

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4829496号
(P4829496)

(45) 発行日 平成23年12月7日(2011.12.7)

(24) 登録日 平成23年9月22日(2011.9.22)

(51) Int.Cl.

G 01 N 33/48 (2006.01)
C 12 M 1/34 (2006.01)
C 12 Q 1/02 (2006.01)

F 1

G 01 N 33/48
C 12 M 1/34
C 12 Q 1/02

Z

E

請求項の数 19 (全 64 頁)

(21) 出願番号 特願2004-514009 (P2004-514009)
 (86) (22) 出願日 平成15年6月16日 (2003.6.16)
 (65) 公表番号 特表2005-534899 (P2005-534899A)
 (43) 公表日 平成17年11月17日 (2005.11.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2003/002309
 (87) 國際公開番号 WO2003/107270
 (87) 國際公開日 平成15年12月24日 (2003.12.24)
 審査請求日 平成18年6月9日 (2006.6.9)
 (31) 優先権主張番号 0213786.7
 (32) 優先日 平成14年6月14日 (2002.6.14)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 0213895.6
 (32) 優先日 平成14年6月17日 (2002.6.17)
 (33) 優先権主張国 英国(GB)

(73) 特許権者 593141953
 ファイザー・インク
 アメリカ合衆国 10017 ニューヨーク州
 ニューヨーク市イースト・フォーティーセ
 カンド・ストリート 235
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100105290
 弁理士 三輪 昭次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】代謝表現型

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

物質の関連する代謝変換に関する被験体の代謝能力を、それらの被験体に試験物質を投与することなく特徴付けるための、または、投与せずに、代謝表現型に依存する被験体の投与後応答を予測するための、モデルを作成する方法であって、

投与物質を投与する前に、複数の被験体に関する投与前データを得ること；

投与物質を投与した後に、上記の複数の被験体に関する投与後データを得ること；および、

投与前データにおける被験体間の変動を、投与後データにおける被験体間の変動と相関させて、観察された相関に基づいて投与前から投与後の予測モデルを作成すること；
 からなり、ここで、投与前および/または投与後データは、サンプルまたは被験体の化学組成または物理学的パラメータに関するデータを含み、そしてここで予測モデルは、投与前データと投与後データとの間の関係を定義する1またはそれ以上の数学的方程式からなり、未投与の被験体の代謝表現型の分類を可能にする、上記方法。

【請求項 2】

投与前および/または投与後データが、生体液であるサンプルから得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

投与前および/または投与後データが、化学組成または物理学的パラメータに関するデータを含む、請求項1または2に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

投与前および／または投与後のサンプルまたは被験体が、分析前に処理されて、データバリが高められる、またはサンプル安定性が改良される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

投与前および／または投与後データが、核磁気共鳴 (NMR) スペクトロスコピー、質量分析 (MS)、赤外 (IR) 分光、ガスクロマトグラフィー (GC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) からなる群より選択される 1 またはそれ以上の化学分析技術を用いて得られる複合データから誘導されるか、または該投与前および／または投与後データが該複合データである、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 6】

適当な物質の投与によって、複数の生化学的変換のそれぞれについて表現型検査モデルを作成する、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

適当な物質の投与によって、複数の投与物質のそれぞれについて応答予測モデルを構築する、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

パターン認識工程の前に、既存の変量の比率および／または他の組合せをとることによって、元の投与前データセットを拡張する、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 9】

特定の物質を投与された被験体の群について、パターン認識方法を、投与物質の変動代謝または投与物質に対する変動応答におけるパターンを同定するために用いる、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

特定の物質を投与された被験体の群について、パターン認識方法を、投与後データ中の関与する変動に相関する投与前データ中の変動を同定するために用い、そしてパターン認識方法が、管理または非管理パターン認識方法である請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

特定の物質を投与された被験体の群について、データ・フィルタリング方法を、投与後データ中の関与する変動に無相関である投与前データ中の変動を除外するのに用いる、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 12】

代謝表現型の情報を与える、または投与に対する応答を予測するために用いることができる、生体マーカーまたは生体マーカー組合せを同定するために用いられる、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

被験体の代謝表現型の選択された態様を決定する方法であって、
関与する生化学的変換または経路を調べる特定の物質を投与された複数の被験体に関する投与前および投与後データの相関を説明する、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法によって作成されるモデルについて、未投与の被験体に関するデータを分析すること； 40

予め決定された該モデルの基準に従って、未投与の被験体の代謝表現型を説明する数的測度または分類を作成すること；
からなる方法。

【請求項 14】

投与物質に対する被験体の応答を予測する方法であって、
特定の投与物質を投与された複数の被験体に関する投与前および投与後データの相関を特徴付ける、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法によって作成されるモデルについて、未投与の被験体に関するデータを分析すること；および、 50

該モデルの予め決定された基準に従って、未投与の被験体が投与物質を投与された場合に予期される応答についての、数的予測またはクラス予測を作成すること；からなる方法。

【請求項 15】

被験体の代謝表現型の選択された態様を決定するか、または投与物質に対する被験体の応答を予測する方法であって、予め同定されている請求項 12 に記載の 1 またはそれ以上の生体マーカーについて、未投与の被験体に関するデータを分析することを含む方法。

【請求項 16】

被験体のアセチレーター表現型を、試験物質を該被験体に投与することなく同定するための、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 17】

物質の投与に対する被験体の応答がアセチレーター表現型に依存する場合に、該応答を予測するための、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

応答予測のための、および / または代謝表現型検査のための装置であって、各モデルが特定の投与物質を投与された複数の被験体に関する投与前および投与後データの相関をモデリングする、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法によって作成される、1 またはそれ以上のモデル；

少なくとも 1 つのモデルについて、未投与の被験体に関するデータを分析し、それにより、用いたモデルに従って、未投与の被験体の代謝表現型の 1 またはそれ以上の態様を決定するかまたは投与に対するその応答を予測する処理機；からなる装置。

20

【請求項 19】

更に、NMR スペクトロスコピー、質量分析、赤外分光または高速液体クロマトグラフイーからなる群より選択される物理的および / または化学的分析を行なう、1 またはそれ以上の分析機器またはデバイスを含む、請求項 18 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験体の代謝表現型を同定する方法、並びに代謝表現型による影響を受ける応答を予測する方法、および代謝表現型に影響を受ける危険因子を決定する方法に関する。特に、本発明は、被験体の生体液を分析することによって、被験体の代謝表現型を同定する方法、および 1 またはそれ以上の処理に対する被験体の応答を予測する方法を包含する。

30

【背景技術】

【0002】

生化学反応

生物の全体的な代謝表現型は、その代謝特性の総計であり、その遺伝組成と「環境」との相互作用により決定され、ここで環境とは、可能な最も広い意味において考えられる。

「代謝表現型」という用語は、生物の代謝特性の個々の態様にも適用できる。

40

【0003】

膨大な配列の生化学反応（代謝変換）が生体内で起こり、これらの反応の圧倒的大多数は酵素により触媒される。

【0004】

酵素は、生化学反応を加速する生化学的触媒として機能する、特殊化されたタンパク質である。通常の細胞活動に必要な反応の多くは、酵素なしでは、通常の体内 pH および温度において十分な速さで進行しない。酵素は触媒として反応速度を高めるが、反応の終わりに通常の状態に戻り、変化しない。

【0005】

酵素による作用を受ける分子は「基質」と呼ばれ、酵素は特定の基質に対して著しい特

50

異性を示す。例えばグルコースオキシダーゼはグルコースを酸化するが、ガラクトースは酸化しない。この特異性は、酵素表面上の基質結合部位により決定される。この部位は、1またはそれ以上の基質に対する好ましい結合能力を与える特定のアミノ酸配列である。或る酵素は広い基質特異性を有する一方で、逆に個々の基質に対して特異的であるものもある。従って、例えばグルコース、マンノースおよびフルクトースは全てヘキソキナーゼによりリン酸化されるが、グルコキナーゼはグルコースに対して特異的である。

【0006】

生化学および分子生物学の国際組合（I U B M B）は、6つの大きな酵素クラス：

1. 酸化還元酵素
2. トランスフェラーゼ
3. 加水分解酵素
4. リアーゼ
5. イソメラーゼ
6. リガーゼ

10

を有する酵素分類体系を確立している。

【0007】

これらの個々のクラスはそれぞれ更に、個々の酵素が属するサブクラスに分けられる。完全な詳細は現在ワールドワイドウェブ（<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme>）上で入手できる。

【0008】

20

一例として、グアニジノアセテートN-メチルトランスフェラーゼ（E C 2.1.1.2）は、S-アデノシル-L-メチオニンとグアニジノアセテートのS-アデノシル-L-ホモシステインとクレアチンへの転化を触媒する。これはメチルトランスフェラーゼの一例である。

【0009】

酵素触媒反応の速度に影響を及ぼし得る因子としては、存在する基質の量、存在する生成物の量、存在する酵素の量、およびそれぞれの酵素分子の活性が挙げられる。酵素分子の活性は、その固有の活性、補助因子および置換基の存在を含む様々な因子によって、またアロステリック部位の結合によって影響を受け得る。酵素量および酵素1分子あたりの活性は共に、被験体間の遺伝的変動による影響を受け得る。酵素量および分子あたりの活性は、協力して全体的な酵素活性を与え、これは異なる被験体間でかなり変化し得る。このような変動は、種々の酵素および代謝変換の全範囲に独立して影響を及ぼし得、この変動はそれぞれの被験体について異なる全体的代謝表現型の発生に寄与する。生化学的変換が起きるために必要とされる任意他の物質のレベルにおける変動もまた、代謝表現型に寄与する。例えば、薬剤をグルクロン酸化する被験体の能力の変動は、UDP-グルクロン酸（UDPGA）のレベルにおける被験体間の変動に起因し得る。

30

【0010】

代謝表現型は、典型的に酵素触媒反応に関して考えられるが、その最も広い意味においての代謝表現型とは、ある種の被験体内で起こり得る非酵素反応のそれぞれに関する基準（measures）をも包含する。更に、被験体の全体的代謝表現型は、例えば腸バクテリアのような、被験体内でまたは被験体上で生きている他の生物の性質および量に影響を受けるであろう。重要なことには、被験体の遺伝子型はその被験体の生きている間中一定であるが、被験体の全体的代謝表現型は、年齢と共に、そして病気、感染および栄養状態のような他の「環境的」影響と共に有意に変化し得る。

40

【0011】

代謝表現型の変動は、薬剤のような生体異物の代謝における被験体間の差異を引き起こす。代謝におけるこのような差異は、これらが作用物質への暴露の程度の差異を招き得るために、投与物質への異なる応答（例えば、効果の程度、毒性の程度等）に寄与する主な因子である。従って、例えば毒性物質の非毒性代謝産物への速い代謝は急速な解毒をもたらすが、毒素の代謝が遅い代謝者は、毒作用をより示しがちである。逆に、薬剤の有効成

50

分または誘導体の速い代謝は、治療効果の低減をもたらし得る。投与物質への異なる応答に寄与する他の因子としては、消化管からの吸収における被験体間差異および受容体の異なる感受性が挙げられる。毒薬に対する感受性および応答における遺伝的変動性は、Toxicology Letters (2001) 120巻において、「Genetic variability in susceptibility and response to toxicants」という題の記事において、Ingelman-Sundberg(259-268頁)により、およびMillerら(269-280頁)により概説されている。ヒト薬剤代謝における個体間の変動性は、PacificiおよびPelkonenにより編集され、Taylor & Francis (2001)により出版された本「Interindividual Variability in Human Drug Metabolism」の主題である。

【0012】

体液および代謝表現型の変動の影響

10

細胞内液の生化学的組成の態様は、細胞外組織液に反映され、従って組織に接触する循環血に反映される。従って、細胞液の生化学的組成における変質は、細胞外組織液の生化学的組成および血液の生化学的組成に対して影響を及ぼす傾向がある。血液組成の変質は、同様に、尿組成の変質に反映され得る。従って、異常な細胞代謝過程は血液および尿のような生体液の変質した組成に反映される傾向があり、結果として、これらの液体は身体の状態に対する診断ウインドーを提供する。このような液体の主な変質は、しばしば、肝臓毒または腎臓毒のような毒素が投与される場合に引き起こされ、主な酵素欠損のような固有の因子をこれらの液体から同定することもできる。従って、例えば古典的なフェニルケトン尿症において、フェニルアラニンヒドロキシラーゼの欠損は、フェニルアラニンのチロシンへの変換の不全を引き起こし、フェニルピルビン酸、フェニル乳酸およびフェニル酢酸のレベルが増加した変質した尿組成を生じる (Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations, 第4版, 1997, T. M. Devlin編, Wiley-Liss出版、を参照のこと)。これは、遺伝的に決定される代謝異常の一例であり、このような疾患は「代謝の先天異常」として知られている (例えば、Newsholme and Leech, 1983, Biochemistry for the Medical Sciences, John Wiley and Sons出版、を参照のこと)。記載される尿中変化の同定は、酵素欠損を同定するのに役立つ。

20

【0013】

深刻な代謝欠陥と同様に、代謝表現型における他のより小さな個体間差異が存在し、これは正常な代謝過程の崩壊および結果として生じる疾患を引き起こすのには十分ではない。しかしながら、生物が、大用量の特定の化学化合物、例えば薬剤物質のような異常な変化に付される場合、このような差異が明らかとなり得る。更に、このような差異は、環境汚染物質およびタバコの煙のような有害物質への長期間の暴露に関するガンのような疾患についての変質された危険因子の原因であり得る。

30

【0014】

生物学的サンプルのNMRスペクトル分析

生物学的液体の低分子量組成を調べるための核磁気共鳴 (NMR) スペクトロスコピーの使用は、現在十分に確立されている (例えば、Nicholson and Wilson (1989), High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids, Progress in NMR Spectroscopy, 21, 449-501 ; Lindon ら (1999), NMR spectroscopy of biofluids, Annual reports on NMR spectroscopy, 38)。NMR用高磁場の出現は、この発達の一因である。このような磁力は該技術の感度を大きく改良し、クリオプローブの使用は更なる改良をもたらす。複雑な混合物の試験にとって更なる利点は、磁場強度の増大により、NMRシグナルの分散が改良されることであり、即ち、シグナルがより展開して、互いに重なり合う傾向が減少することである。現代のNMRスペクトロスコピーの能力を大きく改良した他の要因としては、より高い感度をもたらすプローブ設計における改良、計算機能力の迅速な利用可能性、および例えば水性サンプルにおける水のシグナルの選択的抑制のための改良されたパルスシーケンスの発達が挙げられる。フロープローブの出現は、従来の高精度で壊れ易いガラスサンプル管に比べて、サンプルのスループットを大幅に増加させることができる。

40

【0015】

50

生体液についてのその有用性に加えて、NMRスペクトロスコピーは少量（約10～20mg）の固体組織サンプルの試験に良好に用いることができる（例えばMokaら（1997），Magic angle spinning proton nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of intact kidney tissue samples, Analytical Communications, 34, 107-109）。しかしながら、これにはマジック角回転（MAS）として知られる特別な技術が必要とされ、またMAS-NMRスペクトロスコピーは液状NMRスペクトロスコピーと比べて時間のかかる操作である。操作者が手動でサンプルを変える場合、MAS-NMRスペクトロスコピーでは典型的には1日に10個のサンプルを試験することができるのに対して、自動化された液状NMRスペクトロスコピーでは、1日に150より多くのサンプルを試験することができる。

10

【0016】

大部分の有機化合物はプロトンを含有し、これは分析されるサンプル中に十分な化合物が存在する限り、¹H NMRスペクトロスコピーで検出できる。これは即ち、原則として、¹H NMRスペクトロスコピーが大抵は有機化合物の一般的検出器であることを意味する。特定のサンプル成分からの¹H NMRスペクトロスコピーシグナルの検出能は、存在する成分の量、プロトンの種類および分子環境、並びにNMR実験の性質に左右される。主な制限は、置換性プロトン、例えばヒドロキシル基中のものは観察できないことである。本質的に、いかなる特定の有機化合物の¹H NMRスペクトルも、その化合物に特異的である。更に、NMRスペクトルは容易に解明できて予測可能であるから、化合物の構造特徴、およびしばしばその完全構造を、その¹H NMRスペクトルから推論することができる。

20

【0017】

生体液の従来型1次元（1D）¹H NMRスペクトルにおいて、検出可能なあらゆる成分の個々のスペクトルは、その相対濃度に応じて付加的であり、これは定量を容易にする。実際には、尿および血漿のような生体液の高磁場¹H NMRスペクトルは情報が著しく豊富であり、非常に多くの低分子量～中分子量成分が1回の実験で検出できる。リポタンパク質およびタンパク質のような高分子量成分もまた血漿中に存在するが、その¹H NMRスペクトルは、共振核の制限された移動度に起因する、シグナルが広がるという影響を受ける。このような広がりは、このような成分に由来する情報およびこの成分についての情報の量を減じる。

30

【0018】

生体液NMRスペクトロスコピーの用途

NMRスペクトロスコピーと比べて、従来の臨床化学分析は一般に、より正確な定量を提供し、またより良好な検出限界を提供することができる。一方で、¹H NMRスペクトロスコピーは主に、分析を要する成分を特定する必要がなく、検出可能なあらゆる成分のレベルが1回の実験中に測定されるという点で、従来の臨床化学分析よりも有利である。従って、¹H NMRスペクトロスコピーにより、予期せぬ変化を観察することができ、前もって予見できない物質を同定することができる。従って¹H NMRスペクトロスコピーは、型にはまらない研究のための同時多種分析検出器として大きな強みを有し、新規生マーカーの検出に理想的に適している。

40

【0019】

NMRスペクトロスコピーを用いて投与後の生体液を分析して、毒素に対する応答を同定および追跡することが知られている（例えば、Holmesら（1992）NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine, Mol. Pharmacol., 42, 922-930）。毒性研究について、生体液NMRスペクトロスコピーは、投与物質の代謝および/または投与物質により引き起こされる内因的生体液成分の変化を検出することができ、毒作用の評価並びにグルクロン酸化およびメルカプツール酸形成のような関連する防衛過程の同定に用いることができる。また、生体液NMRスペクトロスコピーは、毒性の機構を解明する有意の可能

50

性を有する。

【0020】

特定の先天性代謝異常は、NMRスペクトロスコピーを用いて生体液サンプルから容易に同定できることが知られている（例えば、Moolenaarら（2003）Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of body fluids in the field of inborn errors of metabolism, Ann. Clin. Biochem., 40, 1, 16-24）。また、生体液のNMRスペクトロスコピーは、他の疾患症状の診断および治療に対する応答の追跡に用いることができる。

【0021】

生体系の代謝状態をモニターするためのNMRに基づく手法の成功に従って、「代謝学（metabonomics）」という用語が作り出されている（Nicholsonら（1999）‘Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, Xenobiotica, 29, 1181-1189）。代謝学とは、「病態生理学的刺激または遺伝子改変に対する生体系のマルチパラメトリックな代謝応答の定量的測定」として定義される。代謝学は、それぞれ遺伝子発現およびタンパク質レベルにおける変化の検出に基づくゲノミクスおよびプロテオミクス技術に対して相補的である。他の技術に対する代謝学の利点は、代謝学が、代謝的に重要かどうか分からず潜在的な影響についてよりもむしろ、代謝の結果全体を見ることがある。

【0022】

パターン認識

10

生物学的（生体液または生体由来）NMRスペクトルのセットからの有用な生化学情報の抽出において、その問題点は、その著しい複雑性である。これらの複雑な、マルチパラメトリックなデータセットを調べる効率的な方法は、コンピュータを使用したパターン認識方法を用いることである。

【0023】

パターン認識（PR）は、推測的に、データセットのパターンを探すために、または他の既知の因子と相關するデータセットの要素を探すために、用いることができる多変量データ分析方法の総称である（例えばBeebeら, 1998, *Chemometrics, A Practical Guide*, John Wiley and Sons, New York等参照）。本来これは、多数の異なる対象からなるデータセットについて、様々なパラメータ（または「変量」）が測定されているということを仮定したものである。時折生じる欠測値が認められ得るとはいえ、これらのパラメータが何であろうと、一般には同一のパラメータはデータセットにおける全ての対象で測定されている。NMRスペクトルのセットに関連して、様々なパラメータは一般にスペクトル全体内の異なるスペクトルウィンドーの積分（integration）であるが、異なる対象は異なるスペクトルである。PR方法は、「管理（supervised）」または「非管理（unsupervised）」のものとして都合よく分類でき、そしてこれらの多変量統計分析方法の幾つかを以下の項で説明する。

20

【0024】

非管理PR方法

30

非管理PR方法は、他のいかなる独立した知識をも参照することなしに、多変量のデータセットにおける固有のクラスター・パターンを決定するのに用いられる。非管理パターン認識方法の例としては、主成分分析（PCA）、階層的クラスター分析（HCA）、および非線形マッピング（NLM）が挙げられる。

40

【0025】

主成分分析（PCA）

主成分分析（PCA）（例えば、Sharafら, 1986, *Chemometrics*, J. Wiley and Sons, New York）は、最も有用で簡単に適用される非管理PR技術の一つである。主成分（PC）は、出発変量と適当な重み係数との線形結合から得られる潜在的変量である。これらのPCの特性は：（i）各PCは、他の全てのPCに直交する（即ち、無相関である）こと、および（ii）最初のPCはデータセットの変動（情報量）の最大部分を含み、その

50

後の P C は相応してこれよりも少量の変動を含むこと、である。

【 0 0 2 6 】

数学的用語において、データ行列 X は、「スコア」行列 T、および「ローディング行列」P から成るものとしてみなすことができ、 $X = T P^t$ (ここで、上付き文字「t」は転置を意味する) である。共分散行列 C は、データ行列 X から計算される。次に、共分散行列の固有値および固有ベクトルは、対角化 (diagonalisation) によって決定される。固有ベクトル・プロットにおける異なる対象の座標 (主成分、即ち P C) は、「スコア」を示し、スコア行列 T を含む。固有ベクトル係数は「ローディング」を示し、ローディング行列 P を含み、P C に対して記述子の寄与を与える。

【 0 0 2 7 】

任意の 2 つの主成分スコアのプロットは、しばしば「スコア・プロット」と呼ばれる。P C 1 対 P C 2 のスコア・プロットは、低次の P C プロットが有用ではあろうが、最大情報量の 2 次元データを提供する。このようなスコア・プロットは、データセットにおける固有のクラスタリングを視覚化するのに用いることができる。

【 0 0 2 8 】

管理された方法

適当ならば、管理されたパターン認識方法はまた、多変量データを分析するのに用いる用いることができる。このような分析において、データセット (X) は可能ならば、1 またはそれ以上の既知の因子 (Y)、例えばクラスの構成員 (class membership)、または X データセットの外側の 1 またはそれ以上のパラメータの値に関連する。このような方法において、X および Y データの「トレーニング・セット」は、必要な Y 因子を X データから評価する統計的「モデル」を構築するために用いられる。次いでこのモデルは、その信頼性および予測能を測定するために独立したデータ (バリデーションデータセットと呼ばれる) で試験される。一度バリデートされるとモデルは、X データのみが利用可能である場合の、サンプルについての関連した Y 因子を予測するために正当に用いることができる。

【 0 0 2 9 】

管理されたパターン認識方法の例としては、次のものが挙げられる：クラス分析のソフト独立モデリング (SIMCA)；部分最小2乗分析 (PLS)；線形判別分析 (LDA)；K-隣接分析 (KNN)；人工ニューラル・ネットワーク (ANN)；確率的ニューラル・ネットワーク (PNN)；ルール誘導 (rule induction) (RI)；および Bayesian 方法。例えば：(SIMCAについて) Wold (1976) Pattern recognition by means of disjoint principal components models, Pattern Recog., 8, 127; (PLSについて) Frankら (1984) Prediction of product quality from spectral data using the partial least squares method, J. Chem. Info. Comp., 24, 20; (LDAについて) Nillson, 1965, Learning Machines, McGraw-Hill, New York; (KNNについて) Beebeら, 1998, Chemometrics, A Practical Guide, John Wiley and Sons, New York 等; (ANNについて) Anker and Jurs (1992) Prediction of C-13 nuclear magnetic resonance chemical shifts by artificial neural networks, Anal. Chem., 64, 1157; (PNNについて) Speckt (1990) Probabilistic neural networks, Neur. Networks, 3, 109; (RIについて) Quinlan (1986) Induction of decision trees, Machine Learning, 1, 81; (Bayesian方法について) Bretthorst, 1990, An introduction to parameter estimation using Bayesian probability theory, In: Maximum Entropy and Bayesian Methods, Ed. Fougere, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 53-79を参照のこと。

【 0 0 3 0 】

部分最小2乗 (PLS)

PLS は、前述の PCA 方法の回帰拡張である。PLSにおいて、データ行列 X の対象間の変動は X - スコア、T、により説明され、Y - ブロック逆行 (Y-block regressed against) における変動は、Y - スコア、U、において説明される。基本的に、PLS は T と U との間の共分散を最大化する。PLS モデルについて、PLS 重み、W、のセットが

10

20

30

40

50

計算され、Yにおける変動の説明への各X - 变量の影響を含む。Y - ブロックに対応する重みセットは、Cで示される。また、X - ローディングの行列Pも計算される。これらのローディングは共に、解釈のために、およびXの適当な分解を行うために用いられる。

【0031】

従って、XおよびYのPLS分解は次のように記載することができる：

$$X = T P^t + E$$

$$Y = T C^t + F$$

ここで、EおよびFはそれぞれXおよびYの残差であり、上付き文字「t」は関連行列の転置である。

【0032】

次に、PLS回帰係数Bは次のようにして得られる：

$$B = W (P^t W)^{-1} C^t$$

次に、Y、 Y_{est} の概算は、次式に従って計算できる：

$$Y_{est} = X W (P^t W)^{-1} C^t = X B$$

【0033】

部分最小2乗判別分析 (PLS-DA)

PLS-DAは、対象の既知のクラス(Y)間の最大分離を説明するデータ行列(X)における「潜在的な」変量を得る、管理された多变量方法である。PLS-DAは、前述のPCA方法の回帰拡張であるPLSに基づく。PCAが単純に研究対象を説明する変量内に存在する最大変動を見つけるために機能するのに対して、PLS-DAは、対象の既知のクラス間の最大分離を見つけるために機能する。これは、クラス情報を保持する「擬似」ベクトルまたは行列(Y)に対するPLS回帰により成される。計算されたPLS成分は、これによって、この情報がデータ中に存在する場合、クラス(Y)を分離するXにおける変動の説明に収束される。クラスの構成員は、実際のモデリングの前に既知でなければならない。一度モデルが計算され、バリデートされたならば、未知のクラスの対象についてクラスの構成員の予測に正当に用いることができる。

【0034】

PLSおよびPLS-DAに対するニューラル・ネットワーク

PLSおよびPLS-DAのような方法は、入力変量間の線形結合 (linear associations) の抽出に基づき、これは分析力を有意に限定し得る。ニューラル・ネットワークに基づくパターン認識技術は、特に予測される因子が多数の非関連原因に影響を受ける場合に、改良された予測能を提供することができる。それにもかかわらず、PLSおよびPLS-DAのような方法はしばしば十分に強力であり、比較的「ブラック・ボックス」ニューラル・ネットワーク方法よりも、モデル構築において特に重要であった入力データセットの態様に関して幾つかの情報を容易に得ることができるという点において、有意な利点を提供する、即ち、ニューラル・ネットワークモデルに比較して、PLSおよびPLS-DAモデルは解釈に関してより明白である。

【0035】

PR方法の代謝学データへの適用

パターン認識方法は、代謝学データ、例えば複合NMRスペクトロスコピー・データの分析に適用され、首尾よく用いられている。例えば、Anthonyら (1994) *Pattern recognition classification of the site of nephrotoxicity based on metabolic data derived from proton nuclear magnetic resonance spectra of urine*, *Mol. Pharmacol.*, 46, 199-211; Beckwith-Hallら (1998) *Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model hepatotoxins*, *Chem. Res. Tox.*, 11, 260-272; Gartlandら (1990) *Pattern recognition analysis of high resolution ¹H NMR spectra of urine. A non-linear mapping approach to the classification of toxicological data*, *NMR in Biomedicine*, 3, 166-172; Holmesら (1992) *NMR spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression and recovery from nephrot*

10

20

30

40

50

oxic lesions in the rat induced by mercury (II) chloride and 2-bromoethanamine, Mol. Pharmacol., 42, 922-930; Holmesら (1994) Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of ^1H NMR spectra of human urine from normal and pathological states, Anal. Biochem., 220, 284-296参照。

【0036】

データ・フィルタリング

パターン認識方法は「フィルタ処理していない」データに適用することができるが、無関係の変動を除外するために、しばしばデータをフィルタ処理することが好ましい。このようなフィルタリングは、関係がある変動と無関係の変動とを識別するためにある程度の管理を必要とする。

10

【0037】

データ・フィルタリングの1つの方法は、単に選択されたスペクトル領域を除去し、次に残りを処理することを含む。従って、例えば水抑制 (water suppression) で得られる水性サンプルの ^1H NMRスペクトルにおいて、残留水シグナルの大きさは、水抑制の有効性に従って変化し、これらの無関係なシグナルは除去できる。

【0038】

別法として、関与する変動に相関しない (即ち直交する) データの変動は、「直交フィルタリング」により除外できる。好ましい直交フィルタリング方法の1つは、慣例的に、直交シグナル修正 (Orthogonal Signal Correction) (OSC) と呼ばれ、ここで、関与する変動に直交する潜在的変量が除外される (Woldら (1998) Orthogonal Signal Correction of Near Infrared Spectra, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 44, 175-185)。

20

【0039】

直交シグナル修正

OSC方法は、Y-ベクトルと相関しない対象間のX変動を説明する最長ベクトルを見つけて、これをデータ行列から除外する。従って、結果として生じるデータセットはフィルタリングされており、これによって、パターン認識は、無相関の直交変動よりもむしろ、関与する特徴に相関する対象群内の変動に集中する。この方法は、必要となる都度に繰返すことができるが、但し「過剰適合 (over-fitting)」は避けなければならない。

【0040】

30

PLSにおいて、重みWは、XとYとの共分散を最大とするように計算される。OSCにおいては対照的に、重みWはXとYとの共分散を最小とするように計算され、これはできる限りYに直交するように成分を計算することと同様である。このような成分は、Yに直交し従って不要な変動を含み、従ってスペクトル・データXから該成分を差し引いて、関与する変動に集中させた、フィルタリングされた予測行列を作ることができる。

【0041】

PCAが異なるクラスの分離を示唆する場合、直交シグナル修正 (OSC) をこの分離の最適化に用いることができ、これによって続く多変量パターン認識分析の性能を改良し、モデルの予測能を強化する。

【0042】

40

モデリングおよび予測

元々のPLS、PLS-DAおよびニューラル・ネットワーク分析は、既知の挙動または種類のサンプルからの「モデル構築」または「モデリング」データを用いる予測的数学的「モデル」の構築の概念である。

【0043】

一度モデルが計算されると、モデルを計算するのに使用されない既知の挙動または種類のサンプルについてのデータを用いてバリデートすることができる。このようにして、モデルの予測能を試験できる。一度バリデートされると、このようなモデルは、挙動または種類が未知であるサンプル (試験データ) の挙動または種類を予測するために正当に用いることができる。分析前に該試験データは、あらゆるフィルタリングの適用を含め、モ

50

リング・データと同様にして処理しなければならない。

【0044】

任意の特定モデルは、使用されるデータがそれを定式化するものであることでのみ正しい。従って、全てのモデリングおよび試験データは、同じ（または同等の）条件下で、同じ（または同等の）実験パラメータを使用して、比較可能な固体から得ることが好ましい。

【0045】

表現型検査の従来技術

代謝的に抗原投与を受けていない被験体（即ち未投与）からの生体液NMRスペクトルのセット内の変動は、PCAのような非管理PR方法により試験でき、種々のグループ分けが一定の実験条件下で時々観察できる（例えば、Bollandら（2001）Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high resolution (1)H NMR spectroscopy of urine and pattern recognition, Anal. Biochem., 295, 2, 194-202）。しかしながら、この方法は、代謝変換に関する種々のグループ分けの有意性について、必ずしも明確の情報を提供するわけではない（例えば、Baud-Camusら（2001）Determination of N-acetylation phenotype using caffeine as a metabolic probe and high-performance liquid chromatography with either ultra violet detection or electrospray massspectrometry, Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 760, 1, 55-63）。異なるグループ間の識別を提供するスペクトル特徴の試験によって、分離の有意性を解釈することが可能となり得る。しかしながら、これは有意性の証明を提供しない、不確かな標的化されていない手法であって、異なる代謝表現型に結び付いた、潜在的で僅かなそして複雑な変動を調べるためには、非常に非効率的な方法である。

【0046】

逆に、標的化された手法において、NMRスペクトロスコピーまたは他の技術を用いて、試験物質（例えばアセチレーター（acetylator）表現型の場合のカフェイン）を投与後に、生体液中で検出された成分のパターンを使用して、被験体が特定の代謝変換を行う能力を明らかにすることが知られている。言い換えれば、NMRスペクトロスコピーおよび他の技術は、投与後の生体液を用いて被験体の代謝表現型を決定するのに用いることができる。これらの分析において、通常、重要な成分は、未変化の投与物質および/またはその代謝産物である。簡素化のために、「投与された化合物の代謝産物」という用語は、これ以降、投与された化合物それ自体を包含するものとして考える。しばしば、このような成分の比率は、関連する代謝能力の測度として決定される。このような分析から、種々の代謝変換全体についての被験体の能力を、適当な試験物質の利用可能性に応じて決定できる。しかしながら、一般に、被験体が1種類の変換を行う能力は、他の全ての変換に関する該被験体の能力から独立していることが望まれる。従って、種々の生化学的変換に関する被験体の能力を調べる場合には、複数の試験物質が必要となることが予想される。このような分析が時折行われるが、ヒトまたは動物被験体へのいかなる物質の不必要的投与も、安全および倫理的な見地から望ましくなく、このような方法の広範囲での使用は考えられない。更なる問題は、試験物質の投与が酵素誘導を引き起こし得るため、その後しばらくは改变された代謝状態となることである。従って、例えばこのような表現型検査は、毒性研究に関しては疑わしい。

【0047】

本明細書において用いられる生体マーカーという用語は、通常には、被験体もしくは被験体サンプルにおける化学的もしくは生化学的存在物または統計的に関連した存在物組合せを意味するか、またはその存在、非存在もしくはレベルに関して有意性を有する被験体において生理学的応答を意味し、これは特定の生理学的状態、疾患または毒性過程の暗示、または代謝もしくは疾患過程の特定の種類に対する傾向の暗示であり、そしてまた、臨床転帰に関連し得る。

【0048】

10

20

30

40

50

このような生体マーカーの例としては、化学的および生物学的分子、例えば代謝基質、代謝中間体または代謝産物、構造タンパク質、核酸、輸送タンパク質および受容タンパク質、免疫タンパク質、代謝または遺伝子制御に関するタンパク質、触媒タンパク質、酵素およびその関連因子が挙げられる。生体マーカーの更なる例としてはまた、生物学的過程の活性レベル、例えば遺伝子およびタンパク質発現、並びに細胞シグナル経路の活性レベルが挙げられる。

【0049】

生体マーカーという用語はまた、前述の分子または過程の存在、非存在またはレベルに関する、またはこれらに特徴的な、測定可能な任意のシグナル；例えば、核磁気共鳴（NMR）スペクトロスコピーおよび/または任意のほかの化学分析技術、例えば質量分析（MS）、赤外（IR）分光法、ガスクロマトグラフィー（GC）および高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）のような技術により、またはこののような技術を統合した任意組合せ、例えばGC-MSを用いて、行われた測定のアウトプットから得られるシグナルまたはシグナルパターン、を意味するものとして理解される。

10

【0050】

本明細書においてサンプルについて用いられる化学組成という用語は、該サンプルを構成する化学および/または生化学種の組合せを包含する。

【0051】

本明細書においてサンプルについて用いられる物理学的パラメータという用語は、クロマトグラフィー、誘導化、分留および分離、結晶化、沈降、スペクトル分析、分子量分析、回折、溶解度分析、濁度、屈折率または抵抗性、融点または沸点の分析のような方法で得られる特徴的な物理学的測度を包含する。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0052】

本発明は、被験体の代謝表現型を同定する方法、並びに代謝表現型による影響を受ける応答を予測する方法、および代謝表現型に影響を受ける危険因子を決定する方法に関する。特に、本発明は、被験体の生体液を分析することによって、被験体の代謝表現型を同定する方法、および1またはそれ以上の処理に対する被験体の応答を予測する方法を包含する。

30

【0053】

上述のとおり、認識されていた代謝表現型検査の仕方は、被験体に投与して投与後の生体液を分析することによるものである。本発明は、これから根本的に離れて、生体液中の投与物質の代謝産物レベルにおける変動が、物質が投与される前の生体液の代謝産物プロファイルにおける変動と相關するという、予期せぬ発見に基づく。すなわち本発明は、物質の投与前に、該物質に対する被験体の応答の予測を可能とするものである。更に、本発明によって、試験物質を被験体に投与する必要なしに、被験体の代謝表現型を決定することを可能とする。明らかなことには、物質が副作用を引き起こす可能性がある場合に、例えば薬品治療において、被験体の応答を予測できることは極めて有用である。更に、上述の理由（安全性、倫理および酵素誘導）により、いかなる投与も必要とせずに被験体の代謝表現型を決定できることは極めて有利である。この新規の、根本的に異なった方法論は、投与後の挙動に相關する投与前の挙動を検出するための、非常に標的化された手法を提供する。

40

【0054】

従って、一つの態様において、本発明は、個体に投与される可能性のある物質に対するその被験体の応答を予測するモデルを構築する一般的方法を提供する。この方法において、投与される物質は、被験体の代表的個体群（以下、モデル構築個体群と称する）に投与される。関心のある応答は、あらゆる適当な手段によって、モデル構築個体群の全ての構成員において測定される。投与前にモデル構築個体群から採取される生体液または他のサンプルは、¹H NMRスペクトロスコピーによって、または他の適当な技術（例えば近赤

50

外分光、高速液体クロマトグラフィー、質量分析またはガスクロマトグラフィー)によって、またはこのような技術の組合せによって試験される。投与前データおよび投与後の応答データは一緒になって、モデル構築データを構成する。PLSまたはPLS-DAのようなケモメトリクスパターン認識(PR)技術(Chemometric pattern recognition(PR) technique)を、モデル構築データに適用して、投与後の応答における変動を投与前データにおける変動に相關させる。ときには、OSCのようなデータ・フィルタリング方法が、投与前データにおける無相関の変動を除外するためにPRの前に用いられる。一度構築されバリデートされたならば、該モデルは、同じ物質に対する応答を予測することが求められる場合、モデル構築個体群と同じ種類の1またはそれ以上の被験体からの適当な投与前データに関して使用可能である。1種の物質用に作られたモデルは近縁の物質に関して使用可能であるかもしれないが、通常、関与する物質のそれぞれについて新規モデルが必要とされる。

【0055】

もう一つの態様において、本発明は、被験体の代謝表現型の1またはそれ以上の要素を特徴付けるモデルを構築する一般的方法を提供する。この方法において、投与される物質および該物質の量は、関与する特定の代謝変換を調べるために慎重に選択される。選択された物質は、被験体の代表的個体群(以下、モデル構築個体群と称する)に投与される。関心のある代謝産物は、投与後の生体液または他のサンプルにおいて、¹H NMRスペクトロスコピーにより、または他の適当な方法により、都合よく測定される。この分析から、関連する代謝変換に関する各被験体の能力の基準が決定される。投与前にモデル構築個体群から採取される生体液または他のサンプルは、¹H NMRスペクトロスコピーによって、または他の適当な技術(例えば近赤外分光、高速液体クロマトグラフィー、質量分析またはガスクロマトグラフィー)によって、またはこのような技術の組合せによって試験される。投与前データおよび投与後の応答データは一緒になって、モデル構築データを構成する。PLSまたはPLS-DAのようなケモメトリクスパターン認識(PR)技術を、モデル構築データに適用して、投与後の能力測定における変動を投与前データにおける変動に相關させる。ときには、OSCのようなデータ・フィルタリング方法が、投与前データにおける無相関の変動を除外するためにPRの前に用いられる。一度構築されバリデートされたならば、該モデルは、関連する代謝能力を決定することが求められる場合、モデル構築個体群と同じ種類の1またはそれ以上の被験体からの適当な投与前データに関して使用可能である。

【課題を解決するための手段】

【0056】

本発明の第1の態様において、被験体の代謝表現型の選択された態様を、それらの被験体に試験物質を投与することなく特徴付けるための、または、投与せずに、代謝表現型に依存する被験体の投与後応答を予測するための、モデルを作成する方法が提供され、該方法は：

投与物質を投与する前に、複数の被験体に関する投与前データを得ること；
投与物質を投与した後に、前記の複数の被験体に関する投与後データを得ること；および、

投与前データにおける被験体間の変動を、投与後データにおける被験体間の変動と相關させて、観察された相関に基づいて投与前から投与後の予測モデルを作成すること；からなる。

【0057】

投与前および/または投与後データは、生体液である例えば尿、血液、血漿、血清、唾液、汗、涙、呼気もしくは呼気濃縮物といったサンプルから、または植物組織、植物液もしくはホモジエネート、例えば精油を含む植物抽出物もしくは植物滲出物、といったサンプルから、またはヒトもしくは動物組織、魚組織もしくは油、組織抽出物、組織培養抽出物、細胞培養上清もしくは抽出物または微生物由来のものであるサンプルから得られる。投与前および/または投与後データは、化学組成および/または物理学的パラメータに關

10

20

30

40

50

するデータを含み得る。

【0058】

投与前および／または投与後のサンプルまたは被験体を、分析前に処理して（例えば、1またはそれ以上の存在する物質の誘導体を生じるように、1またはそれ以上の化学試薬で処理して）、例えばデータリカバリを高めるか、またはサンプル安定性を改良することができる。

【0059】

投与前および／または投与後のデータは、核磁気共鳴（NMR）スペクトロスコピーおよび／または任意の他の化学分析技術、例えば質量分析（MS）、赤外（IR）分光、ガスクロマトグラフィー（GC）および高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて得られる、またはこれらの技術を統合した任意組合せ、例えばGC-MSを用いることにより得られる複合データから誘導することができる。

【0060】

投与前および／または投与後データは、物理学的データであってもまたはそれから誘導されるデータであってもよい。

【0061】

好ましくは、表現型検査モデルは、適当な物質の投与によって複数の生化学的変換のそれぞれについて作製される。同様に、適当な物質の投与によって、複数の投与物質のそれぞれについて応答予測モデルを構築できる。

【0062】

パターン認識の前に、既存の変量の比率および／または他の組合せをとることによって、元の投与前データセットを拡張することができる。これは例えば、得られたデータの比率を含む更なるデータを形成することによって達成できる。

【0063】

任意特定の物質を投与された被験体の群について、パターン認識方法を、投与物質の変動的代謝または該投与物質に対する変動的応答におけるパターンを同定するために用いることができる。管理または非管理パターン認識方法は、投与後データにおける重要な変動に相関する投与前データにおける変動を同定するために用いることができる。

【0064】

直交シグナル修正（OSC）のようなデータ・フィルタリング方法は、投与後データにおける重要な変動に相関しない投与前データにおける変動を除外するために用いることができる。

【0065】

該方法は、代謝表現型の情報を提供するかまたは投与に対する応答を予測するために用いることができる、生体マーカーまたは生体マーカー組合せを同定するために用いることができる。

【0066】

本発明の第2の態様において、被験体の代謝表現型の選択された態様を決定する方法が提供され、該方法は：

関与する生化学的変換または経路を調べる特定の物質を投与された複数の被験体に関する投与前および投与後データの相関を説明するモデルについて、未投与の被験体に関するデータを分析すること；

予め決定された該モデルの基準に従って、未投与の被験体の代謝表現型を説明する数的測度（numerical measure）または分類を作成すること；
からなる。

【0067】

該モデルの予め決定された基準としては、投与前データと投与後データとの間の関係を定義し、投与前データに基づく被験体の特徴付けを可能にし、そして外れ値である試験データの同定を可能にする、1またはそれ以上の数学的方程式が挙げられる。

【0068】

10

20

30

40

50

未投与の被験体に関するデータは、尿、血液、血漿、血清、唾液、汗、涙、呼気もしくは呼気濃縮物のような生体液から、または植物組織、植物液、植物ホモジエネート、例えば精油を含む植物抽出物もしくは植物滲出物、またはヒトもしくは動物組織、魚組織もしくは油から、または組織抽出物、組織培養抽出物、細胞培養上清もしくは細胞培養抽出物から、または微生物由来のサンプルから、またはデータリカバリもしくはサンプル安定性を高める処理を施した後の上記のサンプル種のいずれか1つから、得ることができる。

【0069】

被験体に関して特徴的な複合データおよび/または物理学的データを、核磁気共鳴(NMR)スペクトロスコピーおよび/または任意の他の技術を用いて、または技術の任意組合せを用いて、作成することができる。

10

【0070】

代謝表現型に影響を受ける危険性評価を行うために、および/または特別な健康モニターワークの使用を標的化するために、および/または予備的/予防的処置の使用を標的化するために、および/または保険目的で危険性を特徴付けるために、および/または任意の他の目的、例えば育種用に被験体を選択するために、該表現型検査方法を用いることができる。

【0071】

本発明の更なる態様において、投与物質に対する被験体の応答を予測する方法が提供され、該方法は：

20

特定の投与物質を投与された複数の被験体に関する投与前および投与後データの相関を特徴付けるモデルについて、未投与の被験体に関するデータを分析すること；および、

該モデルの予め決定された基準に従って、未投与の被験体が投与物質を投与された場合に予期される応答についての、数的予測またはクラス予測を作成すること；からなる。

【0072】

予め決定された基準に従って、被験体が受容すべき物質の最大または最小用量が、被験体が受容すべき投与物質の量と同様に予測できる。また、被験体に物質を投与する頻度は、被験体が受容すべき物質の投与回数と同様に予測できる。被験体に対して適当な徐放性処方も選択できる。

【0073】

被験体に関して特徴的な複合データおよび/または物理学的データを、核磁気共鳴(NMR)スペクトロスコピーおよび/または任意の他の技術を用いて、または技術の任意組合せを用いて、作成することができる。

30

【0074】

被験体の代謝表現型の選択された態様を決定する方法、または被験体の投与物質に対する応答を予測する方法は、更に、予め同定されている1またはそれ以上の生体マーカーについて、未投与の被験体に関するデータを分析することを含んでよい。生体マーカーは、色変化のような可視的变化を生じる1またはそれ以上の添加試薬と反応できる。好ましくは、生体マーカーは、投与物質を投与する前の複数の被験体に関する投与前データと、投与物質を投与した後の複数の被験体に関する投与後データを相関させることによって選択される。

40

【0075】

該方法は、室内実験もしくは臨床試験のために、または任意他の目的のために、表現型が同質のまたは類似した被験体の群を選択するために用いることができる。

【0076】

該方法は、生物学的変動が表現型の異質性によって引き起こされる場合に、実験データにおけるこのような変動を、生体液または組織の投与前分析に基づいて有理化するために用いることができる。

【0077】

該データは、全体として、被験体から引き出される物理的および/または化学的測定に

50

基づき得る。このような測定の例としては、血圧、心拍、ピーク・フロー、高さ、重さ等が挙げられる。

【0078】

投与後データは、投与前の状態、例えば血圧を低下させる薬剤で処置されたヒト被験体の血圧の減少、に関する変化を説明することができる。

【0079】

好ましくは、特定のモデルおよび／または方法の制限に適合しない試験データが同定される。

【0080】

該被験体は、動物、特にヒト、マウス、ラット、ブタ、乳牛、雄牛、ヒツジ、ウマ、イヌもしくはウサギのような哺乳動物、または任意の家畜、または競走馬のようなスポーツ用もしくは育種用の任意の動物であってよい。または、該被験体は、植物、魚もしくは任意の他の水生生物、または生物学的組織、組織培養、細胞培養もしくは微生物培養であつてよい。

【0081】

データは、単一の被験体とみなされる被験体の群を代表する、またはそれを代表すると考えられるサンプルから得ることができる。

【0082】

例えば、複数の同種被験体（例えば植物）から得られるサンプルは一緒に粉砕され、得られた物質を、単一の植物被験体に関するとみなされるデータを得るために用いることができる。

【0083】

投与物質は、任意の物質、または物質の混合物もしくは製剤であってよく、例えば、特に医薬物質もしくは薬用物質、または医薬物質もしくは薬用物質となる可能性のある研究中もしくは開発中の物質、更にまた例えば毒素、農薬、除草剤、食料物質もしくは飼料物質、食料添加剤もしくは飼料添加剤、並びに液体、気体、蒸気および煙、例えばタバコの煙のような任意の流体が挙げられる。

【0084】

投与物質は、任意のマトリクスまたは媒体において、任意の方法または経路により、例えば注射により、食べることにより、飲むことにより、吸入により、または喫煙により、被験体の生存期間またはその任意特定の部分もしくはごく一部分のような任意の期間にわたって、積極的にまたは受動的に投与されてよく、このような投与は、例えば環境への暴露もしくは汚染に起因するか、または医療処置、歯科的処置、獣医科的処置もしくは外科的処置に起因するものを含む。

【0085】

該方法は、被験体のアセチレーター表現型を、試験物質を該被験体に投与せずに同定するため用いることができる。加えて、または別法として、該方法は、物質の投与に対する被験体の応答がアセチレーター表現型に依存する場合、該応答を予測するために用いることができる。

【0086】

該方法は、イソニアジド誘導毒性またはガラクトサミン誘導毒性に対する被験体の感受性を予測するために用いることができる。

【0087】

本発明はまた、モデルを作成する装置に関する。

【0088】

本発明の更なる態様において、応答予測のための、および／または代謝表現型検査のための装置が提供され、該装置は：

各モデルが特定の投与物質を投与された複数の被験体に関する投与前および投与後データの相関をモデリングする、1またはそれ以上のモデル；

少なくとも1つのモデルについて、未投与の被験体に関するデータを分析し、それによ

10

20

30

40

50

り、用いたモデルに従って、未投与の被験体の代謝表現型の 1 またはそれ以上の態様を決定するかまたは投与に対するその応答を予測する処理機；
を含む。

【 0 0 8 9 】

加えて、または別手段として、被験体の代謝表現型の選択された態様を、それらの被験体に試験物質を投与することなく特徴付けるための、または、投与せずに、代謝表現型に依存する被験体の投与後応答を予測するための、 1 またはそれ以上のモデルを作成するよう設けられ、該装置は：

投与物質を投与する前に、複数の被験体に関する投与前データを得るように；

投与物質を投与した後に、前記の複数の被験体に関する投与後データを得るように； 10 および、

投与前データにおける被験体間の変動を、投与後データにおける被験体間の変動と相關させて、観察された相関に基づいて投与前から投与後の予測モデルを作成するように、設けられる。

【 0 0 9 0 】

好ましくは、該装置は更に、物理的および / または化学的分析、例えば NMR スペクトロスコピー、質量分析、赤外分光または高速液体クロマトグラフィーの、 1 またはそれ以上の分析機器またはデバイスを含んでもよい。

【 0 0 9 1 】

また、該装置は、 1 またはそれ以上の生体マーカー、特に予め前述のように同定されている 1 またはそれ以上の生体マーカーの使用に基づく応答予測または代謝表現型検査のための生体マーカーを同定するように設けることができる。 20

【 0 0 9 2 】

本発明の更なる態様において、代謝表現型検査のための、または投与に対する被験体の応答を予測するための装置が提供され、該装置は、試験用の被験体からのサンプルを受ける試験領域を含み、該試験領域は、サンプル中の 1 またはそれ以上の生体マーカーと化学的に反応して試験領域の外観を変化させることができる 1 またはそれ以上の試薬を含み、該生体マーカーは予め前述のように同定されており、そしてその結果として生じた試験領域の外観は代謝表現型に特徴的であるかまたは投与に対する応答を予測するものである。 30

【 0 0 9 3 】

好ましくは、該装置は被験体にとって適当な投与計画を同定する。

【 0 0 9 4 】

該装置は、特定の生体マーカーに対して作成された抗体の使用に基づいてよい。選択された生体マーカーは、例えば固体支持体上に固定化された酵素を用いる酵素触媒反応により検出および / または定量できる。

【 0 0 9 5 】

また、本発明は、本発明の方法により作成される 1 またはそれ以上のモデルを含む装置に関する。

【 0 0 9 6 】

更に該装置は、特定のモデルの制限に適合しない試験データを同定するように設けることができる。 40

【 0 0 9 7 】

本発明は、多くの応用を有する：

(1) 修正処理を必要としない「良好な」被験体

被験体の代謝特徴決定（表現型検査）によって、次のものが可能になる：

危険性評価、例えば膀胱癌、特に特定の表現型に関連するもの。

適当とする場合における、即ち危険性の高い被験体における、特別な健康モニター方式の標的化された採用。

適当とする場合における、即ち危険性の高い被験体における、予備的 / 予防的処置の標的化された使用。 50

保険目的の、被験体に関する危険性の度合いの測定。

例えば家畜の育種において、望ましい特徴による被験体の選択。

室内実験または臨床試験のための、表現型が同質の被験体サブセットの選択。

【0098】

(2) 薬品処置、医療処置、歯科的処置、獣医科的処置または他の処置を要する被験体

被験体の代謝特徴決定(表現型検査)および/または投与もしくは処置に対する被験体の応答の予測によって、次のものが可能になる:

被害を受け易い被験体に対して薬剤を投与しないことによる、または薬剤用量および/または投与頻度および/または投与期間を減少することによる、医薬品副作用(例えば昏睡、致死)の回避。

10

薬品処置の軽い副作用(例えば悪心、眠気)の発生および重篤度の予測。

副作用を最小限に抑えながらも、体内における適当なレベルの活性薬剤物質を維持することに基づく、至適薬品処置(処置過程の化合物、用量、投与頻度および投与期間)の選択。

医療処置、歯科的処置、獣医科的処置、および物質、例えばハロタンのような麻酔剤に対する副作用の回避。

適当な医療的、歯科的または獣医科的手段または処置の選択。

【0099】

(3) 薬剤開発および認可(licensing)

異なる被験体において異なる効果(例えば有効性、毒性)を有する薬剤は、投与前代謝表現型検査を行ない、それに従って処置を調整することを前提として認可され得る。これによって、次のものが可能になる:

20

有効性または毒性のいずれかにおける変動的応答による「整理」(薬剤開発過程中の化合物の放棄)の減少。

有効性または毒性の問題が、個体群全体というよりもむしろ特定被験体サブセットに限定される場合の、特定の未承認薬剤の再生/再認可。

【0100】

薬剤開発研究(例えば毒性または有効性についての)に関して、投与前代謝表現型検査によって、次のものが可能になる:

変動が、異なる被験体間または異なる被験体サブセット間の表現型の差に起因する場合の、変動的な結果の解釈。

30

必要とされる特定の代謝特性を有する所望の試験群の選択。

【0101】

(4) 生体マーカーの同定

適当なモデルは、試験データの分析に直接使用する代わりに、代謝表現型を決定するための、または代謝表現型により決定される応答を予測するための、生体マーカーまたは生体マーカー組合せの同定に用いることができる。次いで、関連がある生体マーカーを明らかにして、例えば検尿(urine dipstick)またはHPLC方法のような簡易分析方法を、これらの生体マーカーに基づいて開発することができる。これにより、NMRスペクトロスコピーのような高度な技術に対する依存度を減少して、より遠隔で、例えば地方の研究室、薬局、病院または医者の診療所において、試験することができる。

40

【0102】

ここで、実施例を示すだけのものとして添付図面を参照して、本発明を更に説明する。

図1-1は、ガラクトサミンHCl(略称GalNHC1)(800mg/kg)投与後のガラクトサミンの変動尿中排泄を示す;

図1-2は、GalNHC1(800mg/kg)投与後の、N-アセチル化体の変動尿中排泄を示す;

図1-3は、応答者においてGalNHC1(800mg/kg)によって誘導された幾つかの尿中変化を示す;

図1-4は、ガラクトサミンHCl(800mg/kg)投与後のヒプレート(hippur

50

ate) およびヒスチジンの変化した尿中排泄を示す；

図 1 - 5 は、ガラクトサミン研究からの - 1 日目(投与前)尿NMRスペクトルのPC AからのPC 1対PC 5のスコア・プロットを示す；

図 1 - 6 は、ガラクトサミン研究からの - 1 日目(投与前)尿NMRスペクトルのPC AからのPC 1対PC 5のローディング・プロットを示す；

【0103】

図 2 - 1 は、イソニアジド(400 mg / kg)をオスSprague-Dawleyラットに投与した後0～7時間に採取された尿サンプルのNMRスペクトルにおいて見られる、N-アセチル化代謝産物の種々のパターン例を示す；

図 2 - 2 は、イソニアジド(200 mg / kg)を投与された動物からの1日目(投与から0～7時間)尿サンプルのNMRスペクトルのN-アセチル領域(2.23～2.13)のPCAからの、PC 1対PC 2のスコア・プロットを示す；

図 2 - 3 は、イソニアジド代謝の2種の任意選択的初期経路を示す；

【0104】

図 3 - 1 は、イソニアジド(200 mg / kg)投与後0～7時間に採取された尿サンプルのNMRスペクトルにおける比率(ピーク高さ「a」/ピーク高さアラントイン)の投与前予測を示す；

図 3 - 2 は、図 3 - 1 に記載された結果を生じさせたPLS分析に関する回帰係数を示す；

図 3 - 3 は、イソニアジド(200 mg / kg)を投与したラットから、投与後0～7時間に採取された尿中に排泄された代謝産物Cの量の投与前予測を示す。

図 3 - 4 は、イソニアジド(200 mg / kg)を投与したラットから、投与後0～7時間に採取された尿中の比率[(フラクションC) / (フラクションA + B)]の投与前予測を示す。

図 3 - 5 は、図 3 - 4 に関するモデルの内部バリデーションを示す。

図 3 - 6 は、外部試験セットについての[(フラクションC) / (フラクションA + B)]の投与前予測を示す。

【0105】

図 4 - 1 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間におけるN-アセチル化化合物(約2.22～約2.11)の全尿中排泄の投与前予測を示す。(このパラメータについての第1モデル)。

図 4 - 2 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中に排泄された「MA」量の投与前予測を示す。(このパラメータについての第1モデル)。

図 4 - 3 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中のN-アセチル化化合物(約2.22～約2.11)の全尿中排泄の投与前予測を示す。(このパラメータについての第2モデル)。

図 4 - 4 は、図 4 - 3 に関するモデルの内部バリデーションを示す。

図 4 - 5 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中のパラセタモールグルクロニド(「G」)の尿中排泄の投与前予測を示す。

図 4 - 6 は、図 4 - 5 に関するモデルの内部バリデーションを示す。

図 4 - 7 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中の「MA」の尿中排泄の投与前予測を示す。(このパラメータについての第2モデル)。

図 4 - 8 は、図 4 - 7 に関するモデルの内部バリデーションを示す。

図 4 - 9 は、図 4 - 7 に関するモデルの外部バリデーションを示す。

図 4 - 10 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中の「P」の尿中排泄の投与前予測を示す。

図 4 - 11 は、図 4 - 10 に関するモデルの内部バリデーションを示す。

図 4 - 12 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中に排泄された「S」の量の、投与前予測値に対する観測値を示す。

図 4 - 13 は、パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中に得られ

10

20

30

40

50

た尿サンプルのG/S比の、投与前予測値に対する観測値を示す。

【0106】

図5-1は、パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の3時間における体重1kgあたりのN-アセチル化化合物(2.210~2.135)の全尿中排泄の投与前予測を示す。

図5-2は、図5-1に関するモデルの外部バリデーションを示す。

図5-3は、パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の3時間において尿中に排泄された、体重1kgあたりのパラセタモールグルクロニド(「G」)の量の投与前予測を示す。

図5-4は、図5-3に関するモデルの外部バリデーションを示す。

10

図5-5は、パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の3時間において尿中に排泄された、体重1kgあたりの「P」の量の投与前予測を示す。

図5-6は、図5-5に関するモデルの外部バリデーションを示す。

図5-7は、パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の6時間における体重1kgあたりのN-アセチル化化合物(2.210~2.135)の全尿中排泄の投与前予測を示す。

図5-8は、図5-7に関するモデルの外部バリデーションを示す。

【0107】

A. モデル構築手順の好ましい特徴

1. モデル構築個体群

20

モデル構築個体群を構成する被験体は、可能な限り、試験個体群を構成することになる被験体を代表するものでなければならない。食餌は、生体液の組成に影響することがあるので、従って、被験体間の食餌の変動は、生体液から得られたモデルについて重大となり得る。該方法は、食餌の変動による影響を受けないように十分に堅牢であるのが理想的であるが、これは各モデルについての試験を要する。変動的な食餌によって起こり得る影響に対する予防策として、特定のモデルに関するモデル構築データ、バリデーションデータおよび試験データは全て、同じ食餌を受けた被験体から得ることが望ましい。これは、ヒトで行うよりも、実験動物で行う方が容易である。実際、標準的な動物の食餌と標準的なヒトの食餌が関連する全ての課題について特定されるならば、これは異なるモデルの範囲に対する、被験体の尿サンプルの迅速な検査を可能にするため、有利となり得る。一般に、モデル構築個体群の大きさが大きいほど、作製されるモデルはより堅牢なものになる。一度モデルを構築したならば、モデル構築個体群の構成員ではない被験体群を用いて、バリデートする必要がある。

30

【0108】

2. 投与

投与される物質、用量レベル、投与の頻度および投与方法は、用途に応じて決まる。目的が、代謝表現型検査のための方法を生みだすことである場合、該投与物質は当該の変換の程度を特徴付けるための、1またはそれ以上の代謝産物を与える必要がある。理想的には、選択された代謝産物は当該の変換にのみ影響を受け、他の複雑要因には付されない。従って、投与される化合物はおそらく、小さな単純な化学化合物であって、おそらくは、単化学官能性または2化学官能性を有する化合物であろう。このような表現型検査モデルを構築するためには、選択された物質の単一用量は十分な量であるが、代謝的に異なる固体間の識別を可能にするのに十分に多い量であることが必要であろう。目的が応答予測のためのモデルの構築である場合、投与計画は、被験体において予測される応答のためのものと同一でなければならない。

40

【0109】

3. サンプル

a. 投与前サンプル

投与前サンプルは、関連する代謝情報を含むように選択する必要がある。必要ならば、1種より多くのサンプルを用いて、その情報量を組合わせることができる。該サンプルは

50

容易に得られるものであって、そのサンプリング手順は痛みおよび不都合さを最小限にするものであることが好ましい。投与前のサンプリング時と投与時との間に、代謝表現型に変化が生じる可能性を最小限に抑えるために、投与前サンプルはできる限り投与時に近い時点で採取すべきである。尿は、豊富な代謝情報を含み、特にヒト被験体にとってほとんどまたは全く不都合を感じずにサンプリングすることができるので、理想的な投与前サンプルである。更に、ヒトでは、尿は基本的に要求に応じてサンプリングできる。ラットのような動物からの尿の採取は、これよりもわずかに困難である；この場合、要求時に採取することはできず、ラットのような小動物は一般に、尿採取のために特別な処理をして、数時間個別のケージ内に収容しなければならない。

【0110】

10

血液もまた代謝情報を含み、少量で、比較的容易に大型の動物またはヒトから「針刺し(pin-prick)」方法によりサンプリングできる。しかしながら、凝固を防ぐために特別な処理を行う必要があり、例えば血清を使用したり、またはヘパリンリチウムを含む容器を使用する。特に小動物から大量の血液を採取することはより困難であり、専門技術と鶴血専門医が必要である。血液をサンプリングする部位および被験体を固定する容易さに応じて、麻酔および／または沈静が必要となり得る。血漿または血清は、通常、分析される、血液から得られる2種の液体である。

【0111】

唾液、汗、呼気もしくは呼気濃縮物、涙および母乳は、容易に採取され、検査の性質に応じて関連する代謝情報を含み得る他の体液である。

20

【0112】

b. 投与後サンプル

投与後サンプルの種類は、用途に応じて決められる。投与後サンプルは、被験体全体、例えばヒトまたはラットであってよく、または上述の項a.に挙げたような生物から得られるサンプルであってよい。必要に応じて、1種より多くのサンプルを用いることができる。

【0113】

c. サンプルの安定性

特別な処理を行わなければ細菌または他の手段によって劣化し得る生物学的サンプルには、その安定性を確保するために特別な処理が必要である。上述のように、血液または血漿の凝固を防ぐためには、特別な処理が成されねばならない。尿サンプル、特に糞便または他の汚染に曝された可能性のあるものは、好ましくは、アジ化ナトリウムのような抗菌剤を含む容器中に採取する。アジ化ナトリウムは¹H NMRスペクトロスコピーに対して不可視であるという利点を有する。尿サンプルが有意な期間にわたって、即ち数分間というよりはむしろ数時間にわたって採取される場合には、採取容器またはバッグは氷または他の手段によって冷却されることが好ましい。一度採取され、安定化されたならば、全ての生物学的液体は、すぐに分析されるか、または分析に用いられるまで深冷(-20以下)されて保存される。好ましくは、任意の「固体」組織サンプルは、採取後すぐに液体窒素中で「スナップ」凍結され、分析に用いられるまで-80で保存される。採取および保存容器は、可塑剤または他のプラスチック成分が漏出してサンプルが汚染されないようなものを選択するべきである。

30

【0114】

4. サンプル調製

分析の前に、何等かのサンプル調製または処理が必要となり得る。異なる研究者により用いられる正確な手順には多くの変形があり得るが、¹H NMRスペクトロスコピー分析用サンプルは、典型的には以下のようにして調整される：

【0115】

a. 尿サンプル

典型的には、尿400μlを、リン酸緩衝液(0.2M Na₂HPO₄と0.2M NaH₂PO₄との81:19(v/v)混合物；pH 7.4)200μlと混合して尿サンプル

40

50

をNMR分析用に調製し；不十分量の尿を利用する場合、不足分を純水で補って最小で200μlとした尿を用いる。尿-緩衝剤混合物を室温で緩衝化が起りうるよう10分間静置し、次いで13,000rpmで更に10分間遠心分離して、懸濁した粒子を除去した。「透明な」緩衝化尿500μlをNMR管に移し、TSP/D₂O溶液50μlを加える。TSP(ナトリウム3-トリメチルシリル-[2,2,3,3-²H₄]-1-プロピオネート)は、NMR実験で用いられる化学シフト標準化合物(0)であり、D₂Oは、NMRスペクトロメータのために磁場/周波数ロックを与える。TSP/D₂O溶液の濃度は、NMR管中でTSP終濃度0.1mMとなるようにする。

【0116】

b. 血漿サンプル

典型的には、血漿150μLを、生理食塩水(10%(v/v)D₂Oと90%(v/v)H₂Oとの混合物中の0.9%(w/v)NaCl)350μLと混合して、血漿サンプルを¹H NMR分析用に調製する。サンプル中のタンパク質と結合する可能性があるため、TSPのような化学シフト標準化合物は加えない。

【0117】

用いる分析技術に応じて、サンプルの化学的誘導化は、データリカバリを高めるために用いることができる。従って、例えば、そのままでは紫外線または可視光線の吸収をモニターする分光測光検出器で検知されない化合物に、適当な発色団を付けることができる。他の選択は、蛍光分析による化合物の検出能を高めるために蛍光マーカーを付けることである。このような化学的誘導化によって、検出不可能であった化合物を検出可能にすることができる、またその他のものについては検出限界を改善することができる。化学的誘導化はまた、異なるサンプル成分のクロマトグラフィーによる分離を容易にするために用いることができる。また、そのままでは分析中に問題を引き起こし得る血漿タンパク質のような好ましくないサンプル成分を除去するのに、物理的および/または化学的処理を用いることができる。

【0118】

5. 物理的-化学的分析技術

a. 投与後サンプルの分析

分析技術は、測定されるパラメータに関して、並びにサンプルの数および性質、例えば生物全体または生体液の種類に関して、選択されなければならない。種々のモデルにおいて重要と成り得る非常に多くのパラメータは、非常に多くの分析機器および分析方法が必要となり得ることを意味する。

【0119】

用途が特定の応答、例えば特定の物質を投与した後の血圧の変化を測定することであるならば、最も適当な技術、例えば血圧計が選択される。物質の毒性に重点が置かれる場合、例えば適当なキットを備えた自動化臨床分析器を用いて、酵素活性のような血漿パラメータの範囲を測定するのが好ましいであろう。別法として、組織病理学的結果を、影響の種類に従って分類できるか、または重篤度に従って数的にスコアできる。目的が表現型検査モデルの構築である場合、投与後分析技術は通常、投与物質の1またはそれ以上の代謝産物の定量、または少なくとも相対的定量を提供することが必要となる。

【0120】

b. 投与前サンプルの分析

投与後サンプルと同様に、投与前サンプルのための分析技術の選択は、サンプルの性質に影響を受けるが、更に、選択される投与前分析技術は、代謝情報を示し得ることが必要である。体液または体組織の分析は、NMRスペクトロスコピーを用いて行うか、または他の、指標のない代謝産物を検出および定量できる技術を用いて行うのが好ましく、即ち選択される技術は、理想的には、特別な代謝産物の分析に特定する必要なしに、個々の代謝産物を検出し、定量する。これにより、該モデル内における最も有用な代謝産物の使用が、それらが現在未知であったとしても可能になる。これはまた、関与する新規代謝産物マーカーの同定も可能にする。モデル構築のためには、観察された代謝産物のそれぞれを

10

20

30

40

50

同定する必要はないが、むしろ該分析技術は、各サンプルの信頼性のある定量的な指紋を与えるべきである。選択される技術は、容易に利用できるものであるのが理想的であるが、これには費用および高度な知識レベルが必要となるため、常に可能であるわけではない。ほとんどの分析化学研究室において標準的な分析装置である、可能な技術の1つは、例えばU V - 可視分光光度検出を用いる高性能液体クロマトグラフィー (H P L C) である。H P L C 技術は、多大な時間を消費するが、投与前サンプルから必要なデータの種類を提供することができる。H P L C 用の検出器の選択は重要な要素であり、分析前のサンプルの化学的誘導化によりデータリカバリを容易にすることができます。N M R スペクトロスコピーの使用は、N M R 実験の任意特定の種類に限定されない。

【 0 1 2 1 】

10

c . 種々の分析装置の変動的動作

異なる分析装置は異なった動作を示し、装置単体の動作は、経時的に変動し得る。O S C のようなデータ・フィルタリングは「管理された」P R 分析における装置の変動の影響を最小限にするのに役立つが、好結果を示すモデルの構築のために投与前のサンプル間の僅かな変動を特徴付ける必要がある場合、このような装置の変動が特に重要となり得る。従って、理想的には、特定のモデル構築において、特定の型のすべての測定を、単一の場合に1つの特定の装置を使用して行う。単一の場合に全分析を行うことが不可能であるならば、確実に、異なる使用期間の間に有意に装置の動作が変動しないことが要求される。複数体または複数種の装置を、モデル構築個体群からの測定に用いる場合、各装置が同様の動作を示すことを確認するためにクロスチェックする必要がある。異なる装置間で動作に有意な差が存在する場合は、装置の除外または再校正を行う必要がある。

20

【 0 1 2 2 】

6 . 多変量 P R 分析の前のデータ操作

P R 分析の前に幾らかのデータ操作を行うことが有用となり得、または必要となり得る。

【 0 1 2 3 】

理想的には、利用できる全ての物理的および / または化学的データを、ケモメトリクス分析のための入力データを作成するのに用いる。しかしながら、得られるデータの種類に応じて、多変量分析前に、幾らかデータを整理する必要があり得る。尿のような生体液の¹H N M R スペクトロスコピー・データについて、バッファリングに関わらず、化学シフトスケール上のピーク位置においてp Hに誘導される小さなシフトに対処するために、このようなデータ整理が用いられてきた。従って、残留水シグナルのような特定の領域を除外した後に、各1 D¹H N M R スペクトルの残りの部分を、連続するセグメント(典型的には、6 0 0 M H zスペクトロメータについて幅0 . 0 4 p p m)への横座標および各セグメントについて得られる積分に従って分割する。このようなデータ整理が必要な場合、その前の試みで適当なモデルが得られなかつたならば、例えば異なるスペクトルセグメント幅を使用するといった、異なるデータ整理方法を試すことが勧められる。O S C のようなデータ・フィルタリング技術の使用は、変量選択で補助することによって、データ整理を容易にすることができます。

30

【 0 1 2 4 】

40

生体液N M R データについて、データ整理された各スペクトルを「標準化」することは一般的な方法であり、これには多くのやり方がある。しばしば、各N M R スペクトルを標準化するか、またはスケールして、データセットにおける他の全てのN M R スペクトルに等しい総積分を得る。更に、他のデータ操作は、例えば尿サンプルからの¹H N M R データを、存在するならば 5 . 4 におけるアラントインピークについての一定積分に、または存在する場合にクレアチニンピークについての一定積分にスケールするのに有用となり得る。ヒトにおいて、尿クレアチニン排泄は、筋肉質量に関連し、これは即ちおおまかに体重に関連する。従って、尿データの一定クレアチニンへのスケールは、体重に関連する排泄の差を除外するのに役立つ。更に、尿中の代謝産物濃度の測度を決定することにより、および各被験体から排泄される尿の量を考慮に入れることにより、各被験体から排泄さ

50

れる代謝産物を正確に示すデータセットを得ることが可能となる。代謝産物の排泄が測定されていて、体重も既知であるが変動的である場合、尿データを体重単位当たりの排泄に標準化することが有用であり得る。また、データを「ブロック」して、特定の範囲内に入る値を有する変量を別個の群として処理することも有用であり得る。

【0125】

PCA、PLSまたはPLS-DAのような分析の特定の制限は、変量の非線形組合せがより有益であり得るという事実にもかかわらず、該分析は存在する変量の有用な線形組合せを見つけること基づくということである。従って、このような分析を行う前に、存在する変量の非線形組合せを加えることによって、Xデータ行列を拡張することが賢明であろう。特に、2変量の比率はしばしば、いずれか一方の絶対値よりも有意であり、比率をとることは、異なる代謝産物の相対量がしばしば重要である場合に、代謝表現型検査について特に役立つであろう。従って、拡張されたX行列は、それ自体に対する1変量の比率を除く、その元の全変量の1対1比率と共に、元のX変量を包含するべきである。この手法は、以下の単純な例において示される：

【表1】

元のX行列：

サンプルまたは対象	変量X 1	変量X 2
A	25	25
B	16	8
C	8	2

10

20

拡張されたX行列：

サンプルまたは対象	変量X 1	変量X 2	変量X 1/X 2
A	25	25	1
B	16	8	2
C	8	2	4

30

【0126】

これより僅かに複雑な例において、元の3個のX変量が拡張されて、新たに6個の変量行列を生じる：

【表2】

元の3変量行列：

サンプルまたは対象	変量X 1	変量X 2	変量X 3
A	25	25	50
B	16	8	32
C	8	2	4

10

拡張された行列：

サンプル 又は対象	変量X 1	変量X 2	変量X 3	変量 X 1 / X 2	変量 X 1 / X 3	変量 X 2 / X 3
A	25	25	50	1	0.5	0.5
B	16	8	32	2	0.5	0.25
C	8	2	4	4	2	0.5

【0 1 2 7】

20

この手法の潜在的な利点は、2つのX変量から1つのY変量を予測したい場合に、以下の単純なPLS型の例において示される：

【表3】

元のデータ行列：

サンプルまたは対象	変量X 1	変量X 2	変量Y 1
A	25	25	2
B	16	8	4
C	8	2	8

30

拡張された行列：

サンプルまたは対象	変量X 1	変量X 2	変量X 1 / X 2	変量Y 1
A	25	25	1	2
B	16	8	2	4
C	8	2	4	8

40

【0 1 2 8】

元の行列には、Y1を生じるような、X1とX2との一定線形組合せは存在しない。しかしながら、記載したようにX行列を拡張することによって、非常に単純な線形関係が明らかとなり、即ち $Y_1 = 2 (X_1 / X_2)$ である。

【0 1 2 9】

データセットにおける各変量について、通常、ケモメトリクス分析を行う前に幾つかのスケール形式が必要となる。典型的なスケール手法としては、平均 - 中心化、単位分散スケールおよびパレートスケールが挙げられる。

【0 1 3 0】

50

7. ケモメトリクス方法論

本発明の範囲は、特定の特異化されたケモメトリクス方法論の使用に限定されないことを理解しておくことが重要である。投与前後のデータ相関を同定および明らかにできるこのような方法論のいかなるものも用いることができる。

【0131】

P L S または P L S - D A のような管理パターン認識 (P R) 方法は、通常標的化されたモデル構築、即ち投与前後のデータ相関を得るために用いられる。これらの管理方法は、P C A のような非管理 P R 方法を使用して、例えば投与化合物に対する応答の変動を調べることにより、または投与化合物の代謝の変動を調べることにより、行なうことができる。このような非管理分析は、外れ値を同定することにおいて、および分類方法を構築するかまたは数的結果モデルを構築するか決定することにおいて、有用となり得る (以下を 10 参照) 。

【0132】

時折、代謝表現型または応答予測の幾つかの態様の投与前識別用モデルを得るためにそれほど高度ではない手法において、P C A のような非管理方法を投与前データに適用することが適当であり得る。この手法は、鋭敏なディスクリミネータを決定する能力において管理方法よりも劣りはするが、簡単であるという利点を有する。このような方法は、投与後の挙動に従って、モデル構築投与前データポイントをコード化 (例えば色分け) できることに基づく。この手法が成功するかしないかは、コード化された個体群を投与前に容易に識別できるかどうかによって決まる。一般に、この非管理手法は、異なる応答群についての比較的明確な投与前ディスクリミネータが存在する場合にのみ適当である。該ディスクリミネータが複雑で、「隠されて」おり、重要なことには、O S C のようなデータ・フィルタリング方法をこの「非管理」手法に用いることができない場合には、適当ではない。

【0133】

モデル構築に用いられるケモメトリクス方法は、想定される、または必要とされる最終用途に応じて決まる。従って、P L S - D A のような分類方法は、目的が代謝表現型の幾つかの態様 (例えば「速い」または「遅い」アセチル化) の分類方法、または投与物質に対する応答の種類 (例えば「薬物有害反応を示す」または「薬物有害反応を示さない」) の予測方法を得ることである場合に、適当である。別法として、目的が代謝能の幾つかの態様の定量的測度を得ること、または投与物質に対する幾つかの応答の数的測度を予測することである場合、P L S のような方法が適当であろう。ニューラル・ネットワーク分析 (N N A) は用途に応じて有用となり得、N N A は、多くの独立した源の 1 つによって、与前の識別が可能となる場合、分類的役割において有利であることが分かっており、例えば X データが A または B または C 型のものであるならば、応答は Y 1 となり、X データがこれらの型のものでないならば、応答は Y 2 となる。重要なことには、ニューラル・ネットワーク方法は、関与する識別を提供するそれらの投与前の特徴を容易に同定することはできない。P C A 、P L S および P L S - D A のような方法は、識別力のある特徴を容易に同定することができ、これは任意の識別の科学的根拠を理解するのに、および他の分析方法を得て同様の識別を行うことが望まれる場合に、重要な利点である。

【0134】

時に、O S C のようなデータ・フィルタリング方法は、投与後データにおいて関与する変動に相関しない投与前データにおける変動を除外するのに用いられる。例えば、O S C は物理的および / または化学的分析に用いる分析装置の動作における任意の変動の影響を最小限に抑えるのに役立つ。

【0135】

外れ値のデータはいくらか矛盾するものであり、またはモデル構築の障害となるため、しばしば、比較的少数の外れ値はモデル構築データから除外する必要があり、P C A スコア・プロットおよび D m o d X 値は外れ値を同定するために用いることができる。P L S モデルの場合、外れ値は以下の方法のいずれかによって正当に除外することができる：

10

20

30

40

50

- a) Xスコア (t_1 / t_2) の試験
- b) X残分 ($D \bmod X$) の試験
- c) XおよびY間隔 (space) におけるスコア間の相関 (例えば t_1 / u_1) の試験
- d) Yスコア (例えば u_1 / u_2) の試験
- e) Y残分 ($D \bmod Y$) の試験。

【 0 1 3 6 】

8 . 応答予測用途

生体に投与される物質は、しばしば種々の異なる代謝変換に付される。その後の各代謝産物は、次いで順に、種々の更なる変換等を受ける。従って、元の1つの化合物の完全な代謝は、異なる経路および多くの異なる酵素の、非常に複雑な局面にかかわり得る。その結果、種々の表現型の様々な影響は、投与物質に対する応答の性質に寄与し、これらの全ての種々の影響を解明するのは非常に困難なものとなり得る。従って、応答予測用途に関して、好ましくは、本発明は、種々の影響を解明することなく、該応答を直接予測するのに用いられる。従って、例えばオスSprague-DawleyラットにガラクトサミンHC1 (800 mg / kg) (実施例1参照) を投与する場合に引き起こされる、非常に多様な程度の肝損傷 (組織病理学および臨床化学パラメータにより示される) は、原則的に、投与前尿の変動に直接相關するため、応答の決定因である代謝因子を理解する必要なしに、ガラクトサミンHC1に対する感受性の予測モデルを提供する。

10

【 0 1 3 7 】

B . モデルバリデーション手順の好ましい特徴

20

モデル妥当性の確認は、あらゆる種類の数学的モデリングにおいて非常に重要である。モデルの信頼性および予測能のバリデーションには、モデル構築に用いたデータから独立したバリデーションデータセットが必要である。モデルの予測能は、バリデーションデータセットについての該モデルを基にした予測に関する誤差の大きさに従って評価される。モデルの正確性は、該モデルについて評価された誤差の大きさを、バリデーションデータセットについての該モデルを基にした予測に関する誤差の大きさと比較することによって判断できる。「未知」のサンプルの未来予測について信頼性があるとみなされるモデルは、予測可能性および正確性の両要件を満たすべきである。

【 0 1 3 8 】

P L S モデルの場合、「内部」および「外部」の両方のバリデーションは以下のようにして行われる：

30

P L S モデルの「内部」バリデーションは、第一に $R^2 Y$ および $Q^2 Y$ 値の決定により、そして第二に、Yデータの位置を、これらに対応するX行列中の列についてランダム化すること (典型的には、20個の別個の列の並べ替えが行われる) の、 $R^2 Y$ および $Q^2 Y$ 値に対する影響の観察により、行うことができる。 $R^2 Y$ は P L S モデルの能力の測度を与え、該モデルに含まれる全データを用いて Xデータから Yデータを説明する。しかしながら、過剰適合によって擬似的に高 $R^2 Y$ 値を得ることができ、P L S モデルのリアル・テストはその予測能である。 $Q^2 Y$ は P L S モデルの予測能の測度を与え、これはクロスバリデーション手順により得られ、ここで X Yデータの種々の部分が、該データの残りの部分から得られるモデルを使用する、XからYの予測について順次に提供される。 $Q^2 Y$ は通常 $R^2 Y$ より小さいが、 $R^2 Y$ および $Q^2 Y$ は共に理論上の最大値1を有する。 $R^2 Y$ および $Q^2 Y$ の実効値に従い、 $R^2 Y$ に近接する $Q^2 Y$ の値は良好な予測能を暗示する。 P L S モデルの内部バリデーションの第2段階において、Yデータの位置がランダム化され、元のモデルが妥当であるならば $R^2 Y$ および $Q^2 Y$ の両値は実質的に減少する。 Yデータの位置を、これらに対応するX行列中の列についてランダム化することにより、 $Q^2 Y$ は大きく減少し、理想的には0になる。また、モデリング手順は常に、Xデータ中で、ランダム化されたYデータを予測できるものを、ノイズでさえ、検出することを試みるため、 $R^2 Y$ 値は、ランダム化されたYデータ上で実質的に減少するが、必ずしも0まで減少するとは限らない。

40

【 0 1 3 9 】

50

P L S モデルの「外部」バリデーションは、モデル構築個体群の部分を形成せず、そのY値が該モデルにおけるYデータの範囲にほぼかかるような動物のテストセットをとることによって行うことができる。妥当であるとみなされるモデルについて、試験サンプルの予測誤差 (Umetrics社製のSIMCAソフトウェアにおいて、これはRMSEP - 予測の平均平方誤差と示される) は、該モデルサンプルの推定誤差 (Umetrics社製のSIMCAソフトウェアにおいて、これはRMSEE - 推定の平均平方誤差と示される) と同じ範囲になくてはならない。

【0140】

C. 試験手順の好ましい特徴

この発明の非常に重要な特徴の1つは、異常なまたは極端な代謝表現型を有する被験体の同定に関する。このような被験体は特に、有害なまたは特異な薬剤反応を受ける傾向があり得る。任意のモデル構築動作試験に含まれ得る被験体の数に適用される実際的制限を考えると、代謝表現型の全範囲に基づくモデルを構築することは不可能であり、希少な表現型は含まれるべきではないであろう。更に、民族的差異は表現型の変動の重要な情報源となるであろう。しかしながら、本発明の重要な特徴において、試験段階では、モデルにおける表現型の範囲に適合しない任意表現型は、外れ値としてみなすことができる。PCAおよびPLSモデルの場合、例えばこれらの外れ値は、PCAもしくはPLSスコアにより説明されるモデル平面もしくは超平面の方向において、またはモデル残差方向、モデルへの距離 (DMoDX, Y) において、検出される。更に、PLSモデリングの場合、スコア方向における外れ値はX - 間隔 (T) において、Y - 間隔 (U) において、およびXとYとの間の内部相関 (T/U) において存在できる。外れ値として同定された被験体では、その代謝表現型は十分な信頼性をもって同定することができず、またはその当該投与物質に対する応答は、予測することができない。従って、応答予測用途において、このような外れ値に対して全く物質を投与しないか、または慎重に、例えば初期低用量を用いて処理するかのいずれかが賢明であろう。従って、モデル構築手順の実際的制限にも関わらず、該モデルは被験体の全てについて有用な情報を提供することができる。

【0141】

例えば、被験体の尿の单一のNMRスペクトルは、種々の処理に対する被験体の応答を予測するための、または被験体の代謝表現型の幾つかの態様を評価するための、種々のモデルに対して比較することができる。NMRスペクトルは、必要なときに使用するために電気的に保存することができる。この種の手法は、代謝表現型の年齢に関連する変化を許容するために被験体の一生の異なる段階での試験が必要とされ得るが、必要とされる物理的および/または化学的試験の量を減少させる。

【0142】

通常、新規モデルは、1物質に対して誘導されるモデルが近縁の物質に関して使用可能であり得るにも関わらず、関与する物質のそれぞれについて必要とされる。

【0143】

本発明の各態様の好ましい特徴は、他の態様のそれぞれについて、必要な変更を加えて得られるものである。本明細書に挙げられる先行技術文献は、法的に許容される最大限までここに加入される。

【0144】

〔実施例〕

実施例1

ガラクトサミン塩酸塩の投与に対するSprague-Dawleyラットの変動的応答。投与前生体液サンプルのNMRスペクトルの、単純な応答をコード化したPCAの使用に基づく、可能な応答予測方法の例

30匹の若年齢に対応するオスSprague-Dawleyラットを、Charles River、フランス、から入手した。これらがそれぞれ健康な状態を示していることを確認するために観察した後に、水、および標準的な商業的実験用食餌 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Villemaison-sur-Orge, フランス、製の食餌AO4C) を自由に摂取できるようにして、個

10

20

30

40

50

々の代謝ケージ中に入れた。研究室の温度を 20 ± 2 に、そして相対湿度を 60 ± 20 % に維持した。研究室の空気を、1時間に14回フィルターを通して交換した。一定の「12時間明 - 12時間暗」サイクルに置いた。短期間、ケージに「順応」させてから研究を開始した。サンプリング方法は、表1.1に示すとおりである。

【表4】

表1. 1 : ガラクトサミンHC1研究のためのサンプリング方法。B、UおよびPは、それぞれ血液、尿および病理についてのサンプリングを意味する。投与は、1日目の開始時に行った。

群	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
尿採取時間/日	0-7	0-7	0-7	0-7	7-24	0-7	0-7	0-7	0-7	0-7	0-7	-
後期に安楽死させた群	BU	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	BP
早期に安楽死させた群	BU	U	U	U	U	BP	-	-	-	-	-	-

【0145】

投与時（開始1日目）に、成長中のラットはそれぞれ体重約260gであった。ガラクトサミン（略称GalN）HC1（Sigma、フランス、社製）を生理食塩水に溶解して、腹腔内注射によりそれぞれ200mg/kgまたは800mg/kgで投与し；動物10匹（番号101～110）に低用量で投与し、動物10匹（番号201～210）に高用量で投与した。対照動物10匹（番号1～10）にはトウモロコシ油を経口で投与した。

【0146】

ラット10匹からなる各群から5匹ずつを、2日目にCO₂で安楽死させて、残りは、8日目に同様にして安楽死させた。早期に安楽死させたラットは番号6～10、106～110および206～210であった。後期に安楽死させたラットは番号1～5、101～105および201～205であった。

【0147】

投与前後の尿サンプルを、毎日7時間、抗菌保存剤としてアジ化ナトリウム（10%（w/v）アジ化ナトリウム水溶液0.100ml）を含む氷冷容器に採取した。投与の日には、さらに1晩尿を採取した（投与後7～24時間）。各採取の前に尿採取装置を消毒して、細菌、食物および糞による汚染を最小限に抑えた。尿サンプルをNMR分析まで急速冷凍保存した。

【0148】

血液を、イソフルレン麻酔を行って、眼窩洞からサンプリングした。血液を-3日目、および安楽死させる直前の2日目または8日目に全動物からサンプリングした。安楽死させてから、各ラットを組織病理学検査のためのサンプルとして、各ラットから肝サンプル10個（各肝葉から2個）を採取するなどのサンプリングを行った。血液サンプルを抗凝結剤としてヘパリンリチウムを含む容器中に回収して、すぐに-4で遠心分離して血漿を分離した。各血漿サンプルの一部を、AU600マルチパラメトリック臨床分析器（Olympus）により、多くの中からアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）を含む臨床化学パラメータの範囲につい

10

20

30

40

50

て、30で分析した。

【0149】

尿400μlを、リン酸緩衝液(0.2MNa₂HPO₄と0.2MNaH₂PO₄との81:19(v/v)混合物; pH 7.4)200μlと混合して尿サンプルをNMR分析用に調製し; 不十分量の尿を利用する場合は、不足分を純水で補って最小で200μlとした尿を用いた。尿-緩衝剤混合物を室温で10分間静置して緩衝化して、次いで13,000r.p.mで更に10分間遠心分離して、懸濁した粒子を除去した。「透明な」緩衝化尿500μlをNMR管に移して、TSP/D₂O溶液50μlを加えた。TSP(ナトリウム3-トリメチルシリル-[2,2,3,3-²H₄]-1-プロピオネート)は、NMR実験で用いられる化学シフト標準化合物(0)であり、D₂Oは、NMRスペクトロメータのために磁場/周波数ロックを提供した。TSP/D₂O溶液の濃度は、NMR管中でTSP終濃度0.1mMとなるようにした。水シグナルの大きさを減少するために用いられるNOESY-PRESATパルスシーケンス(Claridge, 1999)を用いて、Bruker AMX 600 MHz NMRスペクトロメータにより、30でNMR分析を行った。主要収集パラメータ(principal acquisition parameter)は次のとおり:

スペクトロメータ周波数: 600 MHz

スペクトル幅: 約7200 Hz (12 ppm)

Brukerパルスプログラム: noesypr1d

タイムドメインにおけるデータポイント数: 65536

スキャン数: 64

20

ダミースキャン数: 4

収集時間: 約4.55秒

前飽和時間(Presaturation Time): 3秒

混合時間: 0.1秒

【0150】

収集後、自由誘導減衰シグナルに適用した指數乗法により、0.3 Hzの線の広がりの適用に従い、32768データポイントへとフーリエ変換した。スペクトルをフェーズして、NMRシグナル周りに一様なベースラインを得て、TSPピークに値0を割り与えることにより化学シフトスケールを設定した。データ整理の前に、-1日目のそれぞれのスペクトルのベースラインを、直線ベースライン修正アルゴリズムを用いて、0強度に移した。これら全てのスペクトル処理操作は、「xwinnmr」ソフトウェア(Bruker GmbH)を使用して、Silicon Graphicsコンピューターにより行った。

30

【0151】

投与後の尿のNMRスペクトルの外観検査により、内因性代謝に対するガラクトサミンHCl(800mg/kg)の影響に関して、動物間で大きな変動があることが明らかになった(表1.5並びに図1-3および1-4参照)。外観試験に基づき、動物を(i)「応答動物」、または(ii)「弱応答または無応答動物」のいずれかに容易に分類できた。更に、応答動物は、投与後0~24時間にわたって、その尿中に、弱応答または無応答動物に比べて、非常に多量のガラクトサミンを排泄することが分かり(図1-1および表1.6参照)、これはガラクトサミン代謝とその毒性との関係を示す。

40

【0152】

図1-1は、3種のNMRスペクトルを示す。スペクトル「a」は、投与後0~7時間に動物201から採取された1日目の尿のものである。スペクトル「b」は、本物のGalN HClから得られたものである。スペクトル「c」は、投与後0~7時間に動物203から採取された1日目の尿のものである。スペクトル「a」および「c」は、一定アラントイン(5.4)ピーク高さにスケールされる。GalNは動物201からの尿中でははっきりと見られるが、動物203からの尿ではそうではない。

【0153】

更に、応答動物は、投与後24~31時間に採取された尿サンプルのNMRスペクトルにおいて、少なくとも大部分の弱応答または無応答動物のスペクトルにおいては存在しな

50

い、特定の N - アセチルピークの存在を示した(図 1 - 2 参照)。このピークを、暫定的に N - アセチルガラクトサミンに割り当てた。また、800 mg / kg の投与に対する応答においての、動物間の大きな変動は、組織病理学的および臨床科学的データを反映した(表 1. 2 ~ 1. 4 参照)。

【 0 1 5 4 】

図 1 - 2 は、投与後 24 ~ 31 時間に動物 202 (スペクトル「a」) および 203 (スペクトル「b」) から採取された 2 日目の尿サンプルの NMR スペクトルを示す。該スペクトルは、一定クレアチニンにスケールされる。N - アセチルガラクトサミンと考えられる N - アセチル化体は、スペクトル「a」においてははっきりと見られるが、スペクトル「b」においてはそうではない。

10

【 0 1 5 5 】

次いで、ガラクトサミン塩酸塩 (800 mg / kg) を続けて投与した動物の、- 1 日目(投与前)の尿サンプルの NMR スペクトルについて PCAを行った。- 1 日目の尿は動物 206 の NMR スペクトルを得るには不足していたため、このデータセットは 9 個のスペクトルで構成されていた。PCA の前に、- 1 日目のスペクトルのそれぞれを、「AMIX」ソフトウェア (BrukerGmbH) を使用して一定の様式で「データ整理」した。9.0 ~ 6.25 および 4.5 ~ 2.76 および 2.48 ~ 0.5 の領域を保持して、特定のスペクトル領域を切り捨てた。保持した領域を、できる限り、連続的な 0.04 ppm 幅のセグメントに分割して、各スペクトルの各セグメントについて積分を得た。次いで、データ整理値を均一に標準化して、各「スペクトル」について総積分値 1000 を得た。結果として得られたデータセットを、多変量統計分析ソフトウェアパッケージ (In fometrix社製「Pirouette」) にロードした。次いで、各変動について、平均 - 中心化によってスケールして PCAを行った。結果として得られたスコア・プロットを、投与後の挙動に従って色分けして、検査によって、PC1 対 PC5 のスコア・プロットが、応答動物と無応答動物との分離を与えることが分かった。このプロットおよび対応するローディング・プロットは、それぞれ図 1 - 5 および 1 - 6 に示す。図 1 - 5 の試験は、個々のラットのガラクトサミン HC1 (800 mg / kg) 投与に対する応答が、既知の応答動物および無応答動物に対してどのようにマッピングされるかに従って、適当な投与前 PCA スコア・プロットから予測できることを示唆している。図 1 - 6 は、このような分析が、応答動物および無応答動物の識別を可能にする投与前の特徴をどの程度明らかにできたかを示している。

20

【 0 1 5 6 】

以下の種々の図および表は、ガラクトサミン HC1 (800 mg / kg) に対する種々のラットの変動応答の詳細を示し、投与前に応答動物および無応答動物を識別するのに、如何に PCA を用いることができるかを示している。PLS、PLS - DA またはニューラル・ネットワーク分析を用いる 管理された PR 方法は、本明細書に記載される 非管理 の方法よりも良好に、応答動物と無応答動物との投与前識別を行うことができるようである。

30

【 0 1 5 7 】

【表5】

表1. 2: ガラクトサミンHC1投与ラットにおける組織病理学的変化の概要

日	ガラクトサミン塩酸塩の投与		
	200mg/kg	800mg/kg	
2	対照との違いなし	<p>動物の4/5において、肝細胞壊死の多病巣性の不規則に散在した病巣が存在した。</p> <p>変化の重篤度：</p> <p>208-なし 207-軽度 206、210-要注意 209-重度</p> <p>ほとんどの壊死性肝細胞が、著しく好酸球性の細胞質および濃縮核で丸くなっていた。幾つかの変性した肝細胞は、微細な細胞質液胞形成を示した。出血性の病巣がときに見られたが、混合された炎症性細胞が壊死性の病巣およびポータルスペースに浸潤した。</p>	10
8	対照との違いなし	<p>動物の2/5 (201および202)において、胆管過形成が見られ、この変化は、僅かな肝細胞の核大小不同および幾つかのヘモジデリン沈着マクロファージを伴った。</p>	20

【0158】

【表6】

表1. 3：投与後24時間でサンプリングされた血漿の臨床化学分析。
略語の一覧および測定の単位については表1. 4を参照のこと。

STUDY	ANIMAL	5'-NT	A/G	ALAT	ALB	AP	ASAT	TBA
99023	6	23	1.4	51	34	635	82	69.0
99023	7	27	1.4	52	33	688	77	24.0
99023	8	21	1.3	62	33	732	103	29.0
99023	9	18	1.5	46	32	497	75	20.0
99023	10	26	1.5	50	34	492	86	16.0
99023	106	23	1.3	43	33	606	107	48.0
99023	107	21	1.4	46	33	495	84	22.0
99023	108	21	1.5	49	37	566	73	29.0
99023	109	19	1.4	38	34	697	67	23.0
99023	110	27	1.4	47	33	637	75	29.0
99023	206	156	1.7	2350	32	787	4320	493
99023	207	23	2.1	178	33	983	264	43.0
99023	208	17	1.5	45	34	666	79	20.0
99023	209	203	2.4	4300	33	999	10600	1300
99023	210	35	1.8	479	31	852	832	65.0

【0159】

10

20

30

【表7】

表1. 3 (つづき)

STUDY	ANIMAL	BILI	CHOL	CREA	GGT	GLUC	PROT	TRIG	UREA
99023	6	0.11	72	0.5	0	144	58	108	27
99023	7	0.09	77	0.4	0	186	56	93	23
99023	8	0.1	78	0.5	0	173	58	142	22
99023	9	0.1	70	0.5	0	185	53	130	31
99023	10		62	0.5		176	57	96	24
99023	106	0.09	73	0.5	0	173	59	94	29
99023	107	0.05	60	0.5	0	184	56	158	40
99023	108	0.11	91	0.5	0	167	61	140	33
99023	109	0.1	72	0.4	0	138	58	109	28
99023	110	0.12	81	0.5	0	182	57	127	28
99023	206	1.26	60	0.4	2	100	51	38	45
99023	207	0.06	15	0.4	0	162	49	89	24
99023	208	0.11	61	0.5	0	168	56	148	29
99023	209	1.37	42	0.4	5	80	47	95	40
99023	210	0.12	46	0.4	1	130	48	38	25

10

20

30

【0160】

【表8】

表1. 4: 血漿の化学略語および単位

略語	パラメータ	単位
5' -NT	5' -ヌクレオチダーゼ	I U/L
A/G	アルブミン/グロブリン比	なし
ALAT	アラニンアミノトランスフェラーゼ	I U/L
ALB	アルブミン	g/L
AP	アルカリホスファターゼ	I U/L
ASAT	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	I U/L
TBA	総胆汁酸	μmol/L
BIL	ビリルビン	mg/dL
CHOL	総コレステロール	mg/dL
CREA	クレアチニン	mg/dL
GGT	γ-グルタミルトランスフェラーゼ	I U/L
GLUC	グルコース	mg/dL
PROT	総タンパク質	g/L
TRIG	トリグリセリド	mg/dL
UREA	尿素	mg/dL

10

20

30

【0161】

【表9】

表1. 5 : ガラクトサミンHC 1投与ラットにおいてNMRにより観察された尿中変化の概要。
これらの結果は、ラットの後期安楽死群（動物1～5、101～105および201～205）についてのものである。

ガラクトサミン塩酸塩の投与	
200 mg/kg	800 mg/kg
1日目の尿サンプル中には、非常に変動的な量のガラクトサミンが存在した。	1日目の尿サンプル中には、非常に変動的な量のガラクトサミンが存在した。動物201および202からのサンプルには多量のガラクトサミンが含まれていたが、動物203～205のサンプルに含まれていたのは非常に少量であった。表1. 6および図1-1参照。 約2.07 ppmにおけるN-アセチル：この新しいピークは、動物201および202からの2日目のサンプルにおいてのみ、はっきりと見られた。このピークは、基準物質の添加により、N-アセチルガラクトサミンに由来するものとして暫定的に同定された。 タウリン：動物203～205は明確な変化を示さなかったが、動物201および202はレベルが著しく上昇した。 クレアチン：動物201および202のみが、3日目にクレアチンの明確な増加を示した。 グアニジノ酢酸：動物201および202のみが、GAAレベルの明確な変化を示した；これらの両動物において、3日目にレベルが著しく上昇し、7日目にはおそらく若干低下した。 2-オキソグルタレート：動物203～205は、2-オキソグルタレートレベルの明確な変化を示さなかった。動物201および202は、2および3日目にレベルの減少を示したが、7日目にはレベルが著しく上昇した。 トリメチルアミノ-N-オキシド：動物203～205は、TMAOレベルの明確な変化を示さなかった。投与前レベルは正常であったにもかかわらず、本質的に、動物201および202から得られた3日目の尿サンプルからTMAOは観察されなかった。 胆汁酸：動物201および202からの3日目のサンプルにおいて明らかに上昇した（C18メチルとして観察された）。
タウリン：数例でタウリンが上昇したが、明確で一貫性のあるパターンは存在しなかった。 クレアチン：増加しなかつた。	ベタイン：動物201および202からの2および3日目のサンプルにおいて非常に明確に観察され、これら両動物からの7日目のサンプルにおいても依然として幾らかのベタインが存在した。動物204～205からの尿サンプルのいずれにもベタインは検出されなかつた。動物203からの3日目のサンプルにおいて、極微量のベタインの存在が検出できた。

【0162】

【表10】

ウロカニン酸：動物201および202からの2および3日目のサンプルにおいて明確に観察されたが、他のいずれのサンプルにも観察されなかった。	10
ヒスチジン：動物201からの3日目のサンプルにおいて非常に明確に観察され、202からの3日目のサンプルにおいて、201ほど明確ではなかったが観察された。ヒスチジンは、他の試験された高用量投与群からの尿サンプルのいずれにおいても存在しなかった。	
スレオニン：動物201および202からの3日目のサンプルにおいて非常に明確に上昇した。スレオニンレベルは、他の高用量投与群サンプルの全てにおいて正常値であった。	20
アラニン：動物201および202からの3日目のサンプルにおいて明確に上昇したが、他のものについては正常値であった。	
グルコース：動物201および202からの2日目および3日目の尿サンプルにおいて上昇した。ときに、他の高用量投与動物においてグルコースの上昇が見られた（動物204の3日目；動物205の7日目）。	30
動物201および202からの2日目の尿スペクトルにおいて、未確認化合物に起因する約δ5.21における2重線が明確に存在した。この二重線は、動物201～205のいずれの他の尿サンプルスペクトルにおいても、はっきりとは見られなかった。	
ヒプレート：動物201および202からの3日目のサンプルにおいて減少した。	40
グルタメートおよびグルタミンは、動物201からの3日目の尿スペクトルにおいて上昇し、動物202からの3日目の尿スペクトルにおいても上昇が確認できた。	
列挙した他にも変化が生じていた。	

【0163】

図1-3は、動物202からの-1日目および+3日目の尿サンプルのnoesypresat NMRスペクトルの一部を示す。投与前サンプル（スペクトル「a」）は、投与前24～17時間に採取した。投与後サンプル（スペクトル「b」）は、投与後48～55時間に採取した。スペクトル「a」と比較して、スペクトル「b」は、クレアチン、ベタイン、グアニジノ酢酸（GAA）およびタウリンの増加、並びにトリメチルアミン-N-オキシド（TMAO）および2-オキソグルタレートの減少を示した。

【0164】

図1-4は、動物201からの-1日目および+3日目の尿サンプルのnoesypresat NMRスペクトルの一部を示す。投与前サンプル（スペクトル「a」）は、投与前24～17時間に採取した。投与後サンプル（スペクトル「b」）は、投与後48～55時間に採取した。スペクトルは一定アラントインにスケールした。スペクトル「a」と比較して、スペクトル「b」はヒスチジン排泄の増加およびヒプレート排泄の減少を示した。

【0165】

【表 1 1】

表1. 6： 尿中に排泄されたガラクトサミン量に関する、ガラクトサミンHC 1 (800 mg / kg) に対する応答の変動性。この表は、各動物について、投与後0～24時間に採取された尿中に排泄されたガラクトサミンの量を示し、毒性応答が観察されたかどうかを記載する。

動物番号	投与後0～24時間に採取した尿中に排泄されたガラクトサミンの総量 (mg)	応答動物 (R) または無応答動物 (NR)	R/NR分類に関する証拠源
201	40.0	R	尿NMR、組織病理学
202	26.2	R	尿NMR、組織病理学
203	0.4	NR	尿NMR、組織病理学
204	0.1	NR	尿NMR、組織病理学
205	0.3	NR	尿NMR、組織病理学
206	14.9	R	組織病理学
207	8.4	NR (または弱R)	組織病理学
208	2.3	NR	組織病理学
209	28.2	R (重度)	組織病理学
210	30.5	R	組織病理学

【0166】

動物206が排泄したガラクトサミンの測定量は、これが強応答動物であると考えた場合、予想されるよりも幾分低かった。これは膀胱に尿が残留していたためと考えられる。動物206が投与後0～24時間の間に排泄した尿はたった3.7 mlであり、この期間に動物が生産した尿の量では最低値であった。測定される尿容量が非常に少ない場合、代謝産物排泄は最も低く評価され；これは、膀胱中に、排尿を引き起こすには不十分である有意量の非常に高濃度の尿が存在するためと考えられる。

【0167】

図1-5は、高用量投与 (800 mg / kg) 動物からの、利用可能な - 1日目の尿サンプル、9個の¹H NMRスペクトルのPCAにより得られたPCAスコア・プロットを示し；動物206からの不十分量の - 1日目の尿は、NMRスペクトルを得るのに利用可能であった。データポイントは、無応答動物（動物番号203、204、205、207および208）については菱形、応答動物（動物番号201、202、209、210）については×印を用いてコード化したが、動物207は応答動物と無応答動物の境界線上にあったことについては言及されるべきである。このプロットは、ガラクトサミン800 mg / kgによる悪影響を受ける動物および受けない動物の投与前尿スペクトル間で識別できる特徴が存在することを示す。応答動物は、無応答動物に比べて、尿クレアチニンの高い投与前レベルを有し、1匹（動物201）を除く全ての応答動物は、投与前の尿の2才キソグルタレート / クレアチニン比率について無応答動物よりも低い値を有した（図1-6も参照のこと）。

【0168】

図1-6におけるプロットされた点のそれぞれは、相当する0.04 ppm幅スペクト

10

20

30

40

50

ルセグメントの中心に従って標識した。従って、例えば 3.02 で標識された点は、3.04 ~ 3.00 ppm のスペクトルセグメント（または变量）を表す。当該のポイントは、実質的に 0 ではなく、PC1 および 5 に寄与するものである。図 1-5 と 1-6 の比較により、応答動物に比べて、無応答動物は 3.02 を中心としたスペクトルセグメントの積分について比較的に高い値を有することが示される。この差異は、無応答動物において 2-オキソグルタレートのレベルがより高いことに起因し、また 2-オキソグルタレートは、2.46 を中心としたセグメントに寄与すると考えられる。トリメチルアミン-N-オキシドは、3.26 を中心としたセグメントに主に寄与し、従って無応答動物は、高レベルの尿中 TMAO を有し得る。これについて考えられる 1 つの解釈は、無応答動物が遅いアセチレーターであったということである。

10

【0169】

実施例 2

変動的な尿イソニアジド代謝産物パターン、およびそのラットにおけるイソニアジドの毒性との関係。個体間の代謝能における極めて有意な差異の実施例

30 匹の若年齢に対応するオス Sprague-Dawley ラットを、Charles River、フランス、から入手した。これらがそれぞれ健康な状態を示していることを確認するために観察した後に、水、および標準的食餌 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Villemoisson-sur-Orge, フランス、製の食餌 AO4C) を自由に摂取できるようにして、個々の代謝ケージ中に入れた。研究室の温度を 20 ± 2 に、そして相対湿度を $60 \pm 20\%$ に維持した。研究室の空気を、1 時間に 14 回フィルターを通して交換した。一定の「12 時間明 - 12 時間暗」サイクルに置いた。ラットが約 6 週齢で体重約 200 g であるときに、短期間、ケージに「順応」させてから研究を開始した。

20

【0170】

投与を、「1 日目」として指定した日に行い、このとき成長中のラットはそれぞれ体重約 250 g であった。イソニアジド (Sigma、フランス、社製) を生理食塩水に溶解して、腹腔内注射によりそれぞれ 200 mg / kg または 400 mg / kg で投与し；動物 10 匹（番号 101 ~ 110）に低用量で投与し、動物 10 匹（番号 201 ~ 210）に高用量で投与した。対照動物 10 匹（番号 1 ~ 10）には食塩水を腹腔内注射により投与した。

【0171】

30

投与前後 7 時間の尿サンプルを、抗菌保存剤としてアジ化ナトリウム (10% (w/v)) アジ化ナトリウム水溶液 0.1 ml を含む氷冷容器に常に採取した。投与後 7 ~ 24 時間に、さらに 1 晩尿を採取した。各採取の前に尿採取装置を消毒して、細菌、食物および糞による汚染を最小限に抑えた。各尿サンプルの最終容量は、アジド溶液についての補正を行わずに決定した。尿サンプルを分析まで急速冷凍保存した。

【0172】

組織病理学検査のために、安楽死の直前に投与前血液サンプルを採取し、また安楽死の直後にもサンプリングを行なうことが意図された。実施例 1 と同様にして、ラット 10 匹からなる各群から 5 匹ずつを、投与の 1 日後に CO₂ で安楽死させて、これにより早期の血液および組織病理学検査用サンプルを得；残りは、投与の 7 日後に同様にして安楽死させて、これにより後期の血液および組織病理学検査用サンプルを得ることが意図された。早期に安楽死させるラットは番号 6 ~ 10、106 ~ 110 および 206 ~ 210 として、後期に安楽死させるラットは番号 1 ~ 5、101 ~ 105 および 201 ~ 205 とすることが計画された。しかしながら、高用量のイソニアジドを投与した群の数匹の動物（番号 204、205、207 および 209）は、突然の痙攣をおこして、死んだかまたは苦痛を回避するために早くに安楽死させなければならなかった。注目すべきことには、比べると、他の高用量投与群の動物（番号 201 ~ 203、206、208 および 210）は、害の明確な臨床兆候を示さなかった。尿サンプルを NMR 分析まで急速冷凍保存した。

40

【0173】

50

尿 $400 \mu\text{l}$ を、リン酸緩衝液 (0.2M Na_2HPO_4 と 0.2M NaH_2PO_4 の 8 1 : 1.9 (v/v) 混合物) $200 \mu\text{l}$ と混合して尿サンプルを NMR 分析用に調製し；不十分量の尿を利用する場合は、不足分を純水で補って最小で $200 \mu\text{l}$ とした尿を用いた。尿 - 緩衝剤混合物を室温で 10 分間静置して緩衝化して、次いで 13,000 rpm で更に 10 分間遠心分離して、懸濁した粒子を除去した。「透明な」緩衝化尿 $500 \mu\text{l}$ を NMR 管に移して、TSP / D_2O 溶液 $50 \mu\text{l}$ を加えた。TSP (ナトリウム 3-トリメチルシリル - [2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] - 1 - プロピオネート) は、NMR 実験で用いられる化学シフト標準化合物 (0) であり、 D_2O は、NMR スペクトロメータのために磁場 / 周波数ロックを提供した。TSP / D_2O 溶液の濃度は、NMR 管中で TSP 終濃度 0.1 mM となるようにした。水シグナルの大きさを減少するために用いられる NOESY-PRESAT パルスシーケンス (Claridge, 1999) を用いて、Bruker AMX 600 MHz NMR スペクトロメータにより、303 K で NMR 分析を行った。主要収集パラメータは次のとおり：

スペクトロメータ周波数 : 600 MHz

スペクトル幅 : 約 7200 Hz (12 ppm)

Bruker パルスプログラム : noesypr1d

タイムドメインにおけるデータポイント数 : 65536

スキャン数 : 64

ダミースキャン数 : 4

収集時間 : 約 4.55 秒

前飽和時間 : 3 秒

混合時間 : 0.1 秒

【0174】

収集後、NMR スペクトルを、自由誘導減衰シグナルに適用した指數乗法により、0.3 Hz の線の広がりの適用に従い、32768 データポイントへとフーリエ変換した。スペクトルをフェーズして、NMR シグナル周りに一様なベースラインを得て、TSP ピークに値 0 を割り与えることにより化学シフトスケールを設定した。スペクトルおよび選択した展開を紙上にプロットした。スペクトルのセットを多変量パターン認識方法により調べる場合に、各スペクトルのベースラインを、直線ベースライン修正アルゴリズムを用いて、0 強度に移した。これらのスペクトル処理操作は、「xwinnmr」ソフトウェア (Bruker GmbH) を使用して、Silicon Graphics コンピューターにより行った。

【0175】

投与後 0 ~ 7 時間に採取された NMR スペクトルの外観検査により、イソニアジドに由来すると考えられる特定の代謝産物のパターンにおいて、大きな変動があることが明らかになった。この変動は、3 種の異なる N-アセチル化体に由来すると考えられる、2 ppm の領域中の 3 つのピークにおいて特に明らかであった。これらの約 2.22、2.20 および 2.15 ppm のピークは、これ以降はそれぞれピーク「a」、「b」および「c」と呼び、これらを生じる化合物は、これ以降は化合物「A」、「B」および「C」と呼ぶ。各投与において、本質的に、これらの代謝産物の 2 種の異なるパターン型が存在すると考えられ、これらの異なるパターン (「1 型」および「2 型」と呼ぶ) の例は図 2-1 を示す。

【0176】

また、イソニアジド (200 mg / kg) 投与後 0 ~ 7 時間に採取された尿サンプルの、データ整理された NMR スペクトルの PCA により、代謝の変動が明らかになった (図 2-2 参照)。この分析を行うために、利用可能な 9 種のサンプルの NMR スペクトルを、まず、AMIX プログラム (Bruker GmbH) を用いて一定の様式で「データ整理」した。N-アセチル領域 2.23 ~ 2.13 を除く全スペクトル領域を切り捨てた。各スペクトルの残った部分を 2 つの連続した 0.05 ppm 幅のセグメントに分割して、各セグメントについて積分を得た。次いで、データ整理された値を標準化して、各「スペクトル」について総積分値 1000 を得た。結果として得られたデ - タセットを、多変量統計

10

20

30

40

50

分析ソフトウェアパッケージ (Infometrix社製「Pirouette」) にロードし、各変量 (スペクトルセグメント) の、平均を中心としたスケーリングを用いて主成分分析 (PCA) を行った。これは、たった2つの入力変量を用いる、PCAのごくありふれた例であるが、予め決定されたとおりの、異なる2種のN-アセチルパターン型の存在を支持し、1型動物は動物101、103および109であり、2型動物は動物102、105、106、107、108および110であった。図2-2において、1型動物のデータポイントは×印で示され、これに対して2型動物のデータポイントは菱形で示される。

【0177】

イソニアジドは、ヒトにおいてのその代謝がN-アセチレーター表現型による影響を受けるような物質の古典的な例であり、この例において観察された異なる代謝産物パターンは、試験群内の、遅い、および速い、N-アセチレーターの存在を示唆した。イソニアジド代謝産物パターンは、いくらかは用量依存性であるが、1日目 (0~7時間) の全ての尿スペクトルを、用量レベルに関係なしに一定のピーク高さ比率基準に基いて、1型または2型パターンのいずれかを有するものとして割り振ることができる (表2.1参照)。注目すべきことに、高用量レベルにおいて、N-アセチルの2型パターンを示す動物のみが、腎機能障害 (尿中グルコースおよび/またはラクテートの増加により示される)、痙攣および死を含む特定の毒性応答を示すことが観察された (表2.1参照)。

【0178】

【表12】

表2. 1. イソニアジドを200および400mg/kgでオスSpague-Dawleyラットに投与した後に観察された代謝挙動および他の挙動の概要。

表2. 1. 第1部.

動物番号	用量 (mg/kg)	a = 2.22ppm pk. ht.	b = 2.20ppm pk. ht.	c = 2.15ppm pk. ht.
101	200	5	30	66.5
102	200	14	62.5	75
103	200	3	22	49
104	200	スペクトルなし	スペクトルなし	スペクトルなし
105	200	14.5	101	82.5
106	200	18.5	79	110
107	200	12	42	44.5
108	200	41	140	101
109	200	6	29	89
110	200	17	70	47.5
201	400	9	44	65.5
202	400	10	48	76.5
203	400	9.5	49	72
204	400	21.5	99.5	28.5
205	400	12.5	68	14
206	400	45	157	69.5
207	400	34	113	25
208	400	14	81	114.5
209	400	34	128	31.5
210	400	6.5	41	77

ピーク高さ (pk. ht. と略される) は、局部的ベースラインを引いた後にプロットしたスペクトルからミリメートルで測定した。

【0179】

【表13】

表2. 1. 第2部.

動物番号	用量 (mg/kg)	c/b pk. ht. 比率	c/a pk. ht. 比率	アセチル型
101	200	2.2	13.3	1
102	200	1.2	5.4	2
103	200	2.2	16.3	1
104	200	スペクトルなし	スペクトルなし	スペクトルなし
105	200	0.8	5.7	2
106	200	1.4	5.9	2
107	200	1.1	3.7	2
108	200	0.7	2.5	2
109	200	3.1	14.8	1
110	200	0.7	2.8	2
201	400	1.5	7.3	1
202	400	1.6	7.7	1
203	400	1.5	7.6	1
204	400	0.3	1.3	2
205	400	0.2	1.1	2
206	400	0.4	1.5	2
207	400	0.2	0.7	2
208	400	1.4	8.2	1
209	400	0.2	0.9	2
210	400	1.9	11.8	1

【0180】

N - アセチルパターン型の決定基準：

低用量：1型：c / b 2.2 ; c / a 13.3

2型：c / b 1.4 ; c / a 5.9

高用量：1型：c / b 1.4 ; c / a 7.3

2型：c / b 0.4 ; c / a 1.5

両用量において：1型：c / a 7.3

2型：c / a 5.9

1型：c / b 1.4

2型：c / b 1.4

【0181】

表2. 1. 第3部. 腎機能障害は、200mg/kg用用量では検出されなかつたが、400mg/kg用用量では数匹の動物が腎機能の障害を示した。更に、400mg/kg用用量では、観察されたアセチルパターン型と、腎機能障害が存在したかどうか、との間に相関がある。2型動物のみが、グルコースおよびラクテートの尿中レベルの増加により示される腎機能障害を示した。2型アセチルパターンを生じる動物である動物206は、尿中ラクテートに関するいくらか異常な挙動を示した。しかしながら、この動物は、アセチルピーケ高さの比率により定義される2型領域の最極端にあったことは、注目すべきである。

10

20

30

40

50

【0182】

【表14】

表2. 1. 第3部.

動物番号	用量 (mg/kg)	アセチル型	ラクテートの増加?	グルコースの増加?
101	200	1	なし	なし
102	200	2	なし	なし
103	200	1	なし	なし
104	200	スペクトルなし	スペクトルなし	スペクトルなし
105	200	2	なし	なし
106	200	2	なし	なし
107	200	2	なし	なし
108	200	2	なし	なし
109	200	1	なし	なし
110	200	2	なし	なし
201	400	1	なし	なし
202	400	1	なし	なし
203	400	1	なし	なし
204	400	2	あり	あり
205	400	2	あり	あり
206	400	2	なし	あり
207	400	2	あり	あり
208	400	1	なし	なし
209	400	2	あり	あり
210	400	1	なし	なし

【0183】

10

20

30

【表15】

表2. 1. 第4部. 400 mg/kg用量で、観察されたアセチルパターン型と、痙攣および早期の死が起きたかどうか、との間に更なる関係性が存在する。2型動物においてのみ、痙攣および早期の死が引き起こされた。動物206はこの場合もやはり、2型動物であるが早期に死ななかったという点で異例であった。

動物番号	用量 (mg/kg)	アセチル型	腎機能障害?	早期の死?
101	200	1	なし	なし
102	200	2	なし	なし
103	200	1	なし	なし
104	200	スペクトルなし	スペクトルなし	なし
105	200	2	なし	なし
106	200	2	なし	なし
107	200	2	なし	なし
108	200	2	なし	なし
109	200	1	なし	なし
110	200	2	なし	なし
201	400	1	なし	なし
202	400	1	なし	なし
203	400	1	なし	なし
204	400	2	あり	あり
205	400	2	あり	あり
206	400	2	あり (軽度)	なし
207	400	2	あり	あり
208	400	1	なし	なし
209	400	2	あり	あり
210	400	1	なし	なし

【0184】

表2.1は、N-アセチルパターンに反映される代謝の差異が、イソニアジド毒性に対して重大な影響を有することを示唆する。重大な代謝段階は、1) N-アセチル化によってN-アセチルイソニアジドになるか、または2)イソニアジドのアミド基の加水分解によってヒドラジンおよびイソニコチニン酸になるか、のいずれかを行なうイソニアジドの最初の変換であると推測される(図2-3参照)。

【0185】

本発明者らは、観察された痙攣の原因はヒドラジンであると推測し、この研究において

10

20

30

40

50

毒性応答を示す動物は、特定のN-アセチレーター表現型を有していたと仮定した。即ち、これらは比較的遅いN-アセチレーターであり、従って、おそらくは比較的速いN-アセチレーターであった他の高用量投与動物に比べて、イソニアジド400mg/kg用量からより多くの毒性ヒドラジンを生産したと仮定した。この研究で観察されたイソニアジド(400mg/kg)の変動的な影響を構成する因子の性質を確かめるために、ピーク「a」、「b」を生じる化合物「A」および「B」を同定しなければならない。化合物「C」はすでにN-アセチルイソニアジドであることが分かっている。

【0186】

この実施例は、周知のとおり、投与物質の代謝産物パターンが、異なる代謝表現型の識別に使用できることを示す。またこの実施例は、PR方法論の使用によって、これらの代謝産物パターンを取り出せることを示す。またこの実施例は、特定の物質の投与に対する個々の応答を決定するのに、代謝表現型が極めて重要であることを示す。次の実施例において、本発明によって、投与後の代謝挙動の変動を、投与前の生化学的サンプル中の変動に相關付けることができ、これによって予測モデルが提供される。

【0187】

実施例3

後からイソニアジド(200mg/kg)を投与されたオスSprague-Dawleyラットの尿中イソニアジド代謝産物量の投与前予測。投与前から投与後の数的予測が得られることを示す実施例

75匹の若年齢に対応するオスSprague-Dawleyラットを、Charles River、フランス、から入手した。これらが健康な状態を示していることを確認するためにスクリーニングした後に、これらを101~175の番号を付けて、水、および標準的食餌(Usine d'Alimentation Rationnelle, Villemoisson-sur-Orge, フランス、製の食餌AO4C)を自由に摂取できるようにして、個々の代謝ケージ中に入れた。研究室の温度を20±2に、そして相対湿度を60±20%に維持した。研究室の空気を、1時間に14回フィルターを通して交換した。一定の「12時間明-12時間暗」サイクルに置いた。ラットが約6週齢で体重約200gとなったときに、短期間、ケージに「順応」させてから研究を開始した。成長中のラットがそれぞれ体重約250gとなったときに、投与を行った。イソニアジド(Sigma、フランス、社製)を生理食塩水に溶解して、腹腔内注射により各ラットに200mg/kgで投与した。

【0188】

個々の投与前(投与前48~41時間)および投与後(投与後0~7時間)の尿サンプルを、抗菌保存剤としてアジ化ナトリウム(10%(w/v)アジ化ナトリウム水溶液0.1ml)を含む氷冷容器に採取した。各採取の前に尿採取装置を消毒して、細菌、食物および糞による汚染を最小限に抑えた。各尿サンプルの最終容量は、アジド溶液についての補正を行わずに決定した。

【0189】

尿400μlを、リン酸緩衝液(0.2MNa₂HPO₄と0.2MNaH₂PO₄との81:19(v/v)混合物; pH 7.4)200μlと混合して尿サンプルをNMR分析用に調製し; 不十分量の尿を利用する場合は、不足分を純水で補って最小で200μlとした尿を用いた。尿-緩衝剤混合物を室温で10分間静置して緩衝化して、次いで13,000rpmで更に10分間遠心分離して、懸濁した粒子を除去した。「透明な」緩衝化尿500μlをNMR管に移して、TSP/D₂O溶液50μlを加えた。TSP(ナトリウム3-トリメチルシリル-[2,2,3,3-²H₄]-1-プロピオネート)は、NMR実験で用いられる化学シフト標準化合物(0)であり、D₂Oは、NMRスペクトロメータのために磁場/周波数ロックを与えた。TSP/D₂O溶液の濃度は、NMR管中でTSP終濃度0.1mMとなるようにした。

【0190】

水シグナルの大きさを減少するために用いられるNOESY-PRESATパルスシーケンス(Clari-dge、1999)を用いて、Bruker 600 MHz NMRスペクトロメータにより、30で、

10

20

30

40

50

調製した尿サンプルのNMR分析を行った。Bruker DRXスペクトロメータを投与後NMRデータの収集に使用し、これに対してBruker AMXスペクトロメータを投与前NMRデータの収集に使用した。主要収集パラメータは次のとおり：

スペクトロメータ周波数：600MHz

スペクトル幅：約7200Hz (12ppm)

Brukerパルスプログラム：noesypr1d

タイムドメインにおけるデータポイント数：65536

スキャン数：32 (投与後スペクトル)；64 (投与前スペクトル)

ダミースキャン数：4

収集時間：約4.55秒

10

前飽和時間：3秒

混合時間：0.1秒

【0191】

収集後、NMRスペクトルを、自由誘導減衰シグナルに適用した指数乗法により、0.3Hzの線の広がりの適用に従い、32768データポイントへとフーリエ変換した。スペクトルをフェーズして、NMRシグナル周りに一様なベースラインを得て、TSPピークに値0を割り与えることにより化学シフトスケールを設定した。投与後NMRスペクトルのそれぞれを紙上にプロットし、ローカライズされたベースラインの修正後に、選択されたピーク上で手動でピーク高さを測定した。高さを測定したピークは、5.4のアラントインピーク、実施例2においてそれぞれピーク「a」、「b」および「c」として知られる約2.22、2.20および2.15の3つのピーク、および0のTSPピークであった。多変量統計分析を導くデータ整理の前に、各デジタルスペクトルのベースラインを、直線ベースライン修正アルゴリズムを用いて、0強度に移した。上述のスペクトル処理およびプロッティング操作は、「xwinnmr」ソフトウェア(Bruker GmbH)を使用して、Silicon Graphicsコンピューターにより行った。

20

【0192】

データ整理後、Infometrix社製「Pirouette」ソフトウェアを用いて、投与後NMRスペクトルの「N-アセチル」領域(2.3～2.1)のPCAを行った。しかしながら、実施例2の結果とは対照的に、データセットに広範囲のパターンが存在するにもかかわらず、1型および2型スペクトルの明確なグループ分けは観察されなかった。実際は、分布内の適当な自然の境界を同定することはできず、個々の投与後スペクトルは、特定のクラスの構成員よりもむしろ、数的測度によって、良好に説明された。これは従って、次の投与前から投与後の相関分析が、クラス予測よりもむしろ数的予測に対して良好に基づくことを意味した。

30

【0193】

尿中代謝産物排泄の有用な測定を行うに關してある種の問題が存在し、従って、投与後サンプルの種々のN-アセチル化体の排泄を定量するために2種の異なる手法を用いた。第1の手法は、内因性尿成分、アラントインに関して、代謝産物A、BおよびC(実施例2と同様に示す)の排泄を定量することであった。従って、各NMRスペクトルのピークa、bおよびcの強度を、5.4のアラントインピークに対するピーク高さの比率として記載した。4.05のクレアチニンメチレンシグナルもまた目的のために用いることができたが、アラントインピークは、高都合の内部基準点であった。第2の手法は、TSPシグナルの大きさを基準とすることによって、成分A、BおよびCの単独の排泄の測定を行うことであり、該TSPシグナルを既知の一定量において各NMRサンプルに加え、各ラットが生産する尿の量を考慮に入れた。従って、例えば異なる動物による化合物Cの単独の排泄の相対的測度は、式(ピーク「c」の高さ/TSPピークの高さ)×(採取された尿の容量)を用いて得られた。動物138(その尿は全く利用できず、NMRサンプルを調製しなかった)を除く、全ての投与後NMRサンプルを、尿400μLを用いて一定の様式で調製したため、この測定は妥当であるということを本明細書に言及しておくことが重要である。ピーク高さをミリメートルで測定し、尿容量をミリリットルで測定した

40

50

。この第2の手法の制限は、設定時間内にわたって動物から採取された尿が、その時間内に膀胱を通過したものを表すとは限らないということであり、採取された尿が非常に少量である場合、このような排泄の「誤差」が特に起こり易いということは、経験的に示されている。定量する第1の手法の制限は、これまでの例により有用な基準点であり得ることが示されているにもかかわらず、内部標準化合物、この場合はアラントイン、の排泄は不变とは限らないということである。

【0194】

各投与前NMRスペクトルは、AMIXプログラム(Bruker GmbH)を用いて一定の様式で「データ整理」した。特定のスペクトル領域(例えば、TSPおよび残留水シグナルを含む領域)を切り捨てて、各スペクトルの残りの部分を連続的な0.04ppm幅のセグメントに分割して、各セグメントについての積分を得た。次いで、データ整理されたスペクトルを標準化して、各「スペクトル」について等しい総強度を得た。次いで、N-アセチル化された種々の代謝産物「A」、「B」および「C」の投与後の排泄を予測可能にする投与前特徴を見つけるために、PLS分析を行った。これらのPLS分析は、Umetrics社製のSIMCAソフトウェアを用いて行った。

10

【0195】

特定の動物について、イソニアジド(200mg/kg)投与後0~7時間に採取された尿サンプルのNMRスペクトルにおいて、5.4のアラントインピークの高さと相対的なピーク「a」および「b」の高さを、投与前データから驚くほど良好に予測できることが分かった(ピーク「a」に関する図3-1および3-2参照)。ピーク「a」の場合を考えると、アラントインに対するそのピーク高さの比率は、NMRサンプルにおける(化合物Aの量/アラントインの量)の比率の相対的測度を与える。1日目の尿採取期間の7時間にわたるアラントイン排泄が、この研究中の全ラットについて一定であると仮定する場合、比率(ピーク「a」の高さ/アラントインピークの高さ)は、該期間中に種々のラットにより排泄された化合物Aの量の相対的測度を与える。従って、これらの結果は、適当なモデルを用いて、イソニアジド(200mg/kg)投与後に排泄される化合物AおよびBの量を、数匹のラットについて投与前データから予測できることを示す。

20

【0196】

また、1日目の0~7時間の採取期間中に3mLを超える尿を生産した大部分の動物について、量(ピーク「c」の高さ/TSPピークの高さ)*(採取された尿の容量)は、投与前データから予測できることが分かった(図3-3参照)。NMRサンプルおよび対応するスペクトルを全て正確に同じ方法で調整し、得たとすると、この量は各ラットにより排泄される化合物Cの量の相対的測度である。従って、適当なモデルを用いて、イソニアジド(200mg/kg)投与後に排泄された化合物Cの量を、投与前データから推測することが可能である。

30

【0197】

図3-1は、オスSprague-Dawleyラットにイソニアジド(200mg/kg)を投与後0~7時間に採取された尿サンプルのNMRスペクトルにおいて、(ピーク「a」の高さ/アラントインピークの高さ)の値を、投与前尿NMRスペクトロスコピー・データから推測するPLSモデルのための、モデル構築データおよびバリデーションデータを示す。このデータポイントは、モデル構築データについては白抜きの三角、およびバリデーションデータについては黒色の三角を用いて示され、コード化される。白抜きの三角は、予測PLSモデルの構築にそのデータが用いられたラットについての観察結果および予測結果を示す。黒色の三角は、そのデータがモデル構築過程から除外された11匹のラット(番号110、111、122、125、128、135、140、144、147、167および172)についての観察結果および予測結果を示す。この図の外観検査は、妥当なモデルが得られること、および投与前データの分析から、アラントインレベルに対するピーク「a」の排泄レベルを予測することが可能であることを示す。

40

【0198】

図3-1のPLS分析に関する回帰係数は、分析に用いた変量のそれぞれについて、図

50

3-2に示される。上述のように、これらの变量は、投与前スペクトルの連続的セグメントの積分に由来した。PLS分析に用いられる種々の变量は、図3-2において、関連する0.04 ppm幅のスペクトルセグメントの中心における化学シフトに従って同定される。スペクトルセグメントについての回帰係数の大きさが、プラスであれマイナスであれ大きいほど、このセグメントの予測的寄与は大きくなり、例えば、3.42を中心とする投与前スペクトルセグメントは、投与後のAの濃度と、マイナス方向に相關する。

【0199】

図3-3は、イソニアジド(200mg/kg)投与後のSprague-Dawleyラットによる化合物Cの排泄を、投与前尿NMRスペクトロスコピー・データから推測するPLSモデルのための、モデル構築データおよびバリデーションデータを示す。図3-3のデータポイントは、モデル構築データについては白抜きの三角、およびバリデーションデータについては黒色の三角を用いて示され、コード化される。白抜きの三角は、該モデルの構築にそのデータが用いられた種々のラットについての観察値、および予測値を示す。黒色の三角は、そのデータがモデル構築過程から除外された8匹のラット(番号105、108、115、116、121、142、157および163)についての観察結果、および予測結果を示す。各動物により排泄された代謝産物Cの相対量は、(ピーク「c」の高さ/TSPピークの高さ)* (生産された尿の容量)として測定した。この図の外観検査は、妥当なモデルが得られたことを示す。

【0200】

データの更なる分析において、異なった手法を用いて、イソニアジド投与後に排泄された化合物A、BおよびCを軽量した。この手法において、3つのピーク「a」、「b」および「c」を含む2.24~2.12の領域を全体として第1積分を行った。次いで、領域2.24~2.17(ピーク「a」および「b」を含む)および2.17~2.12(ピーク「c」を含む)についての別々の積分を、「フラクションA+B」および「フラクションC」を与える2.24~2.12の総積分のフラクションとして得た。次いで、比率[フラクションC/(フラクションA+B)]を、後者2つの量から計算した。この手法についての理論的説明は、表現型識別を提供する個々の比率(量C/量A)および(量C/量B)が、単一の比率[フラクションC/(フラクションA+B)]により有効に置換され得るということが認識されてはいるが、この積分が、ピーク高さ測定から得られるよりも良好に、相対量の見積りを提供するということである。フラクションA+BまたはフラクションCのいずれかが分かっている場合、比率[量C/(量A+量B)]を計算できる。従って、Umetrics社製のSIMCAソフトウェアを用いて、本発明者らは、投与前データからフラクションA+B、フラクションCおよび[フラクションC/(フラクションA+B)]を予測するためのPLSモデルの構築を試みた。これによって、[フラクションC/(フラクションA+B)]の良好な予測をもたらす3つの可能な方法が提供された。

【0201】

(特定のスペクトルを除外した後の)スペクトルの一定総領域に標準化された投与前NMRデータを用いて、投与前データからフラクションA+B、フラクションCおよび比率[フラクションC/(フラクションA+B)]の3つの量のそれぞれを個々に予測することに成功したPLSモデルが得られたことが分かった。

【0202】

図3-4は、オスSprague-Dawleyラットにイソニアジド(200mg/kg)を投与後0~7時間に採取された尿中の[フラクションC/(フラクションA+B)]についての、投与前予測値に対する観測値のプロットを示す。示された結果は、モデリング・データのみに関する。このプロットは、投与前および投与後データ間の相関が検出できることを示す。

【0203】

図3-5は、投与前データと投与後の[フラクションC/(フラクションA+B)]の値との間に観察された相関が無作為ではないことを証明する内部モデルバリデーション分

10

20

30

40

50

析の結果を示す。

【0204】

図3-6は、外部から生成した試験セットについての〔(フラクションC)/(フラクションA+B)〕の予測を示す。この場合、本発明のイソニアジド研究データを用いて構成された、投与前から投与後を予測するモデルは、実施例2に記載したイソニアジド研究からの9匹の低用量投与動物についての結果の、投与前から投与後を予測する試みにおいて用いられた。予測セット(黒丸)は、6匹の2型動物および3匹の1型動物から構成され、この結果、〔フラクションC/(フラクションA+B)〕は2型試験動物について良好に予測できたが、1型試験動物についてはあまりよくは予測できなかった(RMSEE = 0.1524; RMSEP(1型および2型) = 0.4416; RMSEP(2型) = 0.2325)。
10

しかしながら、モデリング・データ(白丸)の試験は、これが殆ど完全に2型動物から構成されたことを示し、これは、なぜ2型試験データが1型よりも良好に予測され得るかについての適切な説明を与える。しかしながら、このモデルが、別の研究において得られる試験データについて有用な予測を提供するのに十分に正確であったことについて言及しておくことが重要である。

【0205】

更なる研究によって、実施例2に見られるように、イソニアジド(400mg/kg)によって誘導される毒性に対して、感受性であるかまたは非感受性であるかを投与前に予測できることが証明される。しかしながら、ここで得られた重大な結果は、特定の代謝表現型によって決定される投与後の結果を、投与前の生体液のNMRスペクトルから予測できるということである。
20

【0206】

実施例4

後からパラセタモール(600mg/kg)を投与されたオスSprague-Dawleyラットにおける、尿中パラセタモール代謝産物量の投与前予測。投与前から投与後の数的予測が得られることを示す実施例

年齢および体重が一致する75匹のオスSprague-Dawleyラットを入手した。投与3日前で、ラットの平均体重は260.2g(標準偏差:12.6g)であり、投与の時点でラットは約7週齢であった。これらを、水および標準的なげっ歯類用食餌を自由に摂取できるようにして、温度、湿度、および明/暗条件を制御した研究室内の個々のケージに入れた。ケージに順応させた後に研究を開始した。メチルセルロース(0.5%w/v)およびTween 80(0.1%w/v)を含む水溶液中のパラセタモール(600mg/kg)をラット65匹に経口で投与した。ラット10匹を対照セットとして用いて、ビヒクルのみを経口で投与した。各ラットから、個々の投与前後24時間の尿サンプルを、保存剤としてアジ化ナトリウム溶液を一定量含む氷冷容器に採取した。投与前尿サンプルは、投与前48~24時間に採取した。投与後尿サンプルは、投与後0~24時間に採取した。各尿サンプルの最終容量は、アジド溶液についての補正を行わずに決定した。一定量の尿、pH緩衝液およびTSP/D₂O溶液を用いて、標準の手順に従って、全ての尿サンプルをNMR分析用に調整した。Bruker社製「xwinnmr」および「iconnmr」ソフトウェアを用いて、フローブローブを備えたBruker NMRスペクトロメータにより、600MHzで¹H NMRスペクトルを得た。「noesypr1d」プログラムを用いて水抑制を行った。パラセタモールを投与したラットの投与後スペクトルは、特別なN-アセチルシグナルを示し、これは分解能を高めた後に、約2.18、2.165、2.155および2.15ppmに位置することが分かった。これらのシグナルは、最初に、それぞれパラセタモールスルフェート(ここでは「S」と示される)、パラセタモールグルクロニド(ここでは「G」と示される)、パラセタモールに由来するメルカプツール酸(ここでは「MA」と示される)、およびパラセタモールそれ自体(ここでは「P」と示される)によるものとして割り当てた。パラセタモールのメルカプツール酸(MA)は、時としてパラセタモールのN-アセチルシステイン抱合体と呼ぶこともある。パラセタモールグルクロニドおよびパラセタモールによるスパイクによって、これらのピーク割り当てが確認され、MAアセ
30
40
50

チルの割り当ては、1.86 ppmにおける類似した大きさのピークから確認された。文献 (Balesら (1984) Urinary excretion of acetaminophen and its metabolites as studied by proton NMR spectroscopy, Clin. Chem., 30, 10, 1631-1636) の言及は、パラセタモールのシステイン抱合体のN-アセチルピークがパラセタモールのN-アセチルピークに重なるかもしれないことを示唆しているが、実際は、システイン抱合体のN-アセチルピークは、メルカプツール酸からの等価のN-アセチルピークに重なるようである。これは、MAおよびPの両方の定量について幾らか疑いを残し、これからは、MAおよびPについてのモデルおよびデータについて言及する場合、測定された量は、システイン抱合体からの寄与を含み得ることを考慮にいれておくべきである。投与後の対照サンプルのスペクトルにおいては、有意の干渉は存在しなかった。パラセタモール自体を含む、種々のパラセタモール関連尿中代謝産物の定量は、他のシグナルもまた使用できたかもしれないが、化学範囲2.22~2.11 ppm中の関連するアセチルシグナルを基準とすることによって行われた。約2.22~2.11 ppmのN-アセチルシグナルの完全なクラスターを、投与後スペクトル中の、TSPシグナルに対して第1積分を行って、各NMRサンプル中のN-アセチル化体の総量の測度を得た。次いで、投与後0~24時間中に各ラットによるN-アセチル化体の総排泄の相対的測度を、(総N-アセチル積分/TSP積分) * 採取した尿の容量(ミリリットル)として計算した。続けて、各投与後スペクトルを、ガウスの乗法(1b-1, g b 0.5)を用いて分解能強化を行い、S、G、MAおよびPの4成分からのシグナルを互いにに対して積分した。これらの値を合計して、次いで各成分の量を全体のフラクションとして計算した。N-アセチルクラスターの他の成分は比較的重要ではないため、各動物の総アセチル排泄量の値との、S、G、MAおよびPのこれらのフラクション値の組合せから、該動物により排泄された各成分の量の見積もりを得た。S/G比を計算した。投与前スペクトルを2種の異なる方法で標準化した。第1の手法において、9.5~0.5 ppmの総スペクトル積分を、水抑制手順による影響を受ける、残留水シグナルおよび尿からのシグナルを含む6.3~4.0 ppm領域を除外後に、一定総領域に調整した。第2の手法において、投与前スペクトルを、各NMRサンプルに一定量で添加されたTSPに対して標準化した。続けて、TSP-標準化された投与前スペクトルのそれぞれを、投与前採取中に採取された尿の相対量(ミリリットル)により増加させた。従って、この第2の手法において、投与前尿中代謝産物のそれぞれの、24時間排泄の相対的測度が得られた。ケモメトリクス分析を行う前に、TSPシグナルを除外した。

【0207】

投与前から投与後を予測するためのPLSモデルを、Umetrics社製のSIMCAソフトウェアを用いて構築した。

【0208】

図4-1は、パラセタモール(600 mg/kg)を投与したラットが0~24時間に排泄した全てのN-アセチル化化合物についてのPLS予測値に対する、観測値のプロットを示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものであり、このパラメータの第1モデルに関する。このプロットは、投与前および投与後データ間の明らかな相関を示す。該モデルについてのRMSEE値は、7.98である。

【0209】

図4-2は、パラセタモール(600 mg/kg)を投与したラットが0~24時間に排泄したMAについてのPLS予測値に対する、観測値のプロットを示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものであり、このパラメータの第1モデルに関する。このプロットは、投与前および投与後データ間の明らかな相関を示す。該モデルについてのRMSEE値は、1.28である。

【0210】

図4-3は、パラセタモール(600 mg/kg)を投与したラットが0~24時間に排泄した全てのN-アセチル化化合物についてのPLS予測値に対する、観測値のプロットを示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものであり、このパラメ

10

20

30

40

50

ータの第2モデルに関する。このプロットは、投与前および投与後データ間の明らかな相関を示す。該モデルについてのRMSEE値は、12.99である。

【0211】

図4-4は、図4-3に示される投与前予測を生成したモデルの良好な内部バリデーションを示す。このプロットは、図4-3により示される投与前および投与後のデータ間の相関が無作為ではないことを証明する。また、該モデルの外部バリデーションも良好であり、RMSEP値12.89を与え、これは該モデルのRMSEE値12.99と比較可能であった。

【0212】

図4-5は、パラセタモール(600mg/kg)を投与したラットが0~24時間に排泄したパラセタモールグルクロニド(「G」)についてのPLS予測値に対する、観測値のプロットを示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものである。このプロットは、投与前および投与後データ間の明らかな相関を示す。該モデルについてのRMSEE値は、6.99である。

【0213】

図4-6は、図4-5に示される投与前予測を生成したモデルの良好な内部バリデーションを示す。このプロットは、図4-5により示される投与前および投与後のデータ間の相関が無作為ではないことを証明する。また、該モデルの外部バリデーションも良好であり、RMSEP値7.27を与え、これは該モデルのRMSEE値6.99と比較可能であった。

【0214】

図4-7は、パラセタモール(600mg/kg)を投与したラットが0~24時間に排泄した「MA」についてのPLS予測値に対する、観測値のプロットを示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものであり、このパラメータの第2モデルに関する。このプロットは、投与前および投与後データ間の明らかな相関を示す。該モデルについてのRMSEE値は、1.90である。

【0215】

図4-8は、図4-7に示される投与前予測を生成したモデルの良好な内部バリデーションを示す。このプロットは、図4-7により示される投与前および投与後のデータ間の相関が無作為ではないことを証明する。また、該モデルの外部バリデーションも良好であり、RMSEP値1.32を与え、これは該モデルのRMSEE値1.90と比較可能であった。外部バリデーションは、図4-9に示され、ここで、白丸はモデル構築データであり、黒丸はモデル構築試験に用いられなかった試験データである。

【0216】

図4-10は、パラセタモール(600mg/kg)を投与したラットが排泄した「P」についてのPLS予測値に対する、観測値のプロットを示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものである。このプロットは、投与前および投与後データ間に相関があることを示す。該モデルについてのRMSEE値は、3.51である。

【0217】

図4-11は、図4-10に示される投与前予測を生成したモデルの内部バリデーションを示す。このプロットは、図4-10により示される投与前および投与後のデータ間の相関が無作為ではないことを証明する。また、該モデルの外部バリデーションも良好であり、RMSEP値3.30を与え、これは該モデルのRMSEE値3.51と比較可能であった。

【0218】

投与後に排泄される「S」の量の直接投与前予測は行わなかった。しかしながら、N-アセチル化体の総排泄についての予測から、排泄された「G」、「P」および「MA」の量の予測を引くことにより、投与後24時間に各ラットが排泄した「S」の量の投与前予測を生み出すことができた。「S」についての該予測を「G」についての適当な予測と組合わせることによって、各ラットの投与後G/S比についての投与前予測を得ることができた。図4-12は、排泄された「S」の量についての予測値に対する観測値を示す。図4-13は、G/S比についての予測値に対する観測値を示す。

10

20

30

40

50

【0219】

この研究の結果は、この新しい方法論が単に、アセチレーター表現型によって決定される応答の予測に制限されないことを示す。ここで与えられる結果は、グルクロン酸化およびメルカプツール酸形成、およびパラセタモール投与に際して起こるもの、量および相対的程度に関して、投与前予測を行うことができる事を示す。尿中に排泄されるパラセタモールスルフェートの量の予測を行うのはあまり容易ではなかったが、得られた結果は、「差によって」予測可能であり得ることを示唆していた。パラセタモールに由来するメルカプツール酸(MA)は、毒性を有する反応性中間体のグルタチオンとの共役に起因すると考えられるために、毒物学的重要性を有する。グルクロン酸化、硫酸化、およびグルタチオン抱合体は、第2相代謝の最も有用な変換の3つであり、それぞれ、種々の外生的物質に関して主要な防御的役割を有する。従って、本データは、被験体に特異的な投与前予測が、多数の外生的化合物の代謝および毒性に関して成され得ることを示す。示された実施例を考えると、投与前の尿中ディスクリミネータが代謝表現型の多種多様な他の態様について存在すること、即ち、代謝表現型の多種多様な態様について、および1またはそれ以上のこれらの態様によって決定される投与応答について、投与前予測モデルを構築できることを、信じるためのあらゆる理由が存在する。

10

【0220】

実施例5

後からパラセタモール(1000mg)を投与されたヒト男性における、尿中パラセタモール代謝産物量の投与前予測。投与前から投与後の数的予測を行なうことがヒトにおいて可能であることを示す実施例

20

倫理的に認められた臨床試験のために、99人の成人ヒト男性を募った。一定期間魚を食べない、およびアルコールを飲まないといった幾らかの食餌制限を規定した。研究に適格であるためには、被験体は、研究に先立っての一定期間パラセタモールまたは他の薬剤を摂取していないことが必要であった。各被験体の体重および身長を記録した。研究の日に、第1に、「スナップショット」流れの中間(mid-stream)の投与前尿サンプルを各被験体に提供してもらった。次に、各被験体は、一定量の水と一緒にパラセタモールB.P.の錠剤 $2 \times 500\text{mg}$ を摂取した。投与後に、各被験体は、連続する2つの期間、即ち投与から0~3時間および3~6時間にわたって、その生成した全ての尿を提供することが要求された。これらの期間の各終了時に、各被験体は、可能な限り完全にその膀胱を空にすることが要求され、各被験体が各投与後期間中に生成した尿の質量を記録した。全尿サンプルを、標準の手順に従ってNMR分析用に調製し、これには尿440マイクロリットルを使用した。Brukerの「xwinnmr」および「iconnmr」ソフトウェアを用いて、Bruker NMRスペクトロメータにより 600MHz で $^1\text{H NMR}$ スペクトルを得た。「noesypr1d」プログラムを用いて水抑制を行った。「投与後スペクトルにおいて、2.210~2.135ppmのN-アセチルシグナルをTSPに対して第1積分して、各被験体による各期間中のN-アセチル化体の総排泄の測度を、(アセチル積分/TSP積分)*採取された尿の質量(g)として決定した。この式は、尿サンプルの濃度がほぼ一定であるという仮定に基づく。検査として、多数の代表的サンプルのサンプル濃度を測定し、1.00~1.04g/mlの範囲にあることが分かり、即ちほぼ一定の濃度であるという仮定は妥当であった。続けて、投与後スペクトルを、FID(1b-1, g b 0.5)のガウスの乗法を用いて分解能強化した。次いで可能ならば、パラセタモールスルフェート(S)、パラセタモールグルクロニド(G)および未変化のパラセタモール(P)を、2.210~2.135ppmの総積分のフラクションとして直接測定した。3~6時間の採取中に排泄された未変化のパラセタモール(P)の量の正確な測度を得ることはできず、このデータは使用しなかった。一般に、パラセタモールメルカプツール酸(MA)のレベルは、正確な測定を可能にするほどには十分な高さではなかった。特定の採取期間中に各被験体により排泄された個々のパラセタモール代謝産物(S, GおよびP)の量は、該被験体についてのN-アセチル化体の総排泄、および2.210~2.135ppmの関連するフラクションの積分により(予め計算された)期間を掛け合わせることにより計算した。適当

30

40

40

50

ならば、2つの採取についてのデータを合計して、投与後0～6時間の全体の期間についてのデータを得た。任意特定の被験体が需要したパラセタモールの有効量はその体重に依存したため、N-アセチル、S、GおよびPについての排泄結果を体重のデータと組合わせて、体重1kgあたりの排泄を得た。ラットにおけるパラセタモール研究と同様に、パラセタモールのシステイン抱合体が未変化のパラセタモールの定量に影響を与える可能性があることは、注目すべきことである。投与前スペクトルを2種の異なる方法で（特定の領域を除外した後の、全スペクトル領域に対して、および一定クレアチニンに対して）標準化し、投与前から投与後を予測するPLSモデルを、Umetrics社製のSIMCAソフトウェアを用いて構築した。

【0221】

10

図5-1は、パラセタモール（1000mg）を摂取した男性ボランティアについての、体重1kgあたりのN-アセチル化化合物の総排泄（0～3時間の採取）のPLS予測値に対する観測値を示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものである。このプロットは、投与前および投与後データ間に明らかな相関が見られたことを示す。該モデルについてのRMSEE値は、1.12であった。

【0222】

図5-2は、図5-1の基礎となるモデルについて分析された外部試験セットについて、体重1kgあたりのN-アセチル化化合物の総排泄（0～3時間の採取）のPLS予測値に対する観測値を示す。RMSEP値は0.80であり、これは該モデルのRMSEE値1.12と好ましく比較される。

20

【0223】

図5-3は、パラセタモール（1000mg）を摂取した男性ボランティアについての、体重1kgあたりのパラセタモールグルクロニド（「G」）の排泄（0～3時間の採取）のPLS予測値に対する観測値を示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものである。このプロットは、投与前および投与後データ間に相関が見られたことを示す。該モデルについてのRMSEE値は、0.84であった。

【0224】

図5-4は、図5-3の基礎となるモデルについて分析された外部試験セットについて、体重1kgあたりの「G」の排泄（0～3時間の採取）のPLS予測値に対する観測値を示す。RMSEP値は0.70であり、これは該モデルのRMSEE値0.84と好ましく比較される。

30

【0225】

図5-5は、パラセタモール（1000mg）を摂取した男性ボランティアについての、体重1kgあたりの「P」の排泄（0～3時間の採取）のPLS予測値に対する観測値を示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものである。このプロットは、投与前および投与後データ間に相関が見られたことを示す。該モデルについてのRMSEE値は、0.185であった。

【0226】

図5-6は、図5-5の基礎となるモデルについて分析された外部試験セットについて、体重1kgあたりの「P」の排泄（0～3時間の採取）のPLS予測値に対する観測値を示す。RMSEP値は0.170であり、これは該モデルのRMSEE値0.185と好ましく比較される。

40

【0227】

図5-7は、パラセタモール（1000mg）を摂取した男性ボランティアについての、体重1kgあたりのN-アセチル化化合物の総排泄（0～6時間の期間）のPLS予測値に対する観測値を示す。示された結果は、モデリング・データのみについてのものである。このプロットは、投与前および投与後データ間に明らかな相関が見られたことを示す。該モデルについてのRMSEE値は、1.47であった。

【0228】

図5-8は、図5-7の基礎となるモデルについて分析された外部試験セットについて

50

、体重1kgあたりのN-アセチル化化合物の総排泄(0~6時間の期間)のPLS予測値に対する観測値を示す。RMSEP値は1.13であり、これは該モデルのRMSEE値1.47と好ましく比較される。

【0229】

この研究から得られた結果は、該方法論がラットからヒトへ拡張できるという原理を裏付け、該方法論は全ての動物に良好に適用できると考えられる。特に、該方法は、完全な食餌制限に付されていないヒトにおいて機能し、またこのような制限が付されたならば、より改良された結果が期待されるということは注目に値する。ここで示される結果は、サンプルおよびデータの予備的分析を示し、改良されたモデルは可能であろう。UV-可視検出を有するHPLCのような標準分析方法の投与後サンプルに関する使用が、パラセタモール代謝産物の改良された定量を与え、従ってモデル構築を容易にすることができる。特に、このような技術の使用は、ここで使用されるNMR方法と比較してPおよびMAの改良された定量を可能にし得る。更に、PLS分析を行う前に、投与前変量(この場合、これは投与前NMRスペクトルの0.04ppm幅セグメントである)の比率および他の組合せをとることによって、改良されたモデルを得ることができると考えられる。

【0230】

仮定的実施例

本発明の主要な特徴は、投与に対する応答を予測できることであり、またこれにより、適当な投与物質および治療計画、例えば薬品治療、麻酔剤等を選択できることである。このような方法は、毒性、有効性および副作用のような予め決定された基準に基づいて、適当な投与物質の同定、最大または最小用量の同定、適当な用量、適当な投与頻度、適当な投与回数の同定、および適当な徐放性製剤の選択を可能にする。これらの方法の典型的な構築は、以下の仮定的実施例に示され、これは設定時間内に特定の種類の感染症を排除するための抗菌物質の最小用量を同定することを包含する。従って、特定の感染症に罹った異なるモデル構築個体群は、異なるレベルの抗菌剤で処置される。設定時間内にいずれの被験体においても感染症を排除しなかった用量レベルに関するデータは、分析から削除される。他のデータセットのそれぞれについて、分類モデルが構築され、感染症排除基準に適合した被験体の投与前の特性、および適合しなかった被験体の投与前の特性が同定される。被験体の試験データが、該モデルのそれぞれについて分析され、その表現型の被験体において感染症を排除するのにふさわしい最小用量を見つける。必ずしもこの用量が投与されるのではなく；このような投与は、例えばその投与レベルで被験体において、容認できない副作用が予期されるかどうかによって決められる。本発明のもう1つの特徴は、目的が何であろうと、表現型として均一な被験体のセットを選択する能力である。典型的には、必要とされるのは、代謝表現型の1要素、例えばN-アセチレーター表現型に関して均一であった被験体の群を選択することである。この例について、N-アセチル化を調べる投与物質を用いて、モデルが構築される。次いで、課された均一性基準に従って分類モデルが構築される。N-アセチレーター表現型が分からぬ被験体に関する試験データを、該モデルおよびそれに応じて分類された被験体に関して調べる。1つのクラスに分類される被験体は、投与物質のN-アセチル化に関して表現型として均一であると考えられる。

【0231】

同様に、本発明は、毒性または有効性研究のような研究において得られる変動的データの有理化を可能にする。例えば、一方の群では毒性を引き起しが、他方の群ではそうではない投与計画は、投与前表現型検査の使用によって、一方の群は速いO-メチレーター(O-methylator)であるのに対して、他方の群は遅いO-メチレーターであることが分かった場合に、有理化され得る。このような指示は、投与物質の代謝の考察をもたらし、毒性代謝産物を生じるかまたは除くかする、重大なO-メチル化段階の同定をもたらすであろう。

【0232】

本発明のもう1つの特徴は、投与前生体マーカーまたは生体マーカー組合せの同定を容

10

20

30

40

50

易にすることであり、これは、投与前サンプルにおけるそれらの存在または濃度が、特定の代謝表現型または投与され得る物質に対する特定の応答を指示することによる。例えば、PCAにおいて、当該の異なるクラスの分離を提供するスコア・プロットは、対応するローディング・プロットと比較される。次いで、クラス分離に対するそれらの相関の識別、および陽性または陰性の性質を提供する投与前変量を同定することができる。ときに、これらの変量は、特定の化合物に直接帰因し得る。NMRスペクトロスコピー・データの場合、特定の変量または変量組合せは、識別特徴を含むスペクトル領域を示す。次いで、モデル構築スペクトルのこれらの領域の試験によって、化合物（または「生体マーカー」）の識別は、原則的には同定できる。

【0233】

10

ときに、被験体のより幅広い群を代表するために多数の被験体からのサンプルをとることが必要である。例えば、通常は、1つの植物の場からは2、3の植物をサンプリングできるのみである。次いで、選択された植物の特徴の分析から、場全体から除草剤の特定の用量を選択することが望まれる。

【図面の簡単な説明】

【0234】

【図1-1】ガラクトサミンHCl（略称GalNHC1）（800mg/kg）投与後のガラクトサミンの変動尿中排泄を示す。

【図1-2】GalNHC1（800mg/kg）投与後の、N-アセチル化体の変動尿中排泄を示す。

20

【図1-3】応答者においてGalNHC1（800mg/kg）によって誘導された幾つかの尿中変化を示す。

【図1-4】ガラクトサミンHCl（800mg/kg）投与後のヒプレートおよびヒスチジンの変化した尿中排泄を示す。

【図1-5】ガラクトサミン研究からの-1日目（投与前）尿NMRスペクトルのPCAからのPC1対PC5のスコア・プロットを示す。

【図1-6】ガラクトサミン研究からの-1日目（投与前）尿NMRスペクトルのPCAからのPC1対PC5のローディング・プロットを示す。

【図2-1】イソニアジド（400mg/kg）をオスSprague-Dawleyラットに投与した後0～7時間に採取された尿サンプルのNMRスペクトルにおいて見られる、N-アセチル代謝産物の種々のパターン例を示す。

30

【図2-2】イソニアジド（200mg/kg）を投与された動物からの1日目（投与から0～7時間）尿サンプルのNMRスペクトルのN-アセチル領域（2.23～2.13）のPCAからの、PC1対PC2のスコア・プロットを示す。

【図2-3】イソニアジド代謝の2種の任意選択的初期経路を示す。

【図3-1】イソニアジド（200mg/kg）投与後0～7時間に採取された尿サンプルのNMRスペクトルにおける比率（ピーク高さ「a」/ピーク高さアラントイン）の投与前予測を示す。

【図3-2】図3-1に記載された結果を生じさせたPLS分析に関する回帰係数を示す。

40

【図3-3】イソニアジド（200mg/kg）を投与したラットから、投与後0～7時間に採取された尿中に排泄された代謝産物Cの量の投与前予測を示す。

【図3-4】イソニアジド（200mg/kg）を投与したラットから、投与後0～7時間に採取された尿中の比率[（フラクションC）/（フラクションA+B）]の投与前予測を示す。

【図3-5】図3-4に関するモデルの内部バリデーションを示す。

【図3-6】外部試験セットについての[（フラクションC）/（フラクションA+B）]の投与前予測を示す。

【図4-1】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間におけるN-アセチル化化合物（約2.22～約2.11）の全尿中排泄の投与前予測を示す。（この

50

パラメータについての第1モデル)。

【図4-2】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中に排泄された「MA」量の投与前予測を示す。(このパラメータについての第1モデル)。

【図4-3】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中のN-アセチル化化合物(約2.22～約2.11)の全尿中排泄の投与前予測を示す。(このパラメータについての第2モデル)。

【図4-4】図4-3に関するモデルの内部バリデーションを示す。

【図4-5】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中のパラセタモールグルクロニド(「G」)の尿中排泄の投与前予測を示す。

【図4-6】図4-5に関するモデルの内部バリデーションを示す。 10

【図4-7】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中の「MA」の尿中排泄の投与前予測を示す。(このパラメータについての第2モデル)。

【図4-8】図4-7に関するモデルの内部バリデーションを示す。

【図4-9】図4-7に関するモデルの外部バリデーションを示す。

【図4-10】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中の「P」の尿中排泄の投与前予測を示す。

【図4-11】図4-10に関するモデルの内部バリデーションを示す。

【図4-12】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中に排泄された「S」の量の、投与前予測値に対する観測値を示す。

【図4-13】パラセタモールを投与したラットについて、投与後24時間中に得られた尿サンプルのG/S比の、投与前予測値に対する観測値を示す。 20

【図5-1】パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の3時間における体重1kgあたりのN-アセチル化化合物(2.210～2.135)の全尿中排泄の投与前予測を示す。

【図5-2】図5-1に関するモデルの外部バリデーションを示す。

【図5-3】パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の3時間において尿中に排泄された、体重1kgあたりのパラセタモールグルクロニド(「G」)の量の投与前予測を示す。

【図5-4】図5-3に関するモデルの外部バリデーションを示す。

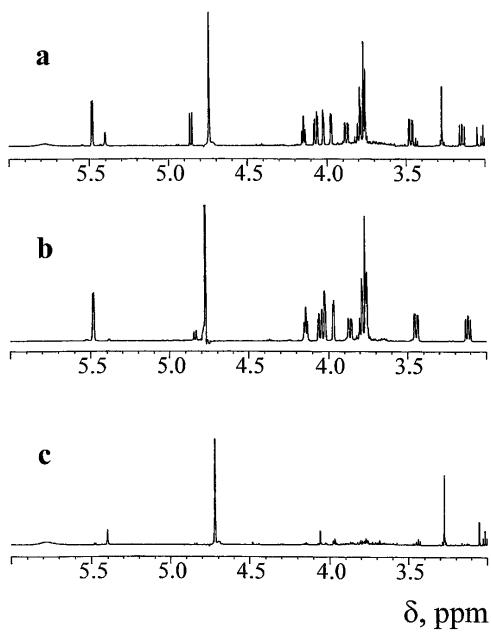
【図5-5】パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の3時間において尿中に排泄された、体重1kgあたりの「P」の量の投与前予測を示す。 30

【図5-6】図5-5に関するモデルの外部バリデーションを示す。

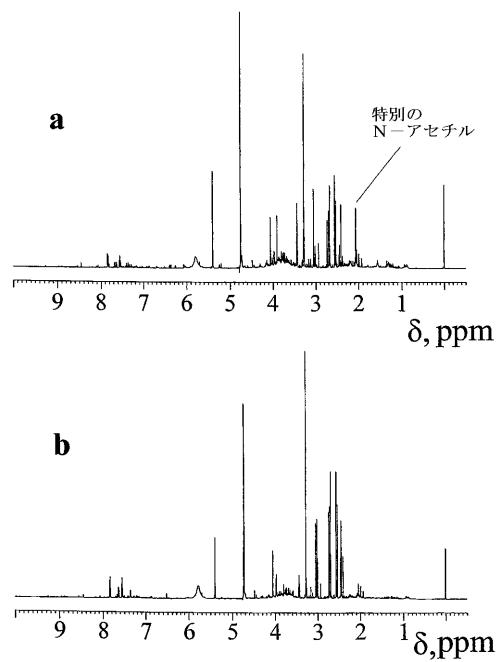
【図5-7】パラセタモールを投与したヒト男性について、投与後最初の6時間における体重1kgあたりのN-アセチル化化合物(2.210～2.135)の全尿中排泄の投与前予測を示す。

【図5-8】図5-7に関するモデルの外部バリデーションを示す。

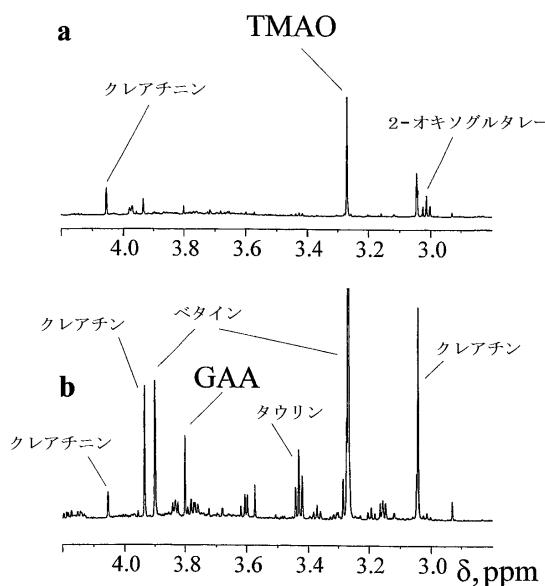
【図1-1】



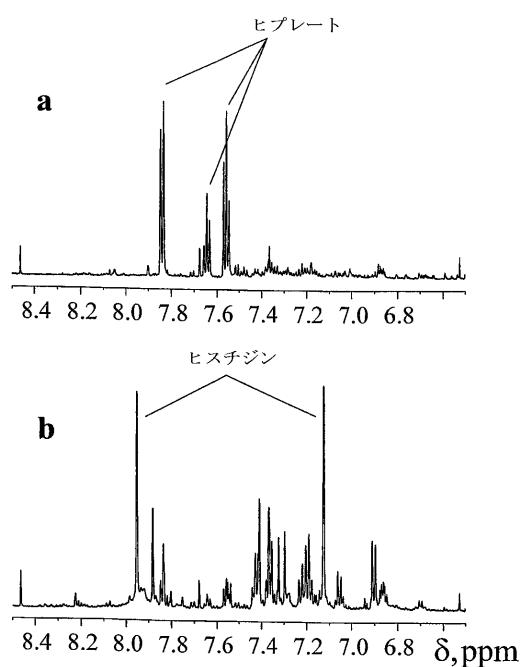
【図1-2】



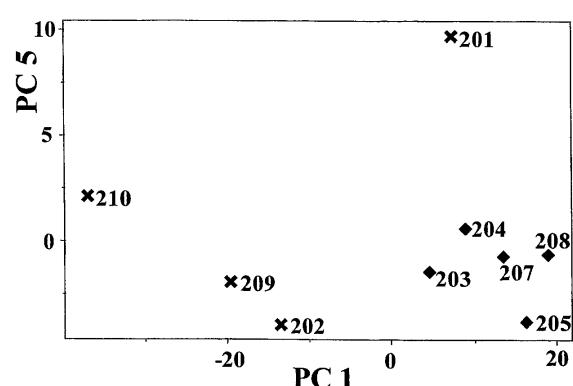
【図1-3】



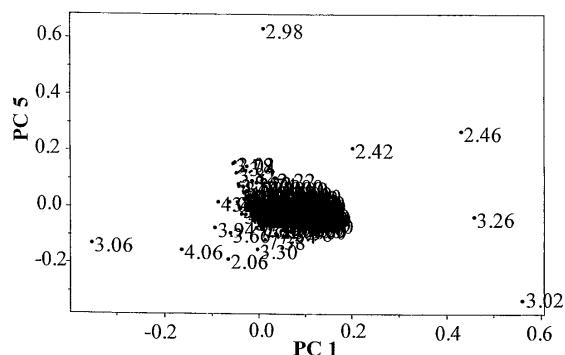
【図1-4】



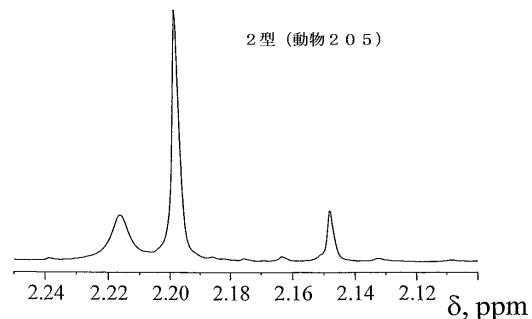
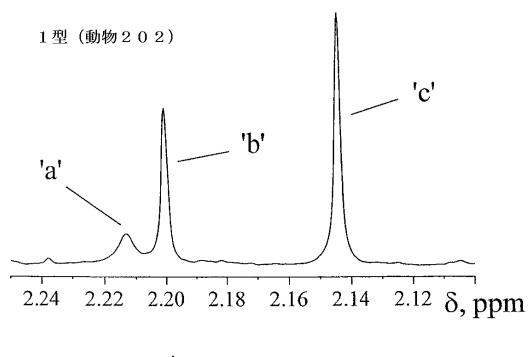
【図 1 - 5】



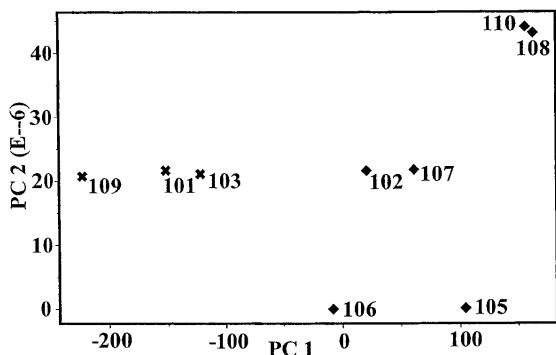
【図 1 - 6】



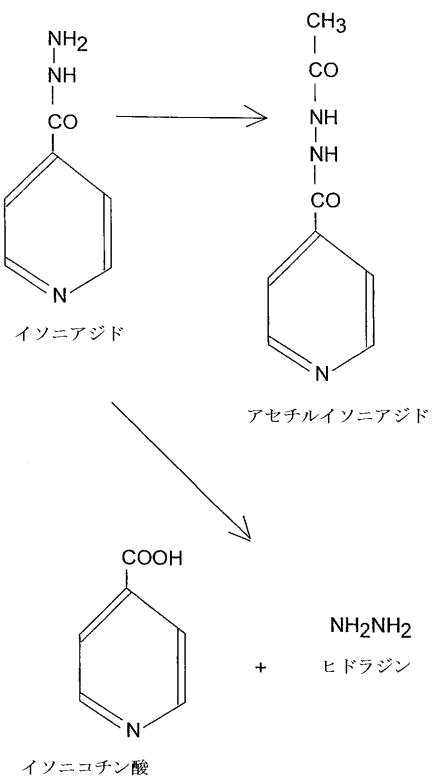
【図 2 - 1】



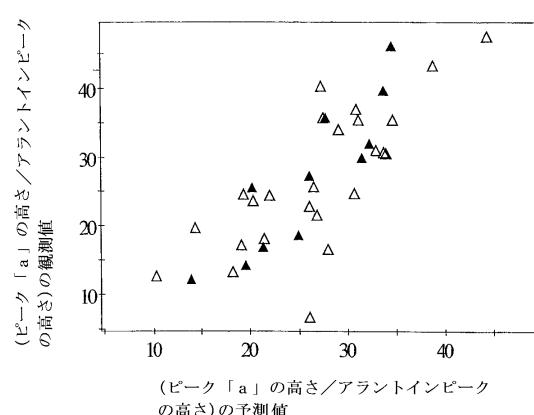
【図 2 - 2】



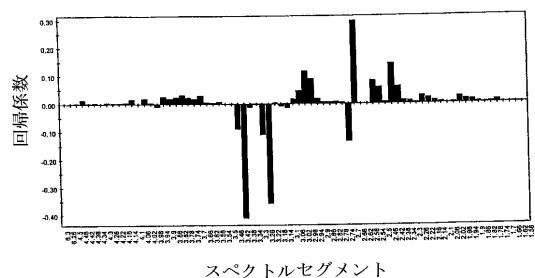
【図 2 - 3】



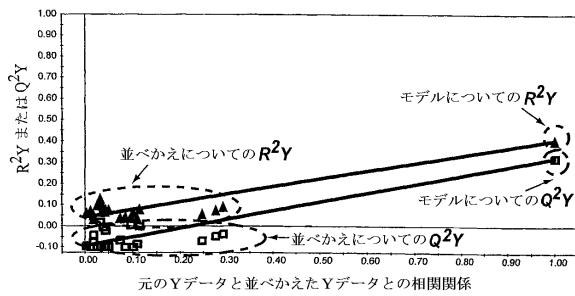
【図3-1】



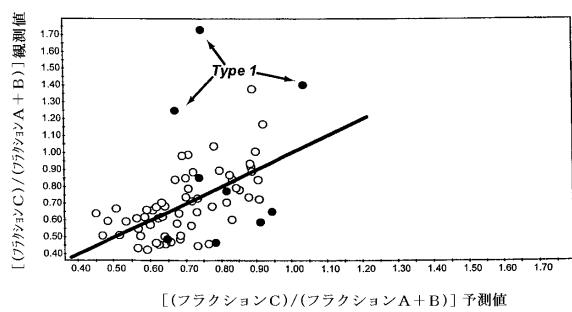
【図3-2】



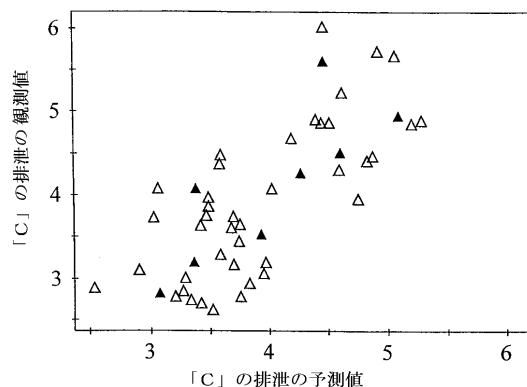
【図3-5】



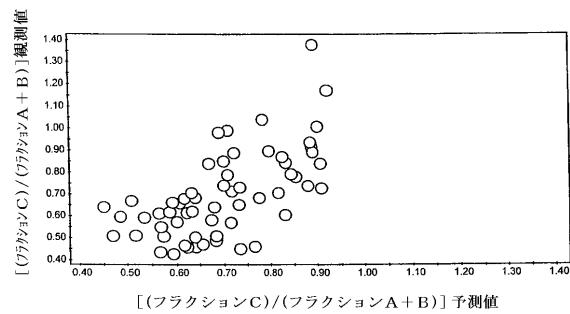
【図3-6】



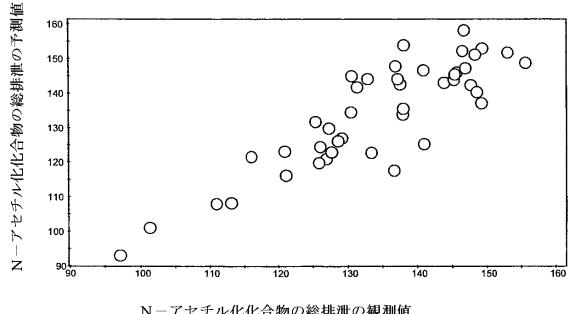
【図3-3】



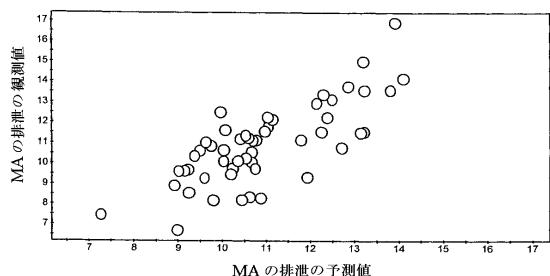
【図3-4】



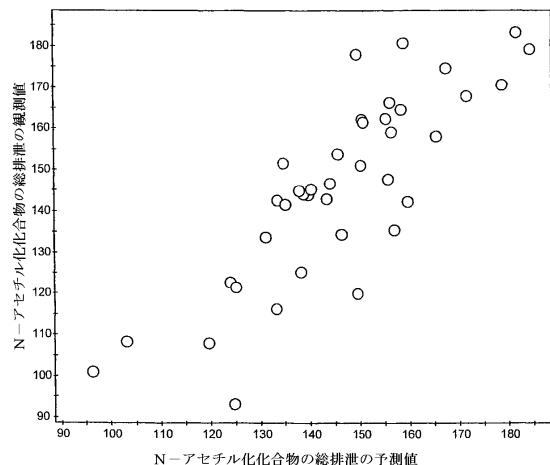
【図4-1】



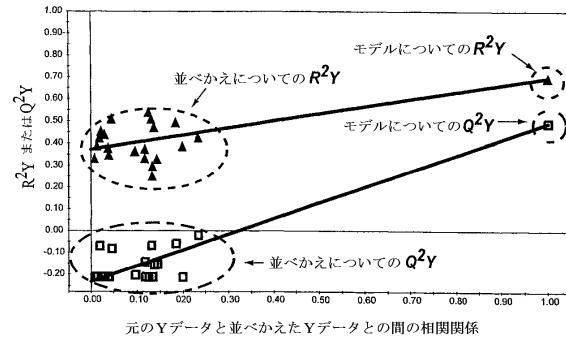
【図4-2】



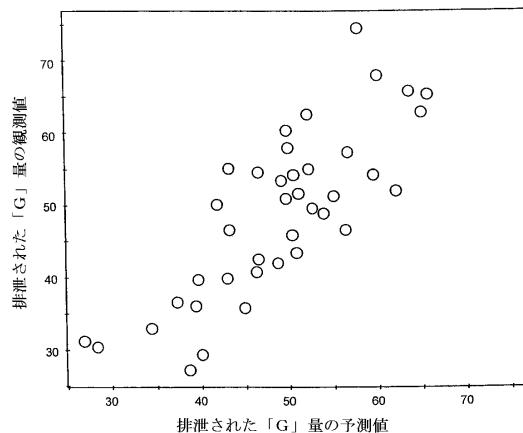
【図4-3】



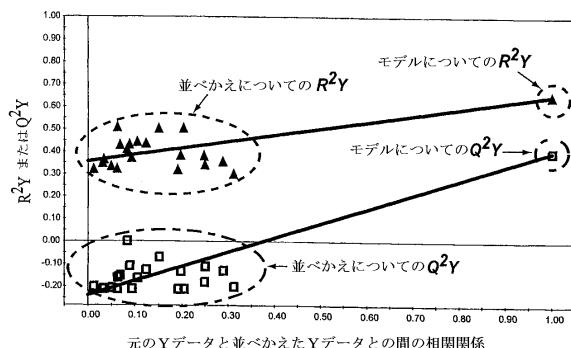
【図4-4】



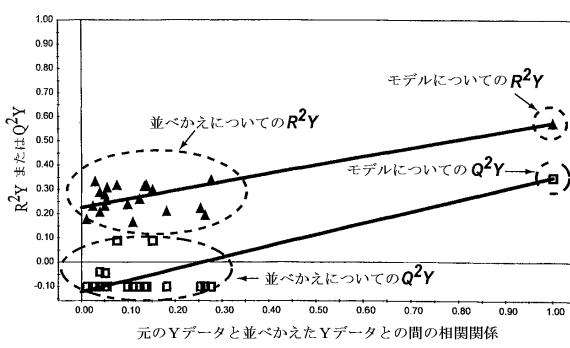
【図4-5】



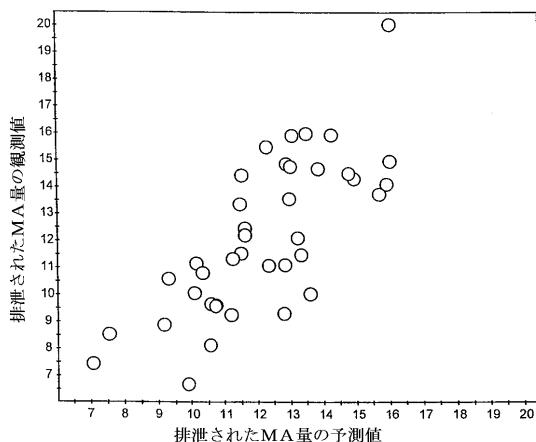
【図4-6】



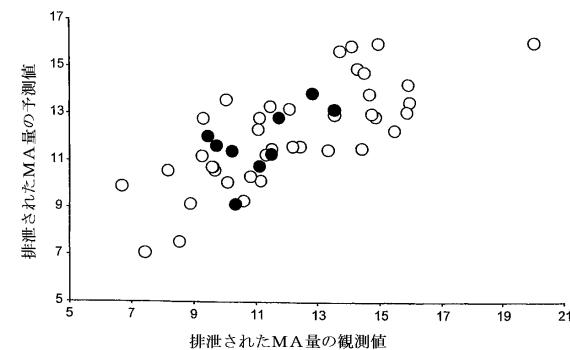
【図4-8】



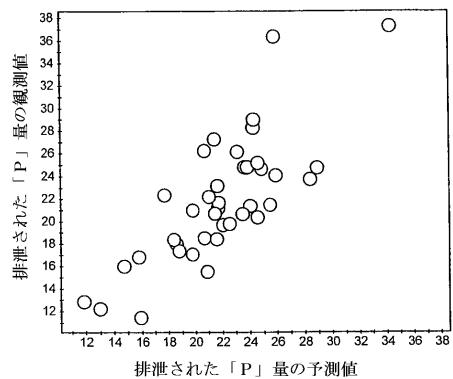
【図4-7】



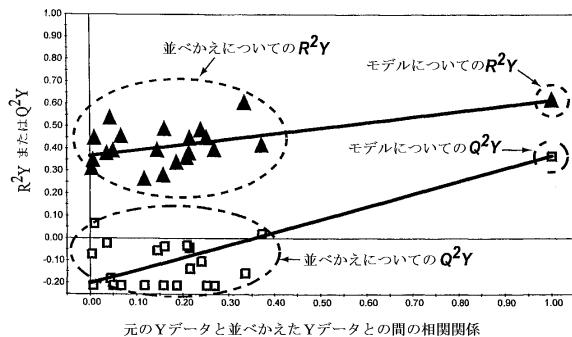
【図4-9】



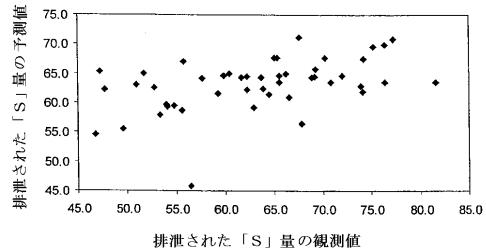
【図4-10】



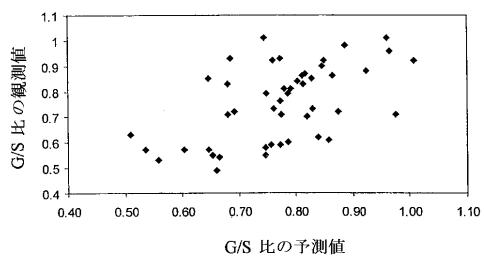
【図4-11】



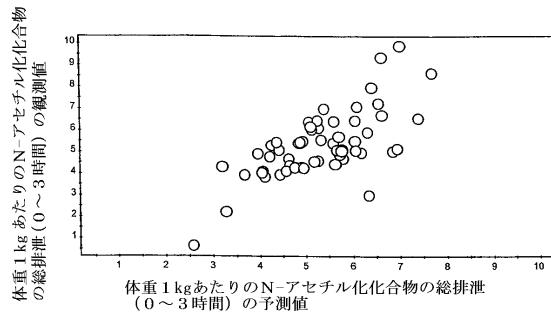
【図4-12】



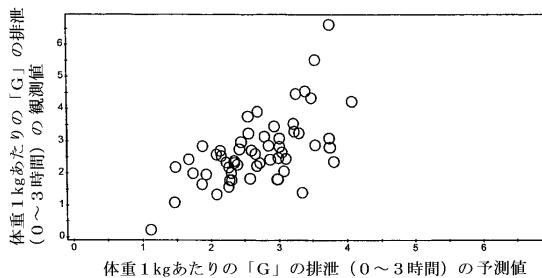
【図4-13】



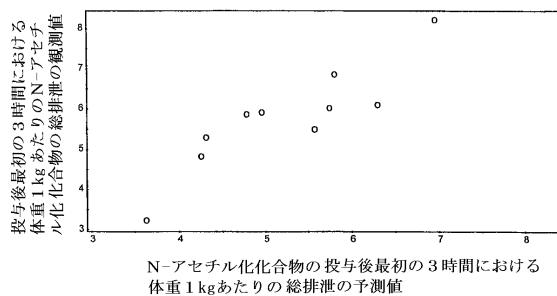
【図5-1】



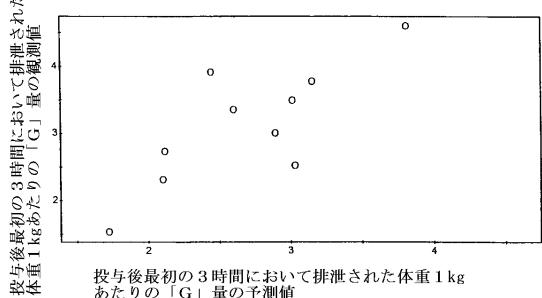
【図5-3】



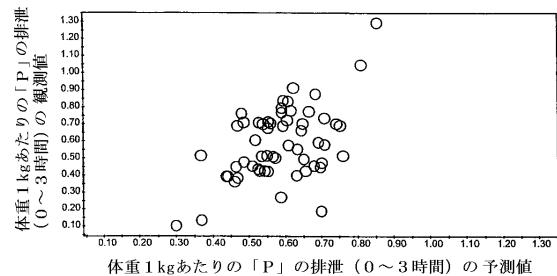
【図5-2】



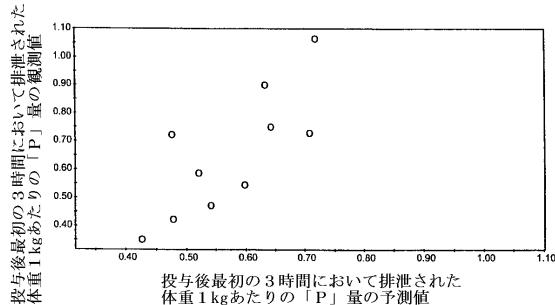
【図5-4】



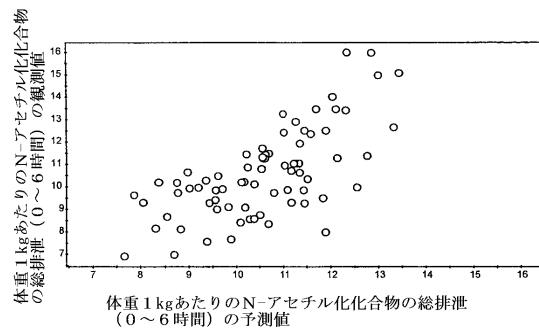
【図5-5】



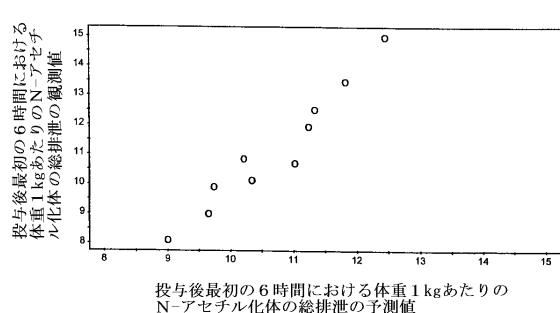
【図5-6】



【図5-7】



【図5-8】



フロントページの続き

- (72)発明者 トマス・アンドルー・クレイトン
イギリス国ケントCT13 9NJ. サンドウィッ奇. ラムズゲイトロード. ファイザー・リミテッド. ユー・ケイ・パテント・デパートメント
- (72)発明者 ジェレミー・ラムゼー・エヴェレット
イギリス国ケントCT13 9NJ. サンドウィッ奇. ラムズゲイト. ファイザー・グローバル・リサーチ・アンド・ディヴェロップメント
- (72)発明者 ジョン・クリストファー・リンドン
イギリス国ケントCT13 9NJ. サンドウィッ奇. ラムズゲイトロード. ファイザー・リミテッド. ユー・ケイ・パテント・デパートメント
- (72)発明者 ジェレミー・カーカ・ニコルソン
イギリス国ケントCT13 9NJ. サンドウィッ奇. ラムズゲイトロード. ファイザー・リミテッド. ユー・ケイ・パテント・ディヴェロップメント

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 HOLMES E, CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY, 米国, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2000年
6月, V13 N6, P471-478
DUMAS, ANALYTICAL CHEMISTRY, 2002年 5月15日, V74 N10, P2261-2273

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48