

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-530350

(P2014-530350A)

(43) 公表日 平成26年11月17日 (2014. 11. 17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006. 01)	GO 1 N 33/68	2 GO 4 1
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z	2 GO 4 5
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 Z	
GO 1 N 27/62 (2006. 01)	GO 1 N 27/62 V	
	GO 1 N 27/62 X	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁)		

(21) 出願番号	特願2014-530362 (P2014-530362)	(71) 出願人	508020155
(86) (22) 出願日	平成24年9月14日 (2012. 9. 14)		ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロピア
(85) 翻訳文提出日	平成26年5月9日 (2014. 5. 9)		BASF SE
(86) 国際出願番号	PCT/IB2012/054790		ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフェン (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02013/038369		D-67056 Ludwigshafen, Germany
(87) 国際公開日	平成25年3月21日 (2013. 3. 21)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	11181219.4		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成23年9月14日 (2011. 9. 14)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	61/534, 402	(74) 代理人	100122389
(32) 優先日	平成23年9月14日 (2011. 9. 14)		弁理士 新井 栄一
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	11187016.8		
(32) 優先日	平成23年10月28日 (2011. 10. 28)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 腎臓毒性を評価するための手段及び方法

(57) 【要約】

本発明は、腎臓毒性診断、及び化学化合物のリスク層別化のための毒物学的評価の分野に関する。具体的には、本発明は腎臓毒性を診断するための方法を開示する。本発明は、化合物が、対象においてそうした腎臓毒性を誘導することができるかどうかを判定するための方法及び腎臓毒性を治療するための薬物を同定する方法にも関する。さらに本発明は、腎臓毒性を診断するための装置及びキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

腎臓毒性を診断するための方法であって、

(a) 腎臓毒性を生じていることが疑われる対象の試験サンプルにおいて表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b) ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較するステップであり、それにより腎臓毒性が診断されることになるステップと

を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記対象は、腎臓毒性を誘導する能力があることが疑われる化合物と接触させた、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

対象において化合物が腎臓毒性を誘導する能力があるかどうかを判定する方法であって、

(a) 腎臓毒性を誘導する能力があることが疑われる化合物と接触させた対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

20

(b) ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較するステップであり、それにより化合物の腎臓毒性を誘導する能力が判定されるステップと

を含む、方法。

【請求項 4】

前記化合物が、アムホテリシンB、 α -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物である、請求項2又は3に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記リファレンスが、(i) 腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群、又は(ii) アムホテリシンB、 α -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する、請求項1～4のうちのいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6】

試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同じである、バイオマーカーの量が、腎臓毒性を示す、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記リファレンスが、(i) 腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は(ii) アムホテリシンB、 α -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブ

50

ロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する、請求項1～4のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記リファレンスが、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである、請求項1～4のうちのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、腎臓毒性を示す、請求項7又は8に記載の方法。

【請求項 10】

腎臓毒性を治療するための物質を同定する方法であって、

(a) 腎臓毒性を治療する能力があると推測される候補物質と接触させた、腎臓毒性を生じている対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b) ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較するステップであり、それにより腎臓毒性を治療する能力がある物質が同定されることになるステップとを含む、方法。

【請求項 11】

前記リファレンスが、(i) 腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群、又は(ii) アムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.及びリン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

試験サンプルとリファレンスの間で異なるバイオマーカーの量が腎臓毒性を治療する能力がある物質を示す、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記リファレンスが、(i) 腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は(ii) アムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する、請求項10に記載の方法。

【請求項 14】

前記リファレンスが、対象集団において計算されたバイオマーカーのリファレンスである、請求項10に記載の方法。

【請求項 15】

試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同じである、バイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療する能力がある物質を示す、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項 16】

対象のサンプルにおいて腎臓毒性を診断するための、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a若しくは1

10

20

30

40

50

1bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー又は前記バイオマーカー用の検出剤の使用。

【請求項 17】

腎臓毒性を生じていることが疑われる対象のサンプルにおいて腎臓毒性を診断するための装置であって、

(a) サンプル中に存在する前記バイオマーカーの量の測定を可能にする、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤を備える分析ユニットと、それと作動可能に連結された、

(b) 分析ユニットで測定された前記少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較することを可能にし、それによって腎臓毒性が診断される、格納されたリファレンス及びデータ処理装置を備える評価ユニットとを含む、装置。

【請求項 18】

前記格納されたリファレンスが、腎臓毒性を生じていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置が、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同じである、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在することを示し、又はリファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在しないことを示す、請求項17に記載の装置。

【請求項 19】

前記格納されたリファレンスが、腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置が、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在することの指標になり、又はリファレンスと比較して本質的に同じである、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在しないことを示す、請求項17に記載の装置。

【請求項 20】

表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤、及び少なくとも1種のバイオマーカーに関するスタンダードであって、その濃度が、(i) 腎臓毒性を生じていることが分かっている対象若しくは対象群、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサ

10

20

30

40

50

クロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するか、(ii)腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群、又はアムホテリシンB、⁻イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するスタンダードを含む、腎臓毒性診断のためのキット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腎臓毒性診断、及び化学化合物のリスク層別化のための毒物学的評価の分野に関する。詳細には、本発明は腎臓毒性を診断するための方法に関する。本発明は、化合物が、対象においてそうした腎臓毒性を誘導することができるかどうかを判定するための方法及び腎臓毒性を治療するための薬物を同定する方法にも関する。さらに本発明は、腎臓毒性を診断するための装置及びキットに関する。

【背景技術】

【0002】

腎臓は、いくつかの機能を有する対臓器であり、3つの主要な解剖学的領域、すなわち皮質、髄質及び腎乳頭を有する。腎皮質は腎臓の最も外側の領域であり、糸球体、近位及び遠位尿細管並びに尿細管周囲毛細血管を含む。皮質血流量は高く、皮質は、腎血流量の約90%を受け入れる。血液由来の毒物は優先的に皮質に送達されるので、それらは、髄質又は腎乳頭の機能よりはむしろ皮質の機能に影響を及ぼしやすい。腎髄質は中央部分であり、ヘンレ係蹄、直血管及び集合管を主として含む。髄質は腎血流量の約6%しか受け入れないが、尿細管構造内で高濃度の毒物にさらされる恐れがある。腎乳頭は腎臓の最小の解剖学的部分であり、腎血流量の約1%しか受け入れない。それにもかかわらず、尿細管液が最大限に濃縮され、管腔液が最大限に減少するので、腎乳頭における潜在的な毒物の濃度が極度に高くなり、腎乳頭尿細管細胞及び/又は間質細胞での細胞傷害につながる恐れがある。ネフロンは腎臓の機能単位である。腎臓系の主要な機能は、内因性代謝又は生体異物の代謝のいずれかに由来する老廃物の除去である。腎臓は、体のホメオスタシスの調節でも重要な役割を果たし、細胞外液量及び電解質バランスを調節する。腎臓の他の機能としては、代謝に影響を及ぼすホルモンの合成が挙げられる。アンギオテンシン及びアルドステロンの形成に関与するホルモンであるレニン、いくつかのプロスタグランジンと同様に腎臓で形成される。

【0003】

多数の毒物に対する腎臓の感受性にいくつかの因子が関与するが、高い腎血流量及び尿細管液から水を再吸収した後の排出物濃度の増大は、明らかに非常に重要である。腎臓は体質量の1%未満しか占めないが、心拍出量のおよそ25%を受け入れる。したがって、著しい量の外来性化学物質及び/又はその代謝物が腎臓に送達される。化学物質に対する腎臓の感受性に影響を及ぼす第2の重要な因子は、尿細管液を濃縮し、結果としてそれが含有するいかなる化学物質も濃縮する、その能力である。腎尿細管の輸送の特徴も、毒性の可能性のある化学物質濃度を細胞に送達するのに寄与する。化学物質が血液から尿細管液に能動的に分泌される場合は、化学物質は近位尿細管の細胞内に最初に蓄積することになり、又は化学物質が尿細管液から再吸収される場合は、化学物質は比較的高濃度で細胞に移行することになる。化学物質の反応性代謝物、ひいては潜在的な有毒な代謝物への生体内

変換は、腎毒性の重要な特徴である。肝臓で見られる同様の活性化反応の多くは腎臓でも見られ、アセトアミノフェン、プロモベンゼン、クロロホルム及び四塩化炭素を含めた多くの毒物がいずれかの臓器で活性化する可能性があり、よってこれらは、肝毒性又は腎毒性のいずれかの可能性がある。腎臓のいくつかの領域は、かなりのレベルの異物代謝酵素を有し、特に、化学的損傷に特に感受性の高い領域である近位尿細管直部にチトクロームP450を有する。反応性代謝物は一般に不安定であり、そのため、程度の差はあるが一過性であるので、これらは、発生部位に近い細胞高分子成分と相互作用し得る。したがって、チトクロームP450などの活性化酵素の活性は肝臓よりも腎臓のほうが低いけれども、腎臓の活性化酵素が作用部位に近接しているため、活性化酵素は、肝臓の毒性よりも腎毒性において極めて重要である。他の臓器の毒性と同様に、毒性エンドポイントの最終的な発現は、反応性代謝物の発生とその解毒のバランスの結果である。腎毒物の他の例としては重金属が挙げられる。ある種の抗生物質、中でも特にアミノグリコシドは、腎毒性であると知られている。

10

【 0 0 0 4 】

腎臓は、その独特な機能的及び構造的な構成並びに体のホメオスタシスの制御及び生体異物除去におけるその役割のため、生体異物の影響を頻繁に受ける臓器に相当する。腎臓毒性は、腎毒性とも呼ばれ、化学的に誘導又は引き起こされる腎臓損傷を指す。可能性のある腎毒素作用が多様であるため、腎臓毒性の評価はかなり複雑なプロセスである。現行方法は、臨床的検査(例えば超音波検査)、病理学的及び病理組織学的検査並びに生化学的分析を通常含む。しかし、そうしたパラメーターは、かなり複雑に調節されており、かなり進行したステージでさえも時々変化が生じ得る。病理組織学的評価の主な欠点は、病理組織学的評価が侵襲的であり、評価が、検査する毒物学者の個々の解釈にある程度基づくので、臨床病理学測定と組み合わせた場合でさえも信頼性が低いことである。さらに、腎毒素誘導性腎臓毒性の結果として起こる前述の疾患及び障害は、現在の臨床測定によっては、疾患又は障害の他の原因とほとんど区別することができない(例えば、Cohen AH (2006) Renal anatomy and basic concepts and methods in renal pathology, 3~17; Fogo AB, Cohen AH, Jennette JC, Bruijn JA, Colvin RB (編) Fundamentals of renal pathology, Springer, New York, NY, USA; Greaves P (1998) The urinary system, 89~125: Target organ pathology, a basic text, Turton J及びHooson J (編) Taylor & Francis, London, United Kingdom, 1998; Hodgson E, Levi PE (2004) 第15章 Nephrotoxicity, 273~278: A textbook of modern toxicology, 第3版(Hodgson編)、Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim Germany; Lemley KV, Kriz W (1991) Kidney Internat. 39: 370~381; Molema G, Meijer DKF (2001, 編) Drug Targeting Organ-Specific Strategies, 第5章、121~156、Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim Germany; Verlander J (1998)、Toxicol. Pathol. 26: 1~17を参照されたい)。

20

30

【 0 0 0 5 】

現在、腎臓毒性が、市場から薬が回収されることになる最も一般的な理由の1つであることを考えれば、腎臓毒性の重要性は明らかとなるであろう。さらに、欧州共同体のあらゆる種類の産業で使用されている化学化合物は、例えば、現在、REACH(化学物質の登録、評価、認可(Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals))を順守する必要がある。化学化合物が腎臓毒性を誘導する可能性は、その化合物にとってリスクが高いと見なされ、その結果、その化合物は、限られた用途且つ高い安全基準に従う場合のみ利用可能であることを理解されたい。

40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

化学化合物の毒物学的な性質、特に腎臓毒性を効率的且つ信頼できる様式で評価するための高感度且つ特異的な方法はまだ利用可能でないが、それにもかかわらず高く評価されるであろう。

【 0 0 0 7 】

50

したがって、本発明の根底にある技術的課題は、前述のニーズに応じる手段及び方法を提供することと考えることができる。この技術的課題は、特許請求の範囲で特徴づけられ且つ本明細書の以下に記載される実施形態によって解決される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、本発明は、腎臓毒性を診断するための方法であって、

(a)腎臓毒性を生じていることが疑われる対象の試験サンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較するステップであり、それにより腎臓毒性が診断されることになるステップとを含む、方法に関する。

【0009】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記対象は、腎臓毒性を誘導する能力があることが疑われる化合物と接触させた。

【0010】

本発明は、対象において化合物が腎臓毒性を誘導する能力があるかどうかを判定する方法であって、

(a)腎臓毒性を誘導できることが疑われる化合物と接触させた対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較するステップであり、それにより化合物の腎臓毒性を誘導する能力が判定されるステップとを含む、方法にも関する。

【0011】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記化合物は、アムホテリシンB、⁻-イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物である。

【0012】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、(i)腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群、又は(ii)アムホテリシンB、⁻-イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同じである、バイオマーカーの量が、腎臓毒性を示す。

【0013】

本発明の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、(i)腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は(ii)アムホテリシンB、⁻-イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、

10

20

30

40

50

リシノブリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、腎臓毒性を示す。

【0014】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、前記リファレンスは、対象集団のバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、リファレンスと比較して試験サンプル中において異なるバイオマーカーの量が、腎臓毒性を示す。

10

【0015】

本発明は、腎臓毒性を治療するための物質を同定する方法であって、

(a)腎臓毒性を治療する能力があると推測される候補物質と接触させた腎臓毒性を生じている対象のサンプルにおいて、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカーの量を測定するステップと、

(b)ステップ(a)で測定した量をリファレンスと比較するステップであり、それにより腎臓毒性を治療する能力がある物質が同定されることになるステップとを含む方法も企図する。

20

【0016】

前述の方法の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、(i)腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群、又は(ii)アムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノブリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプルとリファレンスとの間で異なるバイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療する能力がある物質を示す。

30

【0017】

前述の方法の別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、(i)腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群、又は(ii)アムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノブリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来する。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同じである、バイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療する能力がある物質を示す。

40

【0018】

前述の方法のさらに別の好ましい実施形態では、前記リファレンスは、対象集団におけるバイオマーカーについて計算されたリファレンスである。前記方法のより好ましい実施形態では、試験サンプル及びリファレンスにおいて本質的に同じである、バイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療する能力がある物質を示す。

【0019】

本発明は、対象のサンプルにおいて腎臓毒性を診断するための、表1a、1b、1c、1d、2a

50

、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a若しくは11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー又は前記バイオマーカー用の検出剤の使用にも関する。

【0020】

さらに、本発明は、腎臓毒性を生じていることが疑われる対象のサンプルにおいて腎臓毒性を診断するための装置であって、

(a) サンプル中に存在するバイオマーカーの量の測定を可能にする、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種の前記バイオマーカー用の検出剤を備える分析ユニットと、それと作動可能に連結された、

10

(b) 分析ユニットで測定された前記少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたりリファレンスと比較することを可能にし、それによって腎臓毒性が診断される、格納されたりリファレンス及びデータ処理装置を備える評価ユニットとを具備する装置に関する。

【0021】

本発明の装置の好ましい実施形態では、前記格納されたりリファレンスは、腎臓毒性を生じていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたりリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同じである、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカー量が、腎臓毒性が存在することを示し、又はリファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在しないことを示す。

20

【0022】

本発明の装置の別の好ましい実施形態では、前記格納されたりリファレンスは、腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたりリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在することを示し、リファレンスと比較して本質的に同じである、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在しないことを示す。

30

40

【0023】

さらに、本発明は、腎臓毒性診断のためのキットであって、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される少なくとも1種のバイオマーカー用の検出剤、及び濃度が、腎臓毒性を生じていることが分かっている対象若しくは対象群に由来する又は腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来する、少なくと

50

も1種のバイオマーカーのためのスタンダードを含む、キットに関する。

【発明を実施するための形態】

【0024】

特に本発明は、以下の特異的な方法、使用、装置及びキットも企図する。

【0025】

以下の定義及び説明は、前記の本発明の実施形態全て及び以下に記載する実施形態に準用する。

【0026】

本発明に従って言及される方法は、基本的に前述のステップからなるものでもよいし、さらなるステップを含んでもよい。さらなるステップは、サンプルの前処理又はこの方法によって得られた診断結果の評価に関し得る。好ましいさらなる評価ステップは、本明細書の他の個所に記載される。この方法は、部分的に又は完全に自動化により補助することができる。例えば、バイオマーカー量の測定に係るステップは、ロボット化及び自動化読取装置によって自動化することができる。同様に、量の比較に係るステップも、実行の際に、自動的に比較するプログラムコードを備える、コンピューターなどの適切なデータ処理装置によって自動化することができる。そうした場合のリファレンスは、格納されたりリファレンスから、例えばデータベースから提供される。好ましくは、この方法は、対象のサンプルについて *ex vivo* で行われる方法であり、すなわちヒト又は動物の体に対して実施しない方法であることを理解されたい。

【0027】

本明細書で使用する用語「診断」は、対象が、本明細書で言及する中毒、疾患若しくは障害などの状態を生じている、又はそうした状態に関する素因を有する確率を評価することを指す。素因の診断は、対象がその後既定の時間窓内にその状態を発症する見込みの予後又は予測として時には称される場合もある。当業者に理解されるように、そうした評価は、診断される対象の100%について正確であることが好ましいが、通常はそうではない可能性がある。しかし、この用語は、統計的に有意な一部の対象を、その状態を生じている又はその状態に関する素因を有すると特定できることを必要とする。ある一部が統計的に有意かどうかは、様々な周知の統計的な評価ツール、例えば、信頼区間の決定、P値の決定、スチューデントのt検定、マンホイットニー検定などを使用して、当業者であれば容易に判定することができる。詳細は、Dowdy及びWearden、Statistics for Research、John Wiley & Sons、New York 1983に見出される。好ましい信頼区間は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%又は少なくとも95%である。P値は、好ましくは、0.2、0.1、0.05である。

【0028】

本発明による診断は、ある状態又はその症状及びそれらの素因のモニタリング、確認及び分類も含む。モニタリングは、既に診断された状態又は素因の経過を追うことを指す。モニタリングは、例えば、その状態若しくは素因の進行の判定、その状態の進行に対する特定治療の効果の判定、又は素因を有する対象における、その状態の発症に対する予防的治療若しくは食事療法などの予防策の効果の判定を包含する。確認は、既に判定された状態又はその状態の素因の診断を、他の指標又はマーカーを使用して強化すること又は実証することに関する。分類は、(i) 例えばその状態に付随する症状の強さに応じて、その状態を様々なクラスに割り当てること、又は(ii) その状態に付随する、様々なステージ、疾患若しくは障害を区別することに関する。状態の素因は、リスクの程度、すなわち対象が後でその状態を発症する確率に基づいて分類することができる。さらに、分類は、好ましくは、本発明の方法によって試験化合物に作用様式を割り当てることも含む。具体的には、本発明の方法によって、作用様式がまだ知られていない化合物の特異的な作用様式の判定が可能になる。これは、好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーに関して測定された量又は前記化合物の代表的なバイオマーカープロファイルを、リファレンスとして作用様式が知られている化合物に関して測定されたバイオマーカーの量又はバイオマーカープロファイルと比較することによって達成される。化合物の分子標的が同定されるので、

作用様式の分類によって、より一層信頼できる化合物の毒性評価が可能になる。

【0029】

本明細書で使用する用語「腎臓毒性」は、腎機能の障害、特に尿細管又は糸球体の機能の障害をもたらす、腎臓の任意の損傷又は障害に関する。好ましくは、腎臓毒性によって影響を受けるのは、腎臓の排出関連機能である。好ましくは、本明細書で使用する腎臓毒性は、化学化合物又は薬物の投与によって誘導されるか、又はその投与の結果であり、すなわち、いわゆる毒素誘導性腎臓毒性である。より好ましくは、腎臓毒性は、腎尿細管機能障害を伴う。特に、近位尿細管が影響を受ける。最も好ましくは、近位尿細管直部に位置するP450解毒酵素の機能が、本明細書で言及する腎臓毒性化合物によって影響を受ける。

10

【0030】

腎臓毒性の前述の発現の症状及び臨床徴候は、当業者に周知であり、毒性学の標準的な書籍、例えば、H. Marquardt、S. G. Schafer、R. O. McClellan、F. Welsch (編)、「Toxicology」、第14章：The Kidney、297～330ページ1999、Academic Press、London. 第13章：The Liver、1999、Academic Press、Londonに詳細に記載されている。

【0031】

腎臓毒性の好ましい態様は、利尿障害、糸球体-尿細管異常、尿細管異常、弱酸排出障害、尿細管壊死、腎機能障害若しくは腎不全などのACE阻害剤誘導様異常、間質性腎炎、2u - グロブリン腎症及び/又は直接的な尿細管異常を含む。

【0032】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての利尿障害の診断のために測定されるバイオマーカーは、表1a、1b、1c及び1dに収載されているものである。

20

【0033】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての糸球体-尿細管異常の診断のために測定されるバイオマーカーは、表2a、2b、2c及び2dに収載されているものである。

【0034】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての尿細管異常の診断のために測定されるバイオマーカーは、表3a、3b、3c及び3dに収載されているものである。

【0035】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての弱酸排出障害の診断のために測定されるバイオマーカーは、表4a、4b、4c及び4dに収載されているものである。

30

【0036】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての尿細管壊死の診断のために測定されるバイオマーカーは、表5a及び5bに収載されているものである。

【0037】

好ましくは腎臓毒性の一態様としてのACE阻害剤誘導様異常の診断のために測定されるバイオマーカーは、表6a及び6bに収載されているものである。

【0038】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての間質性腎炎の診断のために測定されるバイオマーカーは、表7a及び7bに収載されているものである。

40

【0039】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての直接的な尿細管異常の診断のために測定されるバイオマーカーは、表8a及び8bに収載されているものである。

【0040】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての2uグロブリン腎症の診断のために測定されるバイオマーカーは、表11a及び11bに収載されているものである。

【0041】

各バイオマーカーが、診断について見かけ上統計的に独立した予測因子であるので、表に列挙されているバイオマーカーのうちの2種以上の組み合わせは、さらに診断を強化することが本発明によって見出された。さらに、マーカー存在量に対する他の組織からの影

50

響が相殺されるので、腎臓毒性に対する特異性も有意に増大する。したがって、本明細書で使用する用語「少なくとも1」は、好ましくは、添付の表のうちのいずれか1つで言及されるバイオマーカーの、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9又は少なくとも10の組み合わせを指す。好ましくは、それらの表のうちのいずれか1つで列挙される全てのバイオマーカーが、本発明の方法に従って組み合わせで測定される。

【0042】

したがって好ましくは、少なくとも1種のバイオマーカーは、前述の群から選択される少なくとも1種のバイオマーカーであり、又は少なくとも1種のバイオマーカーは、前述の群のバイオマーカーからなる若しくはそれを含むバイオマーカーの組み合わせである。前述のバイオマーカー及びバイオマーカーの組み合わせは、より詳細に付属の実施例で記載されるように、特に高い診断価値を有する重要なバイオマーカーとして同定された。

10

【0043】

さらに、他のバイオマーカー又は既知の代謝物、遺伝子変異、転写産物及び/若しくはタンパク質の量若しくは酵素活性を含めた臨床的パラメーターをさらに加えて測定してもよい。そうした、本発明の方法によって測定することができる追加的な臨床的又は生化学的パラメーターは、当技術分野で周知である。

【0044】

本明細書で使用する用語「バイオマーカー」は、サンプル中の存在又は濃度が、ある状態、好ましくは本明細書で言及する腎臓毒性の有無又は強さの指標になる化学化合物を指す。好ましくは、化学化合物は、代謝物又はそれに由来するアナライトである。アナライトは、生物で見出される実際の代謝物と同一であり得る化学化合物である。しかし、この用語は、内因的に生成される、又は単離若しくはサンプルの前処理の間、若しくは本発明の方法の実施の結果として、例えば、精製及び/若しくは測定ステップの間に生成されるそのような代謝物の誘導体も含む。特定の場合では、アナライトは、溶解度などの化学的性質によりさらに特徴づけられる。前記性質のため、アナライトは、精製及び/又は測定プロセス中に得られる極性又は脂質画分中に生じ得る。したがって、化学的性質、好ましくは溶解度は、精製及び/又は測定プロセス中に得られる極性又は脂質画分のいずれかの中にアナライトを生じる。したがって、前記化学的性質、特に、精製及び/又は測定プロセス中に得られる極性画分又は脂質画分のいずれかの中のアナライトの発生として考慮される溶解度は、アナライトをさらに特徴づけ、その同定を補助する。こうした化学的性質を判定及び考慮することができる方法についての詳細は、以下に記載される付属の実施例に見出される。好ましくは、アナライトは、定性的及び定量的な様式で代謝物を表し、これによって、対象又は少なくとも前記対象の試験サンプル中の代謝物の有無又は量に関する決定が必然的に可能になる。バイオマーカー、アナライト及び代謝物は、本明細書では単数形で言及されるが、これらの用語の複数形も含み、すなわち、同一分子種の複数のバイオマーカー、アナライト又は代謝物分子を指す。さらに、本発明によるバイオマーカーは、必ずしも1つの分子種に対応するとは限らない。むしろ、バイオマーカーは、化合物の立体異性体又は鏡像異性体を含み得る。さらに、バイオマーカーは、異性体分子のある生物学的クラスの異性体の総和を表すこともできる。前記異性体は、場合によっては同一の分析的特徴を示すものとし、したがって、以下に記載される付属の実施例で適用されるものを含めた種々の分析方法によって区別できない。しかし、異性体は、少なくとも同一の和公式パラメーターを有するので、例えば脂質の場合には、脂肪酸及び/又はスフィンゴ塩基部分において、同一の鎖長並びに同一の二重結合数を有する。

20

30

40

【0045】

本明細書で使用する用語「試験サンプル」は、本発明の方法による腎臓毒性の診断に使用されるサンプルを指す。好ましくは、前記試験サンプルは生物サンプルである。生物源からのサンプル(すなわち生物サンプル)は、複数の代謝物を通常含む。本発明の方法で使用する好ましい生物サンプルは、体液、好ましくは、血液、血漿、血清、唾液、胆汁、尿若しくは脳脊髄液からのサンプル、又は例えば生検によって、細胞、組織若しくは臓器か

50

ら、好ましくは肝臓から得られるサンプルである。より好ましくは、サンプルは、血液、血漿又は血清サンプルであり、最も好ましくは、血漿サンプルである。生物サンプルは、本明細書の他の個所で明記される対象に由来する。前述の様々な種類の生物サンプルを得るための技術は、当技術分野で周知である。例えば、血液サンプルは採血によって得ることができるが、組織又は臓器サンプルは、例えば生検によって得ることになる。

【0046】

好ましくは、前述のサンプルは、前処理してから本発明の方法で使用する。より詳細に以下に記載するように、前記前処理は、化合物を遊離若しくは分離する又は過剰な材料若しくは廃物を除去するのに必要となる処理を含み得る。適切な技術は、遠心分離、抽出、分画、限外濾過、タンパク質沈殿、それに続く化合物の濾過及び精製並びに/又は濃縮を含む。さらに、化合物の分析に適した形状又は濃度で化合物を提供するために、他の前処理が行われる。例えば、ガスクロマトグラフィー連結質量分析を本発明の方法で使用する場合は、前記ガスクロマトグラフィーより前に化合物を誘導体化することが必要となる。適切且つ必要な前処理は、本発明の方法の実施に使用する手段に依存し、当業者に周知である。先に記載したように前処理されたサンプルも、本発明によって使用される用語「サンプル」に含まれる。

【0047】

本明細書で使用する用語「対象」は、動物、好ましくは哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、サル又はウシなど、さらに、好ましくはヒトに関する。より好ましくは、対象はげっ歯類であり、最も好ましくはラットである。本発明の方法を適用して診断することができる他の動物は、魚類、鳥類又は爬虫類である。好ましくは、前記対象は、腎臓毒性を誘導する能力があることが疑われる化合物と接触したか、又は接触させたものである。腎臓毒性を誘導することが疑われる化合物と接触させた対象は、例えば化合物の毒性に関するスクリーニングアッセイで使用する、例えばラットなどの実験動物でもよい。腎臓毒性を誘導する能力がある化合物と接触したことが疑われる対象は、適切な療法を選択するために診断される対象でもあり得る。好ましくは、本明細書で使用する腎臓毒性を誘導する能力がある化合物は、アムホテリシンB、⁻イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン又はデカリンである。

【0048】

好ましくは、対象が雌の場合は、本発明の方法によって測定される少なくとも1種のバイオマーカーは、表1a、1b、2a、2b、3a、3b、4a、4b、5a又は5bのうちのいずれか1つから選択される。

【0049】

好ましくは、対象が雄の場合は、本発明の方法によって測定される少なくとも1種のバイオマーカーは、表1c、1d、2c、2d、3c、3d、4c、4d、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つから選択される。

【0050】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての利尿障害の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含するか基本的にそれらからなる。雌対象用の、18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン、クレアチニン、バリン、trans-4-ヒドロキシプロリン及びプロリン、並びに雄対象用の、コリンプラスマロゲン第2、スフィンゴミエリン(d18:2、C16:0)、コリンプラスマロゲン第3、トレオニン及びセラミド(d18:1、C24:1)。より好ましくは、前述のバイオマーカーは、以下の付属の表に示すように、カフェイン、フロセミド、リシノプリル、テオプロミン若しくはテオフィリンと接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレン

10

20

30

40

50

スに対して変更される。

【0051】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての糸球体-尿管異常の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含する又は基本的にそれらからなる。雌対象用の、クレアチン、グルコサミン、マンノサミン、エライジン酸(C18:trans[9]1)及び3-インドキシル硫酸、並びに雄対象用の、トレオン酸、システイン、リゾホスファチジルコリン(C18:2)、メタネフリン及びクレアチン。より好ましくは、以下の付属の表に示すように、前述のバイオマーカーは、カプトプリル、シクロスポリンA、ペニシラミン若しくはリン酸トリクレジルと接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して変更される。

10

【0052】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての尿管異常の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含する又は基本的にそれらからなる。雌対象用の、クレアチン、リゾホスファチジルコリン(C18:1)、インドール-3-酢酸、ヒスチジン及びグリセロール、極性画分、並びに雄対象用の、プソイドウリジン、タウリン、TAG(C18:1、C18:2)、アラントイン及びキヌレン酸。より好ましくは、以下の付属の表に示すように、前述のバイオマーカーは、 Ca^{2+} -イオン、カルボプラチン若しくはフロセミド、ヘキサクロロブタジエンと接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して変更される。

20

【0053】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての弱酸排出障害の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含する又は基本的にそれらからなる。雌対象用の、プロリン、リゾホスファチジルコリン(C18:2)、インドール-3-乳酸、リノレン酸(C18:cis[6,9,12]3)及びtrans-4-ヒドロキシプロリン、並びに雄対象用の、リゾホスファチジルコリン(C18:0)、ホスファチジルコリン(C16:0、C20:5)、メチオニン、インドール-3-乳酸及びネルボン酸(C24:cis[15]1)。より好ましくは、以下の付属の表に示すように、前述のバイオマーカーは、ジクロロプロップ-p、MC PA、メコプロップ-p、ペンタクロロフェノール若しくはプロベネシドと接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して変更される。

30

【0054】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての尿管壊死の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含する又は基本的にそれらからなる。雌対象用の、馬尿酸、ドコサヘキサエン酸(C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)、ロイシン、ドコサペンタエン酸(C22:cis[7,10,13,16,19]5)及び乳酸。より好ましくは、以下の付属の表に示すように、前述のバイオマーカーは、アムホテリシンB、ヘキサクロロブタジエン又はトブラマイシンs.c.と接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して変更される。

【0055】

好ましくは腎臓毒性の一態様としてのACE阻害剤誘導様異常の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含するか、又は基本的にそれらからなる。雄対象用の、リシン、グリシン、シトシン、1,5-アンヒドロソルビトール及びグルタミン酸。より好ましくは、以下の付属の表に示すように、前述のバイオマーカーは、リシノプリル若しくはラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.若しくはリン酸トリクレジルと接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して変更される。

40

【0056】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての間質性腎炎の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含する又は基本的にそれらからなる。雄対象用の、リグノセリン酸(C24:0)、クレアチン、セリン、トレオニン及びエイコサン酸(C20:0)。より好ましくは、以下の付属の表に示すよう、前述

50

のバイオマーカーはジピロン、エチルベンゼン若しくはリトコール酸と接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して変更される。

【0057】

好ましくは腎臓毒性の一態様としての直接的な尿細管異常の診断のために測定されるバイオマーカーの好ましい群又は組み合わせは、少なくとも以下のバイオマーカーを包含する又は基本的にそれらからなる。雄対象用の、リゾホスファチジルエタノールアミン(C22:0)、ロイシン、オレイン酸(C18:cis[9]1)、TAG第2及びグリセロール-3-リン酸、極性画分。より好ましくは、以下の付属の表に示すように、前述のバイオマーカーは、ヘキサクロロブタジエン若しくはヒドロキノンと接触させていないリファレンス又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して変更される。

【0058】

本明細書で使用する用語「量を測定する」は、バイオマーカー、すなわち代謝物又はアナライトの少なくとも1つの特徴的な特性を測定することを指す。本発明による特徴的な特性は、生化学的性質を含めた、バイオマーカーの物理的及び/又は化学的性質を特徴づける特性である。そうした性質としては、例えば、分子量、粘性、密度、電荷、スピン、光学活性、色、蛍光、化学発光、元素組成、化学構造、他の化合物と反応する能力、生物学的読み取りシステムで応答(例えばレポーター遺伝子の誘導)を惹起する能力などが挙げられる。前記性質に関する値は、特徴的な特性としての役割を果たすことができ、当技術分野で周知の技術によって測定することができる。さらに、特徴的な特性は、標準的な操作、例えば乗算、除算又は対数計算などの数学的計算によってバイオマーカーの物理的及び/又は化学的性質の値から導かれる任意の特性でもよい。最も好ましくは、少なくとも1つの特徴的な特性によって、バイオマーカー及びその量の測定及び/又は化学的な同定が可能になる。したがって、特性値は、好ましくは、特性値が導かれるバイオマーカーの存在量に関する情報も含む。例えば、バイオマーカーの特性値は、質量スペクトルのピークでもよい。そうしたピークは、バイオマーカーの特徴的な情報、すなわち m/z (質量電荷比)情報及びサンプル中の前記バイオマーカーの存在量(すなわちその量)に関する強度値を含有する。

【0059】

先に論じたように、好ましくは、本発明の方法によって測定される少なくとも1種のバイオマーカーは、定量的に又は半定量的に測定することができる。定量的な測定については、バイオマーカーの絶対量又は正確な量のいずれかが測定されるか、又は本明細書の上記で言及した特徴的な特性(複数可)に関して測定された値に基づいて、バイオマーカーの相対量が測定される。相対量は、バイオマーカーの正確な量が測定できない又は測定すべきでない場合に、測定することができる。前記の場合では、バイオマーカーの存在量が第2の量で前記バイオマーカーを含む第2のサンプルに対して増大又は低下しているのかを判定することができる。したがって、バイオマーカーの定量分析は、バイオマーカーの半定量分析と呼ばれることもある分析も含む。

【0060】

さらに、本発明の方法で使用される測定は、好ましくは、先に言及された分析ステップより前に、化合物分離ステップの使用を含む。好ましくは、前記化合物分離ステップによって、サンプルに含まれる少なくとも1種のバイオマーカーの時間分解分離がもたらされる。したがって、本発明に従って好んで使用される適切な分離技術には、全てのクロマトグラフィー分離技術、例えば、液体クロマトグラフィー(LC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、薄層クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィーが含まれる。こうした技術は、当技術分野で周知であり、当業者であれば容易に適用することができる。最も好ましくは、LC及び/又はGCが本発明の方法で想定されるクロマトグラフィー技術である。バイオマーカーのそうした測定に適切な装置は、当技術分野で周知である。好ましくは、質量分析が使用され、特に、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、直接注入質量分析若しくはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(

10

20

30

40

50

FT-ICR-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)、高速液体クロマトグラフィー連結質量分析(HPLC-MS)、四重極質量分析、MS-MS又はMS-MS-MSなどの任意の逐次連結質量分析、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)、熱分解質量分析(Py-MS)、イオン移動度質量分析又は飛行時間型質量分析(TOF)が使用される。最も好ましくは、以下で詳細に記載されるように、LC-MS及び/又はGC-MSが使用される。前記技術は、例えば、Nissen 1995、Journal of Chromatography A、703: 37~57、US 4,540,884又はUS 5,397,894に開示されており、その開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。質量分析技術の代わりとして又はそれに加えて、以下の技術を化合物の測定に使用することができる:核磁気共鳴(NMR)、磁気共鳴画像(MRI)、フーリエ変換赤外分析(FT-IR)、紫外(UV)分光、屈折率(RI)、蛍光検出、放射化学的検出、電気化学的検出、光散乱(LS)、分散ラマン分光法又は炎イオン化検出(FID)。こうした技術は当業者に周知であり、容易に適用することができる。好ましくは、本発明の方法は、自動化によって補助されるものとする。例えば、サンプルの処理又は前処理は、ロボットによって自動化することができる。好ましくは、データの処理及び比較は、適切なコンピュータプログラム及びデータベースによって補助される。先に本明細書に記載した自動化によって、ハイスループット法で本発明の方法を使用することが可能になる。

10

【0061】

さらに、バイオマーカーは、特異的な化学的又は生物学的アッセイによって測定することもできる。前記アッセイは、サンプル中のバイオマーカーの特異的な検出を可能にする手段を含むものとする。好ましくは、前記手段は、他の化合物と反応するバイオマーカーの能力、又は生物学的読み取りシステムにおいて応答(例えばレポーター遺伝子の誘導)を惹起するその能力に基づいて、バイオマーカーの化学構造を特異的に認識することができるか、又はバイオマーカーを特異的に同定することができる。バイオマーカーの化学構造を特異的に認識することができる手段は、好ましくは、バイオマーカーに特異的に結合する検出剤、より好ましくは、化学構造物と特異的に相互作用する抗体又は他のタンパク質、例えば受容体又は酵素又はアプタマーである。例えば、特異的な抗体は、抗原としてバイオマーカーを使用して、当技術分野で周知の方法によって得ることができる。本明細書で言及する抗体には、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方、及びそれらのフラグメント、例えば、抗原又はハプテンと結合することができるFv、Fab及びF(ab)₂フラグメントが含まれる。本発明は、所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列をヒトアクセプター抗体の配列と組み合わせた、ヒト化ハイブリッド抗体も含む。さらに、単鎖抗体が包含される。ドナー配列は、少なくともドナーの抗原結合アミノ酸残基を通常含むが、他の構造的及び/又はドナー抗体の機能的に関連性のあるアミノ酸残基もまた含んでもよい。そうしたハイブリッドは、当技術分野で周知のいくつかの方法によって調製することができる。代謝物を特異的に認識することができる適切なタンパク質は、好ましくは、前記バイオマーカーの代謝変換に関与する酵素である。前記酵素は、バイオマーカー、例えば代謝物を基質として使用してもよいし、基質をバイオマーカー、例えば代謝物に変換してもよい。さらに、前記抗体は、バイオマーカーを特異的に認識するオリゴペプチドを生成するための基礎として使用することができる。こうしたオリゴペプチドは、例えば、酵素の結合ドメイン又は前記バイオマーカーに対するポケットを含むものとする。適切な抗体及び/又は酵素に基づくアッセイは、RIA(放射免疫測定法)、ELISA(酵素結合免疫吸着測定法)、サンドイッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドイッチ免疫測定法(electrochemiluminescence sandwich immunoassays)(ECLIA)、解離促進ランタニド蛍光免疫測定法(dissociation-enhanced lanthanide fluoro immuno assay)(DELFI)又は固相免疫試験でもよい。バイオマーカーに特異的に結合するアプタマーは、当技術分野で周知の方法で生成することができる(Ellington 1990、Nature 346:818~822; Vater 2003、Curr Opin Drug Discov Devel 6(2): 253~261)。さらに、バイオマーカーは、他の化合物と反応するその能力に基づいて、すなわち特異的な化学反応によって、同定することもできる。さらに、バイオマーカーは、生物学的読み取りシステムで応答を惹起するその能力のため、サンプル中で測定することができる。生物学的な応答は、サンプルに含まれる代謝

20

30

40

50

物の存在及び/又は代謝物の量を示す読み取り値として検出されるものとする。生物学的な応答は、例えば、細胞又は生物の遺伝子発現誘導又は表現型応答でもよい。

【0062】

用語「リファレンス」は、少なくとも1種のバイオマーカーの特徴的な特性の値を指し、好ましくは、腎臓毒性と関連し得る前記バイオマーカーの量の指標になる値を指す。

【0063】

好ましくは、そうしたリファレンスは、腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群に由来するサンプル、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンに接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られる。対象又は対象群は、化合物が生物学的に利用可能である限り、局所又は全身の各投与様式で前記化合物に接触させることができる。好ましい投与様式は、以下の付属の実施例に記載される。

10

【0064】

或いは、とはいえ同様に好ましいことであるが、リファレンスは、アムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプル、又は腎臓毒性に関して、より好ましくは他の疾患に関しても、健康な対象若しくはそうした対象の群に由来するサンプルから得ることができる。

20

【0065】

リファレンスは、バイオマーカーの量について上で記載したように測定することができる。特に、好ましくは、リファレンスは、本明細書で言及する一群の対象のサンプルから得られ、これは、その群の各個体由来のサンプル中の少なくとも1種のバイオマーカー(複数可)それぞれの相対量又は絶対量を別々に測定し、その後、本明細書の他の個所で言及される統計的技術を使用して、前記相対量若しくは絶対量に対する中央値若しくは平均値又はそれらから得られる任意のパラメータを決定することによって得られる。或いは、好ましくは、本明細書で言及するように、リファレンスは、対象群のサンプル混合物由来のサンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーそれぞれに対する相対量又は絶対量を測定することによって得ることができる。好ましくは、そうした混合物は、前記群の各個体から得られるサンプル由来の等容量の部分からなる。

30

【0066】

さらに、また好ましくは、リファレンスは計算されたリファレンスでもよく、最も好ましくは、個体集団に由来する少なくとも1種のバイオマーカーのそれぞれの相対量又は絶対量に対する平均値又は中央値でもよい。前記個体集団は、本発明の方法によって調査される対象が由来する集団である。しかし、計算されたリファレンスを決定するために調査する対象集団は、好ましくは、見かけ上健康な対象(例えば未処理)からなるか、又は前記集団内に試験対象(複数可)が存在することに起因する平均値又は中央値の有意な変化に対して統計的に耐えるのに十分な大きさの、見かけ上健康な多数の対象を含むことを理解されたい。前記集団の個体の少なくとも1種のバイオマーカーの絶対量又は相対量は、本明細書の他の個所で明記されるように判定することができる。適切なリファレンス値、好ましくは平均値又は中央値を計算する方法は、当技術分野で周知である。適切なリファレンスを計算するための他の技術としては、受信者動作特性(ROC)曲線計算を用いる最適化が挙げられ、これは、当技術分野で同様に周知であり、対象の所与のコホートに基づく所与

40

50

の特異性及び感受性を有するアッセイ系について、容易に実施することができる。先に言及した集団又は対象群は、複数の対象、好ましくは、少なくとも5、10、50、100、1,000又は10,000の対象、最大で集団全てまでを含む。より好ましくは、この文脈において言及される対象群は、所与の集団を統計的に代表する大きさを有する対象群、すなわち統計的に代表的なサンプルである。本発明の方法によって診断される対象及び前記複数の対象の対象は同一種であり、好ましくは同じ性別であることを理解されたい。

【0067】

より好ましくは、リファレンスは、データベースなどの適切なデータ記憶媒体に格納されるので、その後の診断にも利用可能である。これによって、腎臓毒性の素因を効率的に診断することが可能になる。なぜなら、対応するリファレンスサンプルが得られた対象が(実際に)腎臓毒性を発症したことが、(その後)一度確認されれば、適切なリファレンス結果をデータベース中で特定することができるからである。

10

【0068】

用語「比較する」は、少なくとも1種のバイオマーカーの定性的又は定量的な測定量が、リファレンスと同じであるか又はそれと異なるかを評価することを指す。

【0069】

リファレンス結果が、腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群に由来するサンプル、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンと接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られた場合は、腎臓毒性は、試験サンプル及び前述のリファレンスから得られる量の間の同程度又は類似度に基づいて、すなわち、少なくとも1種のバイオマーカーに関する同一の定性的又は定量的な組成に基づいて診断することができる。同じ量は、統計的に有意な様式で異なる量を含み、好ましくは、少なくともリファレンスの1~99パーセンタイル、5~95パーセンタイル、10~90パーセンタイル、20~80パーセンタイル、30~70パーセンタイル、40~60パーセンタイルの区間内、より好ましくは、リファレンスの50、60、70、80、90又は95パーセンタイルである。腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンと接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、腎臓毒性を診断するために、又は対象において化合物が腎臓毒性を誘導することができるかどうかを判定するために、本発明の方法で適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと本質的に同じである、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性又は腎臓毒性を誘導することができる化合物が存在することを示し、一方で、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性又は腎臓毒性を誘導することができる化合物が存在しないことを示す。

20

30

40

【0070】

さらに、腎臓毒性を生じている対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオ

50

ブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンと接触させた対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、腎臓毒性を治療するための物質を同定するのに適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療するのに適した物質を示し、一方で、リファレンスと本質的に同じである、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療できない物質を示す。

【0071】

リファレンス結果が、アムホテリシンB、 Ca^{2+} -イオン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンに接触させていない対象若しくは対象群のサンプル、又は腎臓毒性を生じていない対象若しくは対象群のサンプルから得られる場合は、前記腎臓毒性は、試験サンプルから得られる試験量と前述のリファレンスの差異、すなわち、少なくとも1種のバイオマーカーに関する定性的又は定量的な組成における差異に基づいて診断することができる。

10

【0072】

上で明記した計算されたリファレンスが使用される場合も、同じことが当てはまる。

20

【0073】

差異は、少なくとも1種のバイオマーカーの絶対量又は相対量の増大(バイオマーカーのアップレギュレーションと称されることもある。実施例も参照されたい。)であってもよいし、前記量のいずれかの低下若しくは検出可能なバイオマーカーの量が存在しないこと(バイオマーカーのダウンレギュレーションと称されることもある。実施例も参照されたい。)であってもよい。好ましくは、相対量又は絶対量の差異は有意であり、すなわち、リファレンスの45~55パーセント、40~60パーセント、30~70パーセント、20~80パーセント、10~90パーセント、5~95パーセント、1~99パーセントの区間外である。

【0074】

30

アムホテリシンB、 Ca^{2+} -イオン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンス、又は腎臓毒性を生じていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、腎臓毒性を診断するために、又は対象において化合物が腎臓毒性を誘導する能力を有するかどうかを判定するために、本発明の方法で適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性又は腎臓毒性を誘導することができる化合物が存在することを示し、一方で、リファレンスと本質的に同じである、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性又は腎臓毒性を誘導することができる化合物が存在しないことを示す。さらに、アムホテリシンB、 Ca^{2+} -イオン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオブロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンに接触させていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリ

40

50

ファレンス、又は腎臓毒性を生じていない対象若しくは対象群に由来するサンプルから得られるリファレンスは、腎臓毒性を治療するための物質を同定するのに適用することができる。そのような場合では、好ましくは、リファレンスと本質的に同じである、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療するのに適した物質を示し、一方で、リファレンスと異なる、少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性を治療するのに適さない物質を示す。

【0075】

好ましいリファレンスは、付属の表で言及されるもの又は以下の付属の実施例で生成することができるものである。さらに、相対的差異、すなわち個々のバイオマーカーに対する量の増大又は低下は、好ましくは、以下の表に列挙されるものである。さらに、好ましくは、観察される差異の程度、すなわち増大又は低下は、好ましくは、以下の表に示される因子による増大又は低下である。

10

【0076】

好ましくは、表1a、1c、2a、2c、3a、3c、4a、4c、5a、6a、7a、8a又は11aから選択される場合の少なくとも1種のバイオマーカーは、アムホテリシンB、⁻イオン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンに接触させていないリファレンス、又は腎臓毒性を生じていないリファレンスに対して、より好ましくは、以下の表で使用されるリファレンスに対して増大する。

20

【0077】

好ましくは、表1b、1d、2b、2d、3b、3d、4b、4d、5b、6b、7b、8b又は11bから選択される場合の少なくとも1種のバイオマーカーは、アムホテリシンB、⁻イオン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン若しくはデカリンに接触させていないリファレンス、又は腎臓毒性を生じていないリファレンス、より好ましくは、以下の表で使用されるリファレンスに対して低下する。

30

【0078】

好ましくは、比較は自動化によって補助される。例えば、2つの異なるデータセット(例えば、特徴的な特性(複数可)の値を含むデータセット)を比較するためのアルゴリズムを含む適切なコンピュータープログラムを使用することができる。そうしたコンピュータープログラム及びアルゴリズムは、当技術分野で周知である。上記にもかかわらず、手動で比較することもできる。

【0079】

用語「腎臓毒性を治療するための物質」は、本明細書の他の個所で言及される腎臓毒性を誘導する生物学的機序を直接的に妨げることができる化合物を指す。或いは、腎臓毒性に付随する症状の発症又は進行を妨げることができる化合物も好ましい。本発明の方法によって同定される物質は、有機及び無機化学物質、例えば、低分子、ポリヌクレオチド、siRNA、リボザイム若しくはマイクロRNA分子を含めたオリゴヌクレオチド、ペプチド、抗体を含めたポリペプチド又は他の人工的若しくは生物学的な高分子、例えばアプタマーなどでもよい。好ましくは、この物質は、薬物、プロドラッグ又は薬物若しくはプロドラッグを開発するためのリード物質として適する。

40

【0080】

本発明の方法が、腎臓毒性の療法のための薬物の同定、又は化合物の毒物学的評価(すなわち、化合物が腎臓毒性を誘導することができるかどうかの判定)のために使用される

50

ことになる場合は、統計的理由のために、複数の対象の試験サンプルが調査され得ることを理解されたい。好ましくは、試験対象のそうしたコホート内のメタボロームは、例えば調査化合物以外の因子によって引き起こされる差異を回避するために、できるだけ類似しているものとする。前記方法に使用する対象は、好ましくはげっ歯類などの実験動物、より好ましくはラットである。前記実験動物は、好ましくは、本発明の方法が終了した後で屠殺するものとするをさらに理解されたい。コホート試験の対象及びリファレンス動物の全ては、いかなる特異な環境上の影響も回避するために、同一条件下で維持されるものとする。そうした動物を提供する適切な条件及び方法は、WO2007/014825に詳細に記載されている。前記条件は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0081】

好ましくは、本発明の方法は本発明の装置に実装され得る。本明細書で使用する装置は、少なくとも前述のユニットを備えるものとする。装置のユニットは、互いに作動可能に連結される。作動的にユニットを連結する方法は、装置中に備えられるユニットの種類に依存する。例えば、少なくとも1種のバイオマーカーを定性的又は定量的に自動的に測定するための手段が分析ユニット中に適用される場合は、前記自動的な作動ユニットによって得られるデータは、診断を容易にするために、評価ユニットによって、例えば、データ処理装置であるコンピューターで動作するコンピュータープログラムによって処理することができる。好ましくは、そのような場合は、これらのユニットは単一装置に備えられる。しかし、分析ユニットと評価ユニットは、物理的に離れていてもよい。そのような場合では、作動的な連結は、データ伝達を可能にする、ユニット間の有線接続及び無線接続によって達成することができる。無線接続は、無線LAN(WLAN)又はインターネットを使用することができる。有線接続は、ユニット間の光及び非光ケーブル接続によって達成することができる。好ましくは、有線接続に使用するケーブルは、ハイスループットなデータ転送に適する。

【0082】

少なくとも1種のバイオマーカーを測定するための好ましい分析ユニットは、本明細書の他の個所で明記されるような、少なくとも1種のバイオマーカーを特異的に認識する検出剤、例えば抗体、タンパク質又はアプタマーなど、及び前記検出剤を試験サンプルと接触させるゾーンを備える。検出剤は、ゾーン上に固定化して接触させてもよいし、サンプルを負荷した後に前記ゾーンに加えてもよい。好ましくは、分析ユニットは、検出剤と少なくとも1種のバイオマーカーの複合物の量を定性的及び/又は定量的に測定するように適合させるものとする。検出剤が少なくとも1種のバイオマーカーへ結合する際に、少なくとも1種のバイオマーカー、検出剤のいずれか又は両方の少なくとも1つの測定可能な物理的又は化学的性質が変化し、その結果、好ましくは分析ユニットに備えられる検出器によって前記変化を測定できることを理解されたい。しかし、試験ストライプなどの分析ユニットを使用する場合は、検出器及び分析ユニットは、測定のためだけに結合させられる分離したコンポーネントでもよい。少なくとも1つの測定可能な物理的又は化学的性質において検出された変化に基づいて、分析ユニットは、本明細書の他の個所で明記される少なくとも1種のバイオマーカーに関する強度値を計算することができる。次いで、さらに処理及び評価するために、前記強度値を評価ユニットに伝達することができる。最も好ましくは、本明細書の他の個所で明記される検出剤を使用して、少なくとも1種のバイオマーカーの量をELISA、EIA又はRIAに基づく技術によって判定することができる。或いは、本明細書で言及する分析ユニットは、好ましくは、クロマトグラフィー装置などのバイオマーカーを分離するための手段、及び分光測定装置などのバイオマーカーを測定するための手段を備える。適切な装置は、詳細に先に記載されている。本発明のシステムで使用する化合物分離用の好ましい手段としては、クロマトグラフィー装置、より好ましくは液体クロマトグラフィー装置、HPLC装置及び/又はガスクロマトグラフィー装置が挙げられる。化合物測定用の好ましい装置は、質量分析装置、より好ましくは、GC-MS、LC-MS、直接注入質量分析装置、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四重極質量分析装置、(MS-MS若しくはMS-MS-MSを含めた)逐次連結質量分析装置、ICP-MS、Py-MS又はTOFを含む。好ましくは、分離

10

20

30

40

50

及び測定の手段は互いに連結される。最も好ましくは、LC-MS及び/又はGC-MSが、本発明によって言及される分析ユニットで使用される。

【0083】

好ましくは、本発明の装置の評価ユニットは、本明細書の他の個所で明記されるように、比較を実施するためのルールを実行するように適合させたデータ処理装置又はコンピューターを備える。さらに、好ましくは、評価ユニットは、リファレンスを格納したデータベースを備える。本明細書で使用するデータベースは、適切な記憶媒体のデータ集合を備える。さらに、データベースは、好ましくはデータベース管理システムをさらに備える。好ましくは、データベース管理システムは、ネットワーク型、階層型又はオブジェクト指向型データベース管理システムである。さらに、データベースは、連邦データベースでもよいし、統合データベースでもよい。より好ましくは、データベースは、分散(連邦)システムとして、例えばクライアントサーバシステムとして実装される。より好ましくは、データベースは、検索アルゴリズムが、試験データセットをデータ集合に含まれるデータセットと比較できるように構築される。具体的には、そうしたアルゴリズムを使用することによって、腎臓毒性の指標になる類似又は同一のデータセットについてデータベースを検索することができる(例えばクエリ検索)。したがって、同一又は類似のデータセットをデータ集合中に特定することができる場合は、試験データセットは腎臓毒性と関係があることになる。評価ユニットは、好ましくは、腎臓毒性の確定診断に基づく治療的若しくは予防的な介入又は生活習慣の適応に対する助言を有するさらなるデータベースを備えてもよいし、それに作動可能に連結されてもよい。好ましくは、腎臓毒性を治療又は予防するために、試験サンプルを得た対象に対する適切な助言を特定する目的で、評価ユニットによって得られた診断結果を用いて前記のさらなるデータベースを自動的に検索することができる。

10

20

【0084】

本発明の装置の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、腎臓毒性を生じていることが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させた対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して本質的に同じである、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在することを示し、又はリファレンスと比較して異なる、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在しないことを示す。

30

【0085】

本発明の装置の別の好ましい実施形態では、前記格納されたリファレンスは、腎臓毒性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群に由来するリファレンス、又はアムホテリシンB、 β -イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロルプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させていない対象若しくは対象群に由来するリファレンスであり、前記データ処理装置は、分析ユニットで測定された少なくとも1種のバイオマーカーの量を格納されたリファレンスと比較するための指示を実行し、リファレンスと比較して異なる、試

40

50

験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在することを示し、又はリファレンスと比較して本質的に同じである、試験サンプル中の少なくとも1種のバイオマーカーの量が、腎臓毒性が存在しないことを示す。

【0086】

したがって、助言を行うエキスパートシステムが含まれる場合は特に、メディカルスタッフ若しくは検査室スタッフ又は患者が特別な医学知識なしで装置を使用することもできる。この装置は、携帯型に適合させることができるので、患者の近くでの用途にも適する。

【0087】

用語「キット」は、好ましくは別々に又は単一の容器内に提供される、前述のコンポーネントの集合を指す。容器は、本発明の方法の実施に関する指示も備える。こうした指示は、取扱説明書の形でよいし、コンピューター又はデータ処理装置上に実装される場合には、本発明の方法で言及される比較を実施でき、それに応じて診断を確定するためのコンピュータープログラムコードによって提供されてもよい。コンピュータープログラムコードは、データ記憶媒体若しくは装置、例えば光若しくは磁気記憶媒体(例えば、コンパクトディスク(CD)、CD-ROM、ハードディスク、光記録媒体若しくはディスク)上に、又はコンピューター若しくはデータ処理装置上に直接的に提供することができる。本発明のキットに関して言及される「スタンダード」は、溶液中に存在する又は既定の溶液量中に溶解されている場合の少なくとも1種のバイオマーカーの量であり、これは(i)腎臓毒性を生じていることが分かっている対象若しくは対象群、若しくはアムホテリシンB、
-イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロ
ップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ
ン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロ
ロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシ
ンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタ
ン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触させ
た対象若しくは対象群中に存在する少なくとも1種のバイオマーカーの量、又は(ii)腎臓毒
性を生じていないことが分かっている対象若しくは対象群、若しくはアムホテリシンB、
-イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロ
ロプロップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロ
キノ
ン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタク
ロロフェノール、プロベネシド、ラミプリル、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイ
シンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テトラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペンタ
ン、D-リモネン及びデカリンからなる群から選択される少なくとも1種の化合物と接触さ
せていない対象若しくは対象群に由来する少なくとも1種のバイオマーカーの量に類似し
ている。

【0088】

好都合なことに、本明細書に明記される少なくとも1種のバイオマーカーの量によって、腎臓毒性、具体的にはアムホテリシンB、
-イオノン、カフェイン、カプトプリル、カルボプラチン、シクロスポリンA、ジクロロプロ
ップ-p、ジピロン、エチルベンゼン、フ
ロセミド、ヘキサクロロブタジエン、ヒドロキノ
ン、リシノプリル、リトコール酸、MCPA
、メコプロップ-p、ペニシラミン、ペンタクロ
ロフェノール、プロベネシド、ラミプリル
、テオプロミン、テオフィリン、トブラマイシ
ンs.c.、リン酸トリクレジル、1,1,2,2-テ
トラクロロエタン、2,2,4-トリメチルペン
タン、D-リモネン及びデカリンによって誘導さ
れる腎臓毒性の診断が可能になることが、本発明の根底となる研究において見出されてい
る。本方法の特異性及び正確性は、前述のバイオマーカーの数を増加させて測定すること
によって又はさらにその全てを測定することによって、より一層向上する。こうした特異
的なバイオマーカーに関するメタボロームの定量的及び/又は定性的組成の変化は、腎臓
毒性の他の徴候が臨床的に明らかになる前でさえ、腎臓毒性を示す。腎臓毒性を診断す
るのに現在使用されている形態的、生理的及び生化学的なパラメーターは、本発明で提供す

10

20

30

40

50

るバイオマーカー測定と比較すると、特異性及び感受性が低い。本発明によって、化合物の腎臓毒性を、より効率的且つ確実に評価することができる。さらに、前述の知見に基づいて、腎臓毒性の療法に有用な薬物のスクリーニングアッセイが実行可能である。概して、本発明は、腎臓毒性を診断するための、化合物が腎臓毒性を誘導する能力があるかどうかを判定するための、又は腎臓毒性を治療する能力がある物質を同定するための、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a若しくは11bのうちのいずれか1つから選択される対象のサンプルの少なくとも1種のバイオマーカー又は前記バイオマーカー用の検出剤の使用を企図する。さらに、本発明は概して、腎臓毒性の治療に対して感受性である対象を同定するための、対象のサンプルの少なくとも1種のバイオマーカー、又はそのバイオマーカーの検出剤の使用を企図する。本発明のこの文脈において使用するのに好ましい検出剤は、本明細書の他の個所で言及されるものである。さらに好都合なことに、発明の方法は装置中に実装することができる。さらに、本方法を実施できるようにするキットを提供することができる。

10

20

30

40

50

【0089】

本発明は、表1a、1b、1c、1d、2a、2b、2c、2d、3a、3b、3c、3d、4a、4b、4c、4d、5a、5b、6a、6b、7a、7b、8a、8b、11a又は11bのうちのいずれか1つに列挙されるバイオマーカーに対する特性値を含むデータ集合にも関する。用語「データ集合」は、物理的及び/又は論理的にグループ化され得るデータの集合を指す。したがって、データ集合は、単一のデータ記憶媒体又は互いに作動可能に連結された物理的に離れたデータ記憶媒体に実装することができる。好ましくは、データ集合は、データベースによって実装される。したがって、本明細書で使用するデータベースは、適切な記憶媒体上にデータ集合を備える。さらに、好ましくは、データベースはデータベース管理システムをさらに備える。好ましくは、データベース管理システムは、ネットワーク型、階層型又はオブジェクト指向型のデータベース管理システムである。さらに、データベースは、連邦データベースでも統合データベースでもよい。より好ましくは、データベースは、分散(連邦)システムとして、例えばクライアントサーバシステムとして実装される。より好ましくは、データベースは、検索アルゴリズムが試験データセットをデータ集合に含まれるデータセットと比較できるように構築される。具体的には、そうしたアルゴリズムを使用することによって、腎臓毒性の指標になる類似の又は同一のデータセットについてデータベースを検索することができる(例えばクエリ検索)。したがって、同一又は類似のデータセットをデータ集合中に特定することができる場合は、試験データセットは腎臓毒性と関係があることになる。結果として、データ集合から得られる情報を使用して、対象から得られる試験データセットに基づいて腎臓毒性を診断することができる。

【0090】

さらに、本発明は、前記データ集合を備えるデータ記憶媒体に関する。本明細書で使用する用語「データ記憶媒体」は、CD、CD-ROM、ハードディスク、光記録媒体又はディスクセットなどの単一の物理エンティティに基づくデータ記憶媒体を包含する。さらにこの用語は、好ましくはクエリ検索に適切なやり方で、前述のデータ集合を提供するように互いに作動可能に連結された、物理的に別個の実体からなるデータ記憶媒体をさらに含む。

【0091】

本発明はまた、
(a) サンプルの少なくとも1種のバイオマーカーの特性値を比較するための手段と、それに作動可能に連結された、
(b) 本発明のデータ記憶媒体とを含むシステムに関する。

【0092】

本明細書で使用する用語「システム」は、互いに作動可能に連結される異なる手段に関する。前記手段は、単一装置に実装されてもよいし、互いに作動可能に連結された物理的に別個の装置に実装されてもよい。好ましくは、バイオマーカーの特性値を比較するための手段は、上で言及したような比較アルゴリズムに基づいて作動する。好ましくは、デー

タ記憶媒体は、前述のデータ集合又はデータベースを備え、各記憶データセットが腎臓毒性の指標になる。したがって、本発明のシステムによって、試験データセットがデータ記憶媒体に格納されるデータ集合に含まれるかどうかを特定することが可能になる。結果として、本発明のシステムは、腎臓毒性診断の診断手段として適用することができる。本システムの好ましい実施形態では、サンプルのバイオマーカーの特性値を測定するための手段が含まれる。用語「バイオマーカーの特性値を測定するための手段」は、好ましくは、質量分析装置、ELISA装置、NMR装置又はアナライトについて化学的若しくは生物学的アッセイを実施するための装置などの、バイオマーカーを測定するための前述の装置に関する。

【0093】

先に言及した全ての参考文献は、その開示内容全体及び先の記述で明確に言及したその具体的な開示内容に関して、参考により本明細書に組み込むものとする。

【0094】

以下の実施例は、本発明を説明する目的のためにすぎない。これらは、いかなる観点においても本発明の範囲を限定するものと何ら解釈されるべきでない。

【実施例】

【0095】

実施例：腎臓毒性に関連するバイオマーカー

各5匹の雄及び雌ラットの群に、示した化合物(化合物、投与量及び投与詳細について以下の表9を参照のこと)を28日間にわたって1日1回投与した。

【0096】

本研究の各投与群は、性別あたり5匹のラットからなっていた。それぞれ5匹の雄及び雌の動物の追加的な群を対照とした。処理期間の開始前に、供給時に62～64日齢の動物を、居住及び環境条件に7日間順応させた。動物集団の全ての動物を、同一の一定温度(20～24±3)及び同一の一定湿度(30～70%)下で維持した。動物集団の動物は、不断給餌させた。使用する餌には、化学物質又は微生物の混入物は基本的に含まれていなかった。飲料水も自由に与えた。したがって、欧州飲料水指令(European Drinking Water Directive)98/83/EGに規定されている通り、水には、化学物質及び微生物の混入物は含まれていなかった。照明期間は、12時間明期、続いて12時間暗期(6:00から18:00までの12時間明期及び18:00から6:00までの12時間暗期)とした。本研究は、ドイツ動物保護法及び欧州理事会指令86/609/EEに従って、AAALACに認可された実験室で実施した。試験系は、げっ歯類での28日間反復投与経口毒性試験について化学物質を試験するために、OECD 407指針に従ってアレンジした。試験物質(表9の化合物)を、上の表に記載されるように用量決定し、投与した。

【0097】

7日目、14日目及び28日目の朝に、絶食させた麻醉下の動物の眼窩後静脈叢から採血した。抗凝血剤としてEDTAを用いて、各動物から1mlの血液を採取した。このサンプルを遠心分離して、血漿を生成した。全ての血漿サンプルをN₂雰囲気下で覆い、次いで分析まで-80℃で保管した。

【0098】

質量分析に基づく代謝物プロファイリング分析のために、血漿サンプルを抽出し、極性及び非極性(脂質)画分を得た。GC-MS分析のために、非極性画分を酸性条件下でメタノールで処理して、脂肪酸メチルエステルを得た。O-メチル-ヒドロキシアミン塩酸塩及びピリジンを用いて両画分をさらに誘導体化してオキシ基をO-メチルオキシムに変換し、その後シリル化剤を用いて誘導体化してから分析した。LC-MS分析では、両画分を適切な溶媒混合液中で再構成した。HPLCは、逆相分離カラムによって勾配溶出で実施した。WO2003/073464に記載されるように、フルスクリーン分析と並行して、標的及び高感度MRM(多重反応モニタリング)プロファイリングを可能にする質量分析検出を適用した。

【0099】

ステロイド及びその代謝物は、オンラインのSPE-LC-MS(固相抽出LC-MS)によって測定し

10

20

30

40

50

た。カテコールアミン及びその代謝物は、Yamadaら(Yamada 2002、Journal of Analytical Toxicology、26(1): 17~22))によって記載されるように、オンラインのSPE-LC-MSによって測定した。

【0100】

総合的な分析検証ステップに続いて、各アナライトに関するデータを、プールサンプル由来のデータに対して標準化した。これらのサンプルは、プロセス変動を説明するために、全プロセスを通して並行して処理した。性別、処理期間及び代謝物に対して特異的な処理群値の有意性を、処理群の平均と対応する未処理の対照群の平均をWELCH試験を用いて比較することによって判定し、対照に対する処理比及びP値を用いて定量化した。

【0101】

毒性パターン毎の最も重要なバイオマーカーを、以下の表のアナライトの序列化によって同定した。したがって、所与のパターンのリファレンス処理における代謝変化(表に示す)を、関係のない処理における同一代謝物の変化と比較した。各代謝物について、リファレンス及び対照処理からT値を得て、Welch試験によって比較して、これら2群に有意差があるかどうかを評価した。それぞれのT値の最大絶対値を選んで、そのパターンに対する最も重要な代謝物を示した。

【0102】

ラットを処理した後の、腎臓毒性を示す血漿代謝物群の変化を以下の表に示す。

【表1a】

表1a:雌ラットにおける腎臓毒性(利尿作用)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

	テオフィリン	カフェイン	フロセミド
代謝物	f28	f28	f28
バリリン	1.29 *	1.15 *	1.17 *
trans-4-ヒドロキシプロリン	1.91 *	1.23 *	1.16 *
プロリン	1.57	1.23	1.16 *
グリシン	1.32 *	1.5 *	1.14 *
パントテン酸	1.72 *	1.23 *	1.15 *
ヒスチジン	1.25 *	1.29 *	1.35 *
トレオン酸	1.14	1.46 *	1.39 *

【表1b】

表1b:雌ラットにおける腎臓毒性(利尿作用)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

	テオフィリン	カフェイン	フロセミド
代謝物	f28	f28	f28
18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン	0.5 *	0.38 *	0.36 *
クレアチニン	0.8 *	0.84 *	0.77 *
馬尿酸	0.28 *	0.38 *	0.47 *

【表 1 c】

表1c:雄ラットにおける腎臓毒性(利尿作用)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	テオブロミン			テオフィリン			カフェイン			リシノプリル		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
コリンプラス マロゲンNo.02 #	1.38*	1.16	1.34*	1.65*	1.12*	1	1.22*	1.18*	1.26*	1.07*	1.27*	1.11*
スフィンゴミ エリン(d18:2、 C16:0)#	1.41*	1.42*	1.9*	1.61*	1.28*	1.17*	1.75*	2.34*	2.05*	1.21*	1.38*	1.13*
コリンプラス マロゲンNo.03 #	1.08*	1.1	1.1*	1.29	1.18*	1.03	1.55*	1.56*	1.25*	1.12*	1.1*	1.21*
トレオニン	1.32*	1.53*	1.42*	1.22*	1.27*	1.44*	1.2*	1.58*	1.59*	0.99	1.15	1.12*
セラミド(d18:1 、C24:1)	1.21*	1.45*	1.52	0.75	1.94*	1.17	1.2	1.7*	2.43*	1.12	1.32*	1.36*
セラミド(d18:1 、C24:0)	0.84	1.35*	1.33*	0.92	1.56*	0.95	1.11	2.08*	1.82*	1.22*	1.19*	1.24*

10

【表 1 d】

表1d:雄ラットにおける腎臓毒性(利尿作用)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	テオブロミン			テオフィリン			カフェイン			リシノプリル		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
リンゴ酸	1.08	1.65*	1.11	0.76*	0.9	0.72*	0.61*	0.55*	0.54*	0.75*	0.6*	0.65*
グルタミン酸	0.74*	0.94*	0.87*	0.64*	1.04	0.74*	0.55*	0.65*	0.7*	0.94*	0.85*	0.87*
リゾホスファチジ ルコリン(C20:4)#	0.8*	0.86*	0.8*	0.71*	0.87*	0.81*	0.85*	0.87*	0.89*	0.97	0.94	0.9*

30

【表 2 a】

表2a:雌ラットにおける腎臓毒性(糸球体-尿細管異常)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ペニシラミン		カプトプリル		シクロスポリンA	
	f14	f28	f14	f28	f14	f28
クレアチン	1.23*	1.11*	1.18*	1.33*	1.37*	1.17
エライジン酸(C18:trans[9]1)	1.2	1.35*	1.18	1.22*	1.34*	0.88
3-インドキシル硫酸	0.93	1.41*	1.2	1.21*	1.43*	0.74
3-ヒドロキシインドール	0.87	1.53*	1.35	1.21*	1.91*	0.74
キシリトール	1.29*	1.13	1.17	1.31*	0.92	1.21*
クレアチニン	1.69*	1.11	1.06	1.93*	1.8*	1.49*
リゾホスファチジルコリン(C20:4)#	1.14	1.34*	1.04	1.24*	1.27	1.11

40

【表 2 b】

表2b:雌ラットにおける腎臓毒性(糸球体-尿細管異常)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(P値 \leq 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ペニシラミン		カプトプリル		シクロスポリンA	
	f14	f28	f14	f28	f14	f28
グルコサミン	0.75	0.48*	0.4*	1.06	0.73*	0.58*
マンノサミン	0.64*	0.5*	0.69*	1.04	0.73*	0.63*
ヒスタミン	1.36	0.52*	0.93	0.81*	NA	NA
アドレナリン(エピネフリン)	0.55*	1.14	1.27	0.28*	NA	NA

10

【表 2 c】

表2c:雄ラットにおける腎臓毒性(糸球体-尿細管異常)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 \leq 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	リン酸トリクレジル			カプトプリル			ペニシラミン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
トレオン酸	1.32*	1.5*	1.53*	1.37*	1.27*	1.14*	1.47*	1.4*	1.7*
リゾホスファチジルコリン(C18:2)#	1.19	1.27*	1.15*	1.07*	1.2*	1.09	1.23*	1.28*	1.1
クレアチン	1.16*	1.42*	1.11*	1.16*	1.06*	1.31	1.11*	1.35*	1.27*
グリセロール-3-リン酸、極性画分	0.83*	0.89	0.89	1.28*	0.97	1.29*	1.21*	1.42*	1.4*
クレアチニン	0.77	0.74	0.78*	1.32	1.12*	1.05	1.16	1.8*	1.82*

20

【表 2 d】

表2d:雄ラットにおける腎臓毒性(糸球体-尿細管異常)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 \leq 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	リン酸トリクレジル			カプトプリル			ペニシラミン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
システイン	0.44*	0.51*	0.55*	0.59*	0.77*	0.72*	0.46*	0.51*	0.85*
メタネフリン	0.43*	0.74*	0.76	0.81*	0.7*	0.76*	0.83*	0.43*	0.68*
ノルメタネフリン	0.74*	0.71*	1.03	0.9	0.89*	0.73*	0.79*	0.66*	0.68*
4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニルグリコール(HMPG)	0.95	0.93*	0.83*	1.07	0.91*	0.86*	0.91*	0.84*	0.79*
イソパルミチン酸(C16:0)	0.84*	0.76*	0.62*	0.78*	0.64*	0.83	0.75*	1.02	1.23

30

40

【表 3 a】

表3a:雌ラットにおける腎臓毒性(尿細管異常)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 \leq 0.1)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	β -イオノン		カルボプラチン		フロセミド	
	f14	f28	f14	f28	f14	f28
クレアチン	NA	NA	1.22*	1.41*	1.44*	1.56*
リゾホスファチジルコリン(C18:1)#	1.34*	1.42*	0.98	1.12*	1.14*	1.16*
ヒスチジン	1.31*	1.21*	1.03	1.3*	1.1*	1.35*
バリン	1.19*	1.42	1.07*	1.25*	1.12	1.17*
ロイシン	1.26	1.36	1.13*	1.38*	1.26	1.34*
乳糖、脂質画分	2.02*	2.58*	1.17*	0.84	1.42*	0.92
ホスファチジルコリンNo.02#	1.99*	1.76*	1.07*	0.97	1.05*	0.98
イソロイシン	1.14	1.32	1.09*	1.35*	1.11	1.27*
グリセロール-3-リン酸、極性画分	0.98	1.25	1.66*	2.2*	1.51*	1.42*
TAG No.05#	1.65*	1.5	1.9*	1.27*	3.01*	1.83*
グリシン	1.17	1.18	1.08	1.17*	1.16	1.14*
トレオン酸	1.11	1.21	1.14	1.23*	1.06*	1.39*
キシリトール	1.32*	1.88	0.83	1.56*	1.56*	1.33*
ウラシル	0.94	0.94	1.07	1.37*	1.17	1.41*
グルクロン酸	2.55*	2.03*	1.36	1.24*	1.41*	1.33*
クレアチニン	1.61	1.61	0.85	1.59*	1.53*	2.2*
トレオニン	1.57*	1.46*	0.99	1.24*	1.18*	1.07

【表 3 b】

表3b:雌ラットにおける腎臓毒性(尿細管異常)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(P値 \leq 0.1)印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	β -イオノン		カルボプラチン		フロセミド	
	f14	f28	f14	f28	f14	f28
インドール-3-酢酸	0.62*	0.81	0.38*	0.65	0.4*	0.7*
グリセロール、極性画分	0.83	0.65	0.88	0.78*	0.9	0.79*
ショ糖	1.02	1.37	0.67*	0.61	0.49*	0.52
馬尿酸	0.55	0.5*	0.59	0.3*	0.55	0.47*
システイン	0.86	1.06	0.83*	0.67	0.69*	0.94
スペルミジン	0.54*	1.17	0.95	0.69*	0.77*	0.75

【表 3 c】

表3c:雄ラットにおける腎臓毒性(尿細管異常)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 \leq 0.1)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	カルボプラチン		フロセミド	
	m14	m28	m14	m28
プソイドウリジン	1.33*	1.11*	1.56*	1.49*
タウリン	1.18*	1.54*	1.69*	1.67*
アラントイン	1.4	1.24*	1.9*	1.65*
キヌレン酸	1.21*	1.7	2.01*	1.44
グリセロール-3-リン酸、極性画分	1.59*	1.61*	1.35*	1.88*
クレアチン	1.32*	1.42*	1.62*	1.22
ネルボン酸(C24:cis[15]1)	1.02	1.51*	2.97*	1.46*
尿素	1.47*	1.08	2.21*	1.73*
パントテン酸	1.17	1.47*	1.19*	1.58*
ヒスチジン	1.02	1.22*	1	1.21*

10

20

【表 3 d】

表3d:雄ラットにおける腎臓毒性(尿細管異常)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 \leq 0.1)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	カルボプラチン		フロセミド	
	m14	m28	m14	m28
TAG (C18:1、C18:2)#	0.79*	0.62*	0.79	0.7*
16-メチルヘプタデカン酸	0.74*	0.51*	0.61*	0.72*
リノレン酸(C18:cis[9,12,15]3)	0.75	0.7*	0.85	0.68*
ホスファチジルコリンNo.04#	0.74*	0.78	0.59*	0.68*
ホスファチジルコリンNo.02#	0.87*	0.91*	1.01	0.88*

30

【表 4 a】

表4a:雌ラットにおける腎臓毒性マーカー(弱酸排出阻害);有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ジクロロプロップ-p			MCPA			メコプロップ-p			ペンタクロロフェノール		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
リゾホスファチジルコリン (C18:2)#	1.47*	1.44*	1.16*	1.38	1.45*	1.35*	1.26*	1.67*	1.74*	1.32*	1.41*	1.66*
γ -リノレン酸 (C18:ci s[6,9,12]3)	6.14*	6.64*	3.31*	4.23*	2.93*	2.99*	3.03*	3.62*	4.04*	0.78*	1.81	3.23*
ホスファチジルコリン (C16:0、C20:5)#	1.72*	1.25*	1.08*	2.03*	2.09*	1.61*	1.47	1.74*	1.47*	1.05*	1.57*	1.67*
ホスファチジルコリン (C16:1、C18:2)#	2.98*	2.37*	1.81*	2.92*	2.88*	2.45*	1.06	2.03*	2.28	0.87	1.32*	1.54*
グリセロール、脂質画 分#	3.12*	2.68*	2.19*	1.69*	1.38*	1.6*	1.96*	2.17*	2.15*	1.56*	2.38*	1.61*
ホスファチジルコリン (C18:0、C18:1)#	1.36*	1.43*	1.44*	1.57*	1.74*	1.56*	1.23	1.33*	1.4*	0.98	1.54*	1.41*
リノール酸 (C18:cis[9, 12]2)	2.28*	2.34*	1.14	1.66*	1.36*	1.28*	1.51*	1.86*	1.51*	1.35*	1.8*	1.73*
ホスファチジルコリン (C18:1、C18:2)#	1.88*	2.33*	1.71*	1.68	2.12*	1.78*	1.65	1.9*	1.78*	0.85	1.4*	1.3*
ホスファチジルコリン (C16:0、C18:2)	1.47*	1.51*	1.29*	1.66*	1.82*	1.45*	1.25*	1.58*	1.34*	1.02	1.34*	1.49*
ホスファチジルコリン (C16:0、C16:0)#	1.43*	1.14	1.26*	1.52*	1.8*	1.78*	1.17	1.44*	1.4*	1.04	1.25*	1.1*

【表 4 b】

表4b:雌ラットにおける腎臓毒性マーカー(弱酸排出阻害);有意なダウンレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ジクロロプロップ-p			MCPA			メコプロップ-p			ペンタクロロフェノール		
	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28	f7	f14	f28
プロリン	0.85*	0.79*	0.72*	0.61*	0.45*	0.42*	0.7*	0.72*	0.66*	0.73*	0.74*	0.74*
インドール-3-乳 酸	0.16*	0.22*	0.32*	0.24*	0.24*	0.23*	0.6*	0.3*	0.43*	0.62*	0.65*	0.49*
trans-4-ヒドロキ シプロリン	0.88	0.89*	0.77*	0.57	0.47*	0.6*	0.6*	0.7*	0.77*	0.87*	0.92	0.94*
ケトロイシン	0.5*	0.55*	0.5*	0.42*	0.21*	0.15*	0.6*	0.71*	0.71*	0.6*	0.64*	0.6*
トリプトファン	0.17*	0.2*	0.31*	0.17*	0.18*	0.16*	0.5*	0.36*	0.44*	0.6*	0.62*	0.54*
アルギニン	0.9*	0.91	0.79	0.62*	0.58*	0.58*	0.82*	0.78*	0.78*	0.56*	0.72	0.44*

【 表 4 c 】

表4c:雄ラットにおける腎臓毒性マーカー(弱酸排出阻害);有意なアップレギュレーション変化(P値 \leq 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ジクロロプロップ-p			MCPA			プロベネシド			メコプロップ-p		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
ホスファチジルコリン (C16:0, C20:5)#	1.48*	1.51*	1.19*	1.73*	1.82*	2.11*	1.28*	1.36*	1.15*	1.43*	1.2*	1.22*
γ -リノレン酸 (C18:cis[6,9,12]3)	2.07	1.93*	1.13	1.69*	2.68*	2.54*	2.14*	2.74*	2.26*	1.08	1.21	1.08
セラミド (d18:1, C24:0)	1.01	1.54*	1.07	1.2	2.39*	1.72*	1.23	1.53*	1.27*	1.09	1.46*	1.19*
コレステロールエステルNo. 01#	2.12*	2.21*	1.05*	0.97	1.27*	1.32*	1.15*	1.01	1	1.41	1.32*	1.25*
リゾホスファチジルエタノールアミン (C22:5)#	1.03	1.22*	1	1.16	1.08	1.1	1.17*	1.7*	1.17*	1.17	1.11*	1.24*
3-インドキシル硫酸	5.58*	3.28*	3.25*	0.72	1.53*	1.92*	3.55*	4.18*	6.58*	4.14*	2.1*	3*
アスパラギン酸	1.27*	1.18*	2.27*	0.58*	1.01	0.69	0.71	0.83	1.16	1.23*	0.93	0.77

10

20

30

40

【表 4 d】

表4d:雄ラットにおける腎臓毒性マーカー(弱酸排出阻害);有意なダウンレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ジクロロプロップ-p			MCPA			プロベネシド			メコプロップ-p		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
リゾホスファチジルコリン (C18:0)#	0.77*	0.78*	0.83*	0.81*	0.83*	0.73*	0.94*	0.95*	0.98	0.75*	0.78*	0.77*
メチオニン	0.77*	0.73*	0.82	0.66*	0.59*	0.64*	0.89*	0.8*	0.97	0.76*	0.82*	0.8*
インドール-3-乳酸	0.25*	0.29*	0.52*	0.36*	0.38	0.3*	0.69*	0.58*	0.65*	0.51*	0.5*	0.55*
ネルボン酸 (C24:cis[15]1)	0.62*	0.41*	0.66*	0.67*	0.74*	0.76*	0.52*	0.93	0.82*	0.53*	0.6*	0.53*
コリンプラスマロゲン (C18、C20:4)	0.42*	0.57*	0.65*	0.64*	0.76*	0.45*	0.79*	1	0.93	0.53*	0.63*	0.59*
ホスファチジルコリン (C18:0、C20:4)#	0.36*	0.4*	0.51*	0.36*	0.55*	0.24*	0.99	0.98*	0.98*	0.32*	0.41*	0.38*
シトシン	0.44*	0.62*	0.69	0.63*	0.63*	0.6*	0.7*	0.69*	0.68*	0.72*	0.73*	0.66*
リバル(Ribal)	0.5*	0.78*	1.08	0.94*	0.89*	0.77*	0.78*	0.87*	0.68*	0.76*	0.82*	0.7*
アラキドン酸 (C20:cis[5,8,11,14]4)	0.2*	0.29*	0.41*	0.27*	0.42*	0.26*	0.84*	0.96	0.94*	0.28*	0.34*	0.26*
リシン	0.44*	0.52*	0.51*	0.4*	0.3*	0.33*	0.94*	0.79*	0.97	0.59*	0.6*	0.5*
アスパラギン酸	1.27	1.18	2.27	0.58*	1.01	0.69*	0.71*	0.83	1.16	1.23	0.93	0.77
アルギニン	0.74*	0.65*	0.85*	0.72*	0.57*	0.68*	0.86*	0.79	0.91	0.79*	0.7*	0.78*
グルコース	0.98	0.92*	0.91	0.75*	0.72*	0.6*	1.11	0.8*	0.77*	0.9	1.15	0.8*

10

20

【表 5 a】

表5a:雌ラットにおける腎臓毒性(尿細管壊死)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	アムホテリシンB	トブラマイシンs.c.	ヘキサクロロブタジエン
	f28	f28	f28
ドコサヘキサエン酸 (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	1.32 *	1.05 *	1.19 *
ロイシン	1.21 *	1.26 *	1.34 *
ドコサペンタエン酸 (C22:cis[7,10,13,16,19]5)	1.23 *	1.56 *	1.61 *
リン酸(無機リン酸及び有機リン酸)	1.25 *	1.3 *	1.19 *
グリセロール、脂質画分	1.31 *	1.2 *	1.29 *
エイコサン酸(C20:0)	1.18 *	1.05	1.56 *

30

【表 5 b】

表5b:雌ラットにおける腎臓毒性(尿細管壊死)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	アムホテリシンB	トブラマイシンs.c.	ヘキサクロロブタジエン
	f28	f28	f28
馬尿酸	0.44 *	0.14 *	0.35 *
乳酸	0.68 *	0.64 *	0.62 *

40

【表 6 a】

表6a:雄ラットにおける腎臓毒性(ACE阻害剤誘導様毒性)マーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ラミプリル			リシノプリル		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
リシン	1.37*	1.21*	1.17*	0.92	1.13*	1.23*
グリシン	1.24*	1.5*	1.37*	1.21*	1.25*	1.29*
1,5-アンヒドロソ ルビトール	1.02	1.21*	1.17*	1.22*	1.2*	1.53*

10

【表 6 b】

表6b:雄ラットにおける腎臓毒性(ACE阻害剤誘導様毒性)マーカー;有意なダウンレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ラミプリル			リシノプリル		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28
シトシン	0.7*	0.85 *	0.91	0.97	0.89 *	1
グルタミン酸	0.92*	0.71 *	0.61 *	0.94 *	0.85 *	0.87 *

20

【表 7 a】

表7a:雄ラットにおける腎臓毒性(間質性腎炎)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化(P値 ≤ 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、追加的な情報を表10に提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	リトコール酸			ジピロン			エチルベンゼン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
リグノセリン酸(C24:0)	1.31*	1.37*	1.3*	1.02*	1.08	1.14*	1.31*	1.55*	1.23*
クレアチン	1.29*	1.27*	1.54*	1.45*	1.48*	1.07	1.4*	1.35*	1.34*
セリン	1.18*	1.16*	1.51*	1.22*	1.38*	1.67*	1.12*	1.5*	1.54*
トレオニン	1.37*	1.13*	1.55*	1.09*	1.78*	1.88*	1.31*	1.72*	2.44*
エイコサン酸(C20:0)	1.81*	1.12*	1.58*	1.78*	1.27	0.97	1.41*	1.3*	1.76*
ホスファチジルコリン (C18:2、C20:4)#	1.05*	1.14*	1.15*	1.01	1.08*	1.09*	1.05*	1.06*	1.05
myo-イノシトール-2-リン酸	1.06	1.01	1.51*	1.16*	1.26*	1.6*	1.39*	0.88	1.3*
グルクロン酸	0.85*	1	1	1.72*	1.56*	1.69*	1.08	1.17*	1.26*
スフィンゴミエリン(d18 :1、C16:0)#	1.27*	1.22*	1.09	1.32*	1.19*	1.03	1.69*	1.5*	1.48*
クレアチニン	1.12	1.21*	1.27*	1.63*	1.71*	1.15	1.41*	1.58*	1.33*

30

40

【表 7 b】

表7b:雄ラットにおける腎臓毒性(間質性腎炎)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化(P値 \leq 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、追加的な情報を表10に提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	リトコール酸			ジピロン			エチルベンゼン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
キヌレン酸	0.75*	0.75*	0.71	0.72*	0.82	0.78	0.71*	0.83*	0.8*
イソパルミチン酸(C16:0)	0.63*	0.54*	0.68*	0.73	0.69*	0.64*	0.55*	0.57*	0.59*
グリセロール、極性画分	0.93	0.86	0.73*	0.87*	1.2	0.74*	0.98	0.87	0.75*

10

【表 8 a】

表8a:雄ラットにおける腎臓毒性マーカー(直接的な尿細管の影響);有意なアップレギュレーション変化(P値 \leq 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ヘキサクロブタジエン	ヒドロキノン
	m28	m28
リゾホスファチジルエタノールアミン(C22:0)	1.33 *	1.26 *
ロイシン	1.17 *	1.23 *
TAG No.02#	1.47 *	1.91 *
グリセロール-3-リン酸、極性画分	1.58 *	1.64 *
オルニチン	1.35 *	1.24 *
トレオニン	1.3 *	1.03
イソロイシン	1.11 *	1.2 *

20

【表 8 b】

表8b:雄ラットにおける腎臓毒性マーカー(直接的な尿細管の影響);有意なダウンレギュレーション変化(P値 \leq 0.2)に印(*)をつけた。いくつかの代謝物(#で印をつけた)に関して、表10に追加的な情報を提供する。全ての化合物は高用量で投与した。

代謝物	ヘキサクロブタジエン	ヒドロキノン
	m28	m28
オレイン酸(C18:cis[9]1)	0.71 *	0.75 *
TAG (C16:0、C16:1)#	0.51 *	0.4 *
DAG (C18:1、C18:2)#	0.66 *	0.43 *
trans-4-ヒドロキシプロリン	0.74 *	0.87 *
18-ヒドロキシ-11-デオキシコルチコステロン	0.49 *	0.23 *
クエン酸	0.93 *	0.82 *
14-メチルヘキサデカン酸	0.82 *	0.81
リノレン酸 (C18:cis[9,12,15]3)	0.6 *	0.56 *
パルミトレイン酸(C16:cis[9]1)	0.25 *	0.76 *
イソパルミチン酸 (C16:0)	0.61 *	0.62
ケトロイシン	0.91 *	0.75 *
16-メチルヘプタデカン酸	0.51 *	0.76
エライジン酸(C18:trans[9]1)	0.8 *	0.84
リゾホスファチジルコリン (C18:0)#	0.97 *	0.99 *

40

【表 9】

表9:化合物及び投与(CMC=カルボキシメチルセルロース)

化合物	異名	CAS番号	投与用量	詳細
アムホテリシンB	na	1397-89-3	3mg/kg体重 腹腔内	0.9% NaCl中; 投与量:5ml/kg 体重
β -イオノン	na	79-77-6	食物中に10,000 ppm	食物中の混合 物
カフェイン	3,7-ジヒドロ-1,3,7-ト リメチル-1H-プリン- 2,6-ジオン	58-08-2	食物中に5,000p pm	食物中の混合 物
カプトプリル	N-[(S)-3-メルカプト- 2-メチルプロピオニ ル]-L-プロリン	62571-86-2	強制栄養によ り200mg/kg体 重	飲料水中;投 与量:10ml/kg 体重
カルボプラチン	cis-ジアンミン(1,1-シ クロブタンジカルボ キシラト)白金	41575-94-4	10mg/kg体重 i.p.、週2回	0.9% NaCl中; 投与量:3ml/k g体重
シクロスポリンA	na	59865-13-3	強制栄養によ り45mg/kg体重	トウモロコシ 油中、投与量 :5ml/kg体重
ジクロロプロップ-p	R-2-(2,4-ジクロロフ ェノキシ)-プロパン 酸	15165-67-0	食物中に2,500p pm	食物中の混合 物
ジピロン	メタミゾール	68-89-3	強制栄養によ り900mg/kg体 重	トウモロコシ 油中;投与量: 5ml/kg体重
エチルベンゼン	na	100-41-4	強制栄養によ り750mg/kg体 重	トウモロコシ 油中;投与量: 5ml/kg体重
フロセミド	4-クロロ-N-フルフリ ル-5-スルファモイル アントラニル酸	54-31-9	食物中に7500p pm(0~6日目); 食物中に3000p pm(7日目から)	食物中の混合 物
ヘキサクロブタジ エン	ペルクロブタジエ ン	87-68-3	強制栄養によ り10mg/kg体重	トウモロコシ 油中;投与量: 5ml/kg体重
ヒドロキノン	1,4-ジヒドロキシベン ゼン	123-31-9	強制栄養によ り180mg/kg bw 体重(0~7日目) ;強制栄養によ り90mg/kg体重 (8日目から)	飲料水中;投 与量:10ml/kg 体重
リシノプリル	na	83915-83-7	強制栄養によ り400mg/kg体 重	0.5% CMC(チロースCB3 0000)を含有 する飲料水中 、投与量:10 ml/kg体重
リトコール酸	na	434-13-9	強制栄養によ り1000mg/kg体 重	トウモロコシ 油中;投与量: 5ml/kg体重
MCPA	4-クロロ-2-メチルフ ェノキシ酢酸	94-74-6	食物中に2,500p pm	食物中の混合 物
メコプロップ-p	(+)-(R)-2-(4-クロロ-2- メチルフェノキシ)プ ロパン酸	16484-77-8	食物中に2,500p pm	食物中の混合 物

10

20

30

40

ペニシラミン	D-(-)-ペニシラミン	52-67-5	強制栄養により250mg/kg体重	飲料水中;投与量:10ml/kg体重
ペンタクロロフェノール	na	87-86-5	食物中に2,500ppm(0~6日目)、食物中に0ppm(7~9日目)、食物中に1,500ppm(10日目から)	食物中の混合物
プロベネシド	na	57-66-9	強制栄養により800mg/kg体重	トウモロコシ油中、投与量:5ml/kg体重
ラミプリル	na	87333-19-5	食物中に10,000ppm	食物中の混合物
テオブロミン	2,6-ジヒドロキシ-3,7-ジメチルプリン	83-67-0	食物中に6000ppm	食物中の混合物
テオフィリン	1,3-ジメチル-3,7-ジヒドロ-1H-プリン-2,6-ジオン	58-55-9	食物中に8,000ppm(0~6日目)、食物中に2,000ppm(7日目から)	食物中の混合物
トブラマイシンs.c.	na	32986-56-4	40mg/kg体重皮下、1日2回(0~14日目)、20mg/kg体重皮下、1日2回(15日目から)	0.9% NaCl中;投与量:1ml/kg体重、1日2回
リン酸トリクレジル	リン酸トリトリル	1330-78-5	強制栄養により500mg/kg体重	トウモロコシ油中;投与量:5ml/kg体重

10

20

【表 10】

表10: 選択されたバイオマーカーの化学的/物理的性質。これらのバイオマーカーを、化学的及び物理的性質によって本明細書で特徴づけする。

代謝物	フラグメンテーションパターン(GC-MS)及び説明
3-O-メチルスフィンゴシン(d18:1)	3-O-メチルスフィンゴシン(d18:1)は、酸性メタノリシス、及びピリジン中の2% O-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩を用いた誘導体化、それに続くN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた誘導体化の後に、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用してGC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオンフラグメントを示す:MS(EI, 70eV):m/z(%):204(100)、73(18)、205(16)、206(7)、354(4)、442(1)。
5-O-メチルスフィンゴシン(d18:1)	5-O-メチルスフィンゴシン(d18:1)は、酸性メタノリシス、及びピリジン中の2% O-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩を用いた誘導体化、それに続くN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた誘導体化の後に、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用してGC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオンフラグメントを示す:MS(EI, 70eV):m/z(%):250(100)、73(34)、251(19)、354(14)、355(4)、442(1)。
コレステロールエステルNo. 01	代謝物はコレステロールエステル種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、369.2(+/-0.5)である。
コリンプラスマロゲンNo.01	代謝物はコリンプラスマロゲン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、772.6(+/-0.5)である。
コリンプラスマロゲンNo.02	代謝物はコリンプラスマロゲン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、767(+/-0.5)である。
コリンプラスマロゲンNo.03	代謝物はコリンプラスマロゲン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、768.8(+/-0.5)である。

10

20

30

DAG (C18:1、C18:2)	DAG(C18:1、C18:2)は、C18:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含むジアシルグリセロールの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は、641.6Da(+/-0.5Da)である。	
エイコサエン酸 (C20:1)No.02	エイコサエン酸(C20:1)は、酸性メタノリシス、及びピリジン中の2% O-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩を用いた誘導体化、それに続くN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを用いた誘導体化の後に、電子衝撃(EI)イオン化質量分析を適用してGC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオンフラグメントを示す:MS(EI、70eV):m/z(%):55(100)、69(75)、41(57)、83(54)、74(53)、97(45)、110(20)、292(13)、293(13)、124(12)、250(9)、152(8)、138(8)、208(7)、324(2)。	10
グリセロールリン酸、脂質画分	グリセロールリン酸、脂質画分はグリセロール-2-リン酸又はグリセロール-3-リン酸部分を含有し、抽出物を極性及び脂質画分に抽出及び分離した後に脂質画分に存在する代謝物の和パラメーターを表す。	
リゾホスファチジルコリン (C17:0)	リゾホスファチジルコリン(C17:0)は、C17:0脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、510.4Da(+/-0.5Da)である。	20
リゾホスファチジルコリン (C18:0)	リゾホスファチジルコリン(C18:0)は、C18:0脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、546.6Da(+/-0.5Da)である。	
リゾホスファチジルコリン (C18:1)	リゾホスファチジルコリン(C18:1)は、C18:1脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、522.2Da(+/-0.5Da)である。	30
リゾホスファチジルコリン (C18:2)	リゾホスファチジルコリン(C18:2)は、C18:2脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、542.4Da(+/-0.5Da)である。	
リゾホスファチジルコリン (C20:4)	リゾホスファチジルコリン(C20:4)は、C20:4脂肪酸単位を含有するリゾグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、544.4Da(+/-0.5Da)である。	40

リゾホスファチジルエタノールアミン (C22:5)	リゾホスファチジルエタノールアミン(C22:5)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、528.2(+/-0.5)である。
ホスファチジルコリン (C16:0、C16:0)	ホスファチジルコリン(C16:0/C16:0)は、2つのC16:0脂肪酸単位のいずれかの組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は、734.8Da(+/-0.5Da)である。
ホスファチジルコリン (C16:0、C20:5)	ホスファチジルコリン(C16:0、C20:5)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、780.8(+/-0.5)である。
ホスファチジルコリン (C16:1、C18:2)	ホスファチジルコリン(C16:1、C18:2)は、C16:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、756.8Da(+/-0.5Da)である。
ホスファチジルコリン (C18:0、C18:1)	ホスファチジルコリン(C18:0、C18:1)は、C18:0脂肪酸単位とC18:1脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、788.6Da(+/-0.5Da)である。
ホスファチジルコリン (C18:0、C18:2)	ホスファチジルコリン(C18:0、C18:2)は、C18:0脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、786.6Da(+/-0.5Da)である。
ホスファチジルコリン (C18:0、C20:3)	ホスファチジルコリン(C18:0、C20:3)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、812.6(+/-0.5)である。
ホスファチジルコリン (C18:0、C20:4)	ホスファチジルコリン(C18:0、C20:4)は、C18:0脂肪酸単位とC20:4脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、810.8Da(+/-0.5Da)である。
ホスファチジルコリン (C18:0、C22:6)	ホスファチジルコリン(C18:0、C22:6)は、C18:0脂肪酸単位とC22:6脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、834.8Da(+/-0.5Da)である。
ホスファチジルコリン (C18:1、C18:2)	ホスファチジルコリン(C16:0/C20:3 C18:1/C18:2)は、C18:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は784.6Da(+/-0.5Da)である。

10

20

30

40

ホスファチジルコリン (C18:2、C20:4)	ホスファチジルコリン(C16:0/C22:6 C18:2/C20:4)は、C16:0脂肪酸単位とC22:6脂肪酸単位の組み合わせ又はC18:2脂肪酸単位とC20:4脂肪酸単位の組み合わせのいずれかを含有するグリセロホスホリルコリンの和パラメーターを表す。イオン化種の質量電荷比(m/z)は、806.6Da(+/-0.5Da)である。
ホスファチジルコリンNo.02	代謝物はグリセロホスホコリン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、808.4(+/-0.5)である。
ホスファチジルコリンNo.04	代謝物はグリセロホスホコリン種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、796.8(+/-0.5)である。
スフィンゴミエリン (d18:1、C23:0)	スフィンゴミエリン(d18:1、C23:0)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、801.8(+/-0.5)である。
スフィンゴミエリン (d18:1、C24:0)	スフィンゴミエリン(d18:1、C24:0)は、d18:1長鎖基本単位とC24:0脂肪酸単位の組み合わせを含有するスフィンゴミエリンの和パラメーターを表す。エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、815.8Da(+/-0.5Da)である。
スフィンゴミエリン (d18:2、C16:0)	スフィンゴミエリン(d18:2、C16:0)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、723.6(+/-0.5)である。
スフィンゴミエリン (d18:2、C18:0)	スフィンゴミエリン(d18:2、C18:0)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、729.8(+/-0.5)である。
TAG (C16:0、C16:1)	代謝物は、C16:0脂肪酸単位とC16:1脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は549.6(+/-0.5)である。
TAG (C16:0、C18:1、C18:3)	TAG(C16:0、C18:1、C18:3)は、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、855.6(+/-0.5)である。
TAG (C16:0、C18:2)	代謝物は、C16:0脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、575.6(+/-0.5)である。

10

20

30

40

TAG (C18:1、C18:2)	代謝物は、C18:1脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、601.6(+/-0.5)である。
TAG (C18:2、C18:2)	代謝物は、C18:2脂肪酸単位とC18:2脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、599.6(+/-0.5)である。
TAG (C18:2、C18:3)	代謝物は、C18:2脂肪酸単位とC18:3脂肪酸単位の組み合わせを含有するトリアシルグリセリドの和を表す。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、597.6(+/-0.5)である。
TAG (DAGフラグメント)	代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、600.6(+/-0.5)である。
TAG No.01	代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、547.6(+/-0.5)である。
TAG No.02	代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、695.6(+/-0.5)である。
TAG No.05	代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、879.6(+/-0.5)である。
TAG No.059	代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、904(+/-0.5)である。
TAG No.07	代謝物は、トリアシルグリセリド種に属する。これは、エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量分析を適用してLC/MSで検出した場合、以下の特徴的なイオン種を示す:正に帯電しているイオン種の質量電荷比(m/z)は、853.6(+/-0.5)である。

10

20

30

40

【表 1 1 a】

表11a:ラットにおける腎臓毒性(α 2uグロブリン腎症)に関するマーカー;有意なアップレギュレーション変化を太字に変える(P値 \leq 0.1)。1,1,2,2-テトラクロロエタンを除く全ての化合物を高用量で投与した。

代謝物	1,1,2,2-テトラクロロエタン			2,2,4-トリメチルペンタン			D-リモネン			デカリン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
パントテン酸	4.46	4.32	4.32	2.59	3.07	3.03	1.04	1.85	1.76	2.13	3.31	3.02
オレイン酸(C18:cis[9]1)	1.11	1.18	1.18	2.10	2.37	2.97	1.78	1.84	2.35	3.11	4.04	6.72
4-ヒドロキシスフィンガニン(tl 8:0、フィトスフィンゴシン)、総量	2.03	2.04	2.04	1.46	1.34	1.26	1.40	1.29	1.41	2.00	1.98	1.84
ネルボン酸 (C24:cis[15]1)	1.09	0.96	0.96	1.60	1.38	1.22	1.40	1.28	1.47	2.01	2.23	1.74
ジホモ- γ リノレン酸(C20:cis[8, 11,14]3)	2.56	3.40	3.40	2.42	2.06	2.77	1.66	1.62	1.82	2.56	2.86	2.61
オルニチン	2.10	2.38	2.38	1.12	1.23	1.23	1.22	1.46	1.60	1.21	1.11	1.16
グルタミン酸	2.31	1.80	1.80	1.57	1.44	1.74	1.33	1.31	1.45	1.47	1.66	1.97
キシリトール	12.21	10.32	10.32	1.65	1.33	1.68	3.32	2.56	3.04	2.95	2.18	1.48
3-ヒドロキシインドール	1.39	2.05	2.05	1.92	2.88	2.30	1.80	1.32	1.68	1.96	1.80	2.69
グルクロン酸	3.97	1.20	1.20	3.88	3.87	3.46	2.52	2.42	1.71	2.65	3.04	2.79
プソイドウリジン	1.17	1.51	1.51	1.23	1.31	1.28	1.21	1.15	1.10	1.32	1.51	1.65
スフィンゴミエリン (d18:1、C 16:0)	1.65	1.34	1.34	1.62	1.59	1.54	1.22	1.30	1.26	1.47	1.82	1.43
スフィンゴミエリン (d18:2、C 18:0)	1.22	0.93	0.93	1.35	1.28	1.23	1.13	1.24	1.23	1.40	1.54	1.47
ホスファチジルコリン (C18:0、C18:1)	1.48	1.21	1.21	1.35	1.34	1.35	1.63	1.58	1.87	1.75	2.03	1.84

10

20

30

【表 1 1 b】

表11b:ラットにおける腎臓毒性(α 2uグロブリン腎症)に関するマーカー;有意なダウンレギュレーション変化を太字に変える(P値 \leq 0.1)。1,1,2,2-テトラクロロエタンを除く全ての化合物を高用量で投与した。

代謝物	1,1,2,2-テトラクロロエタン			2,2,4-トリメチルペンタン			D-リモネン			デカリン		
	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28	m7	m14	m28
コリンプラスマロゲンNo.02 (推定)	1.04	1.13	1.13	0.72	0.73	0.81	0.88	0.96	0.68	0.67	0.80	0.78
リゾホスファチジルコリン (C17:0)	0.63	0.89	0.89	0.72	0.73	0.80	0.80	0.93	0.87	0.84	0.83	0.87
リゾPE(C22:0)(推定)	0.43	0.65	0.65	0.54	0.49	0.45	0.75	0.78	0.69	0.82	0.76	0.71
TAG(C42:9)(DAGフラグメント)(推定)	0.76	0.72	0.72	0.67	0.64	0.76	1.12	0.76	0.92	0.71	0.38	0.38

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2012/054790		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
G01N33/53 (2006.01) i				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
IPC: G01N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
CNKI, CNPAT, WPI, EPODOC, TXIEP1, TXTGB1, ISI Web of Knowledge, PUBMED: Valine, hippuric acid, linoleic acid, elaidic acid, kidney toxicity, marker, biomarker				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	CN1688715A1(NOVARTIS AG), 26 Oct. 2005(26.10.2005), see claims 1-11, 19-36, 40-60.	1-20(partially)		
Y	DOU Chun-yan, et al. Nephrotoxic effect of melamine-contaminated fodder on rat: a metabonomic study, Clin J Pharmacol Toxicol., Feb 2011, Vol. 25, No. 1, see pages 88-92.	1-20(partially)		
A	CN101416062A (HOFFMANN LA ROCHE), 22 Apr. 2009(22.04.2009), see claims 1-9.	1-20(partially)		
A	WO02095000A2(GENE LOGIC, INC.), 28 Nov.2002(28.11.2002).	1-20(partially)		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search 5 Jan. 2013 (05. 01. 2013)		Date of mailing of the international search report 24 Jan. 2013 (24.01.2013)		
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer YUAN, Shi Telephone No. (86-10)62411033		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2012/054790

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jeffery H. Moran, et al. Analysis of the Cytotoxic Properties of Linoleic Acid Metabolites Produced by Renal and Hepatic P450s, Toxicology and Applied Pharmacology., 2000, Vol. 168, pages 268-279.	1-20(partially)
A	Ivan A Ross, et al. Free fatty acids profile of the fetal brain and the plasma, liver, brain and kidneys of pregnant rats treated with sodium arsenite at mid-organogenesis, Toxicology and Industrial Health., 2010, Vol .26, pages 657-666.	1-20(partially)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2012/054790

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

There are 179 kinds of biomarkers listed in tables 1a, 1b, 1c, 1d, 2a, 2b, 3c, 2d, 3a, 3b, 3c, 3d, 4a, 4b, 4c, 4d, 5a, 5b, 6a, 6b, 7a, 7b, 8a, 8b, 11a, and 11b. When we select one biomarker from any one of these tables, we will get 179 ($=C_{179}^1$) kinds of choices; when we select two biomarkers from any one of these tables, we will get 15931 ($=C_{179}^2$)

kinds of choices; when we select at least one biomarker from any one of these tables, we will get $2^{179} - 1$ ($=C_{179}^1 + C_{179}^2 + \dots + C_{179}^{179} = 2^{179} - C_{179}^0$) kinds of choices. As each of the biomarkers is an apparently statistically independent

predictor for the diagnosis for kidney toxicity (See the description, page 9, lines 29-30, the applicant admits it), this authority considers that inventions comprising determining the amount of the biomarker or biomarkers from above choices indicates different and independent inventions.

See the extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-20, only relating to four biomarkers: valine, hippuric acid, linoleic acid, elaidic acid.
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2012/054790

Continuation of:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Hence there are $2^{179} - 1$ inventions covered by the claims indicated as follows:

1: Claims 1-20(partially), direct to method for diagnosing kidney toxicity comprising determining the amount of one biomarker: valine (the first biomarker in tables 1a, 1b, ..., 11b), and method of identifying a substance for treating kidney toxicity comprising determining the amount of valine, and use, device and kit concerning valine.

2: Claims 1-20(partially), direct to method for diagnosing kidney toxicity comprising determining the amount of another biomarker: trans-4-hydroxyproline (the second biomarker in tables 1a, 1b, ..., 11b), and method of identifying a substance for treating kidney toxicity comprising determining the amount of trans-4-hydroxyproline, and use, device and kit concerning trans-4-hydroxyproline.

.....
180: Claims 1-20(partially), direct to method for diagnosing kidney toxicity comprising determining the amount of two biomarkers: valine and trans-4-hydroxyproline (the first two biomarkers in tables 1a, 1b, ..., 11b), and method of identifying a substance for treating kidney toxicity comprising determining the amount of valine and trans-4-hydroxyproline, and use, device and kit concerning valine and trans-4-hydroxyproline.

.....
 $2^{179} - 1$: Claims 1-20(partially), direct to method for diagnosing kidney toxicity comprising determining the amount of all the 179 biomarkers, and method of identifying a substance for treating kidney toxicity comprising determining the amount of all the 179 biomarkers, and use, device and kit concerning all the 179 biomarkers.

These inventions direct to different methods, use, devices and kits about different choices of biomarkers, so they do not contain a special technical feature within the meaning of Rule 13.2 PCT. The application hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 PCT.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IB2012/054790

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1688715A1	26.10.2005	WO2004005544A	15.01.2004
		CA2493860A	15.01.2004
		AU2003250879A	23.01.2004
		EP1521847A	13.04.2005
		BR0312405A	26.04.2005
		JP2005531321A	20.10.2005
		US2006008804A	12.01.2006
		JP2010042019A	25.02.2010
CN101416062A	22.04.2009	WO2007112906A	11.10.2007
		CA2647274A	11.10.2007
		EP2005191A	24.12.2008
		US2009130770A	21.05.2009
		JP2009532686A	10.09.2009
WO02095000A2	28.11.2002	CA2447357A	28.11.2002
		AU2002339829A	03.12.2002
		EP1392871A	03.03.2004
		US2004072160A	15.04.2004
		US2006078900A	13.04.2006

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100170221

弁理士 小瀬村 暁子

(72)発明者 ウォーク, ティルマン ベー .

ドイツ連邦共和国 1 4 5 3 2 クラインマハノヴ, レッシングシュトラッセ 1 5

(72)発明者 ラヴェンツヴァーイ, ベナード ヴァン

ドイツ連邦共和国 6 7 1 2 2 アルトリップ, ラインシュトラッセ 6

(72)発明者 メラート, ヴェルナー

ドイツ連邦共和国 6 7 4 5 4 ハスロツホ, アルテ ツィーゲライ 9

(72)発明者 ファビアン, エリック

ドイツ連邦共和国 6 7 3 4 6 シュバイヤー, ジークベルトシュトラッセ 3

(72)発明者 シュトラウス, フォルカー

ドイツ連邦共和国 6 7 0 9 8 パド ドュルクハイム, カール - レーダー - アレー 2 1 デー

(72)発明者 カンプ, ヘニッケ

ドイツ連邦共和国 6 7 2 9 4 ビシュハイム, キルヒハイムボランダー シュトラッセ 9

(72)発明者 ヴィーマー, ヤン ツェー .

ドイツ連邦共和国 1 3 5 0 3 ベルリン, ヘニッヒスドルファー シュトラッセ 1 3 9 アー

(72)発明者 ルーサー, ラルフ

ドイツ連邦共和国 1 3 1 5 8 ベルリン, ハウプトシュトラッセ 2

(72)発明者 ヘロルド, ミヒャエル マンフレッド

ドイツ連邦共和国 1 0 5 5 1 ベルリン, クヴィッツォフシュトラッセ 8 7

(72)発明者 プロコディーヌ, アレクサンドル

ドイツ連邦共和国 1 3 1 8 9 ベルリン, エッセングラベン 1 0 1

F ターム(参考) 2G041 CA01 EA04 EA06 FA10 GA03 GA05 GA06 HA01 HA02 LA08

2G045 AA25 DA30 DA35 DA43 DA54 DA60