

⑫ 公表特許公報(A)

平4-502551

⑬ 公表 平成4年(1992)5月14日

⑭ Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求	未請求	
A 01 K 67/027		8502-2B	予備審査請求	有	部門(区分) 1(1)
// A 61 K 45/00	ADU	8415-4C			
49/00	Z	8415-4C			

(全 4 頁)

⑮ 発明の名称 ヒト疾患に対する動物モデル

⑯ 特 願 平1-510569

⑰ 翻訳文提出日 平3(1991)4月5日

⑱ 出 願 平1(1989)10月5日

⑲ 国際出願 PCT/US89/04414

⑳ 国際公開番号 WO90/04017

㉑ 国際公開日 平2(1990)4月19日

優先権主張 ㉒ 1988年10月5日 ㉓ 米国(US) ㉔ 253,990

㉕ 発 明 者 モ ノ ソ フ ア ン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン デイエゴ 71  
エイジー ストリート 6198

㉖ 発 明 者 レ イ グ ス タ フ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92120 サン デイエゴ ウ  
イノナ ストリート 6417

㉗ 出 願 人 アンテイキヤンサー インコー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92110 サン デイエゴ メ  
ボレイテッド トロ ストリート 5325

㉘ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 8 名

㉙ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT  
(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

浄書(内容に変更なし)

請 求 の 範 囲

1. ヒト腫瘍疾患に対する動物モデルであって、前記動物が前記動物の相当する器官中へ移植されたヒト器官から得られた腫瘍組織を有し、前記移植された腫瘍組織を増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有する動物モデル。
2. 動物が無胸腺マウスである、請求項1に記載の動物モデル。
3. ヒト腫瘍組織がヒトの肝臓、腎臓、胃、脾臓、結腸、胸、前立腺、肺、睾丸又は脳から得られる、請求項2に記載の無胸腺マウス。
4. 腫瘍組織がヒト腎臓から得られる、請求項3に記載の無胸腺マウス。
5. ヒト腫瘍腎組織がマウスの腎臓の腎皮質中へ移植される、請求項4に記載の無胸腺マウス。
6. 腫瘍細胞がヒト胃から得られる、請求項3に記載の無胸腺マウス。
7. ヒト腫瘍腎組織がマウスの胃中に、胃の内部粘膜ライニングと胃の外部腹膜コートとの間に移植される、請求項6に記載の無胸腺マウス。
8. 腫瘍組織がヒト結腸から得られる、請求項3に記載の無胸腺マウス。
9. 腫瘍腎組織がマウスの盲腸・大腸中に移植される、請求項8に記載の無胸腺マウス。
10. 腫瘍組織が女性ヒト胸から得られる、請求項3に記載の雌無胸腺マウス。
11. ヒト腫瘍疾患に対する動物モデルを発生させる方法であって、移植されたヒト腫瘍組成を前記動物中で増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有する実験動物を準備し；

ヒト器官からの腫瘍組織の試料を免疫欠損動物の相当する器官中へ移植する、  
ことを含む方法。

12. 実験動物が無胸腺マウスである、請求項11に記載の方法。
13. ヒト腫瘍組織がヒトの肝臓、腎臓、胃、脾臓、結腸、胸、前立腺、肺、睾丸又は脳から得られる、請求項12に記載の方法。
14. 腫瘍組織がヒト腎臓から得られる、請求項13に記載の方法。
15. ヒト腫瘍腎組織がマウスの腎臓の腎皮質中に移植される、請求項14に記載の方法。
16. 腫瘍組織がヒト胃から得られる、請求項13に記載の方法。
17. ヒト腫瘍腎組織がマウスの胃中に、胃の内部粘膜ライニングと胃の外部腹膜コートとの間に移植される、請求項16に記載の方法。
18. 腫瘍組織がヒト結腸から得られる、請求項13に記載の方法。
19. 腫瘍腎組織が無胸腺マウスの大腸の盲腸中に移植される、請求項18に記載の方法。

## 特許(内容に変更なし)

## 明 細 書

## ヒト疾患に対する動物モデル

## 発明の背景

本発明はヒト腫瘍疾患に対する動物モデルに関する。より詳しくは、本発明はヒトの器官から得られ、動物の相当する器官中へ移植された腫瘍組織をもつ動物モデルに関する。

ヒト腫瘍疾患に代る代表的動物モデルに対する要求が長い間存在した。そのようなモデルは多くの目的に役立つことができよう。例えばそれは、ヒトにおける腫瘍疾患の進行を研究して適当な治療形態の発見を援助するために使用できよう。そのようなモデルはまた提案された新抗腫瘍物質の効力の試験に使用できよう。さらに、それは癌患者の腫瘍の個別化した化学的敏感性試験に使用できよう。そのような動物モデルの存在は薬物スクリーニング、試験及び評価を一層効率的にかつ非常に低コストにするであろう。

ヒトの腫瘍疾患に対する動物モデルの発生における若干の以前の試みは移植可能な動物腫瘍を用いた。これらは啮齒動物中に発生し、通常近交集団において、動物から動物へ移植された腫瘍であった。他の動物腫瘍モデルは少なくとも動物系中で、発癌性であった種々の物質により動物中に腫瘍を誘発させることにより発生された。なお他の動物腫瘍モデルは自然発生腫瘍をもつ啮齒動物であった。しかし、これらの啮齒動物モデルはしばしば、同じ物質を受けるヒト被験者とは非常に異なって化学療法剤に应答した。

約20年前に始められて開発された他の動物腫瘍モデルは胸腺のないマウスを用いた。これらの動物は細胞に欠陥があり、その結果外来移植組織を拒絶する能力を失った。該マウスは明確に理解されていない理由のために、実質的に毛がなく、「ヌード」

に足る免疫欠損を有する実験動物中へヒト腫瘍組織を移植することにより発生される。この使用に殊に適する実験動物はT細胞免疫を有しない系統のマウスである。これらのマウスは、一般にヌードマウス又は無胸腺マウスとして示され、容易に利用でき、チャールズ・リバー・ラボラトリーズ(Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, Massachusetts) (カタログ確認: Crl: nu/nu (CD-1) BR、同型接合28~42日令) から商業的に入手できる。

本発明による免疫欠損実験動物中の腫瘍組織の配置は正位移植により行なわれる。これは同種の組織により先に占められた位置に移植された移植組織又は移植片を示す。本発明において正位移植という語はヒトの器官の新生物腫瘍組織を免疫欠損実験動物の相当する器官中へ移植することを示すために使用される。こゝに使用されるヒト腫瘍組織には、例えばヒトの腎臓、肝臓、胃、脾臓、色、胸、前立腺、肺、睾丸及び脳中に生ずる病理学的に診断される腫瘍である新外科試料の組織が含まれる。そのような腫瘍には癌腫並びに肉腫が含まれ、こゝに行なわれるそれらの移植はすべての段階、等級及び型の腫瘍を包含する。

移植の前に、ヒト腫瘍組織は適当な栄養培地、例えば10%ウシ胎児血清及び適当な抗生物質例えばゲンタマイシンを含むイーグル(Eagle)の最少必須培地中に置くことにより維持される。組織を含む培地は次いで約4℃に冷却される。組織はこの方法で約24時間維持できる。

選択した組織試料は選択した器官中の適当に準備した腔中への挿入に適する大きさの塊に形成することにより移植のために準備される。試料の大きさは約0.1×0.5cmから約0.2×0.6cmまで変動することができる。適当な大きさの試料の形成に使用される

又は「無胸腺」マウスと称されるようになった。

これらのヌードマウスの皮膚の下に皮下的に移植されたときにヒト腫瘍がしばしば増殖することが見いだされた。しかし、そのようなヒト腫瘍組織が実際にマウス中に腫瘍を形成した生着率又は頻度は個々の供与体及び腫瘍の型により変動した。これらのモデルにおいて、生着した腫瘍はしばしば、大部分移植の部位で増殖し、もとの腫瘍が供与体中で非常に転移性であってもまれにしか転移しなかった。従って、皮下ヌードマウスヒト腫瘍モデルは、前記啮齒動物モデルよりも良好であるけれども、なお実質的な欠点を有し、すなわち、皮下移植組織は転移する能力を欠いた。

前記不足のないヒト腫瘍疾患の動物モデルに対する要求を満たすために、本発明はヒト中に生ずるような腫瘍疾患の進行に全くよく似た能力を有する新動物モデルを開示する。

## 発明の概要及び目的

本発明の主目的はヒト腫瘍疾患に対する改良された動物モデルを提供することである。

本発明の主観点によれば、ヒト器官から得られて動物の相当する器官中に移植された腫瘍組織を有し、移植された組織を増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有するヒト腫瘍疾患に対する新規動物モデルが提供される。

本発明の他の観点はヒト腫瘍疾患に対する動物モデルを発生させる方法を提供し、該方法は移植されたヒト腫瘍組織を前記動物中で増殖及び転移させるに足る免疫欠損を有する実験動物を準備し、ヒト器官からの腫瘍組織の試料を免疫欠損動物の相当する器官中へ移植することを含む。

## 発明の詳細な説明

本発明の動物モデルは、移植された組織を増殖及び転移させる

技術は鉗子などで所望の大きさの片に引き裂くことにより組織を適当な大きさに引き裂くことが含まれる。

本発明による組織移植の実施に典型的に用いる顕微外科器具にはカストロビジョ(castrovijeo)針ホルダー、ジュアラ(jeweler)の鉗子(直及び曲)、虹彩鉗子、虹彩鉗並びに直及び曲組織鉗子が、各有歯及び各無歯のものを含めて、包含される。

腫瘍組織の移植の前に、選ばれた免疫欠損動物は適当な麻酔薬で麻酔される。肺組織を除いて前記すべての器官組織の移植が、エチルエーテルを用いる普通の麻酔法により便宜に行なわれる。肺組織が移植される場合にはペントバルビタールが麻酔薬として使用される。

ヘパトームからの組織又はヒト肝臓からの腫瘍の移植は移植部位として受容体動物の肝臓の尾状葉を用いて行なわれる。若干のゆるい縫合が葉上に置かれ、大きさ約0.2×0.5cmの腫瘍塊を収容するために縦方向に切開される。切り口中に腫瘍を配置した後、それを適所に確保するために縫合糸を腫瘍上にきちんと引張る。

ヒト膵臓腫瘍からの組織を移植する方法は受容体動物の膵臓中に、十二指腸に近い器官の頭部で切開することにより行なわれる。無血管領域を選ぶことに注意する。切開は選んだ領域中に行なわれ、約0.5×0.2cmの腫瘍塊が前記と同じ方法で移植される。すべての段階及びすべての等級の膵臓癌の組織をこの方法で移植することができる。

ヒト乳癌からの組織の移植は受容体動物の胸上にポケットを外科的に形成することにより行なわれる。ポケットは好ましくは大きさ約0.2×0.5cmの腫瘍塊を収容するに足る大きさである。ポケット中に腫瘍を配置した後、ポケットを縫合で閉じる。すべての段階及び等級の乳癌をこの方法で移植することができる。

受容体動物の前立腺中へのヒト前立腺癌の組織の移植は、前立腺中に切り口を外科的に形成し、次いで内腔中に大きさ約0.2～0.3cmの組織試料を配置することにより行なわれる。組織試料の配置後、切り口を適当な縫合で閉じる。移植組織が初めの位置から移動できないように2つの追加縫合が前立腺の頭部に置かれる。

受容体動物の睾丸中へのヒト睾丸癌の組織の移植は18番ゲージ針を睾丸に縦軸に沿って挿入し、大きさ約0.1×0.5cmの腫瘍塊を針を通して導入することにより行なわれる。組織試料の端が穿刺のときに見え、針をゆっくり引抜きその間可視腫瘍組織を鉗子で適所に保持する。針により作られた孔は次いで1つの縫合により閉ざされる。

受容体動物の肺中へ腫瘍肺組織を移植する準備中に、気管切開が行なわれ、シラスティック管が挿管される。その後次の移植操作のいずれかを用いることができる：

- (1) 気管切開管を肺葉(類)に達するまで進め；小細長(2×6mm)の腫瘍塊を管を通して導入し、次いで管を取出し、気管の創傷を縫合で閉じる；又は
- (2) 予防管を気管中へ挿入し；右胸上に小穿刺創傷を作り、右肺の葉を引き上げて胸部腔をふさぎ、それにより肺の虚脱を防ぎ；肺葉を基部で弱くクランプして2つの結紮糸を肺の上にゆるく置き；肺上に切り口を作り、約0.2×0.5cmの腫瘍をその中へ埋め、結紮糸をきちんと結び；肺葉を胸部腔中へ戻し、創傷を閉じる。

すべての段階及び等級の小細胞及び非小細胞肺癌の組織を前記操作のいずれかにより移植することができよう。

腫瘍ヒト脳組織を受容体動物脳中へ移植するために、パー孔を動物の頭頂頭蓋骨を通して作る。約0.2×0.4cmの腫瘍塊を選ん

で脳中へ移植する。次いで頭蓋骨中の孔を骨ロウにより封じる。

本発明の動物モデルはヒト腫瘍疾患の進行の研究において殊に有用である。これらの研究は、他の臨床試験モダリティ例えば診断映像化と組合せて、治療の最も適切な形態の選択に役立つ。

例えば、本発明の動物モデルを腫瘍映像化にかけると、臨床医は腫瘍増殖の一次及び二次両部位の確認及び動物上の腫瘍の全荷の評価を可能にされる。腫瘍映像化は動物に標識抗腫瘍抗体例えば放射性同位体で標識された抗体を注入し；抗体に腫瘍内で局在する時間を許し；次いで放射線検出器を用いて動物を走査することにより普通に行なわれる。コンピューターを動物の体中に検出された放射能の映像のコンパイルに使用するときコンピューターは放射線の強度に従って映像をカラーコードすることができる。抗体又はその代謝物質の蓄積が予想されない体の領域中の高い放射能の帯域は腫瘍の存在の可能性を示す。

本発明の動物モデルはまた新抗腫瘍剤をスクリーニングして一次部位及び遠い転移部位における腫瘍に作用するか又は遠い転移の発生を防ぐそのような物質の能力を決定するために使用できる。該モデルはまた癌患者の腫瘍の個別化した化学的敏感性試験に有用であろう。

さらに本発明の動物モデルはヒト腫瘍疾患の進行に対するミトレーション(mitration)の効果の研究に有用である。これらの研究は健康な被験者に対する種々の欠失の実証衝撃を考えると殊に重要であることができる。

#### 実施例 I

ヒト腎臓から切除した腫瘍の組織の新外科試料を5匹の動物受容体の腎臓中へ移植した。腎細胞癌として病理学的に診断された組織試料は前記引き裂き操作により適当な大きさに調製した。

それぞれの麻酔したマウスを切開して胃に到達した。No 11小刀を用い、粘膜層に侵入しないように注意して胃壁中に切り口を作った。約0.5×0.2cmの腫瘍塊を受入れるに足る大きさのポケットを形成した。近似的にこの大きさの腫瘍を選び、ポケット中へ挿入し、切り口を7-0縫合糸を用いて閉じた。

この実施例の5匹のマウスは約3～4か月間生存し、他の点では異常がないと思われる。これらのマウスの胃の以後の外科切開は腫瘍が生着したことを証明した。

#### 実施例 II

ヒト結腸から取出され、結腸癌として病理学的に診断されたヒト組織の試料を前記切り裂き操作により適当な大きさに調製した。4～6週令の5匹の無胸腺マウスを移植のための動物受容体として選んだ。外科のための準備中にマウスをエーテルで麻酔した。

それぞれの麻酔したマウスを切開して結腸に到達した。腔のポケットを内腔に入らないように注意して漿膜筋層中に外科的に形成した。約0.5×0.2cmの選んだ腫瘍塊をポケット中へ挿入し、次いでそれを縫合で閉じた。

この移植外科を行なった5匹のマウス中の4匹は3～4か月間生存し、良好な健康であると思われる。組織移植の約1か月後にマウスを外科的に切開し、腫瘍が生着したことが観察された。腫瘍はいずれも、このとき他の器官に転移しなかったと思われる。

本発明は平明な理解のために例示及び実施例によって若干詳細に記載されたけれども、一定の変更及び改変を請求の範囲内で行なうことができることは明らかであろう。

4～6週令の5匹の無胸腺ムードマウスを移植のための動物受容体として選んだ。外科のための準備中にマウスをエーテルで麻酔した。各動物中に切開を行ない腎臓に到達した。各受容体腎臓の腎皮質の切除によりくさび状腔を形成し、約0.5×0.2cmの腫瘍組織の塊を欠損腔中に置いた。次いでマットレス縫合を用いて移植組織を適所に確保した。

この実施例の5匹のマウスはその後なお6か月間生存している。組織移植の約1か月後にマウスを外科的に切開し、移植腫瘍を観察した。各事例において腫瘍が生着したと認められた。これは移植腫瘍組織が隣接組織に浸潤したことを意味する。このとき、組織学的分析を組織移植片で行なった。そのような分析には各動物から組織試料を取出し、試料を組織供与体の組織試料と比較することが含まれた。

組織学的分析に対する組織試料の調製は、(1) 試料をホルマリン中で固定し；(2) 固定した試料をパラフィン中に埋め；(3) 固定し埋めた試料の5ミクロンの切片を調製し；(4) 切片をヘマトキシリン及びエオシンで染色し；(5) 各切断面中の組織構造を顕微鏡的に観察することにより行なった。

組織学的分析は、受容体動物中の組織が(1) その構造及び組織型を保持し、(2) ヒト供与体中の疾患の進行によく似ていることを示した。

#### 実施例 II

胃から切除し、胃癌として病理学的に診断されたヒト組織の試料を前記切り裂き操作により適当な大きさに調製した。

4～6週令の5匹の無胸腺ムードマウスを移植のための動物受容体として選んだ。外科のための準備中にマウスをエーテルで麻酔した。

手続補正書(方式) 4.2.17 平成 年 月 日

国際調査報告 PCT/US 89/04414

特許庁長官 深沢 亘 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第510569号 (PCT/US89/04414)

2. 発明の名称 ヒト疾患に対する動物モデル

3. 補正をする者 事件との関係 出願人

名称 アンチキanser インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 電話(代)3211-8741

氏名(5995) 井理士 中 村 秘

5. 補正命令の日付 平成4年1月21日

- 6. 補正の対象 (1)特許法第184条の5第1項の規定による書面の出願人の欄 (2)代理権を証明する書面 (3)明細書及び請求の範囲の翻訳文

7. 補正の内容 別紙のとおり

方式 審査 佐藤

明細書及び請求の範囲の翻訳文の浄書(内容に変更なし)

International Application No. PCT/US 89/04414. I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER. II. FIELDS SEARCHED. III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT. IV. CERTIFICATION. 14 December 1989. ISA/US. Signature of Authorizing Officer: J. Chamberlain, J. Chamberlain.

Table with 3 columns: Category, Citation of Document, and Page(s) to Claim No. Rows include Cancer Research (Baltimore, USA) and Journal of National Cancer Institute (Bethesda, USA).

Attachment to PCT/ISA/210 Part II. Fields Searched

SEARCH TERMS:

nude mice, transplant, implantation site, tumor, metastasis athymic mice, review, inventors' names.