

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-36613

(P2014-36613A)

(43) 公開日 平成26年2月27日(2014.2.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2012-180489 (P2012-180489)	(71) 出願人	305060567
(22) 出願日	平成24年8月16日 (2012.8.16)		国立大学法人富山大学
			富山県富山市五福3190
		(72) 発明者	安東 嗣修
			富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷
			キャンパス内
		(72) 発明者	鈴木 一成
			富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷
			キャンパス内
		(72) 発明者	倉石 泰
			富山県富山市杉谷2630 富山大学杉谷
			キャンパス内
		Fターム(参考)	2G045 AA29

(54) 【発明の名称】 胆汁うっ滞性障害のモデル動物およびその作製方法

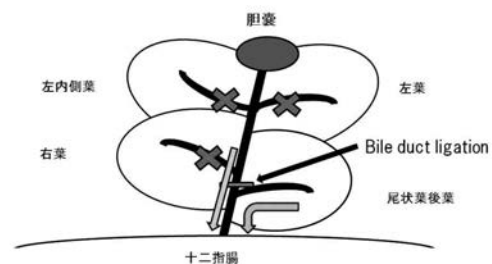
(57) 【要約】

【課題】胆汁うっ滞性肝障害のモデル動物およびその作製方法を提供する。

【解決手段】

肝臓の複数の胆管の内、1本のみを残存する処置を施し、胆汁を排泄させることで、胆汁うっ滞性肝障害のモデル動物を作製する。この胆汁うっ滞性肝障害動物は、長期に生存し、痒み等の症状が発現する。このモデル動物は慢性肝疾患のモデル動物として有用である。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程で作製される胆汁うっ滞性障害のモデル動物

- (1) ヒトを除く動物を麻酔下に開腹する
- (2) 胆管の一つを残し、他の全ての胆管の集合部での胆汁の流れを止める
- (3) 閉腹し、覚醒させる。
- (4) 自発的搔痒反応が観察されるまで飼育する。

【請求項 2】

モデル動物がげっ歯類である請求項 1 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物

【請求項 3】

げっ歯類がマウスである請求項 2 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物

【請求項 4】

胆管の一つが、総胆管の十二指腸への開口部に最も近い胆管である請求項 1 ～ 3 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物

【請求項 5】

集合部での胆汁の流れを止める手段が結紮である請求項 1 ～ 4 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物を用いる胆汁うっ滞性障害の治療薬のスクリーニング方法

【請求項 7】

請求項 1 ～ 5 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物を用いる胆汁うっ滞性障害の治療薬の評価方法

【請求項 8】

以下の工程で示される胆汁うっ滞性障害のモデル動物の作製方法

- (1) ヒトを除く動物を麻酔下に開腹する。
- (2) 胆管の一つを残し、他の全ての胆管の集合部での胆汁の流れを止める
- (3) 閉腹し、覚醒させる。
- (4) 自発的搔痒反応が観察されるまで飼育する。

【請求項 9】

モデル動物がげっ歯類である請求項 8 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物の作製方法

【請求項 10】

げっ歯類がマウスである請求項 9 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物の作製方法

【請求項 11】

胆管の一つが、総胆管の十二指腸への開口部に最も近い胆管である請求項 8 ～ 10 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物の作製方法

【請求項 12】

集合部での胆汁の流れを止める手段が結紮である請求項 8 ～ 11 に記載の胆汁うっ滞性障害のモデル動物の作製方法

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、胆汁うっ滞性障害のモデル動物およびその作製方法並びに胆汁うっ滞性障害の治療薬のスクリーニング方法および評価方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

胆汁は、肝臓で生成される胆汁酸および胆汁色素を含む黄褐色の液体である。胆汁は、胆道系を通過して十二指腸に排泄されるが、この経路のどこかで胆汁の流れが阻害されている状態が胆汁うっ滞である。その原因として、肝炎、薬物性肝障害、原発性胆汁性肝硬変などが知られている。胆汁うっ滞の特徴的な症状は、黄疸、尿の色が濃くなる、便の色が薄

10

20

30

40

50

くなる、全身の痒みである。また、胆汁の排泄不足は、食物脂肪、カルシウム、ビタミンD、ビタミンKが吸収できないなどの障害が生じる。

【0003】

胆汁うっ滞の患者の70%以上が痒みを訴える(非特許文献1)。痒みの原因として、中枢μ-オピオイド受容体の減少(非特許文献2)、Autotaxinの活性化とリゾホスファチジン酸の増加(非特許文献3)などが提唱されているが詳細は不明である。

【0004】

一方、胆汁うっ滞の動物のモデルとして、総胆管を切断したラット(非特許文献4)、総胆管を全部または部分結紮マウス(非特許文献5)が知られている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Rolland E et al.,Hepatology, 10(1), 1-7, 1989

【非特許文献2】Bergasa NV et al, J.Hepatol., 15, 220-224,1992

【非特許文献3】Kremer AE et al.,Gastroenterology, 139, 1008-1018, 2010

【非特許文献4】Swain MG et al.,Gastroenterology.103(2), 630-635, 1992.

【非特許文献5】Heinrich S et al.,Surgery. 149(3), 445-51, 2011.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

胆汁うっ滞性肝障害の患者の多くが全身性の痒みを訴える。痒みの原因として、胆汁酸、オピオイドペプチドやリゾホスファチジン酸などの関与が考えられてきたが、痒みの発生機序の詳細は不明である。また、胆汁うっ滞性肝障害の患者の一部でオピオイド受容体拮抗薬が痒みを軽減することが報告されているが、使用時に禁断症状様の症状を示す場合がある。

【0007】

胆汁うっ滞性肝障害の痒みの発生機序の解析及び禁断症状様症状を起こさずに痒みを軽減する薬物の薬効評価には、胆汁うっ滞性肝障害の病態を維持した状態で長期生存し、痒みを示す動物モデルの作出が課題となる。上記の胆汁うっ滞の動物のモデルは、いずれも急性胆汁うっ滞の動物モデルある。それらの動物モデルに関して、2週間までの血液成分の変化が報告されているものの、胆汁うっ滞患者の主症状の一つである痒みに関する報告はない。

【課題を解決するための手段】

【0008】

肝臓は、数枚の葉と呼ばれる単位で分葉されている。それぞれの葉から胆管は出おり、その胆管の集結して1本になったものが総胆管である。本発明者らは、肝臓と胆管の構成・構造に着目し、総胆管を結紮せずに十二指腸の入り口に近い胆管の1本からの胆汁の排泄を可能にし、その他の胆管からの胆汁の排泄を不能にすることで、マウスの生存率を上げることに成功した。このマウスの自発行動の観察により痒み反応である掻き動作を評価することで、胆汁うっ滞性の痒みを動物で評価できることを見出し、本発明を完成するに至った。

以下に本発明を詳細に説明する。

【0009】

本発明は、ヒトを除く動物であって、麻酔下に開腹され、胆管の一つを残し、他の全ての胆管の集合部の胆汁の流れを止められ、開腹部を閉じた後、さらに自発的掻痒反応が観察されるまで飼育されることを特徴とする胆汁うっ滞性肝障害の病態モデル動物である。

また、本発明は、ヒトを除く動物を、麻酔下に開腹し、胆管の一つを残し、他の全ての胆管の集合部の胆汁の流れを止め、開腹部を閉じた後、さらに自発的掻痒反応が観察されるまで飼育することを特徴とするうっ滞性肝障害の病態モデル動物の作製方法である。

また、本発明は上記のうっ滞性肝障害の病態モデル動物を用いるうっ滞性肝障害を治療す

10

20

30

40

50

る薬物のスクリーニング方法および評価方法である。

【0010】

本発明の動物モデルは以下の方法で作製することができる。

- (1) ヒトを除く動物を麻酔下に開腹する。
- (2) 胆管の一つを残し、他の全ての胆管の集合部での胆汁の流れを止める。
- (3) 閉腹し、覚醒させる。
- (4) 自発的搔痒反応が観察されるまで飼育する。

【0011】

本発明に使用される動物は、ヒト以外であれば特に限定されないが、マウス、ラット、モルモットなどのげっ歯類が好ましい。また、例えば、動物がマウスの場合、本発明に使用されるマウスは、処置開始時5~7週齢の雄が好ましい。

10

【0012】

本発明に使用される動物の開腹手術は、通常公知方法を用いればよいが、例えば、ペントバルビタールなどの麻酔薬を投与し、立ち直り反射の消失、足指や尾への刺激に対する反応の消失を確かめた後、腹部を開腹し、肝臓および胆管を露出させる。

【0013】

次いで、露出した複数の胆管の内、それらの胆管の集合部（総胆管）の十二指腸側の出口に最も近い胆管の1本を残し、それ以外の胆管の集合部における胆汁の流れを止める。胆汁の流れを止める手段として、例えば、胆管の結紮、胆管の梗塞が挙げられるが、胆管を結紮することが好ましい。さらに、結紮した集合部を切断してもよい。次いで、閉腹し覚醒させる。

20

【0014】

次いで、術後経過を観察する。飼育に関して、特別な処置は必要としない。

【0015】

動物がマウスの場合、術後およそ4週間で、自発搔痒反応として後肢による全身への掻き動作などが観察できる。

【発明の効果】

【0016】

本発明の動物モデルは、長期生存が可能であることから慢性の胆汁うっ滞の動物モデル、特に、胆汁うっ滞性搔痒の動物モデルとして、その発生機序の解析や治療薬のスクリーニングにも応用が可能である。

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】従来の胆管結紮のイメージ図である。Aの部分結紮しても生存率は上がるが、黄疸は認められない。Bの部分をも、部分結紮、完全結紮、あるいは切断すると、生存率が低い（完全結紮あるいは切断で数日、部分結紮で2週間程度）

【図2】本発明方法の胆管結紮のイメージ図である。

【図3】本発明の胆管結紮の写真である。エバンスブルーにより胆汁漏れの確認を行っている。

【図4】本発明方法で処置したマウス（BDL）と偽手術したマウス（sham）の血中ビリルビン濃度推移を示す図である。

40

【図5】本発明方法で処置したマウス（BDL）と偽手術したマウス（sham）の肝臓の組織像である。丸く囲んだ部分は胆管周囲の線維化を、クサビは小葉間胆管の増生を示す。

【図6】本発明方法で処置したマウス（BDL）と偽手術したマウス（sham）の自発的搔き動作の推移を示す図である。

【図7】自発的搔き動作に対する薬物の効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明を実施例で説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

50

実施例 1

< 胆汁うっ滞マウスの作製 >

マウス（ICR, 5～7週齢，雄性）をペントバルビタール（80mg/kg、腹腔内注射）麻酔下、十二指腸に近い胆管を胆汁排泄機能を保持した状態で一つの残し、ほかのすべての胆管の集合部を結紮（ネスコスーチャー絹縫合系、7-0）する。その後、開腹部を縫合（ネスコスーチャー絹縫合系、7-0）閉腹し、縫合部をイソジンで消毒し、飼育する。手術後、最初の数日間は黄疸が観察されるが、その後消失し、約4週間飼育後より、自発的搔痒反応（後肢による全身への掻き動作）が観察される。

【0019】

< 生化学検査および自発的搔き動作 >

実施例1の方法で作製した胆汁うっ滞マウスと健常マウス（偽手術したマウス）の血液生化学的検査と自発的搔き動作の結果を、表1（術後1週間）と表2（術後6週間）に示す。

【0020】

【表1】

項目	単位	血清中の濃度	
		術後1週間 (n=6)	
		健常マウス	胆汁うっ滞マウス
総タンパク (TP)	g/dL	4.7 ± 0.1	5.0 ± 0.1*
アルブミン (ALB)	g/dL	2.1 ± 0.0	2.1 ± 0.0
総ビリルビン (T-BIL)	mg/dL	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)	IU/L	73.8 ± 2.5	393.0 ± 114.0*
グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)	IU/L	27.7 ± 1.8	351.8 ± 64.6*
アルカリホスファターゼ (ALP)	IU/L	510.8 ± 33.8	1921.0 ± 461.8*
尿素窒素 (BUN)	mg/dL	25.7 ± 1.2	22.5 ± 0.4
総コレステロール (TCHO)	mg/dL	119.8 ± 1.4	120.3 ± 4.2
中性脂肪 (TG)	mg/dL	56.7 ± 7.5	59.2 ± 6.8
血糖 (GLU)	mg/dL	218.2 ± 9.2	159.8 ± 9.9*
総胆汁酸 (TBA)	mmol/L	1.4 ± 0.1	35.5 ± 10.0*
Scratching	scratch bouts/h	46.4 ± 6.7	59.8 ± 14.7

Values represent the mean and S.E.M n=6. *p<0.05 compared to healthy mice

【0021】

【表2】

項目	単位	血清中の濃度	
		術後6週間 (n=11)	
		健常マウス	胆汁うっ滞マウス
総タンパク (TP)	g/dL	4.7 ± 0.1	4.6 ± 0.1
アルブミン (ALB)	g/dL	2.0 ± 0.0	1.9 ± 0.0
総ビリルビン (T-BIL)	mg/dL	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)	IU/L	122.2 ± 15.9	122.4 ± 17.0
グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)	IU/L	61.8 ± 10.0	59.1 ± 11.6
アルカリホスファターゼ (ALP)	IU/L	234.1 ± 25.9	257.8 ± 37.3
尿素窒素 (BUN)	mg/dL	28.5 ± 1.2	30.0 ± 1.7
総コレステロール (TCHO)	mg/dL	101.4 ± 5.5	106.0 ± 5.6
中性脂肪 (TG)	mg/dL	50.4 ± 7.5	42.7 ± 4.5
血糖 (GLU)	mg/dL	112.2 ± 5.2	115.3 ± 6.5
総胆汁酸 (TBA)	mmol/L	1.1 ± 0.1	2.6 ± 0.7*
Scratching	scratch bouts/h	39.9 ± 4.1	138.8 ± 12.9*

Values represent the mean and S.E.M n=11. *p<0.05 compared to healthy mice

【0022】

実施例 2

< 自発的搔き動作に対する薬物の効果 >

実施例1で作製した胆汁うっ滞マウスを使用し、μオピオイド受容体拮抗薬、H₁ヒスタミン受容体拮抗薬、オピオイド受容体作動薬について、自発的搔き動作を観察した。その結果を図7に示す。

10

20

30

40

50

(A) μ オピオイド受容体拮抗薬

μ オピオイド受容体拮抗薬ナロキソン (naloxone (1mg/kg)) や溶媒 (vehicle(Saline)) は、行動観察の15分前に皮下注射した。

(B) H_1 ヒスタミン受容体拮抗薬

H_1 ヒスタミン受容体拮抗薬テルフェナジン (terfenadine (30mg/kg)) や溶媒 (vehicle (0.5% Carboxymethyl cellulose)) は、行動観察の30分前に経口投与した。

(C) オピオイド受容体作動薬

オピオイド受容体作動薬U50488 (3mg/kg) や溶媒 (vehicle(water)) は、行動観察の30分前に経口投与した。

【 0 0 2 3 】

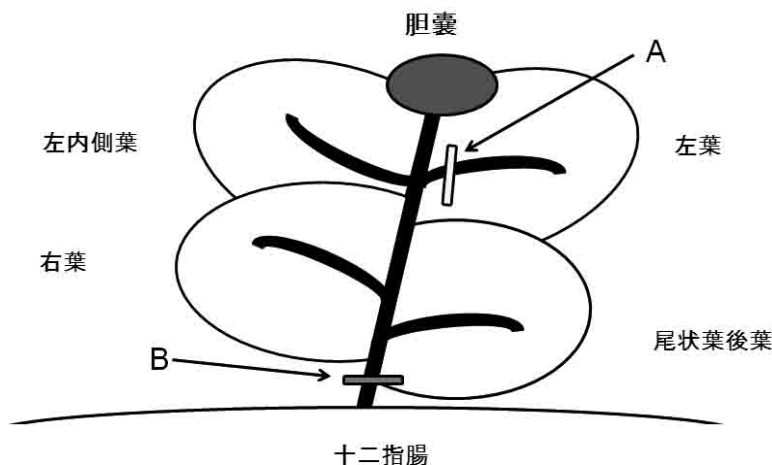
本発明の胆汁うっ滞マウスでの痒み反応は、ヒトの胆汁うっ滞の患者の痒みに有用なオピオイド拮抗薬や δ -オピオイド作動薬により抑制されるが、一般的なかゆみの抑制薬である H_1 ヒスタミン受容体拮抗薬では抑制されない。

【産業上の利用可能性】

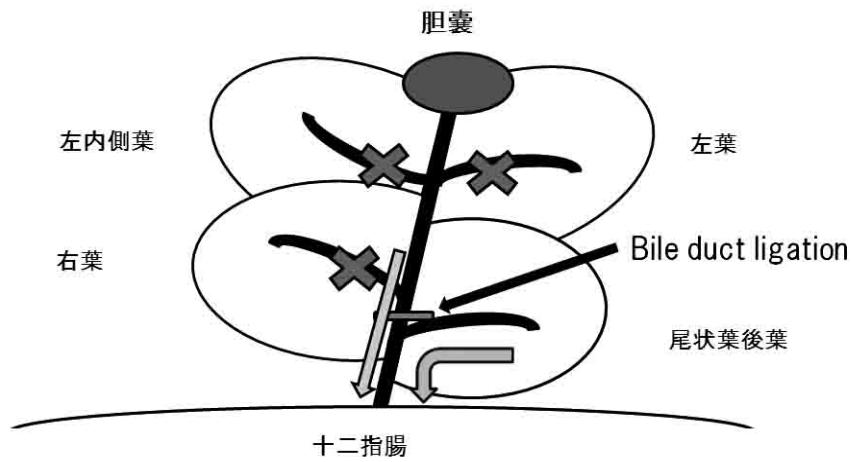
【 0 0 2 4 】

本発明の方法は、胆汁うっ滞の肝障害の動物モデルの作製法として有用である。特に、既存の痒み止めでは効果が認められない胆汁うっ滞による痒みの動物モデルの作製法として有用である。また、本発明の動物モデルは、胆汁うっ滞の肝障害や慢性肝疾患を治療するための新規な化合物のスクリーニングや評価をするために有用である。

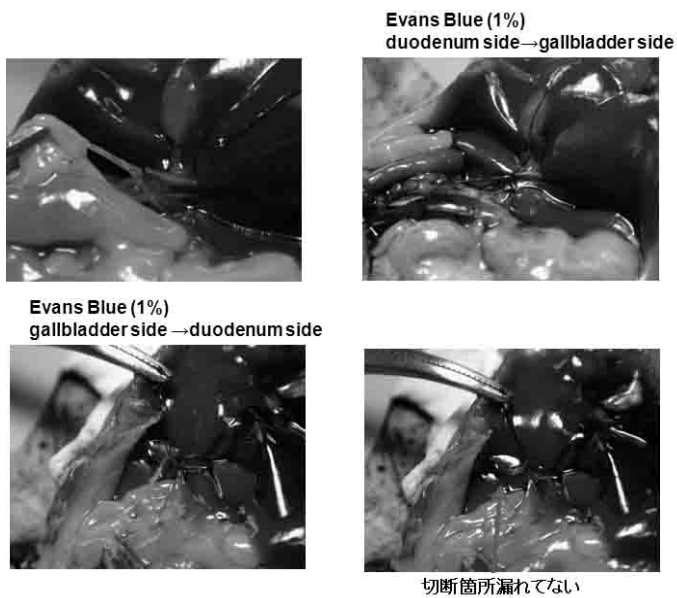
【 図 1 】



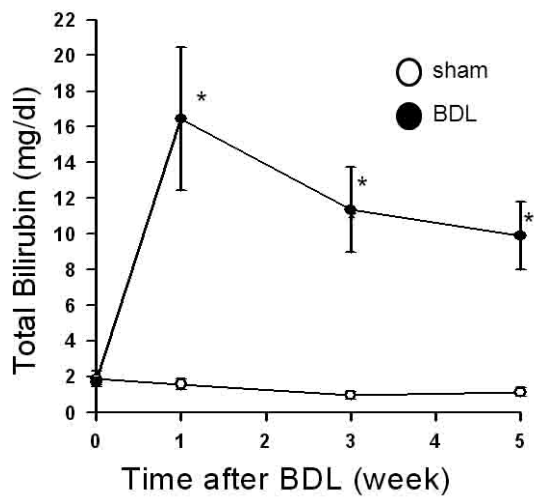
【 図 2 】



【 図 3 】



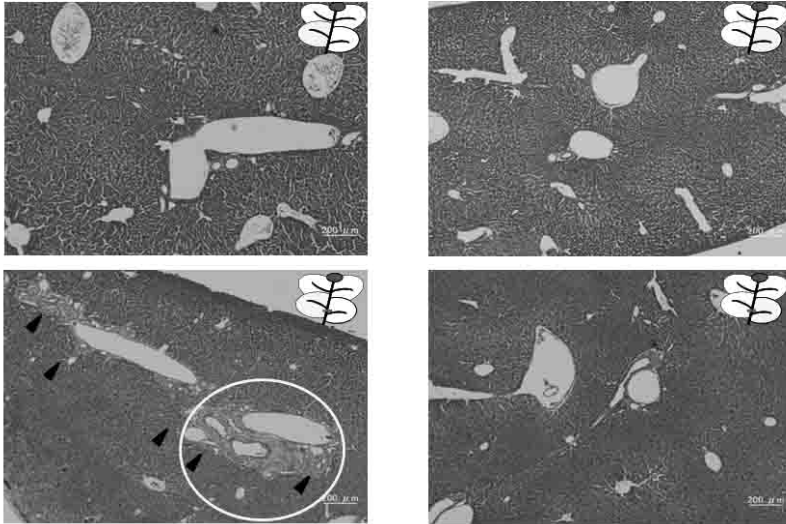
【 図 4 】



Values represent the mean and S.E.M
n=10. * $p < 0.05$ compared to the sham

【 図 5 】

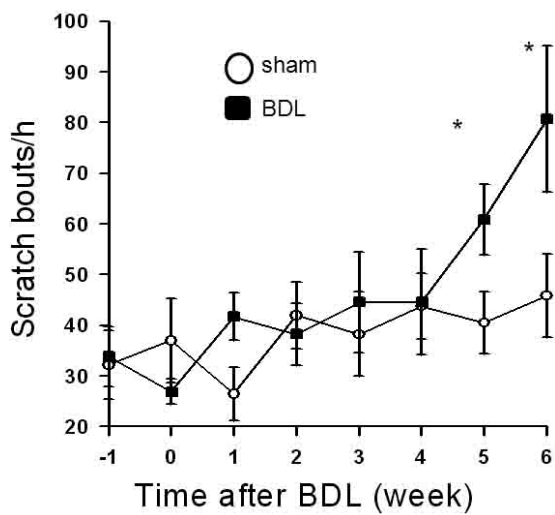
sham



BDL

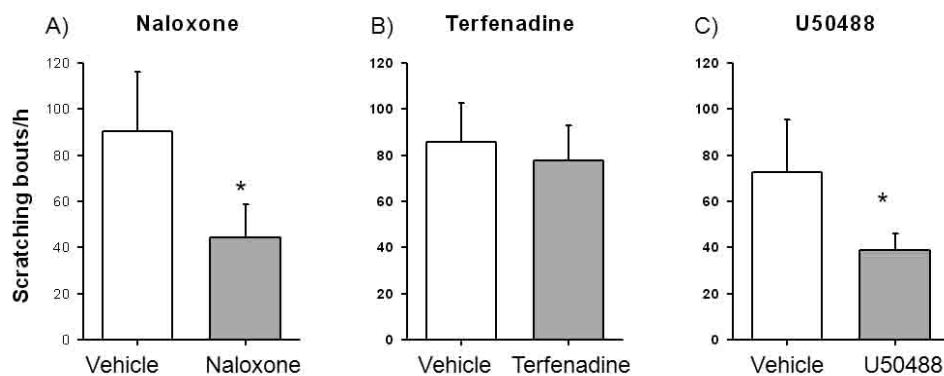
livers were taken after 6 weeks passed from BDL.
livers stained with H&E.

【 図 6 】



Values represent the mean and S.E.M
n=12. * $p < 0.05$ compared to the sham

【 図 7 】



Values represent the mean and S.E.M n=6. * $p < 0.05$ compared to the Vehicle