

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4854509号
(P4854509)

(45) 発行日 平成24年1月18日(2012.1.18)

(24) 登録日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/50 (2006.01) GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15 (2006.01) GO 1 N 33/15 Z

請求項の数 2 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2006-531878 (P2006-531878)	(73) 特許権者	390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(86) (22) 出願日	平成17年8月19日(2005.8.19)	(73) 特許権者	503449018 株式会社フェニックスバイオ 広島県東広島市鏡山三丁目4番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/015148	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(87) 国際公開番号	W02006/019162	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(87) 国際公開日	平成18年2月23日(2006.2.23)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
審査請求日	平成20年8月12日(2008.8.12)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
(31) 優先権主張番号	特願2004-240827 (P2004-240827)		
(32) 優先日	平成16年8月20日(2004.8.20)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬物のヒトにおける肝代謝及び肝機能を予測する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、該キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析し、さらに該キメラ動物とは異なる種の動物における該被験物質の代謝物を分析し、得られた結果を対比することを特徴とする、該被験物質のヒト特異的な代謝物を分析する方法。

【請求項2】

増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、該キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析し、さらに該キメラ動物とは異なる種の動物における該被験物質の代謝物を分析し、得られた結果を対比することを特徴とする、該被験物質についてヒト型の代謝プロファイルを有する動物の予測方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、薬物のヒトにおける肝代謝及び肝機能への影響を正確に予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

体内に摂取された物質の多くはまず肝臓で代謝される。特に医薬品の開発において、薬物が肝臓でどのような代謝を受け、さらに肝機能に影響を及ぼすのかは安全性の面から必須のデータである。また、医薬品だけでなく、環境に存在する種々の化学物質のヒトへの影響を評価するためにも、当該化学物質の肝機能に対する影響の評価は必要である。

【0003】

医薬品開発等においては、これらの被験物質のヒトの肝臓における代謝や肝機能への影響は、直接ヒトに投与して測定することはできないので、従来は、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、チンパンジー等の哺乳動物が使用されている。しかし、肝臓における代謝は、動物種によって大きく相違することが知られていることから、ヒト以外の動物を用いた試験結果から、ヒトにおける代謝を予測することは困難である。

10

【0004】

そこで、最近では、各種ヒト薬物代謝酵素発現系マイクロソームを用いた系やヒトヘパトサイトを用いた系などのインビトロの測定系が開発され、使用されている。しかしながら、これらインビトロの測定系でも、補酵素の添加、測定系の差により異なる結果が出る場合がある等、問題点が多く、ヒトの代謝を正確に予測できないのが現状である。

【0005】

これに対し、インビボにおける被験薬物の肝代謝等を測定するための動物として、ヒト肝細胞の集団を体内に有し、この肝細胞集団が実質的に動物の肝機能を担っているキメラ動物が報告された(特許文献1、および2)。

20

【特許文献1】特開2002-45087号公報

【特許文献2】WO 03/080821 A1

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、前記特許文献1には、キメラ動物に被験物質を投与した実施例はなく、実際に被験物質を投与した場合にキメラ動物がどのような薬物代謝をするのか明らかではない。また、どのような症状をおこすのかについては予測できなかった。実際に前記キメラ動物に被験物質を投与すると異常に血液凝固等が生じてしまうことが判明した。また、このキメラ動物は、動物自身の肝機能が障害されているので、肝機能のマーカーが異常値を示しており、被験薬物を投与した場合の肝機能マーカーの変化が、移植されたヒト肝細胞に対する被験薬物の影響なのか判断できなかった。また、被験薬物投与後の測定値が、すべて移植されたヒト肝細胞由来のものなのか、動物の肝細胞由来のものなのか判断できなかった。

30

【0007】

本発明は、インビボにおいて薬物のヒトにおける肝薬物代謝や肝機能への影響等を正確に予測する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

そこで本発明者は、種々検討した結果、ヒト肝細胞移植キメラ動物に被験物質を投与する際、事前にヒト補体反応を制御すれば、安定的に該キメラ動物を維持することができ、さらに、ヒト肝細胞移植キメラ動物だけでなく、当該キメラ動物と同種の非キメラ動物を同時に使用し、それらの両者に被験物質を投与し、それらの動物の肝代謝物、肝機能を分析比較すれば、正確にヒトにおける被験物質の肝代謝物、肝機能への影響等が予測できることを見出し、本発明を完成するに至った。

40

【0009】

すなわち、本発明は、増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、

50

該キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析比較することを特徴とする、ヒトにおける該被験物質の肝代謝物を予測する方法を提供するものである。

【0010】

また本発明は、増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、該キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析比較することを特徴とする、ヒトにおける該被験物質の排泄の型を判定する方法を提供するものである。

【0011】

さらに本発明は、増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、該キメラ動物及び非キメラ動物の肝機能を検査比較することを特徴とする、ヒトにおける該被験物質の肝機能への影響を予測する方法を提供するものである。

10

【0012】

さらに本発明は、増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、該キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析し、さらに該キメラ動物とは異なる種の動物における該被験物質の代謝物を分析し、得られた結果を対比することを特徴とする、該被験物質のヒト特異的な代謝物を分析する方法を提供するものである。

20

【0013】

さらに本発明は、増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、該キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析し、さらに該キメラ動物とは異なる種の動物における該被験物質の代謝物を分析し、得られた結果を対比することを特徴とする、該被験物質についてヒト型の代謝プロファイルを有する動物の予測方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、インビボで薬物のヒトにおける肝代謝、排泄の型、肝機能への影響等が、正確に予測できる。従って、本発明方法を用いれば、薬物のヒトへの影響が、ヒトに投与する前に予測可能となり、医薬品開発における候補物質のスクリーニング、ヒトでの副作用の発生や有効性の予測が容易となる。それ故、開発初期における候補物質の絞り込み等による開発コストの削減や、ヒトにおける副作用の防止につながり、医薬品開発において極めて有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】血漿中放射能濃度推移を示す図である。

【図2】胆汁中への排泄を示す図である。

40

【図3】尿中及び糞中への放射能の排泄率を示す図である。

【図4】投与2時間後の血漿中の主なピークを示す図である。

【図5】胆汁中の放射能クロマトグラムを示す図である。

【図6】投与2時間後の肝臓中及び腎臓中の放射能クロマトグラムを示す図である。

【図7】糞中の放射能クロマトグラムを示す図である。

【図8】尿中の放射能クロマトグラムを示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明に用いられる非ヒトキメラ動物は、増殖能を有するヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の機能を担っているキメラ動物である。こ

50

のキメラ動物は、その動物本来の肝細胞が障害を受けており、かつヒト肝細胞に対して拒絶反応を示さない免疫不全動物（免疫不全肝障害動物）にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の生着が認められた動物であるのが好ましい。

【0017】

ここで肝障害動物としては、*Science*, 263, 1149 (1994)に記載の、アルブミンのプロモータ及びエンハンサー領域とu-P A（ウロキナーゼタイププラスミノゲンアクチベータ）の融合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いることができる。また、免疫不全肝動物としては、遺伝的に免疫不全であるSCIDマウス（*severe combined immunodeficiency disease* マウス：重症複合免疫不全マウス）を用いることができる。免疫不全肝障害動物は、これらの肝障害マウスと免疫不全マウスを交配させ、その子孫マウスを用いるのが簡便である。このような動物の種としては、マウスが好ましい。免疫不全肝障害マウスの例としては、u P A - T g (+ / +) / S C I D マウスが好ましい。

10

【0018】

免疫不全肝障害動物に移植するためのヒト肝細胞としては、凍結肝細胞、新鮮肝細胞、増殖性の高い小型の肝実質細胞等が好ましい。また、人種による評価のためには、日本人、韓国人、中国人、白人、黒人、その他の人種によるこれら細胞を移植することにより可能となる。

【0019】

免疫不全肝障害動物へのヒト肝細胞の移植は脾臓に行うのが好ましい。脾臓に移植すれば、移植されたヒト肝細胞は動物の肝臓に容易に生着する。

20

【0020】

本発明に用いるキメラ動物としては、特開2002-45087号公報のu P A - T g (+ / +) / S C I D (+ / +) マウスの脾臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の生着が確認されたマウスを用いるのが好ましい。

【0021】

また、本発明に用いる前記キメラ動物と同種の非キメラ動物としては、免疫不全肝障害動物、さらに免疫不全肝障害マウス、特にu P A - T g (- / -) / S C I D (+ / +) マウス、u P A - T g (+ / -) / S C I D (+ / +) マウス、u P A - T g (+ / +) / S C I D (+ / +) マウスが好ましい。

30

【0022】

本発明においては、ヒト肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御された状態下で、被験物質をキメラ動物及び同様の非キメラ動物に投与する。ヒト補体の攻撃から防御しない場合には、被験物質の投与により、汎発性凝固症候群などが発症してしまうからである。ヒト補体の攻撃から防御した状態におくためには、補体抑制剤のメシル酸ナファモスタット等や、血液凝固を抑えるためにヘパリン等の抗凝固剤を、動物に予め投与しておくのが好ましい。投与量は、抗凝固効果の得られる量であればよい。これらの薬剤の投与時期は、被験物質を投与する前である。

【0023】

また、本発明においては、キメラ動物及び同種の非キメラ動物の両者に被験物質を投与する。投与手段としては、被験物質本来の投与手段でもよいが、吸収率などに種差があることを考慮すると、静脈内投与、経口投与等が好ましい。

40

【0024】

被験物質投与後、キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析し、両者を比較すれば、ヒトにおける被験物質の肝代謝物を正確に予測できる。代謝物の分析とは、代謝物の種類、量、存在比、及びそれらの経時的変化、量的変化などの情報を得ることであり、血漿、組織、胆汁、尿、糞中の代謝物を分析するのが好ましい。代謝物の分析手段としては、被験物質として放射性同位元素を有する物質を使用し、その放射能を測定することにより行うのが簡便である。また代謝物としては種々の分解物、抱合体等が挙げられる。

【0025】

50

本発明のように、キメラ動物と非キメラ動物の両者を使用し、両者の分析結果を比較することにより、例えばキメラ動物におけるヒト肝細胞機能の発生率が数十%であっても、被験物質のヒト肝細胞に対する作用が正確に把握できる。また、キメラ動物自体が生じている肝障害と、被験物質投与によって生じた肝障害とが区別できる。さらには、肝臓のmRNA、蛋白等の変化を種々の方法で測定することにより、肝機能障害あるいは肝毒性の機序の解析が可能となる。

【0026】

被験物質投与後、キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析比較することにより、ヒトにおける被験物質の排泄の型を判定することもできる。すなわち、例えば両者の尿、糞及び胆汁中の代謝物を測定して比較することにより、被験物質のヒトにおける排泄の型が判定できる。この排泄の型は、動物種差が大きいと、医薬品開発においては、被験物質のヒトにおける排泄の型を知ることは極めて重要であり、ヒトに被験物質を投与することなく、ヒトにおける排泄の型や代謝物が評価できる本発明は極めて有用である。

10

【0027】

被験物質投与後、キメラ動物と非キメラ動物の肝機能を検査比較すれば、ヒトにおける被験物質の肝機能への影響、例えば肝機能障害に対する予防、治療効果、肝細胞に対する毒性等が正確に予測できる。キメラ動物自体肝障害を生じており、被験物質を投与する前から肝機能を示すマーカー、例えばGOTやGPTは異常値を示しており、対照動物を同時に用いなければ、被験物質のヒトに対する肝機能の影響は全く把握することができない。前記対照動物としては、同種の非キメラ動物が望ましい。前記非キメラ動物としては、

20

該キメラ動物と同じ免疫不全肝障害動物、免疫不全動物、障害のない動物が挙げられる。肝機能を示す検査項目としては、GOT、GPT等の生化学検査値が挙げられるが、肝臓のmRNAの変化、発現蛋白等の変化を公知の方法で測定することも出来る。

【0028】

前記の如く、被験物質投与後、キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析比較して、ヒトにおける該被験物質の排泄の型や代謝物を評価した後、さらに該キメラ動物とは異なる種の動物における該被験物質の代謝物を分析し、得られた結果を対比すれば、該被験物質についてヒト型の代謝プロファイルを有する動物が予測できる。すなわち、種々の動物において、被験物質の代謝プロファイルがヒト型であるか否かを容易に確認することができ、被験物質ならびにその代謝物が生体に及ぼす影響を検討する上で、当該動物の使用の適否を確認することができる。

30

【実施例】

【0030】

次に実施例を挙げて、本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0031】

実施例1

A. 材料

(1) 被験物質

ヒトにおいては、グルクロン酸抱合体の尿中排泄が主消失経路であることが知られているケトプロフェンを用いた。

³H-ケトプロフェン(ART391, Lot 040219)はARCより購入した。標識部位はgeneral、被放射能は1110 GBq/mmolであった。

【0032】

(2) 使用動物

キメラマウスは株式会社フェニックスバイオ製を用いた。すなわち、肝不全型のトランスジェニックマウスであるuPA-Tg(+ / +) / SCIDマウス(雌性)の脾臓にヒト肝細胞を移植し、ヒト肝細胞の生着が認められたマウスを用いた(体重: 10.2 ~ 18.0 g)。ヒト肝細胞の置換率は、60% ~ 80%であり、移植後45日 ~ 87日経過

50

したマウスを用いた。コントロールマウスとして、6～10週齢のuPA(-/-)/SCIDマウスを用いた(体重:15.1～22.2g)。

搬入後のマウスは水(0.012%次亜塩素酸含有)及びビタミンC含有滅菌固形飼料(CRF-1、オリエンタル酵母)を自由に摂取させ、室温 23 ± 3 、湿度 55 ± 20 %の条件下で飼育した。なお、キメラマウスには、1日2回メシル酸ナファモスタット注射液(0.3mg/0.2mL/body)を腹腔内に投与した。

【0033】

(3) 投与量及び投与方法

所定量の ^3H -ケトプロフェンエタノール溶液を採取し、窒素ガス気流下で乾固した後、ケトプロフェンの0.125mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて溶解した。0.1%クエン酸水溶液でpH7.0とし、注射用蒸留水で1mg/mLの濃度に調製した。この投与液を5mL/kgでマウス尾静脈にb o r u s投与した(5mg/5mL/kg)。

10

【0034】

(4) 試料採取

尿及び糞は、キメラマウス及びコントロールマウスを投与後5日まで代謝ケージで飼育し、採取した。肝及び腎は、投与後2時間で放血死させた後、採取した。血漿は眼窩静脈叢より採血して、遠心分離して採取した。胆汁については、キメラマウス及びコントロールマウスに胆管カニューレ術を施し、投与後72時間まで採取した。

20

【0035】

(5) 放射能の測定

各試料中の放射エネルギーは、液体シンチレーターにハイオニックフロー(パーキンエルマー製)、液体シンチレーションカウンターにTRICARB 2500を用いて、2分間計測した。

なお、計数効率の補正は外部標準線源法によって行った。

【0036】

(6) 血漿、組織、胆汁、尿及び糞中濃度の測定

血漿、胆汁及び尿は10 μL を20mL用ガラスバイアルに採取し、ハイオニックフロー-10mLを加え測定した。

組織(肝及び腎)は、重量に対し3倍量の酢酸緩衝液(0.1M、pH3.0)を加えポリトロンホモジナイザーでホモジネートした。50 μL をソルエン350(パーキンエルマー)2mLで可溶化し、ハイオニックフロー-10mLを加え測定した。

30

糞は全量を15又は30mLにメスアップして、ポリトロンホモジナイザーでホモジネートした。0.5mLをソルエン350(パーキンエルマー)2mLで可溶化し、液体ハイオニックフロー-10mLを加え測定した。

【0037】

(7) 血漿、組織、尿中の代謝物分析

(i) 血漿、組織及び糞の分析

血漿50 μL 又は組織ホモジネート100 μL をエッペンドルフチューブに加え、アセトニトリルを4倍量添加し、激しく攪拌した。遠心分離後(22000 $\times g$ 、4、10分)、上清を採取し、窒素気流下濃縮乾固した。酢酸緩衝液(0.1M、pH3.0)200 μL で再溶解後、再度遠心分離(22000 $\times g$ 、4、10分)して、上清をHPLCに注入した。

40

糞ホモジネートについては、その500 μL をガラスチューブに採取し、アセトニトリルを9倍量添加し、激しく攪拌した。遠心分離後(1800 $\times g$ 、4、10分)、上清を採取した。残渣に蒸留水500 μL を加え、攪拌した後、同様のアセトニトリル抽出を繰り返した。上清を合し、窒素気流下濃縮乾固した。酢酸緩衝液(0.1M、pH3.0)200 μL で再溶解後、再度遠心分離(22000 $\times g$ 、4、10分)して、上清をHPLCに注入した。

【0038】

50

(i i) 胆汁及び尿の分析

胆汁は、25 μ L を酢酸緩衝液 (0.1 M、pH 3.0) 75 μ L で希釈して、ウルトラフリー (0.45 μ m、日本ミリポア) で限外ろ過 (22000 \times g、4、10分) した。ろ液を HPLC に注入した。

尿は、代謝ケージの尿収集管にあらかじめ酢酸緩衝液 (0.1 M、pH 3.0) 200 μ L 又は 500 μ L を加えて採取した。100 μ L をウルトラフリー (0.45 μ m、日本ミリポア) で限外ろ過 (22000 \times g、4、10分) し、ろ液を HPLC に注入した。

【0039】

(i i i) 酵素処理

胆汁及び尿試料は、 α -グルクロニダーゼ・アリルスルファターゼ (Helix pomatia, ロシュダイアグノスティクス) による酵素処理を行った。すなわち、胆汁及び尿試料に α -グルクロニダーゼ・アリルスルファターゼ (3%) を加え、16時間37°C でインキュベーションした。インキュベーション試料を遠心分離 (22000 \times g、4、10分) して、上清を HPLC に注入した。

【0040】

(i v) HPLC 分析条件

HPLC システム：島津 LC-10Avp シリーズ

カラム：Inertsil ODS-3、5 μ m、4.6 mm \times 150 mm (GLサイエンス)

移動相：A 液) 0.1% 酢酸水溶液

B 液) 0.1% アセトニトリル

グラジエント：Time (min) 0 15 25 26 35

B conc. (%) 25 80 80 25 25

カラム温度：40

検出：UV 検出装置 (254 nm) 及び連続放射能検出器

【0041】

B. 試験結果

(1) 血漿、組織、胆汁、尿及び糞中濃度の測定

血漿中放射能濃度推移を図 1 に、ノンコンパートメント解析によって得られたキネティックパラメーターを表 1 に示した。コントロールマウス (n = 2) 及びキメラマウス (n = 3) における総放射能基準の AUC はそれぞれ 45.8 μ g \cdot eq \cdot h/mL 及び 35.7 μ g \cdot eq \cdot h/mL、t_{1/2} (0 - 4 h) はそれぞれ 0.92 h 及び 0.78 h であった。両動物間でほぼ同程度であった。

【0042】

10

20

30

【表 1】

	Tmax (min)	Cmax ($\mu\text{g eq./mL}$)	t 1/2 (0-4hr)	t 1/2 (6-24hr)	AUC ($\mu\text{g eq.}\cdot\text{hr/mL}$)	Vd (mL/kg)	CLtotal (mL/h/kg)
コントロール(平均)		30.8	0.92	3.72	45.8	37.8	22.0
キメラ(平均)		27.5	0.78	6.81	35.7	56.7	29.8

10

20

30

40

【0043】

胆汁中への排泄を図2に示した。投与量に対する胆汁中への排泄率はコントロールマウス ($n=3$) で $19.9 \pm 9.6\%$ 、キメラマウス ($n=3$) で $10.5 \pm 7.8\%$ であり、両動物間に有意差は認められなかったが、コントロールマウスが高値を示した。

【0044】

投与後2時間経過後の組織中放射能濃度は、コントロールマウス ($n=3$) 及びキメラマウス ($n=3$) の肝臓で $2.58 \pm 0.33 \mu\text{g eq./mL}$ 及び $2.14 \pm 0.98 \mu\text{g eq./mL}$ 、腎臓で $4.70 \pm 0.61 \mu\text{g eq./mL}$ 及び $5.03 \pm 1.25 \mu\text{g eq./mL}$ であった(表2)。この時の血漿中放射能濃度は、コントロール

50

マウス及びキメラマウスでそれぞれ $6.82 \pm 1.10 \mu\text{g eq. / mL}$ 及び $6.96 \pm 2.65 \mu\text{g eq. / mL}$ であった(表2)。これら組織中及び血漿中濃度において、両動物間で有意差は認められなかった。組織対血漿中濃度比(Kp)を算出した結果、キメラマウスの肝臓においてコントロールマウスに比べ有意な低下が認められた(表2)。

【0045】

【表2】

	濃 度($\mu\text{g eq./mL}$)			
	コントロールマウス		キメラマウス	
	平均	SD	平均	SD
肝臓	2.58	0.33	2.14	0.98
腎臓	4.70	0.61	5.03	1.25
血漿	6.82	1.10	6.96	2.65

	Kp(g tissue/mL)			
	コントロールマウス		キメラマウス	
	平均	SD	平均	SD
肝臓	0.380	0.021	0.301*	0.033
腎臓	0.700	0.147	0.777	0.292

*; $p < 0.05$

【0046】

尿及び糞中への放射能の排泄率について図3に示した。120時間までの投与量に対する尿中への排泄率は、コントロールマウス($n=3$)で $66.5 \pm 6.4\%$ 、キメラマウス($n=3$)で $80.3 \pm 26.9\%$ であった。また、120時間までの投与量に対する糞中へ排泄率は、コントロールマウス($n=3$)で $17.9 \pm 13.0\%$ 、キメラマウス($n=3$)で $11.1 \pm 2.3\%$ であった。キメラマウスにおいて、より尿排泄型のマスバランスを示した。

【0047】

(2) 血漿、組織、尿中の代謝物分析

図4に示したように、投与後2時間の血漿中の主なピークとして、コントロールマウス、キメラマウスいずれも未変化体と水酸化代謝物(推定、以下M1)が認められた。M1の生成はコントロールマウス>キメラマウスであった。

【0048】

胆汁中の放射能クロマトグラムを図5に示した。胆汁中では未変化体はほとんど認められず、グルクロン酸抱合体に由来するピークが出現した。酵素処理を行った結果、コントロールマウスでは、いくつか水酸化代謝物と判断されるピークが認められたが、キメラマウスでは未変化体が主なピークであった。

【0049】

投与後2時間の組織中のピークとして、コントロールマウスの肝臓中(図6)では、未変化体は観測されずM1が主なピークであったのに対し、キメラマウスでは未変化体とM1が認められた。また、腎臓中(図6)では、コントロールマウス、キメラマウスいずれも、未変化体とM1が主なピークとして認められた。肝臓、腎臓いずれも、M1の生成はコントロールマウス>キメラマウスであった。

【0050】

糞は放射能濃度が低かったことから、放射能クロマトグラムのノイズが大きかったものの、コントロールマウス及びキメラマウスいずれも未変化体とM1が主たるピークであると考えられた(図7)。

【0051】

尿の代表的なクロマトグラムを図8に示した。尿中のピークとしては、コントロールマウス、キメラマウス、いずれも未変化体と水酸化代謝物とそれらの抱合体と思われるピー

10

20

30

40

50

クが多数認められた。特に、コントロールマウスの17.8分に溶出するピークは、マウスに特有のピークと考えられた。さらに、これら放射能クロマトグラム上のピークは - グルクロニダーゼ・アシルスルファターゼ酵素処理した結果、未変化体とM1を生じることが明らかとなった。水酸化代謝物の生成はコントロールマウス>キメラマウスであった。

【0052】

なお、アセトニトリルを用いた分析前処理時の放射能の回収率は、血漿、組織（肝及び腎）、糞試料を通して88.5~95.7%と良好であり、代謝プロファイルの検討をすす上で、問題ないものと考えられた。

【0053】

(1)上記の結果から、血漿中濃度推移、組織内濃度はコントロールマウスとキメラマウス間で大きな差は認められなかったが、胆汁排泄率はキメラマウスに比べコントロールマウスが大きかった。また、尿糞排泄の比率については、ばらつきが大きかったため、有意差は認められなかったが、コントロールマウスに比べキメラマウスの方が尿中排泄率が高かった。これは、ヒトでは代謝物も含めげっ歯類よりも尿中排泄が高い事が報告されていることから、キメラマウスが、よりヒトに近い胆汁排泄機能を有しているためと考えられた。

【0054】

(2)さらに、尿中及び胆汁中の代謝プロファイルを比較した結果、キメラマウスでは主に未変化体から生じたと考えられる抱合体が生成していたのに対し、コントロールマウスでは水酸化代謝物とその抱合体の存在が確認された。この結果、キメラマウスはよりヒト型に近い代謝プロファイルを示した。

これらのことから、ヒト由来の肝細胞集団を体内に有し、該肝細胞集団が実質的に該キメラ動物の肝機能を担っている非ヒトキメラ動物、及び同種の非キメラ動物に、該肝細胞の産生するヒト補体の攻撃から防御させた状態下、被験物質を投与し、該キメラ動物及び非キメラ動物の代謝物を分析比較することで、該被験物質が尿排泄型であるか、胆汁排泄型であるか等、ヒトにおける排泄の型を予測できることが判る。さらには、他の動物種と比較することにより、ヒト特異的な代謝物の有無の確認や、該動物種の代謝プロファイルがヒト型であるかを予測しうることがわかった。

【0055】

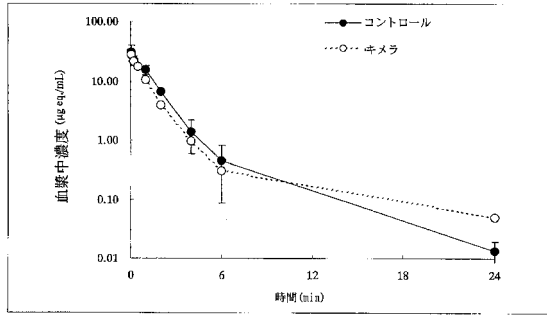
(3)他方、2相系代謝酵素（特にグルクロンサン抱合）が主に関与する場合、*in vitro*試験から得られたデータの*in vivo*への外挿が困難であると報告されており、ヒトヘパトサイトを用いた場合、水酸化代謝物の生成は認められたが、抱合代謝物の生成は確認されなかった。しかしながら、本発明により、ヒトヘパトサイトを用いた*in vitro*試験では確認されなかった抱合代謝物を確認することができ、極めて有用であることが判る。

10

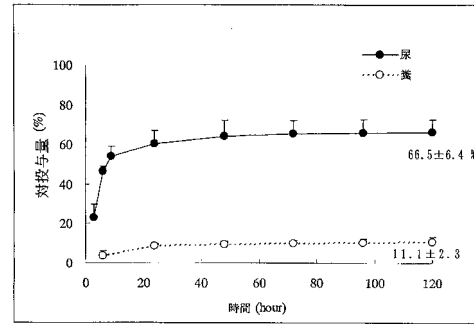
20

30

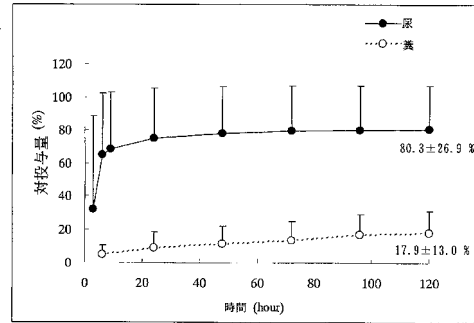
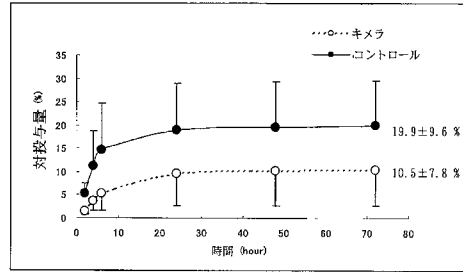
【図1】



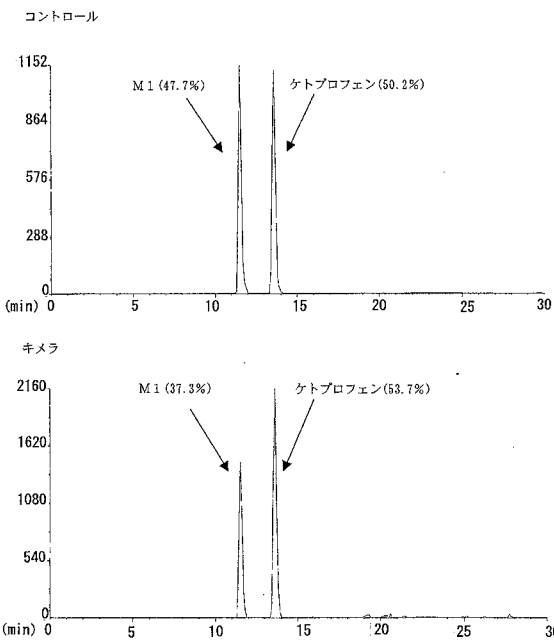
【図3】



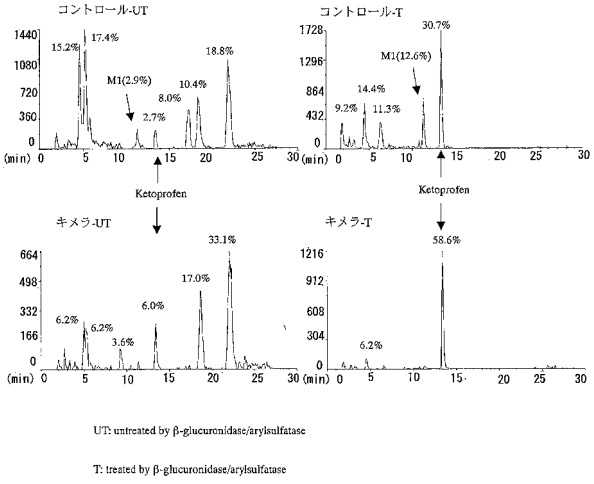
【図2】



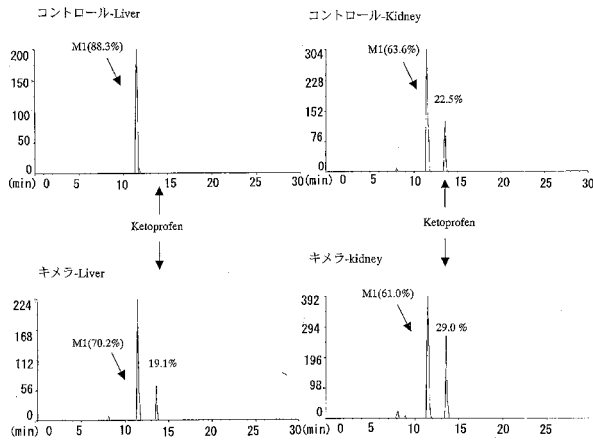
【図4】



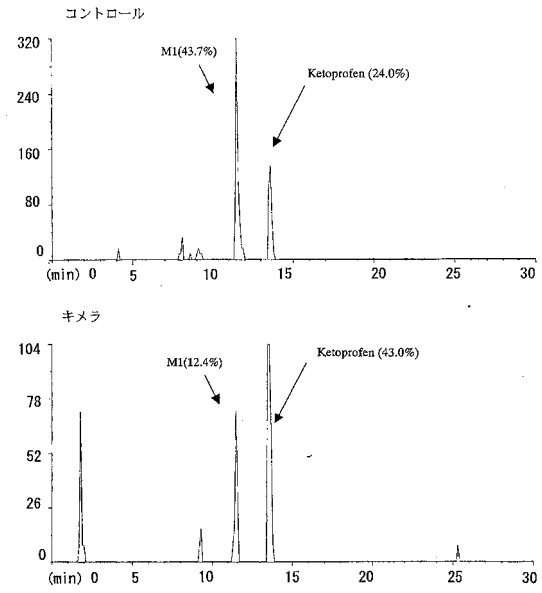
【図5】



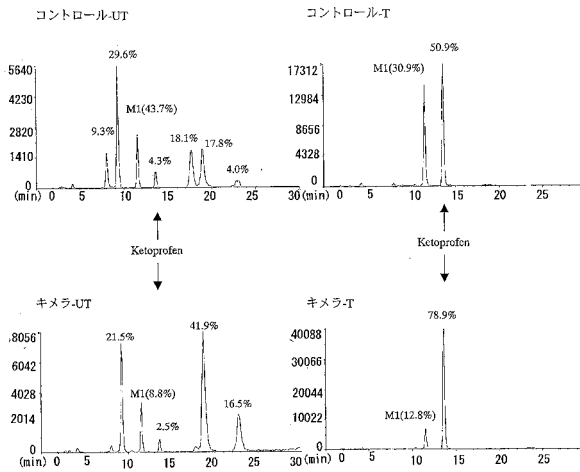
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



UT: untreated by β -glucuronidase/arylsulfatase

T: treated by β -glucuronidase/arylsulfatase

フロントページの続き

- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (72)発明者 二宮 真一
茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社薬物動態研究所内
- (72)発明者 大曾根 義泰
茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社薬物動態研究所内
- (72)発明者 安達 弥永
茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社薬物動態研究所内
- (72)発明者 堀江 透
広島県東広島市鏡山三丁目 1 3 番 6 0 号 株式会社フェニックスバイオ内
- (72)発明者 添野 吉徳
広島県東広島市鏡山三丁目 1 3 番 6 0 号 株式会社フェニックスバイオ内
- (72)発明者 井上 多恵
広島県東広島市鏡山三丁目 1 3 番 6 0 号 株式会社フェニックスバイオ内

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 0 4 5 0 8 7 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 3 / 0 8 0 8 2 1 (W O , A 1)
国際公開第 1 9 9 4 / 0 0 2 6 0 1 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 0 / 0 0 3 0 0 1 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 0 / 0 4 3 4 9 8 (W O , A 1)
TATENO C. et al. , Chimeric Mice With Human Hepatocytes-A New Tool for Pre-Clinical Evaluation of New Chemical Entities- , 細胞 , 2 0 0 4 年 7 月 3 0 日 , Vol.36 No.8 , Page. 328-332
- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/50
G01N 33/15
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)