

Table 1. Cytotoxic effects by CYP3A4.

Drug	DMSO (%)	ATP		CCK	
		30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Amantadine	0.1	7.2	8.1	33.1	20.8
Amiodarone	0.2	52.9	1.0	6.1	-8.1
Amlodipine	0.1	10.4	-0.6	-22.6	-17.9
Benzbromarone	0.1	18.8 <sup>a</sup>	12.3 <sup>b</sup>	20.4	-1.1
Clarithromycin	0.5	-1.0	10.8	15.5	3.7
Clotiazepam	0.1	6.8	15.2	3.9	2.6
Etizolam	0.2	11.3	17.4	16.1	21.8
Flunitrazepam	0.1	21.6	32.8	16.0	38.6
Flutamide	0.1	16.2	11.1	16.7	-1.7
Imipramine	0.1	10.3	10.9	19.7	-6.8
Ketotifen	0.2	2.9	21.3	-3.3	-1.6
Maprotiline	0.1	8.9	-0.7	2.5	0.4
Metformim	0	10.7	9.6	5.7	7.3
Milnacipran	0	-2.3	13.9	15.6	17.6
Montelukast	0.1	28.3	0.9	17.3	25.3
Phenytoin	0.2	2.0	-1.0	14.5	15.9
Prednisolone	0.1	4.3	11.7	2.2	2.5
Rabeprazole	0.1	6.2	8.6	-9.4	-5.7
Raloxifene	0.1	-2.0	-1.3	-2.2	-9.7
Rebamipide	0.1	8.0	13.7	-22.8	11.8
Simvastatin	0.1	2.5	-49.1	-13.2	-41.0
Sulindac	0.1	5.7	26.3	4.9	8.8
Teprenone	0.1	11.5	16.8	10.0	15.4
Ticlopidine	0.1	12.1	26.4	17.5	46.2
Toremifene	0.5	24.6	0.9	-6.1	-7.4
Tranilast	0.1	-1.3 <sup>c</sup>	8.7 <sup>b</sup>	4.3	7.3
Triazolam	0.5	5.5	5.2	22.2	12.7
Warfarin	0.1	17.5	23.9	0.4	11.2
Zafirlukast	0.1	28.9	-0.8	-7.7	-12.6
Zolpidem	0.1	6.8	7.9	10.7	5.3

Cytotoxic effects was evaluated by the differences of cell viability between CYP3A4 and control microsomes. Red, > 20%; Green, 15-20%; Black, < 15%. <sup>a</sup> 25  $\mu$ M, <sup>b</sup> 50  $\mu$ M, <sup>c</sup> 10  $\mu$ M.

一方、ATP および CCK 測定法ともに 15%以下の値を示した薬物はアムロジピン、マプロチリン、メトホルミン、プレドニゾロン、ラベプラゾール、ラロキシフェン、レバミピド、トラニラスト、ゾルピデムであった。またシンバスタチンは ATP および CCK 測定法とともに-20%以下であった。

#### C-6. チクロピジンの細胞障害に及ぼす CYP3A4 濃度の影響

これまで CYP3A4 の濃度は 16 nM で検討してきたが、CYP3A4 濃度依存的な細胞障害を明らかにするため行っ

た検討結果を Fig. 6 に示す。チクロピジン 100  $\mu\text{M}$  処置でコントロールマイクロソーム存在下の細胞生存率より CYP3A4 発現系マイクロソーム存在下の細胞生存率は ATP 測定法において、1 nM で 19.2%、2 nM で 25.5%、4 nM で 27.4%、8 nM で 33.2%、16 nM で 34.0% 減少した。CCK 測定法においては、1 nM で 7.9%、2 nM で 8.9%、4 nM で 13.3%、8 nM で 23.4%、16 nM で 29.4% 低下した。これよりチクロピジン 100  $\mu\text{M}$  処置において、ATP および CCK 測定法ともに CYP3A4 濃度依存的に細胞障害の増強が認められた。

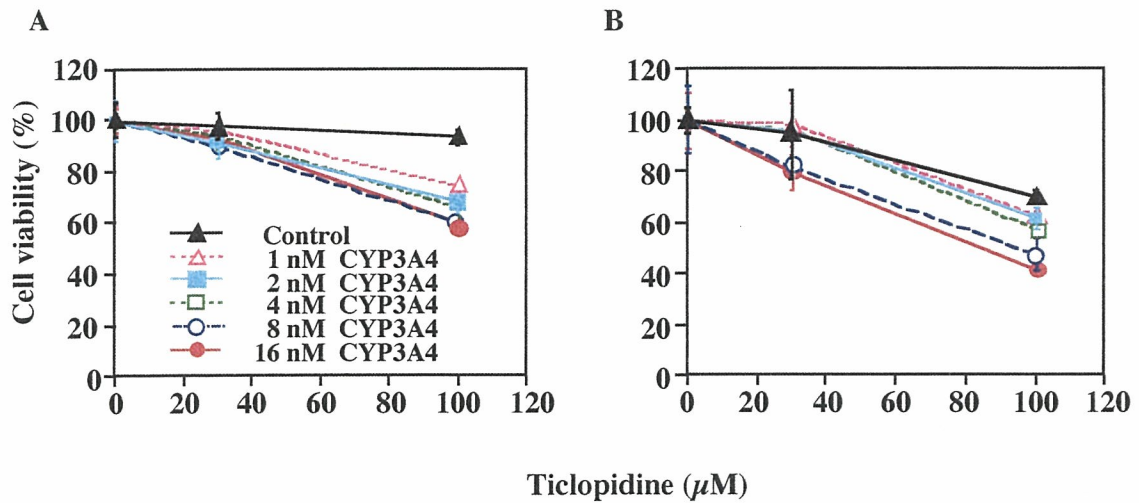


Fig. 6. Changes in the cytotoxicity of ticlopidine by CYP3A4 concentration. The concentration of CYP3A4 supersomes ranged from 1 to 16 nM. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. A, ATP assay; B, CCK assay.

#### C-7. ベンズブロマロン、フルニトラゼパムおよびチクロピジンの CYP3A4 による代謝的活性化の検討

CYP3A4 により細胞障害性の増強が

認められた被験薬の中で、緊急安全性情報が配布されたベンズブロマロンおよびチクロピジン、また ATP 測定法において被験薬 30、100  $\mu\text{M}$  とともに、

CYP3A4 存在下の細胞生存率が 20%以上減少したフルニトラゼパムについてさらに検討を加えた結果を Fig. 7 に示す。ベンズブロマロン、フルニトラゼパムおよびチクロピジンは、ATP および CCK 測定法ともに細胞生存率は、CYP3A4 存在下で低下した。ベンズブロマロンは ATP 測定法において 25 $\mu$ M

で 26.3%、CCK 測定法においては 10  $\mu$ M で 21.7%と最大を示した。フルニトラゼパムでは ATP 測定法において 200  $\mu$ M で 56.3%、CCK 測定法において 200  $\mu$ M で 37.7%と最大を示した。チクロピジンは ATP 測定法において 100  $\mu$ M で 40.7%、CCK 測定法において 100  $\mu$ M で 20.2%と最大を示した。

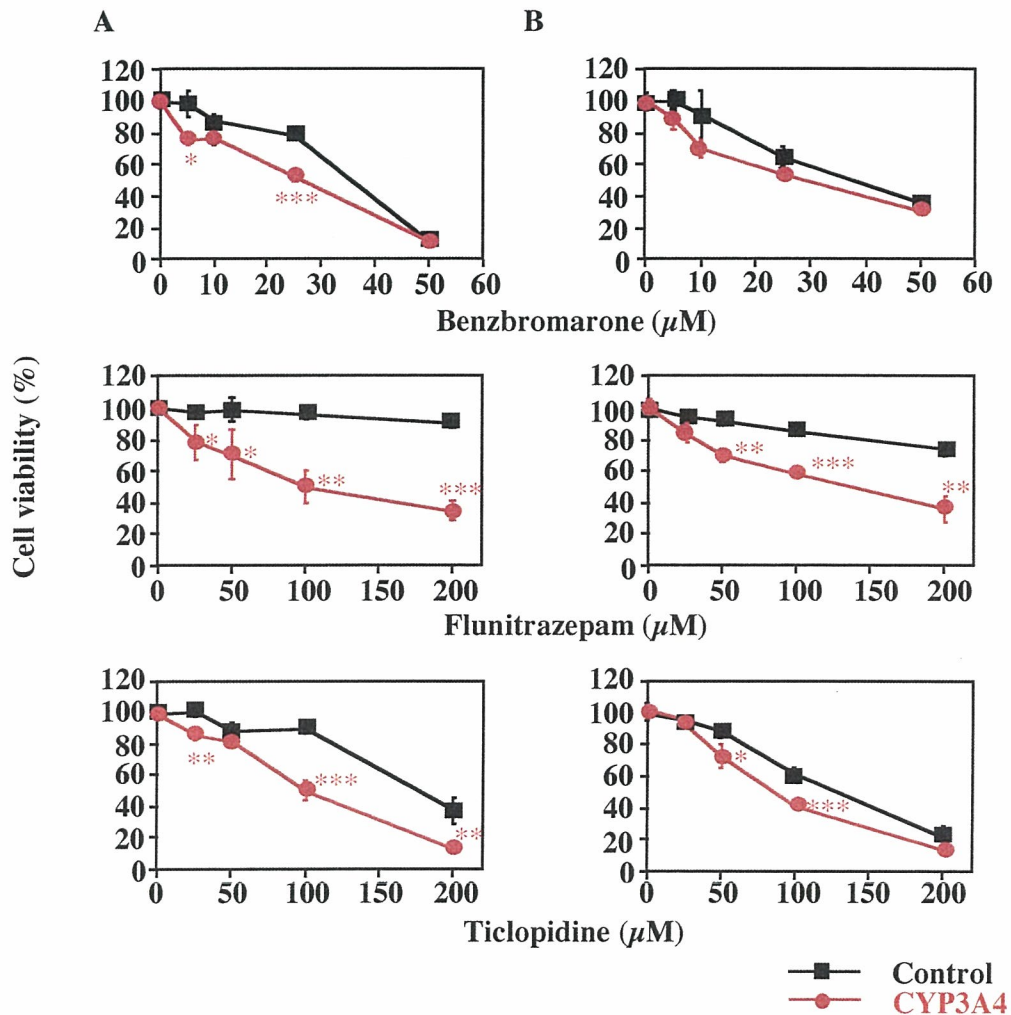


Fig. 7. Changes in the cytotoxicity of benzbromarone, flunitrazepam and ticlopidine by CYP3A4 in HepG2 cells. The concentrations of benzbromarone, flunitrazepam and ticlopidine ranged from 0 to 50, from 0 to 200 and from 0 to 200, respectively. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001, compared with control. A, ATP assay; B, CCK assay.

#### D. 考察

肝臓は薬物代謝を行う主な臓器であり、また胆汁の分泌、糖新生などさまざまな働きを有していることから、生体維持に重要な臓器である。経口投与された薬物は吸収された後、肝臓に運ばれてくるため、肝臓には高濃度の薬物が存在することになる。そのため、多くの薬物は副作用として肝障害を引き起こす可能性が指摘されており、実際に、薬物性肝障害が大きな問題となっている。重篤な肝障害を惹起する代表的な薬物として糖尿病治療薬として使用されていたトログリタゾンが挙げられる。トログリタゾンは1997年3月に我が国で発売され、同年12月に重篤な肝障害についての緊急安全性情報が配布され注意喚起されたが、2000年に自主回収された。トログリタゾンは主にCYP3A4、CYP2C8、硫酸転移酵素、グルクロン酸転移酵素により代謝される (Smith, 2003)。トログリタゾンによる細胞障害メカニズムの1つとして、CYP3A4により生成された活性代謝物によるミトコンドリアの形態変化が示唆されている (Tirmenstein et al., 2002)。

トログリタゾンの代謝的活性化に関与するCYP3A4はヒトにおいて全肝CYPの約30%を占め (Shimada et al., 1994)、現在使用されている医薬品の50%以上を代謝する (Hirata et al., 2005)。またCYP3A4は大きな個体差

が存在することから、CYP3A4による薬物の代謝的活性化を明らかにする必要がある。そこで本章では、CYP3A4による代謝的活性化を検討する *in vitro* 評価系の構築を目的とし、検討を行った。

トログリタゾンの HepG2 細胞に対する細胞障害は、濃度および時間依存的であり、24時間処置で十分細胞障害が認められたため、以後の検討は24時間で行った (Fig. 1)。また *in vitro* でのCYPの薬物代謝反応にはpH7.4のKpiなどの緩衝液が一般的に用いられる。そこで、培養液中にKpiを添加したところ、Kpiにより細胞生存率が低下した (Fig. 2)。従って、Kpiを添加せずにDMEMを基本とした培養液を用いて検討を加えることにした。次に、CYP3A4による代謝的活性化を検討するため、CYP3A4存在下でのトログリタゾンの細胞障害性を検討した (Fig. 3)。ATPおよびCCK測定法ともに、CYP3A4によりトログリタゾンの細胞障害性が増強されたことが明らかになった。Vignatiら (2005)はHepG2細胞を用いてトログリタゾンの代謝的活性化を評価しているが、本章の結果はVignatiら (2005)と一致した。また、CYP3A4存在下においてNADPHを添加しなければ、細胞生存率はコントロールと同程度であったため (Fig. 4)、Fig. 3で認められたCYP3A4によるトログリタゾンの細胞

障害性の増強は、CYP3A4による代謝的活性化が原因であると示唆された。すでに Yamamoto ら (2002) により報告されていた CYP3A4 によるトログリタゾンの活性代謝物が関与していると考えられる。しかし、本章では培養液中の活性代謝物を検出していないため、今後、活性代謝物の存在を明らかにすることが必要である。

またトログリタゾン曝露時の細胞生存率は測定法により異なる結果が得られた (Fig. 3)。CCK 測定法より ATP 測定法は細胞生存率が低く評価される傾向が認められた。ATP 測定法は細胞内の ATP 含有量を測定し、CCK 測定法はミトコンドリアの機能を評価するため、標的因子の違いに起因すると考えられる。従って、今後の検討では ATP および CCK 測定法両者で検討することが望ましいと考えられる。

CYP3A4によって代謝的活性化されるジクロフェナク (Bort et al., 1999; Tang et al., 1999) を用いて同様の検討を行ったところ、CYP3A4 存在下でジクロフェナクによる細胞障害性が増強されることが認められた (Data not shown)。従って本検討では代謝的活性化について評価できたと考えられる。

本章では ATP および CCK 測定法の 2 種類で薬物濃度 2 点において細胞障害性を評価した。少なくとも 1 つの測定法で CYP3A4 による代謝的活性化で細胞障害性が特に増強されたと認

められた被験薬は、30 種類中 13 種類であった (Table 1)。また両測定法で CYP3A4 による代謝的活性化により細胞障害性が特に増強された被験薬は、フルニトラゼパム、モンテルカストおよびチクロピジンであり、ベンズブロマロン、エチゾラムおよびフルタミドもまた CYP3A4 により細胞障害性が増強された。本章での結果よりベンズブロマロン、フルニトラゼパムおよびチクロピジンは CYP3A4 による代謝的活性化が明らかになった (Fig. 7)。まず、ベンズブロマロンについて述べる。ベンズブロマロンによる肝細胞障害メカニズムとしてベンズブロマロン自身のミトコンドリア阻害作用が報告されている (Kaufmann et al., 2005)。しかし本章ではベンズブロマロン 25  $\mu\text{M}$  以下において CYP3A4 による細胞障害性の増強が認められたことから、低濃度において CYP3A4 が何らかの影響を及ぼしていると考えられる。50  $\mu\text{M}$  では CYP3A4 添加に関らず強い細胞障害が認められ、トログリタゾンと類似した細胞障害傾向を示した。これは、高濃度のため、親化合物による直接的な細胞毒性が強くあらわれたと考えられる。ベンズブロマロンは主に CYP2C9 によって 6-水酸化ベンズブロマロンに代謝される (及川ら, 2004)。Kunishoma ら (2003) によると、ベンズブロマロン 5  $\mu\text{M}$  を CYP3A4 発現系マイクロソームと 60 分

インキュベートしたところ、ベンズブロマロンは 85.7%残存しているが、わずかに代謝された可能性がある。また、尿中排泄物として 6-水酸化ベンズブロマロン以外に複数の代謝物が存在する (Arnold et al., 1991)。ベンズブロマロンについて CYP3A4 による代謝的活性化が示唆されたため、活性代謝物の解明を行う必要がある。主代謝経路に CYP3A4 が関与しない薬物についても CYP3A4 による代謝的活性化を受ける可能性を明らかにしたことは、今後の細胞障害性の予測について極めて有用な情報を提供できたと考えられる。次にフルニトラゼパムについて述べる。フルニトラゼパムは重大な副作用として肝機能障害と黄疸がインタビューフォームに記載されている (サイレースインタビューフォーム)。フルニトラゼパムは本章の結果で最も CYP3A4 による細胞障害性の増強が強く、薬物濃度依存的に細胞障害性が増強した被験薬であった。従って、親化合物の細胞障害性は弱い、CYP3A4 により生成される代謝物が細胞障害性を有すると考えられる。ヒトにおいて主代謝物はデスメチル体、7-アミノ体、3-水酸化体である (Kilicarlan et al., 2001)。デスメチル体生成反応が 3-水酸化体生成反応より *in vitro* 実験系においてクリアランス値が高い (Kilicarlan et al., 2001)。主にデスメチル体は CYP2C19 により、3-

水酸化体は CYP3A4 により生成される (Hesse et al., 2001; Kilicarlan et al., 2001)。3-水酸化体もしくは他の CYP3A4 代謝物が細胞障害を示すと考えられる。次にチクロピジンについて述べる。チクロピジンは重大な副作用として、肝障害がインタビューフォームに記載されている (パナルジンインタビューフォーム)。チクロピジンはトログリタゾンおよびベンズブロマロンと同様な細胞障害傾向を示し、CYP3A4 による細胞障害の増強は 100  $\mu\text{M}$  で最も大きく、高濃度ではチクロピジン自身による細胞障害が認められた。CYP3A4 による代謝的活性化が示唆されるが、チクロピジンの代謝は複雑で、CYP、ペルオキシダーゼおよびモノアミノキシダーゼにより触媒される (Dalvie and O'Connell, 2004)。CYP3A4 によっては、主にジヒドロチエノピリジン体、チエノピリジン体およびラクタム体など多くの代謝物が生成することが報告されている (Dalvie and O'Connell, 2004)。また、チクロピジンは CYP3A4 を誘導することが示唆されているため (Boissonnat et al., 1997)、CYP3A4 による代謝的活性化が起こりやすいのかもしれない。

以下は、ATP もしくは CCK 測定法いずれかで CYP3A4 により細胞障害の増強が認められた被験薬について述べる。アマンタジンは CCK 測定法で顕著に細胞障害が発現したが、ATP

測定法では細胞障害は認められなかった。CYP3A4によりミトコンドリアに対する障害性が増強した可能性もあるが、CCK測定法でコントロールの細胞生存率が100%を超えていたため、20%以上の差が認められたと考えられる。またアマンタジンの肝胆道系障害の発症率は0.43%であるが(シメトレルインタビューフォーム)、アマンタジン100  $\mu\text{M}$ で細胞生存率はいずれの場合も70%以上を示したことから、HepG2細胞において細胞障害性は弱いと考えられる。アミオダロンはATP測定法においてのみ低濃度でCYP3A4による細胞障害性の増強が認められた(Fig. 5)。アミオダロンは肝胆道系障害の発現率は4.22%と高い。アミオダロンは半減期が長く、肝臓に蓄積することが知られているため肝障害について注意が喚起されている。加藤ら(1993)によるとアミオダロン400 mg単回投与した場合の最高血中濃度は1.8  $\mu\text{M}$ であり、肝臓中ではさらに高濃度だと考えられる。また、アミオダロンはCYP3A4により代謝される(Fabre et al., 1993)。従って、CYP3A4による代謝的活性化がアミオダロンの肝障害の一因である可能性が考えられる。モンテルカストは多くの代謝物が報告されており、主な代謝物はグルクロン酸抱合体であるが、CYP3A4、CYP2C9によっても代謝される(Chiba et al., 1997)。モンテルカス

トはATPおよびCCK測定法ともにCYP3A4による細胞障害性の増強が20%以上認められ、トログリタゾンと同様な細胞障害性傾向を示した(Fig. 5)。従って、CYP3A4により生成された代謝物が細胞障害性を有すると考えられる。スリンダクはATP測定法でCYP3A4により20%以上の細胞障害の増強が認められた。スリンダクはわずかではあるがCYP3A4により代謝される(Hamman et al., 2000)。従って、CYP3A4により活性代謝物が生成している可能性が考えられる。トレミフェンは主にCYP3A4により代謝されるが(Berthou et al., 1994)、類似体であるタモキシフェンはCYP3A4の存在下でDNAと不可逆的な結合をすることが示されている(Martin et al., 2003)。従って、トレミフェンもCYP3A4による代謝活性化を受ける可能性が考えられる。30  $\mu\text{M}$ では細胞生存率が低値を示したため、さらに低い濃度で検討を行い、CYP3A4による代謝的活性化を明らかにする必要がある。ワルファリンはS体が抗凝固作用を示し、主にCYP2C9により代謝され、R体が主にCYP3A4やCYP1A2により代謝される(Kaminsky and Zhang, 1997)。ワルファリンもATP測定法のみでCYP3A4による細胞生存率の減少が認められたが、細胞生存率が60%以上であったため、HepG2細胞での細胞障害は弱いと考えられる。ザフィル

ルカストは CYP3A4 により活性代謝物が生成され、この活性代謝物が CYP3A4 の mechanism-based inhibitor であり、肝障害の一因であると考えられている (Kassahun et al., 2005)。従って ATP 測定法で細胞生存率が CYP3A4 により減少した本章の結果と一致する。しかし、CCK 測定法で差異が認められなかったためミトコンドリアに対する障害は弱いのかもわからない。また、アムロジピンやラロキシフェンについては 30  $\mu$ M で細胞生存率が 30%以下であったため、さらに低濃度で検討を行う必要があると考えられる。シンバスタチンは主に CYP3A4 により多数の代謝物が生成する (Prueksaritanont et al., 1997)。またシンバスタチンは細胞障害性を有する (Pirillo et al., 1997)。本章においてシンバスタチンは CYP3A4 により細胞障害性の減少が認められた。従って、シンバスタチンの代謝物は細胞障害性を示さないもしくは親化合物より細胞障害性が弱いと考えられる。

本研究では、多数の被験薬が CYP3A4 により代謝的活性化を示すことを明らかにしたが、CYP3A4 の酵素活性には大きな個体差が認められるため、活性代謝物の生成ならびに肝障害の惹起に大きな影響を及ぼす可能性がある。さらに活性代謝物を同定することにより、肝障害メカニズムの解明が可能と考えられる。

## E. 結論

近年、薬物性肝障害が大きな問題となっているが、メカニズムとして代謝的活性化が注目されている。薬物代謝を担う重要な酵素である CYP は、ヒト初代培養肝細胞やヒト肝がん由来細胞で極めて発現量が低い。そのため、代謝的活性化を予測することは極めて難しい。本研究ではヒトにおける代謝的活性化を予測することを目的に検討を行った。

ヒト肝癌由来の HepG2 細胞と CYP3A4 発現系ミクロソームを用いて CYP3A4 による代謝的活性化を検討する *in vitro* 評価系の構築をした。その結果 CYP3A4 により代謝的活性化されるトログリタゾンについて CYP3A4 存在下で細胞障害性の増強が認められた。構築した *in vitro* 評価系を用いて肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討を行った。ベンズブロマロン、エチゾラム、フルニトラゼパム、フルタミド、モンテルカストおよびチクロピジンは CYP3A4 による細胞障害の増強が認められた。その中で肝障害について緊急安全性情報が配布されているベンズブロマロンおよびチクロピジン、医薬品・医療機器等安全性情報が配布されているフルニトラゼパムについてさらに詳細に検討を行ったところ、CYP3A4 による代謝的活性化の可能性が示された。



本研究で、複数の肝障害性薬物について CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。今後の課題として、活性代謝物の検出や同定が望まれる。さらに、活性代謝物による細胞障害メカニズムを明らかにすることにより、薬物性肝障害のより正確な予測が可能と考えられる。これより、本研究は薬物性肝障害を予測する際に有用な情報を提供できたと考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation and drug induced hepatotoxicity—the troglitazone case—. 第 21 回日本薬物動態学会年会 2006.11.29-12.1 シンポジウム 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |      |
|-----------|------|
| 1. 特許取得   | 該当無し |
| 2. 実用新案登録 | 該当無し |
| 3. その他    | 該当無し |

#### I. 参考文献

Arnold PJ, Guserle R, Luckow V, Hemmer R and Grote H (1991) Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolic research. I. Metabolites of benzbromarone in human plasma and urine. *J Chromatogr* **554**: 267-280.

Berthou F, Dreano Y, Belloc C, Kangas L, Gautier JC and Beaune P (1994) Involvement of cytochrome P450 3A enzyme family in the major

metabolic pathways of toremifene in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **47**: 1883-1895.

Boissonnat P, de Lorgeril M, Perroux V, Salen P, Batt AM, Barthelemy JC, Brouard R, Serres E and Delaye J (1997) A drug interaction study between ticlopidine and cyclosporin in heart transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* **53**: 39-45.

Bort R, Ponsoda X, Jover R, Gomez-Lechon MJ and Castell JV (1999) Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **288**: 65-72.

Chiba M, Xu X, Nishime JA, Balani SK and Lin JH (1997) Hepatic microsomal metabolism of montelukast, a potent leukotriene D4 receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* **25**: 1022-1031.

Dalvie DK and O'Connell TN (2004) Characterization of novel dihydrothienopyridinium and thienopyridinium metabolites of ticlopidine in vitro: role of peroxidases, cytochromes p450, and monoamine oxidases. *Drug Metab Dispos* **32**: 49-57.

Fabre G, Julian B, Saint-Aubert B, Joyeux H and Berger Y (1993) Evidence for CYP3A-mediated N-deethylation of amiodarone in human liver microsomal fractions. *Drug Metab Dispos* **21**: 978-985.

Hamman MA, Haehner-Daniels BD, Wrighton SA, Rettie AE and Hall SD (2000) Stereoselective sulfoxidation of sulindac sulfide by flavin-containing monooxygenases. Comparison of human liver and kidney microsomes and mammalian enzymes. *Biochem Pharmacol* **60**: 7-17.

Hesse LM, Venkatakrishnan K, Moltke LL, Shader RI and Greenblatt DJ (2001) CYP3A4 is the major CYP isoform mediating the in vitro hydroxylation and demethylation of flunitrazepam. *Drug Metab Dispos* **29**: 133-140.

Hirata M, Saito M, Urano T, Miyake S and Hasegawa R (2005) Improvement of package insert CYP information for prescription drugs marketed in Japan. *Bull Natl Inst Health Sci* **123**: 12-18.

Ikeda T (2006) Drug-induced liver injury. *Nippon*

- Yakurigaku Zasshi* **127**: 454-459.
- Jaeschke H and Bajt ML (2006) Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* **89**: 31-41.
- Kaminsky LS and Zhang ZY (1997) Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* **73**: 67-74.
- Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 489-499.
- Kassahun K, Skordos K, McIntosh I, Slaughter D, Doss GA, Baillie TA and Yost GS (2005) Zafirlukast metabolism by cytochrome P450 3A4 produces an electrophilic alpha,beta-unsaturated iminium species that results in the selective mechanism-based inactivation of the enzyme. *Chem Res Toxicol* **18**: 1427-1437.
- 加藤和三, 浦野英俊, 諏訪俊男 (1993) 塩酸アミオダロンの単回投与, 長期投与における薬物動態の検討. *基礎と臨床* **27**: 5261-5274.
- Kaufmann P, Torok M, Hanni A, Roberts P, Gasser R and Krahenbuhl S (2005) Mechanisms of benzarone and benzbromarone-induced hepatic toxicity. *Hepatology* **41**: 925-935.
- Kilicarslan T, Haining RL, Rettie AE, Busto U, Tyndale RF and Sellers EM (2001) Flunitrazepam metabolism by cytochrome P450S 2C19 and 3A4. *Drug Metab Dispos* **29**: 460-465.
- Knowles SR, Uetrecht J and Shear NH (2000) Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* **356**: 1587-1591.
- Kunishima C, Inoue I, Oikawa T and Katayama S (2003) The metabolism, toxicity and pharmacological studies of Benzbromarone (Urinorm). *J Saitama Med School* **30**: 187-194.
- Lee WM (2003) Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* **349**: 474-485.
- Li AP (2002) A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the "multiple determinant hypothesis" for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity. *Chem Biol Interact* **142**: 7-23.
- Martin EA, Brown K, Gaskell M, Al-Azzawi F, Garner RC, Boocock DJ, Mattock E, Pring DW, Dingley K, Turteltaub KW, Smith LL and White IN (2003) Tamoxifen DNA damage detected in human endometrium using accelerator mass spectrometry. *Cancer Res* **63**: 8461-8465.
- Meyer UA (2000) Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* **356**: 1667-1671.
- Nassar AE and Lopez-Anaya A (2004) Strategies for dealing with reactive intermediates in drug discovery and development. *Curr Opin Drug Discov Devet* **7**: 126-136.
- 及川寿浩, 国嶋千代子, 安達弥永, 佐藤芳昭, 岡村裕一, 田中信大, 細谷龍男 (2004) ベンズブロマロンの薬物代謝に関する検討-In vitro 薬物代謝試験およびヒト臨床薬物動態試験. *新薬と臨床* **53**: 682-691.
- パネルジンインタビューフォーム (2006) 1-58. 第一製薬株式会社
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 177-202.
- Pirillo A, Jacoviello C, Longoni C, Radaelli A and Catapano AL (1997) Simvastatin modulates the heat shock response and cytotoxicity mediated by oxidized LDL in cultured human endothelial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **231**: 437-441.
- Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L, Yu X, Zhao JJ, Slaughter DE, Arison BH and Vyas KP (1997) In vitro metabolism of simvastatin in humans [SBT]identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s. *Drug Metab Dispos* **25**: 1191-1199.
- Rodrigues AD and Rushmore TH (2002) Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab* **3**: 289-309.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.

サイレースインタビューフォーム (2005)  
1-31. エーザイ株式会社

Smith MT (2003) Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* **16**: 679-687.

シンメトレルインタビューフォーム (2000)  
1-34. ノルバティスファーマー株式会社

Tang W, Stearns RA, Wang RW, Chiu SH and Baillie TA (1999) Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol* **12**: 192-199.

Tirmenstein MA, Hu CX, Gales TL, Maleeff BE, Narayanan PK, Kurali E, Hart TK, Thomas HC and Schwartz LW (2002) Effects of troglitazone on HepG2 viability and mitochondrial function. *Toxicol Sci* **69**: 131-138.

Utrecht J (2006) Role of animal models in the study of drug-induced hypersensitivity reactions. *AAPS J* **7**: E914-E921.

Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter R and Monshouwer M (2005) An in vitro approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* **216**: 154-167.

Yamamoto Y, Yamazaki H, Ikeda T, Watanabe T, Iwabuchi H, Nakajima M and Yokoi T (2002) Formation of a novel quinone epoxide metabolite of troglitazone with cytotoxicity to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos* **30**: 155-160.

Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M and Asahi S (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol In Vitro* **15**: 245-256.

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

肝障害による肝細胞変化が薬物排泄能におよぼす影響

分担研究者 中島 美紀 金沢大学大学院医学系研究科

研究要旨

薬物動態を理解することが医薬品の適正使用を理解する上で重要である。薬物動態を決定する重要な働きを担う臓器は肝臓であり、薬物代謝および胆汁排泄などの多様な機能を有する。肝臓は年齢や障害により、その機能が変化することが知られており、肝機能の低下をもたらす肝障害と薬物動態の関係を理解することは重要である。また、医薬品開発時の重大な問題の一つとして、実験動物とヒトの種差が挙げられる。薬物代謝のみならず、薬物排泄にも少なからず種差が存在することが知られている。そこで、本研究では、肝細胞の変化による薬物排泄能への影響を明らかにすることを目的とし、四塩化炭素誘導性肝障害ラットについて、尿糞中薬物排泄率および肝トランスポーターの発現変動を検討した。ラットにおいて、ほとんど代謝反応の影響を受けず、主に胆汁中に排泄される薬物であるセフメタゾール（CMZ）を用いて検討し、四塩化炭素誘導性肝障害ラットにおいては、生化学的肝障害マーカーであるASTやALT値の上昇に伴い、CMZの尿中排泄率の増加および糞中排泄率の低下が認められた。AST値 > 600 IU/L およびALT値 > 200 IU/Lを示したラットでは、CMZは主に尿中に排泄された。すなわち、CMZの尿中および糞中排泄率は、血清中ASTおよびALT値に依存して変化することを明らかにした。また、DNAマイクロアレイの結果より、肝障害時の糞中排泄から尿中排泄への変化に、肝トランスポーターの発現変動が関与している可能性を示した。薬物排泄は、薬物の体内動態を明らかにするうえで大変重要である。薬物を効果的かつ安全に使用するために、薬物のヒトにおける排泄経路や、病態時の薬物排泄能を正しく評価することが必要である。本研究は、病態時を考慮した医薬品適正使用および医薬品開発に対して有用な情報を提供できたと考えられる。

## A. 研究目的

医薬品は、複数の病気を有する患者に対して用いられる場合が多いため、薬物が疾病に及ぼす影響や、疾病による薬物動態変化に注意する必要がある。薬物動態を決定する因子として、薬物の吸収、分布、代謝および排泄などが知られている。肝臓は、薬物代謝、胆汁排泄および糖新生など、さまざまな機能を有する臓器であり、薬物動態を理解するうえで重要な臓器である。そのため、肝障害患者では、薬物動態の変化に注意する必要がある、薬物の投与量を変更しなければならない場合がある (Mclean and Morgen, 1991)。

薬物動態に影響を与える排泄過程は、主に胆汁排泄あるいは腎排泄に分類される。薬物は、一般的にこれら二種類の経路によって体外へと排泄される。薬物の排泄経路や排泄率の決定因子として、薬物の分子量、脂溶性、タンパク結合率および生理的条件下での溶解度などが知られている (Hirom et al., 1972; Fleck and Braunlich., 1990)。薬物の胆汁移行性は、胆汁/血漿中濃度比(B/P)に基づいて、クラス A (B/P = 1)、B (B/P = 10 - 1000)、C (B/P < 1) と分類される (Brauer, 1959)。多くの薬物はクラス B に分類され、このクラスの薬物は一般的に能動輸送あるいは担体輸送で胆汁中に移行する。近年、生体内での薬物移行

および分布に関する肝トランスポーターの働きが注目されている。Multidrug resistance associated protein 2 (Mrp2) に関しては、mrp2 ノックアウトマウスにおいて、メトトレキサートの血漿中濃度が2倍に増加、ドキシルビシンの胆汁排泄が 1/2 に低下することが報告されている (Vlaming et al., 2006)。Breast cancer resistance protein (Bcrp) に関しては、bcrp ノックアウトマウスにおいて、基質であるピタバスタチンの胆汁排泄クリアランスが低下することが報告されている (Hirano et al., 2005)。従って、薬物排泄について検討する際には、肝トランスポーターの影響を考慮する必要があると考えられる。

胆汁排泄される薬物は、血管から肝細胞に取り込まれ、肝細胞内で移動および代謝され、胆管へと排出される。このように肝細胞を経由して行われる胆汁排泄は、肝機能すなわち肝細胞の状態によって影響をうけることが予想される。肝機能が変化した状態として肝炎や肝硬変などの肝障害があげられる。肝障害時に認められる、薬物代謝能の低下、アルブミン合成能の低下、肝血流量の低下が薬物動態に様々な影響を与えると考えられる。胆汁排泄が主である薬物として、セフトリアキソン、セフォペラゾンおよびセフピラミドなどの第3世代セフェム系

抗菌薬がある (Balant et al., 1985)。主に胆汁排泄される薬物の体内動態に及ぼす肝障害の影響について明らかにすることは、医薬品開発および病態時における薬物の適正使用のために重要であると考えられる。

そこで本研究では、肝障害と薬物排泄の関係に注目し、ラットにおいて未変化体で主に胆汁排泄され、さらに代謝を受けない CMZ を指標薬物として、薬物排泄に及ぼす肝障害の影響を明らかにすることを目的とした。四塩化炭素を投与した肝障害モデルラットを用いて、肝障害による尿糞中排泄率の変動および血清中薬物濃度の変化を検討した。さらに、DNA マイクロアレイを用いて肝トランスポーターの網羅的発現変動解析を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 肝障害ラット作製

雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラット (8 週齢) を日本 SLC (Hamamatsu, Japan) より購入した。SD ラットに、四塩化炭素 640 mg/kg (2 mL/kg) あるいはコーンオイルを 2 日に 1 回、45 日間腹腔内投与を行った。肝障害の程度は、トランスアミナーゼ CII-テストワコーを用いて測定した血清中 aspartate aminotransferase (AST) および alanine aminotransferase (ALT) 値をもとに評価した。AST および ALT 値

をもとに、コントロール群 (AST, > 50 IU/L; ALT > 25, IU/L)、軽度の肝障害群 (AST, 50 - 600 IU/L; ALT, 25 - 200 IU/L) および重度の肝障害群 (AST, > 600 IU/L; ALT, > 200 IU/L) に分類した。また腎機能は、クレアチニンテストワコーを用いて測定した血清中クレアチニン濃度をもとに判断した。

### B-2. 肝障害ラットにおける CMZ 排泄試験

肝障害ラットを用い、四塩化炭素あるいはコーンオイルの最終投与24時間後、PBS (pH 7.4) に溶解させたCMZ (100 mg/kg) を静脈内投与した。尿および糞は、CMZ投与後24時間、代謝ケージを用いて回収した。また、これらの試料は分析に用いるまで-20°Cで保存した。なお、AST、ALT値およびクレアチニン濃度を測定するため、CMZ投与直前に尾静脈より採血した。

### B-3. HPLC による CMZ 定量

尿、糞および血清中の CMZ の定量は、Welage ら (1990) の方法に修正を加え高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。尿 0.1 mL に精製水 0.4 mL を加えた。また糞は、精製水を加えてポリトロンで破碎し、1,500 g で 10 分間遠心分離した後、得られた上清 0.5 mL を以後の操作に使用した。その後、0.5%トリクロロ酢酸

および内標準物質としてのセファゾリンを含むメタノール溶液 0.5 mL を加えた。-20°C で 20 分間放置し、1,500 g で 10 分間遠心分離した後に得られた上清と 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.4) を 1:1 で混合した。この溶液 50  $\mu$ L を HPLC に注入して分析した。血清 40  $\mu$ L はミリ Q 水 20  $\mu$ L を加えて希釈し、0.5% トリクロロ酢酸および内標準物質としてのセファゾリンを含むメタノール溶液 120  $\mu$ L を加えた。その後、-20°C で 20 分間放置し、1,500 g で 10 分間遠心分離した後に得られた上清と 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.4) を 1:1 で混合した。この溶液 50  $\mu$ L を HPLC に注入して分析した。HPLC による分析には L-2130 ポンプ (日立ハイテクノロジーズ, Tokyo, Japan)、L-2200 オートサンプラー (日立ハイテクノロジーズ)、L-2400 UV 検出器 (日立ハイテクノロジーズ)、L-2350 カラムオーブン (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。カラムは C<sub>30</sub>-5  $\mu$ m 分析カラム (Develosil, 4.6  $\times$  150 mm, 野村化学, Aichi, Japan) を用い、移動相は尿および糞用に 13% アセトニトリル/10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.4) (v/v)、血清用に 20% アセトニトリル/10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.4) (v/v) とした。カラム温度は 35°C、流速は 1.2 mL/min とし、溶離液を UV 254 nm でモニターし、D-2000 Elite 形 HPLC

システムマネージャー (日立ハイテクノロジーズ) で解析した。

#### B-4. DNA マイクロアレイによる肝トランスポーター遺伝子の発現解析

DNA マイクロアレイによる肝トランスポーター遺伝子の発現変動解析に用いる cRNA は、GE Healthcare bioscience の CodeLink™ Bioarray Perfect System を用い、プロトコールに従った。アレイスライドのスキャンは、Agilent G2565BA マイクロアレイスキャナを用いて行った。スキャンした画像の解析には、CodeLink Expression Analysis ソフトウェア (GE Healthcare bioscience) を使用した。

#### B-5. RT-PCR 法による肝トランスポーター mRNA 発現量の定量

ラット肝トランスポーター (Multidrug resistance 1a (Mdr1a)、Multidrug resistance 1b (Mdr1b)、Bile-salt export pump (Bsep)、Mrp2、Multidrug resistance associated protein 4 (Mrp4)、Organic anion transporter 2 (Oat2)) mRNA は、Smart Cycler® System (Cepheid, Sunnyvale, CA) を用いて PCR 反応を行い、蛍光を real time で検出することにより定量を行った。total RNA から以下の方法により cDNA を合成した。Total RNA 4  $\mu$ g、ランダムヘキサマー (150 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L

に DEPC 処理水を加えて 23  $\mu$ L とした。70°C 水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。さらに 5 $\times$ 逆転写反应用緩衝液 8  $\mu$ L、2.5 mM dNTPs 8  $\mu$ L、ReverTra Ace 1  $\mu$ L を加えて全量を 40  $\mu$ L とした。37°C で 60 分間反応させた後、沸騰水浴中で逆転写酵素を失活させた。PCR

の反応条件は、(1) 95°C で 30 秒を 1 サイクル (2) 94°C で 4 秒、64°C で 20 秒を 45 サイクルとした。本章で使用したラット肝トランスポーターに対するプライマーを Table 1 に示す。

### C. 研究結果

Table 1. Sequence of primers of rat transporter used in this chapter.

Primer	Sequence
Mdr1a S <sup>a</sup>	5'-ATCAACTCGCAAAAGCATCC-3'
Mdr1a AS <sup>a</sup>	5'-AATTCAACTTCAGGATCCGC-3'
Mdr1b S <sup>a</sup>	5'-CACTGGTGCCTCTGAGTTGA-3'
Mdr1b AS <sup>a</sup>	5'-GCACATCTTCATCCACATCCT-3'
Mrp2 S	5'-CAGTCACGGCTTCCTTTCTG-3'
Mrp2 AS	5'-AGGTTTCCGCTGGGACTTCT-3'
Mrp4 S <sup>b</sup>	5'-GACAGTTAGTGTGCCTTGCG-3'
Mrp4 AS <sup>b</sup>	5'-TGGTGAGAACAGTGCCTGG-3'
Bsep S	5'-TTACTCCGGAGAATAATGAG-3'
Bsep AS	5'-AGGGCTGACAGCAAGAATCA-3'
Oat2 S	5'-AATACTTGCTGAGCTGTGCC-3'
Oat2 AS	5'-AAACAGCAGCTGTGTCTGGT-3'

S, sense primer; AS, antisense primer

<sup>a</sup> From Theron et al. (2003)

<sup>b</sup> From Berezowski et al. (2004)

#### C-1. 肝障害ラットの作製

四塩化炭素投与群は、最終投与 24 時間後の血清中 AST および ALT の値が、それぞれ 91 - 3,913 IU/L および 37

- 1,200 IU/L であった。コーンオイルを投与したコントロール群では、血清中 AST および ALT 値は、それぞれ 26 - 37 IU/L および 13 - 18 IU/L であった。腎



機能の評価は、血清中クレアチニン濃度を指標とした。血清中クレアチニン濃度は、四塩化炭素投与群 (n = 19) で  $0.89 \pm 0.23$  mg/dL、コントロール群 (n = 5) で  $0.86 \pm 0.20$  mg/dL であり、有意な差は認められなかった。

### C-2. 肝障害ラットにおける CMZ 排泄パターン

AST および ALT 値に対する CMZ 投与後 24 時間の尿および糞中 CMZ 排泄率の変化を Fig. 1 に示した。また、AST、ALT 値および尿糞中 CMZ 排泄率の平均値を Table 2 に示した。尿および糞中 CMZ 排泄率は、総 CMZ 排泄量に対する尿および糞中 CMZ 排泄量で示した。総 CMZ 排泄量は、コントロール群で  $46.3 \pm 3.8\%$ 、四塩化炭素投与群では  $68.0 \pm 17.8\%$  であった。コントロール群では、CMZ の尿中排泄率が 28%、糞中排泄率が 72% であり、主に糞中に CMZ が排泄された。しかし、四塩化炭素投与群では、CMZ の尿中排泄率が AST および ALT 値依存的に増加した。逆に、糞中排泄率は AST および ALT 値依存的に低下した。四塩化炭素投与群において、軽度の肝障害群

(AST, 50-600 IU/L; ALT, 25~200 IU/L) では、CMZ 排泄率が顕著に変動したが、重度の肝障害群 (AST, > 600 IU/L; ALT, > 200 IU/L) では、尿中および糞中排泄率はほぼ一定になった。

### C-3. 肝障害ラットにおける CMZ 血清中濃度推移

CMZ の血清中濃度および薬物動態学的パラメーターを Fig. 2 および Table 3 に示した。重度の肝障害群では、コントロール群および軽度の肝障害群と比較して、すべての時間において CMZ 血清中濃度が高かった。一方で、軽度の肝障害群の CMZ 血清中濃度は、コントロール群とほぼ同程度であった。重度の肝障害群の AUC は、コントロール群の約 2 倍であり、有意に高かった。また、他の薬物動態学的パラメーターは、重度および軽度の肝障害群ともに有意な変化は認められなかった。しかし、 $CL_{tot}$  および V 値は、肝障害の程度に依存して減少した。

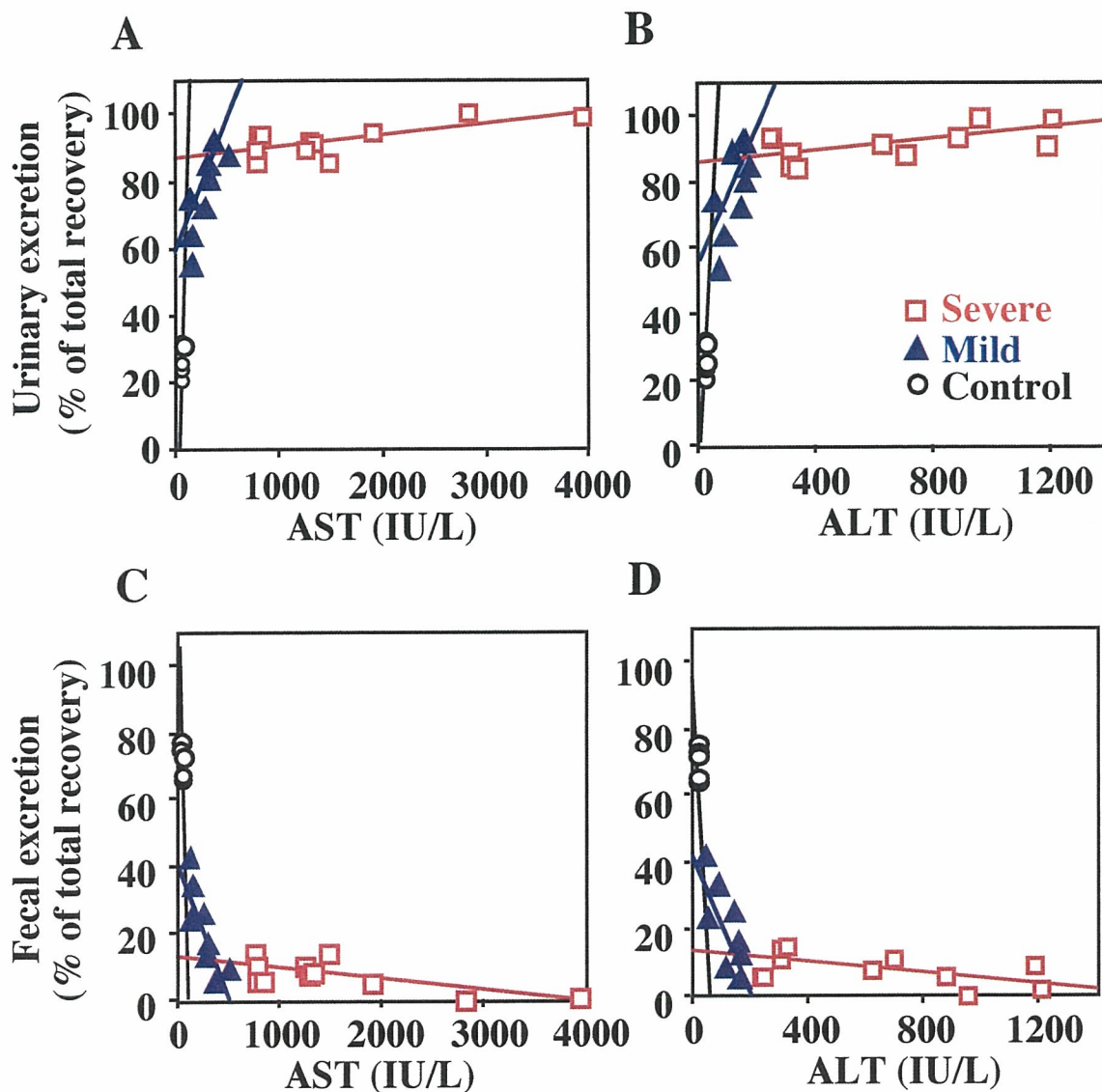


Fig. 1. AST and ALT dependent-changes of urinary (A, B) and fecal (C, D) excretion of CMZ in rats with carbon tetrachloride-induced liver dysfunction.  
Control (○, n = 5), AST < 50, ALT < 25 IU/L; Mild (▲, n = 8), AST 50 - 600, ALT 25 - 200 IU/L; Severe (□, n = 11), AST > 600, ALT > 200 IU/L.

Table 2. Excretion of CMZ and serum levels of AST and ALT in carbon tetrachloride-treated rats.

	Control	Carbon tetrachloride-treated	
		Mild	Severe
Urinary excretion (% of total recovery)	27.6 ± 5.1	77.8 ± 12.7**	92.3 ± 5.1***
Fecal excretion (% of total recovery)	72.4 ± 5.1	22.2 ± 12.7**	7.7 ± 5.1***
AST (IU/L)	31.1 ± 4.6	220.0 ± 130.3**	1551.2 ± 987.4***
ALT (IU/L)	16.1 ± 2.1	104.1 ± 48.1**	673.7 ± 368.8***

Data represent the mean ± SD.

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control rats.

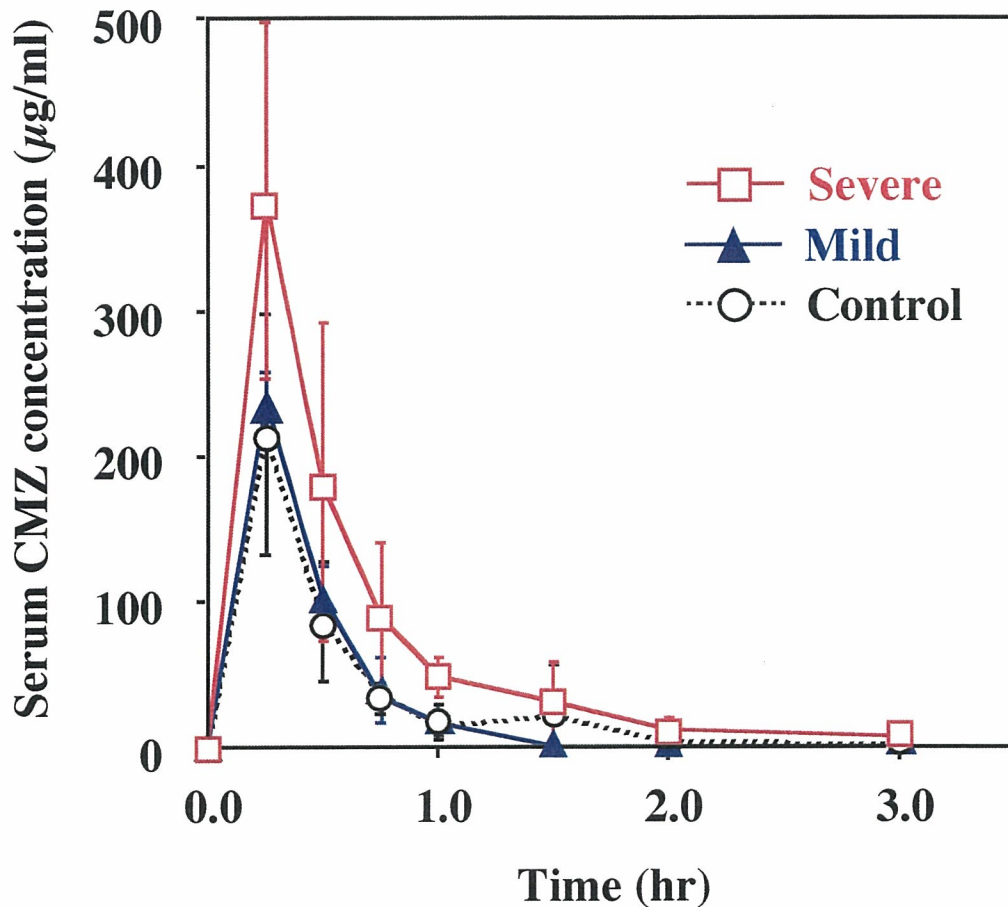
#### C-4. 四塩化炭素の休薬が及ぼす CMZ 排泄への影響

重度の肝障害群ラット4匹について、45日間の四塩化炭素投与後14日間休薬を行い、CMZ排泄試験を行った。コントロール群、重度の肝障害群および休薬群における尿および糞中CMZ排泄率をFig. 3に示した。休薬群では、重度の肝障害群と比較して、CMZ尿中排泄率の低下および糞中排泄率の増加が認められた。なお、休薬群のASTおよびALT値は、コントロール群と同程度であった。

#### mRNA 発現解析

コントロール群、軽度の肝障害群および重度の肝障害群におけるAST値の平均値は、それぞれ42.1 IU/L、468.7 IU/L、1488.0 IU/Lであった。遺伝子発現プロファイルの解析結果では、軽度および重度の肝障害群とともに、コントロール群と比較して2倍以上の変化が認められた遺伝子数は、十分なスポット強度が得られた11198遺伝子中1513遺伝子であった。このうち、2倍以上増加したものは980、1/2以下に減少したものは533遺伝子であった。

#### C-5. DNA マイクロアレイおよびRT-PCR法 による肝トランスポーター



**Fig. 2. Serum concentration of CMZ in rats with CCl<sub>4</sub>-induced liver dysfunction. Control (black), AST < 50, ALT < 25 IU/L; Mild (blue), AST 50~600, ALT 25~200 IU/L; Severe (red), AST > 600, ALT > 200 IU/L. Data represent the mean ± SD (control, n = 5; mild, n = 3; severe, n = 3)**

ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター30 遺伝子中 8 遺伝子 (増加 5、減少 3)、Solute carrier (SLC) トランスポーター141 遺伝子中 19 遺伝子 (増加 10、減少 9) において 2 倍以上の変化が認められた (Table 4)。四塩

化炭素投与による主要な肝トランスポーター発現変動を Fig. 4 に示した。血管側 SLC トランスポーターは、AST に依存した発現量の低下が、血管側 ABC トランスポーターでは、AST に依存した発現量の増加が認められた。