

反応性代謝物および免疫・炎症関連因子を考慮した  
フェニトイン誘導性肝障害発症機序に関する研究

佐々木 永太

2015年 1月

# 博士論文

## 反応性代謝物および免疫・炎症関連因子を考慮した フェニトイン誘導性肝障害発症機序に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

創薬科学専攻

薬物代謝安全性学研究室

学籍番号:1229012007

氏名:佐々木 永太

主任指導教員:中島 美紀

# 目次

略語	1
第I章 序論	5
第II章 フェニトイン (DPH) 誘導性肝障害モデルマウスの作製および 免疫・炎症関連因子の発現変動解析	13
第1節 緒言	13
第2節 実験材料および方法	17
II-2-1 試薬	17
II-2-2 動物への処置および生体材料の調製	18
II-2-3 肝臓中 GSH および GSSG 含量測定	20
II-2-4 肝臓中カルボニル化タンパク質含量の測定	21
II-2-5 血漿中 HMGB1、IL-1 $\beta$ および IL-17 タンパク質濃度測定	22
II-2-6 総 RNA 抽出および逆転写反応	22
II-2-7 リアルタイム PCR による mRNA 発現量解析	22
II-2-8 病理組織学解析	24
II-2-9 統計学的解析	25
第3節 実験結果	25
II-3-1 DPH 単回投与 24 時間後の血漿中 ALT ならびに AST 値の測定	25
II-3-2 DPH5 日間反復投与時の血漿中 ALT 値の経時的変化および 病理学的解析	25
II-3-3 DPH および BSO 投与が肝臓中 GSH および GSSG 含量に及ぼす影響	27
II-3-4 肝臓中カルボニル化タンパク質含量の変動	28
II-3-5 CYP 阻害剤併用処置が DPH 誘導性肝障害発症に与える影響	28
II-3-6 CYP 阻害剤併用処置が肝臓中 GSH 含量の低下に与える影響	29
II-3-7 肝臓中の自然免疫関連因子の解析	30
II-3-8 血漿中 HMGB1 タンパク質濃度の解析と抗 HMGB1 抗体または TLR4 アンタゴニストが DPH 誘導性肝障害に与える影響	33
II-3-9 肝臓中の Th 細胞関連因子およびケモカイン mRNA 発現量解析	34

II-3-10	血漿中 IL-17 タンパク濃度の測定ならびに抗 IL-17 抗体処置が DPH 誘導性肝障害に与える影響	36
II-3-11	肝臓中 MPO 陽性細胞数の変化	37
II-3-12	PGE <sub>1</sub> 処置が DPH 誘導性肝障害に与える影響	38
第 4 節 考 察		40
第 III 章 DPH 誘導性肝障害モデルマウスにおけるチオール抱合体の検出と肝障害発症における CYP 代謝の関与		49
第 1 節 緒 言		49
第 2 節 実験材料および方法		52
III-2-1	試薬	52
III-2-2	動物の処置および生体材料の調製	53
III-2-3	DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁中 GSH 抱合体および血漿中 Cys または NAC 抱合体の分析	53
III-2-4	血漿中 DPH ならびに代謝物濃度測定	54
III-2-5	肝ミクロソーム画分におけるミダゾラムおよびトルブタミド水酸化酵素活性測定	55
III-2-6	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロットティング	55
III-2-7	統計学的解析	56
第 3 節 実験結果		56
III-3-1	DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁中チオール抱合体の検出および構造推定	56
III-3-2	DPH 誘導性肝障害モデルマウスの血漿中チオール抱合体の検出および構造推定	57
III-3-3	DPH と代謝物の血漿中濃度推移	60
III-3-4	ABT 併用処置による血漿中 ALT 値推移および肝臓中 GSH 含量の変化	61
III-3-5	ABT 併用処置による DPH 代謝プロファイルの変化	62
III-3-6	DPH 誘導性肝障害に対する KTZ 併用処置の影響	63
III-3-7	KTZ 処置が肝ミクロソーム画分における CYP 酵素活性に与える影響	64

III-3-8	肝ミクロソーム画分における Cyp2c および Cyp3a タンパク質発現量 および酵素活性の測定	66
III-3-9	PB 前処置が DPH 誘導性肝障害発症に与える影響	67
第 4 節	考 察	68
第 IV 章	総 括	75
謝 辞		77
参考文献		78
論文目録		91

## 略 語

本論文では以下の略語を使用した。

## 試 薬

略号	英名	和名
ABT	1-aminobenzotriazole	1-アミノベンゾトリアゾール
APAP	acetaminophen	アセトアミノフェン
BSO	L-buthionine ( <i>S,R</i> )-sulfoximine	L-ブチオニン ( <i>S,R</i> )-スルフォキシミン
DEPC	diethylpyrocarbonate	ジエチルピロカーボネート
DNP	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-ジニトロフェニルヒドラジン
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)
DPH	diphenylhydantoin	フェニトイン (ジフェニルヒダントイン)
DW	distilled water	蒸留水
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	グリコールエーテルジアミン四酢酸
KTZ	ketoconazole	ケトコナゾール
MDZ	midazolam	ミダゾラム
NADP <sup>+</sup> (H)	nicotinamide adenine dinucleotide oxidized (reduced) form	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphates	デオキシリボヌクレオチド三リン酸
1'-OH MDZ	1'-hydroxymidazolam	1'-ヒドロキシミダゾラム
4-OH MDZ	4-hydroxymidazolam	4-ヒドロキシミダゾラム
4-OH TOL	4-hydroxytolbutamide	4-ヒドロキシトルブタミド
PB	phenobarbital	フェノバルビタール
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
SDS	sodium dodecylsulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
TOL	tolbutamide	トルブタミド
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	トリスヒドロキシメチルアミノメタン

## 薬物代謝酵素および薬物代謝解析機器関連

略号	英名	和名
CAR	constitutive androstane receptor	構成的アンドロスタン受容体
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
Cys	cysteine	システイン
DPH-glu	DPH <i>N</i> -glucuronide	フェニトイン <i>N</i> -グルクロン酸抱合体
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
4'-HPPH	4'-hydroxy DPH	4'-ヒドロキシフェニトイン
4'-HPPH- - <i>O</i> -glu	4'-HPPH <i>O</i> -glucuronide	4'-ヒドロキシフェニトイン <i>O</i> -グルクロン酸抱合体
GS-	glutathione conjugated	グルタチオン抱合体
GST	glutathione <i>S</i> -transferase	グルタチオン転移酵素
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析
NAC-	<i>N</i> -acetylcysteine conjugated	<i>N</i> -アセチルシステイン抱合体
PXR	pregnane X receptor	プレグナン X 受容体
UGT	UDP-glucuronosyltransferase	UDP-グルクロン酸転移酵素

## 血液生化学的検査項目

略号	英名	和名
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
T.Bil	total bilirubin	総ビリルビン

## 酸化ストレス関連

略号	英名	和名
GR	glutathione reductase	グルタチオン還元酵素
GSH	reduced glutathione	還元型グルタチオン
GSSG	oxidized glutathione	酸化型グルタチオン
Nrf2	NF-E2-related factor 2	NF-E2 関連因子 2
ROS	reactive oxygen species	活性酸素種
SOD	superoxide dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ

## 免疫および炎症関連因子

略号	英名	和名
DAMPs	damage-associated molecular pattern molecules	傷害関連分子パターン
Foxp3	forkhead box p3	フォークヘッドボックスタンパク 3
GATA3	GATA-binding protein 3	GATA 結合タンパク 3
HLA	human leukocyte antigen	ヒト白血球抗原
HMGB1	high-mobility group box 1	高移動度グルーブタンパク質 1
IFN	interferon	インターフェロン
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IL	interleukin	インターロイキン
KC	Kupffer cell	クッパー細胞
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
MCP1	monocyte chemoattractant protein 1	単球走化性タンパク質 1
MIP2	macrophage inflammatory protein 2	マクロファージ炎症性タンパク質 2
MPO	myeloperoxidase	ミエロペルオキシダーゼ
RAGE	receptor of advanced glycation endproducts	終末糖化産物受容体
ROR	retinoic acid-related orphan receptor	レチノイド関連オーファン受容体
T-bet	T-box expressed in T cells	転写因子 T-bet
Th	helper T cell	ヘルパーT細胞
Treg	regulatory T cells	制御性 T 細胞
NALP3	NACHT-, LRR- and PYD-containing protein 3	PYD 含有 NLR ファミリータンパク 3
TLR	Toll-like receptor	Toll 様受容体
TGF	transforming growth factor	トランスフォーミング増殖因子
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

## その他

略号	英名	和名
ANOVA	analysis of variance	分散分析
cDNA	complementary	DNA 相補的 DNA
DILI	drug-induced liver injury	薬物誘導性肝障害
DNA	deoxyribo nucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FP	forward primer	フォワードプライマー
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
$\gamma$ -GTP	$\gamma$ -glutamyltransferase	$\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -glutamylcysteine synthetase	$\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素
HE	hematoxylin and eosin	ヘマトキシリン・エオシン
HRP	horseradish peroxidase	西洋わさびペルオキシダーゼ
LD	lethal dose	致死量
mRNA	messenger RNA	伝令 RNA
ND	not detected	不検出
NS	not significant	有意差なし
NT	non-treated	無処置
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PVDF	polyvinylidene difluoride	2 フッ化ポリビニリデンフルオリド
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RP	reverse primer	リバースプライマー
RT	reverse transcription	逆転写
SEM	standard error of the mean	標準誤差

## 第 I 章 序 論

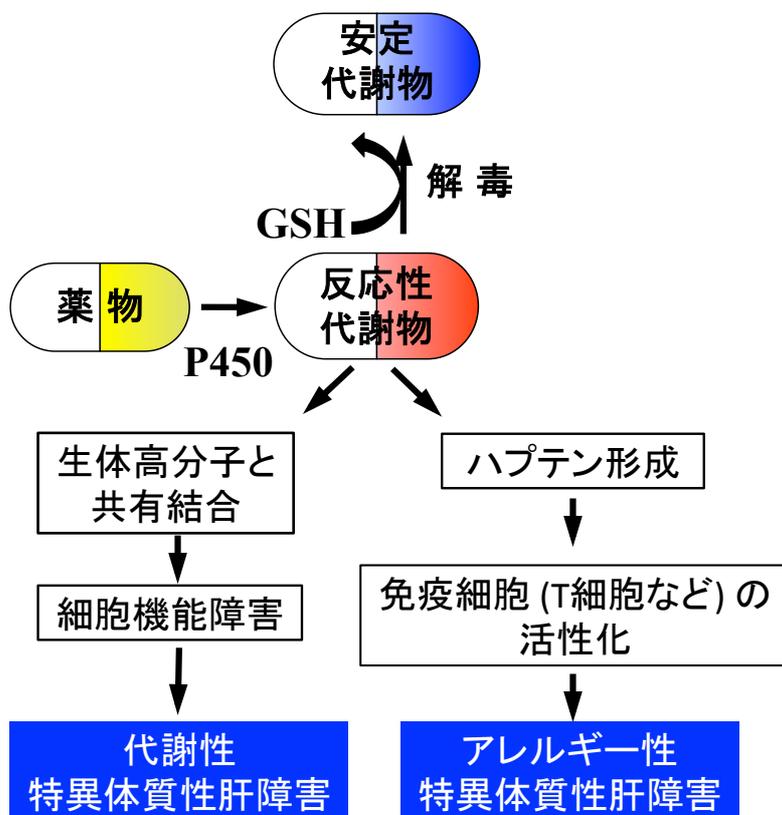
医薬品開発において、安全性の問題により開発が中止される事例は増加する傾向にある (Qureshi et al, 2011)。市販後および臨床段階における副作用発現は、患者への負担ならびに、医薬品の市場からの撤退を余儀なくされる事態につながるため、医薬品や候補化合物による毒性を早期に予測することが望ましい。

一般に薬物により惹起される副作用の多くは、投与用量依存的に認められ、かつ多くの場合は正常動物での再現が可能な中毒性の機序で発現する。このような中毒性の薬物障害は上市前の非臨床試験および臨床試験で検出可能である。また、毒性試験で再現が可能であり、毒性発現が用量依存的なことから、その毒性が発現する用量と血漿中濃度や薬効が発現する用量と血漿中濃度との間に十分な乖離があることを確認することで、臨床において重度な副作用が発現することを回避することが可能である。このような中毒性の薬物障害の代表例としてアセトアミノフェン (APAP) が挙げられる。医薬品開発段階における非臨床試験においては特定の生理的特徴や、疾患をもたない正常動物が用いられているのに対し、上市後には、病態、性別、年齢、生活環境や薬物服用歴等が異なる多くのヒトにおいて服用される。特定の反応に人種差や個人差が認められることや、ヒトの多くの遺伝子に多型が存在することも近年明らかになってきている。このようなヒトにおける特定の生体反応における個人差は、非臨床試験で予測できない副作用の原因になっていると考えられている。このような薬物障害は、正常動物で容易には再現できず、用量依存的でないことから特異体質性 (idiosyncratic) の薬物障害とされている。特異体質性薬物障害の原因として、投薬された生体において何らかの機序により副作用が発現しやすい状態になっていることが考えられている。特異体質性薬物障害の特徴は、その発症に数週間から1年を要すること、投与用量非依存的に発症すること、正常動物で障害を再現することが困難であること等が臨床上の報告から明らかになっている (戸田, 1999)。また、その発症機序については不明な点が多く、なぜ特定のヒトにおいて発現するのかは不明であり、

現時点では特異体質性の薬物障害を予測することは非常に困難である。一方で、ルミラコキシブやフルクロキサシリンによる薬物性肝障害の感受性が、ヒト白血球抗原 (HLA) クラス II ハプロタイプに関連することが報告されており、HLA の遺伝子型を調べることで肝毒性のリスクがあるヒトを除外することができる可能性が示されている (Aithal and Daly, 2010)。しかし、HLA の遺伝子型と薬物障害との関連性のある薬物は限られていることから、HLA の遺伝子型を考慮するのみでは特異体質性の薬物障害を予測するには不十分と考えられる。

特異体質性の薬物障害に関しては、多くの総説が執筆されており、精力的な研究が行われている (Pirmohamed et al., 1996; Park et al., 2000; Utrecht, 2000; Deng et al., 2009)。薬物誘導性肝障害 (DILI) は医薬品開発の中止理由となる原因の一つであり (Wilke et al., 2007)、ブロモフェナク (1998 年)、トログリタゾン (2000 年) およびネファゾドン (2004 年) がその肝障害性により市場から撤退していることから、臨床および医薬品開発において重大な問題となっている。特異体質性の DILI は、代謝性およびアレルギー性機序に分類される (Fig. 1)。前者では、薬物が生体内で代謝され、反応性に富んだ代謝物が DNA やタンパクなどの生体高分子に結合して細胞死を引き起こし、後者では、薬物が直接あるいは、反応性代謝物が生体高分子と結合したものがハプテンとなり、免疫応答を引き起こすと考えられている。前者に関しては、グルタチオン (GSH) 等の求核剤や、放射標識された候補化合物と肝マイクロソーム画分を用いた *in vitro* トラッピング試験等により評価が行われている (Gan et al., 2005)。また、*in vivo* において GSH を枯渇させることにより、反応性代謝物による毒性発現に対する感受性を高めた動物モデルも報告されている。後者に関しては、リポ多糖 (LPS) を処置した免疫機能改変モデル動物による検討が行われており、生活環境における免疫活性化因子が特異体質性毒性の危険因子の一つになる可能性が示されている (Shaw et al., 2007; Tukov et al., 2007; Lu et al., 2012)。しかし、前者において、トラッピング試験のみでは免疫因子の影響を加味することが困難であり、後者においては、LPS 処置による検討では同一の機序による発症を想定したものであり、多くの薬物における多様な障害性を理解することは難しい。また、これまでに行われて

きた GSH を枯渇させた動物を用いた検討は、薬物の単回投与での検討であり (Shimizu et al., 2009; 2011; Nishiya et al., 2008)、薬物の長期暴露によって発症するヒトの特異体質性の DILI とは発症パターンが異なっていることや、反応性代謝物と免疫の両方を考慮した DILI 発症機序における包括的な理解がされていないことから、肝障害発症に重要となる因子は未だ不明瞭である。Fig. 1 に示すように、これらの発症機序の仮説にはいずれも反応性代謝物の生成過程が含まれている。したがって、正常動物での再現が困難な特異体質性の DILI の一部は、反応性代謝物をより多く生成するモデル動物、あるいは反応性代謝物の解毒が抑制されたモデル動物を用いることで、これらの毒性が再現可能になる可能性が考えられる。また、特異体質性の DILI を発症する薬物の一部は自身が薬物代謝酵素の誘導や阻害作用をもつことから (トログリタゾン、カルバマゼピン、フェニトイン)、長期投与により、反応性代謝物の生成量の変動し、DILI の発症に繋がる可能性が考えられる。

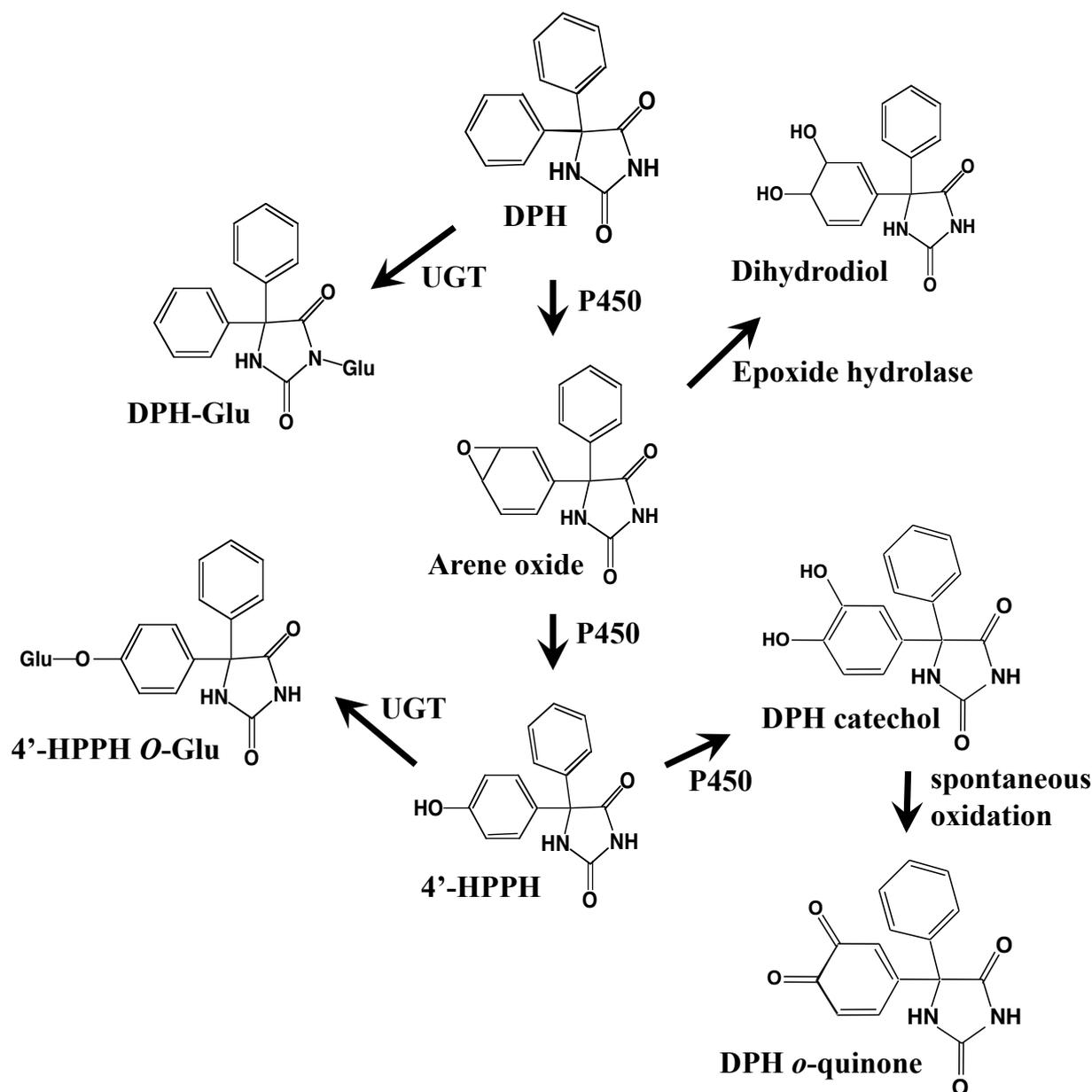


**Fig. 1. Proposed mechanisms of drug-induced toxicity induced by immunemediated or metabolic idiosyncrasy.**

当研究室ではこれまでに、DILI 発症に様々な免疫機構が関わっていることを、DILI モデルマウスを用いた検討で明らかにしてきた。特に注目すべきことは、DILI 時に肝臓中で認められる免疫応答の機構が薬物により異なっていることである。例えば、吸入麻酔薬として使用されてきたハロタンは、ヒトにおいて劇症肝炎を引き起こすことが知られている。Balb/c マウスを用いてハロタン誘導性肝障害発症機序を解析した研究で、インターロイキン (IL)-17 と呼ばれるサイトカインが増悪因子として関与していることを示した (Kobayashi et al., 2009)。一方で、甲状腺機能亢進症の治療薬として用いられるメチマゾールはごく少数の患者において肝障害を惹起させるが、Balb/c マウスを用いて肝障害発症機序を解析した結果、IL-4 が肝障害増悪因子として関与していることを明らかにしてきた (Kobayashi et al., 2012)。このことから、DILI 発症において関与する免疫因子は薬物により異なることが示された。さらに、興味深いことに、上記のハロタン誘導性肝障害モデル動物を、C57BL/6 マウスを用いて作製を試みたところ、肝障害が発症しないことが報告されている (Kobayashi et al., 2009)。ハロタンは cytochrome P450 (CYP) 2E1 によってトリフルオロ酢酸へと代謝され、生体高分子と結合することが知られている。しかし、肝障害を発症する Balb/c マウスと、肝障害を発症しない C57BL/6 マウス共に肝臓ホモジネートに対するトリフルオロ酢酸の結合量は同等であることが報告されている (You et al., 2006)。この結果は、ハロタン誘導性肝障害の感受性における系統差は、ハロタンの代謝的活性化よりも、免疫応答機構の差に起因するものであり、両系統がそれぞれ異なる免疫応答性を示すことが原因であると推察されている。これらの結果は、反応性代謝物の生成と、その生体高分子に対する共有結合能力のみならず、それに続く免疫応答も肝障害発症を左右する大きな役割を担っていることを示唆している。そのため、ヒトにおいて特異体質性の薬物誘導性肝障害を引き起こす薬物を用いて DILI モデル動物を作成し、DILI 発症の鍵となっている因子を薬物代謝および免疫の両方の視点から理解することが重要と考えられる。しかし、確立されている DILI モデル動物が少ないことから、その検証は充分とは言い難く、特異体質性とされている薬物障害モデル動物を作成し、発症機序を包括的に理解することが望まれている。

フェニトイン (diphenylhydantoin, DPH) は現在も広く使用されている抗てんかん薬である。DPH を投与された一部の患者において、薬疹やリンパ性浮腫ならびに発熱が認められ、それらの発症に伴い肝障害を発症することが報告されている (Dhar et al., 1974; Haruda, 1979; Taylor et al., 1984)。DPH による肝障害は、DPH 服用開始から 1-8 週間のうちに発症し、約 10,000 人に 1 人の割合で発症すると言われている (Mullick and Ishak, 1980)。このような発症状況から、DPH 誘導性肝障害は特異体質性肝障害に分類されている。臨床病理学的には、リンパ球の浸潤を伴う肝細胞壊死および変性が認められ、免疫応答を伴う肝障害と考えられる (Mullick and Ishak, 1980)。しかし、動物実験においてこれらの病態に類似した肝障害は、DPH の過剰投与によっても再現されていない (アレビアチン 医薬品インタビューフォーム, 2014)。

DPH 誘導性肝障害の発症機序は未だ解明されていないが、DPH から CYP2C9 および CYP3A4 により新電子性反応性代謝物が生成されることが *in vitro* 実験により示されている (Munns et al., 1997; Cuttle et al., 2000)。さらに DPH 代謝物と CYP2C9 との共有結合が *in vitro* で証明されていること、DPH 誘導性肝障害患者の血清に CYP2C9 に対する自己抗体が認められていることから (Leeder et al., 1992)、CYP による代謝的活性化の肝障害発症への関与が推察されている。DPH の主要代謝経路を Fig. 2 に示す。



**Fig. 2. Major metabolic pathways of DPH in humans.**

**Dihydrodiol:** 5-(3',4'-dihydroxy-1',5'-cyclohexadien-1-yl)-5- phenylhydantoin;

**UGT:** UDP-glucuronosyltransferase; **Glu:** glucuronide;

**4'-HPPH:** 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin;

**DPH catechol,** 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin;

**DPH *o*-quinone,** 5-(3,4-dioxocyclohexa-1,5-dien-1-yl)-5-phenylimidazolidine-2,4-dione;

**DPH-Glu,** DPH *N*-glucuronide; **4'-HPPH *O*-Glu,** 4'HPPH *O*-glucuronide.

ヒトおよびラットの主要代謝物である4'位水酸化体 DPH (5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin, 4'-HPPH) はヒトでは主に CYP2C9、ラットでは主に CYP2C11 によって生成される (Komatsu et al., 2000; Yamazaki et al., 2001)。4'-HPPH は、ベンゼン環の 3',4' 位エポキシド体 (5-{7-oxabicyclo[4.1.0]hepta-2,4-dien-3-yl}-5-phenylimidazolidine-2,4-dione, アレンオ

キシド体) を介して生成されるが、アレンオキシド体は非常に不安定であるため、ミクロソームタンパク質と共有結合を形成する。アレンオキシド体はエポキシドヒドロラーゼによって 5-(3,4-dihydroxycyclohexa-1,5-dien-1-yl)-5-phenylimidazolidine-2,4-dione (ジヒドロジオール体) へと代謝される。4'-HPPH は、さらにベンゼン環の 3'位が水酸化され、5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin (カテコール体) を形成する。このカテコール体は自然酸化され、不安定な親電子性中間体 (反応性代謝物) である 5-(3,4-dioxocyclohexa-1,5-dien-1-yl)-5-phenylimidazolidine-2,4-dione (*o*-キノン体) を生成し、タンパク質と共有結合を形成する (Munns et al., 1997)。4'-HPPH からカテコール体への反応も CYP 依存的であり、これらの反応性代謝物とタンパク質との共有結合は、GSH 等の親電子性物質によって阻害されることが、ヒト、ラットおよびマウス肝ミクロソーム画分 を用いた検討から明らかにされている (Munns et al., 1997; Roy and Snodgrass, 1988; 1990)。DPH および 4'-HPPH はそれぞれ *N*-または *O*-グルクロン酸抱合を受け、*N*- glucuronide (DPH-Glu) または 4'-HPPH *O*-glucuronide (4'-HPPH *O*-Glu) へと代謝されるが、いずれも安定代謝物であり毒性発現発現への関与は報告されていない。したがって、特定の肝障害患者においては GSH 等の生体防御機能の低下によって、反応性代謝物の生成と生体防御機構のバランスが崩れることにより、共有結合体の生成量が増加し、肝障害に至りやすいと推察される。この仮説に基づけば、正常ラットおよびマウスにおいても、同様に反応性代謝物が生じているものの、反応性代謝物に対する防御機構が保たれている結果、特定のヒトで認められるような肝障害が再現されないものと考えられる。ラット等のげっ歯類は、肝臓における GSH 含量およびその抱合反応を触媒する GSH 転移酵素 (GST) 活性が、ヒトのそれぞれ 4 倍および 20 倍と非常に高いことから (Grover and Smis, 1964; Eoodhouse et al., 1983; Watanabe et al., 2003)、正常マウスやラットを用いた場合、ヒトを想定した反応性代謝物による毒性が、非臨床試験において検出できない可能性がある。ただし、これらの仮説は、*in vitro* での研究結果に基づくものであり、*in vivo* で DPH あるいは、その反応性代謝物の肝障害発症における役割を検討した報告はほとんどない。

また、先に述べたように DPH 誘導性肝障害患者において、好酸球増多、発熱および発疹などのアレルギー症状を伴っていることから、代謝的活性化のみならず免疫機序の関与も考え得る。しかし、これまでの DPH の肝障害に関する研究では、*in vitro* による検討がほとんどであることから、実際に肝障害発症に代謝的活性化および免疫が関与しているか十分な解析は行われていない。

本研究では、特異体質性 DILI を引き起こす DPH を用いて肝障害モデル動物を作成し、その発症機序を代謝的活性化と免疫の両視点から解明することを目的とした。DPH をはじめ多くの特異体質性の DILI は、薬物の反復投与によって肝障害を発症することから、反復投与によって発症する原因を考察した。また、いくつかの DILI においては GST 分子種 GST-M1 および GST-T1 の両欠損者で発症頻度が有意に高いこと (Ueda et al., 2007; Watanabe et al., 2003) が言われており、特異体質性肝障害への GSH の関与が示唆されている。GSH は DPH をはじめ、多くの反応性代謝物の解毒に関わり加齢や生活習慣によって生体内濃度が変動しやすいことから、医薬品を服用する多くの患者のうち特定のヒトにおいて GSH 含量が低下していることを想定することができる。したがって、特異体質性の DILI 発症機序を理解する上で、GSH は重要な因子であると考えられる。本研究では、免疫学の研究で頻用されているマウスを用いて DPH 誘導性肝障害モデル動物の作成を行い、自然免疫応答の惹起から獲得免疫による炎症反応誘起に至るまでの免疫・炎症関連因子の mRNA 発現量を経時的に解析した。また、DPH 誘導性肝障害モデルマウスにおける DPH の薬物代謝変動と反応性代謝物の生成に着目し、肝臓中 CYP 酵素活性および血漿中 DPH ならびに代謝物濃度を経日的に解析し、DPH 代謝プロファイル、CYP 代謝、CYP 誘導と肝障害発症との関連について考察した。

## 第 II 章 DPH 誘導性肝障害モデルマウスの作製および 免疫・炎症関連因子の発現変動解析

### 第 1 節 緒言

DPH は現在も広く使用されている抗てんかん薬であるが、稀に重篤な発疹、発熱および肝障害を発症する (Dhar et al., 1974; Haruda et al., 1979)。DPH による特異体質性肝障害の発症機序は不明であるが、これまでに、CYP による代謝的活性化に続く親電子性反応性代謝物の生成とタンパク質との共有結合体形成が報告されており、この現象が免疫機構を活性化させ、肝障害を発症させる原因となっていると考えられている (Munns et al., 1997; Roy and Snodgrass, 1988)。この共有結合体の形成は、求核性物質である GSH や Cys の存在により抑制される。したがって、DPH の親電子性代謝物の解毒に GSH などのチオールが関与していることが推測される。しかし、DPH の GSH 抱合体は同定されていないことや、GSH が DPH 誘導性肝障害発症に与える影響を検討した報告はなく、肝障害発症に GSH や DPH の代謝的活性化が関与しているかは不明である。また、ヒトにおいて DPH 誘導性肝障害の発症には、1-8 週間を要することから (Mullick and Ishak, 1980)、DPH 誘導性肝障害発症には DPH の反復投与が必要であると考えられるが、その原因も不明である。このように、DPH は *in vivo* において肝障害を再現することが困難であったことから、肝障害発症機序はほとんど明らかにされていない。したがって、上記の代謝的活性化および免疫因子を考慮した肝障害発症機序を説明するには、DPH 誘導性肝障害モデルの作成が必要である。

肝臓には Kupffer 細胞に加え、T 細胞、NK 細胞など、多様な免疫細胞が存在しており、自然免疫機構ならびに獲得免疫機構を構成している (Winnock et al., 1995; Tiegs et al., 1992)。Kupffer 細胞は消化管から門脈を介して流入した異物、例えば病原性微生物、細胞破砕物、ヘムおよびリポ多糖 (LPS) などを捕捉する。とくに LPS をはじめとするエンドトキシンは

Kupffer 細胞の重要な活性化因子のひとつであるとされている (Bilzer et al., 2006)。活性化された Kupffer 細胞はサイトカインおよびケモカインなどの様々な免疫制御メディエーターを放出し、肝細胞死に続発する炎症細胞浸潤と肝細胞ネクロシスに関与すると考えられている。このエンドトキシンや細胞破砕物による Kupffer 細胞活性化機構は明らかにされている。近年、エンドトキシンや病原性微生物のみならず、high mobility group box protein1 (HMGB1) をはじめとする多くの細胞由来のタンパク質も、Kupffer 細胞の活性化を行うことが明らかになってきた (Bianchi et al., 2007; Scaffidi et al., 2002)。Kupffer 細胞の活性化機序は、HMGB1 やエンドトキシン等の Kupffer 細胞活性化物質が Kupffer 細胞の細胞膜表面に存在する Toll 様受容体 (TLR) を介して、サイトカイン産生を促すことで、Kupffer 細胞を活性化させることとされている (Schwabe et al., 2006)。この TLR シグナルを介し、Kupffer 細胞やマクロファージの活性化を行う物質を、傷害関連分子パターン (damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs) と言う。前述したように、DAMPs には外来物質のみならず、HMGB1 をはじめとする細胞含有タンパク質等も含まれており、病原菌の暴露のみならず、壊死組織においても免疫細胞の活性化が即され、組織傷害が重篤化することを意味している。とりわけ HMGB1 においては、DILI 発症への関与が研究されており、APAP 誘導性肝障害モデルマウスにおいて、肝障害増悪因子として寄与していることが知られている (Antonine et al., 2009)。

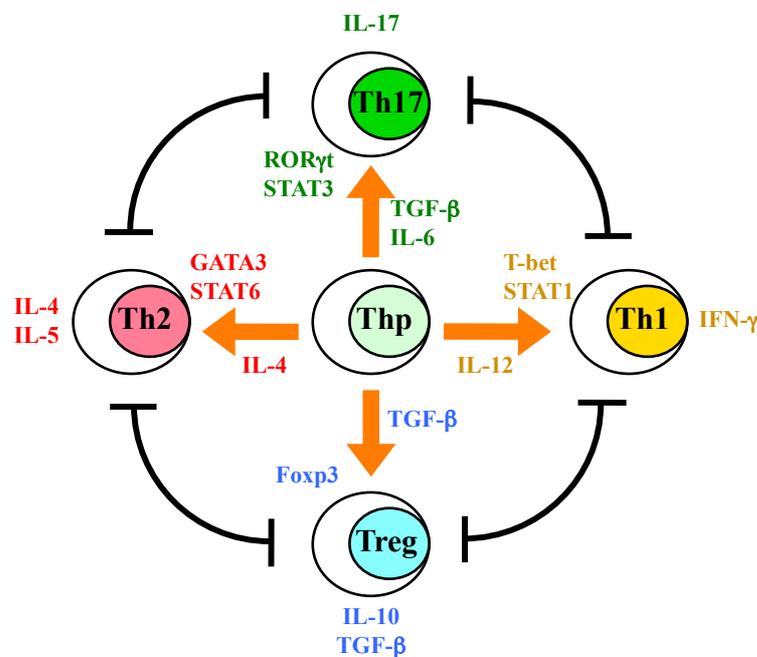
一方で、もう一つの自然免疫活性化機構として、NLR family, pyrin domain containing 3 (NALP3) インフラマソームの関与が報告されている。NALP3 インフラマソームは尿酸結晶、バクテリア RNA や ROS により活性化を受け (Church et al., 2008; Bryant and Fitzgerald, 2009; Martinon et al., 2009)、カスパーゼ 1 を活性化する (Latz, 2010; Schroder and Tschopp, 2010)。その結果未成熟型 IL-1 $\beta$  および IL-18 タンパク質が切断を受け、成熟型タンパクが産生される。NALP3 インフラマソームの DILI 発症への関与は APAP 誘導性肝障害モデルマウスを用いた検討で示されている (Williams et al., 2011)。また、IL-1 $\beta$  はジクロフェナク誘導性肝障害において、その発症に関与していることがマウスモデルを用いた研究で報告されており (Yano et al.,

2012)、NALP3 インフラマソームの DILI への関与は、DILI の発症機序を解析する上で興味深い。このことから、DILI において、TLR および NALP3 インフラマソーム活性化を介した自然免疫機構はその発症機序を理解するうえで重要と考えられる。

上記のようなさまざまな機構により産生されたサイトカインは傷害部位に炎症細胞を誘引する。誘引された炎症細胞は傷害された肝細胞の除去に働くが、この過程で病変周囲の正常な肝細胞も傷害される可能性がある。とくに、ウイルスや毒性化学物質などの場合、それ自体による肝細胞の傷害に加え、炎症細胞による傷害作用も大きいとされている (Ramadori and Armbrust, 2001)。MCP-1 および MIP-1 は単球の遊走因子であり、好中球や好塩基球などの炎症細胞を傷害部位に呼び寄せ、抗原の除去ならびに殺菌を行う (Hsieh et al., 2008)。この際に、傷害部位のみならず、周囲の正常肝細胞に対しても死滅および消化作用を示し、結果的に傷害部位の拡大に繋がると考えられ、免疫反応が関与する肝障害においては、好中球が直接的な組織傷害因子として寄与が大きいことが知られている (Ramalah and Jaescke, 2007)。

Kupffer 細胞をはじめとする自然免疫細胞による炎症作用は一過性であり、APAP 誘導性肝障害モデルマウスを用いた検討でも、Kupffer 細胞による自然免疫機構が急性肝障害に深く関わっていることが明らかにされている (Fisher et al., 2013)。特異体質性 DILI の場合、肝障害と併発して、発熱、好酸球増多ならびに発疹などのアレルギー様症状を伴うことも少なくない。DPH もその例外ではなく、肝障害発症患者のほとんどが、これらのアレルギー様症状を呈することが報告されている (Dhar et al., 1974; Haruda, 1979)。このようなアレルギー性の特異体質性 DILI には Kupffer 細胞などの自然免疫細胞のみならず、T 細胞等の獲得免疫系の細胞による免疫機構が関与していると言われている (Adams et al., 2010)。T 細胞のうち CD4+CD8-を細胞膜上に抗原として発現している細胞を、とくにヘルパー T (Th) 細胞と呼び、ヒトにおいてさまざまなタイプの肝障害発症に関わる重要な調節因子である。前駆体ヘルパー T 細胞は Fig. 3 に示すように特定のサイトカインおよび、特定の転写調節因子によって Th1, Th2, 制御性 T (T-reg)、および Th17 細胞に分類される (Kidd, 2003; Zhu and Paul, 2008)。Th1 細胞は転写因

子として T-box expressed in T cels (T-bet) が必要であり、インターフェロン (IFN)- $\gamma$  を分泌する。Th2 細胞は転写因子として GATA 結合ドメイン 3 (GATA3) を必要とし、IL-4 および IL-5 を産生する。Th17 細胞は IL-17 および IL-23 を分泌し、転写因子としてレチノイド関連オーファン受容体 (ROR) $\gamma$ t を必要とし、T-reg 細胞は、IL-10 およびトランスフォーミング因子 (TGF)- $\beta$  を分泌し、Foxp3 を転写因子として必要とする。実験動物を用いた DILI に関する研究で、IFN- $\gamma$  の関与が APAP (Ishida et al., 2002)、IL-4 の関与がジクロキサシリンおよびメチマゾール (Higuchi et al., 2011; Kobayashi et al., 2012)、IL-17 の関与がハロタンおよびカルバマゼピンによる肝障害モデルマウスを用いた解析 (Kobayashi et al., 2009; Higuchi et al., 2012) からそれぞれ報告されている。いわゆるアレルギー様症状を伴う DILI は症状が長期化することなどから、Th 細胞による長期的な免疫機構が肝障害の増悪に関与しているものと考えられる。以上を踏まえると、DILI 発症機序を体系的に理解するには、肝臓傷害部位からの DAMPs の放出とそれに続く、Kupffer 細胞の活性化ならびに、分泌されたサイトカインによる Th 細胞の活性化を総合的に評価することが必要であると考えられる。



**Fig. 3. Differentiation mechanism of CD4+ Th cells subsets.**

本章では肝障害発症機序を解明するため、はじめに DPH 誘導性肝障害モデルマウスの作製を行った。先に述べたように *in vitro* の研究から GSH が DPH の反応性代謝物と生体タンパク質との共有結合を減弱させることが示されていることから、GSH 合成の律速酵素である  $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素 ( $\gamma$ -GCS) の特異的阻害剤である L-buthionine (*S,R*)-sulfoximine (BSO) を用いて GSH 低下が DPH 誘導性肝障害に及ぼす影響を検討した。肝障害発症における自然免疫および獲得免疫の関与を検討するため、肝臓中の免疫および炎症関連因子 mRNA 発現量を解析した。また、mRNA 発現解析により得られた結果から肝障害に寄与していると推測された因子を中和抗体または阻害剤を用い、その機能を阻害することで肝障害発症に対する直接的な影響を検討した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### II-2-1 試薬

DPH、*S*-メフェニトインおよび BSO は和光純薬工業 (大阪) から購入した。1-aminobenzotriazole (ABT) は東京化成工業 (茨城) より購入した。RNAiso、ランダムヘキサマー、SYBR Premix Ex Taq はタカラバイオ (滋賀) より、ReverTra Ace は東洋紡 (大阪) より購入した。TLR4 拮抗剤であるエリトランはエーザイ株式会社より供与いただいた。プロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) は日本ケミファ (東京) から購入した。プライマーは北海道システムサイエンスに合成を依頼した。ニワトリ抗 HMGB1 ポリクローナル抗体およびコントロール用グロブリン (Ig)Y はシノテスト (東京) から購入し、ラット抗マウス IL-17 抗体ならびにコントロール用 IgG2a は R&D system (Minneapolis, MN, USA) より購入し、Envision<sup>+</sup> for mouse およびウサギ抗ミエロペルオキシダーゼ (MPO) ポリクローナル抗体はダコ・ジャパン (東京) より購入した。IL-1 $\beta$  ならびに IL-17 タンパク濃度の測定に用いた ELISA は eBioscience (San Diego, CA, USA) から購入した Ready-SET-GO! Mouse IL-1 $\beta$  および IL-17 をそれぞれ用い、血漿中 HMGB1 タン

パク濃度の測定には、HMGB1 ELISA Kit II (シノテスト) を用いた。その他の試薬は全て特級または生化学用のものを用いた。本章で使用した溶液の組成を以下に示す。

#### 生理食塩水

塩化ナトリウムの最終濃度が 0.9%になるように精製水を加え、121°C で 20 分間オートクレーブ処置し、実験に供した。

#### ジエチルピロカルボネート (DEPC) 処理精製水

DEPC の最終濃度が 0.1%になるように精製水を加え、37°C で 2 時間加温した。その後、121°C で 20 分間オートクレーブ処置し、実験に供した。

#### 10 × リン酸緩衝液 (PBS)

塩化ナトリウム 80 g、塩化カリウム 2 g、リン酸水素二ナトリウム (12 水和物) 29 g、リン酸水素二カリウム 2 g に精製水を加え、全量を 1 L とした後、121°C で 20 分間オートクレーブ処置した。使用に際しては、精製水で 10 倍希釈し、1 × PBS とし、実験に供した。

### II-2-2 動物への処置および生体材料の調製

8 週齢の雄性および雌性 C57BL/6J マウスおよび雌性 Balb/c マウスは日本 SLC より購入した。マウスは、水および標準飼料を自由に摂取させ、12 時間の明暗サイクル中、一定温度 ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) ならびに一定湿度 ( $55 \pm 20\% \text{RH}$ ) の条件で飼育した。

単回投与の検討では、雌性の C57BL/6J マウスにコーン油 (10 mL/kg) に溶解した DPH を 50, 100 および 200 mg/kg で経口または腹腔内投与した。投与量はマウスにおける DPH の  $\text{LD}_{50}$  が 367 mg/kg であることを考慮して (アレビアチン 医薬品インタビューフォーム, 2014)、その約半分を最大投与量として設定した。DPH 投与 1 時間前に、生理食塩水 (10 mL/kg) に

溶解した BSO (700 mg/kg) を腹腔内投与した。BSO の用量ならびに投与方法は、既報 (Shimizu et al., 2009) を参考に設定した。DPH 投与 24 時間後にエーテル麻酔下、血液を後部腹大静脈から採血し、その後肝臓を摘出した。血漿を分離し、ALT ならびにアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) 値を Dri-Chem 4000 (富士フィルム) を用いて測定した。

5 日間反復投与の検討では、雌性 Balb/c マウスならびに雄性および雌性 C57BL/6 マウスにコーン油 (10 mL/kg) に溶解した DPH を 50 mg/kg で 2 日間反復腹腔内投与した。その後、反復投与 3 日目からは、コーン油 (10 mL/kg) に溶解した DPH を 100 mg/kg で 3 日間反復経口投与した。また、各 DPH 投与 1 時間前に、生理食塩水 (10 mL/kg) に溶解した BSO (700 mg/kg) を腹腔内投与した。溶媒対照群として、それぞれコーン油および生理食塩水を投与した。本稿では、特に断りがない限りこの投与方法により作成した肝障害モデルを DPH 誘導性肝障害モデルマウスと定義した。また、BSO ならびに DPH 投与の代わりに溶媒を投与とした対照群を設定した (DPH 単独投与群、BSO 単独投与群)。なお、DPH の同効薬で構造類自体である *S*-メフェニトインは肝障害報告が少ないことから (Zimmerman, 1999)、薬理作用による肝障害への影響を検討する目的として、メフェニトインにおいても反復投与の検討を行った。BSO、メフェニトインの溶解方法ならびに投与方法は、DPH 誘導性肝障害モデルマウスと同様に行った。DPH 反復投与開始 4 日目までは、DPH 投与から 0 ならびに 6 時間後に尾静脈から採血した。DPH 反復投与 5 日目 (DPH 最終投与時) では、DPH 投与から 0, 6, 24 ならびに 48 時間後に尾静脈から採血した。DPH 最終投与から 72 時間後に、エーテル麻酔下、後部腹大静脈から採血し、その後肝臓を摘出した。血漿を分離し、ALT、AST ならびに総ビリルビン (T.Bil) 値を Dri-Chem 4000 を用いて測定した残った肝臓サンプルは -80°C で凍結保存した。

DPH による GSH 含量低下におよぼす CYP 活性阻害の影響の検討においては、DPH 誘導性肝障害モデルマウス作製プロトコールに加え、ABT 100 mg/kg を DPH 最終投与 1 時間前に腹腔内投与した。ABT は生理食塩水に溶解させ、投与量は Shimizu ら (2009) の報告に準拠した。ABT の対照群としては、生理食塩水を処置した群を置いた。また、各種阻害剤 (ABT お

よび BSO) ならびに DPH 投与を、溶媒投与として置き換えた対照群を設定した (ABT 単独投与群、DPH 単独投与群、DPH/ABT 投与群、DPH/BSO 投与群)。顕著な ALT 値の上昇が認められる DPH 最終投与から 24 時間後に剖検、血漿中 ALT 値測定ならびに肝臓採取を行った。採取した肝臓は GSH 含量測定まで、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。

HMGB1 中和抗体併用処置の検討では、DPH 最終投与と同時に、抗 HMGB1 ポリクローナル抗体をリン酸緩衝液 (PBS) に溶解させ、 $200\ \mu\text{L}/\text{mouse}$  で静脈内投与した。抗体投与のタイミングは血漿中 HMGB1 タンパク濃度の結果をもとに設定した。コントロール群は、IgY 抗体を同様に  $200\ \mu\text{L}/\text{mouse}$  で静脈内投与した。TLR4 阻害剤処置の検討では、DPH 最終投与と同時に、エリラン  $50\ \mu\text{g}/\text{mouse}$  を静脈内投与した。エリランは生理食塩水に溶解させ ( $200\ \mu\text{L}/\text{mouse}$ )、投与量は既報 (Higuchi et al., 2012) に従って設定し、投与のタイミングは自然免疫因子の mRNA 発現量解析の結果をもとに設定した。IL-17 中和抗体併用投与の検討では、DPH 最終投与から 3 時間後にラット抗マウス IL-17 抗体を  $100\ \text{mg}/\text{mouse}$  で静脈内投与した。中和抗体は PBS に溶解させ ( $200\ \mu\text{L}/\text{mouse}$ )、対照群として、ラット IgG2a 抗体を同様の方法で投与した群を置いた。PGE<sub>1</sub> 併用処置の検討では、生理食塩水に溶解させた PGE<sub>1</sub> ( $500\ \mu\text{L}/\text{mouse}$ ) を DPH 最終投与から 3 時間後に  $50\ \text{mg}/\text{mouse}$  で腹腔内投与した。抗 HMGB1 抗体、エリラン、抗 IL-17 抗体ならびに PGE<sub>1</sub> 併用処置の実験においては、いずれも DPH 最終投与から 24 時間後に剖検、血漿中 ALT 値測定ならびに肝臓採取を行った。本実験におけるすべての動物実験は金沢大学動物実験指針に従って実施した。

### II-2-3 肝臓中 GSH および GSSG 含量測定

Tietze (1969) の方法を一部改変して、以下のように GSH および GSSG 含量を測定した。マウス肝臓約  $100\ \text{mg}$  に対して 5% スルホサリチル酸  $1\ \text{mL}$  を加え、ガラスホモジナイザーを用いて氷上でホモジナイズし、 $8,000\ \text{g}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心分離し、上清を得た。96 ウェルプレートの各ウェルに  $0.3\ \text{mM}$   $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 溶液を  $140\ \mu\text{L}$  お

よび 4.8 mM 5,5-ジチオビス 2-ニトロ安息香酸 (DTNB) 溶液を 25  $\mu$ L 加え、5 分間室温で反応させ、上記操作で得られた肝ホモジネート上清を精製水で適宜希釈後 20  $\mu$ L ずつ添加した。なお、GSSG 測定の際には、肝ホモジネート 100  $\mu$ L に対してを 2-ビニルピリジン を 2  $\mu$ L 加え室温で 1 時間処置後、上記の作業に供した。グルタチオン還元酵素溶液 (4 Units/mL) を 25  $\mu$ L 加え、5 分後に 405 nm の吸光度を Biotrak II plate reader (GE Healthcare) を用いて測定し、GSH および GSSG 含量を定量した。

#### II-2-4 肝臓中カルボニル化タンパク質含量の測定

肝臓中カルボニル化タンパク質含量の測定は、Protein Carbonyl ELISA kit (Enzo LifeScience) のプロトコールに従い、以下の方法で実施した。採取したマウス肝組織 10 mg に対して 3 倍量の氷冷したホモジナイズ用緩衝液 (0.1 M トリスヒドロキシアミノメタン (Tris)-HCl, 0.1 M 塩化カリウム、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), pH 7.4) を加え、テフロンホモジナイザーによりホモジナイズした。タンパク質濃度は Protein Assay kit (Bio-Rad) を用い測定した。肝ホモジネート (4 mg/mL) 50  $\mu$ L に対して、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNP) 溶液を 200  $\mu$ L 加え室温で 45 分間放置した。その後、200 倍容の enzyme immunoassay buffer 中に移すことで反応を停止させ、このうち 200  $\mu$ L を酵素免疫測定法 (ELISA) 用 96 ウェルプレートに移し、4°C で 12 時間静置した。キットに付属されているリン酸緩衝液 (PBS) wash buffer で 5 回洗浄後、水分を除き、blocking solution を 1 ウェルあたり 250  $\mu$ L 加え、室温で 30 分間静置した。PBS wash buffer で 5 回洗浄後、水分を除き、抗-DNP ビオチン標識抗体を 1 ウェルあたり 200  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間静置した。その後、PBS wash buffer で 5 回洗浄後水分を除き、ストレプトアビジン結合西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を 1 ウェルあたり 200  $\mu$ L 加え、室温で 1 時間静置した。PBS wash buffer で 5 回洗浄後、水分を除き、chromatin reagent を 1 ウェルあたり 200  $\mu$ L 加え、室温で 20 分間静置した。Stopping reagent を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ L 加え、反応を停止させた後、450 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。

## II-2-5 血漿中 HMGB1、IL-1 $\beta$ および IL-17 タンパク質濃度測定

血漿中 HMGB1 タンパク質濃度は HMGB1 ELISA Kit を用い、添付のマニュアルに従って測定した。血漿中 IL-1 $\beta$  および IL-17 タンパク質濃度は Ready-SET-GO! Mouse IL-1 $\beta$  および IL-17 をそれぞれ用い、添付のマニュアルに従って測定した。いずれも、吸光度が検量線における最低濃度の標準タンパク質溶液を下回った場合は、not detected (ND) とした。

## II-2-6 総 RNA 抽出および逆転写反応

肝臓から RNAiso を用い添付のマニュアルに従って総 RNA を抽出した。260 nm における吸光度を Nano Drop (Nano Drop Technologies) を用いて定量した。作成した総 RNA を用いて逆転写反応を行った。総 RNA 4  $\mu$ g に対して 150 ng/mL のランダムヘキサマー 1  $\mu$ L を加え、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理精製水を加えて全量が 23  $\mu$ L となるように調製し、サーマルサイクラー (タカラ) を用いて 70 で 10 分間反応させ、氷冷した後に 5  $\times$  逆転写用緩衝液 8  $\mu$ L、2.5 M dNTPs 8  $\mu$ L、ReverTra Ace (100 unit/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L を加え、逆転写反応は、30 $^{\circ}$ C で 60 分の後 90 $^{\circ}$ C で 10 分間行い cDNA 試料とした。

## II-2-7 リアルタイム PCR による mRNA 発現変動解析

Mx3000P を用いて RT-PCR 反応を行った。使用したプライマーを Table 1 に示す。cDNA 試料 1  $\mu$ L、10 uM フォワードプライマー (FP) およびリバースプライマー (RP) をそれぞれ 0.8  $\mu$ L、SYBR Premix EX Taq buffer 10  $\mu$ L、ROX 0.25  $\mu$ L に、滅菌精製水を加え全量を 20  $\mu$ L とした。PCR は以下の反応条件にて行った。FasL, Foxp3, Gapdh, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23p19, NALP3, RAGE, S100A8, S100A9, TLR2, TLR4 および TLR9 では熱変性反応を 95 $^{\circ}$ C、30 秒間の後、解離反応を 94 $^{\circ}$ C、4 秒間、アニーリングと伸長反応を同時に 64 $^{\circ}$ C、20 秒間を 1 サイクルとし、40 サイクル反応を行った。T-bet では熱変性反応を 95 $^{\circ}$ C、60 秒間の後、解離反応を 95 $^{\circ}$ C、15 秒間、アニーリングと伸長反応を同時に 68 $^{\circ}$ C、20 秒間を 1 サイクルとし 40 サイクル行った。

MIP-2、MCP-1 と GATA3 では熱変性反応を 95°C、60 秒間の後、解離反応を 94°C、4 秒間 (GATA3 は 15 秒間)、アニーリングは 62°C、15 秒間、伸長反応を 72°C、30 秒間を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。ROR- $\gamma$ t では熱変性反応を 95°C、60 秒間の後、解離反応を 95°C、15 秒間、アニーリングを 68°C、15 秒間、伸長反応を 72°C、30 秒間を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。PCR 反応後、融解曲線解析と、電気泳動を行い PCR 産物が単一物であることを確認した。

**Table 1**  
**Sequence of primers used for real-time RT-PCR analyses.**

Gene		Sequence
FasL	FP	AGA AGG AAC TGG CAG AAC TC
	RP	GCG GTT CCA TAT GTG TCT TC
Foxp3	FP	CTA GCA GTC CAC TTC ACC AAG
	RP	GCT GCT GAG ATG TGA CTG TC
Gapdh	FP	AAA TGG GGT GAG GCC GGT
	RP	ATT GCT GAC AAT CTT GAG TGA
GATA3	FP	GGA GGA CTT CCC CAA GAG CA
	RP	CAT GCT GGA AGG GTG GTG A
IL-1 $\beta$	FP	GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT
	RP	CAC ACA CCA GCA GGT TAT CA
IL-6	FP	CCA TAG CTA CCT GGA GTA CA
	RP	GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA
IL-23 p19	FR	CCA GTG TGA AGA TGG TTG TG
	RP	CTA GTA GGG AGG TGT GAA GT
MIP-2	FP	AAG TTT GCC TTG ACC CTG AAG
	RP	ATC AGG TAC GAT CCA GGC TTC
MCP-1	FP	TGT CAT GCT TCT GGG CTT G
	RP	CCT CTC TCT TGA GCT TGG TG
NALP3	FP	GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT
	RP	CAC ACA CCA GCA GGT TAT CA
RAGE	FP	GTG CTG GTT CTT GCT CTA TG
	RP	ATC GAC AAT TCC AGT GGC TG
ROR $\gamma$ t	FP	ACC TCC ACT GCC AGC TGT GTG CTG TC
	RP	TCA TTT CTG CAC TTC TGC ATG TAG ACT GTC CC
S100A8	FP	GAG TGT CCT CAG TTT GTG CAG
	RP	TAG ACA TAT CCA GGG ACCCAG
S100A9	FP	GAT GGC CAA CAA AGC ACC TT
	RP	CCT CAA AGC TCA GCT GAT TG
T-bet	FP	TGC CCG AAC TAC AGT CAG GAA C
	RP	AGT GAC CTC GCC TGG TGA AAT G
TLR2	FP	GAA AAG ATG TCG TTC AAG GAG
	RP	TTG CTG AAG AGG ACT GTT ATG
TLR4	FP	TTC TTC TCC TGC CTG ACA CC
	RP	CCA TGC CAT GCC TTG TCT TC
TLR9	FP	ATT CTC TGC CGC CCA GTT TGT C
	RP	ACG GTT GGA GAT CAA GGA GAG G

FP: Forward primer, RP: Reverse primer.

## II-2-8 病理組織学解析

DPH 最終投与から 24 時間後の肝臓サンプルを 4  $\mu$ m に薄切し、10%ホルマリン緩衝液 (和光純薬工業) で固定し、パラフィンワックスに包埋し、その後ヘマトキシリンおよびエオシン

(HE) により染色した。肝臓における好中球浸潤を評価するため、抗 MPO 抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。DPH 最終投与から 24 時間後の肝臓サンプルをパラフィン包埋後、4  $\mu\text{m}$  に薄切された肝臓組織切片を 0.1% (w/v) のトリプシン液で 37°C、10 分間前処置した後、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  で室温、15 分間処理した。さらに、ウサギ抗 MPO ポリクローナル抗体と 37°C、30 分間反応後、Envision<sup>+</sup> for mouse (DAKO) を用いて室温で 40 分間反応させた。発色は  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下でジアミノベンジジン (DAB) を用いて行い、光学顕微鏡を用い 3 視野の MPO 陽性細胞数をそれぞれの動物個体において計測した。

## II-2-9 統計学的解析

群平均および標準誤差を算出するとともに、2 群間における比較には Student's *t*-test を、多群間における比較には分散分析 (ANOVA) および Tukey 検定を用い、 $P < 0.05$  のとき統計学的に有意と判断した。

## 第 3 節 実験結果

### II-3-1 DPH 単回投与 24 時間後の血漿中 ALT ならびに AST 値の測定

DPH/BSO 単回投与 24 時間後の血漿中 ALT 値を Fig. 4A に示す。DPH 100 または 200 mg/kg 投与群においては、DPH の薬理作用によると思われる自発的運動能の低下、振顫ならびに体重減少等の一般状態の変化が認められたものの、経口投与ならびに腹腔内投与のいずれの投与量においても、顕著な血漿中 ALT の上昇は認められなかった。

### II-3-2 DPH 5 日間反復投与時の血漿中 ALT 値の経時的変化および病理学的変化

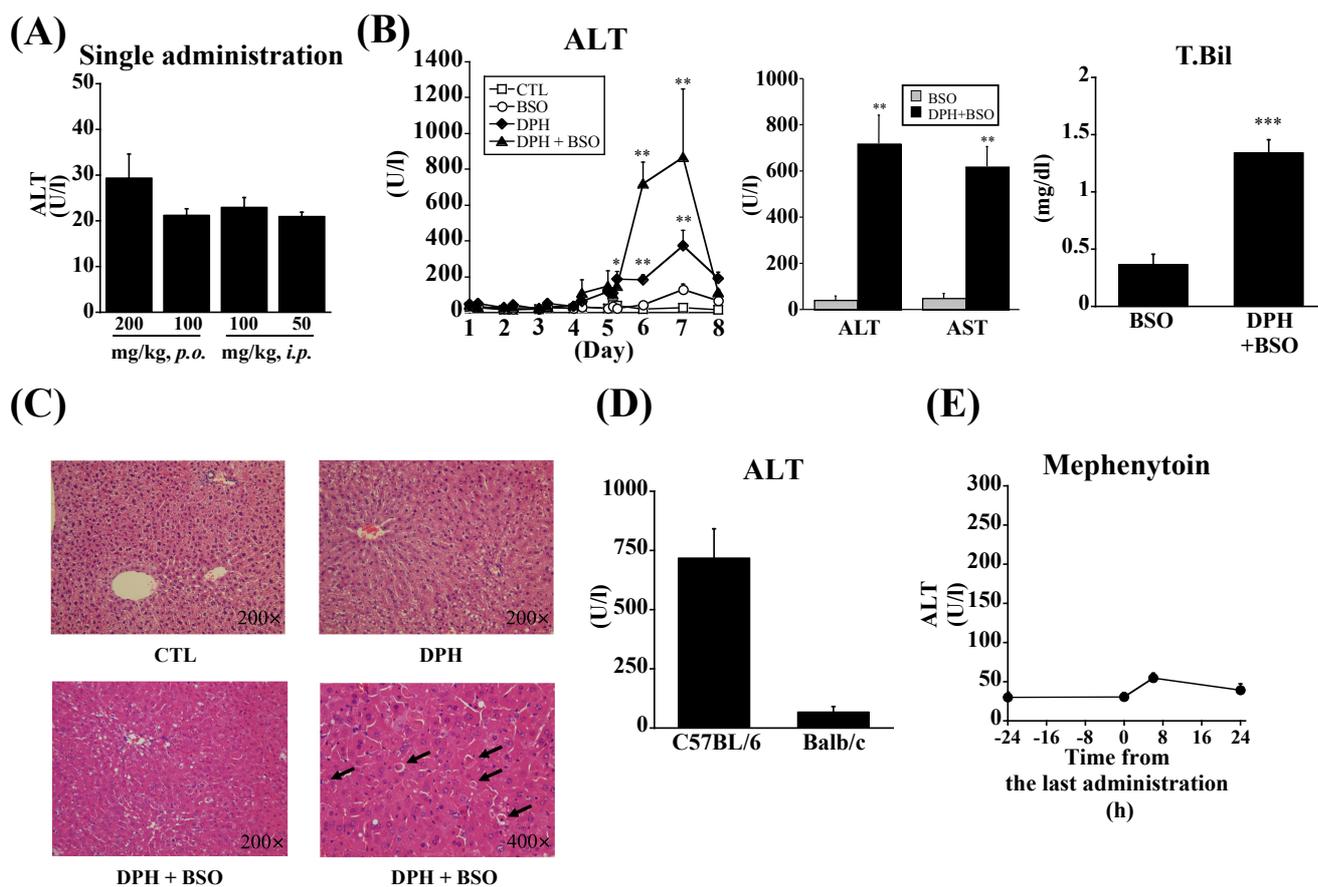
DPH/BSO 投与群において、血漿中 ALT 値は DPH 4 日間反復投与後から軽微な上昇 (約  $147 \pm 9.8 \text{ U/l}$ ) が認められ、DPH 5 日間反復投与 24 時間後において、溶媒投与群と比較し

て有意な ( $P < 0.01$ ) 上昇 ( $718 \pm 122$  U/l) が認められた (Fig. 4B)。血漿中 ALT 値は、DPH 5 日間反復投与 48 時間後に最大値に達した。72 時間後には回復傾向が認められ、溶媒投与群と比較して有意な差は認められなかった。なお、DPH/BSO 投与群における DPH 5 日間反復投与 24、48 ならびに 72 時間後における致死率はそれぞれ約 25%、50%および 70%であった。DPH 単独投与群においては、DPH/BSO 投与群と同様の ALT 値の推移を示したが、その上昇幅は DPH/BSO 投与群よりも小さかった ( $182 \pm 27$  U/l)。溶媒対照群においては、顕著な ALT 値の変動は認められなかった。

DPH 最終投与 24 時間後の血漿中 ALT, AST および T.Bil 値を Fig. 4B に示す。いずれのパラメーターにおいても、DPH/BSO 投与群は BSO 単独投与群と比較して有意な高値を示した。DPH 最終投与 24 時間後の肝病理組織像を Fig. 4C に示す。DPH 単独投与群において肝細胞肥大および軽微な脂肪滴の蓄積が認められ、DPH/BSO 投与群では肝細胞肥大および脂肪滴の蓄積に加えて顕著なアポトーシスが認められた。

マウスの系統差を検討するため、Balb/c マウスを用いて DPH 誘導性肝障害モデルマウスの作成検討を行ったが、溶媒投与群と比較して ALT 値は有意な高値を示さなかった (Fig. 4D)。

DPH 誘導性肝障害発症における薬理学的影響を検討するため、DPH の同効薬で構造類似体であり、肝障害報告の少ない *S*-メフェニトインを投与した結果を Fig. 4E に示す。*S*-メフェニトイン/BSO 投与群において、溶媒投与群と比較して血漿中 ALT, AST および T-Bil 値は有意な高値を示さず、肝障害を疑う変化は認められなかった (Fig. 4E)。したがって、DPH 誘導性肝障害発症はその薬理作用に依存しないことが示された。



**Fig. 4. Time-dependent changes in plasma ALT and AST levels in DPH-induced liver injury.** (A) In a single administration experiment, mice were given an oral dose of DPH at 200 or 100 mg/kg and an intraperitoneal injection of 100 or 50 mg/kg. BSO (700 mg/kg) was intraperitoneally injected 1 h prior to the DPH treatment, and blood was collected 24 h after DPH administration. Values represent the mean  $\pm$  SEM of four animals. (B) Female C57BL/6 mice were intraperitoneally given DPH at 50 mg/kg for 2 days, and afterwards on days 3-5, DPH was orally given at 100 mg/kg. BSO (700 mg/kg) was intraperitoneally injected 1 h prior to each DPH administration. Each vehicle was used as a control. At 0 and 6 h after DPH administration on days 1-4 and at 0, 3, 6, 24, 48, and 72 h after the final DPH treatment, blood was collected to measure plasma ALT levels. The days 6, 7, and 8 correspond to 24, 48, and 72 h after the final DPH treatment. In the second panels the plasma ALT, AST and T-Bil levels were measured 24 h after the final DPH treatment. Values represent the mean  $\pm$  SEM of four to six animals. (C) Liver tissue sections from 24 h after the final DPH treatment were stained with H&E. (D) Female Balb/c mice were treated with DPH and BSO described in (B). (E) As the negative control, mice were given mephentytoin and BSO on the same dosing regimen as in (B). At 24 h before (-24) and 0, 6, and 24 h after the final mephentytoin treatment, blood was collected to measure plasma ALT levels (E). Values represent the mean  $\pm$  SEM of four animals. Values represent the mean  $\pm$  SEM of four to five specimens. The differences relative to the BSO-treated mice (ALT, AST and T-Bil) were considered significant at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ .

### II-3-3 DPH および BSO 投与が肝臓中 GSH および GSSG 含量に及ぼす影響

DPH 最終投与後から肝臓中 GSH および GSSG 含量を経時的に測定した (Fig. 5A)。GSH 含量は、BSO 単独投与群では投与から 2.5-7 時間後にかけて溶媒対照群と比較して有意な低

値を示した。DPH 単独投与群においても、DPH 最終投与 1.5-6 時間後および 24 時間後にかけて、溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。両群において GSH 含量枯渇のピークは DPH 最終投与から 3-6 時間後であった。DPH/BSO 投与群では、DPH 最終投与から 0-24 時間後にかけて溶媒対照群と比較して有意な低値を示し、他群よりも枯渇の程度が大きく、かつ持続的な低値を示した。一方で GSSG 含量は、DPH/BSO 併用投与群において、持続的に溶媒対照群と比較して有意な低値を示し、BSO 単独投与群においても BSO 投与 2.5 時間後に溶媒対照群と比較して有意な低値が認められたものの顕著ではなかった。総 GSH 含量 (GSH + GSSG) は、GSH とほぼ同様の傾向を示し、DPH または BSO 処置により低値を示し、DPH および BSO の共処置でさらに枯渇が顕著になることが示された。溶媒対照群においては GSH ならびに GSSG の顕著な変動は認められなかった。

#### II-3-4 肝臓中カルボニル化タンパク質含量の変動

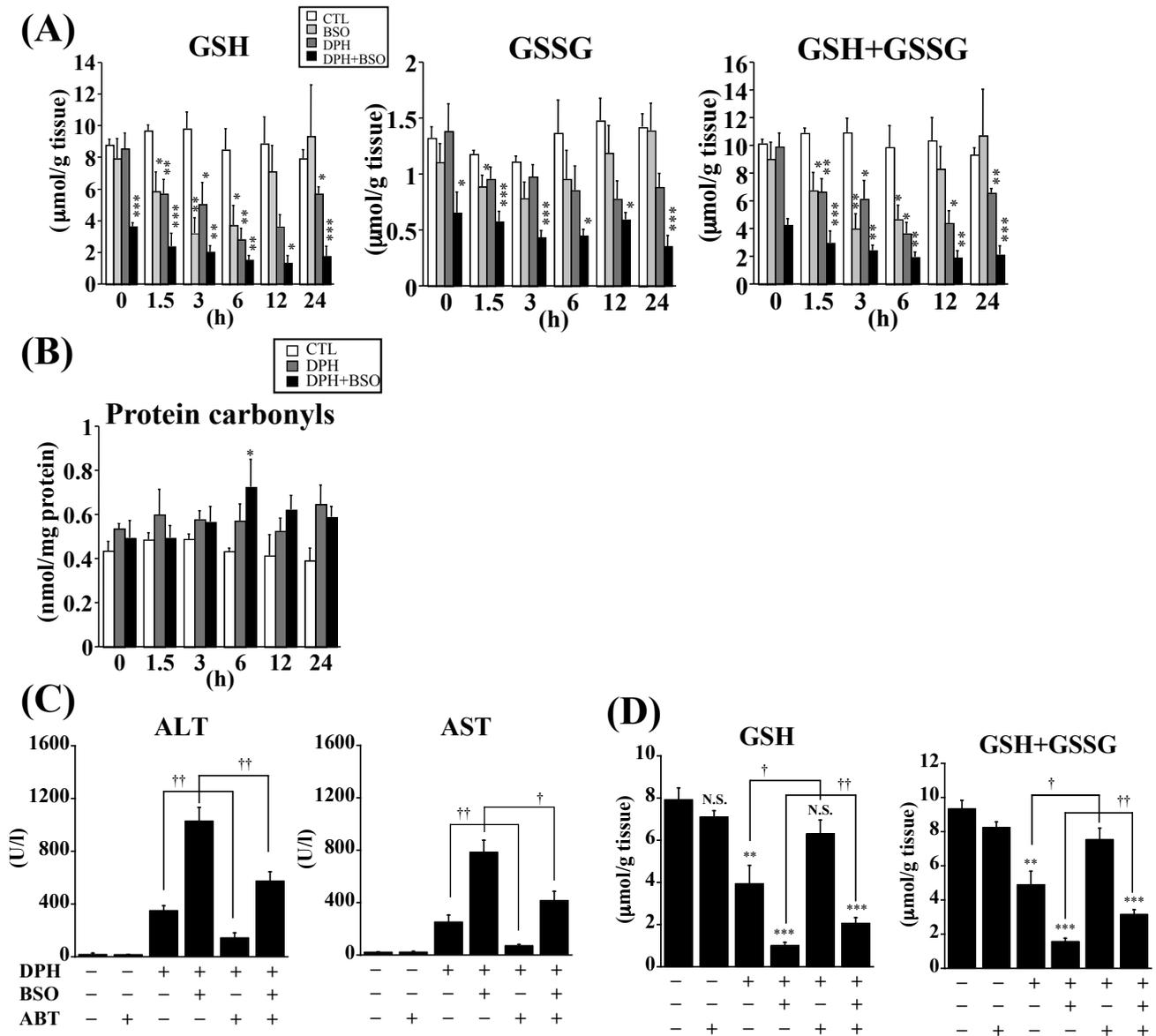
DPH 単独投与群において、カルボニル化タンパク質含量は DPH 最終投与 0-24 時間後にかけて持続的な上昇傾向を示した (Fig. 5B)。DPH/BSO 処置群では DPH 最終投与 6 時間後において有意な高値を示した。溶媒対照群ではいずれの時間においても変動は認められなかった。

#### II-3-5 CYP 阻害剤併用処置が DPH 誘導性肝障害発症に与える影響

DPH 最終投与から 24 時間後の血漿中 ALT ならびに AST 値を示す (Fig. 5C)。ABT 単独投与群では溶媒対照群と比較して有意な ALT および AST の変動は認められなかった。一方で、DPH 単独投与群では II-3-2 の結果と同様に ALT 値は高値を示し、DPH/BSO 投与群では、より高値を示した。しかし、ABT 併用投与条件下では ABT 非処置群と比較して有意な低値を示した。

### II-3-6 CYP 阻害剤併用処置が肝臓中 GSH 含量の低下に与える影響

DPH 最終投与 24 時間後の肝臓中 GSH および総グルタチオン含量を示す (Fig. 5D)。II-3-3 で示したとおり、DPH および DPH/BSO 投与群では、溶媒対照群と比較して GSH 含量は低値を示し、その値は DPH/BSO 投与群がより低値であった。しかし、ABT を併用処置群では、非処置群と比較して有意な高値を示した。ABT 単独投与群では、溶媒対照群と比較して有意な GSH 含量の変動は認められなかった。



**Fig. 5.** Time-dependent changes in hepatic GSH, GSSG, and oxidative stress marker in DPH-induced liver injury.

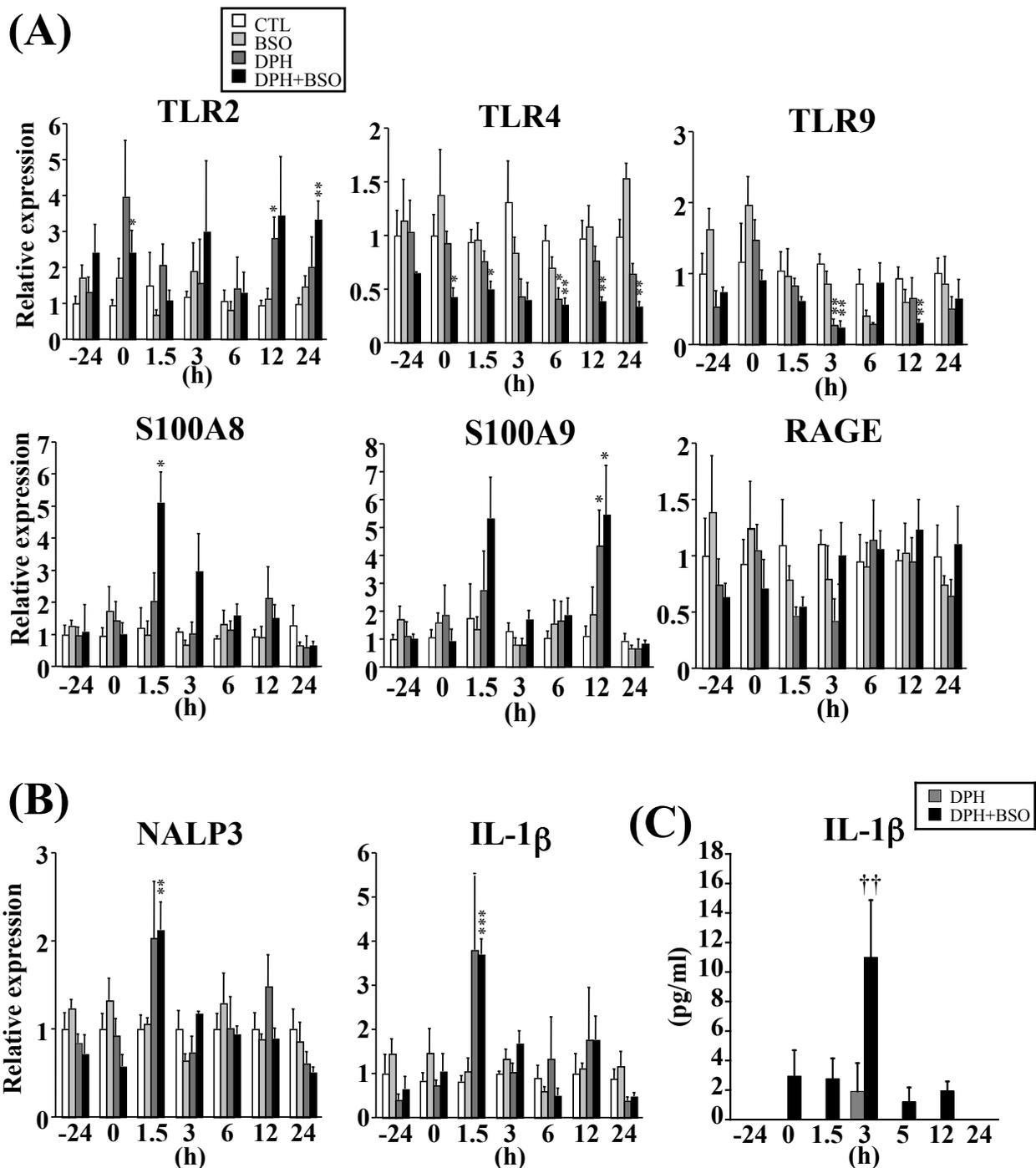
Mice were intraperitoneally given DPH at 50 mg/kg for 2 days, and afterwards on days 3-5, DPH was orally dosed at 100 mg/kg. BSO was intraperitoneally injected 1 h prior to each DPH administration. Each vehicle was used as a control. At 0, 1.5, 3, 6, 12, and 24 h after the final DPH treatment, the liver was collected to measure the hepatic GSH, GSSG, and GSH+GSSG levels, the GSH/GSSG ratio (A), and its level of hepatic protein carbonyls (B). ABT (100 mg/kg), a non-specific inhibitor of P450, was intraperitoneally given 1 h prior to the final DPH treatment. Each vehicle was used as a control. At 24 h after the final DPH treatment, the liver and plasma were collected to measure plasma ALT and AST levels (C), hepatic GSH and GSH+GSSG levels, and the GSH/GSSG ratio (D). The data are shown as the mean  $\pm$  SEM of the results from four mice. The differences relative to the control mice were considered significant at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ , and the differences between ABT-treated and vehicle-treated mice were considered significant at  $\dagger p < 0.05$ ,  $\dagger\dagger p < 0.01$ .

## II-3-7 肝組織中の自然免疫関連因子の解析

自然免疫応答に関わる TLRs、RAGE ならびにそのリガンドとなる S100A8/9 mRNA の発現

変動を Fig. 6A に示す。DPH/BSO 投与群において、TLR9 は DPH 最終投与から 3 および 12 時間後に溶媒投与群と比較して有意な低値が認められ、TLR4 はほぼ全時間において有意な低下が認められた。S100A8/9 は DPH 最終投与から 1.5 時間後に顕著な高値が認められ、S100A8 では溶媒対照群と比較して有意差が認められた。S100A9 は DPH 最終投与から 12 時間後に有意な高値が認められ、RAGE は低値を示す傾向が認められた。DPH 単独投与群では、ほとんどすべての mRNA 発現量において DPH/BSO 投与群と同様の変動傾向を示したが、RAGE を除き、発現変動幅は DPH/BSO 投与群と比較して小さいものであった。BSO 単独投与群ではいずれの mRNA においても顕著な変動は認められなかった。

自然免疫応答の活性化には TLRs を介した経路の他に、NALP3 インフラマソームの活性化経路があり、NALP3 およびその標的となる IL-1 $\beta$  mRNA 発現量を経時的に解析した (Fig. 6B)。DPH/BSO 処置群において、DPH 最終投与から 1.5 時間後に溶媒対照群と比較して有意に NALP3 および IL-1 $\beta$  mRNA 発現量が高値を示した。DPH 処置群においても、DPH/BSO 併用処置群と同程度の高値が認められたが、有意差は認められなかった。溶媒対照群および BSO 単独投与群では、いずれの時点および mRNA においても顕著な変動は認められなかった。IL-1 $\beta$  はカスパーゼ 1 により切断され、成熟型 IL-1 $\beta$  として生理的な活性を獲得する。したがって、肝臓中 IL-1 $\beta$  mRNA 発現量ではなく、肝臓中あるいは血漿中の IL-1 $\beta$  タンパク質量が産生の指標となる。DPH および DPH/BSO 投与群の血漿中 IL-1 $\beta$  タンパク質濃度を測定した (Fig. 6C)。DPH/BSO 投与群において、DPH 最終投与から 3 時間後に、肝障害未発症時点の DPH 投与 4 日目 (DPH 最終投与 24 時間前、-24 h) と比較して高値を示した。DPH 単独処置群では、最終投与から 3 時間後に IL-1 $\beta$  タンパク質が検出されたが、DPH/BSO 投与群と比較して低値であった。



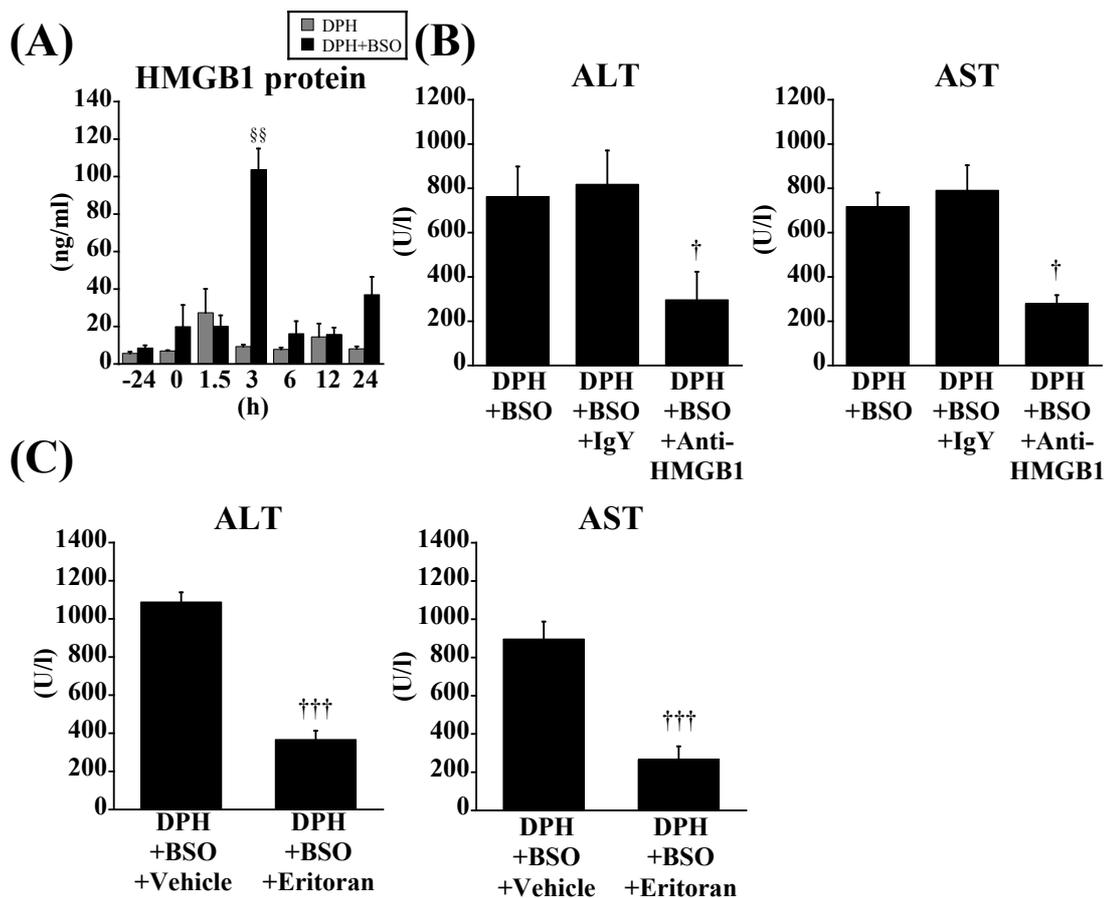
**Fig. 6.** Time-dependent changes in the hepatic mRNA expression levels of DAMP-related genes, NALP3 and IL-1 $\beta$ .

(A and B) Mice were intraperitoneally given DPH at 50 mg/kg for 2 days, and afterwards on days 3-5, DPH was orally dosed at 100 mg/kg. BSO was intraperitoneally injected 1 h prior to each DPH administration. Each vehicle was used as a control. At 24 h before (-24) and 0, 1.5, 3, 6, 12, and 24 h after the final DPH treatment, liver and plasma samples were collected to measure the expression of both the hepatic mRNAs of DAMP-related genes NALP3 and IL-1 $\beta$ . The expression levels of hepatic mRNAs were normalized to that of Gapdh. The data are shown as the mean  $\pm$  SEM. The results of the time-dependent study are taken from three to five mice, and the other data are taken from four to five mice. The differences relative to the control mice were considered significant at \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001.

## II-3-8 血漿中 HMGB1 タンパク質濃度の解析と抗 HMGB1 抗体または TLR4 アンタゴニストが DPH 誘導性肝障害へ与える影響

DPH および DPH/BSO 投与マウスの血漿中 HMGB1 タンパク質濃度の経時的な推移を示す (Fig. 7A)。DPH/BSO 投与群では、DPH 最終投与から 3 時間後に、肝障害未発症時の-24 時間時点と比較して有意に高値を示した。DPH 単独投与群ではいずれの時点においても顕著な上昇は認められなかった。DPH/BSO 投与マウスに抗 HMGB1 抗体を併用投与したところ、DPH 最終投与 24 時間後の ALT 値および AST 値は抗体非処置群と比較して有意な低値を示した (Fig. 7B)。コントロール IgY 抗体処置では、抗体非処置群と比較して顕著な ALT 値の変動は認められなかった。

DPH/BSO 処置マウスに TLR4 アンタゴニストであるエリランを併用投与したところ、DPH 最終投与 24 時間後の ALT 値および AST 値は溶媒対照群と比較して有意な低下を示した (Fig. 7C)。

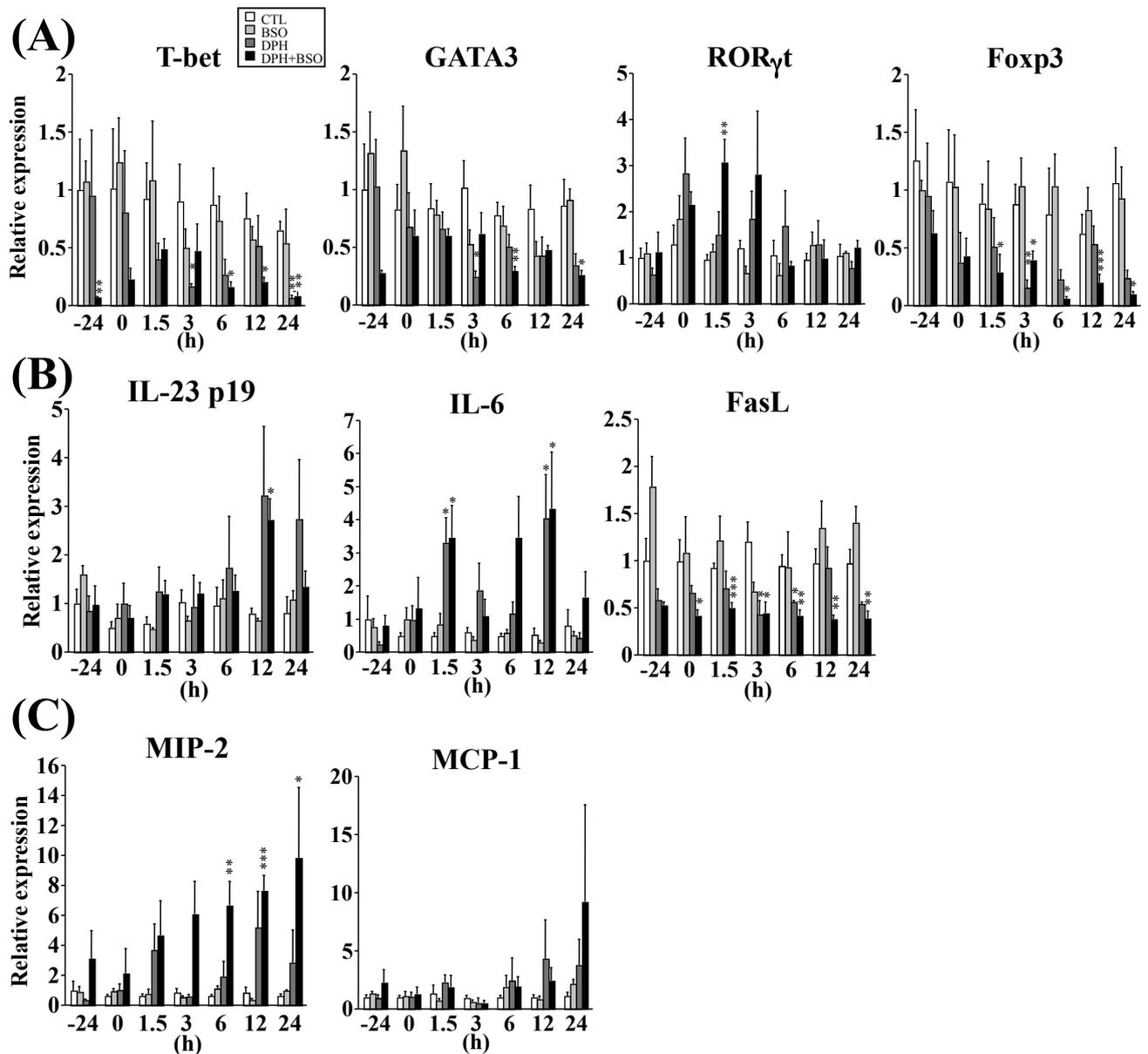


**Fig. 7. Time-dependent changes of plasma HMGB1 protein levels, and results of the neutralization studies in DPH-induced liver injury.** (A) Mice were intraperitoneally given DPH at 50 mg/kg for 2 days, and afterwards on days 3-5, DPH was orally dosed at 100 mg/kg. BSO was intraperitoneally injected 1 h prior to each DPH administration. Each vehicle was used as a control. At 24 h before (-24) and 0, 1.5, 3, 6, 12, and 24 h after the final DPH treatment, plasma samples were collected to measure the plasma HMGB1 protein. (B) The effect of an anti-HMGB1-antibody. Mice were intravenously administered the anti-mouse HMGB1-antibody (200  $\mu$ g anti-HMGB1-antibody in 0.2 ml sterile PBS) simultaneously with the final DPH treatment. Blood was collected 24 h after the final DPH treatment. (C) The effect of eritoran, a TLR4 antagonist, on DPH-induced liver injury. Mice were intravenously given eritoran (50  $\mu$ g/mouse in 0.2 ml sterile saline) simultaneously with the final DPH treatment. Blood was collected 24 h after the final DPH treatment. The data are shown as the mean  $\pm$  SEM. The results of the time-dependent study are taken from three to five mice, and the other data are taken from four to five mice. The differences relative to the control mice were compared to the -24 h mice were considered significant at <sup>\$\$</sup> $p < 0.01$  in ELISA; and compared to isotype IgY or vehicle-treated mice were considered significant at <sup>†</sup> $p < 0.05$  and <sup>†††</sup> $p < 0.001$  in neutralization or antagonist studies, respectively.

### II-3-9 肝臓中の Th 細胞関連因子およびケモカイン mRNA 発現量解析

Th 細胞関連因子 mRNA の経時的な発現変動を Fig. 8A に示す。T-bet は、DPH/BSO 処置群において-24、3-24 時間後に、溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。DPH 単独投与群では、DPH/BSO 処置群と同様の発現変動傾向が認められたが、有意な低値を示したのは

DPH 最終投与 24 時間後のみであった。GATA3 は、DPH/BSO 投与群では DPH 最終投与から 6 および 24 時間後において、溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。DPH 単独投与群では、DPH/BSO 投与群と同様の傾向が認められ、DPH 最終投与 3 時間後に有意な低値を示した。ROR $\gamma$ t は、DPH/BSO 投与群において、DPH 最終投与から 1.5 時間後に溶媒対照群と比較して有意な高値を示した。DPH 単独投与群では、溶媒対照群と比較して高値な mRNA 発現量を示す傾向が認められたが、いずれの時間においても有意差は認められなかった。FoxP3 は、DPH/BSO 投与群において、DPH 最終投与から 1.5-24 時間後に、溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。DPH 単独投与群でも、いずれの時点においても溶媒対照群と比較して低値を示し、DPH 最終投与 3 時間後には有意な低値を示した。IL-23p19 は、DPH/BSO 投与群において、DPH 最終投与から 12 時間後に溶媒対照群と比較して有意な高値を示した (Fig. 8B)。DPH 単独投与群では、DPH 最終投与 12-24 時間後にかけて高値を示したが、溶媒対照群と比較して有意差は認められなかった。IL-6 は DPH/BSO および DPH 処置群の両群において、DPH 最終投与 1.5 および 12 時間後に、溶媒対照群と比較して有意な高値を示した (Fig. 8B)。FasL は、DPH/BSO 投与群において持続的な低値を示し、DPH 最終投与 0-24 時間後で溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。DPH 単独投与群では、DPH/BSO と同様に持続的な低値を示し、DPH 最終投与 3-6 時間後において、溶媒対照群と比較して有意な低値を示した。ケモカインでの 1 つである MIP-2 は DPH/BSO 投与群において、時間依存的な高値を示し、DPH 最終投与 6-24 時間後に有意に高値を示した (Fig. 8C)。DPH 単独投与群では、DPH 最終投与後、3, 12 および 24 時間後に顕著な高値を示したが、溶媒対照群と比較して有意差は認められなかった。また MCP-1 は DPH/BSO 投与群は DPH 最終投与から 24 時間後において溶媒対照群と比較して顕著な高値を示し、DPH 単独投与群でも高値を示す傾向が認められた。なお、いずれの mRNA においても溶媒対照群では時間依存的な変動は認められなかった。また、BSO 単独投与群では溶媒対照群と比較して有意な変動は認められなかった。



**Fig. 8. Time-dependent changes of hepatic mRNA expression levels of proinflammatory cytokines and chemokines in DPH-induced liver injury.**

(A - C) The experimental conditions for DPH treatments and blood and liver collection were the same as those in Fig. 6. The data are shown as the mean  $\pm$  SEM. The results of the time-dependent study are taken from three to five mice, and the results from the neutralization study are taken from four to five mice. The differences relative to the control mice were considered significant at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , and  $***p < 0.001$ .

II-3-10 血漿中 IL-17 タンパク濃度の測定ならびに抗 IL-17 抗体処置が DPH 誘導性肝障害に与える影響

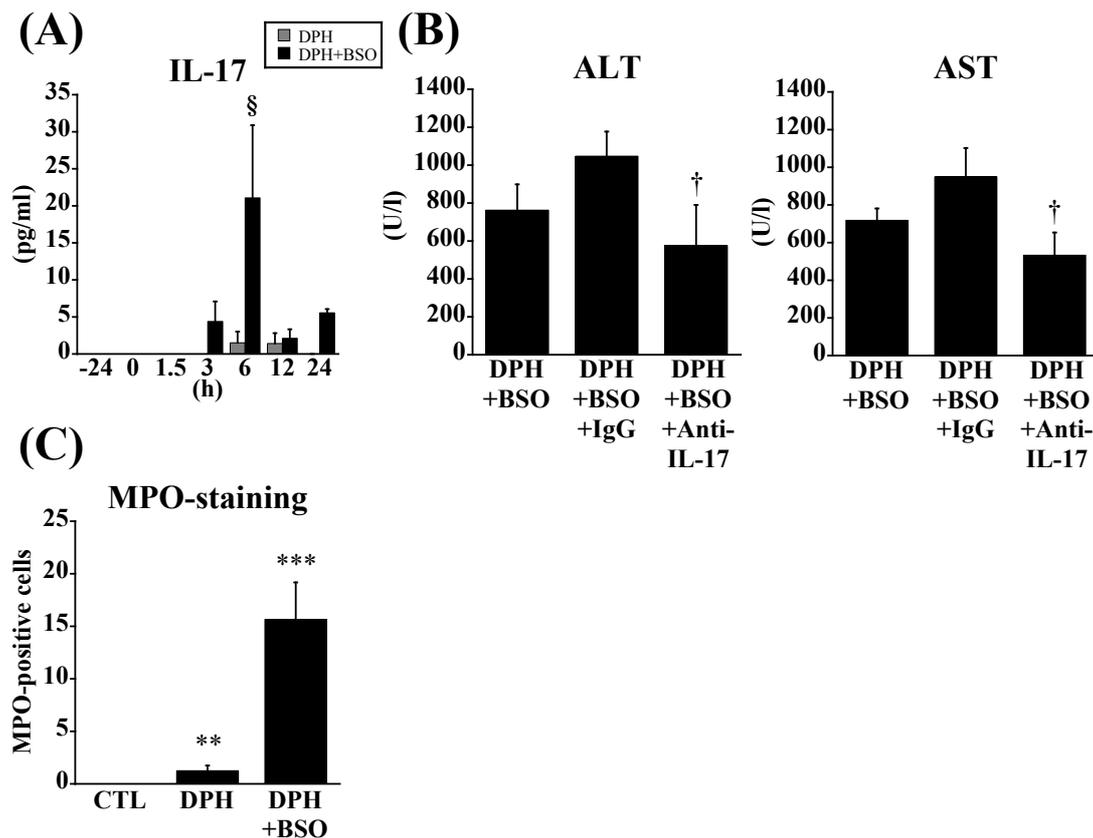
DPH および DPH/BSO 投与群の血漿中 IL-17 濃度の経時的推移を Fig. 9A に示す。

DPH/BSO 投与群の DPH 最終投与 6 時間後では、肝障害未発症時点の-24 時間の時点と比較して有意な高値を示した。DPH 単独投与群では、いずれの時点においても顕著な高値は示

さなかった。抗 IL-17 抗体を DPH/BSO 投与群に処置したところ、DPH 最終投与 24 時間後の ALT および AST 値は、コントロール IgG 処置群と比較して有意な低値を示した (Fig. 9B)。コントロール IgG 処置による影響は認められなかった。

#### II-3-11 肝臓中 MPO 陽性細胞数の変化

DPH 最終投与後 24 時間後の肝臓における好中球浸潤を確認するため、MPO 陽性細胞を染色し、計測した (Fig. 9C)。DPH および DPH/BSO 投与群において MPO 陽性細胞数は BSO 単独投与群と比較して有意に高値を示した (Fig. 9C)。その上昇の程度は DPH 単独投与群と比較して DPH/BSO 投与群の方が顕著であった。



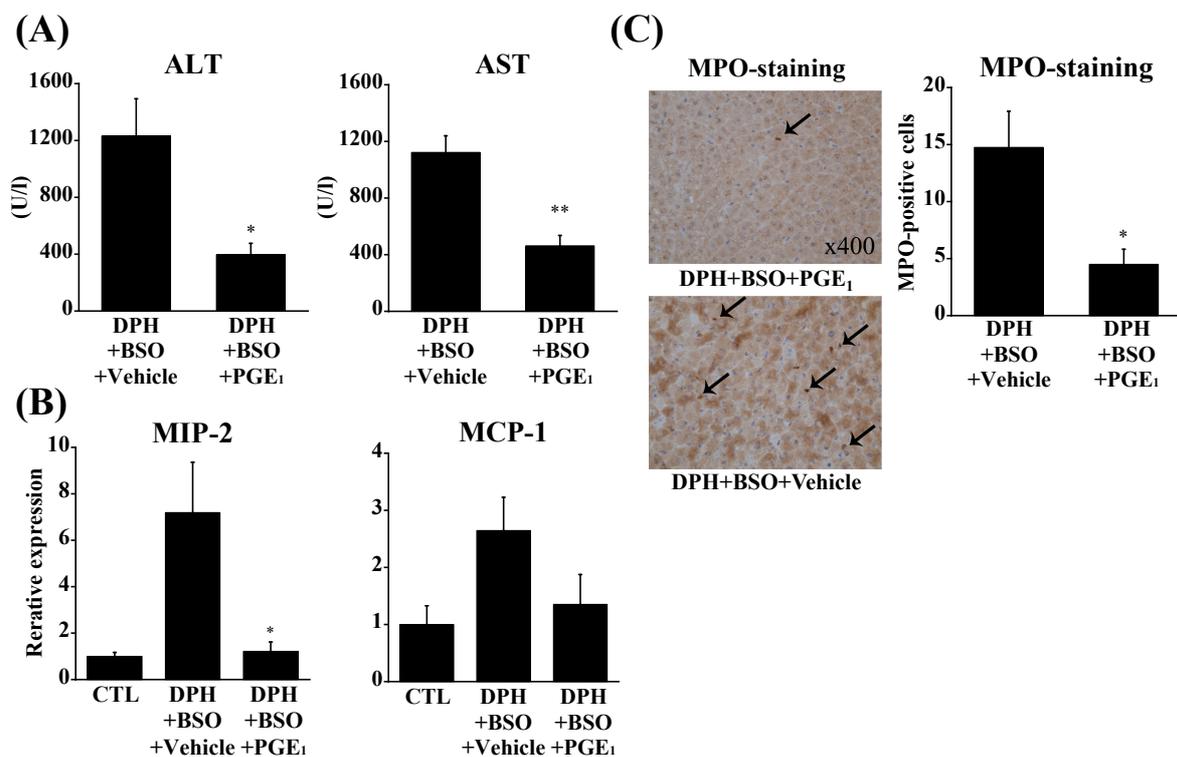
**Fig. 9. A neutralization study of IL-17 and assessment of neutrophil infiltration in DPH-induced liver injury.**

(A) The experimental conditions for DPH treatments and blood collection were the same as those in Fig. 6. (B) For the neutralization study, mice were intravenously injected with an anti-mouse IL-17 antibody (100  $\mu$ g anti-mouse IL-17 antibody in 0.2 ml of sterile PBS) 3 h after the final DPH treatment. As a control, the IgG isotype was used. At 24 h after the final DPH treatment, plasma was collected to measure its ALT and AST levels. (C) Neutrophil infiltration was assessed by immunostaining for MPO. Data indicate the number of MPO-positive cells in mice treated with DPH and BSO, DPH alone, or vehicle. The data are shown as the mean  $\pm$  SEM. The results of the time-dependent study are taken from three to five mice, and the results from the neutralization study are taken from four to five mice. The differences relative to the control mice were considered significant  $^{\S}p < 0.05$  in ELISA; and those compared to isotype IgG-treated mice were considered significant at  $^{\dagger}p < 0.05$  in neutralization study, and the differences relative to the control mice (MPO-stained) were considered significant at  $^{**}p < 0.01$ , and  $^{***}p < 0.001$ .

## II-3-12 PGE<sub>1</sub> 処置が DPH 誘導性肝障害に与える影響

PGE<sub>1</sub> は好中球のスーパーオキシド産生を抑制することが知られており (Talpain et al., 1995)、ハロタン誘導性肝障害モデルマウスおよびカルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウスを用いた検討で肝障害に対する保護作用があることを、当研究室において明らかにしている (Kobayashi et al., 2009; Higuchi et al., 2012)。DPH 誘導性肝障害においても好中球の浸潤が

Fig. 9C で示されたことから、PGE<sub>1</sub> 処置により肝障害が緩和されるかどうか、血漿中 AST および ALT 値ならびに好中球遊走ならびに浸潤に関与するケモカインである MIP-2 および MCP-1 mRNA 発現量を評価した。その結果、PGE<sub>1</sub> 投与により、DPH 最終投与 24 時間後の血漿中 AST および ALT 値が溶媒対照群と比較して有意な低値を示すことを明らかにした (Fig. 10A)。また、DPH 最終投与 24 時間後の MIP-2 および MCP-1 mRNA 発現量は溶媒対照群 (CTL) と同等の低値を示した (Fig. 10B)。PGE<sub>1</sub> が DPH/BSO 投与マウスの肝臓における好中球浸潤に与える影響を検討するため、PGE<sub>1</sub> 併用処置マウスの DPH 最終投与 24 時間後の肝臓を用いて、MPO 陽性細胞を計測した。その結果、DPH/BSO 投与マウスの MPO 陽性細胞数は溶媒処置群と比較しては有意な低値を示した (Fig. 10C)。



**Fig. 10. Effects of PGE<sub>1</sub> on DPH-induced liver injury.**

The experimental conditions for DPH administration were the same as those in Fig. 4. Mice were intraperitoneally injected with PGE<sub>1</sub> (50 µg/mouse, dissolved in 0.5 ml sterile saline) 3 h after the final DPH treatment. Each vehicle was used as a control. At 24 h after the final DPH treatment, the plasma and liver were collected to measure ALT and AST levels (A), hepatic mRNA levels of MIP-2 and MCP-1 (B) and for immunohistochemistry (C). The expression level of hepatic mRNA was normalized to that of Gapdh. Mononuclear cell infiltration was assessed by immunostaining for MPO. The number of MPO-positive cells in DPH and BSO-treated or DPH, BSO, and PGE<sub>1</sub>-treated mice is shown in (C). The arrows indicate MPO-positive cells. The data are shown as the mean ± SEM of the results from four to five mice. The differences compared to the DPH-, BSO- and vehicle-treated mice were considered significant at \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01.

#### 第4節 考察

マウスにおけるDPHの経口LD<sub>50</sub>は367 mg/kgであり、予備検討においてDPHを200 mg/kgで単回単回経口投与した際、投与後に重篤な振せんならびに昏睡など、薬理作用に起因すると推察される症状が認められた。しかし、血漿中ALT値の上昇は認められず肝障害は発症しなかったと考えられた。また、アレビアチン 医薬品インタビューフォーム (2014) によると、DPHをラットに100 mg/kgで20週間経口投与しても病理組織学的および血液生化学的に肝障害を疑う所見は検出されていない。そこで、本検討ではGSH合成阻害剤であるBSO投与ならびに、DPHの反復投与を組み合わせ、C57BL/6マウスを用いて肝障害モデルの作成を試みた。BSOはGSH合成経路の律速酵素であるγ-GCSの特異的阻害剤であり、*in vivo*においても肝臓中GSH含量を低下させることが知られている (Griffith and Meister, 1979; 1982)。さらに、BSOは肝ミクロソーム画分に含まれるCYP、グルクロン酸転移酵素 (UGT) および硫酸転移酵素等の薬物代謝酵素の発現量に影響を与えないことが報告されている (Drew and Miners, 1984; Watanabe et al., 2003)。しかし、BSO処置マウスにDPH 200 mg/kgを単回経口投与しても血漿中ALT値の有意な上昇は認められなかったことから (Fig. 4A)、肝臓におけるGSH含量の低下のみでは、DPH誘導性肝障害は発症しないことが示された。臨床においてDPH誘導性肝障害は1-8週間のDPH暴露により発症している (Mullick and Ishak, 1980)。多くの特異体質性のDILIは、長期の薬剤暴露によって発症することから、薬物の長期暴露による生体内の生理学的変化等が、DILI発症の引き金として関与していることが推察される。そこで、BSO処置と共にDPHを5日間反復投与したところ、DPH 5日間反復投与後に有意な血液生化学パラメーターの上昇ならびに、肝病理組織学的に組織傷害像が認められた (Figs. 4B and 4C)。一方で、DPH単独5日間反復投与の検討においては、有意な血液生化学パラメーターの上昇が認められたものの、DPH/BSO投与マウスよりもALT値の上昇程度は低く、病理組織学的にも明瞭な組織傷害像は認められなかった (Figs. 4B and 4C)。これらの結果から、GSHがDPH反復投与による肝障害発症に対して防御的に作用していることが示された。

本検討において、DPH 反復投与における DPH の投与経路ならびに投与量が、5 回で一貫していない。予備検討において、DPH を 5 日間 100 mg/kg で反復経口投与を行ったところ、血漿中 ALT 値の顕著な上昇が認められたが (1500-2000 U/l)、ALT 値ピーク時に至る DPH 最終投与から 24 時間後までの致死率が 75%を超え、肝障害発症機序を解析するモデルとして望ましくないと考えた。死亡個体は主に DPH 投与開始から 2-3 日目の比較的初期に認められた。DPH は CYP 誘導能を有することから (Hagemeyer et al., 2010)、反復投与によって薬理作用が減弱されることが考えられる。反復投与初期に投与量を多くすると CYP 誘導が惹起される前に薬理作用が強く表れ、過剰な鎮静作用により死に至ると推察した。そこで、5 日間の反復投与のうち、1-2 日目は投与量を 50 mg/kg に減量させ DPH の薬理作用の緩和を期待した。また、既報から、腹腔内投与では経口投与よりも血漿中 DPH 濃度が低値であることが示されていることから (Lolin et al., 1994; Burstein et al., 1999)、強力な薬理作用を避け、かつ持続的な DPH 暴露を可能にすることを期待し、薬理作用の認められやすい 1-2 日目は腹腔内投与とした。その結果、ALT 値の上昇は約 700 U/l 程度と高値が認められたまま、致死率は約 25%にまで減少した。

肝臓中 GSH は反応性代謝物の解毒に重要な役割を担っている。APAP の反応性代謝物である *N*-アセチル *p*-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) や、抗血小板凝集薬であるチクロピジンの反応性代謝物である *S*-オキシド体等の親電子性の反応性代謝物は、アミノ酸のシステイン残基を介してタンパク質へと共有結合する (Zhou et al., 2005)。生体では GSH が反応性代謝物と結合することで安定なグルタチオン抱合体を形成し、生体は反応性代謝物のタンパク質への共有結合から免れているとされている。げっ歯類は、ヒトに比べてグルタチオン抱合に寄与する GST 活性および、肝グルタチオン含量がそれぞれ約 10-20 および 2-4 倍高く、ヒトよりも反応性代謝物に対する解毒能が高い (Grover and Smis, 1964; Eoodhouse et al., 1983; Watanabe et al., 2003)。これまでに、チエニル酸、チクロピジン、アモジアキン、メチマゾールならびに APAP 等の反応性代謝物の生成が認められる薬物において、BSO 前処理がげっ歯類における DILI

発症の感度を高めることが報告されている (Nishiya et al., 2008; Shimizu et al., 2009;2011; Kobayashi et al., 2012)。ヒトにおいては飲酒 (Lauterburg and Veltez, 1988)、加齢 (Hernanz et al., 2000) や肝炎ウイルス (Staal et al., 1992) 等によって GSH 含量が低下することが知られている他、GSH 合成における律速酵素である  $\gamma$ -GCS の酵素活性変動を伴う遺伝子多型も報告されている (Nakamura et al., 2002)。これらのことから、特定のヒトにおける GSH 含量低下が想定され、本モデルは特異体質性の DPH 誘導性肝障害発症の一部を反映するとともに、特異体質性 DILI 検出モデルの作成として BSO 投与が有効であることを示している。しかし、DPH 単回投与では、BSO 前処置によっても血漿中 ALT 値は上昇せず、DPH を反復投与することで BSO 処置による肝障害増悪が認められた (Figs. 4A and 4B)。これらの結果から、DPH 連投による代謝プロファイル変化など、GSH 枯渇以外の因子の肝障害発症への寄与について検討する必要があると思われた。

マウスの系統によって DILI に対する感受性が異なることが報告されている (Masubuchi et al., 2009; Welch et al., 2006; You et al., 2006)。本研究において、Balb/c マウスを用いて BSO 処置と DPH 5 日間反復投与を行っても ALT 値の有意な上昇は認められなかった (Fig. 4D)。Balb/c マウスはハロタン、ジクロフェナク、カルバマゼピンおよびアザチオプリン誘導性肝障害モデルとして、当研究室において用いてきた系統である (Kobayashi et al., 2009; Yano et al., 2012; Higuchi et al., 2012; Matsuo et al., 2014)。一方で、C57BL/6 マウスは APAP 誘導性肝障害のモデル作成に用いる系統として頻用されている。特に、ハロタン誘導性肝障害マウスモデルにおいては、高い感受性を示す Balb/c と肝障害耐性を示す C57BL/6 とでは、ハロタンの反応性代謝物であるトリフルオロ酢酸のタンパク共有結合量に差はないものの、免疫ならびに炎症関連因子において両系統における顕著な差が認められていることを当研究室において明らかにしている。(Kobayashi et al., 2009)。また、APAP 誘導性肝障害においても免疫応答が肝障害の重篤度に与える影響が検討されており (Masubushi et al., 2009)、これらのことを踏まえると DPH 誘導性肝障害モデルマウスにおいても、C57BL/6 特異な免疫応答が DPH 誘導性肝障害発症

において重要であると推察された。

DPH 誘導性肝障害発症に伴い、肝臓中 GSH 含量の低下が認められたことから、親電子性反応性代謝物が生成され、それらの不十分な解毒が肝障害発症に繋がっている可能性が考えられた。DPH 単独投与においても GSH のみならず総グルタチオン (GSH + GSSG) 含量においても認められたため (Fig. 5A)、GSH 含量の低下は酸化ストレスによる GSH/GSSG 比の変動によるものではなく、親電子性反応性代謝物による GSH 付加体形成による GSH の消費を反映しているものと推察された。BSO は、DPH 単独投与による GSH 含量低下のピーク時間とほぼ同じタイミング (DPH 最終投与 3-6 時間後) に GSH 含量を顕著に低下させていた (Fig. 5A)。このことから、BSO は解毒に必要な GSH を減少させることにより、親電子性反応性代謝物による生体タンパク質への共有結合量を増加させ、肝障害を増悪させていると推察された。これらの結果は、BSO 併用投与により、GSH 合成能力を低下させたマウスにおいて、より強い肝障害を生じた Fig. 4A の結果からも支持される (Fig. 4B)。

DPH は肝臓において CYP による代謝的活性化を受けることが報告されている (Munns et al., 1997; Cuttle et al., 2000; Roy and Snodgrass, 1988;1990)。そこで DPH 誘導性肝障害マウスモデルに、CYP 阻害剤である ABT を併用処置した結果、DPH/BSO ならびに DPH 単独投与による ALT 値の上昇は有意に抑えられた (Fig. 5C)。また、肝臓中の GSH 含量が DPH 投与により有意に減少することが示されたが、この現象が CYP により代謝的活性化を受けた親電子性反応性代謝物に起因するものと推察し、CYP 阻害剤 ABT が DPH による肝臓中 GSH 含量低下に及ぼす影響を検討した。その結果、ABT 併用処置によって、DPH による GSH 枯渇は有意に抑制された (Fig. 5D)。さらに、CYP 阻害剤処置条件下では、肝臓中 GSH を低下させた状態 (BSO 併用処置条件下) であっても DPH 誘導性肝障害の程度は減弱された (Figs. 5C and 5D)。すなわち、親電子性反応性代謝物は CYP 代謝に依存し、DPH 誘導性肝障害発症における未変化体ならびにグルクロン酸抱合体の寄与は小さいことが考えられた。親電子性物質は GSH 抱合体に変換されるのみならず、細胞のレドックス状態を酸化側にシフトさせることによ

て、いわゆる親電子性ストレスを細胞に与える (Takakusa et al., 2008)。これらのストレスによっても細胞機能が破綻し、細胞変性/壊死へと繋がっていくものと推察された。

酸化ストレスは DILI のみならず、肝虚血再還流障害等においても惹起される組織障害に共通して生じる。例えば、APAP は肝細胞に酸化ストレスを生じさせるとともに、NF-E2 関連因子 (Nrf2) を活性化させ、細胞の対酸化ストレス性を高める (Goldring et al., 2004)。さらに、ROS や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消去に関わるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は DILI 発症における酸化ストレス防御因子として重要であるとされ、ニメスリドおよび APAP 等の薬剤が SOD2 ヘテロノックアウトマウスを用いることで、その肝障害性を感度よく検出できることが報告されている (Fujimoto et al., 2009; Ong et al., 2006)。DPH/BSO 投与群においてタンパク質の終末酸化体であるカルボニル化タンパク質含量の有意な上昇が認められた (Fig. 5B) ことから、親電子性反応性代謝物の生体タンパク質への結合や、それに続くミトコンドリア障害の誘発等が推察され、酸化ストレスの誘発が肝障害発症の一端を担っている可能性が示された。一方で、肝障害発症機序における酸化ストレスを考慮するにあたり、GSH 以外の ROS スカベンジャー、例えば SOD のような分子の異常が、危険因子となっている可能性もある。しかし、本動物モデルにおいては、GSH 枯渇のみで肝障害を再現できたことや、既報から SOD2 ヘテロノックアウトマウスによる肝障害発症の感受性上昇は軽微である上 (Fujimoto et al., 2009; Ong et al., 2006)、ごく限られた薬剤での報告に留まっていることから、SOD2 の機能低下が DILI 発症に与える影響は大きくないものと考えられた。しかし、SOD のような ROS の消去に関わる因子と、肝毒性物質のヒト臨床データに基づいた検証も必要であると考えられる。

肝臓における自然免疫応答は主に Kupffer 細胞により介在される免疫応答である。細菌由来の低分子化合物 LPS や、バクテリア RNA、CpG DNA などによって、TLR シグナルが活性化され (Bianchi, 2007)、下流の NF- $\kappa$ B による転写機構を活性化することにより、サイトカイン等の産生を亢進させる (Schwabe et al., 2006; Kita et al., 2001; Oo and Adams, 2010)。また、RAGE は終末糖化産物 (AGE) の受容体として発見され、TLRs と共に、肝障害時における自然免疫

細胞の活性化に関わっている (Zeng et al., 2009)。本研究においては、TLRs の mRNA 発現量の低下が認められたが、そのリガンドとなる S100A8/9 mRNA 発現量の上昇が認められたことから (Fig. 6A)、TLR あるいは RAGE を介した自然免疫応答の活性化が惹起されている可能性が示された。TLRs mRNA の発現が低下した原因は不明であるが、TLRs は Kupffer 細胞などの免疫細胞のみならず、肝実質細胞にも存在するため、肝臓中の mRNA 発現量を解析した場合、肝実質細胞の mRNA 発現変動の影響が強く現れるものと推察されるが、TLRs mRNA 発現量低下の原因については不明である。

一方で、TLRs のリガンドとなり多くの免疫疾患の原因となる因子の一つとして HMGB1 が報告されている (Schwabe et al., 2006)。HMGB1 は APAP 誘導性肝障害をはじめ、多くの肝障害マウスモデルで肝障害発症における関与が強く示唆されている (Antoine et al., 2009; Higuchi et al., 2012)。DPH/BSO 投与マウスにおいて、肝障害発症に伴って有意な血漿中 HMGB1 タンパク質濃度の上昇が認められ (Fig. 7A)、抗 HMGB1 抗体を併用処置することで血漿中 ALT および AST 値の低下が認められた (Fig. 7B) ことから HMGB1 が DPH 誘導性肝障害発症に関与していることが示された。HMGB1 および S100A8/9 などの DAMPs が、TLRs を介して免疫細胞を活性化させているか検討するため、TLR4 のアンタゴニストであるエリトランを併用処置したところ、血漿中 ALT および AST 値共に低下が認められたことから (Fig. 7C)、HMGB1 および S100A8/9 などの DAMPs が TLR4 を介して、免疫細胞を活性化させているものと推察された。

自然免疫応答により IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインがマクロファージなどから分泌されるが、IL-1 $\beta$  も炎症性サイトカインとして重要な役割を担っている。Yano ら (2012) は、ジクロフェナクによる肝障害マウスモデルにおいて、IL-1 $\beta$  が炎症増悪因子として重要な役割を担っていることを報告している。また、成熟型 IL-1 $\beta$  の産生を促進する NALP3 インフラマソームの活性化が、APAP 誘導性肝障害発症の一端を担っていることが報告されており (Williams et al., 2011)、TLRs のみならず NALP3 活性化による自然免疫応答の活性化も重要であると考え

られる。NALP3 は尿酸結晶や、バクテリア RNA 以外に、ROS によっても活性化されることが報告されているが (Bryant and fitzgerad, 2009; Martinon et al., 2009)、DILI 発症においては反応性代謝物の産生やミトコンドリア障害に続く、ROS の産生亢進による NALP3 活性化が重要であると考えられる。Fig. 4B に示したように、肝障害発症初期における ROS の産生や反応性代謝物の産生が示唆されていることから、DPH 誘導性肝障害においても反応性代謝物やミトコンドリア障害に起因した NALP3 の活性化が惹起されていると考えられた (Figs. 6B and C)。

DAMPs に分類される S100A8/9 mRNA および HMGB1 タンパクは、肝障害発症に伴った変動を示したが、ALT 値のピークが 24-48 時間であることを考慮すると、両者は肝障害発症の比較的初期の段階に発現上昇が認められており (Figs. 6A-C and 7A)、これは肝障害発症において自然免疫応答が発症初期に関与していることを示唆する結果であると言える。TLR4 アンタゴニストである eritoran は敗血症の治療を目的に開発されたリポ多糖 (LPS) の構成成分であるリポド A の構造類似化合物である (Mullarkey et al., 2003)。DPH のみならず APAP などによる肝障害をはじめ、TLR4 による自然免疫活性化が示唆されている肝障害において、エリトランが有効な治療薬となる可能性が示された。

活性化された自然免疫細胞 (Kupffer 細胞など) は IL-6 や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインを放出し、好中球などの細菌殺傷や、死細胞の排除を行う免疫細胞を組織損傷部に遊走させる。それとともに、IL-6 や IL-23 などのサイトカインは Th 細胞の分化促進を行い、獲得免疫反応の構築を行う (Kita et al., 2001; Oo and Adams, 2010)。Fig. 5 に示したように、それぞれの Th 細胞はお互いの分化を抑制し合っており、サイトカインのバランスにより免疫応答の機構が保たれている。本研究においては、Th17 細胞において特異的に高発現を示す ROR $\gamma$ t の mRNA 発現の上昇が認められたが (Fig. 8A)、Th1, 2 および Treg の分化マーカーである T-bet, GATA3 および FoxP3 の mRNA 発現量は抑制されていた (Fig. 8A)。このことから、DPH 誘導性肝障害発症に伴い、Th17 細胞の分化が促進する可能性が示された。Th1 細胞は細胞内の病原体に対して免疫応答を惹起し、FasL や TNF- $\alpha$  を介して病原体感染細胞を殺傷する。Th2

細胞は、IL-4 や IL-5 などの産生を介し、喘息や自己免疫疾患などのアレルギー反応に関与しており、Treg 細胞は IL-10 などの抗炎症性サイトカインに産生を介し、免疫反応を調節するとともに、免疫自己寛容を維持するために重要な役割を担っている (Zhu and Paul, 2008)。Th17 細胞は、IL-17 を産生し、自己免疫疾患などに関与することが報告されており、IL-17 は、MIP-2 や MCP-1 などのケモカインや、IL-23 や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を誘導することで、好中球の遊走や浸潤を促進させることが知られている (Zhu and Paul, 2008)。好中球は、過酸化水素および塩化物イオンから MPO の触媒により次亜塩素酸を産生させるなど、組織傷害を増悪させる直接的な役割を担っており、肝障害の増悪に直接的に寄与していることが知られている (Jaescke, 2006)。本研究において、抗 MPO 抗体を用いた病理学的解析より、肝障害の進展に伴い、好中球の浸潤が促進されていることが示されたことから (Fig. 9C)、好中球が DPH 誘導性肝障害における組織傷害の増悪に直接的に関与していることが示唆された。また、Th17 細胞の DPH 誘導性肝障害発症への役割を解析するため、抗 IL-17 抗体を用いた検討を行った結果、抗 IL-17 抗体により肝障害が緩和されたことから (Fig. 9B)、Th17 細胞により産生される IL-17 が、好中球の浸潤を促進させ、肝障害を増悪させていることが推察された。

IL-17 は好中球の遊走および浸潤に関与するとされているが、IL-1 $\beta$  も IL-17 と類似した好中球遊走機能を持つとされており (Latz, 2010)、IL-17 以外の因子によって好中球の遊走および浸潤が促進されている関与も十分に考えられる。また抗 IL-17 抗体併用処置では DPH 誘導性肝障害は緩和されたが (Fig. 9B)、その程度は TLR4 アンタゴニストや抗 HMGB1 抗体よりも弱いものであった (Figs 7B and C)。各抗体または阻害剤併用処置時における、ターゲットタンパクの機能阻害の強度を検討していないが、各種抗体ならびに阻害剤による阻害の程度が同一だと仮定すると、次のように解釈できる。すなわち、肝障害発症初期に認められる自然免疫応答が獲得免疫より上流に位置するため、抗 IL-17 抗体併用処置よりもエリトランまたは抗 HMGB1 抗体併用処置の方が肝障害緩和の影響が大きかったものと考えられる (Figs. 7B, C and 9B)。本研究で認められた免疫応答機構は、自然免疫の活性化に続き、Th17 細胞による

獲得免疫応答が惹起されていることが推察され、肝障害発症の引き金となる因子として、自然免疫活性化因子が重要であると考えられ、肝障害発症機序を理解する上で重要であると考えられる。

PGE<sub>1</sub> は好中球による組織の炎症反応を沈静化させることが知られており、肝障害時に肝組織において好中球の浸潤が認められているハロタンおよびカルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウスを用いた研究から、薬物誘導性肝障害治療薬としての有用性が示されている (Kobayashi et al., 2009; Higuchi et al., 2012)。また、PGE<sub>1</sub> は本邦において閉塞性血栓血管炎治療薬として用いられていることから、安全性が担保されており、臨床での使用が想定できる。本研究において、PGE<sub>1</sub> 投与により血漿中 AST および ALT 値の低下が認められた (Fig. 10A) と共に、MPO 陽性細胞の低下 (Fig. 10C)、および好中球の遊走ならびに浸潤を促進させるケモカインである MIP-2 および MCP-1 の低下が認められた (Fig. 10B)。PGE<sub>1</sub> 投与によるこれらの変化は、好中球の浸潤および遊走を抑制していることを示しており、PGE<sub>1</sub> が DPH 誘導性肝障害の治療薬として有用である可能性が示された。

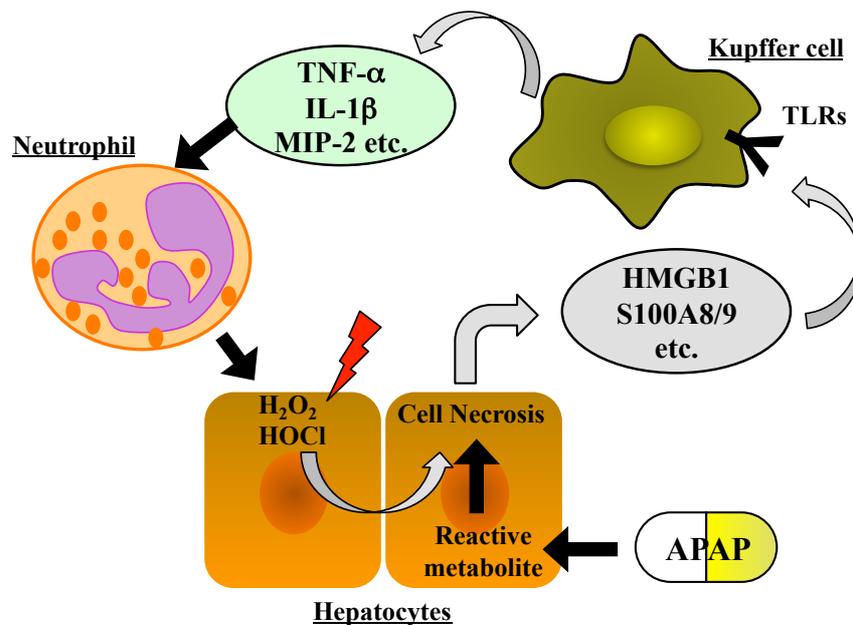
以上より、DPH 誘導性肝障害は、TLR4 を介した自然免疫応答に引き続く Th17 細胞による獲得免疫系の活性化が惹起され、その結果顕著な好中球の浸潤および遊走を招き、肝障害の増悪を招いている可能性が示された。

### 第 III 章 DPH 誘導性肝障害モデルマウスにおける

#### チオール抱合体の検出と肝障害発症における CYP 代謝の関与

##### 第 1 節 緒言

第 II 章では、GSH 合成阻害薬である BSO を前処置し、DPH を 5 日間反復投与することで DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作製し、肝障害発症に伴って自然免疫および獲得免疫機構の活性化が引き起こされ、肝障害を増悪に招いていることを示した。DILI 誘導性肝障害の発端となる事象は、反応性代謝物の生成と考えられている。反応性代謝物はミトコンドリア障害の誘起や、タンパク質との共有結合を介して細胞毒性を招くとされている (Zhou et al., 2005)。APAP 誘導性肝障害発症機序に関する研究は精力的に行われており、反応性代謝物の産生から免疫応答に至るまでの機序がいくつか示されている (Adams et al., 2010, Fig. 11)。DPH 誘導性肝障害発症を理解するにあたって、代謝的活性化を考慮する必要がある。DPH は自身の主要薬物代謝酵素である CYP2C および CYP3A を誘導することが知られており (Chaudhry et al., 2010; Fleishaker et al., 1995)、CYP によるさらなる代謝的活性化が DILI 発症の引き金として関与している可能性が考えられる。そこで本章では、肝障害に寄与する反応性代謝物の検出、ならびに CYP 代謝の肝障害発症への関与について詳細な検討を行った。



**Fig. 11. Mechanisms of APAP-induced liver injury.**

This figure was created by modification of a report by Adams et al (2010).

DPH の代謝経路は、ラットおよびヒト肝ミクロソーム画分を用いた *in vitro* 研究で詳細に検討されている (Komatsu et al., 2000; Yamazaki et al., 2001)。ヒトおよびラットにおける DPH の代謝経路は明らかにされており (Fig. 2)、主要代謝物である 4'-HPPH は、ヒトでは CYP2C9、ラットでは CYP2C11 によって生成される。4'-HPPH は CYP2C9 および CYP3A4 によりさらに酸化されカテコール体となる。カテコール体は、自然酸化されて反応性に富んだ *o*-キノン体へと変換され、タンパク質と共有結合を形成することが報告されている (Munns et al., 1997)。また、4'-HPPH 生成過程において、不安定なキノン体およびアレンオキシドが生成する (Roy and Snodgrass, 1988; 1990)。アレンオキシドはエポキシドヒドロラーゼによって触媒される H<sub>2</sub>O との反応を介し、キノン環が開裂し、安定なジヒドロジオール体へと変換される。DPH 代謝物によるタンパク質との共有結合についても詳細に検討されており、CYP 代謝依存的なタンパク共有結合体の生成が認められている (Munns et al., 1997; Leeder et al., 1992; Cuttle et al., 2000)。そのタンパク質のターゲットとして CYP2C9 と CYP3A4 が挙げられており、DPH による発疹、発熱および肝障害を発症した患者の血清中から抗 CYP2C9 抗体が検出されている (Leeders et al.,

1992)。また、DPH の CYP 代謝依存的なタンパク質への共有結合は、Cys、NAC および GSH などの求核性物質存在下で、強く抑制されることが報告されている (Munns et al., 1997; Roy and Snodgrass, 1988;1990)。さらに、第 II 章で明らかにしたように、DPH 反復投与に加え、BSO を併用投与することで強い肝障害が認められた (Fig. 4B) ことから、親電子性反応性代謝物によるタンパク質への共有結合が DPH 誘導性肝障害を誘起している可能性が考えられる。

反応性代謝物は、一般に極めて不安定であるため、そのものを検出することはできないが、GSH 存在下における最終安定生成物である GSH 抱合体は親電子性反応性代謝物の生成の指標となっており、ダンシル蛍光標識 GSH を用いた *in vitro* トラッピングアッセイなどが確立されている (Gan et al., 2005)。これまでに DPH の GSH 抱合体の存在を示唆する報告がいくつかある。例えば、グルタチオン枯渇剤であるジエチルマレイミド (DEM) 処置をしたラットに DPH を投与すると、DEM 非処置群と比較して、肝臓におけるタンパクとの共有結合体形成が多いこと (Roy and Snodgrass, 1988)、ヒト肝ミクロソームを酵素源とした際の CYP 代謝依存的な DPH とタンパクとの共有結合体形成が、GSH またはシステインの添加によって低下することが報告されている (Munns et al., 1997)。したがって、肝障害発症に関与する反応性代謝物は GSH 抱合をうけることが推察される。しかし、DPH の GSH 抱合体については *in vitro* の研究から、その存在が推察されるものの、GSH をはじめとするチオール抱合体代謝物の存在を証明した報告はない。そこで本章では、DPH 誘導性肝障害発症に伴う DPH 代謝プロファイルを検討するにあたり、DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁および血漿中からチオール抱合体代謝物の検出を試みた。

DPH は CYP 誘導能を有することから、DPH 反復投与によって代謝プロファイルが変化することが考えられる。また、ヒトにおいて DPH 誘導性肝障害は 1-8 週間の反復投与によって発症することから、反復投与による代謝プロファイル変化を検討することは重要であると考えた。CYP 誘導により肝障害への感受性が高まる例として APAP が挙げられる。APAP は CYP2E1 あるいは CYP3A などの CYP 誘導剤前処置により、APAP による肝障害が増強する

(Kostrubsky et al., 1997; Sinclair et al., 1998)。APAP から反応性代謝物である NAPQI への代謝が亢進したためと考えられており、CYP が誘導された動物を用いることは肝障害の高感度な検出や特異体質性 DILI の検出など、毒性試験への応用に繋がることが考えられる。そこで、DPH 反復投与による CYP への影響ならびに CYP 誘導または阻害による DPH 誘導性肝障害への影響も併せて検討した。

## 第 2 節 実験材料および方法

### III-2-1 試薬

ABT, BSO および DPH の購入先は I-2-2 に準じた。フェノバルビタールは和光純薬より、ケトコナゾールは LKT Laboratories (St. Paul, MN, USA) より購入した。グルコース 6リン酸 (G6P)、グルコース 6リン酸脱水素酵素 (G6PDH) および $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP<sup>+</sup>) はオリエンタル酵母 (東京) より購入した。ヤギ抗マウス Cyp3a モノクローナル抗体 (sc-30621) はサンタクルーズ (Santa Cruz, CA)より、ウサギ抗ラット CYP2C13 ポリクローナル抗体 (マウス Cyp2c に交差反応を示す) は積水メディカル (茨城) より購入した。ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 イモビロン-P は日本ミリポア (東京) より購入した。メタノールおよびアセトニトリルは関東化学 (東京) の HPLC 用を使用した。その他の試薬は全て特級または生化学用のものを用いた。

### III-2-2 動物の処置および生体材料の調製

動物およびその飼育環境は II-2-3 に準じた。胆汁中の GSH 抱合体の検出には、II-2-4 に記載された方法で DPH を 5 日間反復投与し、DPH 最終投与 3 時間後に胆管にポリエチレンチューブ PE-5 (エイコム、京都) を留置し、個体毎に覚醒拘束下で、DPH 最終投与 6 時間後まで継続的に胆汁を採取した。血漿中の Cys および NAC 抱合体の検出には、II 章の実験で得ら

れた DPH/BSO 投与群の DPH 最終投与から 24 時間後の血漿を用いた。Cyp 発現量と酵素活性を評価するために DPH 投与前 (Day 0)、および DPH 投与後 Day1, 2 および 4 において、II-2-4 に準じて肝臓を採取し、使用に供するまで、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて保管した。

KTZ 併用処置の検討では、DPH 最終投与 1 時間前に、コーン油に溶解した KTZ 50 mg/kg (10 mL/kg) で腹腔内投与した。KTZ の投与量は既報 (Soo et al., 2010) に準拠した。DPH 最終投与から 24 時間後に II-2-4 の方法に従って採血および剖検を行い、血漿 ALT 値と肝臓中 GSH 含量を測定した。また、DPH および KTZ を腹腔内投与した 1 時間後に肝臓を採取し、Cyp 酵素活性の評価に供した。PB による CYP 誘導の検討では生理食塩水に溶解した PB 80 mg/kg (10 mL/kg) を 4 日間腹腔内投与した後、生理食塩水に溶解した BSO 700 mg/kg (10 mL/kg) を腹腔内投与した。BSO 投与から 1 時間後にコーン油に溶解した DPH を 100 mg/kg (10 mL/kg) で単回経口投与した。DPH 投与直後および 6 時間後に、エーテル麻酔下で尾静脈採血し、さらに 24 時間後に採血および剖検を行い、血漿 ALT 値を測定した。PB による CYP 誘導を検討するために、前述した方法に従い PB を 4 日間投与したマウスの肝臓を回収した。本実験におけるすべての動物実験は金沢大学動物実験指針に従って実施した。

### III-2-3 DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁中 GSH 抱合体および血漿中 Cys または NAC 抱合体の分析

III-2-2 で採取した胆汁をプールし、そのうちの 20  $\mu\text{L}$  に等量のアセトニトリルを加え、13,000 g で 3 分間遠心し、上清を分析に用いた。また、DPH 誘導性肝障害モデルマウスの血漿 20  $\mu\text{L}$  に 40  $\mu\text{L}$  のアセトニトリルを加え、13,000 g で 3 分間遠心分離し、上清を分析に用いた。液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) には、HP1200 高速液体クロマトグラフィーシステム (HPLC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) および飛行時間型質量分析計を装備した Q-TOF Ultima (Micromass, Manchester, UK) を用いた。カラムには、Sun Shell 2.6  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  2.1 mm I.D. クロマニックテクノロジーズ (大阪) を使用した。移動相は、10

mM ギ酸アンモニウム中のアセトニトリル濃度勾配 (95-65% 15 分、65-5% 2 分、5-95% 1 分および 95% 7.9 分) で、流速は 0.2 mL/min とした。エレクトロスプレーイオン化は 120°C で、陽イオンモードで 2.8 kV、陰イオンモードでは 3.2 kV で行った。コリジョンガスにはアルゴンを用い、コリジョンエネルギーは 5 eV、コーン電圧は 35 V、脱溶媒温度は 250°C とした。コーンガスおよび脱溶媒ガスには窒素を用い、流速はそれぞれ 800 l/h および 100 l/h とした。Q-TOFMS から得られたデータは、質量分析解析用ソフトウェア Metabolynx (Waters, Milford, MA, USA)) を用いて解析し、チオール抱合体の探索を行った。MS/MS フラグメンテーション時のコリジョンエネルギーは 10-40 eV に設定した。検出された代謝物の構造は、MS/MS で得られたフラグメンテーションパターンから推定した。

### III-2-4 血漿中 DPH ならびに代謝物濃度測定

DPH 誘導性肝障害モデルマウスの血漿 5  $\mu$ l に 20  $\mu$ l のアセトニトリルと 20  $\mu$ l の内標準溶液 (10 nM ベラパミル) を加え、混合した後、13,000 g で 3 分間遠心分離し、上清を分析に用いた。液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) には、Acquity UPLC システム (Waters) およびトリプル四重極型 MS/MS を装備した Waters XevoTQ (Waters) を用いた。カラムには、Acquity UPLC BEH C18 カラム (1.7 mm, 30 mm  $\times$  1.1 mm, I.D., Waters) を使用した。移動相は、DPH, 4'-HPPH, Cys-DPH および NAC-DPH の定量には、10 mM ギ酸アンモニウム/アセトニトリル濃度勾配 (98% 0.5 分、80% 1.1 分、65% 0.4 分、2% 0.5 分および 98% 0.5 分) とし、流速は 0.5 mL/min とした。DPH のジヒドロジオール体、DPH-Glu および 4'-HPPH O-Glu の定量には、上述の移動相でのギ酸アンモニウムの代わりにギ酸を用い、アセトニトリル勾配および流速は上述と同様とした。それぞれの代謝物は多重反応モニタリング (MRM) で検出した。検出したそれぞれの化合物の  $m/z$  を Table 2 に示す。Xevo TQ MS の分析条件は、キャピラリー電圧 0.5 kV、ソース温度 150°C、脱溶媒温度 600°C とし、コーンガスおよび脱溶媒ガスには窒素を用い、流速はそれぞれ 100 l/h および 1200 l/h とした。コリジョンガスにはアルゴ

ンを用い、流速は0.15 mL/minとした。DPH および 4'-HPPH の血漿中濃度は、ピーク面積を指標とし、検量線を作製することで算出した。それ以外の代謝物に関しては、代謝物が市販されていなかったため、当該のピーク面積を、内標準物質（ベラパミル）のピーク面積で除した、相対値により血漿中濃度推移を解析した。DPH および 4'-HPPH においては、標準物質の MS/MS フラグメントパターンより、当該のフラグメントが DPH および 4'-HPPH 由来であることを確認し、それ以外の標準物質が入手できなかった代謝物に関しては、MS/MS フラグメントパターン分析により、代謝物の構造を推定した。

**Table 2**  
**MS/MS conditions for the Xevo TQ MS instrument.**

Compound	Mass	MRM transition	Ion mode (ES)	CV (V)	CE (eV)
DPH	253.04	253.04 > 182.00	positive	30	20
4'-HPPH	269.03	269.03 > 198.10	positive	30	15
DPH-Glu	427.11	427.11 > 251.10	negative	25	15
4'-HPPH O-Glu	443.11	443.11 > 267.10	negative	25	15
Dihydrodiol	285.09	285.09 > 242.10	negative	25	15
Cys-DPH	370.10	370.10 > 283.10	negative	25	15
NAC-DPH	412.10	412.10 > 283.10	negative	25	15
IS (verapamil)	455.00	455.00 > 165.00	positive	40	30

*Abbreviations:* CE, collision energy; CV, cone voltage; Cys-, cysteine-conjugated; DPH, phenytoin; ES, electrospray source; Glu, glucuronide; IS, internal standard; MRM, multiple reaction monitoring; NAC-, N-acetylcysteine-conjugated.

### III-2-5 肝ミクロソーム画分におけるミダゾラムおよびトルブタミド水酸化酵素活性測定

肝ミクロソーム画分は Emoto ら (2000) の方法に従って調製した。肝ミクロソーム画分タンパク質濃度は、ヒトγ-グロブリンを標準物質としてブラッドフォード法 (Bradford, 1976) により測定した。肝ミクロソームにおけるミダゾラム (MDZ) およびトルブタミド (TOL) 水酸化酵素活性は Emoto ら (2000) の方法に従って測定した。

### III-2-6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロットティング

Laemmli (1970) の方法に従って SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動ならびに、ウェスタンブ

ロットティングを行った。Cyp2c および Cyp3a 解析には、それぞれ 1  $\mu$ g または 4  $\mu$ g の肝マイクローム画分を 7.5% の SDS-ポリアクリルアミドゲルに添着し、電気泳動した。泳動後、タンパク質をゲルから Immobilon P PVDF 膜に転写した。膜を Odyssey blocking buffer (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) でブロッキング後、一次抗体 (ウサギ抗 Cyp2c ポリクローナル抗体あるいはヤギ抗 Cyp3a モノクローナル抗体) で処理した後、蛍光標識体結合二次抗体 (IRDye 680 ロバ抗ヤギ IgG 抗体または、IRDye 680 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 Li-COR Biosciences) で処置し、Odyssey Infrared Imaging system (Li-COR Biosciences) を用いて検出し、バンド強度を定量化した。

### III-2-7 統計学的解析

II-2-8 に準じた。

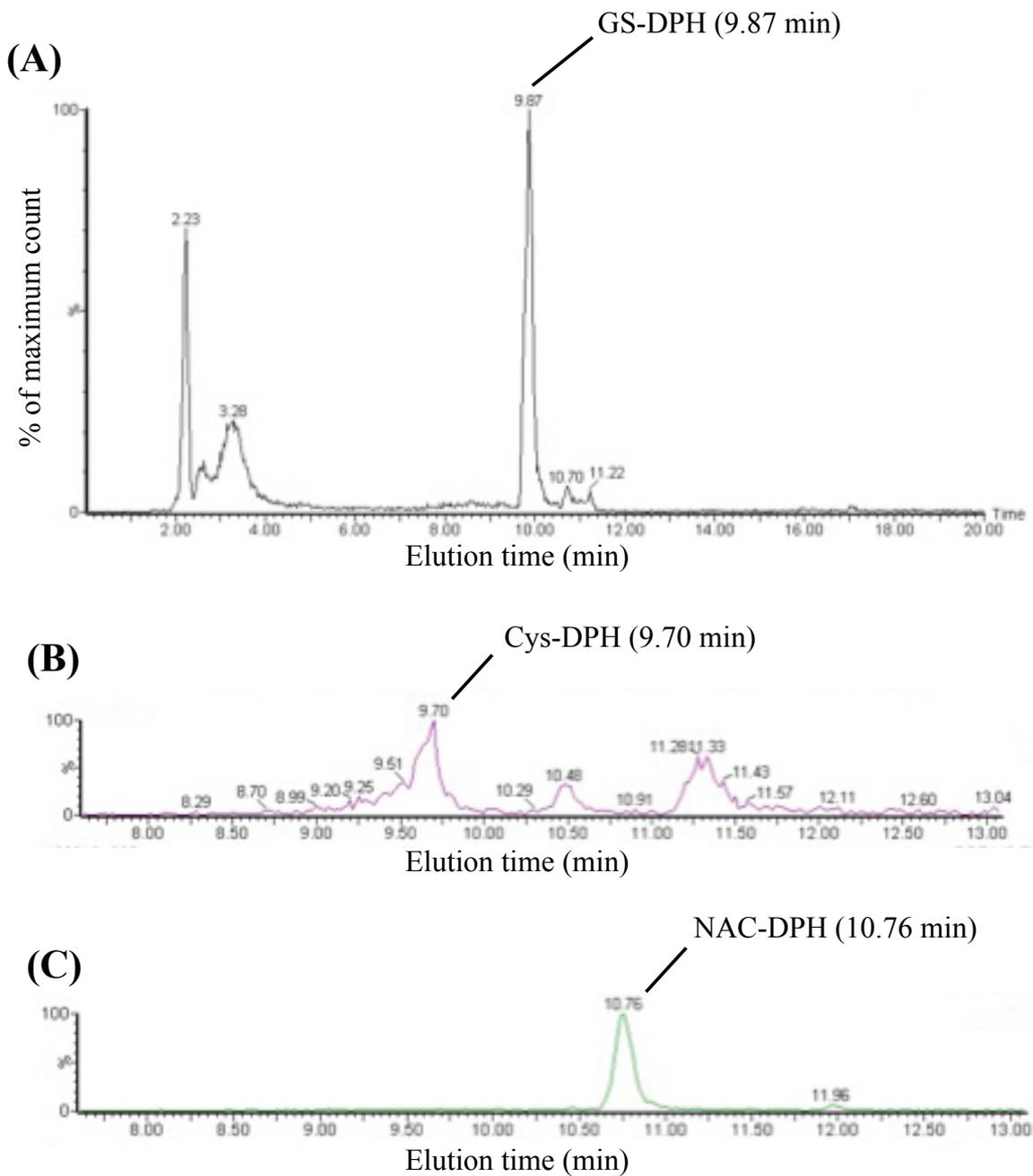
## 第 3 節 実験結果

### III-3-1 DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁中のチオール抱合体の検出および構造推定

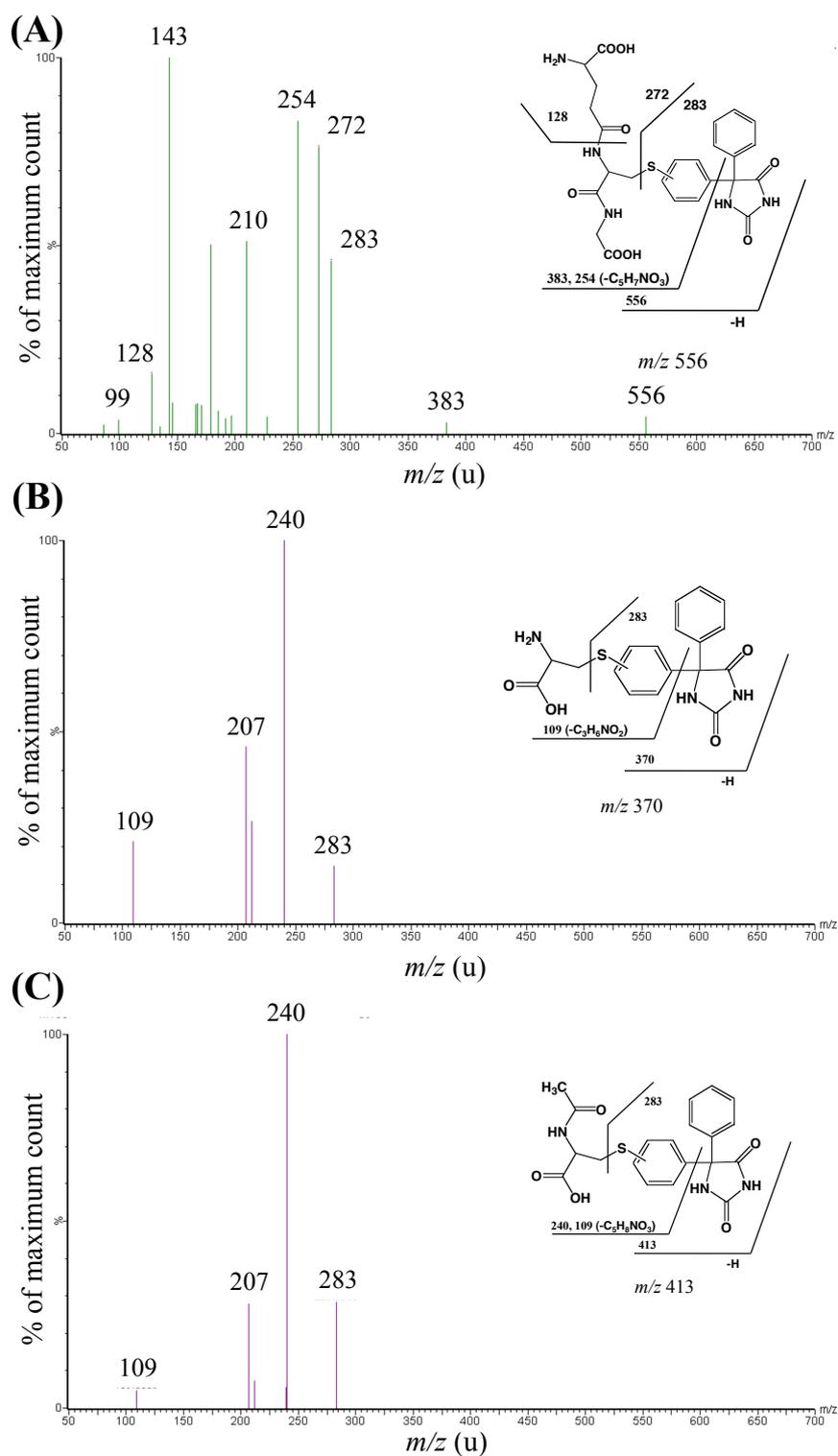
DPH 誘導性肝障害モデルマウス (DPH 単独投与マウス) の DPH 最終投与 3-6 時間後の胆汁を用いて、LC-MS/MS でチオール抱合体の検出を試みた。129 u のニュートラルロスキャンにより GSH 抱合体を探索したところ、溶出時間 9.87 分に主要なピークが認められた (Fig. 12A)。このピークの MS を Fig. 13A に示すが、DPH にグルタチオンが付加した [M-H]<sup>-</sup> に相当する  $m/z$  556 のシグナルが認められた。さらに、グルタチオンのピログルタミン酸を示す  $m/z$  128、GSH の C-S 結合の開裂によって生じる  $m/z$  272、およびベンゼン環に GSH が付加されていることを示す  $m/z$  383 のシグナルが認められた。これらの結果から、DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁中に DPH の GSH 抱合体が存在していることが示唆された。他にこれまでに報告がされていない DPH 代謝物は検出されなかった。

### III-3-2 DPH 誘導性肝障害モデルマウスの血漿におけるチオール抱合体の検出および構造推定

DPH 誘導性肝障害モデルマウス (DPH/BSO 投与マウス) の DPH 最終投与 24 時間後の血漿を用いて、同様に GSH に特徴的なピログルタミン酸の開裂に由来する 129 u のニュートラルロススキャン (Baillie and Davis, 1993) を行ったが、ピークは認められなかった (data not shown)。GSH 抱合体代謝物は、一般に肝臓および腎臓に発現する $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼにより、GSH に含まれるグルタミン酸とグリシンが取り除かれ、速やかにシステイン抱合体へと変換されるため (Meister and Anderson, 1983)、血漿中では GSH 抱合体の存在量は少ないものと推察された。また、システイン抱合体は最終的に *N*-アセチルトランスフェラーゼによって NAC 抱合体へと変換される。そこで、DPH の  $m/z$  251 に Cys (121 u) または NAC (163 u) 分の分子量が付加された  $m/z$  370 および 413 のイオンを selected reaction monitoring (SRM) で探索したところ、それぞれ、9.7 分と 10.7 分にピークが認められた (Figs. 12B and 12C)。Cys 抱合体と推定される  $m/z$  370 のイオンの MS/MS スキャンでは、システインの C-S 結合の開裂に由来する  $m/z$  283 のシグナルが認められ、また、ベンゼン環に Cys に含まれる S 元素が結合していることを示す  $m/z$  109 のシグナルが検出された (Fig. 13B)。NAC 抱合体と推定される  $m/z$  413 のイオンの MS/MS スキャンでは、NAC の C-S 結合の開裂に由来する  $m/z$  283 のシグナルおよびベンゼン環に NAC が付加していることを示す  $m/z$  240 のシグナル、ベンゼン環に NAC 由来の S 元素が付加されたことを示す  $m/z$  109 のシグナルが検出された (Fig. 13C)。これらの結果は、分析した 3 個体の血漿ですべて同じであった。これらのチオール抱合体は、アレンオキシド体が GSH 抱合を受け、最終的に NAC 抱合体へと代謝されることを示していると考えられた。以上の結果から、DPH 誘導性肝障害モデルマウスの血漿中に DPH の Cys および NAC 抱合体が存在することが示唆された (Fig. 14)。



**Fig. 12.** LC-MS/MS analysis of GS-DPH adducts in bile (A), and Cys-DPH (B) and NAC-DPH adducts (C) in plasma of the DPH-induced liver injury mice. MS spectrum of GS-DPH, Cys-DPH and NAC-DPH at 9.87 min, 9.70 min and 10.76 min of the elution time, respectively.



**Fig. 13.** LC-MS/MS analysis of GS-DPH in bile, and Cys-DPH and NAC-DPH adducts in plasma of the DPH-induced liver injury mice.

Mice were intraperitoneally injected DPH at a dose of 50 mg/kg for 2 days and then orally administered at a dose of 3 days. The plasma was collected at 24 h after the final DPH administration. The bile was collected at 3 to 6 h after the final DPH administration. The bile pooled of 4 mice was used for the LC-MS/MS analysis. MS spectrum of the parent  $M^-$  ion  $m/z$  556,  $m/z$  413 and  $m/z$  370 were observed at 9.8, 10.7 and 9.7 min of the elution time, respectively. Product ion spectrum of the each of parent  $M^-$  ion was detected in the bile (A) and plasma (B and C).

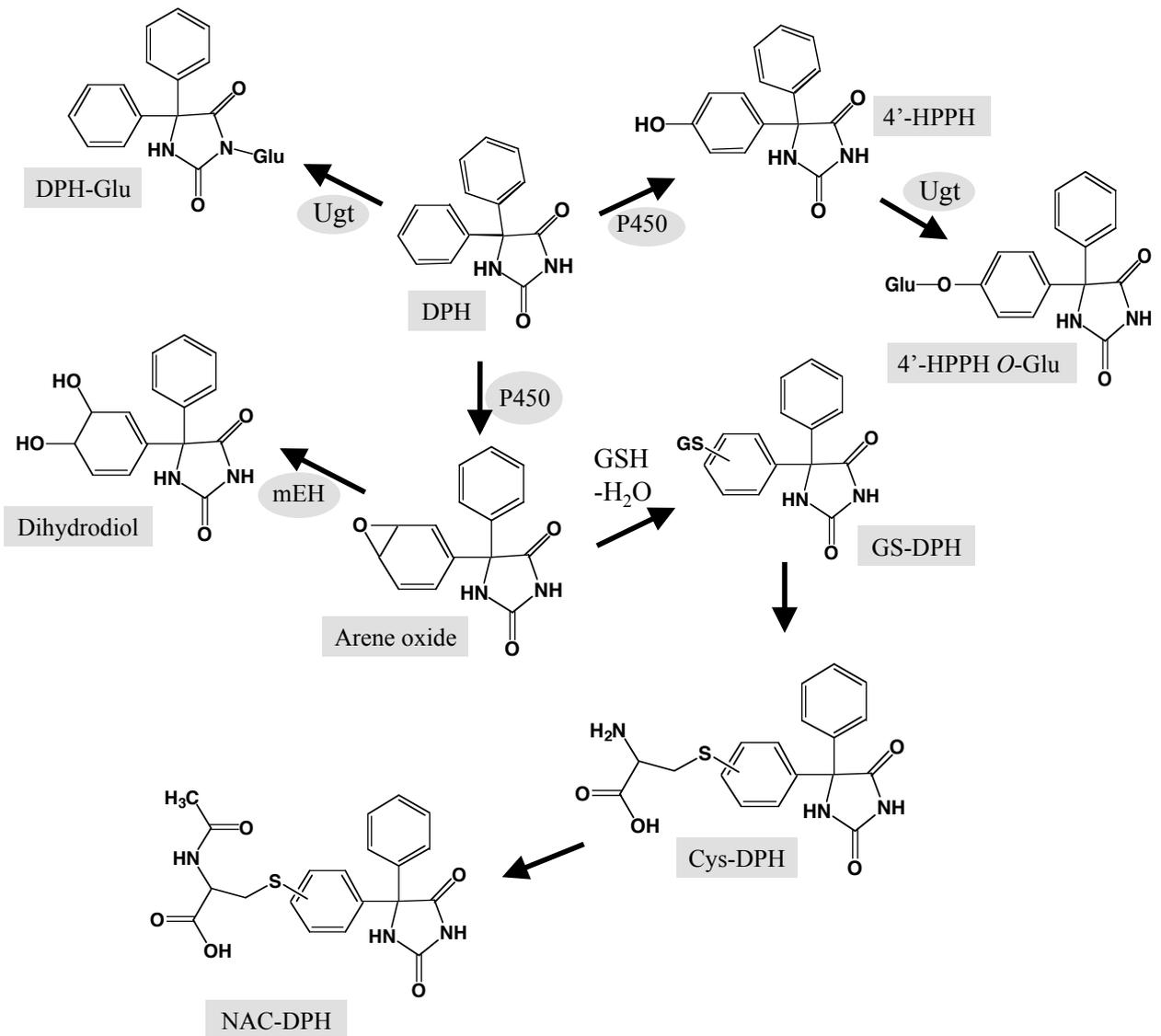


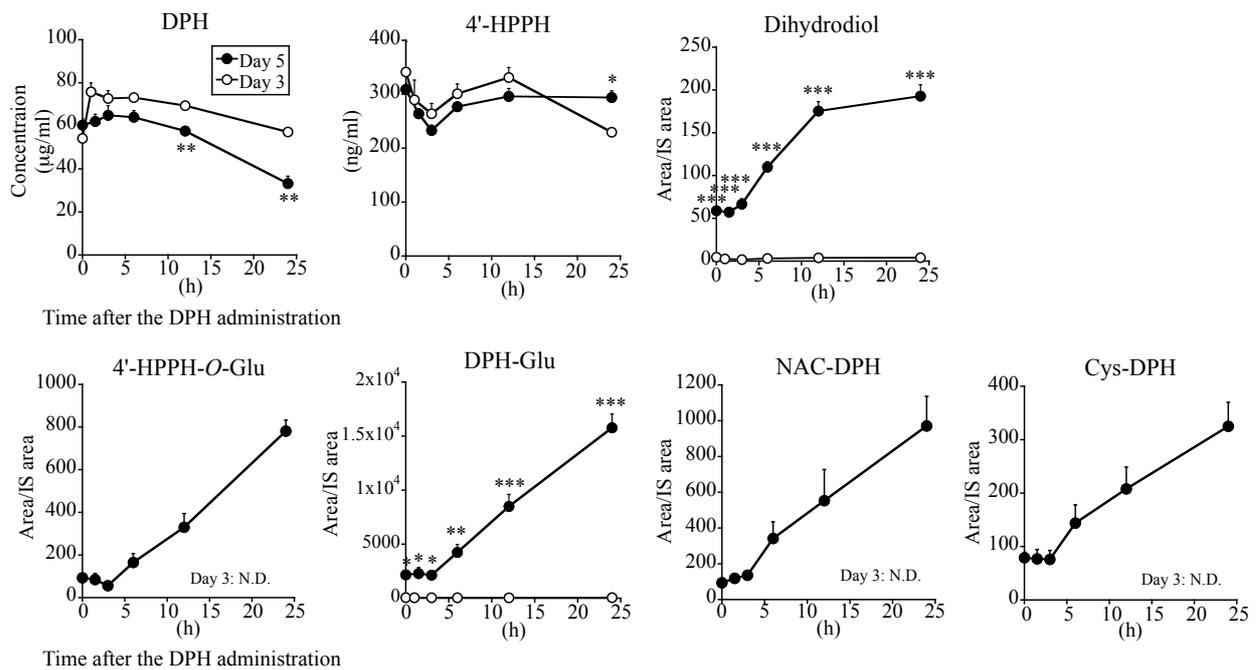
Fig. 14. Proposed metabolic pathways of DPH in mice with DPH-induced liver injury.

### III-3-3 DPH とその代謝物の血漿中濃度推移

Day 3 および Day 5 における DPH およびその代謝物の血中濃度推移を Fig. 15 に示す。

DPH の血漿中濃度推移は Day 3 および Day 5 とともに非常に緩やかであり、DPH 投与後 3-6 時間にかけて上昇が認められ、その後、緩やかな低下が認められた。Day 5 において、DPH 投与 0 時間の血漿中濃度を除き、Day 3 と比較して有意な低値を示した。主要代謝物である 4'-HPPH は Day 3 および Day 5 とともにほぼ同じ推移を示したが、DPH 投与から 24 時間後において Day 5 の血漿中濃度が Day 3 と比較して高い濃度を示した。ジヒドロジオールは、Day 3 よりも Day 5 で有意に高い濃度を示した。4'-HPPH O-Glu は、Day 3 では検出限界以下であった。

が、Day 5 では検出可能であり、時間依存的な血漿中濃度の上昇が認められた。DPH-Glu は、ジヒドロジオールと同様に、Day 3 と比較して Day 5 で有意に高い血漿中濃度を示した。NAC-DPH および Cys-DPH は、Day 3 で検出限界以下であったが、Day 5 で時間依存的な血漿中濃度の上昇が認められた。以上より、肝障害非未発症時の Day 3 と比較して肝障害発症時の Day 5 では DPH の代謝が亢進されていることが示された。



**Fig. 15. Changes in the plasma concentration of DPH and its metabolites in DPH-induced liver injury mice.**

Mice were intraperitoneally injected DPH at a dose of 50 mg/kg for 2 days and then orally administered at a dose of 3 days. BSO was intraperitoneally injected at a dose of 700 mg/kg at 1 h prior to the each of DPH administration. At 0, 1.5, 3, 6, 12, and 24 h after the 2 days intraperitoneal DPH administration (indicated as day 3) and after the final DPH administration (indicated as day 5), the blood was collected for assessment of DPH and its metabolites in plasma. The data are shown as the means  $\pm$  SEM of the results from 6 to 12 mice. Differences compared with mice on the day 3 in each time points were considered significant at  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$ .

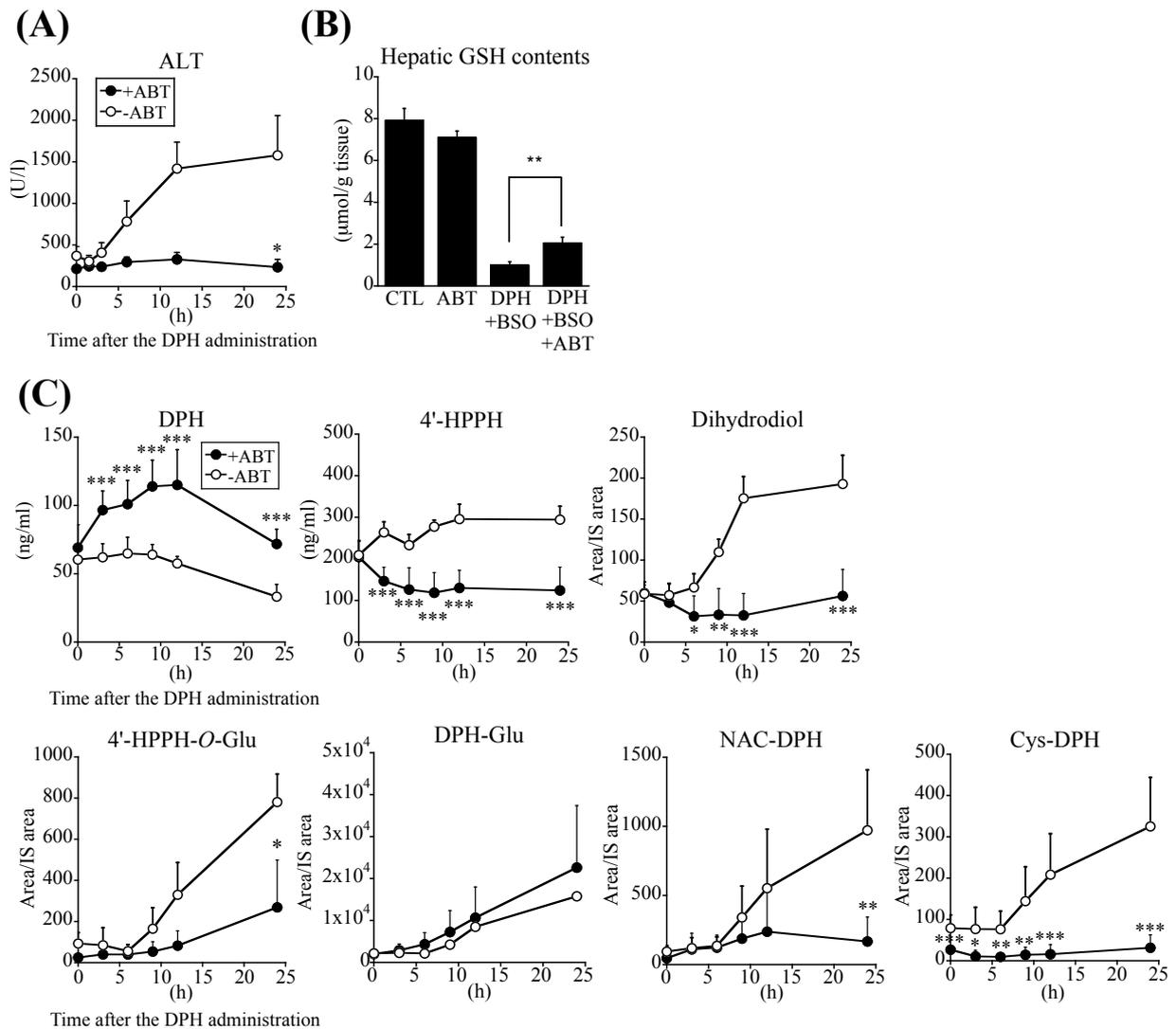
### III-3-4 ABT 併用処置による血漿中 ALT 値推移の変化および肝臓中 GSH 含量の変化

ABT 併用処置時および非併用処置時の DPH/BSO 投与マウスの、DPH 最終投与後の血漿中 ALT 値の推移を示す (Fig. 16A)。ABT 処置により、いずれの時点においても血漿中 ALT 値は、ABT 非処置群と比較して低値を示し、DPH 最終投与 24 時間後においては有意な低値

を示した。従って、ABT 併用処置により DPH 誘導性肝障害が緩和されることが示された。また、DPH 最終投与 24 時間後の肝臓中 GSH 含量を Fig. 16B に示すが、ABT 処置群では DPH/BSO 投与マウスの肝臓中グルタチオン含量は有意に高値を示した。以上より、CYP 代謝により産生される親電子性反応性代謝物が肝障害発症に関与している可能性が示された。

### III-3-5 ABT 併用処置による DPH の代謝プロファイルの変化

ABT 処置ならびに非処置群における DPH 最終投与後の血漿中 DPH および代謝物の血漿中濃度推移を示す (Fig. 16C)。DPH は、ABT 処置により DPH 最終投与 3-24 時間後にかけて、ABT 非処置群と比較して有意な高値を示した。4'-HPPH は ABT 処置により、DPH 最終投与 3-24 時間後にかけて、ABT 非処置群と比較して有意な低値を示し、ジヒドロジオール体においては、6-24 時間後にかけて、有意な低下を示した。DPH-Glu 文字 は、ABT 処置群と非処置群間で差が認められなかったが、4'-HPPH *O*-Glu は、DPH 最終投与 24 時間後において、ABT 非処置群と比較して有意な低下を示した。ABT 処置により、Cys-DPH はいずれの時点においても、NAC-DPH は DPH 最終投与 24 時間後において有意な低値を示した。以上より、ABT 併用処置により、CYP 代謝依存的に生成される代謝物の産生が阻害されていることが示された。また、代謝物の産生抑制に伴い、DPH の血漿中濃度の上昇が認められ、DPH の代謝が阻害されていることが示された。



**Fig. 16. Effects of ABT treatment on DPH-induced liver injury in mice.**

Mice were intraperitoneally given DPH at a dose of 50 mg/kg for 2 days followed by oral administration of 100 mg/kg DPH on days 3 through 5. BSO (700 mg/kg) was intraperitoneally injected 1 h prior to each DPH administration. ABT (100 mg/kg), a non specific inhibitor of P450, was intraperitoneally given 1 h prior to the final DPH administration. At 0, 3, 6, 9, 12, and 24 h after the final DPH administration, the blood was collected for measure the plasma ALT levels (A) and DPH and its metabolites concentrations (C). The livers were collected at 24 h after the final DPH administration to measure the hepatic GSH contents (B). The data are shown as the means  $\pm$  SE of the results from 4 to 12 mice. The differences compared with non-ABT-treated mice in each time point were considered significant at  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  (A and C), and the differences compared with the non-ABT-treated mice were considered significant at  $**P < 0.01$  (B).

### III-3-6 DPH 誘導性肝障害に対する KTZ 併用処置の影響

DPH の代謝的活性化に Cyp 代謝が関与するのか検討するため、Cyp2c および Cyp3a 阻害剤である KTZ の DPH 誘導性肝障害に対する影響を検討した。その結果、DPH 最終投与 24 時間後の血漿中 ALT 値は、KTZ 併用処置では溶媒対照群と比較して有意な低値を示した

(Fig. 17A)。

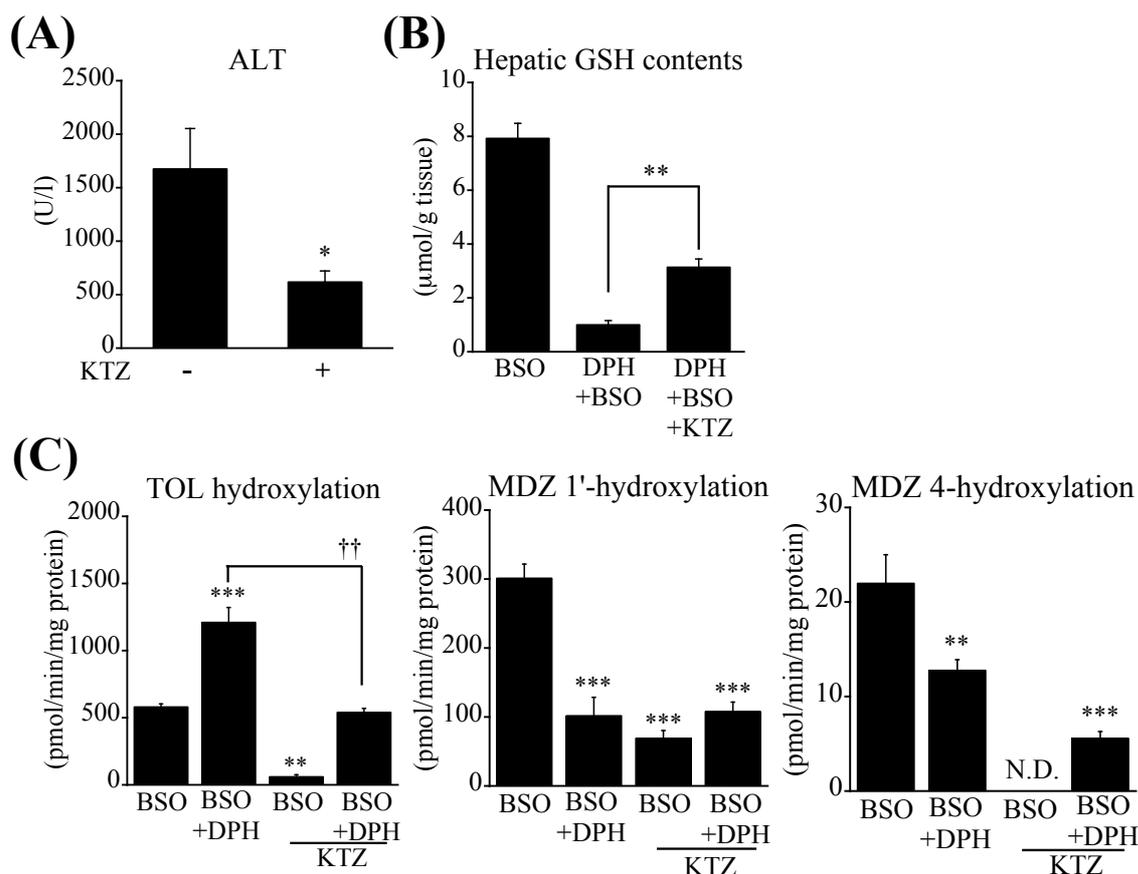
DPH 最終投与から 24 時間後の時点における肝臓中 GSH 含量を Fig. 17B に示す。BSO 単独投与群では、BSO 投与から 24 時間以上経過していることもあり、正常の GSH 含量である 8  $\mu\text{g/g tissue}$  とほぼ同等の値が得られ、GSH 含量は低下していないことが示された。DPH/BSO 処置群においては、BSO 単独投与群と比較して GSH 含量は低値を示したが、KTZ 併用処置により、KTZ 非処置群と比較して高値を示した。したがって、Cyp 代謝によって GSH 抱合を受ける反応性代謝物が生成され、その反応性代謝物が肝障害発症に関与することが示唆された。

### III-3-7 KTZ 処置が肝ミクロソーム画分における CYP 酵素活性に与える影響

KTZ 処置により、DPH 代謝に関わるとされている肝ミクロソーム中の Cyp2c および Cyp3a 酵素活性が低下しているか検討するため、KTZ 併用処置時および非併用処置時の肝ミクロソーム画分における酵素活性を測定した。Cyp2c の指標活性として、TOL 水酸化酵素活性を、Cyp3a の指標活性として MDZ 水酸化酵素活性をそれぞれ測定した (Fig. 17C)。TOL 水酸化酵素活性は、DPH/BSO 投与群で、BSO 投与群と比較して有意な高値を示したことから、DPH 反復投与により Cyp2c が誘導されていることが示された。一方で KTZ を併用処置された BSO 投与群および DPH/BSO 投与群は、KTZ 非併用処置の対照群と比較して低い TOL 水酸化酵素活性を示した。また、KTZ 処置された DPH/BSO 群の TOL 水酸化酵素活性は、BSO 投与群と同等の値を示した。したがって、DPH により誘導された Cyp2c 酵素活性を、KTZ が阻害していることが示された。

MDZ 1'-OH 生成酵素活性は、DPH/BSO 投与群は BSO 単独投与群と比較して低値を示したことから、DPH 反復投与は Cyp3a 酵素活性を低下させることが示された。また、KTZ 併用処置によって BSO 単独投与群の MDZ 1'-OH 生成酵素活性はより低値を示したが、DPH/BSO 投与群においては変化が認められなかった。MDZ 4-OH 生成酵素活性は、DPH/BSO 投与群

は BSO 投与群と比較して低い酵素活性を示した。また、BSO 投与群は KTZ 併用処置によって MDZ 4-OH 生成酵素活性は低値を示したが、DPH/BSO 投与群においては、KTZ 併用処置による変化は認められなかった。したがって、DPH は Cyp3a 酵素活性を阻害することが示された。また、DPH/BSO 投与群において Cyp3a 酵素活性の低下は認められなかった。



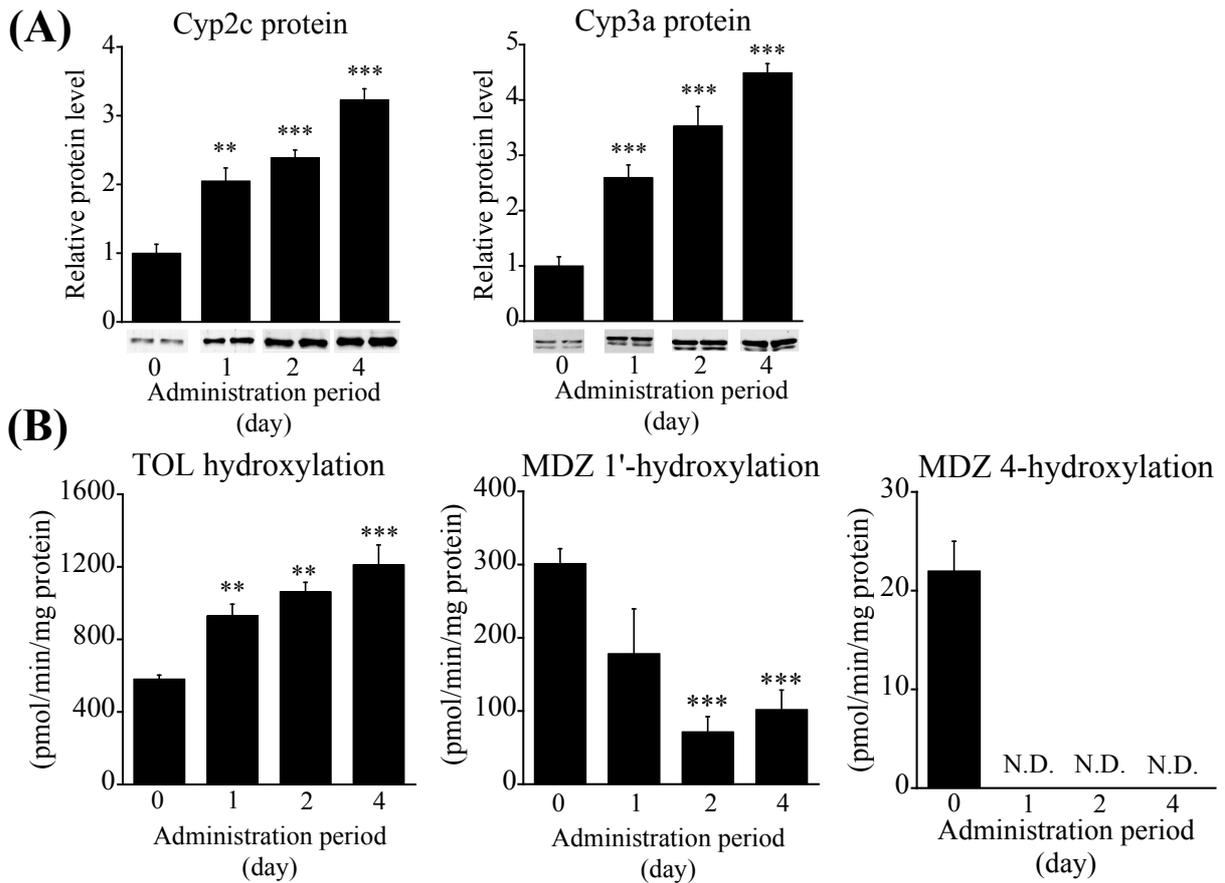
**Fig. 17. Effects of ketoconazole on DPH-induced liver injury in mice.**

Mice were intraperitoneally injected DPH at a dose of 50 mg/kg for 2 days and then orally administered at a dose of 2 days. BSO was intraperitoneally injected at a dose of 700 mg/kg at 1 h prior to the each of DPH administration. Cyp inhibitor, KTZ (50 mg/kg in corn oil) was intraperitoneally injected 1 h prior to the final DPH administration. At 24 h after the final DPH administration, plasma and livers were collected for assessment of plasma ALT levels and hepatic GSH contents, respectively (A and B). To assessment for the effects of Cyp inhibitor on hepatic Cyp enzyme activities, hepatic microsomes were prepared from Mice immediately before the finale DPH administration. Microsomal Cyp2c and 3a activities were assessed by the method described as Fig. 16. The data are shown as the means  $\pm$  SEM of the results from 4 to 5 mice. Differences compared with the non-inhibitor treated mice or BSO alone treated mice were considered significant at  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.01$ .  $\dagger\dagger P < 0.01$ , N.D., Not detected.

### III-3-8 肝ミクロソーム画分における Cyp2c および Cyp3a タンパク質発現量および酵素活性の測定

DPH 反復投与により、Cyp2c および Cyp3a の誘導が誘起されているか検討するため、DPH/BSO 投与マウスの Day 0, 1, 2 および 4 における肝ミクロソーム画分に発現する CYP 分子種のウェスタンブロッティングを行った (Fig. 18A)。DPH 投与日数に比例して、Cyp2c および Cyp3a タンパク質発現量は、Day 0 (DPH 未処置時点) と比較してそれぞれ約 3 倍または 4.5 倍の有意な高値を示した。したがって、DPH 反復投与により Cyp2c および Cyp3a タンパク質発現が誘導されることが示された。

TOL 水酸化酵素活性は、Day 1, 2 および 4 において、Day 0 (DPH 未処置時点) と比較して有意な高値を示した (Fig. 18B)。一方、Cyp2c および Cyp3a により触媒される MDZ 1'位水酸化酵素活性は DPH 投与により Day 1, 2 および 4 のいずれの時点においても、Day 0 と比較して低値を示し、Day 2 および 4 は有意な低値を示した。Cyp3a によって触媒される MDZ 4 位水酸化体酵素活性は Day 1, 2 および 4 のいずれの時点においても検出限界値 (2 pmol/min/mg protein) 以下の活性であった。DPH 反復投与により Cyp2c 酵素活性が上昇したことから、DPH 反復投与による CYP 代謝亢進の原因の一部は Cyp2c 酵素活性の上昇に起因することが示唆された。



**Fig. 18. Effects of DPH administration on Cyp2c and 3a protein expressions and its enzyme activities.**

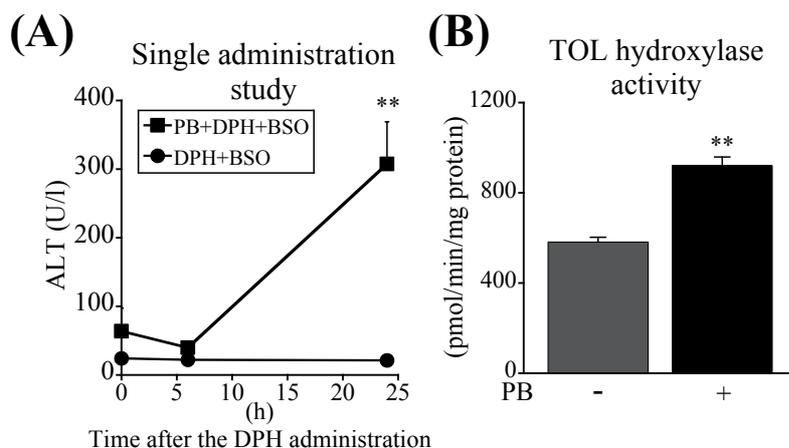
Mice were intraperitoneally injected DPH at a dose of 50 mg/kg for 2 days and then orally administered at a dose of 2 days. BSO was intraperitoneally injected at a dose of 700 mg/kg at 1 h prior to the each of DPH administration. Hepatic microsomes were prepared 24 h after the 0, 1, 2, and 4 times after DPH administration. Microsomal Cyp2c and 3a contents were assessed by Western blotting analysis. The quantitative analysis of protein expression was performed using densitogram (A). Microsomal Cyp2c activity and 3a activity were evaluated by tolbutamide hydroxylation, and midazolam 1'- and 4-hydroxylation using high-performance liquid chromatography, respectively (B). The data are shown as the means  $\pm$  SEM of the results from 4 to 5 mice. Differences compared with the 0 times of DPH administration mice were considered significant at  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.01$ . N.D.: Not detected.

### III-3-9 PB 前処置が DPH 誘導性肝障害発症に与える影響

肝障害は DPH の反復投与によって発症し、単回投与では BSO 併用処置によっても発症しなかった (Fig. 4)。DPH による Cyp 誘導が関与していることが示されたため、典型的な Cyp 誘導剤を投与することで、DPH 単回投与で肝障害が誘発されるか検討した (Fig. 19A)。その結果、PB を前処置したマウスにおいては、DPH 単回投与 24 時間後において、PB 非処置マウス

と比較して血漿中 ALT 値が有意に高値を示した (約 300 U/l) が、DPH 反復投与による肝障害 (約 800 U/l) よりも低値を示した。

PB 投与群の肝ミクロソーム画分における TOL 水酸化酵素活性を Fig. 19B に示す。PB 非処置群と比べて有意な高値を示したことから、PB 投与により Cyp2c が誘導されていることが示された。したがって、DPH 誘導性肝障害発症には Cyp 誘導に伴う DPH 代謝の亢進が必要であることが示唆された。



**Fig. 19. Potentiate effects of Cyp2 inducer phenobarbital on development of DPH-induced hepatotoxicity by single DPH administration.**

Mice were intraperitoneally injected PB (80 mg/kg) for 4 days and orally administered DPH (100 mg/kg) on the day 5. BSO was intraperitoneally injected 1 h prior to the DPH administration. At 0, 6, and 24 h after the DPH administration, the plasma were collected for assessment of plasma ALT levels. To assessment of hepatic Cyp2c activities, the livers were collected at 24 h after the 4 times PB treatment (80 mg/kg for 4 days). Cyp2c activities were determined according to the method same as Fig. 18. The data are shown as the means  $\pm$  SEM of the results from 4 to 5 mice. Differences compared with the non-PB treated mice were considered significant at  $**P < 0.01$ .

#### 第4節 考察

過去の研究において、ラット *in vivo* で DPH の反応性代謝物を検討した報告によると、反応性代謝物とタンパク質の共有結合体の形成が GSH 枯渇下で増加し、アレンオキシドを加水分解するエポキシドヒドロラーゼの阻害剤トリクロロプロペンオキシド (TCPO) を前処置することでも増加するとされている (Roy and Snodgrass, 1988)。つまり、アレンオキシドが反応性代謝物と

して生成されていることが示唆されている。一方、ヒト肝ミクロソーム画分を用いた報告から、CYP 代謝依存的なタンパク質共有結合体は、DPH を基質とした時よりも、4'-HPPH を基質とした際に多かったことから、反応性代謝物は 4'-HPPH から産生される *o*-キノン体と示唆されている (Munns et al., 1997)。これらの報告では GSH や Cys によりタンパク質共有結合体形成の抑制が認められていることから、生体においてチオール抱合体代謝物が生成することが推察されるが、チオール抱合体の存在を直接証明した報告はない。そこで本研究において、LC-MS/MS を用いて DPH 誘導性肝障害モデルマウスの胆汁および血漿からチオール抱合体代謝物を検出したところ GS-DPH、Cys-DPH および NAC-DPH に由来すると考えられる代謝物が検出された (Figs. 13A-C)。これらのチオール抱合体はいずれも DPH のベンゼン環にチオールが結合した構造であることが推察された。

DPH の反応性代謝物として推定されているアレンオキシドと *o*-キノン体が GSH 抱合された場合、前者は、3'位または 4'位に GSH が結合することで、3'または 4'にそれぞれ GSH または水酸基が結合した代謝物へと変換され、脱水反応により水酸基が外れ、DPH のベンゼン環に GSH が結合した GSH 抱合体が生成されると推定される。アレンオキシドをはじめとするエポキシドは、同様の機序で GSH 抱合体が生成されることがベンゼンやチエニル酸で報告されている (Ross et al., 1996; Nishiya et al., 2008)。一方で、後者の *o*-キノン体の場合は、2'あるいは 5'位に GSH が結合し、最終的にキノンが還元され、カテコール体として安定に存在すると推測されるが、本研究においてカテコール体を示唆する MS ピークは検出されなかった。したがって、本研究で検出されたチオール抱合体は、アレンオキシド生成に続く GSH 抱合を経たのち、脱水反応によって GS-DPH が生成され、さらにメルカプツール酸経路によって代謝された Cys-DPH および NAC-DPH と推察された。II-3-4 の結果から DPH 単独投与によって肝臓中 GSH 含量が低下したこと (Fig. 4A)、BSO 併用処置によって DPH 誘導性肝障害が増悪したことから (Fig. 3B)、肝臓中 GSH 含量の低下と、BSO による肝障害の増悪は、親電子性代謝物であるアレンオキシド体の生成を介して引き起こされていることが示唆された。

本モデルマウスにおける血漿中 DPH および代謝物濃度を測定したところ、DPH の最大濃度はおよそ 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4'-HPPH は 0.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった (Fig. 15)。一方で、ヒトにおける血漿中の最大濃度はそれぞれ 52  $\mu\text{g}/\text{mL}$  および 1.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と報告されている (Vasko et al., 1980; Kerb et al., 2001)。このことから、本マウスモデルにおける DPH の暴露条件は臨床と大きく乖離していないと考えられる。しかし、代謝物である 4'-HPPH 濃度は、DPH 誘導性肝障害モデルマウスにおける血漿中濃度がヒトより低値を示していることから、マウスはヒトより 4'-HPPH 生成能が低いと考えられる。したがって、DPH 誘導性肝障害発症において、CYP 依存的な代謝的活性化が必要であると仮定すると、マウスはヒトより肝障害を発症しにくいと推察され、このことが DPH 誘導性肝障害を実験動物で再現できない原因の 1 つとなっている可能性がある。

本研究における DPH 誘導性肝障害モデルマウスは、DPH の 5 日間の反復投与により肝障害を発症するが、DPH 単回投与では BSO 併用処置によっても肝障害は発症しない (Fig. 4)。このことは DPH の反復投与により、生体の生理機能的変化が誘起され、肝障害が発症しやすい条件へと変化していることを示唆している。II-3-6 の結果より、免疫応答は肝障害発症に伴った変動であったため、免疫機構以外の因子により、肝障害発症の発端となる事象が誘起されていると考えられた。ヒトにおける DPH 誘導性肝障害も、DPH 服用から発症まで 1-8 週間を要することから (Mullick and Ishak, 1980)、DPH 連投による生体の生理機能変化が推察される。DPH の反復投与により、ヒト、ラットおよびマウスにおいて CYP2C および CYP3A が誘導されることが知られている (Chaudhry et al., 2010; Fleishaker et al., 1995; Yamazaki et al., 2001; Hagemeyer et al., 2010)。これらの CYP 分子種は DPH 代謝に関与しており、DPH 連投により、DPH の代謝プロファイルが変化する可能性が考えられる。CYP 誘導は薬剤併用時に、意図しない薬物相互作用を招く恐れがあり、留意すべき事象とされているが、DILI 発症と関連づけた報告はほとんどない。DPH 誘導性肝障害モデルマウスの代謝プロファイルを解析した結果、肝障害発症時の Day 5 ではグルクロン酸抱合体を含め、いずれの代謝物の濃度も、肝障害発症時の Day 3 と比較して高値を示した (Fig. 15)。このことから、DPH 反復投与により CYP による

酸化代謝反応およびグルクロン酸抱合反応が亢進することが示された。ヒトにおいて、DPH のグルクロン酸抱合反応を触媒する UGT1A が DPH によって誘導されることが示唆されており、DPH-Glu の生成が DPH 反復投与により増加した結果は、Ugt1a の誘導に起因する可能性が考えられる (Sytherland et al., 1993)。興味深いことに、Cys-DPH および NAC-DPH は Day 3 では検出されず、肝障害発症時の Day 5 のみにおいて検出されたことから、親電子性反応性代謝物であるアレンオキシドの生成は、DPH の反復投与により強く促進されることが示唆された。これらの結果から、DPH 誘導性肝障害発症において DPH 反復投与による代謝プロファイルの変化が、肝障害発症の引き金として一端を担っている可能性が示された。

一方で、CYP 阻害剤 ABT を DPH 誘導性肝障害モデルマウスに併用処置することで肝障害が緩和された (Fig. 16A)。ABT 併用処置による DPH の代謝プロファイルの変化を解析したところ、DPH-Glu 以外の代謝物濃度は、ABT 処置により低値を示した (Fig. 16C)。血漿中 DPH 濃度は、ABT 非処置群と比較して、ABT 処置群で 2 倍以上に高値を示したことから、DPH のクリアランスに Cyp 代謝の寄与が大きいと考えられた。また、ABT 併用処置により 4'-HPPH *O*-Glu の血漿中濃度が低下を示したが、これは ABT 併用処置により 4'-HPPH 生成量が低下した結果、4'-HPPH *O*-Glu 産生量も低下したものと推察される (Fig. 16C)。肝障害発症時点の DPH 代謝が肝障害未発症時点と比較して亢進されていることと、CYP 阻害によって肝障害が緩和されたことから、CYP 代謝の亢進が肝障害発症に関与していると考えられた。特に、BSO により DPH 誘導性肝障害が増悪することを考慮すると、グルタチオン抱合を受けるアレンオキシド体が毒性発現に関与していると考えられる。

KTZ は一般に CYP3A4 を阻害するが、高用量で処置することで、CYP2C に対する阻害作用も示す (Emoto et al., 2003)。本検討では、Cyp2c 酵素活性の阻害による肝障害の緩和を期待して、DPH 誘導性肝障害モデルマウスに KTZ 併用処置した。その結果、溶媒対照群と比較して肝障害の緩和が認められ (Fig. 17A)、さらに肝臓中 GSH 含量が溶媒対照群と比較して有意に高値を示した (Fig. 17B)。このことから、KTZ は DPH 誘導性肝障害発症に関与する反応

性代謝物の生成を抑制していることが示された。次に、KTZ 併用処置による肝ミクロソーム画分における CYP 酵素活性への影響を検討したところ、Cyp2c 酵素活性の指標となる TOL 水酸化酵素活性が、KTZ 処置により顕著に低下することが示された (Fig. 17C)。以上より、Cyp2c が DPH 誘導性肝障害発症に寄与する反応性代謝物の生成の一端を担っている可能性が示された。一方で、DPH/BSO 投与マウスにおいて、Cyp3a 酵素活性の指標とされる MDZ 1'-OH および 4-OH 生成酵素活性は、KTZ 併用処置により有意な変動は認められなかった (Fig. 17C)。しかし、BSO 単独投与マウスに KTZ を併用処置した際には、MDZ 1'-OH および 4-OH 生成酵素活性が有意に低下していることから (Fig. 17C)、本検討における KTZ 投与条件は Cyp3a 酵素活性を阻害する十分な投与容量であったことが考えられる。DPH/BSO 投与マウスにおいて、KTZ による MDZ 1'-OH および 4-OH 生成酵素活性の低下が認められなかった原因として、DPH の反復投与において、MDZ 1'-OH および 4-OH 体の生成酵素活性が既に低下していることに起因すると考えられる (Fig. 17C)。前述したように、DPH は Cyp3a に対して mechanism based inhibition (MBI) を誘起する可能性が示されており (Fig. 18B)、KTZ 併用処置前に、DPH が MBI により Cyp3a 酵素活性を阻害することで、KTZ による Cyp3a 酵素活性阻害効果が認められなかったものと推察される。

本検討において、Cyp2c が DPH 誘導性肝障害の発症に重要な反応性代謝物の生成に関与していることが示唆されたが、ヒトにおいては CYP2C9 および CYP2C19 の遺伝子多型が DPH 誘導性肝障害のリスクファクターとして関係しないことが報告されている (Pachkoria et al., 2007)。本研究において、CYP 誘導と GSH 含量の低下という 2 つの因子によって DPH 誘導性肝障害発症リスクが高まる可能性を示した。したがって、CYP の遺伝子多型のみならず、GST や  $\gamma$ -GCS の遺伝子多型を合わせて考慮することで、これらの因子がリスクファクターとして DPH 誘導性肝障害に関与しているのか、明白になることが期待される。

DPH 反復投与による代謝プロファイル変化の原因を解明するため、DPH の主要薬物代謝酵素である Cyp2c および Cyp3a を解析した。DPH 反復投与により肝ミクロソーム中の Cyp2c およ

び Cyp3a タンパク質量が DPH 投与期間依存的に高値を示した (Fig. 18A)。Cyp2c における誘導は Day 0 と比較して、肝障害発症の直前の Day 4 でおよそ 3 倍、Cyp3a においてはおよそ 4 倍と高く、DPH により Cyp2c および Cyp3a タンパク質発現量が上昇することが示され、これらの Cyp 誘導が DPH 代謝亢進に繋がっていることが示唆された。DPH はヒトおよびマウスにおいて、プレグナン X 受容体 (PXR) および構成的アンドロスタン受容体 (CAR) を介し、CYP3A および CYP2C を誘導するとの報告があり (Jackson et al., 2004; Chaudhry et al., 2010; Luo et al., 2002)、本検討で認められた Cyp2c および Cyp3a タンパク質の増加は (Fig. 18A)、これらの受容体を介したものと考察される。マウスにおける MDZ 1'-OH 酵素活性は、Cyp3a のみならず Cyp2c によっても触媒されることが Cyp2c ノックアウトマウスを用いた実験から示されている (Waterschoot et al., 2008)。一方で、MDZ 4'-OH 酵素活性は Cyp3a 選択的であることが示されている。本検討においては、DPH 反復投与により TOL 水酸化酵素活性が上昇し、MDZ 1'-OH 酵素活性の低下が認められたことから、DPH により Cyp2c 酵素活性は増加し、Cyp3a 酵素活性が阻害されていることが示唆された (Fig. 18B)。さらに、マウス Cyp3a 選択的に触媒される MDZ 4-OH 酵素活性は、DPH 投与によって検出限界以下にまで低下した (Fig. 18B)。したがって、DPH 反復投与により Cyp2c および Cyp3a タンパク質の発現誘導が誘起され、Cyp2c 酵素活性の上昇が認められることが示された。しかし、Cyp3a は、DPH 反復投与によりタンパク質発現が高値を示したにも関わらず、酵素活性は減少し、タンパク質発現量と酵素活性が相反する結果となった (Figs. 17A and B)。DPH はヒト肝ミクロソーム画分において、CYP 代謝依存的に CYP3A と共有結合を形成することから (Munns et al., 1997)、DPH は CYP3A に対して MBI を誘起することが推察される。また、ラットに 20 日間 DPH を反復投与させた検討において、CYP3A1/2 タンパク質の発現誘導が認められるにも関わらず、その酵素活性は低下するとの報告もある (Yamazaki et al., 2001)。このことから、本検討においても、Cyp3a タンパク質増加の一方、MBI により Cyp3a 酵素活性の低下が認められたものと推察された。DPH の CYP3A に対する共有結合は、*o*-キノン体によると推察されている (Munns et al., 1997)。*o*-キノン体の生成は、

4'-HPPH の水酸化によって生成するカテコール体が自然酸化されることで生成されることが示唆されており、このカテコール体の生成には CYP3A が主要薬物代謝酵素として関与することが報告されている (Yamazaki et al., 2001)。これらの報告を踏まえると、本検討において認められた Cyp3a に対する MBI は *o*-キノン体によって生じたものと推察される。しかし、本研究の胆汁および血漿中代謝物分析において、カテコール体および *o*-キノン体を示唆する代謝物は認められなかった。したがって、*o*-キノン体の生成が非常に微量であり、速やかに CYP へ共有結合してしまうため、血漿および胆汁からの検出が困難であった可能性、あるいは *o*-キノン体以外の反応性代謝物、アレンオキシドによって MBI が引き起こされた可能性が考えられる。MBI は毒性発現と関与すると推察されており、time-dependent inhibition (TDI) アッセイにより、CYP に対する MBI 形成、すなわち CYP 酵素活性の時間依存的な抑制強度を指標に評価する方法が、反応性代謝物の生成評価法として医薬品開発研究において採用されている (Riley et al., 2007) ことから、Cyp3a への MBI も DPH 誘導性肝障害発症機序の一端を担っている可能性がある。

DPH の単回投与では、BSO 併用処置によっても肝障害を発症しない (Fig. 4)。Cyp 酵素誘導が DPH 誘導性肝障害発症に重要であることを検討するため、Cyp2b, Cyp3a および Cyp2c の誘導剤である PB を反復投与後に DPH を単回投与したところ、肝障害の発症が認められた (Fig. 19A)。このことから、CYP 誘導により DPH 誘導性肝障害発症のリスクが上昇することが示され、DPH 反復投与が肝障害発症に必要な理由の一部として、Cyp の誘導が考えられた。また、PB 前処によって Cyp2c の酵素活性が上昇していたことから (Fig. 19B)、Cyp2c による代謝反応が肝障害発症に繋がる反応性代謝物生成の一端を担っている可能性が示された。ヒトにおいては APAP の他、イソニアジドが CYP 誘導により肝障害発症のリスクが高まることが示唆されており (Yue and peng, 2009)、今回用いた CYP 誘導剤前処置動物を毒性試験に応用することにより、CYP の触媒で代謝的に活性化される薬物による毒性の高感度な検出や、特異体質性毒性の検出が可能になることが期待される。

## 第 IV 章 総 括

医薬品の開発にあたって実施される *in vivo* 毒性試験には一般に正常動物が用いられる。しかし、薬物を服用するヒトの多様性から、特異体質性の副作用が生じることもふまえると、正常動物を用いた毒性試験のみで副作用予測を行うことは困難である。特異体質性 DILI の発症原因の1つとして、薬物の代謝過程における反応性代謝物の生成や、免疫機構の活性化などが考えられているが、これらの要因も含め *in vivo* において DILI 発症機序を体系的に解析した報告は少ない。本研究では特異体質性 DILI を発症することが知られている DPH による肝障害発症機序を解析した。

第 II 章では、DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作製し、肝障害発症に伴う免疫・炎症関連因子の関与を検討した。DPH 誘導性肝障害は、DPH の連投および BSO 併用処置によって発症したことから、肝臓中 GSH の枯渇と DPH の反復投与が肝障害発症のリスクファクターとなることが示唆された。肝障害発症に伴い自然免疫の活性化が認められ、肝障害発症の早期から免疫応答が誘起されていることが示された。また、肝障害発症時には獲得免疫機構による炎症反応の増強が認められ、自然免疫応答とそれに続く獲得免疫機構が協調することで肝障害の増悪へと進展させていることが示された。この結果を踏まえ、自然免疫応答活性化の引き金となる TLR4 のアンタゴニストである eritoran の肝障害に対する治療効果を検討し、肝障害治療薬としての可能性を示すとともに、肝障害時の免疫活性化の引き金として TLR4 活性化が重要であることを示した。

第 III 章では、DPH 誘導性肝障害発症における、薬物代謝の関与について検討を行い、薬物連投による肝障害発症機序の一端として、Cyp 自己誘導による反応性代謝物生成亢進が関与していることを示した。また、肝障害発症に関与する代謝物として、これまでに報告されていないチオール抱合体を検出した。さらに Cyp2c 自己誘導によるアレンオキシド生成亢進と肝臓中 GSH の低下が肝障害のリスクファクターとなる可能性を示し、*in vivo* 肝障害モデル動物を用

いることで薬物代謝と肝障害との関連について詳細な知見を得ることができた。

ヒトにおいて DILI を引き起こす多くの薬物は長期間の服用後に肝障害を発症することから、本研究で明らかにした薬物連投による肝障害発症機構は、他の薬物誘導性肝障害発症機序においても共通した機構である可能性があり、医薬品開発における研究に対して有用な知見となると思われる。また、CYP が誘導された動物を用いることで、反応性代謝物の生成が示唆されている薬物による肝障害発症リスクを評価することができる可能性が示された。本研究では Cyp 誘導動物の肝障害検出への応用を考え PB による Cyp 誘導マウスを用いたところ、DPH 単回投与では誘発できなかった肝障害の惹起に成功し、Cyp 誘導動物が反応性代謝物による毒性の検出に有用であることが示された。

以上、本研究では DPH 誘導性肝障害モデルマウスを作製し、免疫応答機構ならびに薬物代謝を考慮することで DILI 発症機構の一端を明らかにするとともに、肝障害発症に重要な因子を考察することができた。これらの知見を毒性試験に応用することを考えると、BSO による GSH 枯渇動物、CYP 誘導剤処置動物、ならびに免疫応答の異なる系統の動物を適切に用いることが考えられ、従来の正常動物を用いた毒性試験のみからは予測の困難な特異体質性と呼ばれる DILI の一部も予測可能になることが期待される。一方で、ヒトにおける肝障害の臨床病理は多様性に富むことから、あるひとつの薬物によって発症する肝障害に限っても複数のリスクファクターが存在することが推察される。今後、臨床研究と非臨床研究が一体となった研究によって、ヒトにおける DILI 発症のリスクファクターの詳細が明らかになることが期待される。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御懇篤なる御指導を賜りました金沢大学 大学院 医薬保健学総合研究科 薬学系 薬物代謝安全性学研究室 教授 中島美紀 博士、ならびに名古屋大学 大学院 医学系研究科 教授 横井毅 博士に深謝致します。本研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました同研究室 助教 深見達基 博士に厚く御礼申し上げます。

肝病理診断をはじめ、貴重なご助言、ご援助をいただきました富山大学 医学部 病理診断学講座 准教授 (現 徳島大学 医学部 環境病理学 教授) 常山幸一 博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、実験への御協力ならびに貴重な御助言をいただきました田辺三菱製薬株式会社 薬物動態研究所 岩村篤 氏ならびに久米俊行 博士に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり、御助言ならびに実験への御協力をいただきました元 金沢大学 大学院 医薬保健学総合研究科 薬学系 薬物代謝化学研究室 松尾研太郎 氏ならびに高井翔平 氏に感謝すると共に、実験に御協力いただきました小田祐輝 氏、飯田あずみ 氏をはじめとする金沢大学 大学院 医薬保健学総合研究科 薬学系 薬物代謝安全性学研究室の皆様へ感謝の意を表します。

## 参考文献

- Adams DH, Ju C, Ramaiah SK, Uetrecht J and Jaeschke H (2010) Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicol Sci* **115**:307-321.
- Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Jenkins RE, Regan SL, Sathish JG, Kitteringham NR and Park BK (2009) High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis *in vivo*. *Toxicol Sci* **112**:521-531.
- Baillie TA and Davis MR (1993) Mass spectrometry in the analysis of glutathione conjugates. *Biol Mass Spectrom* **22**:319-325.
- Benoit M, Desnues B and Mege JL (2008) Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* **181**:3733-3739.
- Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**:1-5.
- Bilzer M, Roggel F and Gerbes AL (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* **26**:1175-1186.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Bryant C and Fitzgerald KA (2009) Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol* **19**:455-464.
- Burne MJ, Elghandour A, Haq M, Saba SR, Norman J, Condon T, Bennett F and Rabb H (2001) IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *J Leukoc Biol* **70**:192-198.
- Burstein AH, Cox DS, Mistry B and Eddington ND (1999) Phenytoin pharmacokinetics

following oral administration of phenytoin suspension and fosphenytoin solution to rats.

*Epilepsy Res* **34**:129-133.

Chaudhry AS, Urban TJ, Lamba JK, Birnbaum AK, Rimmel RP, Subramanian M, Strom S, You JH, Kasperaviciute D, Catarino CB, Radtke RA, Sisodiya SM, Goldstein DB and Schuetz EG (2010) *CYP2C9\*1B* promoter polymorphisms, in linkage with *CYP2C19\*2*, affect phenytoin autoinduction of clearance and maintenance dose. *J Pharmacol Exp Ther* **332**:599-611.

Church LD, Cook GP and McDermott MF (2008) Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**:34-42.

Deng X, Luyendyk JP, Ganey PE and Roth RA (2009) Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: hints from animal models. *Pharmacol Rev* **61**:262-282.

Dhar GJ, Pierach CA, Ahamed PN and Howard RB (1974) Diphenylhydantoin-induced hepatic necrosis. *Postgrad Med* **56**:128-134.

Drew R and Miners JO (1984) The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochem Pharmacol* **33**:2989-2994.

Emoto C, Murase S, Sawada Y, Jones BC and Iwasaki K (2003) *In vitro* inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**:287-295.

Emoto C, Yamazaki H, Yamasaki S, Shimada N, Nakajima M and Yokoi T (2000) Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidations in mouse intestinal microsomes. *Xenobiotica* **30**:943-953.

Fisher JE, McKenzie TJ, Lillegard JB, Yu Y, Juskewitch JE, Nedredal GI, Brunn GJ, Yi ES, Malhi H, Smyrk TC and Nyberg SL (2013) Role of Kupffer cells and toll-like receptor 4

- in acetaminophen-induced acute liver failure. *J Surg Res* **180**:147-155.
- Fleishaker JC, Pearson LK and Peters GR (1995) Phenytoin causes a rapid increase in 6  $\beta$ -hydroxycortisol urinary excretion in humans - a putative measure of CYP3A induction. *J Pharm Sci* **84**:292-294.
- Fujimoto K, Kumagai K, Ito K, Arakawa S, Ando Y, Oda S, Yamoto T and Manabe S (2009) Sensitivity of liver injury in heterozygous Sod2 knockout mice treated with troglitazone or acetaminophen. *Toxicol Pathol* **37**:193-200.
- Gan J, Harper TW, Hsueh MM, Qu Q and Humphreys WG (2005) Dansyl glutathione as a trapping agent for the quantitative estimation and identification of reactive metabolites. *Chem Res Toxicol* **18**:896-903.
- Goldring CE, Kitteringham NR, Elsbey R, Randle LE, Clement YN, Williams DP, McMahon M, Hayes JD, Itoh K, Yamamoto M and Park BK (2004) Activation of hepatic Nrf2 *in vivo* by acetaminophen in CD-1 mice. *Hepatology* **39**:1267-1276.
- Grattagliano I, Portincasa P, Palmieri VO and Palasciano G (2002) Overview on the mechanisms of drug-induced liver cell death. *Ann Hepatol* **1**:162-168.
- Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* **257**:13704-13712.
- Griffith OW and Meister A (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (*S-n*-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* **254**:7558-7560.
- Grover PL and Sims P (1964) Conjugations with glutathione. Distribution of glutathione *S*-aryltransferase in vertebrate species. *Biochem J* **90**:603-606.

- Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* **8**:E101-E111.
- Hagemeyer CE1, Bürck C, Schwab R, Knoth R and Meyer RP (2010) 7-Benzyloxyresorufin-*O*-dealkylase activity as a marker for measuring cytochrome P450 CYP3A induction in mouse liver. *Anal Biochem* **398**:104-111.
- Haruda F (1979) Phenytoin hypersensitivity: 38 cases. *Neurology* **11**:1480-1485.
- Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vazquez JJ and Arnalich F (2000) Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci* **67**:1317-1324.
- Higuchi S, Kobayashi M, Yoshikawa Y, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2011) IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett* **200**:139-145.
- Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2012) Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* **130**:4-16.
- Hsieh CH, Frink M, Hsieh YC, Kan WH, Hsu JT, Schwacha MG, Choudhry MA and Chaudry IH (2008) The role of MIP-1 $\alpha$  in the development of systemic inflammatory response and organ injury following trauma hemorrhage. *J Immunol* **181**:2806-2812.
- Ishida Y, Kondo T, Ohshima T, Fujiwara H, Iwakura Y and Mukaida N (2002) A pivotal involvement of IFN- $\gamma$  in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J* **16**:1227-1236.
- Jackson JP, Ferguson SS, Moore R, Negishi M and Goldstein JA (2004) The constitutive active/androstane receptor regulates phenytoin induction of Cyp2c29. *Mol Pharmacol* **65**:1397-1404.

- Jaeschke H (2006) Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G1083-G1088.
- Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW and Pohl LR (2002) Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem Res Toxicol* **15**:1504-1513.
- Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**:489-499.
- Kaufman DW and Shapiro S (2000) Epidemiological assessment of drug-induced disease. *Lancet* **356**:1339-1343.
- Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**:223-246.
- Kita H, Mackay IR, Van De Water J and Gershwin ME (2001) The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* **120**:1485-1501.
- Kobayashi E, Kobayashi M, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2009) Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol Sci* **111**:302-310.
- Kobayashi M, Higuchi S, Ide M, Nishikawa S, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2012) Th2 cytokine-mediated methimazole-induced acute liver injury in mice. *J Appl Toxicol* **10**:823-833.
- Kola I and Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **8**:711-715.
- Komatsu T, Yamazaki H, Asahi S, Gillam EM, Guengerich FP, Nakajima M and Yokoi T (2000) Formation of a dihydroxy metabolite of phenytoin in human liver microsomes/cytosol: roles of cytochromes P450 2C9, 2C19, and 3A4. *Drug Metab Dispos* **28**:1361-1368.

- Kostrubsky VE, Szakacs JG, Jeffery EH, Wood SG, Bement WJ, Wrighton SA, Sinclair PR and Sinclair JF (1997) Role of CYP3A in ethanol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **143**:315-323.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Latz E (2010) The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* **22**:28-33.
- Lauterburg BH and Velez ME (1988) Glutathione deficiency in alcoholics: risk factor for paracetamol hepatotoxicity. *Gut* **2**:1153-1157.
- Leeder JS, Riley RJ, Cook VA and Spielberg SP (1992) Human anti-cytochrome P450 antibodies in aromatic anticonvulsant-induced hypersensitivity reactions. *J Pharmacol Exp Ther* **263**:360-367.
- Lolin YI, Ratnaraj N, Hjelm M and Patsalos PN (1994) Antiepileptic drug pharmacokinetics and neuropharmacokinetics in individual rats by repetitive withdrawal of blood and cerebrospinal fluid: phenytoin. *Epilepsy Res* **19**:99-110.
- Lu J, Jones AD, Harkema JR, Roth RA and Ganey PE (2012) Amiodarone exposure during modest inflammation induces idiosyncrasy-like liver injury in rats: role of tumor necrosis factor-alpha. *Toxicol Sci* **125**:126-133.
- Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, Hamilton G, Rizzo C, Jolley S, Gilbert D, Downey A, Mudra D, Graham R, Carroll K, Xie J, Madan A, Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E and Gan LS (2002) CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **30**:795-804.
- Martinon F, Mayor A and Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu*

- Rev Immunol* **27**:229-265.
- Masubuchi Y, Sugiyama S and Horie T (2009) Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chem Biol Interact* **179**:273-279.
- Matsuo K, Sasaki E, Higuchi S, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2014) Involvement of oxidative stress and immune- and inflammation-related factors in azathioprine-induced liver injury. *Toxicol Lett* **224**:215-224.
- Maynert EW (1960) The metabolic fate of diphenylhydantoin in the dog, rat and man. *J Pharmacol Exp Ther* **130**:275-284.
- Meister A and Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**:711-760.
- Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, Kawata T, Kimura A, Kobayashi S, Przetak M, Chow J, Gusovsky F, Christ WJ and Rossignol DP (2003) Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1093-1102.
- Mullick FG and Ishak KG (1980) Hepatic injury associated with diphenylhydantoin therapy. A clinicopathologic study of 20 cases. *Am J Clin Pathol* **74**:442-452.
- Munns AJ, De Voss JJ, Hooper WD, Dickinson RG and Gillam EM (1997) Bioactivation of phenytoin by human cytochrome P450: characterization of the mechanism and targets of covalent adduct formation. *Chem Res Toxicol* **10**:1049-1058.
- Naisbitt DJ, Williams DP, Pirmohamed M, Kitteringham NR and Park BK (2001) Reactive metabolites and their role in drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **1**:317-325.
- Nakamura S, Kugiyama K, Sugiyama S, Miyamoto S, Koide S, Fukushima H, Honda O, Yoshimura M and Ogawa H (2002) Polymorphism in the 5'-flanking region of human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene is associated with myocardial infarction. *Circulation* **105**:2968-2973.

- Nishiya T, Mori K, Hattori C, Kai K, Kataoka H, Masubuchi N, Jindo T and Manabe S (2008) The crucial protective role of glutathione against tienilic acid hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**:280-291.
- Ong MM, Wang AS, Leow KY, Khoo YM and Boelsterli UA (2006) Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous Sod2(+/-) mice. *Free Radic Biol Med* **40**:420-429.
- Oo YH and Adams DH (2010) The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J Autoimmun* **34**:45-54.
- Park BK, Kitteringham NR, Powell H and Pirmohamed M (2000) Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**:39-60.
- Pirmohamed M, Madden S and Park BK (1996) Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. *Clin Pharmacokinet* **3**:215-230.
- Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Gordon F and Park BK (2002) The danger hypothesis-potential role in idiosyncratic drug reactions. *Toxicology* **181**:55-63.
- Qureshi ZP, Seoane-Vazquez E, Rodriguez-Monguio R, Stevenson KB, Szeinbach SL (2011) Market withdrawal of new molecular entities approved in the United States from 1980 to 2009. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **2**:772-777.
- Racanelli V and Rehermann B (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**:S54-S62.
- Ramadori G and Armbrust T (2001) Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**:777-784.
- Ramaiah SK and Jaeschke H (2007) Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol Pathol* **35**:757-766.
- Riley RJ, Grime K and Weaver R (2007) Time-dependent CYP inhibition. *Expert Opin Drug*

- Metab Toxicol* **1**:51-66.
- Ross D (1996) Metabolic basis of benzene toxicity. *Eur J Haematol* **60**:111-118.
- Roy D and Snodgrass WR (1988) Phenytoin metabolic activation: role of cytochrome P-450, glutathione, age, and sex in rats and mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **59**:173-190.
- Roy D and Snodgrass WR (1990) Covalent binding of phenytoin to protein and modulation of phenytoin metabolism by thiols in A/J mouse liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **252**:895-900.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**:1675-1687.
- Scaffidi P, Misteli T and Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**:191-195.
- Schwabe RF, Seki E and Brenner DA (2006) Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* **130**:1886-1900.
- Shaw PJ, Hopfensperger MJ, Ganey PE and Roth RA (2007) Lipopolysaccharide and trovafloxacin coexposure in mice causes idiosyncrasy-like liver injury dependent on tumor necrosis factor-alpha. *Toxicol Sci* **100**:259-266.
- Shimizu S, Atsumi R, Itokawa K, Iwasaki M, Aoki T, Ono C, Izumi T, Sudo K and Okazaki O (2009) Metabolism-dependent hepatotoxicity of amodiaquine in glutathione-depleted mice. *Arch Toxicol* **83**:701-707.
- Shimizu S, Atsumi R, Nakazawa T, Izumi T, Sudo K, Okazaki O and Saji H (2011) Ticlopidine-induced hepatotoxicity in a GSH-depleted rat model. *Arch Toxicol* **85**:347-353.
- Sinclair J, Jeffery E, Wrighton S, Kostrubsky V, Szakacs J, Wood S and Sinclair P (1998)

- Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: role of CYP2E and CYP3A. *Biochem Pharmacol* **55**:1557-1565.
- Smith RG, Daves GD, Lynn RK and Gerber N (1977) Hydantoin ring glucuronidation: characterization of a new metabolite of 5,5-diphenylhydantoin in man and the rat. *Biomed Mass Spectrom* **4**:275-279.
- Soo GW, Law JH, Kan E, Tan SY, Lim WY, Chay G, Bukhari NI and Segarra I (2010) Differential effects of ketoconazole and primaquine on the pharmacokinetics and tissue distribution of imatinib in mice. *Anticancer Drugs* **7**:695-703.
- Staal FJ, Ela SW, Roederer M, Anderson MT and Herzenberg LA (1992) Glutathione deficiency and human immunodeficiency virus infection. *Lancet* **339**:909-912.
- Sultatos LG (1986) The effects of phenobarbital pretreatment on the metabolism and acute toxicity of the pesticide parathion in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* **86**:105-111.
- Sutherland L, Ebner T and Burchell B (1993) The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochem Pharmacol* **45**:295-301.
- Takakusa H, Masumoto H, Mitsuru A, Okazaki O and Sudo K (2008) Markers of electrophilic stress caused by chemically reactive metabolites in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **36**:816-823.
- Talpain E, Armstrong RA, Coleman RA and Vardey CJ (1995) Characterization of the PGE receptor subtype mediating inhibition of superoxide production in human neutrophils. *Br J Pharmacol* **114**:1459-1465.
- Taylor JW, Stein MN, Murphy MJ and Mitros FA (1984) Cholestatic liver dysfunction after long-term phenytoin therapy. *Arch Neurol* **41**:500-501.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A and Engel P (1995) The selectins: vascular adhesion molecules.

- FASEB J* **9**:866-873.
- Tiegs G, Hentschel J and Wendel A (1992) A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* **90**:196-203.
- Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**:502-522.
- Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE and Roth RA (2007) The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury. *Toxicol Sci* **100**:267-280.
- Ueda K, Ishitsu T, Seo T, Ueda N, Murata T, Hori M and Nakagawa K (2007) Glutathione S-transferase M1 null genotype as a risk factor for carbamazepine-induced mild hepatotoxicity. *Pharmacogenomics* **8**:435-442.
- Utrecht JP (1999) New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system. *Chem Res Toxicol* **5**:387-395.
- Utrecht JP (2000) Is it possible to more accurately predict which drug candidates will cause idiosyncratic drug reactions? *Curr Drug Metab* **2**:133-141.
- Watanabe I, Tomita A, Shimizu M, Sugawara M, Yasumo H, Koishi R, Takahashi T, Miyoshi K, Nakamura K, Izumi T, Matsushita Y, Furukawa H, Haruyama H and Koga T (2003a) A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther* **73**:435-455.
- Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W and Manabe S (2003b) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol Sci* **28**:455-469.

- Waterschoot RA, Herwaarden AE, Lagas JS, Sparidans RW, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, Goldstein JA, Zeldin DC, Beijnen JH and Schinkel AH (2008) Midazolam metabolism in cytochrome P450 3A knockout mice can be attributed to up-regulated CYP2C enzymes. *Mol Pharmacol* **73**:1029-1036.
- Wilke RA, Lin DW, Roden DM, Watkins PB, Flockhart D, Zineh I, Giacomini KM and Krauss RM (2007) Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **11**:904-916.
- Williams CD, Antoine DJ, Shaw PJ, Benson C, Farhood A, Williams DP, Kanneganti TD, Park BK and Jaeschke H (2011) Role of the Nalp3 inflammasome in acetaminophen-induced sterile inflammation and liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol* **252**:289-297.
- Winn LM and Wells PG (1997) Evidence for embryonic prostaglandin H synthase-catalyzed bioactivation and reactive oxygen species-mediated oxidation of cellular macromolecules in phenytoin and benzo[*a*]pyrene teratogenesis. *Free Radic Biol Med* **22**:607-621.
- Winn LM and Wells PG (1999) Maternal administration of superoxide dismutase and catalase in phenytoin teratogenicity. *Free Radic Biol Med* **26**:266-274.
- Winnock M, Garcia BM, Lukomska B, Huet S, Saric J, Balabaud C and Bioulac-Sage P (1995) *J Gastroenterol Hepatol* **10**:S43-S46.
- Woodhouse KW, Williams FM, Mutch E, Wright P, James OF and Rawlins MD (1983) The effect of alcoholic cirrhosis on the activities of microsomal aldrin epoxidase, 7-ethoxycoumarin *O*-de-ethylase and epoxide hydrolase, and on the concentrations of reduced glutathione in human liver. *Br J Clin Pharmacol* **15**:667-672.
- Yamazaki H, Komatsu T, Takemoto K, Saeki M, Minami Y, Kawaguchi Y, Shimada N, Nakajima M and Yokoi T (2001) Decreases in phenytoin hydroxylation activities catalyzed by liver microsomal cytochrome P450 enzymes in phenytoin-treated rats. *Drug*

*Metab Dispos* **29**:427-434.

Yano A, Higuchi S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2012) Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *Toxicology* **293**:107-114.

You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D and Ju C (2006) Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology* **44**:1421-1431.

Yue J and Peng R (2009) Does CYP2E1 play a major role in the aggravation of isoniazid toxicity by rifampicin in human hepatocytes? *Br J Pharmacol* **157**:331-333.

Zeng S, Feirt N, Goldstein M, Guarrera J, Ippagunta N, Ekong U, Dun H, Lu Y, Qu W, Schmidt AM and Emond JC (2009) Blockade of receptor for advanced glycation end product (RAGE) attenuates ischemia and reperfusion injury to the liver in mice. *Hepatology* **39**:422-432.

Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M and Chen YZ (2005) Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab Rev* **37**:41-213.

Zhu J and Paul WE (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**:1557-1569.

Zimmerman HJ (1999) Psychotropic and Anticonvulsant Agents. In: *Hepatotoxicity: The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals on the Liver*. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, PA.

戸田剛太郎 (1999) インスリン抵抗性改善剤トログリタゾンによる肝障害 *内分泌・糖尿病科* **9**: 393-400.

大日本住友製薬 (2014) アレビアチン錠® *医薬品インタビューフォーム* 第18版

## 論文目録

### 主論文

本学位論文内容は、下記の発表論文を基礎とする。

Sasaki E, Matsuo K, Iida A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2013) A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. *Toxicol Sci* **136**:250-263.

Sasaki E, Iwamura A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, Kume T and Yokoi T (2015) Role of cytochrome P450-mediated metabolism and identification of novel thiol-conjugated metabolites in mice with phenytoin-induced liver injury. *Toxicol Lett* **232**: 79-88.

### 副論文

Matsuo K, Sasaki E, Higuchi S, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2014) Involvement of oxidative stress and immune- and inflammation-related factors in azathioprine-induced liver injury. *Toxicol Lett* **224**:215-224.