方法を提供することを更なる課題とする。

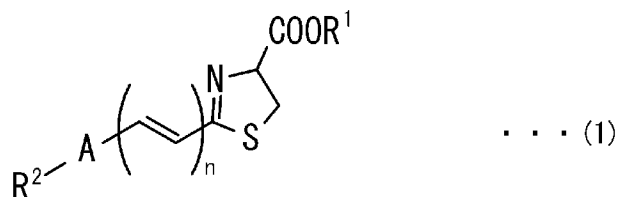
課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、シトクロムP450が特定構造の化合物と反応して発光し、該発光を定量することで、シトクロムP450を定量できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、上記課題を解決する本発明の要旨構成は、以下の通りである。

[0008] 本発明の発光システムは、下記一般式（1）：

[化1]

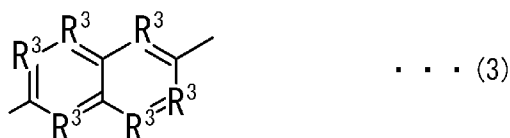


[式中、 R^1 は、水素又は炭素数1～4のアルキル基であり、

R^2 は、 NR^4_2 又はOHであり、ここで、 R^4 は、それぞれ独立して水素又は炭素数1～6のアルキル基であり、また、 NR^4_2 の2つの R^4 は、互いに結合して環を形成してもよく、

Aは、下記一般式(2)又は(3)：

[化2]



で表され、

R^3 は、それぞれ独立して CR^5 又はNであり、ここで、 R^5 は、それぞれ独立して水素、炭素数1～8のアルキル基又は炭素数2～8のアルケニル基であり、

nは、0～3の整数である]で表される複素環式化合物又はその塩と、シトクロムP450と、を含むことを特徴とする。

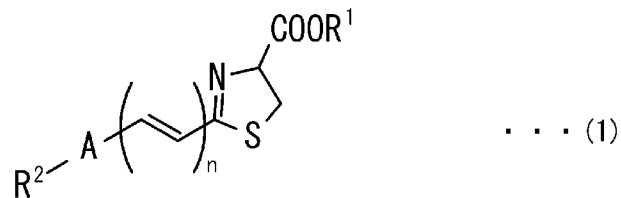
かかる本発明の発光システムは、励起光を必要とせず、簡便にシトクロムP450由来の発光を得ることができる。

[0009] 本発明の発光システムの好適例においては、前記シトクロムP450が、生体内組織中に存在する。この場合、生体内組織中のシトクロムP450に由来する発光が得られる。

[0010] 本発明の発光システムの他の好適例においては、前記シトクロム P 4 5 0 が、哺乳類の肝臓組織中に存在する。この場合、哺乳類の肝臓組織中のシトクロム P 4 5 0 に由来する発光が得られる。

[0011] 本発明のシトクロム P 4 5 0 の定量方法は、シトクロム P 4 5 0 に、下記一般式 (1) :

[化3]

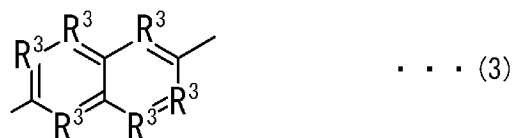


[式中、R¹は、水素又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基であり、

R²は、NR⁴₂又はOHであり、ここで、R⁴は、それぞれ独立して水素又は炭素数 1 ～ 6 のアルキル基であり、また、NR⁴₂の 2 つの R⁴は、互いに結合して環を形成してもよく、

Aは、下記一般式 (2) 又は (3) :

[化4]



で表され、

R³は、それぞれ独立してCR⁵又はNであり、ここで、R⁵は、それぞれ独立して水素、炭素数 1 ～ 8 のアルキル基又は炭素数 2 ～ 8 のアルケニル基であり、

n は、0 ～ 3 の整数である] で表される複素環式化合物又はその塩を反応させ、生じる発光量を測定し、

前記発光量から、前記シトクロム P 4 5 0 の量を測定することを特徴とする。

かかる本発明のシトクロム P 4 5 0 の定量方法は、簡便に且つ高感度で、シトクロム P 4 5 0 を定量することができる。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、励起光を必要とせず、簡便に発光させることが可能な、シトクロム P 4 5 0 の発光システムを提供することができる。

また、本発明によれば、簡便に且つ高感度で、シトクロム P 4 5 0 を定量する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]節足動物抽出物と、構造式 (1-1) の化合物又はホタルルシフェリンを含む系での、発光量を測定した結果である。

[図2]哺乳類の肝臓培養細胞と、構造式 (1-1) の化合物又はホタルルシフェリンを含む系での、発光量を測定した結果である。

[図3]ダンゴムシ (雄) 抽出物と、シトクロム P 4 5 0 阻害剤と、構造式 (1-1) の化合物を含む系での、発光量の減少量を測定した結果である。

[図4]ダンゴムシ (雌) 抽出物と、シトクロム P 4 5 0 阻害剤と、構造式 (1-1) の化合物を含む系での、発光量の減少量を測定した結果である。

[図5]クロキンバエ (雄) 抽出物と、シトクロム P 4 5 0 阻害剤と、構造式 (1-1) の化合物を含む系での、発光量の減少量を測定した結果である。

[図6]クロキンバエ (雌) 抽出物と、シトクロム P 4 5 0 阻害剤と、構造式 (1-1) の化合物を含む系での、発光量の減少量を測定した結果である。

[図7]マウスの肝臓抽出物と、シトクロム P 4 5 0 阻害剤と、構造式 (1-1) の化合物を含む系での、発光量の減少量を測定した結果である。

[図8]マウスに、シトクロム P 4 5 0 阻害剤と、構造式 (1-2) の化合物を投与して、発光量の減少量を測定した結果である (in vivo)。

[図9]CYP1A2と、一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を含む系での、発光量を測定した結果である。

[図10]C Y P 2 A 6 と、一般式 (1) で表される複素環式化合物を含む系での、発光量を測定した結果である。

[図11]C Y P 2 B 6 と、一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を含む系での、発光量を測定した結果である。

[図12]C Y P 2 C 9 と、一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を含む系での、発光量を測定した結果である。

[図13]C Y P 2 D 6 と、一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を含む系での、発光量を測定した結果である。

[図14]C Y P 2 E 1 と、一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を含む系での、発光量を測定した結果である。

[図15]C Y P 3 A 4 と、一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を含む系での、発光量を測定した結果である。

[図16]マウスに、構造式 (1 - 2) の化合物 (D 体) 又は構造式 (1 - 8) の化合物 (L 体) を投与して、発光量を測定した結果である (*in vivo*) 。

[図17]クロキンバエ幼虫に、構造式 (1 - 2) の化合物を投与して、撮影した発光画像である (*in vivo*) 。

[図18]四塩化炭素による慢性肝疾患モデルマウスと、対照群のマウスに、構造式 (1 - 2) の化合物を投与して、発光量を測定した結果である (*in vivo*) 。

[図19]非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスと、対照群のマウスに、構造式 (1 - 2) の化合物を投与して、発光量を測定した結果である (*in vivo*) 。

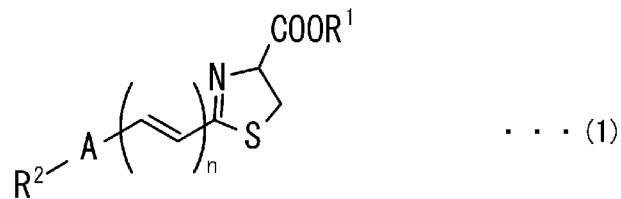
発明を実施するための形態

[0014] 以下に、本発明の発光システム及びシトクロム P 4 5 0 の定量方法を、その実施形態に基づき、詳細に例示説明する。

[0015] <発光システム>

本発明の発光システムは、下記一般式 (1) :

[化5]

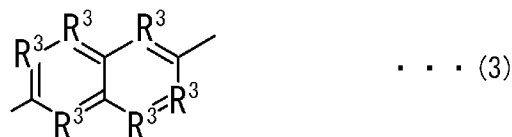


[式中、 R^1 は、水素又は炭素数1～4のアルキル基であり、

R^2 は、 NR^4_2 又は OH であり、ここで、 R^4 は、それぞれ独立して水素又は炭素数1～6のアルキル基であり、また、 NR^4_2 の2つの R^4 は、互いに結合して環を形成してもよく、

A は、下記一般式(2)又は(3)：

[化6]



で表され、

R^3 は、それぞれ独立して CR^5 又は N であり、ここで、 R^5 は、それぞれ独立して水素、炭素数1～8のアルキル基又は炭素数2～8のアルケニル基であり、

n は、0～3の整数である]で表される複素環式化合物又はその塩と、シトクロムP450と、を含むことを特徴とする。

[0016] 本発明の発光システムにおいては、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩とシトクロムP450とが反応して、発光する。該発光の際、本発明の発光システムは、蛍光アッセイとは異なり、励起光を必要としない。

また、本発明の発光システムは、ホタルルシフェリンをを用いた発光シス

テムとは異なり、ホタルルシフェラーゼを必要としない。そのため、*in vivo*（生体内）の場合であっても、予めホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入した遺伝子組換え生物を作製する必要がない。

従って、本発明の発光システムは、励起光を必要とせず、簡便に発光させることができる。

[0017] 本発明の発光システムによれば、シトクロムP450の活性を直接可視化する方法を提供することができる。シトクロムP450に、該シトクロムP450と反応する上記一般式（1）で表される複素環式化合物又はその塩を作用させると、シトクロムP450の活性度に応じて発光する。この発光は、ホタルの発光システムとは異なり、ルシフェラーゼを必要としないため、測定対象にルシフェラーゼ遺伝子を導入する必要がない。また、特定のシトクロムP450と、それと相互作用する一般式（1）で表される複素環式化合物又はその塩と組み合わせることで、生体に広く存在するシトクロムP450のセンシングが可能となる。

[0018] （複素環式化合物又はその塩）

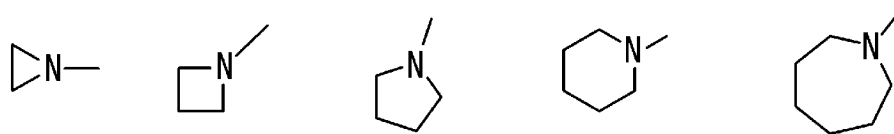
上記一般式（1）中、 R^1 は、水素又は炭素数1～4のアルキル基である。ここで、炭素数1～4のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基等が挙げられる。発光効率の観点から、 R^1 としては、水素が好ましい。

なお、 $-COOR^1$ が結合しているチアゾリン環の不斉炭素に関して、立体配置は、*R*でも、*S*でもよい。

[0019] 上記一般式（1）中、 R^2 は、 NR^4_2 又はOHであり、ここで、 R^4 は、それぞれ独立して水素又は炭素数1～6のアルキル基であり、また、 NR^4_2 の2つの R^4 は、互いに結合して環を形成してもよい。 R^4 に関して、炭素数1～6のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基等が挙げられる。また、 NR^4_2 の2つの R^4 が結合して、Nと共に形成

する環状構造の基としては、下記式：

[化7]



で表される 1-アザシクロプロピル基（三員環）、1-アザシクロブチル基（四員環）、1-アザシクロペンチル基（五員環）、1-アザシクロヘキシル基（六員環）、1-アザシクロヘプチル基（七員環）等が挙げられる。発光効率の観点から、 R^4 としては、メチル基が好ましい。

R^2 としては、発光効率の観点から、 NR^4_2 が好ましく、 $N(CH_3)_2$ が特に好ましい。

[0020] 上記一般式（1）中、Aは、上記一般式（2）又は（3）で表される。なお、発光効率の観点から、Aは、上記一般式（2）又は（3）で表され、 R^3 が CR^5 であることが好ましく、上記一般式（2）で表されることがより好ましい。

[0021] 上記一般式（2）及び（3）中、 R^3 は、それぞれ独立して CR^5 又はNであり、ここで、 R^5 は、それぞれ独立して水素、炭素数1～8のアルキル基又は炭素数2～8のアルケニル基である。 R^5 に関して、炭素数1～8のアルキル基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基等が挙げられ、炭素数2～8のアルケニル基としては、ビニル基、アリル基、1-プロペニル基、イソプロペニル基、1-ブテニル基、2-ブテニル基、3-ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基、ヘプテニル基、オクテニル基等が挙げられる。

合成容易性の観点からは、 R^3 は、 CR^5 であることが好ましい。また、水やpHが中性付近の緩衝液への溶解性の観点からは、 R^3 の一つ以上が、Nであることが好ましい。

[0022] 上記一般式（1）中、nは、ビニレン単位（ $-CH=CH-$ ）の繰り返し

数を示し、0～3の整数である。nの数が多い程、発光波長が長くなるため、生体内深部の可視化の観点から、nは2又は3であることが好ましく、合成容易性の観点から、nは2であることが好ましい。

[0023] 上記一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩は、例えば、特許第5464311号公報、特許第6011974号公報、特許第6353751号公報、国際公開第2013/027770号に開示の方法に従って合成することができ、また、市販品を利用することもできる。

[0024] 上記一般式(1)で表される複素環式化合物は、塩とすることもできる。一般式(1)で表される複素環式化合物の塩も、シトクロムP450と反応して、光を発することができる。

ここで、上記一般式(1)で表される複素環式化合物の塩は、酸との付加塩でも、塩基との付加塩でもよい。例えば、一般式(1)の複素環式化合物と酸との付加塩における酸としては、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸、亜リン酸、亜硝酸、クエン酸、ギ酸、酢酸、シュウ酸、マレイン酸、乳酸、酒石酸、フマル酸、安息香酸、マンデル酸、ケイ皮酸、パモ酸、ステアリン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸、コハク酸、トリフルオロ酢酸等が挙げられ、また、酸付加塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、スルファミン酸塩、リン酸塩、硝酸塩、亜リン酸塩、亜硝酸塩、クエン酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、安息香酸塩、マンデル酸塩、ケイ皮酸塩、パモ酸塩、ステアリン酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンジスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、トリフルオロ酢酸塩等が挙げられる。一方、一般式(1)の複素環式化合物と塩基との付加塩における塩基としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム、アンモニア、エタノールアミン、メグルミンが挙げられ、また、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マ

グネシウム塩、アンモニウム塩、エタノールアミン塩、メグルミン塩等が挙げられる。

[0025] 上記一般式(1)で表される複素環式化合物の塩は、水やpHが中性付近の緩衝液への溶解性に優れる。そのため、上記一般式(1)で表される複素環式化合物の塩は、水やpHが中性付近の緩衝液に高濃度で溶解させることができ、発光輝度を向上させることができる。

[0026] (シトクロムP450)

前記シトクロムP450(CYP)とは、モノオキシゲナーゼ活性を有する一群の還元型プロトヘム含有タンパク質であり、該タンパク質に還元状態で一酸化炭素を通気すると吸収スペクトルが変化し450nmに極大をもつ差スペクトル(CO差スペクトル)が現れることを特徴とする。シトクロムP450の遺伝子は、大腸菌等の一部の細菌を除く大部分の生物に存在することが知られている。シトクロムP450は、水酸化反応、エポキシ化反応、脱メチル化反応等、様々な反応に関与することが知られており、生体内での役割も、二次代謝、ステロイドホルモンの生合成、異物代謝、炭化水素の資化等、多様である。例えば、シトクロムP450は、血中を循環する疎水性薬剤、発癌物質、並びに、その他の潜在的に毒性を有する化合物及び代謝産物の代謝に関与する。なお、肝臓は、高レベルの最も重要なCYP混合機能オキシダーゼを含有する、生体異物代謝のための主要器官である。薬物代謝反応の約80%に、シトクロムP450が関与するとも言われており、シトクロムP450の活性を測定することで、薬剤による副作用を評価することが可能となる。

[0027] 前記シトクロムP450は、アミノ酸配列の同一性に基づいて分類される。原則として、アミノ酸配列が40%以上一致する場合は同一のファミリー、55%以上一致する場合には同一のサブファミリーに分類され、固有の分類記号が付与される。分類記号は、シトクロムP450を表すCYP、ファミリー番号、サブファミリー番号、及び遺伝子番号をこの順で含み、遺伝子番号は発見順に付与される。

前記シトクロムP450のサブファミリー（分子種）としては、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5等が挙げられる。

これらの中でも、薬物代謝反応への寄与率の観点からは、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP2C8、CYP1A2が好ましく、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9が更に好ましい。これらのシトクロムP450分子種は、薬物代謝の寄与率が高く、薬物代謝の評価に特に有効である。

また、上記一般式（1）で表される複素環式化合物又はその塩との反応性の観点からは、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5が好ましく、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP3A4が更に好ましい。これらのシトクロムP450分子種は、一般式（1）で表される複素環式化合物又はその塩との反応による発光量が高く、高感度で検出できる。

[0028] 本発明の発光システムの一好適実施態様においては、前記シトクロムP450が、生体内組織中に存在する。この場合、生体内組織中のシトクロムP450に由来する発光が得られる。なお、生体内組織中に存在するシトクロムP450由来の発光を検出するには、上記一般式（1）で表される複素環式化合物又はその塩を生体に投与して、反応により発生する光を検出してもよいし、生体を採取し、試験管等の容器中において、一般式（1）で表される複素環式化合物又はその塩と接触させて、発生する光を検出してもよい。

[0029] 本発明の発光システムの他の好適実施態様においては、前記シトクロムP450が、哺乳類の肝臓組織中に存在する。この場合、哺乳類の肝臓組織中のシトクロムP450に由来する発光が得られる。一般に、哺乳類においては、肝臓組織中にシトクロムP450が高濃度で存在するため、肝臓組織中のシトクロムP450に由来する発光を検出することで、対象となる哺乳類の薬物代謝能や副作用を高い精度で評価できる。なお、哺乳類の肝臓組織中

に存在するシトクロムP450由来の発光を検出するには、上記一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩を哺乳類に投与し、肝臓に送達されて、肝臓組織中に存在するシトクロムP450との反応により発生する光を検出してもよいし、哺乳類から肝臓組織を採取し、試験管等の容器中において、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩と接触させて、発生する光を検出してもよい。

[0030] 本発明の発光システムの他の好適実施態様においては、前記シトクロムP450が、試験管等の容器中に存在する。この場合、生体外で、シトクロムP450由来の発光を検出できるため、生体への影響を低減できると共に、生体内の成分(例えば、ヘモグロビン、酸化ヘモグロビン、水)による光の吸収や散乱も低減でき、発生した光を検出し易い。また、必要に応じて、採取した生体組織に精製処理を施すことで、より精度良く、シトクロムP450由来の発光を検出できる。

[0031] 上記一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩は、前記シトクロムP450 1molに対して、1mol~ 1×10^5 mol使用することが好ましく、 1×10^1 mol~ 1×10^4 mol使用することが更に好ましい。この場合、シトクロムP450の量に依存して、シトクロムP450と、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩と、の反応による発光の量が増加して、シトクロムP450の定量の精度が向上する。

[0032] (その他)

本発明の発光システムは、構成要素として、上述の一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩と、シトクロムP450を有すればよいが、発光量を増加させたり、発光を安定化させる等を目的として、更に他の成分を含んでもよい。また、シトクロムP450と反応する際に、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩が存在すればよく、例えば、試験管等の容器や、生体内に投与する際は、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩の前駆体であってもよい。一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩の前駆体としては、一般式(1)中の R^1 や R^2 に、糖、ATP、

リン脂質等が結合した化合物やその塩等が挙げられるが、これに限られるものではない。これら前駆体も、糖、ATP、リン脂質等がR¹やR²から外れて、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩に変化することで、シトクロムP450と反応して、発光する。

[0033] 本発明の発光システムは、更に緩衝剤を含むことが好ましい。緩衝剤を含む場合、発光システムのpHを調整し易く、安定した発光を得易い。ここで、発光システムのpHは、4～10が好ましく、6～8がより好ましい。また、緩衝剤としては、リン酸カリウム、トリス塩酸(Tris/HCl)、グリシン、HEPES等が挙げられる。

[0034] 本発明の発光システムは、更に界面活性剤を含むことが好ましい。該界面活性剤としては、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤等が挙げられ、非イオン性界面活性剤が好ましい。また、非イオン性界面活性剤としては、ポリ(オキシエチレン)オクチルフェニルエーテル(Triton X-100等)等が好ましい。発光システム中の界面活性剤の含有量は、0.1～3質量%の範囲が好ましく、0.5～2体積%の範囲が更に好ましい。

[0035] 本発明の発光システムは、ホタルルシフェラーゼを含まないことが好ましい。発光システムがホタルルシフェラーゼを含まない場合、ホタルルシフェラーゼと、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩との反応による発光を防止でき、シトクロムP450と、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩との反応による発光のみを観測することができ、シトクロムP450に対する感度が向上する。

[0036] <シトクロムP450の定量方法>

本発明のシトクロムP450の定量方法は、シトクロムP450に、上記一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩を反応させ、生じる発光量を測定し、該発光量から、前記シトクロムP450の量を測定することを特徴とする。

かかる本発明のシトクロムP450の定量方法は、簡便に且つ高感度で、

シトクロム P 4 5 O を定量することができる。

[0037] 本発明のシトクロム P 4 5 O の定量方法は、生体内で実施してもよいし、生体外で実施してもよい。

生体内で実施する場合、上記一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を生体に投与し、投与された一般式 (1) の複素環式化合物又はその塩が、生体内のシトクロム P 4 5 O と反応し、発生した光の量を測定することで、生体内のシトクロム P 4 5 O を定量することができる。

また、生体外で実施する場合、例えば、生体から生体内組織（特には、哺乳類の肝臓組織）を採取して、容器内に収容し、該容器に、上記一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を添加し、添加された一般式 (1) の複素環式化合物又はその塩が、容器内の生体内組織中のシトクロム P 4 5 O と反応し、発生した光の量を測定することで、生体内組織中のシトクロム P 4 5 O を定量することができる。

[0038] 前記シトクロム P 4 5 O と、上記一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩との反応により生じる発光（量）は、ルミノメーター、イメージアナライザー、シンチレーションカウンター、光電子倍增管光度計、感光乳剤フィルム等を用いて測定することができる。

[0039] <発光システム、シトクロム P 4 5 O の定量方法の用途>

本発明の発光システムは、細菌、植物、哺乳動物に至るまでの殆ど全ての生物に存在するシトクロム P 4 5 O の活性を直接評価することで、それらの生物体内の薬物代謝、ホルモンの生合成、脂肪酸の代謝や、植物の二次代謝等を光センシングできる。

また、上記一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩を用いた生体発光イメージングの特徴である、非侵襲、生体深部可視化によって、従来では難しかった生体内のその場観察（*in vivo* 評価）が可能となる。

また、本発明の発光システムは、ホタルルシフェラーゼを要さず、ルシフェラーゼ遺伝子の導入を必要としないため、シトクロム P 4 5 O の活性評価が簡便であり、実験動物のみならずヒトの疾患、健康状態の診断にも応用で

きる。以下、これの用途について、更に詳述する。

[0040] (1) 生体光イメージング

本発明の発光システムは、ホタルの発光酵素のような遺伝子の導入を必要としない発光システムであるため、実験動物のみならずヒトの疾患、健康状態の診断にも応用できる。

[0041] (2) 疾患の診断

疾患によりシトクロムP450の活性(量)が変化する場合には、本発明の発光システムを用いることで、シトクロムP450由来の発光量の変化を測定することにより疾患の診断が可能となる。

[0042] (3) 薬物動態・安全性評価

多くの薬物が、シトクロムP450によって代謝され、体外に排出されることが知られている。そのため、新規薬物がどのシトクロムP450によって、どの程度代謝されるかは、その薬物の安全性評価において必須の検討項目である。該代謝過程を、本発明の発光システムを利用することで、簡便に検出できるため、本発明の発光システムは、薬物動態・安全性評価に有用である。

[0043] (4) 農林水産分野(農薬、品種改良、増産等)

植物において、シトクロムP450は、二次代謝に大きく関わっている。特定の栄養素の多い食物への品種改良等の際に、シトクロムP450の活性を簡便に可視化できれば、スクリーニングが容易となるため、本発明の発光システムは、農業、林業において、有用である。

水産物においても、シトクロムP450は、二次代謝に大きく関わっており、本発明の発光システムは、水産業分野においても、特定の栄養素を多く含む水産物の養殖等にも活かせる。

このように、農業、水産業のいずれでも、農薬や家畜に対する抗生物質の開発等においても、本発明の発光システムによれば、ヒトの創薬同様、簡便に安全性の評価等が可能となる。

[0044] (5) 環境分野(環境ホルモン、環境汚染等)

環境ホルモンを含む環境汚染の検出に、魚類が用いられることがある。その際に、魚類のシトクロム P 4 5 0 の働きが指標に使われることがある。そのため、本発明の発光システムを、魚類のシトクロム P 4 5 0 の働きの検出に利用することで、本発明の発光システムは、環境汚染の検出にも有効に活用できる。

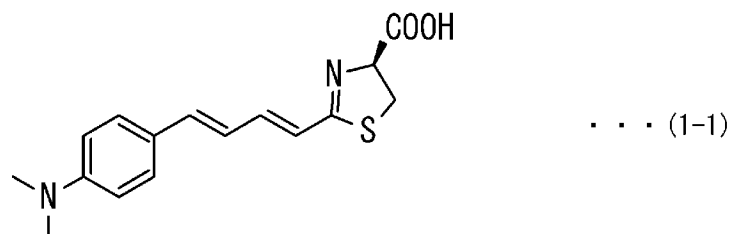
実施例

[0045] 以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明は下記の実施例に何ら限定されるものではない。

[0046] <供試複素環式化合物>

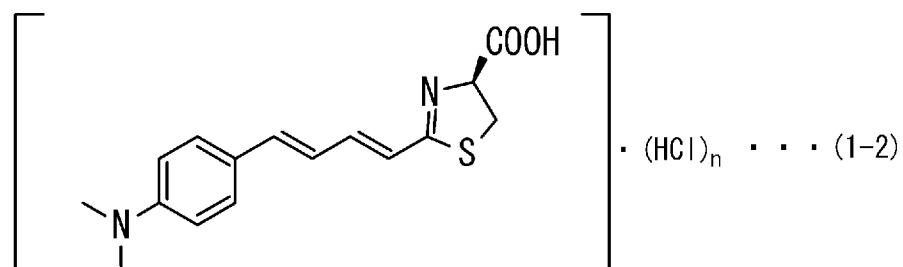
以下の実験においては、一般式 (1) で表される複素環式化合物又はその塩として、下記構造式 (1-1) :

[化8]



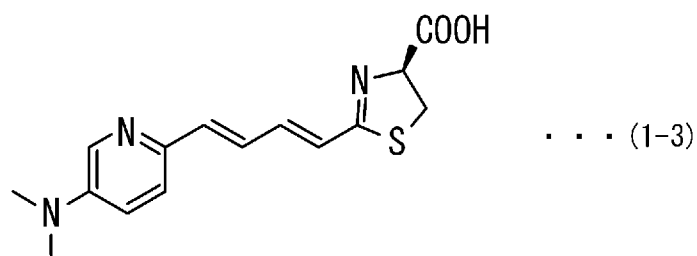
で表される化合物（黒金化成株式会社製「Tok e On i」の脱 HCl タイプ）、又は、下記構造式 (1-2) :

[化9]



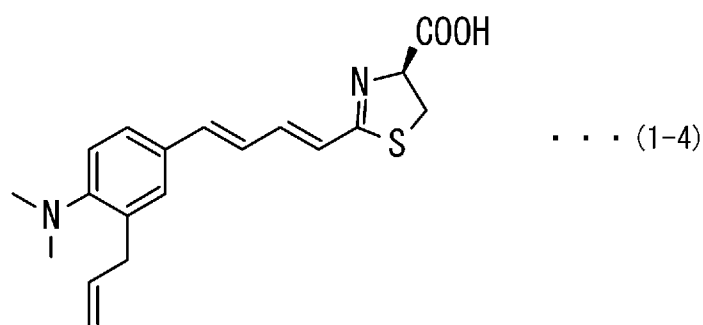
で表される化合物（黒金化成株式会社製「Tok e On i」）、又は、下記構造式 (1-3) :

[化10]



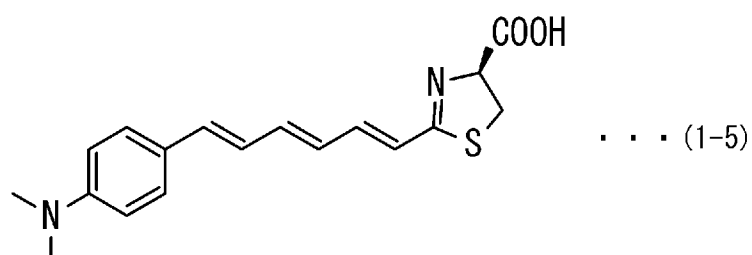
で表される化合物（黒金化成株式会社製「S e M p a i」）、又は、下記構造式（1－4）：

[化11]



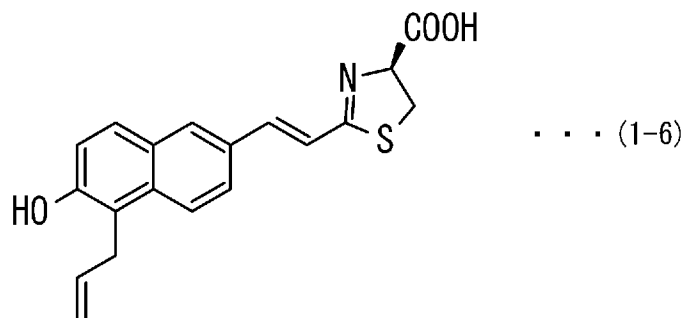
で表される化合物、又は、下記構造式（1－5）：

[化12]



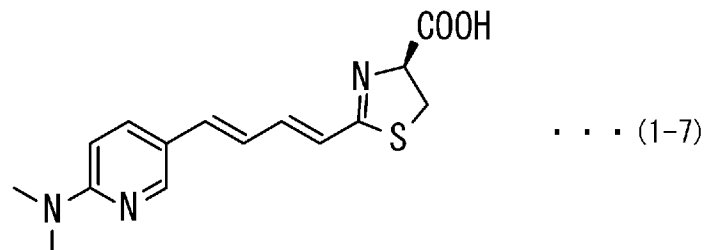
で表される化合物、又は、下記構造式（1－6）：

[化13]



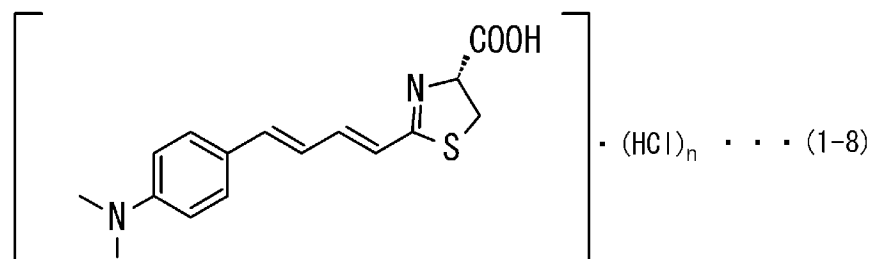
で表される化合物、又は、下記構造式（１－７）：

[化14]



で表される化合物、又は、下記構造式（１－８）：

[化15]



で表される化合物を使用した。

なお、構造式（１－３）の化合物及び構造式（１－７）の化合物は、特許第６３５３７５１号公報に記載の方法で合成した。

また、構造式（１－６）の化合物は、国際公開第２０１３／０２７７７０号に記載の方法で合成した。

また、構造式（１－４）の化合物は、構造式（１－６）の化合物の合成法において、原料のナフタレン環を有する化合物を、ベンゼン環を有する化合物に置き換えて、合成した。

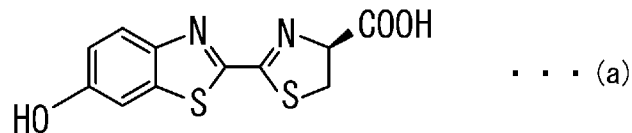
また、構造式（１－５）の化合物は、特許第５４６４３１１号公報に記載の合成法において、二重結合の形成工程を繰り返して、合成した。

また、構造式（１－８）の化合物は、特許第５４６４３１１号公報に記載の合成法において、実施例１－３の「メチルエステル１の合成」の工程で、「Ｄ－システイン－Ｓ－トリチル化合物」に代えて「Ｌ－システイン－Ｓ－トリチル化合物」を使用する以外は、同様にして、構造式（１－１）の化合物

物のL体を合成した後、特許第6011974号公報に記載の合成法に従い塩酸塩(HCl)化して、合成した。

[0047] また、比較対照として、下記化学式(a)：

[化16]



で表される天然のホタルルシフェリン（富士フィルム和光純薬株式会社製）を使用した。

[0048] <測定機器>

また、発光量の測定には、ルミノメーター（アトー社製、「ルミネッセンサーAB2200」）を使用した。測定は、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩、あるいはホタルルシフェリンを添加後、30秒間の発光の積算値を記録することにより行った。

[0049] (1) 節足動物、環形動物又は哺乳類の肝臓培養細胞と、シトクロムP450と、による発光観察

(1-1) 節足動物および環形動物抽出物

各節足動物または環形動物を0.5mLの緩衝液(10mMリン酸緩衝液(pH7.4)、20%グリセロール)中でホモジェナイズした。ホモジェネートを15,000×gにおいて、4℃、15分間遠心分離を行い、上清を抽出液として測定に用いた。

発光測定時の溶液組成は、50mM Tris/HCl、20mM KPB、30mM KCl、8mM MgCl₂、6%(v/v)グリセロール、1%(v/v)Triton X-100、及び、200μM 構造式(1-1)の化合物[図1中、化合物(1-1)]又は200μM ホタルルシフェリンである。

結果を図1に示す。

[0050] (1-2) 哺乳類の肝臓培養細胞

150 cm²培養シャーレにおいて培養したラット、マウス、ヒトの肝臓培養細胞を回収後、0.1 mLの緩衝液（10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）、20%グリセロール）中でホモジェナイズした。ホモジェネートを15,000×gにおいて、4℃、15分間遠心分離を行い、上清を抽出液として測定に用いた。

発光測定時の溶液組成は、50 mM Tris/HCl、20 mM KPB、30 mM KCl、8 mM MgCl₂、6%（v/v）グリセロール、1%（v/v）Triton X-100、及び、200 μM 構造式（1-1）の化合物〔図2中、化合物（1-1）〕又は200 μM ホタルルシフェリンである。

結果を図2に示す。

[0051] 図1から、節足動物および環形動物の抽出液に構造式（1-1）の化合物を添加すると、発光を誘導できることが分かる。

また、図2から、ヒト、ラット、及びマウスの肝臓培養細胞の抽出液に構造式（1-1）の化合物を添加しても、発光を誘導できることが分かる。

一方、ホタルルシフェリン投与では、発光を検出できないことが分かる。

[0052] （2）シトクロムP450阻害剤による発光量の減少観察

（2-1）ダンゴムシ、クロキンバエ抽出物

ダンゴムシ3匹、あるいは、クロキンバエ5匹を0.5 mLの緩衝液（10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）、20%グリセロール）中でホモジェナイズした。ホモジェネートを15,000×gにおいて、4℃、15分間遠心分離を行い、上清を抽出液として測定に用いた。

発光測定時の溶液組成は、50 mM Tris/HCl、20 mM KPB、30 mM KCl、8 mM MgCl₂、6%（v/v）グリセロール、1%（v/v）Triton X-100、200 mM 構造式（1-1）の化合物である。

結果を図3～図6に示す。

[0053] 図3～図6に示すグラフにおいては、溶媒であるDMSO添加時の発光値

を100%として、その相対値で示している。

阻害剤の濃度は、全て2 mMである。また、DMSOの添加量は、全て2 %である。

[0054] 各阻害剤と、標的シトクロムP450 (CYP) との関係を表1に示す。

[表1]

阻害剤	標的CYP
α -ナフトフラボン	CYP1A2
スルファフェナゾール	CYP2C9
キニジン	CYP2D6
パロキセチン塩酸塩0.5水和物	CYP2D6
ケトコナゾール	CYP3A4
クラリスロマイシン	CYP3A4

[0055] (2-2) マウス肝臓抽出物

C57BL/6マウスから、安楽死の後に肝臓を摘出し、1匹あたり3.0 mLの緩衝液(i) (10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、20%グリセロール)を加え、ホモジェナイズした。ホモジェネートを15,000×gにおいて、4℃、15分間遠心分離を行い、上清を回収し、孔径0.45 mmのシリンジフィルターを用いて濾過した。

次に、濾液を、陰イオン交換カラム (HiTrap Q FF: GEヘルスケア) に供した。緩衝液(i)によりカラム平衡化の後、濾液を流速0.6 mL/minによりカラムにロードし、素通り画分を回収した。

次に、この素通り画分を、ヒドロキシアパタイトカラム (Bio-Scale Mini CHT Type I カートリッジ: バイオラッド) に供した。緩衝液(i)によりカラム平衡化の後、流速0.6 mL/minによりカラムにロードし、素通り画分を回収した。ヒドロキシアパタイトカラムを15 mLの緩衝液(i)により洗浄後、緩衝液(ii) (150 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、20%グリセロール)により溶出を行った。発光測定には、素通り画分と溶出液の画分の混合液を用いた。

発光測定時の溶液組成は、50 mM Tris/HCl、65 mM PB、30 mM KCl、8 mM MgCl₂、6% (v/v) グリセロール、1% (v/v) Triton X-100、200 mM 構造式 (1-1) の化合物である。

結果を図7に示す。

[0056] 図7に示すグラフにおいては、溶媒であるDMSO添加時の発光値を100%として、その相対値で示している。

阻害剤の濃度は、全て2 mMである。また、DMSOの添加量は、全て2%である。

[0057] 各阻害剤と、標的シトクロムP450 (CYP) との関係を表2に示す。

[表2]

阻害剤	標的CYP
α-ナフトフラボン	CYP1A2
ピロカルピン	CYP2A6
ケルセチン	CYP2C8
スルファフェナゾール	CYP2C9
キニジン	CYP2D6
パロキセチン塩酸塩0.5水和物	CYP2D6
テトラエチルチウラムジスルフィド	CYP2E1
ケトコナゾール	CYP3A4
クラリスロマイシン	CYP3A4

[0058] 図2～図6から、ダンゴムシ、又は、クロキンバエ由来の抽出液に、シトクロムP450阻害剤を添加すると、いくつかの阻害剤により、発光を阻害する効果が見られた。

また、図7から、マウスの肝臓抽出液に、シトクロムP450阻害剤を添加しても、いくつかの阻害剤により、発光を阻害する効果が見られた。

これらの結果から、シトクロムP450の作用により構造式 (1-1) の化合物による発光がなされていることが分かる。

[0059] (2-3) マウス (in vivo) での試験

発光測定の前30分前に、6から10週齢のC57BL/6マウスの腹腔内に、DMSOに溶解した10mMの各阻害剤を100 μ L投与した。次に、発光測定の前15分前に、麻酔薬ペントバルビタールを体重1kgあたり65mgとなるように、前記マウスの腹腔に投与し、更に、発光測定の前5分前に、前記マウスの腹腔に、20mMの構造式(1-2)の化合物を250 μ L投与した。測定は、イメージアナライザーLS4000 (GEヘルスケアジャパン)において、20分間行った。結果を図8に示す。

[0060] 各阻害剤と、標的シトクロムP450 (CYP) との関係を表3に示す。

[表3]

阻害剤	標的CYP
α -ナフトフラボン	CYP1A2
キニジン	CYP2D6
パロキセチン塩酸塩0.5水和物	CYP2D6
テトラエチルチウラムジスルフィド	CYP2E1
ケトコナゾール	CYP3A4
クラリスロマイシン	CYP3A4

[0061] 図8から、マウスの生体内に、シトクロムP450阻害剤を添加しても、発光を阻害する効果が見られた。

これらの結果から、シトクロムP450の作用により構造式(1-2)の化合物による発光がなされていることが分かる。

[0062] (3) シトクロムP450による発光の検討

シトクロムP450 (CYP) としては、CORNING社のヒトP450酵素を用いた。

また、コントロールとしては、対照実験用としてCORNING社から販売されている、昆虫細胞の膜画分を使用した。該コントロールでの測定値を、CYPでの測定値から差し引いた値を、CYPと各基質とからなる発光シ

ステムによる発光量とした。

[0063] 発光測定時のCYP濃度は、100 pmol/mLである。

また、発光測定時の溶液の他の組成は、46 mM Tris/HCl、17 mM リン酸バッファー、24 mM KCl、6.4 mM MgCl₂、17 mM NaCl、2% (v/v) Triton X-100、及び発光基質(変量)である。

なお、発光基質濃度は、それぞれ、構造式(1-1)の化合物: 200 μM、構造式(1-2)の化合物: 800 μM、構造式(1-3)の化合物: 200 μM、構造式(1-4)の化合物: 100 μM、構造式(1-5)の化合物: 40 μM、構造式(1-6)の化合物: 100 μM、構造式(1-7)の化合物: 200 μMである。

結果を図9～図15に示す。

[0064] 図9～図15に示すグラフにおいては、構造式(1-3)の化合物添加時の発光量の値を100%として、その相対値で示している。

[0065] 図9～図15から、シトクロムP450と、一般式(1)で表される複素環式化合物又はその塩を組み合わせることで、発光することが分かる。

[0066] (4) 異性体による確認実験

発光測定の15分前に、6から10週齢のC57BL/6マウスの腹腔内に、麻酔薬ペントバルビタールを体重1 kgあたり65 mgとなるように投与し、更に、発光測定の5分前に、前記マウスの腹腔に、20 mMの構造式(1-2)の化合物(D体)又は構造式(1-8)の化合物(L体)を250 μL投与した。測定は、イメージアナライザーLS4000 (GEヘルスケアジャパン)において、20分間行った。結果を図16に示す。

[0067] 図16から、構造式(1-2)の化合物(D体)を用いても、構造式(1-8)の化合物(L体)を用いても、発光量は同等であることが分かる。

[0068] (5) 昆虫(in vivo)での発光試験

発光測定の15分前に、孵化後5から6日齢のクロキンバエ幼虫に、20 mMの構造式(1-2)の化合物を3 μL投与した。測定は、イメージアナ

ライザーLS4000（GEヘルスケアジャパン）において、5分間行い、画像を取得した。結果を図17に示す。図17中、白い部分が発光部位を示す。

[0069] 図17から、クロキンバエ幼虫（シトクロムP450を含有）と、一般式（1）で表される複素環式化合物又はその塩を組み合わせることで、発光することが分かる。

[0070] （6）四塩化炭素投与による薬物性肝障害モデルマウスでの発光試験

7週令のC57BL6マウスに対し、四塩化炭素をオリーブ油により5倍に希釈し、3 mL/kgとなるよう週2回、4週間、腹腔に投与し、慢性肝疾患モデルマウスを作製した。対照群には、同量のオリーブ油を投与した。

発光測定の15分前に、麻酔薬ペントバルビタールを体重1 kgあたり65 mgとなるように、前記マウスの腹腔に投与し、更に、発光測定の5分前に、前記マウスの腹腔に、20 mMの構造式（1-2）の化合物を250 μ L投与し、測定を行った。結果を図18に示す。

[0071] 図18から、慢性肝疾患モデルマウスでは、対照群のマウスに比べて、発光量が減少することが分かる。これは、薬物性肝障害により、マウスのシトクロムP450が減少したことを示している。

[0072] 薬物による中毒性肝障害に関する文献として、例えば、日本内科学会雑誌、84、188-193（1995）には、四塩化炭素の投与により、肝臓内のシトクロムP450の量が減少することが開示されており、上記の試験結果と整合することが確認できた。

[0073] （7）非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスでの発光試験

7週令のC57BL6マウスに、コリン欠乏CDAHFD高脂肪飼料を8週間自由摂取させた。対照群には、同量の通常飼料を自由摂取させた。

発光測定の15分前に、麻酔薬ペントバルビタールを体重1 kgあたり65 mgとなるように、前記マウスの腹腔に投与し、更に、発光測定の5分前に、前記マウスの腹腔に、20 mMの構造式（1-2）の化合物を250 μ L投与し、測定を行った。結果を図19に示す。

[0074] 図19から、非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスでは、対照群のマウスに比べて、発光量が増加することが分かる。これは、非アルコール性脂肪性肝疾患により、マウスのシトクロムP450が増加したことを示している。

[0075] 非アルコール性脂肪肝炎に関する文献として、例えば、Weltman M. D. et al. (1998), “Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis”, Hepatology, 27(1):128-33には、非アルコール性脂肪肝炎の患者において、CYP2E1の発現が誘導されることが開示されており、上記の試験結果と整合することが確認できた。

産業上の利用可能性

[0076] 本発明の発光システムは、上述のように、生体光イメージング、疾患の診断、薬物動態・安全性評価、農林水産分野（農薬、品種改良、増産等）、環境分野（環境ホルモン、環境汚染等）に利用できる。

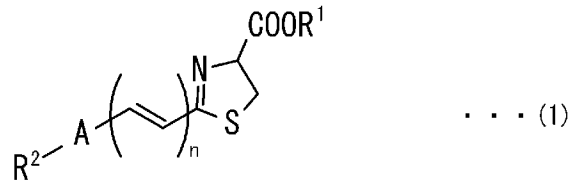
また、本発明の発光システムは、グルコースモニタリングキット、心臓マーカー、感染症検査キット、妊娠と不妊検査キット、血糖値、血液ガス及び電解質テストキット、腫瘍／がんマーカー、尿検査テストキット、コレステロールテストキット、免疫テストキット、薬物動態・安全性評価キット、食物毒性評価キット、等の各種キットにも利用できる。

更に、本発明の発光システムは、医療研究分野、進化・生命研究分野、宇宙生物学分野（国際宇宙ステーション（ISS）、月軌道プラットフォームゲートウェイを利用した微小重力科学実験等）にも利用できる。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（１）：

[化1]

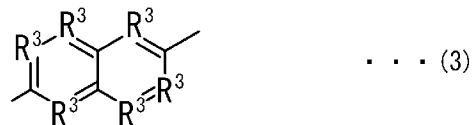


[式中、R¹は、水素又は炭素数１～４のアルキル基であり、

R²は、NR⁴₂又はOHであり、ここで、R⁴は、それぞれ独立して水素又は炭素数１～６のアルキル基であり、また、NR⁴₂の２つのR⁴は、互いに結合して環を形成してもよく、

Aは、下記一般式（２）又は（３）：

[化2]



で表され、

R³は、それぞれ独立してCR⁵又はNであり、ここで、R⁵は、それぞれ独立して水素、炭素数１～８のアルキル基又は炭素数２～８のアルケニル基であり、

nは、０～３の整数である] で表される複素環式化合物又はその塩と、

シトクロムP４５０を含むことを特徴とする、発光システム。

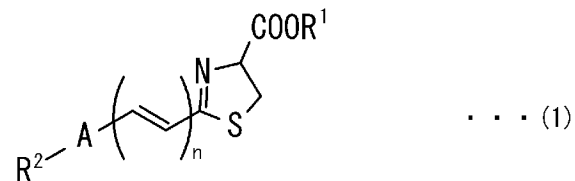
[請求項2] 前記シトクロムP４５０が、生体内組織中に存在する、請求項１に記載の発光システム。

[請求項3] 前記シトクロムP４５０が、哺乳類の肝臓組織中に存在する、請求

項 1 又は 2 に記載の発光システム。

[請求項4] シトクロム P 4 5 O に、下記一般式 (1) :

[化3]

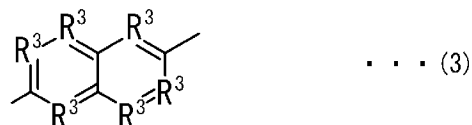


[式中、R¹は、水素又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基であり、

R²は、NR⁴₂又はOHであり、ここで、R⁴は、それぞれ独立して水素又は炭素数 1 ～ 6 のアルキル基であり、また、NR⁴₂の 2 つの R⁴は、互いに結合して環を形成してもよく、

A は、下記一般式 (2) 又は (3) :

[化4]

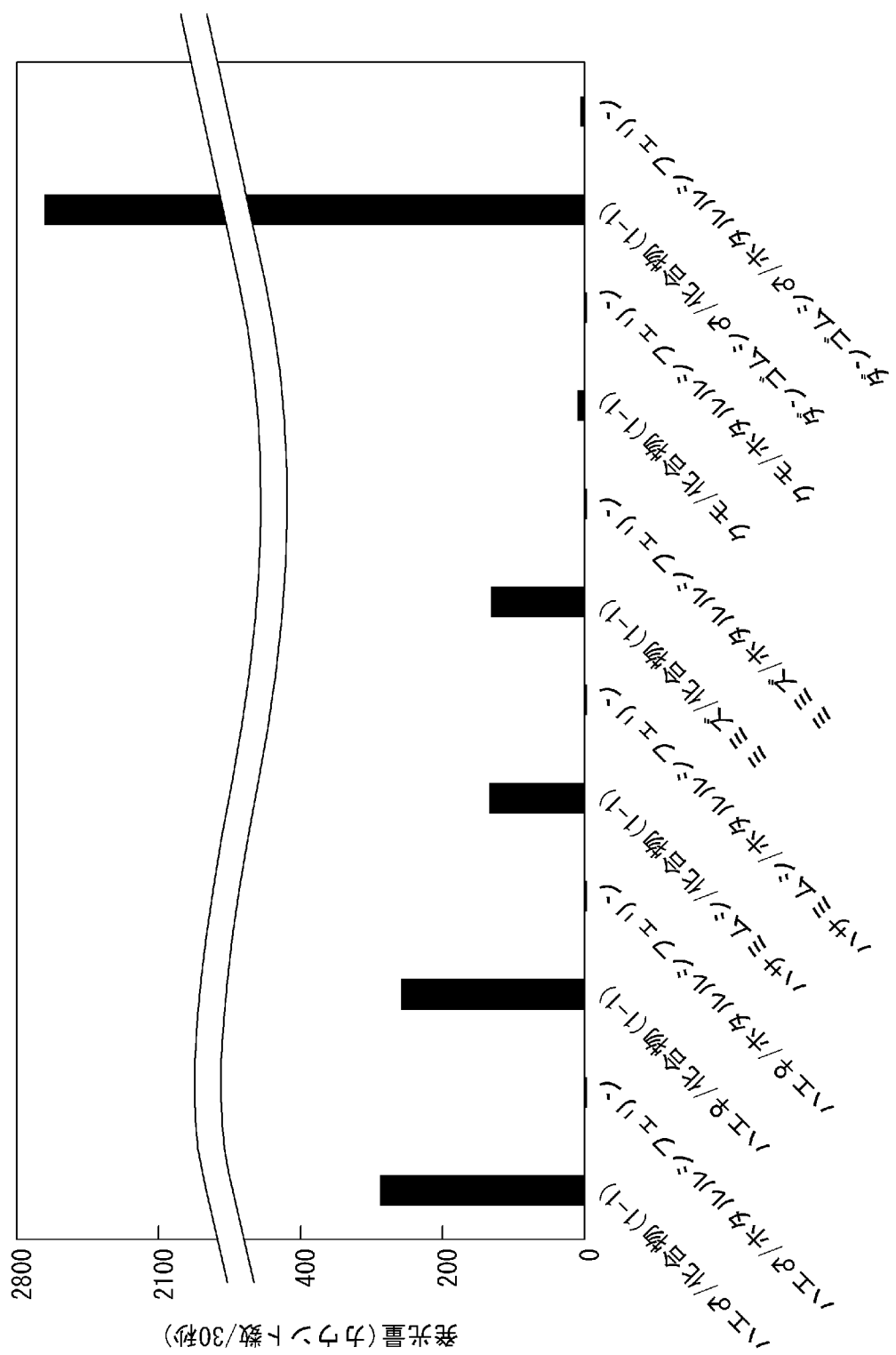


で表され、

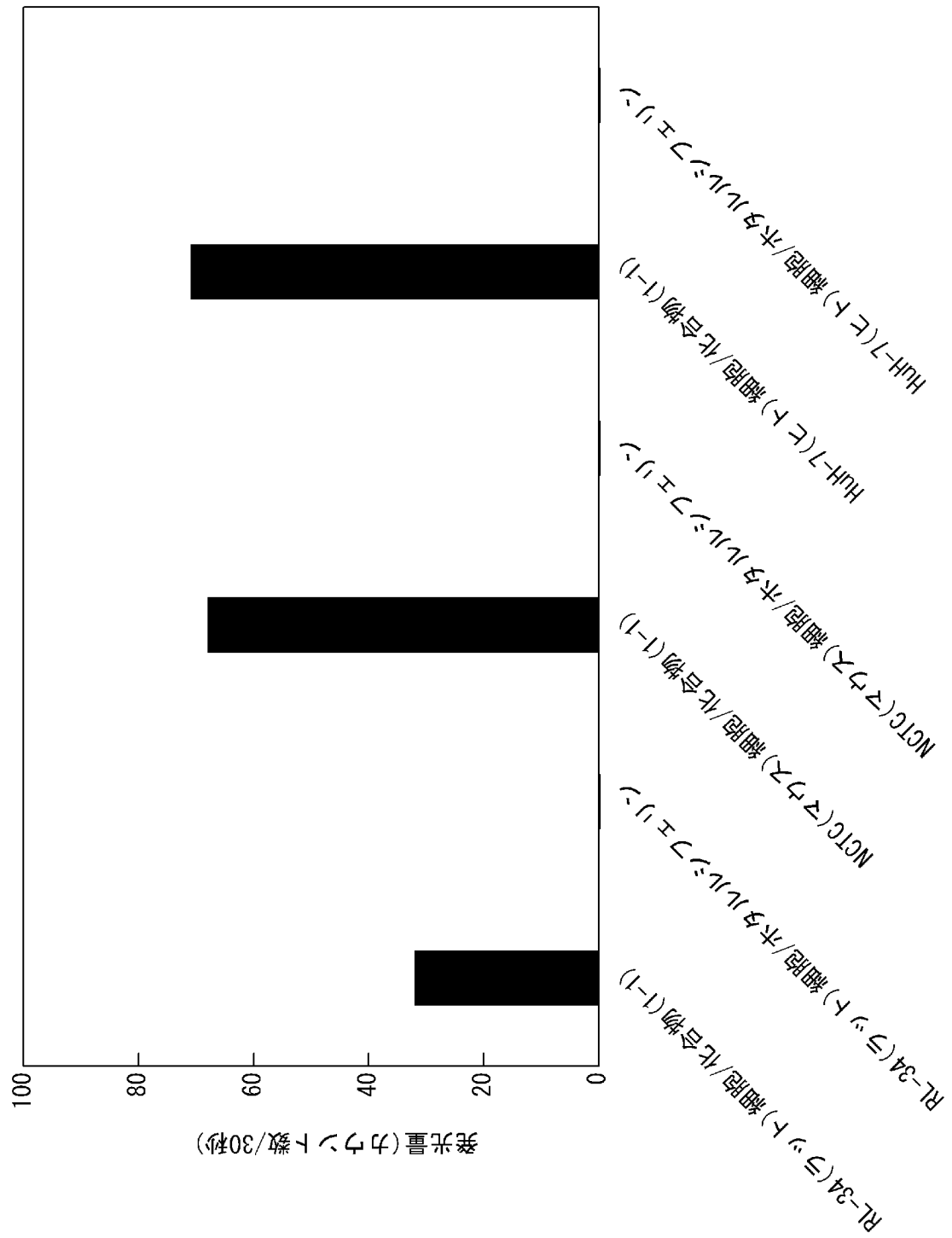
R³は、それぞれ独立してCR⁵又はNであり、ここで、R⁵は、それぞれ独立して水素、炭素数 1 ～ 8 のアルキル基又は炭素数 2 ～ 8 のアルケニル基であり、

n は、0 ～ 3 の整数である] で表される複素環式化合物又はその塩を反応させ、生じる発光量を測定し、

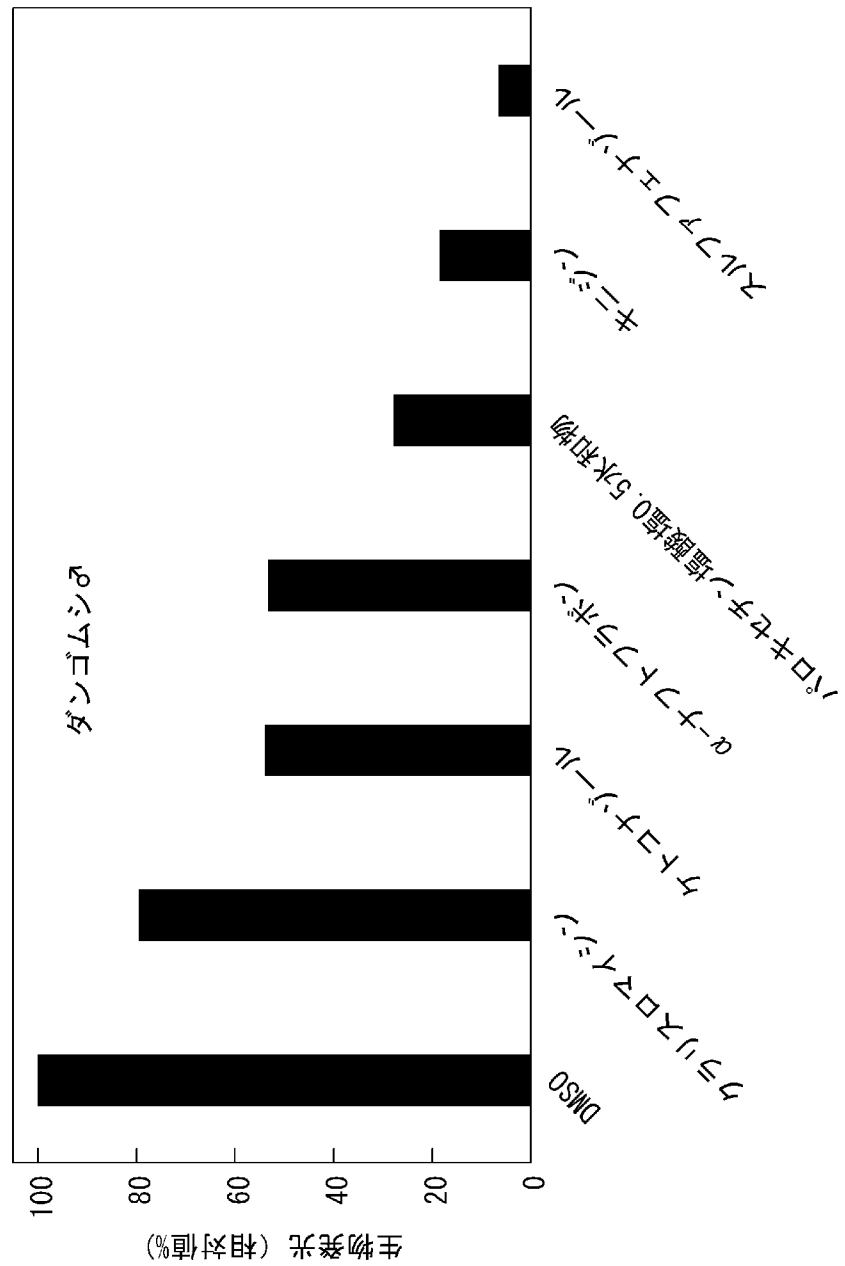
前記発光量から、前記シトクロム P 4 5 O の量を測定することを特徴とする、シトクロム P 4 5 O の定量方法。



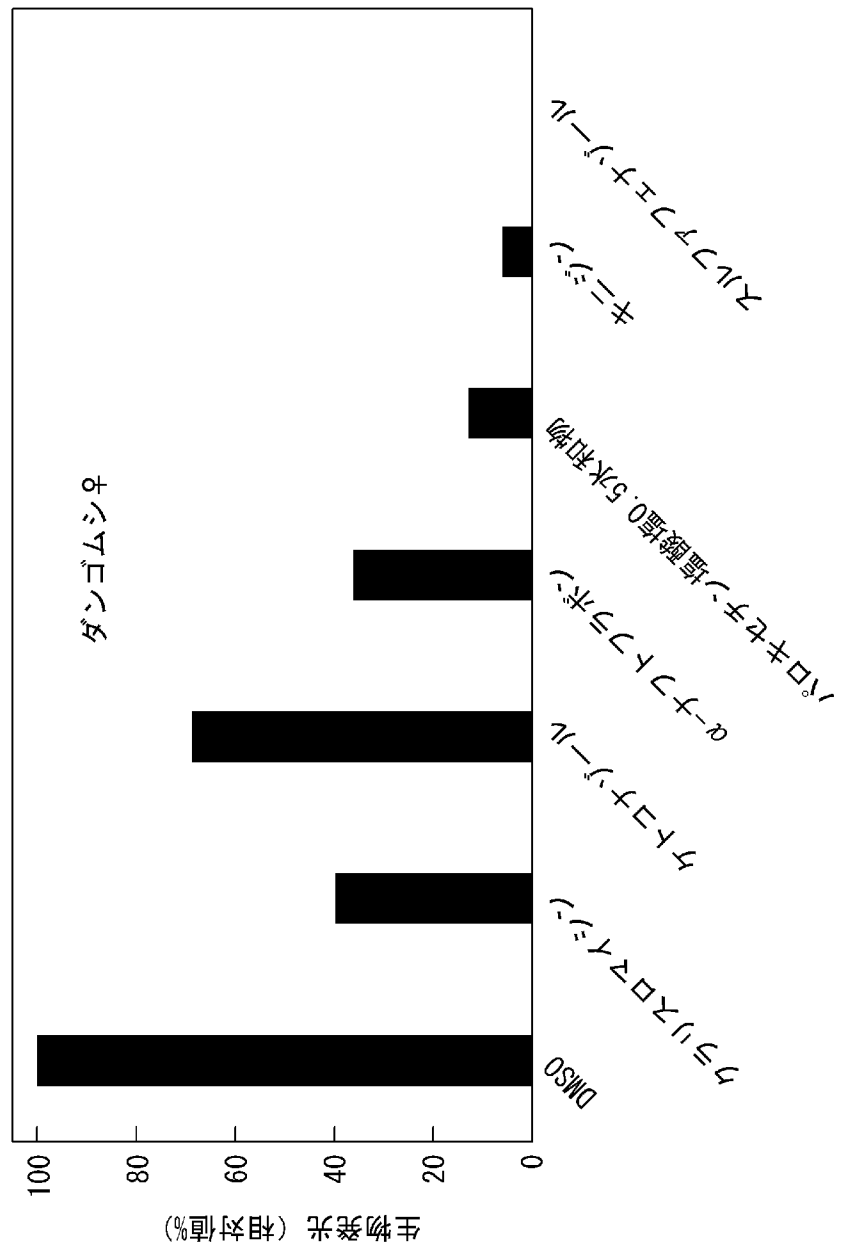
[図2]



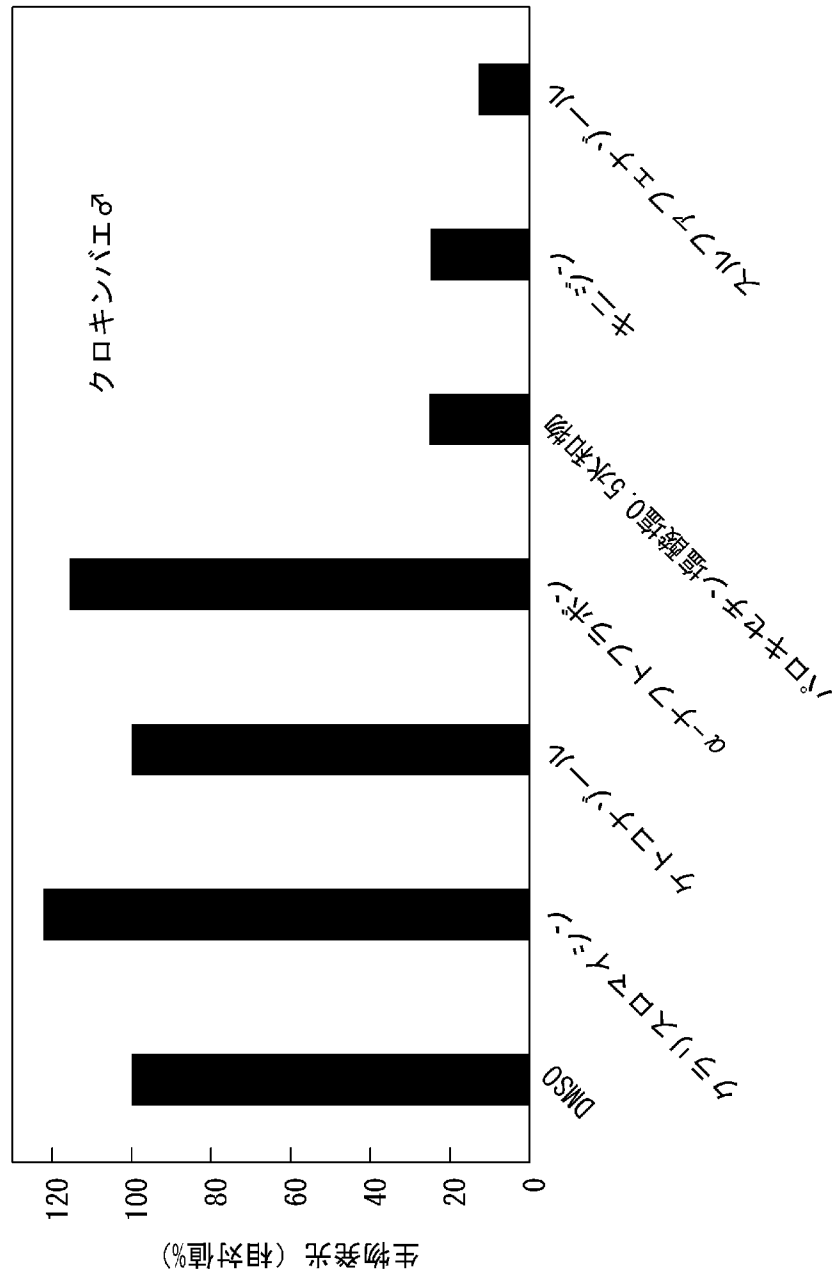
[図3]



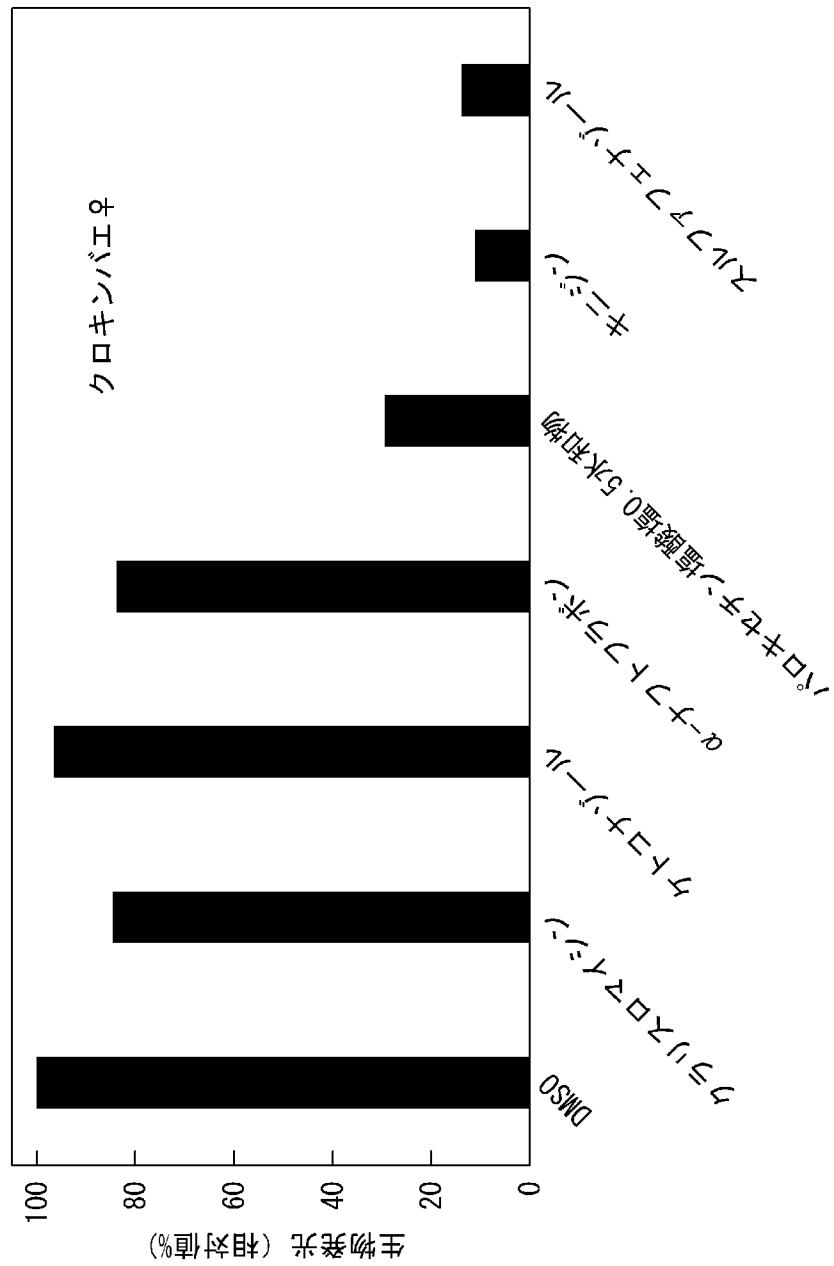
[図4]



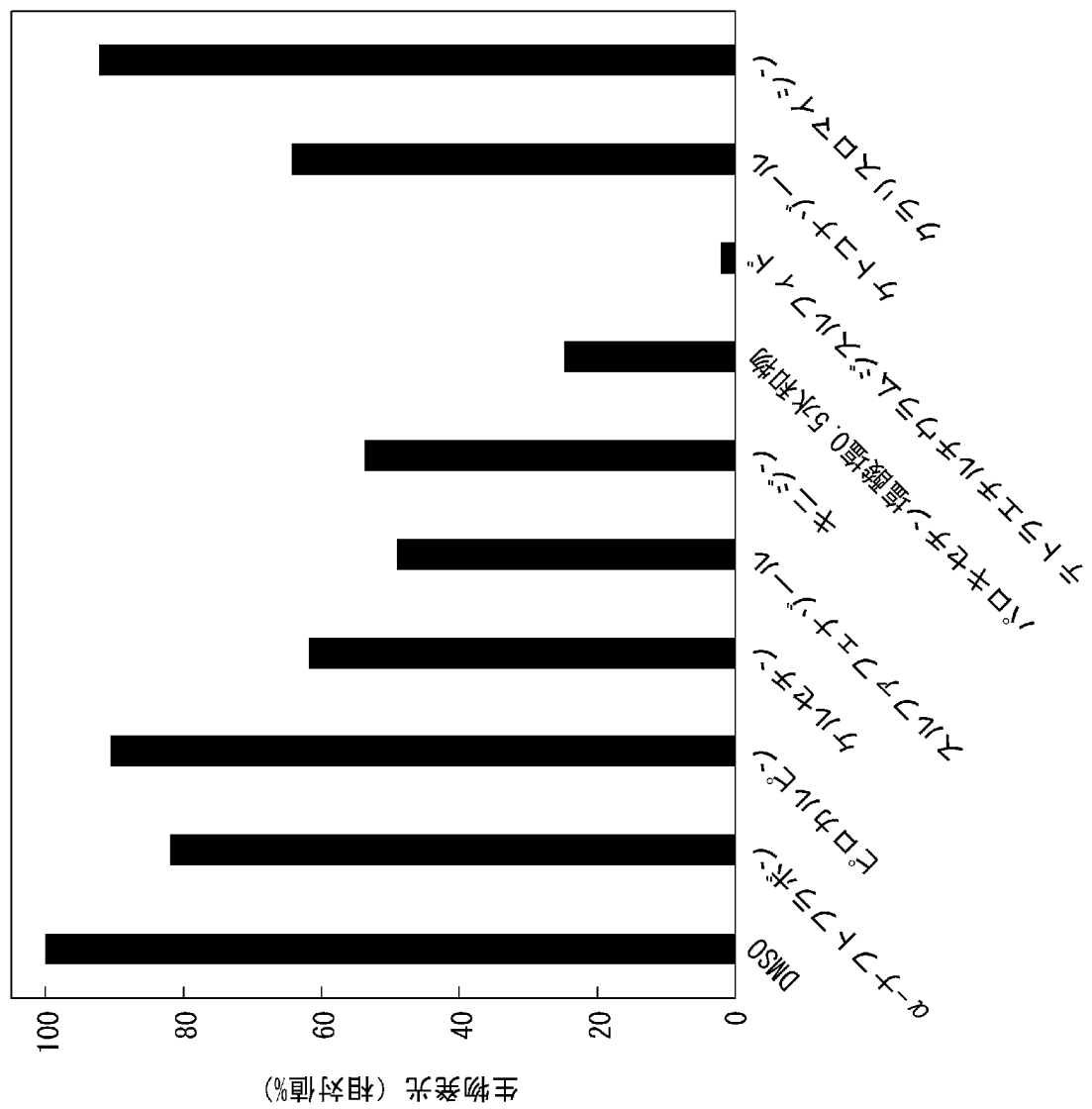
[図5]



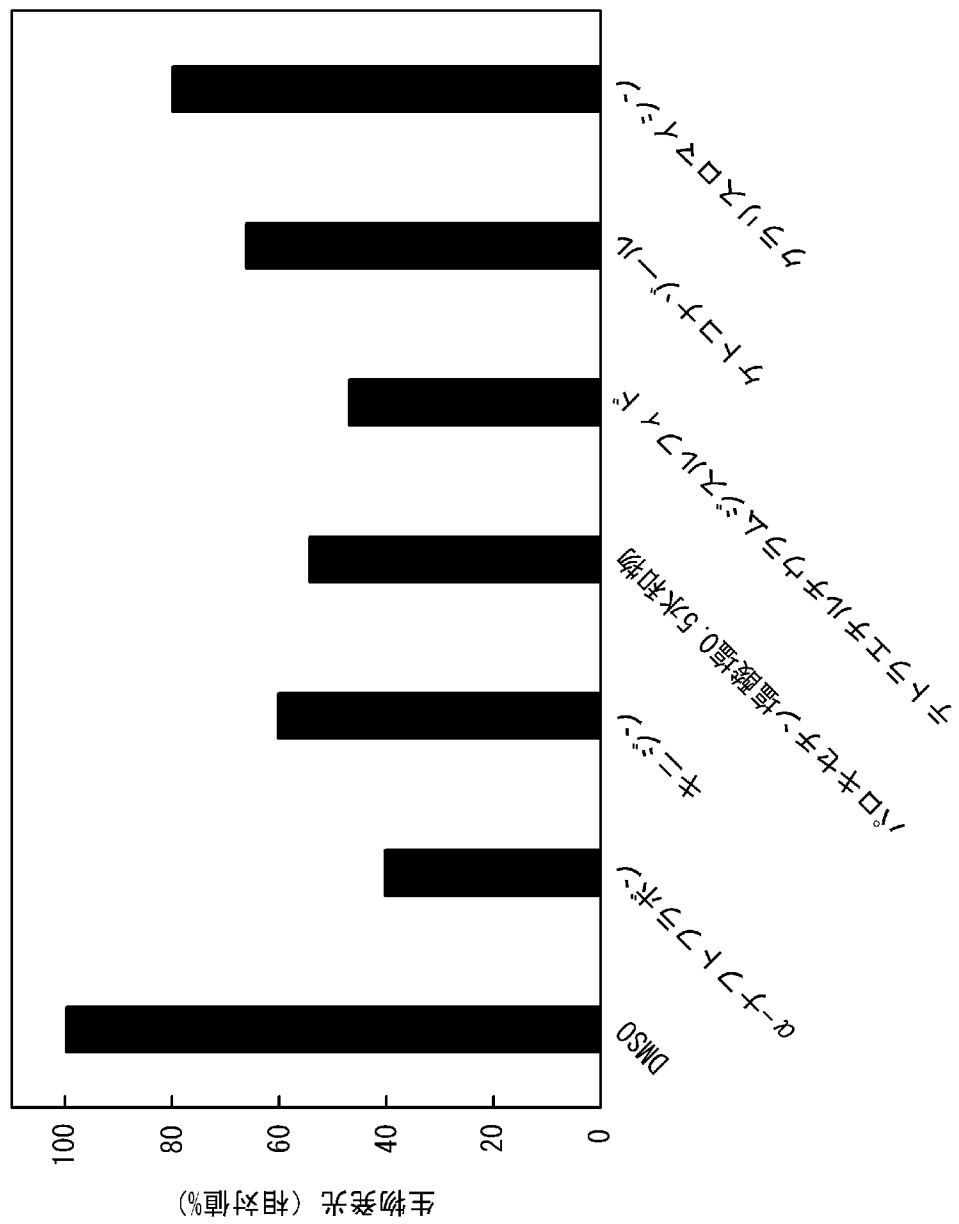
[図6]



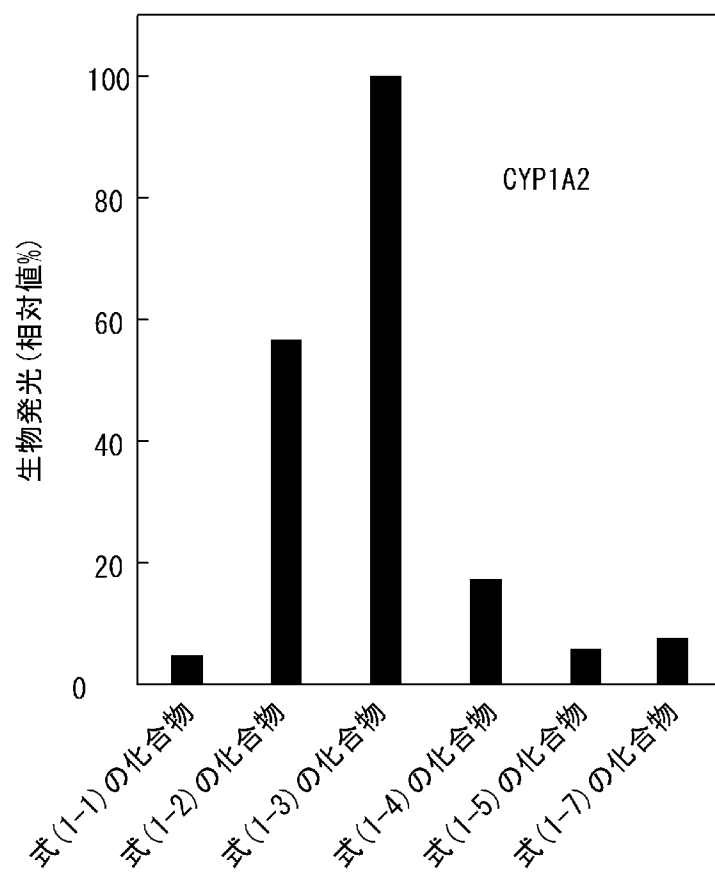
[図7]



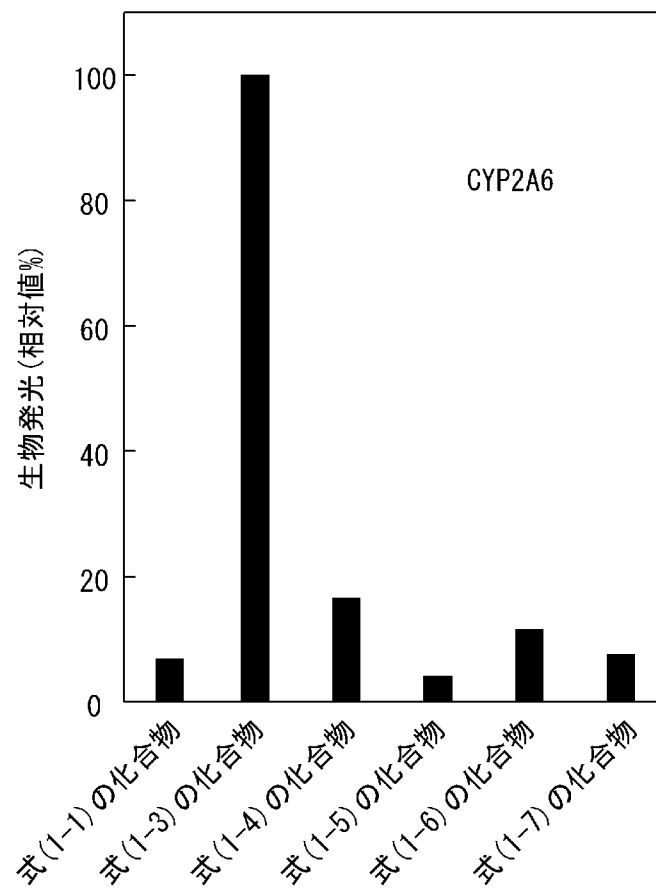
[図8]



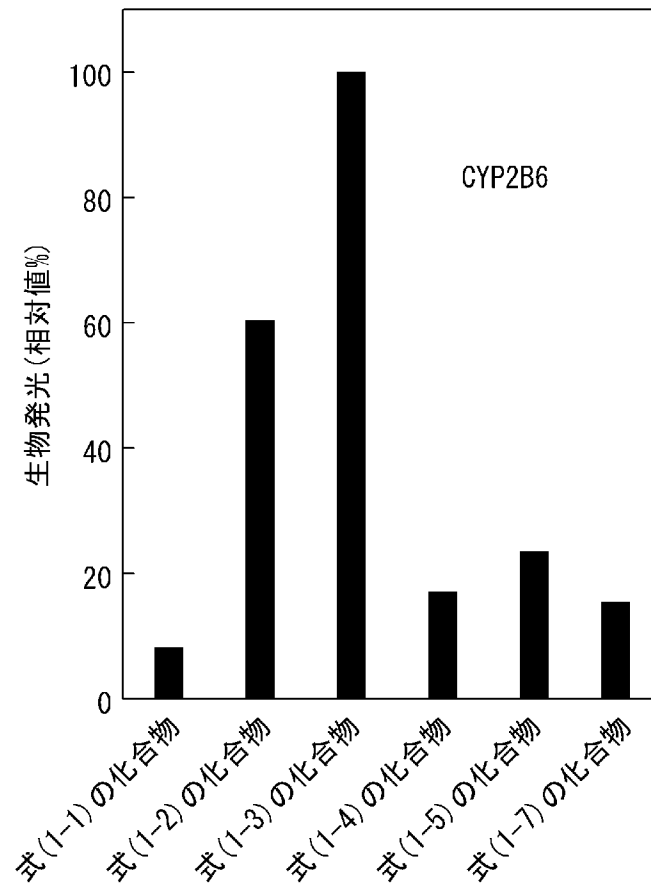
[図9]



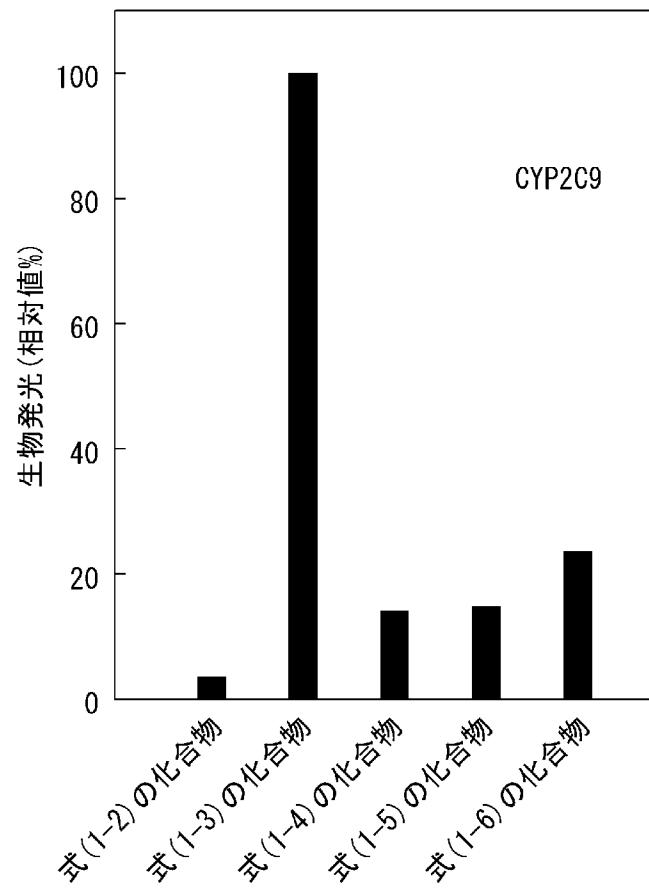
[図10]



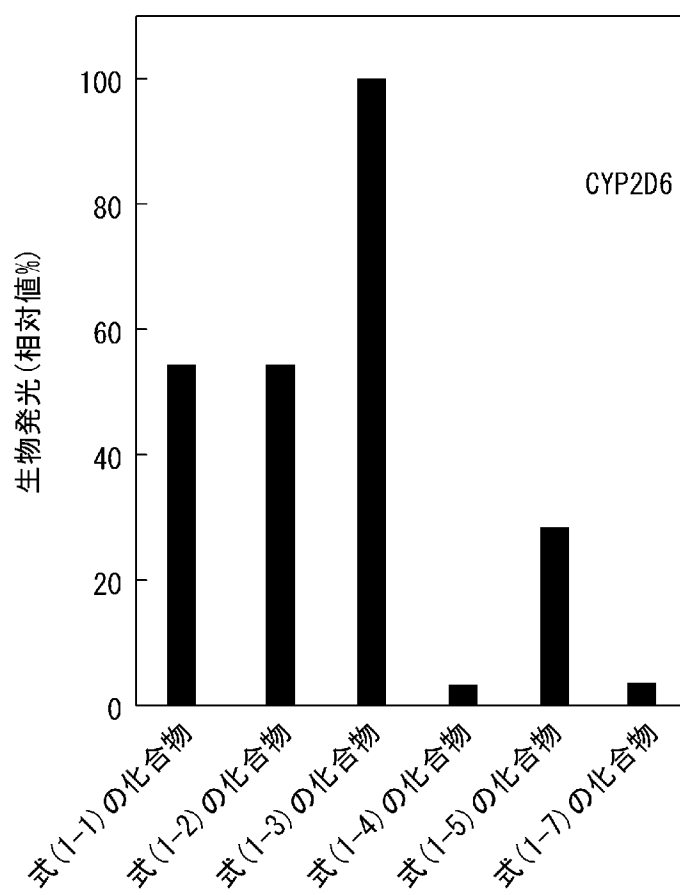
[図11]



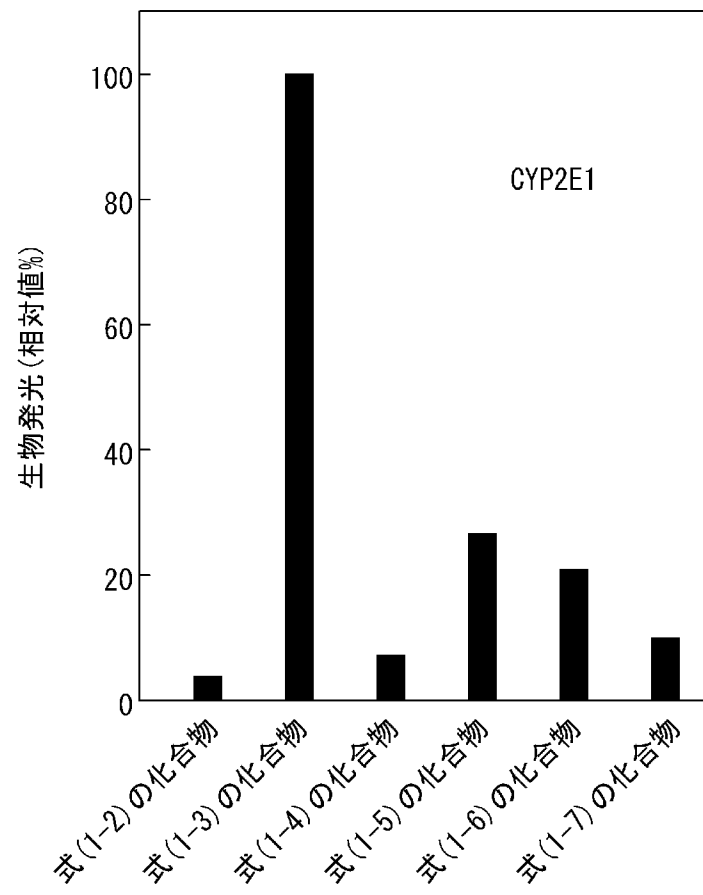
[図12]



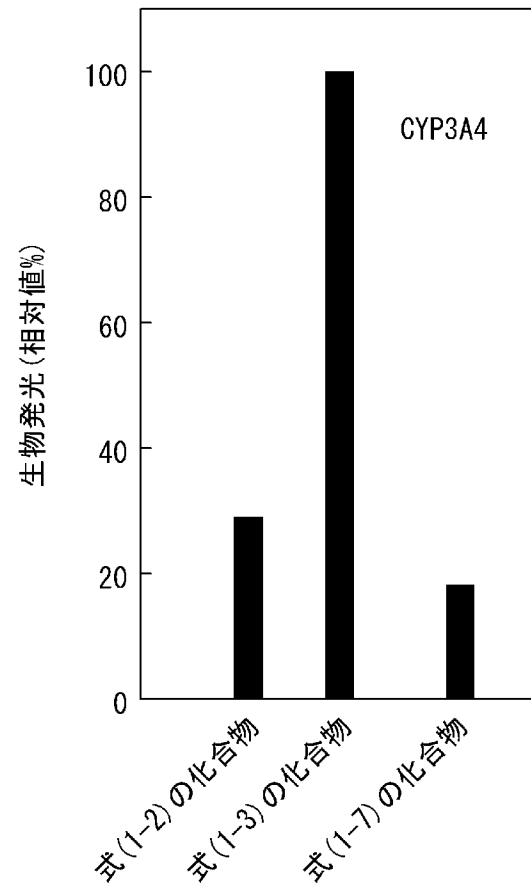
[図13]



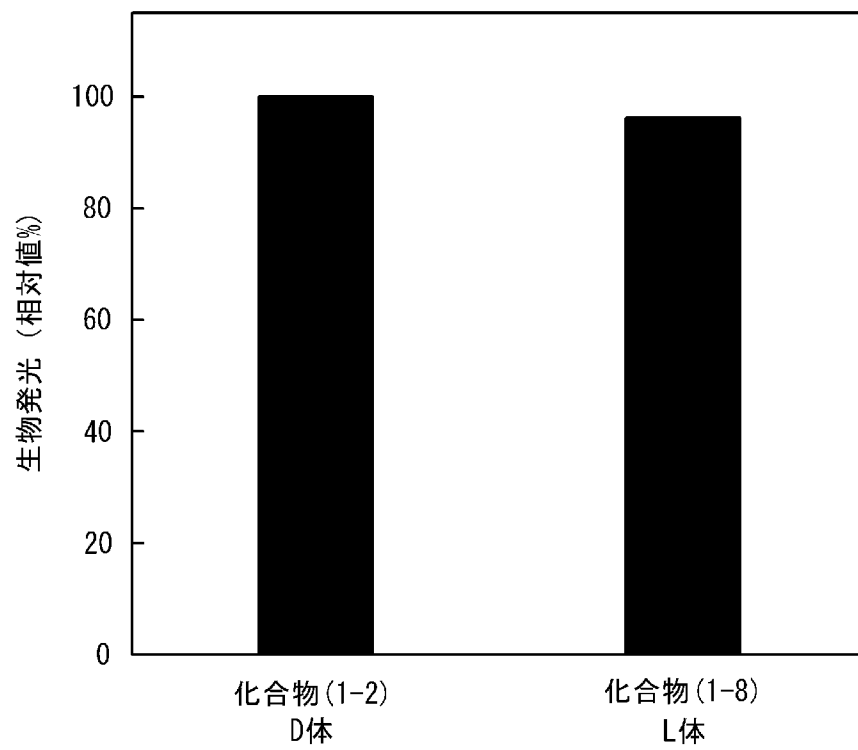
[図14]



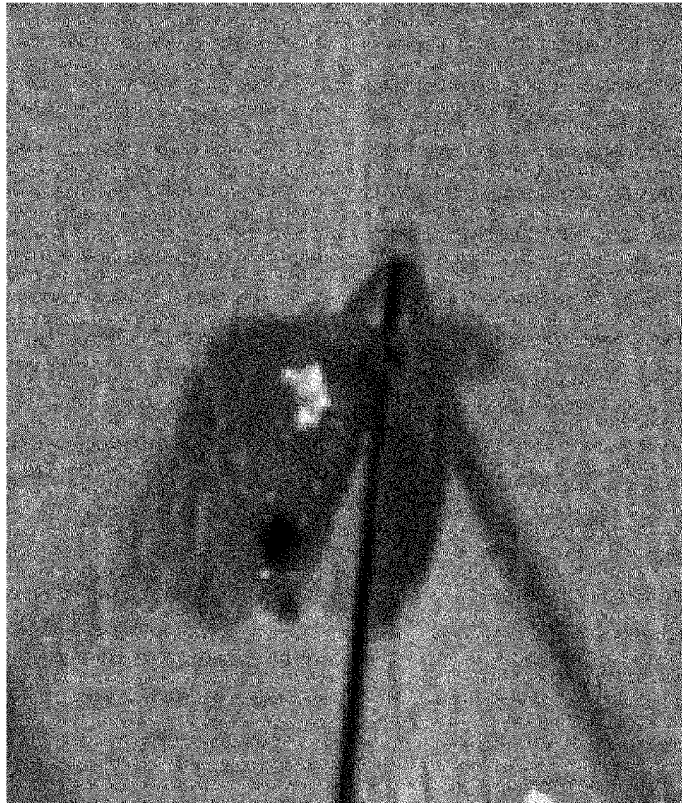
[図15]



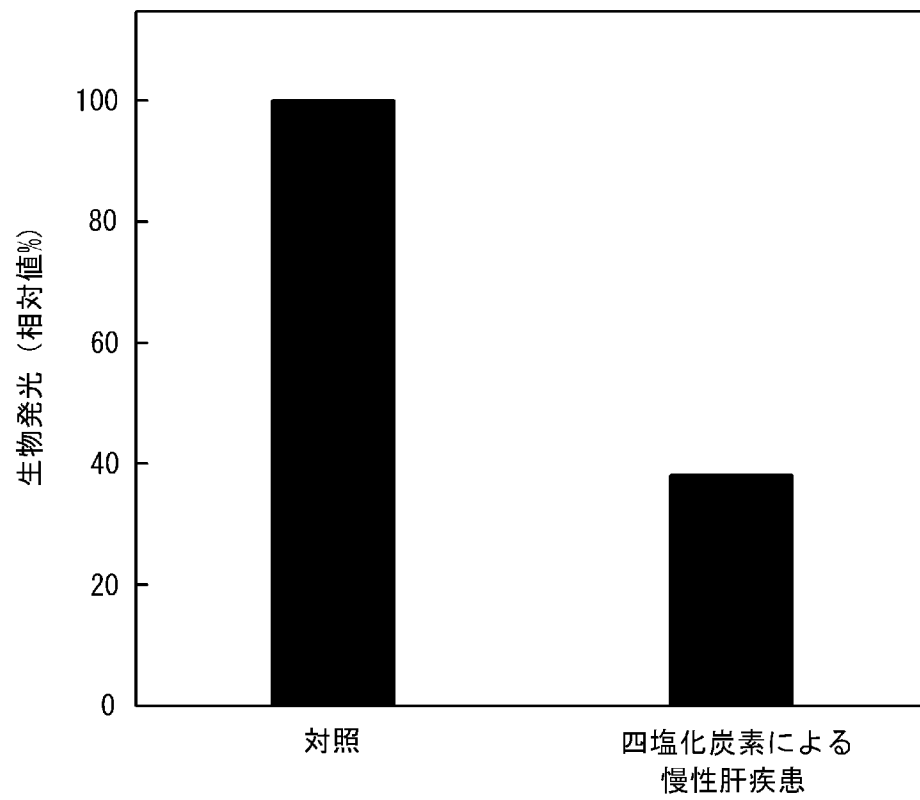
[図16]



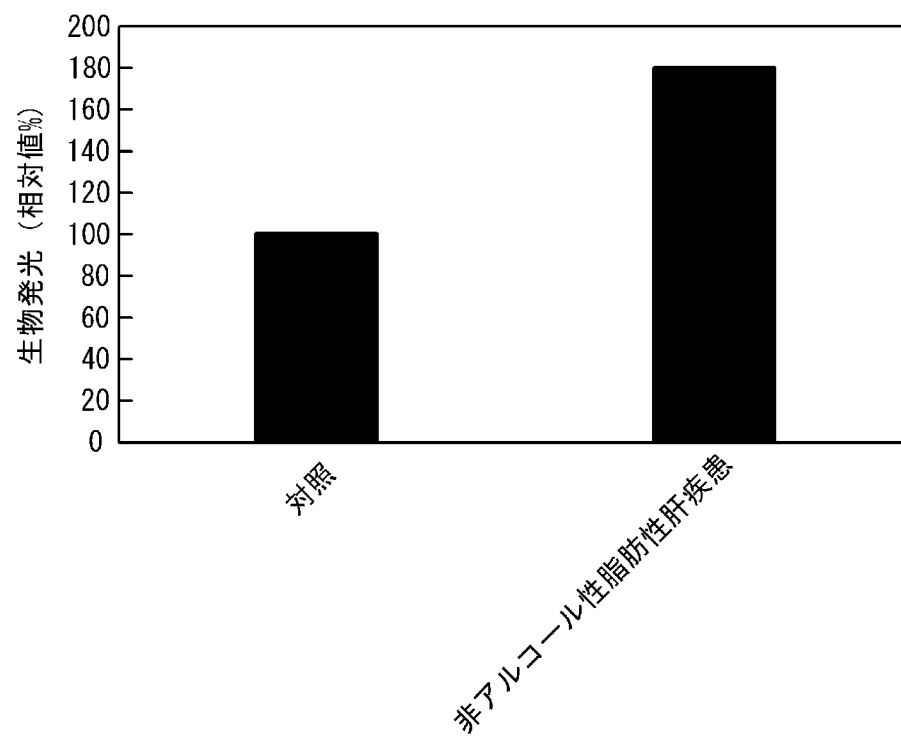
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/031785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C12Q 1/26**(2006.01)i; **A61K 51/04**(2006.01)i; **A61P 1/16**(2006.01)i; **G01N 21/78**(2006.01)i

FI: C12Q1/26; G01N21/78 C; A61K51/04 200; A61P1/16

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)

C12Q1/26; A61K51/04; A61P1/16; G01N21/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/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	JP 2008-545746 A (PROMEGA CORPORATION) 18 December 2008 (2008-12-18) claims 1, 27, 33, 38, example 5, fig. 17-19, etc.	1-4
Y	claim 1, fig. 17-19, etc.	1-4
Y	JP 2012-500258 A (PROMEGA CORPORATION) 05 January 2012 (2012-01-05) claims 1, 7, 8, 10, 12, 13, paragraphs [0200], [0211], example 6, etc.	1-4
A	YAMAORI, S. et al. A Specific Probe Substrate for Evaluation of CYP4A11 Activity in Human Tissue Microsomes and a Highly Selective CYP4A11 Inhibitor: Luciferin-4A and Epalrestat. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS., 2018, vol. 366, pp. 446-457 fig. 1	1-4
A	JP 2009-184932 A (UNIV OF ELECTRO-COMMUNICATIONS) 20 August 2009 (2009-08-20)	1-4
A	JP 2014-218456 A (UNIV ELECTRO COMMUNICATIONS) 20 November 2014 (2014-11-20)	1-4

☒ 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

22 October 2021

Date of mailing of the international search report

02 November 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/031785**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-193584 A (UNIV ELECTRO COMMUNICATIONS) 05 November 2015 (2015-11-05)	1-4
A	WO 2013/027770 A1 (THE UNIVERSITY OF ELECTRO-COMMUNICATIONS) 28 February 2013 (2013-02-28)	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/031785

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2008-545746	A	18 December 2008	US	2007/0015790	A1	
				US	2008/0299593	A1	
				US	2014/0154716	A1	
				US	2016/0176830	A1	
				US	2019/0031629	A1	
				WO	2006/130551	A2	
				claims 1, 27, 33, 38, example 5, fig. 19			
				EP	1935986	A2	
				EP	2272972	A1	
				EP	2272973	A1	
				EP	2277872	A1	
				EP	2778234	A1	
				EP	3312292	A1	
JP	2012-500258	A	05 January 2012	US	2010/0062470	A1	
				WO	2010/021686	A1	
JP	2009-184932	A	20 August 2009	claims 1, 7, 8, 10, 12, 13, paragraphs [0142], [0152], example 6			
				US	2011/0033878	A1	
JP	2014-218456	A	20 November 2014	WO	2009/096197	A1	
				(Family: none)			
JP	2015-193584	A	05 November 2015	(Family: none)			
WO	2013/027770	A1	28 February 2013	US	2014/0221665	A1	
				EP	2754657	A1	
				CN	103796999	A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/26(2006.01)i; A61K 51/04(2006.01)i; A61P 1/16(2006.01)i; G01N 21/78(2006.01)i FI: C12Q1/26; G01N21/78 C; A61K51/04 200; A61P1/16		
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）） C12Q1/26; A61K51/04; A61P1/16; G01N21/78		
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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY (STN); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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
X	JP 2008-545746 A（プロメガ コーポレーション）18.12.2008（2008-12-18） 請求項1、27、33、38、実施例5、図17-19等	1-4
Y	請求項1、図17-19等	1-4
Y	JP 2012-500258 A（プロメガ コーポレーション）05.01.2012（2012-01-05） 請求項1、7、8、10、12、13、段落0200, 0211, 実施例6等	1-4
A	YAMAORI S. et al., A Specific Probe Substrate for Evaluation of CYP4A11 Activity in Human Tissue Microsomes and a Highly Selective CYP4A11 Inhibitor: Luciferin-4A and Epalrestat, THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 2018, Vol.366, p.446-457 Fig. 1	1-4
A	JP 2009-184932 A（国立大学法人 電気通信大学）20.08.2009（2009-08-20）	1-4
A	JP 2014-218456 A（国立大学法人電気通信大学）20.11.2014（2014-11-20）	1-4
A	JP 2015-193584 A（国立大学法人電気通信大学）05.11.2015（2015-11-05）	1-4
A	WO 2013/027770 A1（国立大学法人電気通信大学）28.02.2013（2013-02-28）	1-4
☐ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 22.10.2021		国際調査報告の発送日 02.11.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 北村 悠美子 4N 4501 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/031785

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2008-545746	A	18.12.2008	US	2007/0015790	A1	
				US	2008/0299593	A1	
				US	2014/0154716	A1	
				US	2016/0176830	A1	
				US	2019/0031629	A1	
				WO	2006/130551	A2	
				claims 1, 27, 33, 38, Example 5, FIG. 19			
				EP	1935986	A2	
				EP	2272972	A1	
				EP	2272973	A1	
				EP	2277872	A1	
				EP	2778234	A1	
				EP	3312292	A1	
JP	2012-500258	A	05.01.2012	US	2010/0062470	A1	
				WO	2010/021686	A1	
JP	2009-184932	A	20.08.2009	claims 1, 7, 8, 10, 12, 13, [00142], [00152], EXAMPLE 6			
				US	2011/0033878	A1	
JP	2014-218456	A	20.11.2014	WO	2009/096197	A1	
				(ファミリーなし)			
JP	2015-193584	A	05.11.2015	(ファミリーなし)			
WO	2013/027770	A1	28.02.2013	US	2014/0221665	A1	
				EP	2754657	A1	
				CN	103796999	A	