

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第 1 分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法法の確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

## 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス  
に関する研究



## ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発 への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－

所属 広島大学大学院理学研究科

研究者 吉里 勝利

**研究要旨** これまでの動物試験ではその代謝種差のため、医薬品の胆汁排泄動態の予測は困難とされてきた。本事業は薬物代謝に関わるヒト型酵素系をドナー肝細胞と同様のレベルで発現しているキメラマウスを利用して、非拘束状態でマウス胆汁回収を可能とするモデル系の確立を試みている。本年度は、昨年度開発した胆嚢カニューレーション技術及び、非拘束胆汁排泄回収装置について最適化の検討を行った。また、キメラマウスから回収した胆汁の分析方法の検討及び、モデル化合物投与試験も併せて行った。

### 分担研究者

- (1) ㈱フェニックスバイオ 堀江透
- (2) 自治医科大学分子病態治療研究センター臓器置換研究部 小林英司
- (3) 国立成育医療センター研究所移植・外科研究部 絵野沢伸

### A. 研究目的

広島県地域結集型共同研究事業（研究統括：広島大学大学院理学研究科 吉里勝利）で開発されたヒト肝細胞キメラマウス（以後、キメラマウス）は、マウス肝臓の70%以上がヒト肝細胞で置換されており、キメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞は、薬物代謝に関わるヒト型酵素系をドナー肝細胞と同様のレベルで発現していることが分かっている。このため、キメラマウスは医薬品開発に必須であるヒトにおける薬物の動態および安全性を予測するモデル動物になり得ると期待されている。

医薬品の開発段階における動物実験では、薬物代謝にかかわる動物種差のため、ヒトの薬物動態を予測することは難しい。本研究では、非拘束的に胆汁採取を可能にしたキメラマウスに医薬候補化合物を投与し、継続的に回収したマウス胆汁中の代謝物を同定し、これまでにできなかったヒト臨床第Ⅰ相試験の尿・糞排泄バランスや代謝物を予測するモデル系の確立することを目標としている。昨年度はICRマウスで開発したマウスの胆汁回収技術をキメラマウスに適用し、回収

した胆汁の組成からキメラマウスの胆汁排泄モデルがヒトの胆汁排泄モデルになりうることを示した。

2年目となる本年度は非拘束状態で継続的にキメラマウスから胆汁を回収することを目標にマウスに対する胆嚢カニューレーション技術の改良及び、非拘束胆汁回収装置の改良を行った。また、キメラマウスから回収した胆汁をHPLCで分析するため、胆汁中の医薬候補化合物及び代謝物の抽出方法の検討を行った。さらにキメラマウスの胆汁排泄動態を調べるため、キメラマウスに放射能ラベル化合物を投与し、ラジオ-HPLCで胆汁中の親化合物及び代謝物の分析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. ヒト肝細胞キメラマウスの作製

ヒト肝細胞キメラマウスは広島大学大学院理学研究科・吉里が、以下のように作製、品質管理を行った。免疫不全肝障害マウス（以下 uPA<sup>+/+</sup>/SCID マウス）は肝障害マウス（uPA トランスジェニックマウス）と免疫不全マウス（SCID マウス）とを交配させることによって作出した。uPA<sup>+/+</sup>/SCID マウスへのヒト肝細胞の移植はBD ジェンテスト社より購入したBD-061（ドナー：6歳の黒人女性）ヒト肝細胞をマウスの脾臓に1匹あたり0.75-1.0 x 10<sup>6</sup>個の肝細胞を20 µlに懸濁し脾臓から注入した。マウス血中のヒトアルブミン濃度は、肝におけるヒト肝細胞へ生着と置換の程度は移植後3週目から週1回のペースでマウス血液を尾静脈から2 µl採取し、抗ヒトアルブミン抗体を結合させたラテック

スピーズを用いた比濁法のキット（LX 試薬 栄研 Alb-II、栄研化学株式会社）で測定した。キメラマウスにおけるヒト肝細胞の置換率は、あらかじめ求めたマウス血中のヒトアルブミン濃度とマウス肝臓切片におけるヒトサイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色の相関係数から算出した。以上のキメラマウス作製を（株）フェニックスバイオ（本社：広島県東広島市鏡山 3 丁目 13-26 テクノプラザ 405 号室）に委託した。

## 2. 胆嚢カニューレーション技術の改良

胆嚢カニューレーション技術の改良は自治医科大学・小林が行った。高置換キメラマウス（マウス肝臓のヒト肝細胞への置換率が 70%以上と予想される高置換率キメラマウス）に対する胆嚢カニューレーション施術法の改良を行った。胆嚢へのカニューレーション施術は実体顕微鏡下で行った。マウスに麻酔薬を腹腔内投与し、十分麻酔が効いたところで仰向けの状態で腹部を横切開した。十二指腸に近い部分の総胆管を結紮した後、胆嚢の一部を切開して新たに改良したストッパー付きのポリウレタン製カニューレ（内径：0.3 mm、外径：0.6 mm のカニューレに 1.5 mm の長さに切断してリング状にした内径 0.6 mm、外径 0.9 mm のカニューレをかぶせ、熱で固定したもの、図 1）を挿入した。挿入したカニューレのストッパーの手前側で胆嚢とカニューレを一緒に縛り、カニューレを固定した。この改良したカニューレを用いて高置換キメラマウス、ゼロ置換マウス（ヒト肝細胞を移植していない  $\text{uPA}^{+/+}$ /SCID マウス）、および SCID マウスから胆汁を回収した。

胆嚢に接続したカニューレの反対端は、腹部皮下を通してマウスの体外へ露出させた。非拘束胆汁回収を行う場合はマウスの後頭部皮下からカニューレを露出し、そこから非拘束のフリームービング装置に連結した。

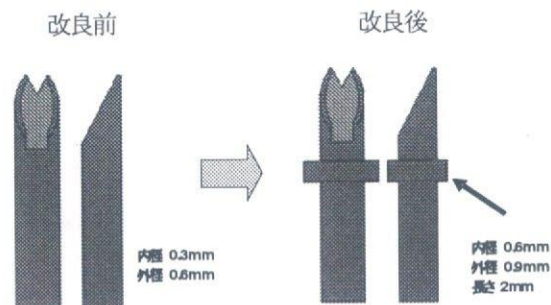


図 1：改良した胆嚢カニューレーション施術用カニューレ

## 3. 非拘束型胆汁回収装置の改良

非拘束型胆汁回収装置の改良は（株）フェニックスバイオ・堀江が行った。昨年度開発した非拘束型胆汁回収装置に胆汁が滞留する等の問題点が発生したため、ケージの変更、シーベルの吊り下げ方法の変更等を行った。非拘束型胆汁回収装置を 125 × 200 × 110 mm のサイズの小ケージ（マウス許容量 1-2 匹）をもとに作製した。シーベルユニットはマウスの動きに合わせて自由に動作できるようにした。作製した装置に胆嚢カニューレーションを施したマウスを接続し、継続的に胆汁を採取した。

## 4. 胆汁中の親化合物とその代謝物の分析

胆汁中の親化合物及びその代謝物の分析は国立成育医療センター研究所・絵野沢が行った。まず、胆汁に含まれる医薬品の親化合物と代謝物の分析系の確立のため、胆汁に *S*-warfarin および代謝物を混合後、以下の液-液抽出法 4 種類、固相抽出法 1 種類で抽出の条件を検討した。

### 液-液抽出法

実験方法① 試料 200  $\mu\text{l}$  に 1 M 硫酸 140  $\mu\text{l}$  を加え、混合した。さらに、ジエチルエーテル 5 ml 加えた後、1 時間振とうした。こうして得られた溶液を遠心分離し（600 × g, 10 分）、上層（エーテル層）を回収し、溶媒を減圧留去した。

実験方法② 試料 100  $\mu\text{l}$  に 1 M 塩酸 5  $\mu\text{l}$  を加え、混合した。さらに、ジエチルエーテル 5 ml 加えた後、5 分間よく振とうした。こうして得られた溶液を遠心分

離し (2000×g, 10分)、上層 (エーテル層) を回収し、溶媒を減圧留去した。

実験方法③ 試料 100 µl に 1 N 塩酸 200 µl を加え、混合した。さらに、ジエチルエーテル 5 ml 加えた後、5 分間よく振とうした。こうして得られた溶液を遠心分離し (2000×g, 10分)、上層 (エーテル層) を回収し、溶媒を減圧留去した。

実験方法④ 試料 100 µl に 0.1 N 水酸化ナトリウム 200 µl を加え、混合した。さらに、ジエチルエーテル 5 ml 加えた後、5 分間よく振とうした。こうして得られた溶液を遠心分離し (2000×g, 10分)、有機層 (エーテル層) を回収し、溶媒を減圧留去した。

#### 固相抽出法

実験方法⑤ Sep-Pak (C18, Waters) にメタノール 2 ml、水 2 ml でコンディショニング後、試料を通導した。水、0.15 M リン酸緩衝液 (pH 3.0) で洗浄後、メタノール 4 ml で溶出し、溶媒を減圧留去した。

また、確立した胆汁中の医薬候補化合物及び代謝物の抽出方法が有効であるか確認するため、ヒト肝細胞の置換率が 1% 未満の低置換キメラマウスに *S-warfarin* を 1 匹あたり 30 mg/kg 経口投与した。回収した胆汁を抽出し、HPLC (Inertasil ODS-3, 5 µm, 4.6x150 mm) で分離した。検出は UV 検出器 (304 nm) で行った。

#### 5. モデル化合物の投与試験

マウス胆嚢カニューレーション施術を施した高置換キメラマウスを 96 ウエルプレートの裏面にうつ伏せの状態に固定した。マウスが覚醒した状態でヒトとマウスで薬物代謝プロファイルの異なるモデル化合物として <sup>3</sup>H-*S-warfarin* を 1 匹あたり 30 mg/kg 経口投与した。露出させたカニューレはマウスより低い位置に置いた 1.5 ml チューブに接続し、胆汁を 24 時間回収した。

回収した胆汁は、HPLC (Inertasil ODS-3, 5 µm, 4.6x150mm) で分離した。検出は FLO-SINT II シンチレーションカウンター (Perkin Elmer) で行った。

(倫理面への配慮)

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外において適切な手続きを経て加工され、販売されているものを購入して使用した。ヒト肝細胞を持つキメラマウス作製に関しては、動物実験の倫理指針に従って実施し、(株) フェニックスバイオの社内倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。マウス非拘束型胆汁排泄モデルのための手術は全身麻酔下で行い、実験終了時には苦痛を最小限にとどめて死亡させサンプルを回収した。拘束状態で胆汁を回収する場合は、24 時間以内に実験を終了させ、実験終了時には苦痛を最小限にとどめて死亡させた。ヒト胆汁の入手・解析は国立成育医療センター研究所内の倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。

#### C. 研究結果

##### 1. ヒト肝細胞キメラマウスの作製

今年度胆汁排泄試験に使用したキメラマウスは非接着性の凍結ヒト肝細胞ロットである BD-061 を移植したものを用いた。BD-061 は融解後の細胞生存率が約 75% で、1 バイアル当たり約 9 匹のマウスに移植が可能であった。キメラマウスの置換率は BD-061 を移植したキメラマウスの解剖時のマウス血中ヒトアルブミン濃度により予測し、最終的にはマウス肝臓切片におけるヒトサイトケラチン 8/18 抗体による免疫染色により求めた。BD-061 移植後のキメラマウスにおけるヒト血中ヒトアルブミン濃度の経時変化をそれぞれ図 2 に示した。BD-061 を uPA<sup>+/+</sup>/SCID マウスに移植して 60 日目以降にマウス血中ヒトアルブミン濃度が 6.0 mg/ml 以上に達したマウスを高置換率キメラマウス (置換率 70% 以上) とした。以上のような生産状況下で、BD-061 を移植した高置換率キメラマウス 13 匹を本事業に用いた。

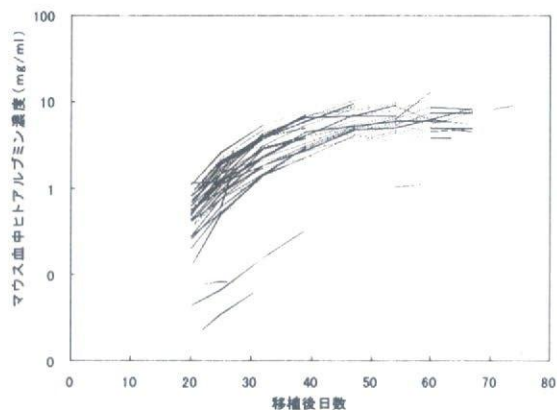


図2 BD-061 移植マウスにおけるヒトアルブミン濃度の変化

## 2. 胆嚢カニューレシオンの改良

胆嚢カニューレシオンに図1のようなストッパー加工を施したカニューレを使用することで施術中、あるいは非拘束の胆汁回収装置に接続してから胆汁を回収している際もカニューレがマウスの体内から脱落することなく持続的に回収することができた。胆汁流量もストッパー加工を施していないカニューレを使用した場合と変化はなかった。改良したカニューレを用いて改良した非拘束型胆汁回収装置により高置換キメラマウス、ゼロ置換マウス、およびSCIDマウスから胆汁を回収したところ、いずれのマウス種においても1週間程度、長い場合は2週間にわたって回収することができた(表1)。

## 3. 非拘束胆汁回収装置の改良

非拘束胆汁回収装置に小ケージを採用し、シーベルユニットの自由度を増す加工を施した改良型の小ケージ型非拘束胆汁回収装置を図3に示した。実際にこの装置を用いて回収した胆汁量の時間変化を図4及び、表1に示した。改良した非拘束胆汁回収装置では胆汁回収中に胆汁が滞留するというトラブルは少なくなり、持続的に胆汁を回収することができるようになった。しかし、胆汁回収量(体重1gあたりの胆汁排泄量)にばらつきが見られた。これは、胆汁に含まれるタンパク質がカニューレに詰まったり、カニューレがマウスの動きによってねじれてしまう為と考えられた。



図3: 改良した小ケージ胆汁回収装置

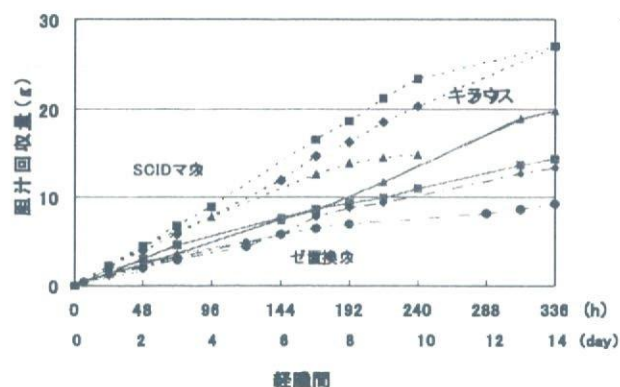


図4: 非拘束型胆汁回収装置による胆汁回収

表1: 非拘束型胆汁回収装置による胆汁回収の結果

動物種	体重(g)	h-Alb(mg/ml)	回収量(μ)	回収時間(h)	胆汁排泄量 (mg/h)	体重1gあたりの胆汁排泄量 (mg/h/g-BW)
キメラマウス	16.77	8.13	1.66	48	34.58	2.06
	22.10	5.34	14.36	336	42.74	1.93
	21.23	6.93	19.79	336	58.90	2.77
平均	20.03	6.80	-	-	45.41	2.27
ゼロ置換マウス	17.41	-	9.22	336	27.44	1.58
	14.92	-	13.24	336	39.40	2.64
	17.33	-	5.72	144	39.72	2.29
平均	16.55	-	-	-	35.52	2.16
SCIDマウス	25.60	-	26.96	336	80.24	3.13
	23.20	-	14.90	240	62.08	2.68
	26.08	-	27.07	336	80.57	3.09
平均	24.96	-	-	-	74.30	2.98

## 4. 胆汁中の親化合物と代謝物の分析

S-warfarin、S-warfarin の6位水酸化体(6-OH)、7位水酸化体(7-OH)および内部標準物質(Naproxen; 以下ISと略す)を添加した胆汁1mlに(胆汁中S-warfarin、6-OH、7-OH、ISの終濃度は各200 μM)を用いて、4種類の液-液抽出法と1種類の固相抽出法を試した。その結果、液-液抽出法③(実験方法3)での抽出率は、81.9%(S-warfarin)、80.4%(6-OH)、及

び77.7% (7-OH)であった。固相抽出法⑤ (実験方法5)での抽出は、85.7% (*S*-warfarin)、68.5% (6-OH)、59.0% (7-OH)であり、化合物により抽出率に差が見られた。

また、クロマトグラムより、固相抽出法⑤の方法よりも、液-液抽出法③の方法のほうが、*S*-warfarin、6-OH、7-OHの妨害成分の除去率が高いことから、本実験では液-液抽出法③を使用することにした (図5)。また、液-液抽出法①、②、④では、これらの化合物を確認することはできなかった。

表2: マウス胆汁中 *S*-warfarin とその代謝物の抽出率

化合物	液-液抽出	固相抽出
	実験方法③	実験方法⑤
<i>S</i> -warfarin	81.9%	85.7%
6 hydroxywarfarin (6-OH)	80.4%	68.5%
7 hydroxywarfarin (7-OH)	77.7%	59.0%

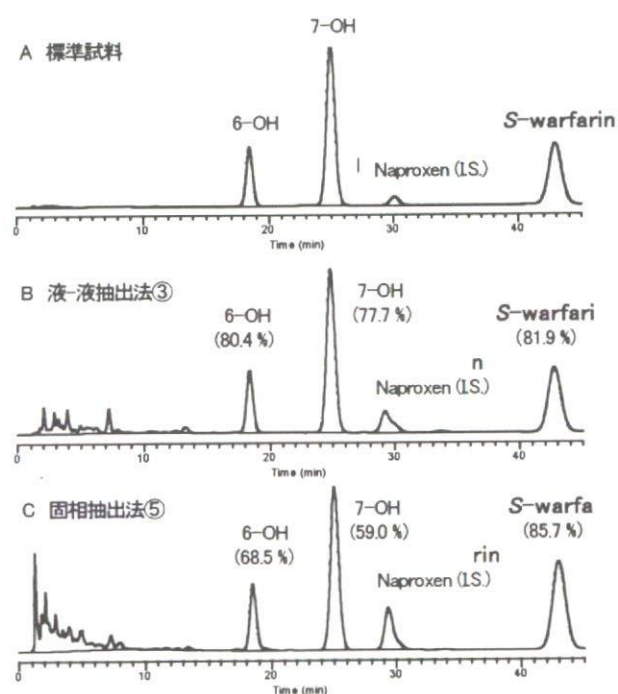


図5 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるマウス胆汁中の *S*-warfarin とその代謝物のクロマトグラム。A. 標準試料 (*S*-warfarin、6-OH、7-OH、及びNaproxen (I.S.)、各 200  $\mu$ M)、B. 液-液抽出法③、C. 固相抽出法⑤

*S*-warfarin 投与低置換キメラマウス胆汁 (1、2) を分析検体として、液-液抽出法③での抽出を行った。抽出後、HPLCにより確認すると、*S*-warfarin とその代謝物 (6-OH、7-OH) を検出することができた。また、*S*-warfarin、6-OH、7-OH を検量線より定量した。低置換キメラマウス1では、*S*-warfarin (115  $\mu$ mol)、6-OH (813  $\mu$ mol) と高濃度で検出されたが、7-OH (2.00  $\mu$ mol) はほとんど見られなかった。また、低置換キメラマウス2でも、同様の傾向が見られた。

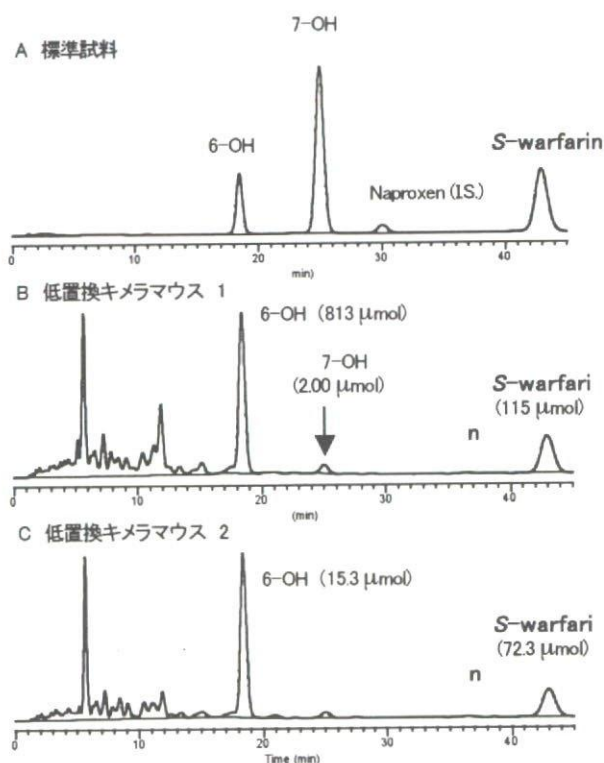


図6: 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による低置換キメラマウス胆汁中の *S*-warfarin とその代謝物のクロマトグラム。A. 標準試料 (*S*-warfarin、6-OH、7-OH、及びNaproxen (I.S.)、各 200  $\mu$ M)、B. 低置換キメラマウス1、C. 低置換キメラマウス2

## 5. モデル化合物の投与試験

キメラマウスの胆汁排泄がヒトでの動態を反映していることを確かめるため、放射能ラベル化合物の投与試験を行った。胆嚢カニューレシオン術を施したキメラマウスに拘束状態で  $^3$ H-*S*-warfarin を 30 mg/kg 経口投与し、胆汁を回収した。回収した胆汁を HPLC で分析し、代謝物の割合を調べた (図7)。

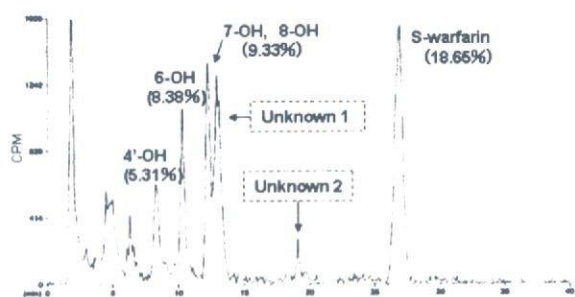


図7 S-warfarinを投与したキメラマウスから回収した胆汁のラジオクロマトグラム

その結果、未変化体の S-warfarin、代謝物として S-warfarin の4'位水酸化体 S-warfarin (4'-OH)、6-OH のピーク及び、7-OH と8位水酸化体 S-warfarin (8-OH 体) の重複ピークが認められた。また、胆汁中にはキメラマウス尿中には検出されなかった未知のピークが検出された(図7中 Unknown2)。胆汁中に排泄された S-warfarin 及び、既知の代謝物の割合は、4'-OH:5.31%、6-OH:8.38%、7-及び、8-OH の重複ピーク:9.33%、未変化体:18.65%であった。また、<sup>3</sup>H-S-warfarin を経口投与した際の、胆汁中放射能の排泄率は24時間で9.53%であった。

#### D. 考察

我々は、キメラマウスで医薬品候補化合物の胆汁排泄動態や胆汁中の代謝物を同定し、臨床第1相試験の尿・糞排泄バランスや代謝物を予測するモデル系を確立することを目標としている。キメラマウスの胆汁回収技術については昨年度に胆嚢からの胆汁回収に成功した。本年度は胆汁回収をより確実なものとするため、まず、胆嚢カニューレーションの改良を行った。その結果、胆嚢カニューレーションでは、カニューレにストッパーを取り付けることで施術中あるいは試験中の懸案であったカニューレの脱落防止が可能となった。

昨年度開発した中ケージ型非拘束系胆汁回収装置は、皮膚の薄い小さなマウスを装置に接続した場合、マウスがアンカーを引っ張ることによって皮膚が伸び、皮下で体内のカニューレがねじれて胆汁が滞留することが頻繁に観察された。また、アンカーが外れて露出し

たカニューレをマウスが噛み切る場合もあった。今回改良した小ケージ型非拘束系胆汁回収装置では、キメラマウスにおいても1週間程度は皮膚が伸びることもなく、継続的に胆汁を回収することができた。しかし、いずれのマウス種においても胆汁に含まれるタンパク質がカニューレに詰まったり、カニューレがマウスの動きによってねじれてしまうため、胆汁回収量に変動がみられた。来年度はこのような現象を解消するため、マウスの動きに合わせて上下、左右への動き及び回転が可能なシーベルユニットの改良を行う予定である。

マウスから回収した胆汁中の医薬品及び代謝物を分析するため、胆汁に S-warfarin とその代謝物を混合後、液-液抽出法4種類と固相抽出法1種類で抽出の条件を検討した。S-warfarin は酸性であることから、抽出に用いる水酸化ナトリウムと塩酸の量を調節した方法(液-液抽出法③)により、S-warfarin 及び代謝物ともに80%程度の回収率を得ることができた。

胆嚢カニューレーション施術を施した低置換キメラマウスに S-warfarin を投与し、回収した胆汁を液-液抽出法③で抽出をした。抽出後、HPLCで分析することにより、S-warfarin とその代謝物(6-OH、7-OH)を検出することができた。しかし、液-液抽出は技術的にやや難しく、多サンプル処理には固相抽出が適している。今回の検討において、固相抽出法で S-warfarin 及びその代謝物の抽出を行った場合、代謝物の回収率が落ちてしまったため、今後さらに改良する必要があると思われる。

キメラマウスの胆汁排泄がヒトでの動態を反映していることを確かめるため、放射能ラベル化合物の投与試験を行った。<sup>3</sup>H-S-warfarin を投与したキメラマウスの胆汁を HPLC で分析したところ、7-及び、8-OH 体の重複ピークの割合が4'-OH や6-OH に比べて多かった(図7)。これは、ヒトにおいて S-warfarin が CYP2C9 により芳香環の主に7位、一部は6位が酸化され、7位水酸化体が主要代謝物として生成するという報告と一致していた。また、キメラマウス胆汁中には S-warfarin の未変化体が比較的多量に検出されたことから、肝臓から胆汁へ排出された S-warfarin は腸管から再吸収され門脈を経て肝臓に戻り、能動輸送で肝細胞に取り込ま

れる腸肝循環により最終的にはほとんど代謝されると考えられた。ヒトでは *S*-warfarin はほとんど全てが代謝され、尿および糞中に排泄される。したがって *S*-warfarin はヒトにおいても腸肝循環をしながら代謝されると考えられた。

来年度はキメラマウス、ゼロ置換マウス、および SCID マウスを用いてキメラマウスの非拘束型胆汁排泄モデルがヒトの薬物動態を反映し、医薬品開発における医薬候補化合物の評価に利用できることを証明する。また、カニューレーション手術法の改良として胆管カニューレーション技術を確認する。さらに非拘束胆汁回収装置についても引き続き改良を行う。

#### E. 結論

本年度得られた研究成果を以下に示す。

1. ヒト凍結肝細胞 BD-061 を用いて本事業で使用する高置換キメラマウスを 13 匹作成した。
2. 昨年度開発した胆嚢カニューレーションの改良を行った。同じく昨年度開発したマウス用の非拘束胆汁装置と組み合わせることで 1 週間程度、長い場合は 2 週間にわたって胆汁を回収することができた。
3. 胆汁中の医薬品の親化合物及び代謝物の分析条件の確立を行った。
4. 拘束状態でキメラマウスに放射能ラベル化合物を投与した。回収した胆汁を分析したところ、ヒトと同様 7 位水酸化体が主要代謝物として検出された。また、キメラマウス胆汁中に *S*-warfarin の未変化体が比較的多量に検出されたことから、肝臓から胆汁へ排出された *S*-warfarin は腸管から再吸収され門脈を経て肝臓に戻り、能動輸送で肝細胞に取り込まれる腸肝循環により最終的にはほとんど代謝されると考えられた。ヒトにおいても *S*-warfarin はほとんど全てが代謝されることからヒトでも *S*-warfarin は腸肝循環をしながら代謝されると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Katoh, M., Matsui, T., Nakajima, M., Tateno, C., Soeno, Y., Horie, T., Iwasaki, K., Yoshizato, K., and Yokoi, T. (2005). In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition*. 33, 754-763.
- 2) Nishimura, M., Yokoi, T., Tateno, C., Kataoka, M., Takahashi, E., Horie, T., Yoshizato, K., and Naito, S. (2005). Induction of human CYP1A1 and CYP3A4 in primary culture of hepatocytes from chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabol. Pharmacokin.* 20, 121-126.
- 3) Tsuge, M., Hiraga, N., Takaishi, H., Noguchi, C., Oga, H., Imamura, M., Takahashi, S., Iwao, E., Fujimoto, Y., Ochi, H., Chayama, K., Tateno, C., and Yoshizato, K. (2005). Infection of human hepatocyte chimeric mouse which genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology*, 42, 1046-1054.
- 4) Katoh, M., Matsui, T., Okumura, H., Nakajima, M., Nishimura, M., Naito, S., Tateno, C., Yoshizato, K., and Yokoi, T. (2005). Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metabolism and Disposition*. 33, 1333-1340.
- 5) Emoto K., Tateno C., Hino H., Amano H., Imaoka Y., Asahina K., Asahara T., and Yoshizato K. Efficient In Vivo Xenogeneic Retroviral Vector-Mediated Gene Transduction into Human Hepatocytes. *HUMAN GENE THERAPY* 16:1138-1174, 2005
- 6) 吉里勝利. ヒト肝細胞キメラマウス. 化学と生物. 印刷中
- 7) 小林英司, 添野吉徳, 堀江透. 拘束実験技術—古くて新しい技術. *Biophilia*:Vol. 1 No. 3 p43 2005
- 8) 宮本義孝, 絵野沢 伸. 細胞の保存と蘇生. *Organ Biology* 12(4):263-272, 2005

## 2. 学会発表

- 1) 吉里勝利:「マウスで増殖させたヒト肝細胞の性質と創薬への利用」、動物細胞工学シンポジウム、2005. 11. 30、東京大学山上会館
- 2) 吉里勝利:「再生医療の最前線」、第5回日本再生医療学会総会、2006. 3. 8、岡山コンベンションセンター
- 3) 井上多恵、新田華容子、杉原数美、北村繁幸、堀江透、太田茂:「ヒト肝細胞を有するキメラマウスにおける warfarin 代謝」、日本薬学会第126年会、2006. 3. 30、仙台国際センター
- 4) 堀江透、立野知世:「The utilization of chimeric mice (humanized mice) in drug discovery and development」、PACIFICHEM 2005, 2005. 12. 15, Honolulu, USA
- 5) 絵野沢 伸. トランスポーターの医工学的利用. ワークショップ4. 薬物体内動態、代謝酵素とトランスポーター. 第12回日本臓器保存生物医学学会総会 筑波 平成17年11月25-26日
- 6) 宮本義孝、山田奈央、絵野沢 伸. 糖質を利用した肝細胞の保存技術の開発とその有用性. シンポジウム1. 細胞・組織・臓器保存法の進展. 第12回日本臓器保存生物医学学会総会 筑波 平成17年11月25-26日
- 7) 絵野沢 伸. 医学研究における人由来組織の必要性. ワークショップ2. ヒト由来資源の応用. 日本生命倫理学会第17回年次大会 東京 平成17年11月19-20日
- 8) 宮本義孝、山田奈央、絵野沢 伸. 糖質効果を利用したヒト肝細胞の凍結保存. 日本生物工学会第57回大会 筑波 平成17年11月15-17日
- 9) 若林 正、絵野沢 伸、小林英司. 医学研究における「既存試料」の取扱いに関する一般市民の意識. 第4回日本再生医療学会総会 大阪 平成17年3月1-2日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願  
実験用小動物飼育容器 (特願2005年 第149768号)
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社