

(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
2011年3月3日(03.03.2011)



(10) 国際公開番号

WO 2011/025014 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/064747
- (22) 国際出願日: 2010年8月30日(30.08.2010)
- (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 2009-201043 2009年8月31日(31.08.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社(TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 上口 尚美 (KAMIGUCHI, Naomi) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 奥田 照明 (OKUDA, Teruaki) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号 武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 青山 英嗣 (AOYAMA, Eiji) [JP/JP]; 〒5300046 大阪府大阪市北区菅原町10番12-1303号 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, 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, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR EVALUATION OF SAFETY OF DRUG

(54) 発明の名称: 薬物の安全性の評価方法

(57) Abstract: A method for evaluating the xenobiotic metabolizing enzyme-inducing capability of a test compound, comprising exposing hepatocytes to the test compound in the presence and absence of a substance capable of inducing the activity of a xenobiotic metabolizing enzyme and comparing the activity of the enzyme in the presence of the substance with that in the absence of the substance.

(57) 要約: 本発明は、生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下および非存在下で肝細胞を試験化合物に曝露し、両条件下での該酵素活性を比較することを含む、該試験化合物の生体異物代謝酵素誘導能の評価方法を提供する。



WO 2011/025014 A1

明 細 書

発明の名称：薬物の安全性の評価方法

技術分野

[0001] 本発明は、薬物の安全性、特に生体異物代謝酵素誘導能の評価方法に関する。詳細には、本発明は、生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下および非存在下で肝細胞を試験化合物に曝露し、両条件下での該酵素活性を比較することを含む、薬物の生体異物代謝酵素誘導能の評価方法に関する。

[0002] (発明の背景)

肝臓は医薬品などの生体異物を排泄しやすい形態に変換する生体異物代謝に関して中心的機能を果たしている。この生体異物代謝の機能は、同時に生体異物代謝産物による突然変異誘発や毒性発現、あるいは併用薬の薬理効果の低減などをもたらす場合もある。このような理由から、医薬品などの開発には、早期探索段階において候補化合物群の肝臓での代謝機能誘導活性を調査する必要があり、実験動物あるいは実験動物より採取した肝細胞を用いた生体異物の肝代謝の研究が広く進められてきた。しかし、生体異物代謝酵素群の活性は、実験動物とヒトとの間で大きく異なり、実験動物を用いて得られた知見がヒトに反映されない場合も多い。それゆえ、医薬品のヒト肝代謝に及ぼす影響を正しく知るためには、ヒトの肝臓あるいはヒト肝臓由来の細胞を用いることが望ましいが、肝細胞の場合、本来の分化形質を失うことが一般に多いとされる株化細胞だけでなく、初代培養においてさえも生体異物代謝酵素群の活性が失われやすい。生体異物代謝能を保持する肝細胞として、摘出後速やかに新鮮肝臓切片から調製された初代肝細胞を用いることが考えられるが、入手の困難さなど様々な問題があり、実用性は極めて低い。

[0003] 近年、凍結保存した初代ヒト肝細胞を利用可能にするための研究が進められ、FDAによって誘導アッセイ用として認可された凍結初代ヒト肝細胞が、商業的に入手可能となった。凍結初代ヒト肝細胞は、新鮮初代ヒト肝細胞と比較して、入手容易性、実験の再現性、ドナーの選択性などの点で有利である。しかし、初代肝細胞における肝機能の発現の多くは、培養液中に含ま

れる各種成分や血清をはじめとする添加物に著しく影響される。西原ら（特許文献1）は、凍結初代ヒト肝細胞を、グルココルチコイドを含有する無血清完全合成培地で維持することにより、生体異物代謝酵素群の活性および遺伝子発現、並びに該酵素群の活性誘導および遺伝子発現誘導の機構を安定に維持することができ、試験化合物の生体異物代謝酵素群の活性および／または遺伝子発現の誘導活性の有無を判定できることを報告した。

しかし、実際の誘導アッセイでは、試験化合物によっては高濃度域で生体異物代謝酵素の活性が低下することが知られている。この場合でも、mRNAレベルでは誘導能が認められることが多く、試験化合物の生体異物代謝酵素の発現誘導能が過小評価されて、真に誘導能を有しない化合物だけを選択することができないという問題がある。そこで、Nicolli-Griffithら（非特許文献1）は、試験化合物単独でヒト肝細胞を処理した場合と、既知のCYP3A誘導物質であるリファンピシンを用いて、該酵素（CYP3A）を誘導した後に、リファンピシンを除去してから試験化合物をヒト肝細胞に添加した場合とで、該酵素の活性を測定・比較することにより、偽陰性の出現を防ぎ、試験の信頼性を高めることができると報告している。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第02/40995号パンフレット

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Drug Metabolism and Disposition 32: 1509-1515 (2004)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、早期創薬段階における医薬候補化合物の生体異物代謝酵素誘導能を評価するための、簡便で信頼性のある評価方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記の課題に鑑み、鋭意検討を重ねた結果、生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下および非存在下に、肝細胞を試験化合物に曝露し、両条件下における該酵素の活性を測定・比較することにより、試験化合物が該酵素活性を阻害する場合のみならず、細胞傷害性や機序に基づく阻害作用を持つ場合等に起こる酵素活性の誘導能の過小評価をも防ぐことができ、より信頼性の高い評価が可能であることを見出した。また、薄層マトリゲルコートした96穴プレートを使用することにより、ヒト肝細胞は長期の培養期間中でも高いCYP3A活性を維持できたことから、このアッセイ系は、頑健で高スループットな生体異物代謝酵素誘導能の評価系となり得ることが確認された。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである：

[1] 以下の工程：

(a) 培養肝細胞を含む試料を二分し、一方を生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下、試験化合物で処理し、他方を生体異物代謝酵素活性の誘導物質の非存在下、試験化合物で処理する工程、

(b) 工程(a)で得られた各試料中に含まれる該生体異物代謝酵素の活性を測定する工程、及び

(c) 工程(b)で測定された各酵素活性を比較し解析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物の生体異物代謝酵素誘導能の評価方法。

[2] 工程(a)における処理が、薄層マトリゲルでコーティングされた培養器上で行われることを特徴とする、上記[1]の方法。

[3] 培養器が96穴プレートである、上記[2]の方法。

[4] 工程(a)における処理が、2以上の試験化合物濃度において行われる、上記[1]～[3]のいずれかの方法。

[5] 生体異物代謝酵素が、シトクロムP450である、上記[1]～[4]

】のいずれかの方法。

〔6〕シトクロムP450が、CYP3Aである、上記〔5〕の方法。

〔7〕シトクロムP450がCYP3A4である、上記〔5〕の方法。

〔8〕生体異物代謝酵素活性の誘導物質が、リファンピシン、ニフェジピン、エファビレンツ、カルバマゼピン、アバシミベ、トログリタゾン、ゲムフィブロジル、ランソプラゾール、モダフィニル、ネビラピン、オメプラゾール、フェノバルビタール、フェニトイン、ロフェコキシブ、スルフィンピラゾン、又はトピラメートである、上記〔1〕～〔7〕のいずれかの方法。

〔9〕生体異物代謝酵素活性の誘導物質が、リファンピシンである、上記〔1〕～〔8〕のいずれかの方法。

〔10〕培養肝細胞が哺乳動物由来肝細胞である、上記〔1〕～〔9〕のいずれかの方法。

〔11〕培養肝細胞がヒト肝細胞である、上記〔1〕～〔10〕のいずれかの方法。

〔12〕培養肝細胞が凍結初代ヒト肝細胞である、上記〔1〕～〔11〕のいずれかの方法。

〔13〕培養肝細胞における該生体異物代謝酵素の遺伝子発現を測定する工程をさらに含む、上記〔1〕～〔12〕のいずれかの方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下および非存在下に、肝細胞を試験化合物に曝露し、両条件下における該酵素の活性を測定・比較することにより、試験化合物が該酵素活性を阻害する場合のみならず、その試験化合物が細胞傷害性や機序に基づく阻害作用を有する場合等に起こり得る該酵素（例、CYP3A）誘導能の過小評価を防ぐことができ、頑健で高スループットな生体異物代謝酵素の誘導能の評価が可能となる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]リファンピシンでのCYP3A酵素活性の誘導に対するマトリクスの影響を示す。凍結初代ヒト肝細胞を、コラーゲンでコーティングした48穴ポ

レート（白三角）、96穴プレート（黒三角）、又は薄層マトリゲルでコーティングした96穴プレート（黒丸）上で培養した。肝細胞培養を、3日間0.1% DMSO（コントロール）又は種々の濃度のリファンピシンで処理した。細胞密度は、48穴プレートでは 0.16×10^6 細胞/ウェルとし、96穴プレートでは 0.8×10^5 細胞/ウェルとした。CYP3A活性を、テストステロンの6 β -ヒドロキシル化の程度として決定した。データを、 $n=3$ （48穴プレート）又は4（96穴プレート）の別個のプレートから算出した平均値 $\pm$ S.D.で表す。

[図2]凍結初代ヒト肝細胞におけるCYP3A誘導に対するプレート基質の影響を示す。凍結初代ヒト肝細胞を、2ロットの薄層マトリゲル、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ポリ-L-オルニチン/ラミニン（PLO/LM）又はポリ-D-リジン（PDL）でコーティングしたプレート上で培養した。該肝細胞を、0.1% DMSO（コントロール）、 $10 \mu\text{M}$ リファンピシン、 $30 \mu\text{M}$ フェニトイン又は $30 \mu\text{M}$ カルバマゼピンで処理した。CYP3A誘導応答は、CYP3A活性（テストステロンの6 β -ヒドロキシル化の程度）として表す。各カラムの棒グラフは、左から、DMSO、リファンピシン、フェニトイン、カルバマゼピンを示す。

[図3]種々の誘導剤及び非誘導剤で処理した凍結初代ヒト肝細胞におけるCYP3Aの誘導を示す。試験した化合物を、N.J. Hewitt, et al.; Chem. Biol. Interact. 168, 51-65 (2007)で報告された新鮮又は凍結初代ヒト肝細胞におけるCYP3A誘導能にしたがって、強力な誘導剤（黒いバー）、中程度の誘導剤（グレーのバー）又は非誘導剤（白いバー）に分類した。 $10 \mu\text{M}$ （A）、 $1 \mu\text{M}$ （B）、及び $0.1 \mu\text{M}$ （C）の化合物でのCYP3A誘導応答を、 $10 \mu\text{M}$ リファンピシン応答に対する割合（%）として表す（縦軸）。

[図4]凍結初代ヒト肝細胞において陽性応答を生じる化合物の濃度-応答曲線を示す。いくつかの濃度の試験化合物を単独で（黒丸）、又は試験化合物と

10 μ M リファンピシンとを組合せて（白丸）、肝細胞を処理した。フェノバルビタール及びカルバマゼピンは、典型的な濃度－応答曲線を示し、リファンピシンによるCYP3A誘導の阻害は示さない（A）。アバシミベ及びエファビレンツは、ベル型の濃度－応答関係を示し、リファンピシンによるCYP3A誘導を阻害する（B）。データは、CYP3A活性の平均値 $\pm$ S. D. として表す（ $n=3$ 又は4）。

[図5] リトナビルで処理した肝細胞におけるCYP3A活性及びCYP3A4 mRNA量の誘導の濃度－応答曲線を示す。肝細胞を、いくつかの濃度のリトナビル単独で（黒丸）、又はリトナビルと10 μ M リファンピシンとを組合せて（白丸）処理した。CYP3A活性を、テストステロン6 β -ヒドロキシル化を測定することによって決定し（A）、CYP3A4 mRNA量をqRT-PCRによって測定した（B）。データは、CYP3A活性の平均値 $\pm$ S. D. 又はCYP3A4 mRNA量の平均値として表す（ $n=3$ 又は4）。

[図6] 誘導されたCYP3A活性とCYP3A4 mRNA量との間の相関を示す。凍結初代ヒト肝細胞を、44の化合物で、いくつかの濃度において処理した（ $n=128$ ）。各記号は、化合物によるリファンピシン誘導性のCYP3A活性の残留率を表す。データは、平均値として表す（ $n=3$ 又は4）。

[0011] （発明の詳細な説明）

本発明の生体異物代謝酵素誘導能の評価方法（本明細書中、本発明の評価方法と略記する場合がある）は、以下の工程：

（a）培養肝細胞を含む試料を二分し、一方を生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下、試験化合物で処理し、他方を生体異物代謝酵素活性の誘導物質の非存在下、試験化合物で処理する工程、

（b）工程（a）で得られた各試料中に含まれる該生体異物代謝酵素の活性を測定する工程、及び

（c）工程（b）で測定された各酵素活性を比較し解析する工程

を含む。

[0012] 本発明の評価方法における「培養肝細胞」とは、任意の動物の肝臓から採取した肝細胞を培地中で維持したものをいい、例えば、新鮮肝臓から得られる肝細胞を用いても、肝細胞を凍結させた凍結肝細胞を融解して用いてもよいが、供給の安定性、ドナーの選択性、及び細胞従来性の性質の維持等の観点から、凍結初代肝細胞が好ましい。本発明の評価方法における「培養肝細胞を含む試料」とは、このような肝細胞自体であってもよいし、培地中で維持される肝細胞、すなわち、肝細胞を含む培地であってもよい。

本発明における培養肝細胞の由来は、特に限定されないが、好ましくは哺乳動物（イヌ、ヒト、非ヒト霊長類、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット、ラット、及びマウス等）由来であり、特に好ましくはヒト由来である。例えば、ヒト肝細胞は、ヒト成人から手術により部分的に摘出された新鮮肝臓切片あるいは脳死患者より摘出された新鮮肝臓又はこれら摘出肝臓等の正常組織を、公知のコラゲナーゼ灌流法等で処理することで得られる（A. P. Li, et al.; J. Tiss. Cult. Meth. 14, 139-146 (1992)）。このようにして得られた初代ヒト肝細胞は、5～20%のジメチルスルホキシドと5～20%の牛胎児血清を含む細胞培養培地や、セルバンカー（日本全薬工業株式会社）、セルヴェイション（CELOX CORPORATION）等市販の細胞凍結保存液に分散させ、プログラムフリーザ等を用いる公知の方法等に準じて凍結し、液体窒素液中あるいは液体窒素で-140℃以下に冷却された窒素気層中で数年以上安定に保存できる（A. Ostrowska, et al.; Cell and Tissue Banking 1, 55-68 (2000)）。あるいは、本発明における培養肝細胞として、例えばCelsis In Vitro Technologies社等から市販されている凍結初代肝細胞、又はXenotech社等から市販されている不死化ヒト肝細胞等を用いることもできる。本発明の評価方法における「培養肝細胞」は、特に好ましくは、凍結初代ヒト肝細胞である。

[0013] こうして保存又は入手した細胞は、必要に応じ融解して維持し、凍結初代肝細胞として用いることができる。細胞の融解及び維持は、市販の培地を用

い、公知の培養方法にしたがって行うことができる。例えば、凍結初代ヒト肝細胞を、プレーティング培地（例、In Vitro GRO（登録商標）CP培地；Celsis In Vitro Technologies製）中で融解し、96穴マイクロプレート培養器として、 $0.1 \sim 1.0 \times 10^5$ 生細胞／ウェルの密度にて播種する。12～48時間、好ましくは約24時間のインキュベーション後、プレーティング培地を除去し、Torpedo Antibiotic Mix（Celsis In Vitro Technologies製）を追加したインキュベーション培地（例、In Vitro GRO（登録商標）HI培地；Celsis In Vitro Technologies製）と交換する。次いで、細胞を数日（例、1、2、3、5、7日）間インキュベートすることで、培養系を確立できる。その後は24から72時間毎に新鮮な培地に交換することが好まれる。なお、インキュベーションは、 $30 \sim 42^\circ\text{C}$ 、好ましくは約 37°C 前後、5% CO_2 を含む水蒸気飽和した培養器中で行われる。

[0014] あるいは、本発明において凍結初代肝細胞は、Williams' E培地、DMEM培地、ランフォード培地中において、5% CO_2 を含む水蒸気飽和した培養器中、 $30 \sim 42^\circ\text{C}$ にて培養できる。培地中にITS（インシュリン、トランスフェリン、セレンウム）、デキサメタゾン、抗生物質（ペニシリン-ストレプトマイシン）等を添加して培養することもできる。

[0015] 培養器は、肝細胞の培養に適した形態であれば特にマイクロプレートに限定されず、例えばプラスチック製プレート（12、24、96穴プレート等）、プラスチック又はガラス等のシャーレ又はディッシュ等が用いられる。また、キトサン膜、ハイドロゲル薄膜、綿等のガーゼ、ポリウレタン又はポリグリコール酸等の多孔性スポンジ、ナイロン若しくはポリエステル等の中空系又はホロファイバー、セラミック等の無機材料ビーズ等を培養支持体として用いても良い。培養器又は培養支持体は、必要に応じて細胞の接着を容易にする物質（例えばコラーゲン、コラーゲングル等が挙げられ、好ましくは薄層マトリゲルである）でコーティングされてもよい。本発明の評価方法

では、肝細胞の長期培養においても生体異物代謝酵素の活性を高く維持することができ、また必要な細胞数を抑えることが可能である点から、薄層マトリゲルでコーティングされた培養器（好ましくは96穴マイクロプレート）を用いるのが最も好ましい。

[0016] 本発明の評価方法における「生体異物代謝」とは、例えば医薬品、食品添加物、環境汚染物質等の生体に通常存在しない物質の代謝を意味し、なかでも薬物代謝が代表的な例である。本発明の評価方法における「生体異物代謝酵素」とは、生体異物代謝を行う酵素をいい、代表的な例として、主に肝細胞内のミクロソームで行われる薬物代謝に関与する薬物代謝酵素が挙げられる。本発明の評価方法における「生体異物代謝酵素」としては、肝特異的な生体異物代謝に関与する酵素、例えば、シトクロムP450、フラビン含有モノオキシゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、モノアミン酸化酵素、NADPH-シトクロムP450還元酵素、アルデヒド還元酵素、ケトン還元酵素、UDP-グルクロン酸転移酵素、硫酸転移酵素、アミノ酸N-アシル転移酵素、アセチル転移酵素、メチル転移酵素、及びグルタチオンS-転移酵素が挙げられる。これらの中でシトクロムP450は、動物では肝以外にも腎、肺、消化管、副腎、脳、皮膚等ほとんどすべての臓器に少量ながら存在し、ヒトにおいて医薬品の95%以上の代謝に関与するともいわれており、生体異物代謝における機能の点から特に重要な酵素群である。従って、生体異物代謝酵素としては、シトクロムP450が好ましい。

[0017] シトクロムP450は、多数の酵素タンパク質の総称であり、ヒト肝臓で生体異物の代謝に関わる個々のシトクロムP450の分子種の例としては、CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C（具体的には、CYP2C8、CYP2C9及びCYP2C19）、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A（具体的には、CYP3A4、CYP3A5及びCYP3A7）等が知られており、なかでもCYP1A（CYP1A1又はCYP1A2）、CYP3A（CYP3A4、CYP3A5又はCYP

P 3 A 7) 等、特に C Y P 3 A、とりわけ C Y P 3 A 4 が好ましく用いられる。シトクロム P 4 5 0 の活性発現には、N A D P H-シトクロム P 4 5 0 還元酵素の存在が必須である。

[0018] 肝特異的な生体異物代謝に関わる酵素活性としては、例えば、U D P-グルクロニルトランスフェラーゼ活性、フラビン含有モノオキシゲナーゼ活性、エポキシドヒドラーゼ活性、スルフトランスフェラーゼ活性、グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性、又は N A D P H-シトクロム P 4 5 0 還元酵素及びシトクロム P 4 5 0 等によって構成される混合機能酸化反応 (M F O) 活性 (例えば、メトキシレゾルフィン脱アルキル化活性、エトキシレゾルフィン脱アルキル化活性、ペントキシレゾルフィン脱アルキル化活性、ベンジルオキシレゾルフィン脱アルキル化活性、エトキシクマリン脱アルキル化活性、クマリンヒドロキシル化活性、タキソールヒドロキシル化活性、トルブタミドヒドロキシル化活性、(S)-メフェニトインヒドロキシル化活性、ブフラロールヒドロキシル化活性、ニトロフェノールヒドロキシル化活性やテストステロンヒドロキシル化活性等) 等が挙げられる。なかでも、U D P-グルクロニルトランスフェラーゼ活性、フラビン含有モノオキシゲナーゼ活性、M F O 活性が重要であり、M F O 活性として検出できるシトクロム P 4 5 0 活性は例えば生体異物代謝における機能の点から最も重要な酵素活性と考えられる。

[0019] 生体異物代謝酵素活性の測定は、測定を目的とする酵素に応じて、公知の方法を用いて測定できる。例えば C Y P 3 A 活性を測定する場合、テストステロンからの 6 β -ヒドロキシテストステロン形成の程度を、液体クロマトグラフィによって測定することが可能である。具体的には、例えば、培養肝細胞を適宜洗浄後、100 μ M テストステロンを含有する緩衝液 (ハンクス平衡塩溶液等) 又は培地 (MEM 培地、DMEM 培地、Williams' E 培地、Leibovitz' s L-15 培地、ランフォード培地等) で、37°C にて 2 時間インキュベートする。インキュベーション終了後、培地 10 μ L を液体クロマトグラフィカラムに注入し、6 β -ヒドロキシテス

トステロンの生成量からテストステロンのヒドロキシル化活性を測定できる。
。

[0020] 本発明の評価方法における「生体異物代謝酵素活性の誘導物質」とは、その物質を投与することによって、生体異物代謝酵素の活性化を誘導する物質をいい、本明細書中、単に、誘導物質または「誘導剤」と略記することがある。多くの生体異物代謝酵素は、ある一定の条件下で誘導を受けることが知られており、生体異物代謝酵素の活性化を誘導する限り、誘導物質は特に限定されないが、例としては、CYP1A発現に対するベンゾ[a]ピレン、ベンズ[a]アントラセン、3-メチルコランスレン、ダイオキシン等のいわゆる多環性芳香族化合物の効果、CYP2B発現に対するフェノバルビタール、フェノバルビトンの効果、CYP3A発現に対するリファンピシン、デキサメタゾン、フェニトイン、フェニルブタゾンの効果等がよく知られている（C. G. ギブソンら、新版生体異物の代謝学 講談社、1995年）。他にも、CYP3A活性の誘導物質として、例えばニフェジピン、エファビレンツ、カルバマゼピン、アバシミベ、トログリタゾン、ゲムフィブロジル、ランソプラゾール、モダフィニル、ネビラピン、オメプラゾール、フェノバルビタール、ロフェコキシブ、スルフィンピラゾン、及びトピラメート等が挙げられるが、CYP3A発現に対する誘導効果の高さから、本発明の評価方法では、リファンピシンが好ましく用いられる。

[0021] 培養肝細胞を含む試料を試験化合物で処理する工程が、後述のように、試験化合物を添加した培地中で当該試料をインキュベートすることにより実施される場合、生体異物代謝酵素活性の誘導物質は当該培地に添加して用いられる。

生体異物代謝酵素活性の誘導物質の培地への添加濃度は、生体異物代謝酵素活性を誘導するのに十分な濃度であれば特に制限はなく、誘導物質の種類に応じて好ましい濃度範囲が適宜選択されるが、例えば、リファンピシンの場合、0.05～20 μ M、好ましくは0.1～10 μ Mの濃度で用いることができる。

[0022] 本発明の評価方法における試験化合物としては、特に限定されないが、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性天然物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿等が挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本明細書中、培養肝細胞を含む試料を試験化合物で「処理する」とは、培養肝細胞が試験化合物に曝露される状態におくことを意味し、具体的には、当該処理は、培養肝細胞を含む試料に試験化合物を添加することによって実施される。さらに具体的には、当該処理は、例えば、培養肝細胞を含む試料を、試験化合物を添加した培地中でインキュベートすることにより実施され得る。

培養肝細胞を含む試料を試験化合物で処理する際（具体的には、培養肝細胞を含む試料を、試験化合物を添加した培地中でインキュベートする際）の試験化合物の濃度（試験化合物濃度）は、好ましくは 1 nmol/L から 1 mol/L 程度である。該試験化合物濃度は、2以上であることが好ましく、例えば3、4、5、7、又は10の試験化合物濃度において試料が処理される。試験化合物は生理食塩水やメタノール、ジメチルスルホキシド等の溶剤に溶解した溶液として用いることができ、該溶剤の培地に占める割合は0.1%から1%が好ましい。培養肝細胞を試験化合物に曝露させる時間、即ち、培養肝細胞を含む試料を、試験化合物（あるいはさらに生体異物代謝酵素活性の誘導物質）を添加した培地中でインキュベートする時間は、例えば、1～7日間、好ましくは2～5日間、より好ましくは3日間前後である。また、培養肝細胞を含む試料を試験化合物で処理する工程は、好ましくは、薄層マトリゲルでコーティングされた培養器（好ましくは、96穴プレート）上で行われる。

[0023] 本発明の評価方法において、生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在及び非存在下、培養肝細胞を含む試料（例えば、培養肝細胞）を試験化合物で処理し、得られた各試料中に含まれる該生体異物代謝酵素の活性を測定して、測定された各酵素活性を比較及び解析することによって、試験化合物が生体

異物代謝酵素活性の誘導能を有するかを評価することができる。その結果、
（a）生体異物代謝酵素活性の誘導物質の非存在下において、酵素活性が試験化合物の添加によって上昇した場合、その試験化合物は該酵素の誘導能を有すると判定することができる。一方、（b）生体異物代謝酵素活性の誘導物質の非存在下において、試験化合物の添加による酵素活性の上昇が認められなかった場合であって、（b 1）生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下において、酵素活性が試験化合物の添加によって変化しなかった（例えば、該誘導物質単独の場合と同等の酵素活性の上昇が認められた）場合には、その試験化合物は該酵素生体異物代謝酵素活性の誘導物質の非存在下において試験化合物による酵素活性の誘導能を有しないと判定することができ、（b 2）生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下において、酵素活性が試験化合物の添加によって変化した（例えば、該誘導物質単独の場合と比較して有意に酵素活性が低下した）場合には、その試験化合物は、該酵素の誘導能を有する可能性があるとして判定することができる。

[0024] 本発明の評価方法はまた、培養肝細胞における生体異物代謝酵素の遺伝子発現を測定する工程をさらに含んでいても良い。ここで、遺伝子発現を測定することによって、試験化合物が真に生体異物代謝酵素の誘導能を有するかどうかを評価することができる。特に、酵素活性に基づく評価結果が上記（b 2）の場合となった試験化合物については、遺伝子発現の測定を実施することが望ましい。

遺伝子発現の測定は、培養肝細胞から全RNA画分を調製し、該画分中に含まれる生体異物代謝酵素のmRNAを検出することにより調べることができる。RNA画分の調製は、グアニジン-CsCl超遠心法、AGPC法等公知の手法を用いて行うことができるが、市販のRNA抽出用キット（例：SV 96 Total RNA Isolation Kit; Promega製、RNeasy Mini Kit; QIAGEN製等）を用いることで、微量試料から迅速且つ簡便に高純度の全RNAを調製することができる。RNA画分中の遺伝子転写産物（生体異物代謝酵素のmRNA）を検

出する手段としては、例えば、ハイブリダイゼーション（ノーザンブロット、ドットブロット、DNAチップ（マイクロアレイ）解析等）を用いる方法、あるいはPCR（RT-PCR、競合PCR、リアルタイムPCR等）を用いる方法等が挙げられる。微量試料から迅速且つ簡便に定量性よく遺伝子の発現変動を検出できる点で競合PCRやリアルタイムPCR等の定量的PCR法が好ましい。

実施例

[0025] （材料及び方法）

材料

5バッチの凍結初代ヒト肝細胞（表1）は、Celsis In Vitro Technologies（Baltimore, MD, アメリカ）から入手した。肝細胞プレーティング培地（In Vitro GRO（登録商標）CP培地）（以下、プレーティング培地と略記することがある）、インキュベーション培地（In Vitro GRO（登録商標）HI培地）及びTorpedo Antibiotic Mixは、Celsis In Vitro Technologiesから入手した。薄層マトリゲル、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ポリーラーオールニチン／ラミニン（PLO／LM）及びポリーDーリジン（PDL）コート96穴プレートは、Becton Dickinson（San Jose, CA, アメリカ）から入手した。市販されている全ての化合物は、最高グレードの物を用いた。CYP3A活性とCYP3A4 mRNA量との間の相関を調べる実験で用いた44化合物のうち、市販されていないものは、Takeda Pharmaceutical Company, Ltdによって合成された。

[0026]

[表1]

ドナー情報

Lot No.	Age (yrs)	Sex	Race	Cause of Death	Tobacco		Alcohol		Substance		Serologies			Medical History
					Use		Use		Use		CMV	HepB/C	HIV	
BPB	42	F	C	Head Trauma	N		N		N		+	-	-	None
LMP	38	F	C	Cerebrovascular accident	Y		Y		N		-	-	-	None Listed
UFN	17	M	C	Head Trauma	Y		Y		N		-	-	-	None
ZCA	34	F	C	ICB	Y		N		N		+	-	-	Asthma
LOF	54	F	C	Cardiac Arrest	Y		N		N		-	-	-	Hypertension, High Cholesterol

M, male; F, female; C, Caucasian; ICB, intracerebral bleeding; Y, yes; N, no; +, positive; -, negative.

[0027] 実施例 1

細胞培養及び誘導

凍結初代ヒト肝細胞を、プレーティング培地中で融解し、薄層マトリゲル96穴プレートに、 $0.4 \sim 0.8 \times 10^5$ 生細胞/ウェルの密度にて移した。薄層マトリゲル96穴プレートに移された凍結初代ヒト肝細胞（以下、単に「肝細胞」と略記する場合がある）を24hrインキュベーションした後、プレーティング培地を除去し、Torpedo Antibiotic Mixを追加したインキュベーション培地に交換した。次いで、肝細胞をさらに3日間インキュベートし、培養系を確立した。最初の4日間のコンディショニング培養後、培地を除去し、肝細胞を3日間毎日、 $10 \mu\text{M}$ リファンピシンの存在又は非存在下、試験化合物を含むインキュベーション培地で処理した。 $10 \mu\text{M}$ リファンピシン存在下の試験化合物のウェルを、リファンピシン誘導CYP3A活性に対する試験化合物の阻害作用を予測するのに使用した。全てのインキュベーションを、 37°C 、5% CO_2 を含む水蒸気飽和した雰囲気下で行った。

[0028] CYP3A活性測定

CYP3A活性を、テストステロンからの 6β -ヒドロキシテストステロン形成の程度を、超高速液体クロマトグラフィシステム（UPLC; Waters）によって測定することにより定量した。肝細胞を、 25mM HEPESを含むハンクス平衡塩溶液で2回洗浄した後、 $100 \mu\text{M}$ テストステロンを含む同じ溶液 $150 \mu\text{L}$ で、 37°C にて2時間インキュベートした。インキュベーション終了時、培地 $120 \mu\text{L}$ を、 $10 \mu\text{L}$ の5% HClO_4 を含有する96穴プレートに移し、 $10 \mu\text{L}$ をカラムに注入した。 6β -ヒドロキシテストステロンを標準物質として用いた。UPLC/UV条件は、以下のとおりである：

カラム：Acquity BEH C18, $1.7 \mu\text{m}$, $100 \times 2.1\text{mm}$ I.D. (Waters)

カラム温度： 40°C

移動相：A) 10mM 酢酸アンモニウム/水/アセトニトリル (1 : 8 : 1, v/v)

B) 10 mM 酢酸アンモニウム／アセトニトリル (1 : 9, v / v)

流速 : 0.5 mL / min

グラジエント (Bに対する%) : 25% (0-1 min), 95% (1.01-2.4 min), 25% (2.41-2.5 min)

UV検出 : 250 nm

[0029] リアルタイムqRT-PCR

肝細胞における全RNAを、SV 96 Total RNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI, アメリカ) を用いて単離した。肝細胞におけるCYP3A4のmRNA量を標準的なTaqMan qRT-PCR法を用いて決定した。TaqManプライマー及びプローブ配列を表2に示す。TaqMan one-step RT-PCRを、TaqMan one-step RT-PCR Master Mix試薬キット (Applied Biosystems, Foster City, CA, アメリカ) から調製した最終反応容積10 μ L中2 μ Lの各RNA試料について、ABI Prism 7900HT配列決定システム (Applied Biosystems) を用いて行った。最初のRT工程を30分間、48°Cにて行った後、続いて95°Cまで10分間加熱し、次いで95°Cで15秒間及び60°Cで1分間のサイクルを40サイクル行った。ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼI (HPRT) を、内因性コントロールとして用い、CYP3A4 mRNA量をHPRTの発現によって、標準化した。

[0030]

[表2]

TaqManアッセイにおいて用いられるプライマー及びプローブの配列

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Probe
CYP3A4	TCCTCTATCTATATGGAACCCATTCA	GCCCTTATGGTAGGACAAAATATTC	AATCCAGGGCCACACCTCTGC
HPRT	CAAAGATGGTCAAGGTCGC	CTGGCTTATATCCAAACACTTCG	AGCTTGCTGGTGAAAAGGACCCC

各プローブは、5'－FAM及び3'－TAMRAで合成した。

リファンピシンに対する割合の値（%R I F）及びコントロールに対する倍率（F o l d）を以下に示すように算出した。

$$\%R I F = (\text{化合物活性} - \text{コントロール活性}) / (10 \mu M \text{ リファンピシン活性} - \text{コントロール活性}) \times 100$$

$$F o l d = (\text{化合物活性}) / (\text{コントロール活性})$$

[0032] （結果）

CYP3A酵素活性の誘導に対するプレートの基質の影響

CYP3A誘導アッセイにおける96穴プレートの有用性を評価するために、I型コラーゲンでコーティングした48穴若しくは96穴プレート、又は薄層マトリゲルでコーティングした96穴プレート上で培養した夫々のリファンピシン処理肝細胞間で、CYP3A活性を比較した（図1）。肝細胞を各プレートに蒔き、4日間で培養系を確立させ、次いでさらに3日間、0.1% DMSOの存在下（コントロール細胞）又は種々の濃度のリファンピシンの存在下でインキュベートした。CYP3A活性を、テストステロンの6β-ヒドロキシル化の測定によって決定した。リファンピシンによる用量依存的なCYP3A誘導が、各プレート上で培養された全ての肝細胞において観察されたが、CYP3A活性のレベルは、培養条件によって異なった。48穴、96穴のI型コラーゲンプレート、及び96穴のマトリゲルプレートにおけるコントロール活性はそれぞれ80、50、及び153 pmol/h/10⁶細胞であり、それらのプレートにおいて10 μM リファンピシンで誘導されたCYP3A活性はそれぞれ2243、1200、及び3538 pmol/h/10⁶細胞であった。96穴マトリゲルプレートにおける基礎及び誘導されたCYP3A活性は、48又は96穴I型コラーゲンプレートにおける活性よりも有意に高かった。

図2は、リファンピシン、フェニトイン、及びカルバマゼピンによるCYP3Aの誘導に対する異なるマトリクス条件の影響を示す。CYP3A誘導応答を、薄層マトリゲル（2ロット）、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ラミニン、及びフィブロネクチン等のバイオマテリアルからの細胞外マト

リクスの成分；並びにポリ－Ｌ－オルニチン／ラミニン（ＰＬＯ／ＬＭ）、又はポリ－Ｄ－リジン（ＰＤＬ）等の培養基質上への細胞接着を促進する合成化合物、を含む、異なる種類の基質をもつ９６穴プレートにおいて培養された肝細胞間で比較した。マトリゲルプレートにおける平均基礎ＣＹＰ３Ａ活性は、他のプレートにおける活性と比較して、３．６倍～１０倍高かった。誘導されたＣＹＰ３Ａ活性もまた、これらのプレートの中で、マトリゲルプレートにおいて最も高かった。１０μＭ リファンピシン応答に対して標準化したＣＹＰ３Ａ相対活性も、肝細胞をフェニトイン及びカルバマゼピンで刺激した場合に、前記したプレートの中で、マトリゲルコートプレートにおいて最も高かった（表３）。これらの知見は、試験化合物が弱い誘導剤である場合にも、薄層マトリゲルでのコーティングが、ＣＹＰ３Ａ誘導能の信頼性ある評価に効果的であることを示す。

[0033]

[表3]

異なるマトリクス成分における相対CYP3A誘導応答							
% of Rifampicin							
	Matrigel-1	Matrigel-2	Collagen TypeI	Collagen TypeIV	Laminin	Fibronectin	PLO/LM
30 μ M Phenytoin	37.5	32.9	10.5	11.1	11.6	6.2	8.1
30 μ M Carbamazepin	22.2	23.1	7.7	8.0	17.3	6.8	12.9
データは、10 μ M リファンピシン応答によって標準化した相対活性として表す。							
							PDL
							12.0
							10.8

[0034] 種々の誘導剤及び非誘導剤で処理した凍結初代ヒト肝細胞におけるCYP3Aの誘導応答

本発明の評価方法を検証するため、N. J. Hewitt, et al.; Chem. Biol. In

teract. 168, 51-65 (2007)で報告された新鮮又は凍結初代ヒト肝細胞におけるCYP3A誘導能にしたがって、強力な誘導剤、中程度の誘導剤又は非誘導剤に分類された種々の化合物で細胞を処理した。非誘導剤として用いた化合物は、セレコキシブ、シメチジン、シタロプラム、ファモチジン、フェキサソフェナジン、フルボキサミン、ロキソプロフェン、ミダゾラム、及びリスペリドンであった。中程度の誘導剤として用いた化合物は、ゲムフィブロジル、ランソプラゾール、モダフィニル、ネビラピン、オメプラゾール、フェノバルビタール、フェニトイン、ロフェコキシブ、スルフィンピラゾン、及びトピラメートであった。強力な誘導剤として用いた化合物は、アバシミベ、カルバマゼピン、エファビレンツ、ニフェジピン、リファンピシン、及びトログリタゾンであった。各化合物を0.1 μ M、1 μ M、及び10 μ Mで検査した。凍結初代肝細胞を3日間処理し、評価項目としてCYP3A活性を測定した。CYP3A誘導能を、10 μ M リファンピシン応答の割合として表す。0.1 μ Mの濃度では、リファンピシン及びアバシミベを含むわずかな化合物のみが、CYP3A活性を誘導した（図3）。これらの化合物は、1 μ Mでは、CYP3A活性の著しい増加を示した。ニフェジピン、エファビレンツ、及びトログリタゾンもまた、1 μ MでCYP3A活性を誘導した。10 μ Mの濃度では、全ての強力な誘導剤及び大部分の中程度の誘導剤が、CYP3A活性の増加をもたらした。これに対し、セレコキシブを除く全ての非誘導剤が、10 μ MでCYP3A誘導をもたらさなかった。

[0035] リファンピシン誘導性のCYP3A活性に対する化合物の阻害作用の評価の有用性

本発明の評価方法を用いて、凍結初代ヒト肝細胞におけるさらなる化合物のCYP3A誘導の濃度-応答の研究を行った。試験化合物のうち、フェノバルビタール及びカルバマゼピンは、CYP3A活性の標準的な濃度依存性のアップレギュレーションを示した（図4A）。これに対し、アバシミベ及びエファビレンツは、ベル型の濃度-応答曲線を示した（図4B）。これらの化合物においては、CYP3A活性によって誘導能をスクリーニングする

場合に、CYP3A誘導を過小評価するリスクがある。そのような過小評価を防ぐために、本発明の評価方法では、アッセイのコントロールとして、リファンピシン誘導性のCYP3A活性に対する試験化合物の阻害作用を評価した。リファンピシンと、いくつかの濃度の試験化合物の存在下肝細胞を3日間培養し、誘導されたCYP3A活性を決定した。標準的な濃度依存性を示した化合物の場合、リファンピシン誘導性のCYP3A活性は、試験化合物の全濃度範囲において、変化しなかった（図4A）。しかし、化合物が非定型のベル型の濃度-応答曲線を示した場合、リファンピシンによって誘導されたCYP3A活性は、より高い化合物濃度においては減弱し、それと共に、試験化合物による誘導も減少した（図4B）。

リトナビルは、周知のCYP3Aの誘導剤かつ機序に基づく阻害剤であるが（E. L. LeCluyse, et al.; Eur. J. Pharm. Sci. 13, 343-368 (2001)）、リトナビルのCYP3A誘導能は、CYP3A活性の測定によっては検出できず、リファンピシン存在下ではリトナビル濃度が増加するとともにリファンピシン誘導性のCYP3A活性が減弱した（図5A）。しかし、同一の肝細胞におけるCYP3A4 mRNA量の測定によっては、リトナビルの濃度依存的なCYP3A4 mRNA量の増加によってリトナビルのCYP3A4誘導能が確認された（図5B）。リトナビルと共培養したリファンピシンによって誘導されたCYP3A4 mRNA量は、高リトナビル濃度においても減弱しなかった。

これらの結果により、本発明の評価方法は、CYP3A誘導能の過小評価を防ぐことを可能とすることが示された。

[0036] 誘導されたCYP3A活性とCYP3A4 mRNA量との間の相関を確認するために、44の化合物をいくつかの濃度で、10 μ M リファンピシンの存在下又は非存在下で検査した。図6は、試験化合物についての、誘導されたCYP3A活性とCYP3A4 mRNA量との間の相関プロットを示す。この図において、各記号は、試験化合物と共培養した場合の、リファンピシン誘導性CYP3A活性の残留率の程度を表す。試験化合物によって

誘導されたCYP3A活性及びCYP3A4 mRNA量は、リファンピシン誘導性のCYP3A活性の残留率が80%を超える場合には、全て良く相関した。しかし、リファンピシン誘導性のCYP3A活性が30%未満に抑制された場合、試験化合物は潜在的に阻害作用を有し、試験化合物のCYP誘導能は、CYP3A活性によって検出されなかった一方で、CYP3A4 mRNAの発現は、化合物によって誘導された。

産業上の利用可能性

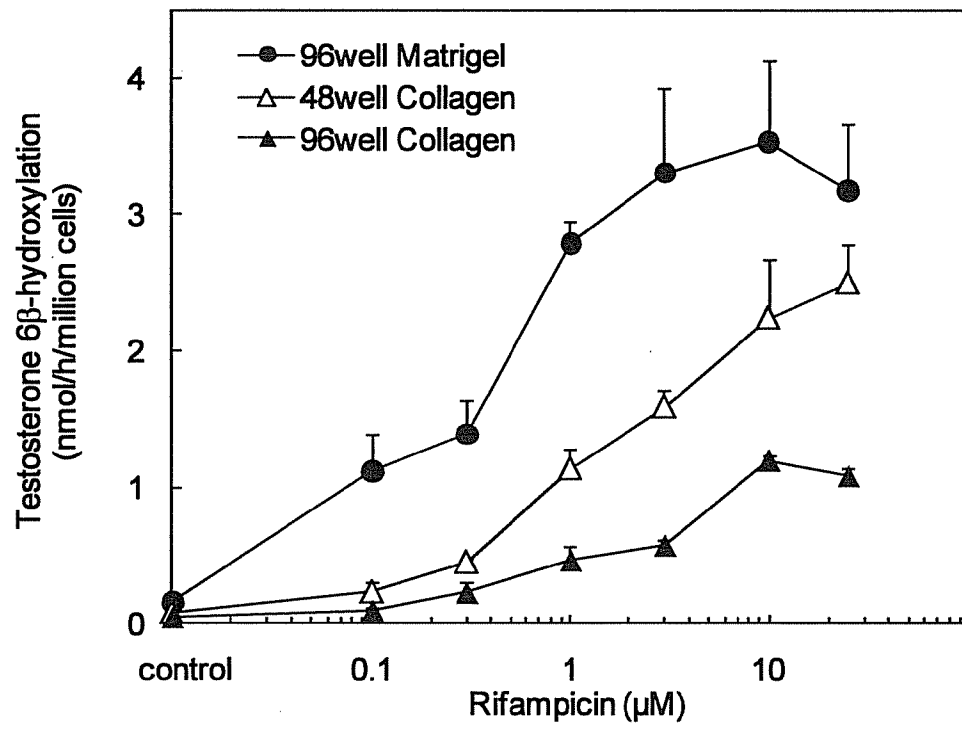
- [0037] 本発明の評価方法は、早期探索段階における医薬候補化合物の生体異物代謝酵素活性の誘導能評価において、試験化合物が細胞傷害性又は機序に基づく阻害作用等を有する場合に起こる誘導能の過小評価を防ぐことを可能とし、特に真に誘導能のない化合物を探索するために有用である。
- [0038] 本出願は、2009年8月31日付で日本国に出願された特願2009-201043を基礎としており、その内容は全て本明細書に包含される。

請求の範囲

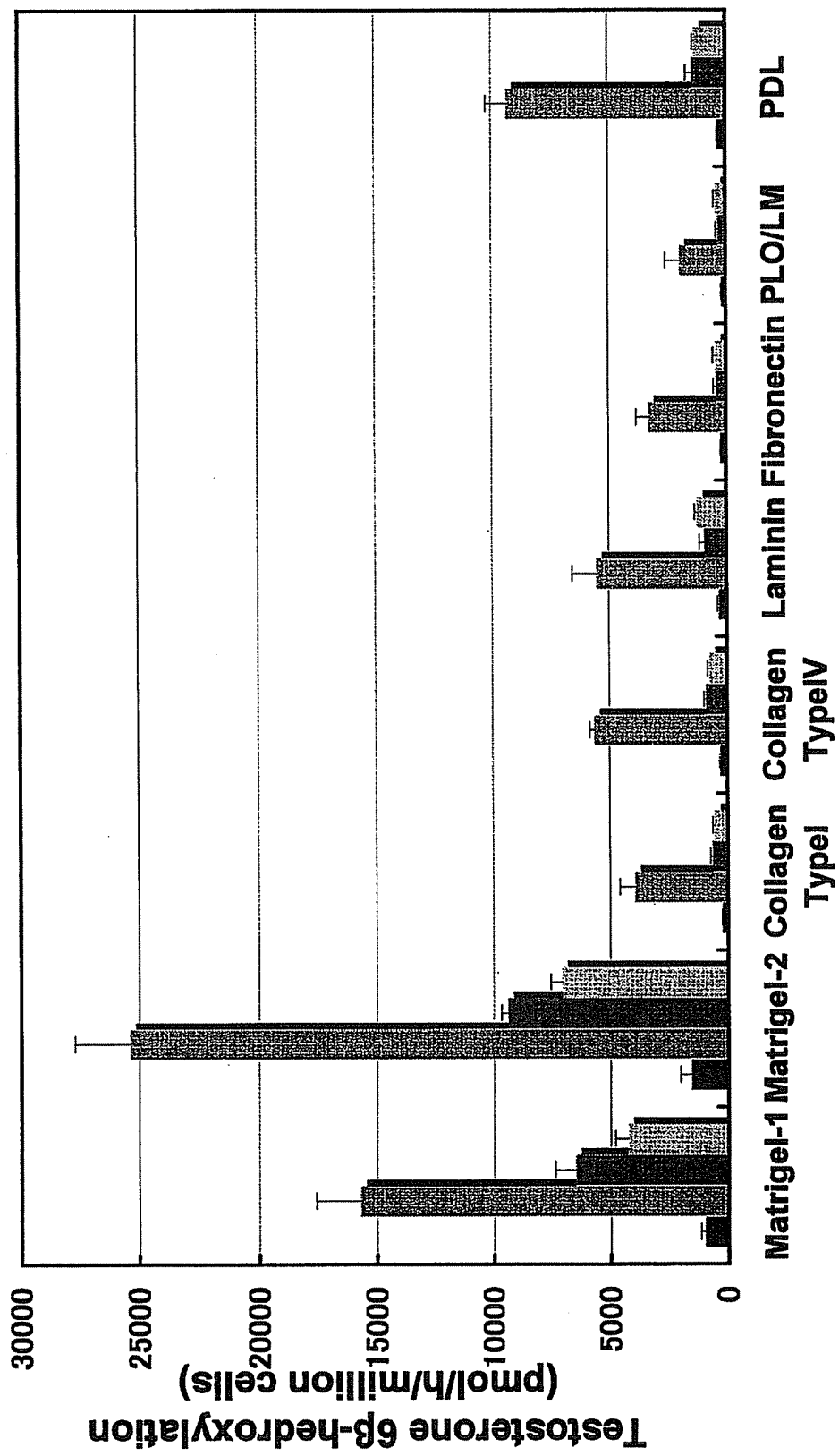
- [請求項1] 以下の工程：
- （a）培養肝細胞を含む試料を二分し、一方を生体異物代謝酵素活性の誘導物質の存在下、試験化合物で処理し、他方を生体異物代謝酵素活性の誘導物質の非存在下、試験化合物で処理する工程、
- （b）工程（a）で得られた各試料中に含まれる該生体異物代謝酵素の活性を測定する工程、及び
- （c）工程（b）で測定された各酵素活性を比較し解析する工程を含むことを特徴とする、試験化合物の生体異物代謝酵素誘導能の評価方法。
- [請求項2] 工程（a）における処理が、薄層マトリゲルでコーティングされた培養器上で行われることを特徴とする、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 培養器が96穴プレートである、請求項2記載の方法。
- [請求項4] 工程（a）における処理が、2以上の試験化合物濃度において行われる、請求項1記載の方法。
- [請求項5] 生体異物代謝酵素が、シトクロムP450である、請求項1記載の方法。
- [請求項6] シトクロムP450が、CYP3Aである、請求項5記載の方法。
- [請求項7] シトクロムP450がCYP3A4である、請求項5記載の方法。
- [請求項8] 生体異物代謝酵素活性の誘導物質が、リファンピシン、ニフェジピン、エファビレンツ、カルバマゼピン、アバシミベ、トログリタゾン、ゲムフィブロジル、ランソプラゾール、モダフィニル、ネビラピン、オメプラゾール、フェノバルビタール、フェニトイン、ロフェコキシブ、スルフィンピラゾン、又はトピラメートである、請求項1記載の方法。
- [請求項9] 生体異物代謝酵素活性の誘導物質が、リファンピシンである、請求項1記載の方法。
- [請求項10] 培養肝細胞が哺乳動物由来肝細胞である、請求項1記載の方法。

- [請求項11] 培養肝細胞がヒト肝細胞である、請求項 1 記載の方法。
- [請求項12] 培養肝細胞が凍結初代ヒト肝細胞である、請求項 1 記載の方法。
- [請求項13] 培養肝細胞における該生体異物代謝酵素の遺伝子発現を測定する工程をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

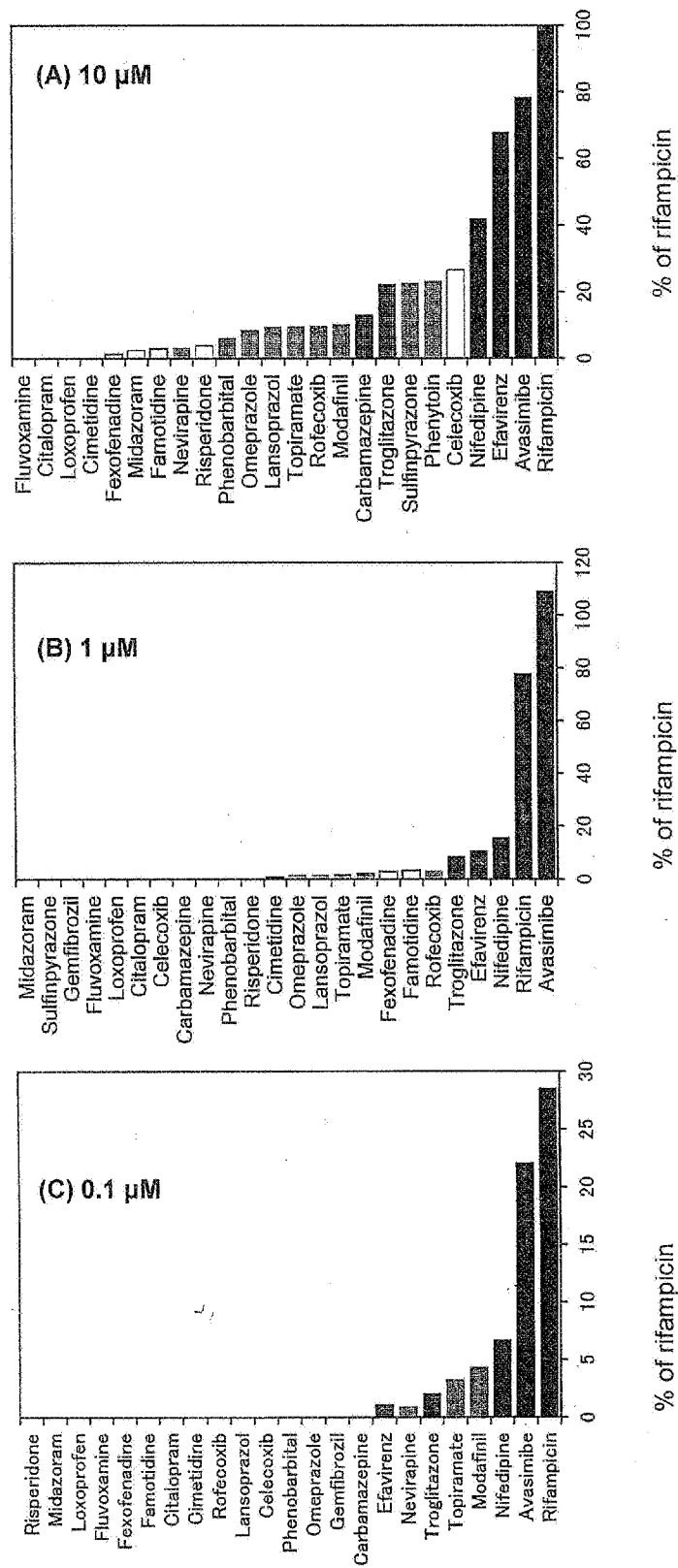
[図1]



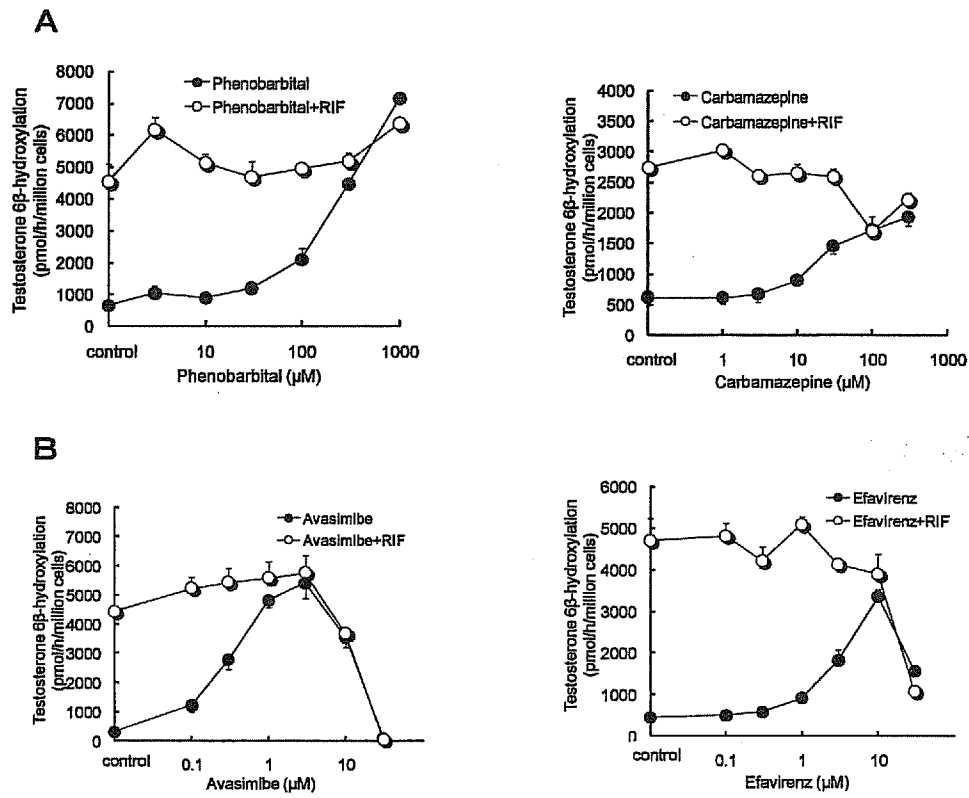
[図2]



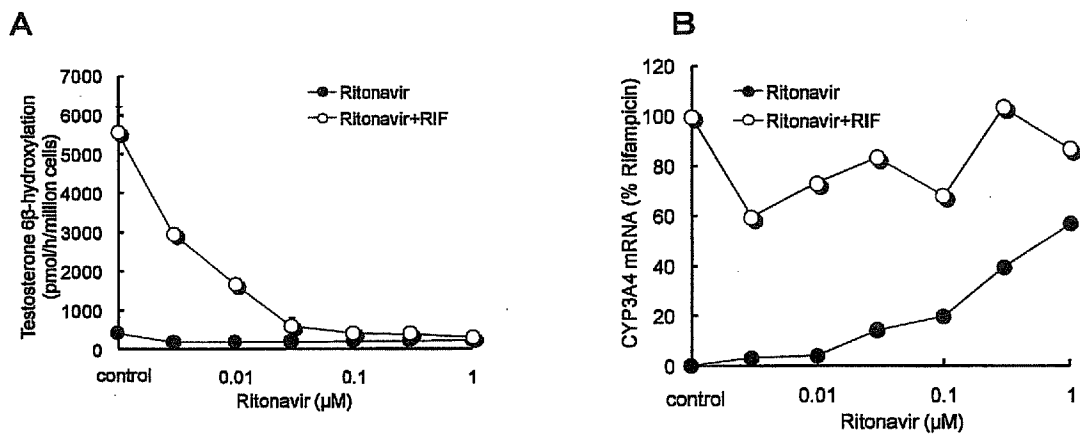
[図3]



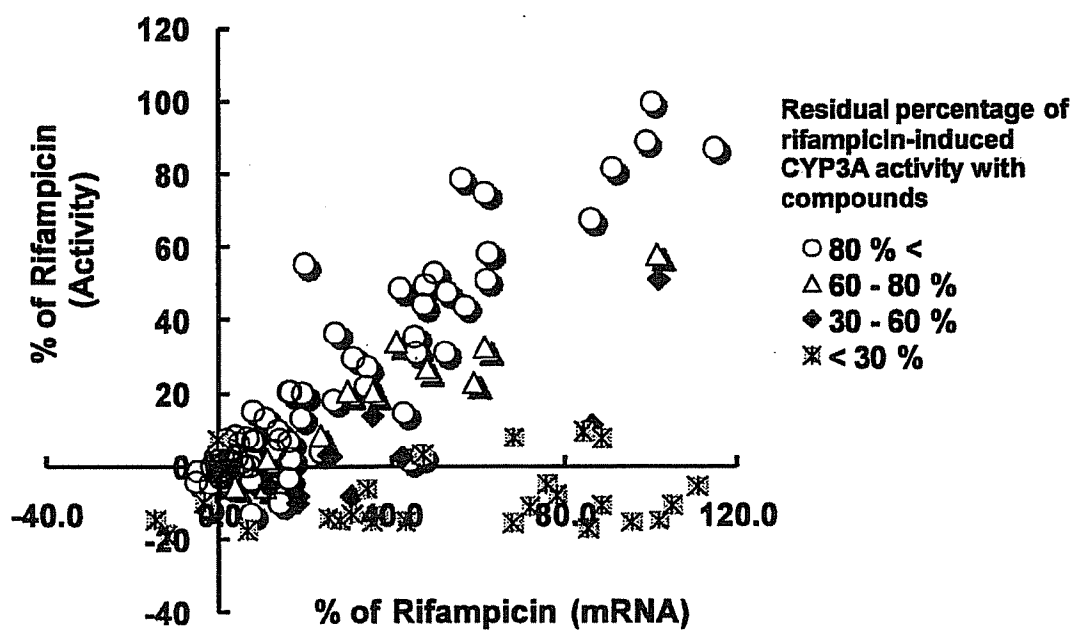
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/064747

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

C12Q1/00-3/00, C12N15/00-15/90

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

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

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII), Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yasuhiro YAMADA, "Soyaku ni Okeru Hito Kansaibo no Hitsuyosei to Shihan Hito Kansaibo no Mondaiten", Organ biology. 2006, vol.13, no.2, pages 119 to 135	1-13
A	Yoko EJIRI et al., "Iyaku hin Kaihatsu no Tameno Shinki Hito Kansaibo Baiyokei no Kochiku", HAB Kenkyu Kiko Gakujutsu Nenkai Program Yoshishu, 22 May 2009 (22.05.2009), vol.16, page 63	1-13



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

26 October, 2010 (26.10.10)

Date of mailing of the international search report

09 November, 2010 (09.11.10)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/26(2006.01)i, C12Q1/48(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n												
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（I P C）） Int.Cl. C12Q1/00-3/00, C12N15/00-15/90												
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												
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(JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース												
C. 関連すると認められる文献 <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</td> <td>山田泰弘, 創薬におけるヒト肝細胞の必要性和市販ヒト肝細胞の問題点, Organ biology. 2006, Vol.13, No.2, p.119-135</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>江尻洋子、外 4 名, 医薬品開発のための新規ヒト肝細胞培養系の構築, HAB 研究機構学術年会プログラム・要旨集. 2009.05.22, Vol.16, p.63</td> <td>1-13</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	山田泰弘, 創薬におけるヒト肝細胞の必要性和市販ヒト肝細胞の問題点, Organ biology. 2006, Vol.13, No.2, p.119-135	1-13	A	江尻洋子、外 4 名, 医薬品開発のための新規ヒト肝細胞培養系の構築, HAB 研究機構学術年会プログラム・要旨集. 2009.05.22, Vol.16, p.63	1-13
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	山田泰弘, 創薬におけるヒト肝細胞の必要性和市販ヒト肝細胞の問題点, Organ biology. 2006, Vol.13, No.2, p.119-135	1-13										
A	江尻洋子、外 4 名, 医薬品開発のための新規ヒト肝細胞培養系の構築, HAB 研究機構学術年会プログラム・要旨集. 2009.05.22, Vol.16, p.63	1-13										
☐ 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 2 6 . 1 0 . 2 0 1 0		国際調査報告の発送日 0 9 . 1 1 . 2 0 1 0										
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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） 清水 晋治 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8										