

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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	綱脇祥子 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

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 開発したマウス用非拘束胆汁回収装置を用いて、モデル化合物を投与したキメラマウスから胆汁回収を行った。回収した胆汁中化合物およびその代謝物を分析した結果、それらはヒトの薬物動態を反映するものであることがわかった。

分担研究者

- (1) 株式会社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

医薬品開発には、通常、10年以上の歳月と数百億円の巨額の研究開発費を要する。よって研究開発の中止は企業経営に大きな影響を与えるため、製薬企業各社は新薬開発の成功確率を高めることと研究開発期間の短縮に努めている。しかし、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。実際、臨床試験の段階で開発中止となる医薬候補品はその60%に達するが、その原因の約8割が種差に起因するものである。

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重要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。

新規医薬品の開発においては尿中排泄と共に胆汁への排泄データも求められている。また、薬物体内動態の解析、予測において胆汁への薬物排泄を定量的に調べることは、肝薬物移行の解明上も極めて重要である。胆汁排泄試験にヒト肝細胞で置換されたキメラマウスを用いることができれば、ヒトの胆汁中薬物代謝の予測にも有用となる。

しかしながら、マウスの胆汁排泄試験は技術的に容易ではない。さらに非拘束条件下でマウス胆汁を採取することは困難であり、これまで確立された方法はない。そこで本事業では、キメラマウスを用いた上記胆汁排泄試験を行うため、マウスの非拘束型胆汁排泄モデル系の開発を行っている。

最終年度となる本年度は安定的な胆汁回収を目標に胆汁回収装置の改良および、胆汁排泄施術を行うマウスの選定条件等の検討を行った。また、その装置および条件を用いて、実際にヒトで代謝経路がわかっているモデル化合物をキメラマウスに投与し、継続的に回収した胆汁中代謝物を探索することでキメラマウスの非拘束胆汁排泄モデルが医薬品開発におけるヒト代謝予測に対する有用性を確認した。さらにマウスへの負担が少なく、胆汁の排出が止まる現象（以下滞留）が少ないと思われる胆管カニューレション法の開発を行った。

B. 研究方法

1. ヒト肝細胞キメラマウスの作製

免疫不全肝障害マウス（以下 uPA^{-/-}/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された。uPA^{-/-}/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 $0.75-1.0 \times 10^6$ 個の肝細胞を 20 μ l 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、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 μ l 採取し、抗ヒトアルブミン抗体を結合させたラテックスビ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. 胆管カニューレシオン施術法の開発

胆管へのカニューレシオン施術は実体顕微鏡下で行った。マウスにケタミン/キシラジンの混合麻酔薬を腹腔内投与し、十分麻酔が効いたところで胸部剣状突起の下 1cm を縦に切開した。切開した部分から十二指腸を引き出し、脾臓内を走る胆管を剥離した。剥離した胆管の十二指腸に近い部分を結紮し、結紮した部分より肝臓側の胆管に切込みを入れた。胆管の切り込み部分には胆嚢カニューレシオンに使用するポリウレタンカニューレに更に細かいサイズのカニューレ（内径：0.12 mm、外径：0.3 mm）を連結した先端部分を挿入した。胆汁に唾液が混入しないようにするため、カニューレの先は肝臓の手前まで押し進めた。

胆管に接続したカニューレの反対端は、腹部皮下を通して下腹部からマウスの体外へ露出させた。

また、胆管カニューレシオン法について、胆嚢カ

ニューレシオン法との相違がないか確認するため、それぞれの方法で回収した胆汁成分の比較を行った。

3. マウス小型非拘束型胆汁回収装置（非拘束胆汁回収装置）の改良

本研究で開発した胆汁回収装置は昨年度までにシーベル部分をゴムで吊ることによってアンカーにかかる力を緩衝させる改良を行った。しかし、マウスがケージの床の部分でのみ動き回るだけでなく、ケージのフタにしがみついて回る等の三次元的な動きをするため、アンカー部分に負担がかかって装置からマウスが外れてしまう現象がよく見られた。本年度はこれを解消するため、アンカーの代わりに体全体でカニューレのずれを防止するハーネスを導入した。また、昨年度改良した装置はシーベルを吊るアームが装置に固定されていたため、マウスの行動範囲はシーベルを吊るゴムが伸縮する範囲内に制限されていた。本年度は行動範囲制限に対するマウスのストレスを軽減するため、シーベルを吊るアーム本体がマウスにあわせて動作する改良を装置にくわえた。アームにはアルミの平棒を用いた。アルミの平棒をコの字型にまげ、側面中央部付近に穴を開けた。そこに長さ 30 mm のビスを貫通させ、アームの両下端部にバランス用の錘を取り付けた。ケージのフタには中央部に切り込みを入れ、フタの周辺部にアームを支持するビスの軸受けを取り付けた。シーベルはアームにゴムを張り、そのゴムに取り付けた針金で固定した。

4. 非拘束状態での胆汁回収条件の検討

昨年度、非拘束胆汁回収装置による胆汁回収を確立したが、カニューレに胆汁中タンパクが沈着して胆汁が滞留するばかりでなく、非拘束装置への接続によるストレスでマウスの体重が減少するとともに胆汁量も減少するという状態がよく見受けられた。これらの現象を解消するため、体外部分のカニューレの交換頻度や施術するマウスの選定条件について検討した。

5. キメラマウスへのモデル化合物投与試験

1) 拘束状態でのキメラマウスへのモデル化合物投与および胆汁分析

昨年度に引き続き、拘束状態でキメラマウスにモデル化合物を投与したときの胆汁中代謝物の分析を行った。胆汁排泄施術を施したキメラマウスに拘束状態で1匹あたり¹⁴C-ジアゼパム 5.13 mg/10 μ Ci を単回経口投与し、回収した胆汁について、胆汁中代謝物の TLC 分析を行った。RI 実験は広島大学医学部 RI 研究共同施設で行った。

2) 非拘束状態でのキメラマウスへのモデル化合物および胆汁分析

本研究の最大の目的であるキメラマウスの胆汁排泄モデルがヒトの薬物代謝予測に有用であるか検証するため、胆汁排泄施術を施したキメラマウスを非拘束胆汁回収装置に接続し、モデル化合物を投与する試験を行った。まずキメラマウスに化合物を反復投与し、経時的に胆汁を採取して大量の代謝物を回収するという目的で糖尿病治療薬であるナテグリニドを投与した。ナテグリニドを 10 mg/kg/day でキメラマウスに 5 日間反復投与し、その胆汁を投与開始から 5 日間、1 日ごとに回収した。回収した胆汁は、MeOH/MeCN で抽出した上清に HCOOH を加えた。得られた試料のうち、5 μ l を API3000 LC/MS/MS システム (Inertasil ODS-3, 2.1x 100 mm) で分離した。移動相は、0.1% HCOOH/H₂O と 0.1% HCOOH/MeCN のグラジエントを用いた。

非拘束胆汁回収はまた、長期間経時的に胆汁を回収できるので、代謝物が長期にわたって排泄される場合でもその半減期を追跡することも可能である。その検証を行うため、ヒトで半減期が長い化合物として高脂血症治療薬のアトルバスタチンを非拘束胆汁回収装置に接続したキメラマウスに投与した。アトルバスタチンをキメラマウスに 50 mg/kg で単回投与し、その胆汁を 5 日間、1 日ごとに回収した。回収した胆汁は、酢酸エチル/ジクロロメタンを加えて抽出し、遠心した上清を乾固した。乾固した残渣に水/メタノール/アセトニトリルの混合液 100 μ l を加え

た。得られた試料のうち、10 μ l を HPLC (Kromasil ODS, 4.6x 250 mm) で分離した。移動相は、0.05% トリフルオロ酢酸とアセトニトリルのグラジエントを用いた。

(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。

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 を移植したものをを用いた。BD-061 は融解後の細胞生存率が約 75% で、1 パリアル当たり約 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 1 に示した。BD-061 を uPA^{+/+}/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 6 匹を本事業に用いた。

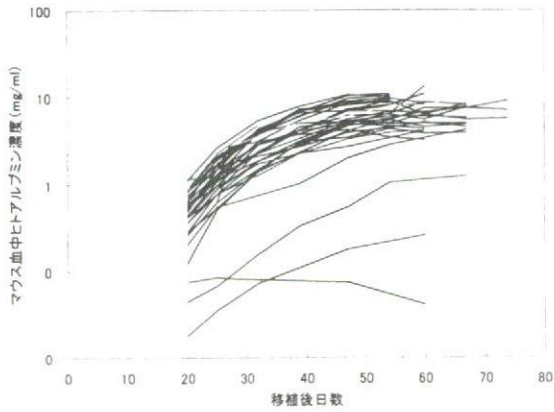


図1 BD-061 移植マウスにおけるヒトアルブミン濃度の変化

2. 胆管カニューレーション施術法の開発

胆嚢カニューレーション施術法は長時間麻酔をかけたままマウスの腹部を大きく切開するため、マウスに負担のかかる施術法であった。また、胆嚢に接続したカニューレを腹部皮下経路で体外に出す作業を行う際にカニューレが回転し、それに伴って胆嚢の根元部分がねじれて胆汁が滞留することがよく見受けられた。そこで施術時間の短縮と胆嚢のねじれを防止する目的で、ラットに用いられている胆管カニューレーション施術方法をマウスに試みた。マウスの剣状突起下を縦切開し、そこから十二指腸を引き出した。十二指腸から肝臓に向けて伸びる胆管に切込みを入れ、そこに通常使うカニューレにさらに先の細いカニューレを接続したもの(図2)の先端部分を挿入した(図3)。この方法は開腹面積が小さく、閉腹に手間がかからないので施術時間は胆嚢カニューレーションの半分程度であった。ラットに比べてマウスの胆管は細いため、そこへカニューレを挿入することは難しいと思われたが、先の細いカニューレを使用することにより、体の小さいキメラマウスにも胆管カニューレーションが可能となった。また、体重あたりの胆汁量も8時間程度であれば胆嚢カニューレーション施術と同程度であった(表1)。

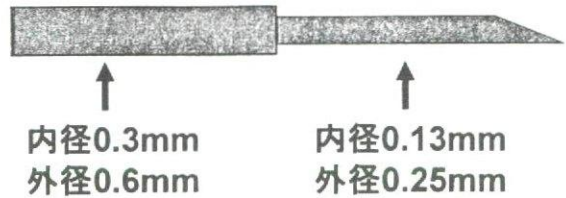


図2 改良した胆管カニューレーション施術用カニューレ

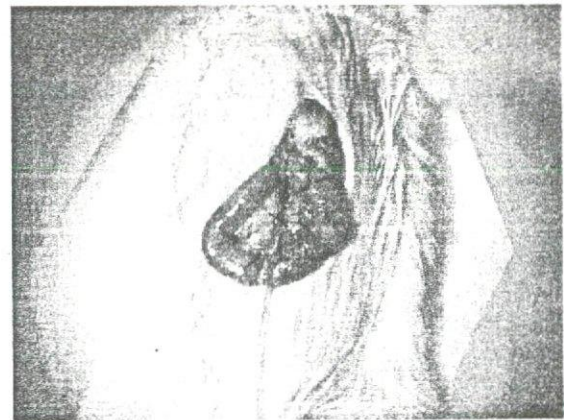


図3 キメラマウス胆管へのカニューレーション施術

表1 胆嚢カニューレーションと胆管カニューレーションによる胆汁回収量の比較

マウス	施術方法	体重(g)	h Alb (μg/mL)	胆汁回収量(0-8h)		
				回収量 (mg)	平均 (mg)	対体重比 (mg-bile/g-wt)
SCID A	胆管	24.35	-	596	726	3.06
SCID B		24.98	-	855		4.28
キメラマウスA		16.66	9.128	400	345	3.00
キメラマウスB		14.44	6.820	290		2.51
SCID C	胆嚢	27.93	-	643	750	2.88
SCID D		26.53	-	856		4.03
キメラマウスC		18.31	6.071	450	410	3.07
キメラマウスD		16.69	7.622	370		2.77

しかし、胆管カニューレーション施術をキメラマウスに施術した場合、全例が24時間以内に死亡した。キメラマウスに胆管カニューレーション施術を行った場合、平均胆汁回収可能時間は8時間程度で、胆嚢カニューレーション施術法に比べて1/3程度であった。死亡したマウスを観察したところ、腸管の膨張がほとんどの個体に見られた。そこで胆嚢及び、胆管カニューレーションで採取した胆汁の成分に変動がないか確認した。それぞれの施術方法で回収したキメラマウスの胆汁成分を調べたところ、タウロコール酸(TC)とグリココール酸(GC)の胆汁酸組成に大きな変動は見られなかった(表2)。

表 2 キメラマウスにおける胆嚢カニューレシオンと胆管カニューレシオンの胆汁酸組成の比較

マウス	施術方法	h-Alb($\mu\text{g/mL}$)	サンプル量(g)	TC (μM)	GC (μM)	TC/GC(比率)
			0-8h			
キメラマウスA	胆嚢	9,128	0.40	54461	11530	4.7
キメラマウスB	カニューレシオン	6,820	0.29	39440	3463	11.4
キメラマウスC	胆嚢	6,071	0.45	38263	1656	23.1
キメラマウスD	カニューレシオン	7,622	0.37	26371	2656	9.9

3. 非拘束胆汁回収装置の改良

非拘束胆汁回収装置の改良に先立ち、まずは装置とマウスを接続するハーネスについて検討した。ケージ内を縦横無尽に移動するマウスの動きを考慮し、市販のランドセルタイプのハーネスに改良を施すことにした。ランドセルタイプのハーネスにゴムの固定具の代わりに結束バンド（幅 3 mm×長さ 100 mm）の固定具をとりつけた。これにより、マウスの体に合わせて拘束具の長さが調整できるため、マウスののどや体に拘束具が食い込むことはなく、ハーネス自体がマウスから外れることもなかった。

次にケージ内でマウスがストレスなく動き回れるように胆汁回収装置に更なる改良を施した。昨年度改良したアームはシーベルをゴムで吊ることによってアンカーにかかる負担を緩衝していたが、アームが装置に固定されていたため、マウスは一定区域内しか移動できなかった。マウスの移動範囲を広げるため、シーベルを吊るアーム自体がマウスの動きに合わせて振り子のような動きをするものに変更した。まず、アーム本体はアルミの平棒を用いた。アルミの平棒をケージの大きさに合わせてコの字型にまげ、側面には穴を開けた。そこに長さ 30 mm のビスを貫通させ、アームの下端部にバランス用の錘を取り付けた。ケージのフタについては長手方向にコの字型に切り込みを入れ、マウスの動きに追従してアームがスイングする機能を持たせた。アームの上端から少し下の位置にゴムを張り、シーベル位置調整用の針金をかけた。シーベルから先は上部を切断し底に穴を開けたプラスチックチューブ、マウス噛み切り防止用コイルスプリング、ハーネスの順に取り付けた（図 4）。以上の改良により、ハーネスがマウスから外れたり、カニューレがねじれて胆汁が滞留する等のトラブルはなくなった。

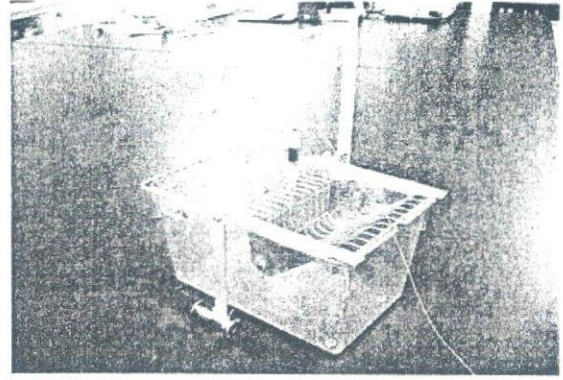


図 4 改良した非拘束胆汁回収装置

4. 非拘束状態での胆汁回収条件の検討

これまでの長期胆汁回収ではキメラマウスは通常のマウスに比べて胆汁流量が少ないため、胆汁と共に排出されるタンパクがカニューレに沈着して胆汁が滞留することがしばしばおこった。マウス体内からのタンパクの流出は抑えられないため、マウスの体外部分のカニューレ交換でタンパクのつまりを抑えることを試みた。

非拘束状態でマウスの胆汁を観察すると 3 日間程度でカニューレにタンパクが沈着し始めることがわかった。そこで体外部分のカニューレを 2 日に 1 回交換した。カニューレ交換をタンパクの沈着が始まる前に行うことでタンパクの沈着による胆汁流量の減少はなくなった。

次に非拘束胆汁排泄施術を施すマウスの条件を検討した。キメラマウスの平均体重は通常、動物実験で使用される ICR マウスの半分程度の約 15 g である。一般的に市販されているマウス用の実験器具は 30 g 程度のマウスを想定しており、キメラマウスに適用できるものは少ない。また、キメラマウスの宿主動物である uPA^{-/-}/SCID マウスは遺伝的に肝障害を誘発しており、肝細胞を移植されてキメラマウスになっても肝臓に障害を受けている部分が残っているためか通常のマウスに比べて体格が小さく、体力的に弱い印象がある。このため、15 g 程度のキメラマウスに非拘束胆汁排泄施術を行ったとしても衰弱が激しく 1 日か 2 日間程度で胆汁の滞留や死亡という現象がしばしば見られた。SCID マウスで非拘束胆汁排泄を検討した際に体が大きいほど胆汁

量が多く、非拘束胆汁回収装置に対するストレスが小さいように感じたため、この結果を元にどれぐらいの体重のキメラマウスであれば安定的に非拘束胆汁回収が可能か検討した。

平均的な体重のキメラマウスでは2日間程度の短期間で死亡する個体が多く見られていたが、体が大きいほど長期間生存する傾向があった。20g以上になるとほぼすべてのマウスが2週間程度安定的に胆汁回収をすることが可能であった。以上の結果を踏まえて20g以上のキメラマウスを用い、カニューレ交換を2日に1回行った際の胆汁回収結果を図5に示した。

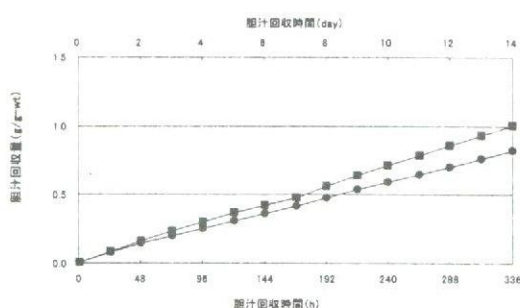


図5 回収条件検討後の非拘束状態での胆汁回収結果 2匹のキメラマウスで行った結果を示す。

5. キメラマウスへのモデル化合物投与試験

1) 拘束状態でのキメラマウスへのモデル化合物投与および胆汁分析

キメラマウス4匹の¹⁴C-ジアゼパム 5.13 mg/10 μCi/Bodyを単回経口投与した際の胆汁中代謝物についてTLC分析を行った。投与後8時間までに未変化体ジアゼパムが投与量の0.51%、M-1が0.56%及びM-2が0.09%、24時間までに未変化体が1.81%、M-1が0.67%及びM-2が0.74%が排泄された。

2) 非拘束状態でのキメラマウスへのモデル化合物および胆汁分析

今年度改良した胆汁回収装置を用いることによりキメラマウスから胆汁が安定的に回収できるようになったため、ヒトで代謝経路がわかっているモデル化合物2種類を投与する試験を行った。まず、ナテ

グリニドを10 mg/kg/dayでキメラマウスに5日間反復投与し、その胆汁を投与開始から5日間、1日ごとに回収した。キメラマウスから回収した各胆汁をLC/MS/MSで分析した結果、ナテグリニドの代謝物は全てのサンプルにおいて確認することができた。図5に代謝物(M1, M2&M3, M7)の回収量を示す。

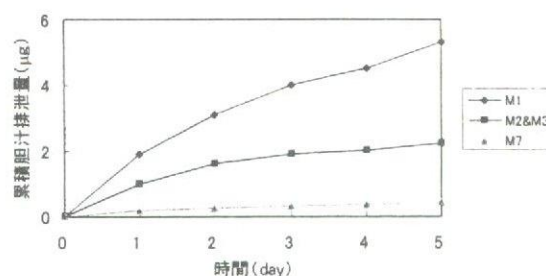


図5 LC/MS/MSによるナテグリニド代謝物の胆汁分析結果

次にアトルバスタチンを50 mg/kgで単回投与し、胆汁を5日間、1日ごとに回収した。キメラマウスから回収した胆汁をグラジエントHPLCで分析した。図6のようにアトルバスタチンが経時的に減少する様子を観察することができた。

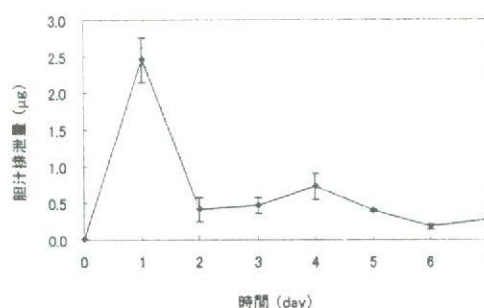


図6 グラジエントHPLCによるアトルバスタチンの胆汁分析結果 2匹のキメラマウスで行った結果を示す。

D. 考察

本研究で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までに新た

に開発した非拘束胆汁回収装置を用いて経時的にキメラマウスから胆汁を回収することに成功した。しかし、その胆汁回収はさまざまな要因により安定的ではなかった。本年度は安定的な胆汁回収を目指して多方面からの改良を行った。

まず、マウスの体力的負担を軽減させるため、胆嚢カニューレシオンよりも手術が容易で時間のかからない胆管カニューレシオン手術法の開発を行った。胆管カニューレシオン手術法は手術時間が短いので体の小さなキメラマウスの負担が最小限にとどめられると思われる。また、カニューレを胆管に挿入するため、胆嚢カニューレシオン手術法のようにカニューレおよび、胆嚢がねじれて胆汁が滞留することはなかった。しかし、胆管カニューレシオン手術を行ったキメラマウスは全例が24時間以内に死亡した。そこで死亡したマウスを観察したところ、腸管の膨張がほとんどの個体に見られた。観察所見から原因は膵炎の発症によるものであると考えられた。マウスは胆管と膵管が完全に分かれていないため、カニューレを腸管付近から肝臓付近まで挿入すると腸への膵液の流出を妨げてしまう。これにより、膵炎を発症すると考えられる。膵炎の発症でマウスに生理的な影響が発生すると考慮されるため、胆嚢及び、胆管カニューレシオンで採取した胆汁の成分に変動がないか確認した。キメラマウスの胆汁成分を調べたところ、8時間以内では胆汁酸組成に大きな変動は見られなかった。このことから、手術法の違いによる試験結果の相違はないと考えられ、短時間の試験では胆管カニューレシオン、長期間の試験では胆嚢カニューレシオンで手術するという採取方法の使い分けが可能であると考えられる。

次に胆汁回収の安定化に向けた改良を行った。昨年度はマウスの体に合わせたサイズに装置を改良したが、アンカーの脱落やカニューレにタンパクが詰まる等の現象で胆汁の滞留がしばしばおこるため、胆汁の回収は安定的ではなかった。これらの現象を解消するため、装置の改良と回収を維持するための条件検討を行った。装置の改良については、装

置のアーム部分とマウスと装置とをつなぐアンカーの代わりにハーネスの導入を行った。アーム部分については上下の動きを緩衝するだけでなく、アームが振り子のように動く機構を加えたことで負荷が軽減され、さらに自由に動き回れるようになったと思われる。ハーネスについては丈夫で軽いという点から市販のランドセルタイプのハーネスに結束バンドという組み合わせのものを採用した。また、胆汁回収の維持条件として、手術するマウスの選定条件および、術後のマウスの維持について検討した。カニューレに沈着するタンパクや非拘束胆汁排泄手術を行ったマウスを観察したところ、手術には20g以上のマウスを選定し、2日に1回、体外部のカニューレ交換をすることに決定した。これらの処理を施すことにより、キメラマウスから2週間以上安定的に胆汁回収をすることが可能となった。

キメラマウスからの胆汁回収が安定的になったため、実際に非拘束状態のキメラマウスに化合物を投与し、その胆汁を回収し、親化合物および代謝物の分析を行った。ナテグリニドの投与試験では胆汁にヒト特異的な代謝物であるグルクロン酸抱合体だけでなく、他の代謝物も排泄されていることが確認された。また、キメラマウスに化合物を反復投与し、経時的に胆汁を採取することで単回投与のときよりも大量にヒト特異的な代謝物を回収できることが確認された。また、アトルバスタチンを投与した試験ではキメラマウスで投与翌日から7日目までアトルバスタチンが減少することが確認できたことから、ヒトで半減期の長い胆汁代謝物の回収がキメラマウスの非拘束胆汁回収モデルで可能であることがわかった。

以上の投与実験により、キメラマウスの非拘束胆汁排泄モデルは生理的条件下に近い状態でヒトの薬物動態を予測できる非常に優れたモデルであると考えられる。今後は取り込み、排出のヒトのトランスポーターの予測モデルとしての有用性について検討を加える予定である。

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6匹作成した。
 2. キメラマウスに対して負担の少ない施術法とし
て胆管カニューレシオン施術法の開発を行っ
た。短時間でトラブルの少ない施術法であつた
が、胆汁回収期間が限定された。
 3. 非拘束胆汁回収装置の改良を行った。アームが
振り子のように動く機構を加えたことでマウ
スの負荷が軽減され、さらに自由に動き回れ
るようになった。また、拘束具を改良すること
により、装置からマウスが外れるトラブルがな
くなった。
 4. 非拘束状態で胆汁回収を行う条件を検討した。
体外部のカニューレを2日に1回交換し、20 g
以上のキメラマウスを使用することで長期にわ
たってより安定的に胆汁を回収することが可能
となった。
 5. 本研究で開発、改良した装置を用いてモデル化
合物を投与したキメラマウスから回収した胆汁
を分析したところ、ヒトの薬物動態を反映した
ものであつた。
 6. 以上の結果より、キメラマウスの胆汁排泄モデ
ルはヒトの胆汁中薬物代謝予測に有用であると
考えられる。
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Aoki, K., Kashiwagura, Y., Horie, T., Sato,
H., Tateno, C., Ozawa, N., Yoshizato, K. 2006.
Characterization of Humanized Liver from
Chimeric Mice Using Coumarin as a Human CYP2A6
and Mouse CYP2A5 Probe. Drug Metab.
Pharmacokinet. 21, 277-285
 - 2) 向谷(立野)知世、森川 良雄、吉里 勝利 ヒト
肝細胞キメラマウス New Technology Vol.33
No.1 P650-651
 - 3) 吉里勝利 医学のあゆみ キメラマウス
vol.218 NO.9 P805-807 2006
 - 4) Chise Tateno, Miho Kataoka, Rie Utoh, Chihiro
Yamasaki, Asato Tachibana, Kenjiro Wake, Koji
Inoue, Katsutoshi Yoshizato Chimeric Mice with
Human Hepatocytes _Growth Ability of Human
Hepatocytes in Liver of an Immunodeficient and
Liver-damaged Mouse Model- Minophagen
Proceedings
 - 5) 吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウス 化学と生物
vol.44 no.6 2006 P352-354 ヒト肝細胞キメラ
マウス
 - 6) Chise Tateno, Katsutoshi Yoshizato SINUSOID
NEWSLETTER INTERNATIONAL Chimeric mice whose
livers have human hepatocytes -Future Aspects
of the Humanized Chimeric Mouse Whose Liver in
Almost Completely Repopulated with Human
Hepatocytes-
 - 7) Miyamoto Y, Suzuki S, Nomura K, Enosawa S.
Improvement of hepatocyte viability after
cryopreservation by supplementation of
long-chain oligosaccharide in the freezing
medium in rats and humans. Cell Transplantation
15(10); 911-919, 2006
 - 8) Tokiwa T, Yamazaki T, Xin W, Sugae N, Noguchi
M, Enosawa S, Tsukiyama T. Differentiation
potential of an immortalized non-tumorigenic
human liver epithelial cell line as liver
progenitor cells. Cell Biology International
30; 992-998, 2006
 - 9) 絵野沢 伸. 書評 ビッグ・ファーマ 製薬会社
の真実. Organ Biology 13(2); 181-182, 2006
 2. 学会発表
 - 1) 向谷(立野)知世 鶴頭 理恵、片岡 美穂、山崎
ちひろ、立花 亜里、吉里 勝利 ヒト肝細胞キメ
ラマウスの医薬品開発への応用 平成18年6月
16日 第2回広島肝臓プロジェクト研究センター
シンポジウム
 - 2) 向谷(立野)知世 片岡 美穂、宮 冬樹、角田 達
彦、妙見 夕佳、山縣 彰、大房 健、吉里 勝利

- ヒト肝細胞キメラマウスのヒト成長ホルモン投与によるヒト肝細胞の遺伝子およびタンパク質発現の変化 平成18年6月30日-7月1日 第13回肝細胞研究会
- 3) 片岡美穂 鶴頭理恵、立野(向谷)知世、吉里勝利 継代移植ヒト肝細胞キメラマウスに見られる脂肪性肝炎の解析 平成18年6月30日~7月1日 第13回肝細胞研究会
- 4) 山崎ちひろ 向谷(立野)知世、片岡美穂、二宮真一、安達弥永、松田直、舩本法生、初迫博幸、五十嵐友香、五十嵐由希子、浅原利正、吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウスから分離した肝細胞の *in vitro* における機能評価 平成18年6月30日-7月1日 第13回肝細胞研究会
- 5) 向谷(立野)知世 片岡美穂、吉里勝利 ヒト肝細胞キメラマウスにおける脂肪肝およびNASH様病変に関する研究 平成18年8月26日 OSAKA CITY LIVER CLUB
- 6) Y. Morikawa H. Ohshita, M. Nakagawa, C. Ohnishi, A. Yanagi, T. Arimura, M. Kakuni, Y. Kageyama, T. Horie, S. Enosawa, C. Tateno, K. Chayama, K. Yoshizato Utilization and application of chimeric mice with humanized liver for studies of cell biology and pharmacology as *in vivo* human model. 平成18年9月3日-9月7日 16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation
- 7) Chise Tateno Miho Kataoka, Rie Utoh, Chihiro Yamasaki, Asato Tachibana, Kenjiro Wake, Koji Inoue, Katsutoshi Yoshizato Chimeric Mice with Human Hepatocytes -Growth Ability of Human Hepatocytes in Liver of an Immunodeficient Liver-damaged Mouse Model 平成18年9月8日 Minophagen International Symposium 2006 "Liver Cell Injury, Pathogenesis and Therapeutic Implications"
- 8) Chise Tateno Miho Kataoka, Norio Masumoto, Rie Utoh, Asato Tachibana, Fuyuki Miya, Tatsuhiko Tsunoda, Katsutoshi Yoshizato Human growth hormone induces the growth of human hepatocytes and ameliorates liver steatosis in human hepatocyte-chimeric mice 平成18年10月31日 The Liner Meeting 2006
- 9) Miho Kataoka Chise Tateno, Rie Utoh, Katsutoshi Yoshizato A Humna NASH mouse model: a chimeric mouse produced by transplanting human hepatocytes isolated from liver of uPA/SCID mice that had been near completely replaced with human hepatocytes 平成18年10月31日 The Liner Meeting 2006
- 10) 森川良雄、大下浩樹、柳愛美、大西千元、中川真紀子、景山豊、堀江透、向谷(立野)ヒト肝細胞キメラマウスの作製と *in vivo* ヒトモデルとしての医薬品開発および細胞生物学への応用 平成19年3月13日-3月14日 第6回日本再生医療学会
- 11) 絵野沢伸 人由来組織の医療、研究、創薬の視点からみた利用の現状について。第124回ヒューマンサイエンス振興財団研究資源委員会。平成18年4月21日、東京
- 12) 宮本義孝、鈴木聡、絵野沢伸 肝細胞の凍結液組成の基礎的検討-オリゴ糖の効果-。第13回肝細胞研究会。平成18年6月30日-7月1日 旭川
- 13) 宮本義孝、鈴木聡、小川亜希子、絵野沢伸。セリシンを利用したヒト肝細胞凍結保存液の検討。第58回日本生物工学会大会。大阪。平成18年9月11-13日
- 14) 宮本義孝、絵野沢伸、竹内朋代、竹澤俊明。ビトリゲル薄膜担体上で培養した状態での細胞の凍結保存と蘇生。第33回日本臓器保存生物医学学会 学術集会 一ツ橋、東京 平成18年11月23, 24日
- 15) ISSX-JSSX(仙台、10月2007年)予定
- 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18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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