

検討を行った。最初に、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞と CYP3A4 発現系マイ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。本研究では、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、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。

(4) トログリタゾン由来肝障害性関連蛋白質の同定と毒性発現。トログリタゾ

ンを肝癌由来細胞およびヒト初代培養肝細胞に暴露し、2次元プロテオミクスにより、同効薬による影響の排除した条件で検索をおこなうと、非常にわずかの蛋白スポットが変化を示すに過ぎなかった。具体的には3種類の蛋白スポットが明らかに変化を示したにすぎなかった。よってトログリタゾン特異的な肝細胞毒性への関与の期待があった。その代表が BiP であり、同定し、siRNA 法により毒性発現への寄与を細胞レベルで明らかにすることができ、成果を挙げることができた。しかし、*in vivo* での siRNA の効果が大きくなかった、この系を *in vivo* で検討することについては考慮中である。BiP は肝障害性の原因であることは確実であろうが、他にも関与している蛋白があるために、毒性発現への寄与が大きくなかったものと考えている。

(5) 薬物誘導性肝障害による薬物排泄能への影響。四塩化炭素の連続投与による肝障害ラットと正常ラットの間で、血清中クレアチニン濃度に有意な差は認められなかったことから、四塩化炭素による腎障害は起きなかったと考えられた。正常ラット (AST 値 < 50 IU/L、ALT 値 < 25 IU/L) においては、CMZ は回収量の 72% が糞中に、28% が尿中に排泄された。しかし、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。ALT 値の増加と薬物排泄能

の変動に強い相関が認められることを明らかにした。DNA マイクロアレイによる肝トランスポーターの発現変動解析の結果より、肝障害時の尿中排泄の増加は、血管からの取り込みの低下、血管への排泄の増加、および胆管への排泄低下によって引き起こされる可能性が示された。

(6) CYP3A4 による代謝的活性化に関する薬物誘導性肝障害試験系構築の研究。平成 13 年 7 月に厚生労働省医薬局から代表的なベンゾジアゼピン系薬物であるフルニトラゼパムの肝機能障害について注意を喚起する医薬品・医療用具等安全性情報 (168 号) が出された。我が国では数多くのベンゾジアゼピン系薬物が承認されており臨床で使用されている。そこで 13 種のベンゾジアゼピン系薬物に関して、CYP3A4 による薬物の代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。検討した被験薬には代謝物も含まれている。代表薬であるジアゼパムの主代謝経路は 1 位の脱メチル化と 3 位の水酸化である。従ってデスメチルジアゼパム、テマゼパムおよびオキサゼパムはジアゼパムの代謝物である。同様にフルラゼパムの代謝物はノルフルジアゼパムであり、ニメタゼパムの代謝物はニトラゼパムであると考えられる。結果として、フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムにおいて CYP3A4 の存在下で HepG2 細胞に対する細胞障害が増強した。他のベンゾジア

ゼピン系薬物は上述の 3 種ほど顕著な変動は認められなかった。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムは 7 位にニトロ基を有するニトロベンゾジアゼピンである。同じくニトロベンゾジアゼピンであるクロナゼパムは臨床で抗てんかん薬として使用されている薬物である。溶解度の問題から 400 μM まで検討できなかったが、100 μM においては CYP3A4 により細胞生存率がコントロールと比較して ATP 測定法で 57%、MTT 測定法で 35% 減少した。検討した他のベンゾジアゼピン系薬物はニトロ基を有していなかったため、7 位のニトロ基の存在が、ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化に重要な役割を果たしていると考えられる。置換基が及ぼす細胞障害への影響について以下に述べる。ここで使用した被験薬の 7 位はニトロ基以外にハロゲンが導入されている。7 位以外は同じ構造であるジアゼパムとニメタゼパムあるいはデスメチルジアゼパムとニトラゼパムを比較すると、コントロールミクソソーム存在下では 7 位に塩素を有する構造が特に高濃度において細胞障害が増強した。しかし、CYP3A4 存在下では低濃度においてニトロ基を有する薬物の細胞生存率が減少した。7 位の置換基は CYP3A4 による代謝的活性化だけでなく、親化合物の細胞障害性にも影響を与えていると考えられる。

ニトロベンゾジアゼピンについてさら

に複数の CYP 分子種による代謝的活性化の有無について検討した。ヒトにおいてフルニトラゼパムの代謝物は血中で 1-脱メチル体、尿中で 3-水酸化体および 7-アミノ体が検出されており、1-脱メチル化反応は主に CYP2C9 および CYP2C19、3-水酸化反応は CYP3A4 によって触媒されるまた、HepG2 細胞においてフルニトラゼパムの 7-アミノ化に NPR が関与しているとの報告がある。ニメタゼパムはマウス、ラット、イヌにおいて 1-脱メチル化体、3-水酸化体、7-アミノ化体が、ヒトにおいて 1-脱メチル化体、3-水酸化体に代謝される (エリミンインタビューフォーム)。ニトラゼパムのヒトにおける代謝物は 7-アミノ体および 7-アセトアミド体が主で、他に 2-アミノ-5-ニトロベンゾフェノン および 3-水酸化体が認められている (ネルボンインタビューフォーム)。従ってフルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムは類似した代謝を受けると考えられる。ニトロベンゾジアゼピンの代謝に関与する CYP2C9 および CYP2C19 は代謝的活性化に関与しないことから、ニトロベンゾジアゼピン系薬物の代謝的活性化は CYP3A4 特異的であることが示唆された。本研究では、CYP3A4 によりニトロベンゾジアゼピンが代謝的活性化を受けることを明らかにした。フルニトラゼパムによる肝障害についてのメカニズムは未だ明らかにされていないが、CYP3A4 による代謝的活性化が一因であることが示された。

(7) 肝障害化合物投与による網羅的 RNA 発現変動解析およびマイクロ RNA の発現変動とその役割の検討。DNA チップによる遺伝子発現プロファイルの解析は、論文 2 報となり、一定の成果を挙げている。しかし、この検討は本研究プロジェクトにおいては、予備的検討に位置付けられる。すなわち、今後肝障害の候補遺伝子または候補 microRNA を同定できた場合に、ノックダウンや導入などの手法により肝細胞および実験動物での肝障害を評価するためのバックデータになる。この研究により、化合物の肝障害性について DNA チップを用いた発現プロファイル解析で理解できることが示された。今後の研究展開におけるさらなる応用を期待している。肝における miRNA として、miR-122a が最も多く存在しており、様々な検討がなされているものの、薬物誘導性肝障害との関与はこれまでに報告されておらず、miRNA による肝毒性への関与についての研究は進んでいないのが現状である。本研究では、miRNA においても応用されているマイクロアレイ技術を用いて、チオアセタミド (TA) 処置後の網羅的な miRNA 発現変動の解析を行った。今回用いたラットにおける過去の報告はないために完全な比較を行うことは難しいが、確認できた一部の miRNA については発現パターンが似通っているものも、そうでないものも存在していた。実験条件として、TA 投与直後よりかなり早い段階における変

動について検討を行った。miRNA による転写調節は、転写された primary miRNA から mature miRNA になるとすぐにその作用を発揮すると考えられるためである。今回変動が認められた miRNA は増加が 10 種、減少が 14 種であったが、ラットにおいて同一クラスターに属するものは存在しなかった。また、これら 24 種の miRNA のうち、すでに論文として報告されているものは一部であった。本研究では miR-21 に興味を持ち、詳細な検討を行った。PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrezdb=PubMed>) のウェブサイトによると、2007 年 12 月 21 日現在、miR-21 で検索を行うと 37 報の報告が表示されるが、そのうちの 27 報までが 2007 年出版の雑誌に掲載されている。このことから miR-21 の検討が現在盛んに行われていることがわかる。この miR-21 について、5 種類の化合物においてその発現変動パターンを検討した。その結果、肝障害の発症時間に相関し、毒性発症が早い APAP および四塩化炭素において投与後 1 時間において発現の増加が認められ、逆にそれ以外の比較的毒性発現が遅い化合物の BB, DMN, TA においては早い段階での抑制が認められた。次に、miR-21 の抑制状態における細胞障害性の影響について検討を行った。しかし、本研究における検討に用いた HeLa 細胞において、TA 処置による細胞毒性を引き起こすことができなかった。肝由来ではない上に、薬物代謝能が

低下している培養系において毒性を引き起こすために必要な TA の濃度が非常に高くなってしまい、生存率の測定系にも影響が出たためである。それに加えて、miR-21 の標的蛋白質を複数の予測サイトによる検討の結果、PPAR- α を本検討における標的蛋白質として設定した。そこで、PPAR- α のアゴニストとして知られるフィブラート系薬剤との併用で、横紋筋融解症を引き起こすことが知られるスタチン系薬剤について検討した。脂溶性のシンバスタチン、ロバスタチンと、対照薬として水溶性のプラバスタチン、フルバスタチンについて検討を行ったところ、脂溶性スタチンにおいてのみ濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。しかしながら、標的蛋白質の発現を検出することができず、As0 による蛋白質への影響を検討することはできなかった。前述の通り、miR-21 は現在急速に研究が進められている miRNA であるが、薬物誘導性細胞障害との関係を明らかにした報告は初めてである。一方、予備検討においてシンバスタチン処置前に miR-21 precursor 導入について検討したが、細胞障害性への影響は認められなかった。影響しなかった理由として、HeLa 細胞には他の細胞株と比較して miR-21 が少ないとしても、正常組織より過剰な miR-21 が発現していたため影響を見ることができなかったと考えられる。As0 を導入した群において SCR と比較して 50% 程度の細胞生存率の減少

が見られた。以上の結果から、見出された miR-21 の誘導は、薬物誘導性細胞障害に対して保護的な作用を示すことが示唆された。しかしながら、細胞障害に対する保護作用を示したと考えられる、HeLa 細胞における miR-21 の具体的な標的となる遺伝子を見出すには至らなかった。今後の検討課題として、*in vivo*における As0 の導入もしくは安定発現系を用い、生体内における miR-21 の抑制による薬物誘導性肝障害への影響の検討が考えられる。

(8) CYP1B1 のマイクロ RNA による発現制御と毒性。本研究により CYP1B1 の発現には転写調節に加えて、miR-27b による転写後調節も関与することが明らかとなった。miR-27b は乳腺において高く発現している。miR-27b の発現を制御する因子は明らかにされていないが、いくつかの miRNA の発現は腫瘍の発達とともに変化することが知られている。CYP1B1 は腫瘍組織において高い発現が認められていることから、miR-27b の発現の低下が関与していることが示唆される。検討に用いた乳癌組織はすべて ER 陽性かつ progesterone receptor 陽性であった。また miR-27b および CYP1B1 の発現量と病理学的特徴、病期およびリンパ節転位との関連は認められなかった。乳癌において過剰発現した CYP1B1 は 17β -エストラジオールの代謝を上昇させることが考えられる。 17β -エストラジオールはエストロゲン依存的な腫

瘍の発達を促進する一方で、CYP1B1 により生成する代謝物である 4-水酸化エストラジオールは DNA 損傷を引き起こすことから、ホルモンが関与する毒性に関与することが示唆された。

(9) マイクロ RNA によるヒト PXR の発現制御と CYP3A4 の個人差に関する検討。PXR は薬物代謝や薬の排泄に関わる 40 以上の蛋白の発現の制御に関わっている。PXR の制御機構の研究は、薬物の pharmacokinetics の個人内および個人間変動の理解には重要な情報になると考えられる。多くの報告がヒト肝試料における PXR mRNA の変動について報告しているが、そのタンパク質レベルでの発現量との相関については明らかにしていない。この研究で最初に我々は、PXR の mRNA とタンパク質の発現量が相関しないことを見出した。このことは、マイクロ RNA の関与の可能性を示唆するものである。ルシフェラーゼアッセイにより内因性および外因性の miR-148a を発現させることにより PXR の miR-148a 認識配列 (PXRmRE148) が機能していることを明らかにした。さらに内因性の PXR タンパク質は miR-148a を過剰発現させることにより消失し、阻害することにより誘導されることを示した。これにより、ヒト PXR は転写後調節を受けていることが明らかになった。さらに、LS180 細胞を用いて、CYP3A4 の誘導が miR-148a に依存した PXR

の変動によって制御されていることを見出した。興味あることに miR-148a が認識すると考えられる配列が CYP3A4 mRNA の下流に存在する。結合エネルギー計算では CYP3A4 が PXR よりも優位と思われた。しかし、この配列は全く機能していないことをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。よって、CYP3A4 は miR-148a によって直接制御される可能性は無いと考えられた。ヒト肝パネルで miR-148a は PXR 蛋白質の発現量と反比例していた。このことは miR-148a が PXR に機能していることを示唆していた。一方、CYP3A4 は mRNA レベルと蛋白質レベルの発現量は相関していたことは、過去の多くの報告を支持するものであった。ヒト肝において、PXR 蛋白質量は CYP3A4 mRNA 発現量と相関していたことは、miR-148a が PXR を介して CYP3A4 の発現に影響をしていることを示す。一方、ヒト MDR1 および CYP2B6 の発現に miR-148a は影響をしていなかった。さらに CYP3A4 mRNA は HNF4 α や CAR の蛋白発現量とも相関していなかった。ヒトと齧歯類を比較すると、PXR の ligand-binding domain はかなり保存されているために、種差の大きな影響はないと予想される。さらに、ほとんどのマイクロ RNA は進化論的にもかなり保存されていることも知られており、種差の影響が少ないと予想される。実際 miR-148a の結合配列は、ヒトとラットで 1 塩基の差である。よって、ラット PXR も miR-148a

で制御されることが予想される。本研究において、ヒト PXR は miR-148a によって転写後調節を受け、ヒト肝における CYP3A4 の発現量に影響を及ぼしている。この発見は、ヒト CYP3A4 の大きな個人差の説明の糸口になると考えられる。

E. 結論

(1) γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによるグルタチオン減少モデルラットを用いた薬物誘導性肝障害試験系の評価。最終年度までに特許を申請し、Journal of Biological Chemistry に論文報告した。さらにアセトアミノフェンに加えて 2 種類の薬について in vivo での評価を終了した。このラット in vivo モデルについては、製薬メーカーの関心が高く、20 年 4 月から 1 社で評価研究をスタートしているところである。今後、データを評価しつつ対象とする製薬会社を増やしていき、大きな規模で評価研究を行う予定をしている。我が国の創薬研究に資する試験系に育つようにしていければ幸いと考えている。しかし、アデノウイルスが多量に必要であることが速やかな研究の進展に障害となっているが、解決は難しいのが現状である。また、組み換え遺伝子の規制を遵守するため、大学外での実験可能な施設に限られることもデメリットの一つである。

(2) スーパーオキシドデスムターゼ 2

ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築。この系はグルタチオンによる解毒系以外の主たる解毒系であるSOD2についての試験系を確立したものである。現在までに細胞を用いた系での検討が成功・終了しており、ダブソンなどでこれまでに検出できなかった明確な細胞毒性を検出することができた。In vitroのデータについて現在論文を作成中である。今後、in vivo ラットによる検討を急ぎ、上記の GSH の系と一緒に評価できる試験系として確立する予定である。In vivo ラットの系が確立したら、製薬会社での評価試験をお願いする予定である。一方、細胞レベルのみであっても、十分に評価に値するというので、20年4月から製薬会社1社で評価研究がスタートしようとしている。今後、SOD2が薬物誘導性の肝障害への関与についてのデータを集積していきたい。

(3) アデノウイルスを用いたCYP3A4の発現と薬物誘導性細胞障害。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。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結果、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。

(5) 薬物誘導性肝障害による薬物排泄能への影響。本研究では、四塩化炭素誘導性肝障害やマウス肝からヒト肝細胞への置換などによる肝細胞変化が薬物の排泄に影響を与えることを明らかにした。薬物を効果的かつ安全的に使用するためには、薬物排泄能を正しく評価することが必要であり、本研究は、病態時の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示できたと考えられる。

(6) CYP3A4による代謝的活性化に関する薬物誘導性肝障害試験系構築の研究。CYP3A4がその代謝的活性化反応に関与しないとこれまで考えられていた一連の薬物についてその関与を明確にする目的で行った。予想通り3種類のベンゾジアゼピン系薬物でのみ細胞毒性が明確になり、構造式との相関性も明確にすることができた。この内容について論文を作成中である。これまで我々が確証がそれほど無い状態で考えていたCYP3A4の関与が明確になったことで、今後の製薬会社における非臨床における試験系の組み立てにも影響を及ぼすものと考えている。

(7) 肝障害化合物投与によるマイクロRNAの発現変動とその役割の検討

マイクロ RNA が生命現象の根幹にも関わっていることが明らかにされつつあるが、そのターゲット蛋白質の同定は極めて難しい。同じような responsible element 配列を有していても機能に影響を及ぼすかの推定ができず、多くの候補蛋白質を絞りこめないことが大きな問題である。しかし、影響が出てもその寄与率を推定することは極めて難しい。今後広くマイクロ RNA に関心が新しい研究手法により、*in vivo* での寄与を定量的に考え得ることが必要である。今後さらなる検討を継続していきたい。

(5) マイクロ RNA によるヒト PXR の発現制御と CYP3A4 の個人差に関する検討。MiR-148a がヒト CYP3A4 活性の個人差に大きく寄与していることを明らかにできた。これは大変大きな意味のある成果であると考えている。CYP3A4 はヒト肝でもっとも多く重要な分子種である。本研究内容は、現在 Journal of Biological Chemistry に印刷中である。本研究結果により、個人差の主因は明らかにできたが、定量的な予測が今後の課題である。すなわち、miR-148a の発現制御機構が不明であるため、miR-148a 量を予測する手段がないのが現状である。残念ながら現在まで、マイクロ RNA の発現量の決定因子は不明であるため、今後の研究が期待されている。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

国内原著論文	0 件
海外原著論文	21 件
海外総説原著	2 件

1. Rawian Maniratanachote, Keiichi Minami, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Chaperone proteins involved in troglitazone-induced toxicity in human hepatoma cell lines. *Toxicol Sci.*, 83: 293-302, 2005.
2. Yusuke Hara, Miki Nakajima, Ken-ichi Miyamoto, and Tsuyoshi Yokoi. Inhibitory effects of psychotropic drugs on mexiletine metabolism in human liver microsomes: prediction of *in vivo* drug interactions. *Xenobiotica*, 35: 549-560, 2005.
3. Keiichi Minami, Toshiro Saito, Masatoshi Narahara, Hiroyuki Tomita, Hirokazu Kato, Hisashi Sugiyama, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats. *Toxicol. Sci.*, 87: 296-305, 2005.
4. Miki Nakajima, Yuto Fujiki, Satoru Kyo,

- Taro Kanaya, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiko Maida, Masaaki Tanaka, Masaki Inoue, and Tsuyoshi Yokoi. Pharmacokinetics of paclitaxel in ovarian cancer patients and genetic polymorphisms of *CYP2C8*, *CYP3A4*, and *MDR1*. *J. Clin. Pharmacol.*, 45: 674-682, 2005.
5. Rawiwan Maniratanachote, Ayaka Shibata, Shuichi Kaneko, Ikuo Yamamori, Takanoobu Wakasugi, Takeshi Sawazaki, Kanefusa Katoh, Shogo Tokudome, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Detection of autoantibody to aldolase B in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. *Toxicology*, 216: 15-23, 2005.
6. Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Yusuke Hara, Miki Katoh, Osamu Tachibana, Junkoh Yamashita, and Tsuyoshi Yokoi. Interindividual variability in urinary excretion of phenytoin metabolites, 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin and its *O*-glucuronide in humans and analysis of genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20: 135-143, 2005.
7. Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Tatsuki Fukami, Haruko Sakai, Akiko Nakamura, Miki Katoh, Masataka Takamiya, Yasuhiro Aoki, and Tsuyoshi Yokoi. CYP2A6 and CYP2B6 are involved in normicotine formation from nicotine in humans: Interindividual differences in these contributions. *Drug Metab. Dispos.*, 33: 1811-1818, 2005.
8. Keiichi Minami, Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Simultaneous measurement of gene expression for hepatotoxicity in thioacetamide-administered rats by DNA microarrays. *Mutat. Res.*, 603: 64-73, 2006.
9. Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Miki Katoh, Wenchao Zheng, Colin R Jefcoate, and Tsuyoshi Yokoi. Binding of steroidogenic factor-1 to the regulatory region might not be critical for transcriptional regulation of human *CYP11B1* gene. *J. Biochem.*, 139: 527-534, 2006.
10. Miki Katoh, Naoto Suzuyama, Toshiyuki Takeuchi, Sumie Yoshitomi, Satoru Asahi, and Tsuyoshi Yokoi. Kinetic analyses for species differences

- in P-glycoprotein-mediated drug transport. *J. Pharm. Sci.*, 95: 2673-2683, 2006.
11. Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Dephosphorylation of ribosomal protein P0 in response to troglitazone-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.*, 166: 189-199, 2006.
 12. Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res.*, 66: 9090-9098, 2006.
 13. Naoto Suzuyama, Miki Katoh, Toshiyuki Takeuchi, Sumie Yoshitomi, Tomoaki Higuchi, Satoru Asashi, and Tsuyoshi Yokoi. Species differences of inhibitory effects on P-glycoprotein-mediated drug transport. *J. Pharm. Sci.*, 96: 1609-1618, 2007.
 14. Miki Nakajima, Hiroyuki Yamanaka, Ryoichi Fujiwara, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. Stereoselective glucuronidation of 5-(4'-hydroxy phenyl)-5-phenylhydantoin by human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1, UGT1A9, and UGT2B15: effects of UGT-UGT interactions. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 1679-1686, 2007.
 15. Miki Katoh, Tomohito Matsui, and Tsuyoshi Yokoi. Glucuronidation of antiallergic drug, tranilast: identification of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms and effect of its phase I metabolite. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 583-589, 2007.
 16. Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Koichi Tsuneyama, Miki Katoh, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Knock down of γ -glutamylcysteine synthetase in rat causes acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 282: 23996-24003, 2007.
 17. Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Haruko Sakai, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. CYP2A13 metabolizes the substrates of human CYP1A2, phenacetin, and theophylline. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 335-339, 2007.
 18. Yusuke Hara, Miki Nakajima, Ken-ichi Miyamoto, and Tsuyoshi Yokoi. Morphine glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are

- co-administered with morphine. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 22: 103-112, 2007.
19. Hirotoshi Okumura, Miki Katoh, Keiichi Minami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Change of drug excretory pathway by CCl₄-induced liver dysfunction in rat. *Biochem. Pharmacol.*, 74: 488-495, 2007.
20. Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Miki Katoh, and Tsuyoshi. Glucuronidation of thyroxine in human liver, jejunum, and kidney microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 1642-1648, 2007.
21. Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya Mohri, and Tsuyoshi Yokoi. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by microRNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.*, in press.
22. Miki Nakajima. Smoking behavior and related cancers: the role of *CYP2A6* polymorphisms. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 9: 538-544, 2007.
23. Rawiwan Maniratanachote, and Tsuyoshi Yokoi. A mechanistic view of troglitazone hepatotoxicity. S.C. Sahu Ed. In *Hepatotoxicity: From Genomics to in vitro and in vivo*. John Wiley & Sons, Ltd. pp299-311, 2007.
2. 学会発表
 国内学会発表 21件
 国際学会発表 14件
 それ以外の発表（招聘講演等）
 14件
- 【国内学会発表】
1. 山中洋幸、中島美紀、加藤美紀、加納綾乃、田村 修、石橋弘行、横井 毅：ニコチンの主代謝物である 3'-水酸化コチニンのグルクロン酸抱合反応を触媒するヒト UGT 分子種、日本薬学会第 125 年会 2005. 3. 29-31 東京
 2. 高木信伍、中島美紀、土屋佑樹、加藤美紀、横井 毅：ヒト CYP1B1 遺伝子の転写調節における SF-1 および PKA の関与、日本薬学会第 124 年会 2006. 3. 28-30 仙台
 3. 松井智均、加藤美紀、中島美紀、横井毅：抗アレルギー薬トラニラストのヒトにおけるグルクロン酸抱合に関する検討、日本薬学会第 124 年会 2006. 3. 28-30 仙台
 4. 鈴山 直人、加藤 美紀、中島 美紀、竹内 敏之、吉富 純江、朝日 知、横井 毅：P-糖蛋白質の阻害能に関する動物種差の *in vitro* 研究、日本薬学会第

- 124 年会 2006. 3. 28-30 仙台
5. 南 圭一、マニラタナチョト ラウイワン、戸塚 善三郎、塩山 昇平、白谷 博忠、加藤 美紀、中島 美紀、横井 毅：チアゾリジンジオン系薬物による細胞毒性に及ぼすシャペロン蛋白質 gp96 の影響、第 33 回日本トキシコロジー学会 2006. 7. 3-5 名古屋
 6. マニラタナチョト ラウイワン、加藤 美紀、中島 美紀、横井 毅：トログリタゾン誘導性細胞傷害によるリボソーム P0 タンパク質の脱リン酸化、第 33 回日本トキシコロジー学会 2006. 7. 3-5 名古屋
 7. 高木信吾、土屋佑樹、中島美紀、加藤 美紀、谷屋隆雄、横井 毅：ヒト *CYP1B1* 遺伝子の発現は microRNA により制御される、日本薬学会北陸支部会 2006. 7. 8 金沢
 8. 奥村浩敏、加藤美紀、南 圭一、中島 美紀、横井 毅：薬物排泄に及ぼす肝障害の影響、日本薬学会北陸支部会 2006. 7. 8 金沢
 9. 赤井 翔、細見浩子、南 圭一、加藤 美紀、中島美紀、横井 毅：アデノウイルスベクター由来 shRNA による γ -glutamylcysteine synthetase ノックダウンを用いた薬物誘導性肝障害試験、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006. 11. 29-12. 1 東京
 10. 奥村浩敏、加藤美紀、南 圭一、中島 美紀、横井 毅：肝障害が及ぼす薬物排泄能への影響、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006. 11. 29-12. 1 東京
 11. 加藤美紀、松井智均、中島美紀、横井 毅：抗アレルギー薬トラニラストのグルクロン酸抱合に関する検討、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006. 11. 29-12. 1 東京
 12. 山中洋幸、中島美紀、藤原亮一、加藤 美紀、横井 毅：UGT-UGT タンパク相互作用の酵素活性に与える影響：UGT1A1, 1A9 および 2B15 による立体選択的な 5-(4'-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin のグルクロン酸抱合反応について、第 21 回日本薬物動態学会年会、2006. 11. 29-12. 1 東京
 13. 山中洋幸、中島美紀、藤原亮一、加藤 美紀、横井 毅：チロキシンのグルクロン酸抱合反応を触媒するヒト UGT 分子種の同定と UGT-UGT 蛋白質間相互作用の影響、日本薬学会第 125 年会 2007. 3. 28-30 富山
 14. 赤井 翔、細見浩子、南 圭一、加藤 美紀、中島美紀、横井 毅： γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによる薬物誘導性肝障害試験系の構築、日本薬学会第 125 年会 2007. 3. 28-30 富山
 15. 細見浩子、赤井 翔、南 圭一、加藤 美紀、中島美紀、横井 毅：グルタチオン減少および CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた薬物毒性試験系の構築、第 34 回日本トキシコロジー学会学術

- 年会 2007. 6. 27-29 東京
16. 山中洋幸、藤原亮一、中島美紀、生城真一、榊 利之、横井 毅：ヒト UGT1A 分子種間の相互作用による酵素活性への影響、第 10 回 P450 研究会 2007. 7. 21-22 富山
 17. 高木信吾、中島美紀、茂利拓也、横井 毅：ヒト PXR の microRNA による転写後調節、第 5 回ながの遺伝子発現調節研究会 2007. 11. 24-25 上諏訪
 18. 高木信伍、中島美紀、茂利拓也、加藤美紀、横井 毅：miR-148a によるヒト pregnane X receptor (PXR) の発現制御と CYP3A4 の発現に及ぼす影響、第 17 回 アンチセンスシンポジウム 2007. 12. 3-4 金沢
 19. 森田麻友、赤井 翔、細見 浩子、加藤美紀、中島美紀、横井 毅；グルタチオン合成酵素ノックダウンラットを用いた薬物誘導性肝障害の検討 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26-28 日 東京（発表予定、抄録提出済）
 20. 吉川幸孝、細見浩子、加藤美紀、中島美紀、横井 毅；SOD2 ノックダウンおよび CYP3A4 発現アデノウイルスを用いた薬物誘導性細胞障害試験系の構築：第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008 年 6 月 26-28 日 東京（発表予定、抄録提出済）
 21. 水野 克彦、加藤美紀、中島美紀、横井 毅；ベンゾジアゼピン系薬物の

CYP3A4 による代謝的活性化：第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会 2008 年 6 月 26-28 日 東京（発表予定、抄録提出済）

【国際学会発表】

1. Rawiwan Maniratanachote, Ayaka Shibata, Shuichi Kaneko, Ikuo Yamamori, Takanobu Wakasugi, Takeshi Sawazaki, Kanefusa Katoh, Shogo Tokudome, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Identification of autoantibodies to aldolase B in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. 13th North-America ISSX and 20th JSSX joint meeting, 2005. 10.23-27 Maui-Hawaii
2. Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. Limited impact of steroidogenic factor-1 on the transcriptional regulation of human *CYP11B1* gene. 13th North-America ISSX and 20th JSSX joint meeting, 2005. 10.23-27 Maui-Hawaii
3. Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Akiko Nakamura, Miki Katoh, Masataka Takamiya, Yasuhiro Aoki, and Tsuyoshi Yokoi. CYP2A6 and CYP2B6 are involved in normicotine formation from nicotine in humans. 13th North-America

- ISSX and 20th JSSX joint meeting, 2005.
10.23-27 Maui-Hawaii
4. Rawiwan Maniratanachote, Ayaka Shibata, Shuichi Kaneko, Ikuo Yamamori, Takanobu Wakasugi, Takeshi Sawazaki, Kanefusa Katoh, Shogo Tokudome, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Identification of anti-aldolase B autoantibodies in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2006. 3.5-9 San Diego-USA
 5. Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Ribosomal protein P0 dephosphorylation associated with troglitazone-induced cytotoxicity. The 1st Asia Pacific ISSX Meeting, 2006. 5.25-27 Jeju-Korea
 6. Yuki Tsuchiya, Shingo Takagi, Miki Nakajima, Miki Katoh, Takao Taniya, and Tsuyoshi Yokoi. Human cytochrome P450 CYP1B1 is a target of microRNA, miR-27b. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6.18-23 Kyoto-Japan
 7. Rawiwan Maniratanachote, Miki Katoh, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Dephosphorylation of ribosomal protein P0 in response to troglitazone-induced cytotoxicity. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6.18-23 Kyoto-Japan
 8. Keiichi Minami, Miki Nakajima, Yuto Fujiki, Miki Katoh, Frank J. Gonzalez and Tsuyoshi Yokoi. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 and lipoprotein lipase via aryl hydrocarbon receptor. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006. 6.18-23 Kyoto-Japan
 9. Tsuyoshi Yokoi, Shingo Takagi, Yuki Tsuchiya, Miki Katoh, Takao Taniya, and Miki Nakajima. Human CYP1B1 is regulated by microRNA, miR-27b. 15th International Conference on cytochrome P450, 2007. 6.17-21 Bled-Slovenia
 10. Hiroyuki Yamanaka, Miki Nakajima, Ryoichi Fujiwara, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. Thyroxine glucuronidation in human liver jejunum, and kidney microsomes were catalyzed by UGT1A1, 1A7, 1A8 and 1A10: effects of UGT-UGT interactions. 8th International ISSX meeting, 2007. 10.9-12

Sendai-Japan

11. Shingo Takagi, Miki Nakajima, Takuya Mohri, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA post-transcriptionally regulates human PXR affecting the expression level of CYP3A4. 8th International ISSX meeting, 2007. 10.9-12 Sendai-Japan

12. Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Haruko Sakai, Miki Katoh, and Tsuyoshi Yokoi. CYP2A13 has high catalytic activity toward substrates of CYP1A2 and CYP2E1. 8th International ISSX meeting, 2007. 10.9-12 Sendai-Japan

13. Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA regulates CYP enzymes. Special Seminar for Biomedical Research Centre, University of Dundee 2007.9.12 Dundee-UK

14. Tsuyoshi Yokoi, Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Miki Katoh, and Miki Nakajima. Investigation of drug induced hepatotoxicity by knockdown of glutathione synthesis. 8th International ISSX Meeting, 2007.10.9-12 Sendai-Japan

【その他、招聘講演など】

1. 横井 毅：薬物誘導性肝障害について、第 53 回質量分析総合討論会 2005. 5. 25-27 大宮 シンポジウム

2. 横井 毅：薬物代謝能の個人差と薬物療法、平成 17 年度金沢大学医学部十全同窓会総会講演 2005. 7. 12 金沢

3. 横井 毅：創薬研究における安全性評価の現状と展望、第 22 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー 2005. 10. 4 東京 招待講演

4. Tsuyoshi Yokoi. Idiosyncratic drug reactions and pharmacogenetics: The troglitazone case. 13th NA-ISSX/20th JSSX Meeting. 2005.10.23-37 Hawaii-USA

5. Tsuyoshi Yokoi. Mechanistic approach to drug induced idiosyncratic hepatotoxicity. 1st Indo-Japanese International Conference on Advances in Pharmaceutical Research and Technology, 2005. 11. 25-29 Mumbai-India

6. Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation and drug induced hepatotoxicity—the troglitazone case—. 21st JSSX Annual Meeting, 2006.11.29-12.1 Tokyo-Japan ISSX-JSSX Joint Symposium

7. 横井 毅：薬物代謝と P-糖蛋白質の種差、第 10 回薬物動態談話会セミナー 2006. 8. 23-25 筑波

8. 高木信吾、土屋祐樹、中島美紀、加藤美紀、谷屋隆雄、横井 毅：

- microRNAによるヒトCYP1B1遺伝子の発現制御、第21回日本薬物動態学会年会、2006.11.29-12.1 東京 シンポジウム
9. 横井 毅：薬物代謝と毒性発現-代謝物の安全性も含めて-、日本薬学会関東支部第21回シンポジウム
2007.11.10 東京
10. 横井 毅：薬物相互作用と薬物動態関連遺伝子の多型、福井大学医学部特別講義 2007.6.2 福井
11. 横井 毅：医薬品の代謝物の安全性評価、第34回日本トキシコロジー学会学術年会 2007.6.27-29 東京
ワークショップ
12. 横井 毅：代謝物の安全性情報と副作用、第24回日本TDM学会学術大会
2007.7.28-29 金沢 シンポジウム
13. Tsuyoshi Yokoi. MicroRNA regulates CYP enzymes. Special Seminar for Biomedical Research Centre, University of Dundee 2007.9.12 Dundee-UK
14. Tsuyoshi Yokoi, Sho Akai, Hiroko Hosomi, Keiichi Minami, Miki Katoh, and Miki Nakajima. Investigation of drug induced hepatotoxicity by knockdown of glutathione synthesis. 8th International ISSX Meeting, 2007.10.9-12 Sendai-Japan
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 1件
特願：2006-320830
出願日：2006年11月27日
発明の名称：アデノウイルスベクターによるグルタチオン合成酵素ノックダウン系を用いた薬物誘導性肝障害ラットモデル
- さらに、SOD2のアデノウイルスベクターによるノックダウンの系について出願準備中。
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他 該当無し

追記；論文として発表していない研究成果（論文作成中）は、資料として添付した。

【資料1】 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

γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによるグルタチオン減少モデル
ラットを用いた薬物誘導性肝障害試験系の評価

主任研究者 横井 毅 金沢大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

グルタチオン(GSH)は、グリシン、グルタミン酸およびシステインから構成されるトリペプチドであり、内因性物質や薬物から生じるフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護している。GSTは薬物および活性代謝物を解毒することに深く関わっているが、ヒトに比べてげっ歯類で酵素活性が高いことが知られており、この代謝能の違いが前臨床試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。本研究においては、GSH 減少モデルラットを用いてジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害の発現について検討し、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出できることを明らかにした。しかし、ヒトにおいて毒性が認められる投与量と比べると薬物の投与量が過剰である点を考慮すると、今後はラット肝臓中にヒト CYP を過剰発現させる、あるいはヒトと比べてラットで高い代謝能を持つ酵素をさらにノックダウンさせるなどして、ヒトにおける毒性発現に近い実験系を確立する必要があると考えられる。種差に起因する代謝能の違いは、医薬品開発中止の主な原因の一つである薬物誘導性肝障害の予測を困難にしている。このため、ヒトにより近いモデル動物の作成が望まれている。今回、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出する有用な手段となり得ることを明らかにした。本研究で検討した GSH 減少モデルラットが医薬品開発の安全性研究で用いられ、前臨床試験におけるスクリーニングの段階で薬物誘導性肝障害を高感度に検出し、ヒトにおける副作用を未然に防ぐ有用な手段になることを期待する。

A. 研究目的

医薬品開発研究において、候補化合物が医薬品として認可されるまで 10～15 年もの年月と 150～200 億円の研究費を要すると言われている。前臨床の薬効試験、安全性試験や薬物動態試験などの多くの試験は、マウスやラットなどのげっ歯類やイヌやサルを用いて行われている。化学物質の多くは肝臓で代謝・解毒されるが、実験動物とヒトでは、代謝活性に大きな種差があることが知られている。このため、ヒトにおける体内動態を前臨床試験の段階で予測することは困難であり、実際に臨床試験の段階で開発中止となる候補化合物は 60%に達し、その原因の約 80%は種差に起因するものであると言われている (Nedeicheva and Gut, 1994; Kola and Landis, 2004)。

グルタチオン (5-L-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) は、グリシン、グルタミン酸およびシステインから構成されるトリペプチドであり、内因性物質や薬物より生じるフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護している (Reed, 1986; Lu, 1999)。グルタチオン S-転移酵素 (GST) は薬物および活性代謝物を解毒することに

深く関わっているが、ヒトに比べげっ歯類で酵素活性が高いことが知られており (Sims and Grover, 1965; Jackson et al., 2000; Grover and Sims, 1964)、この代謝能の違いが非臨床安全性試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。活性代謝物が核酸やタンパク質と共有結合する結果、遺伝毒性や、直接的に細胞機能を傷害し臓器障害を引き起こす例も少なくない (有吉ら, 2000)。GSH は γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) により、グルタミン酸とシステインから γ -グルタミルシステインが合成され、さらに glutathione synthetase (GSS) によってグリシンと γ -グルタミルシステインから合成される (Orlowski and Meister, 1971)。この反応の律速酵素である γ -GCS は、ヘテロダイマーを形成している酵素であり、catalytic サブユニット (heavy chain; 73 kDa) および modulatory サブユニット (light chain; 27.7 kDa) から構成されており、catalytic サブユニットは酵素活性部位として、modulatory サブユニットは GSH 蓄積による GSH 合成のフィードバック阻害を減弱させることが知られている (Huang et al., 1993)。また、

catalytic サブユニットのノックアウトは胎生致死である (Dalton et al., 2000)。

現在、ある特定の遺伝子がどのような機能に影響を及ぼすかを検討する方法として、RNA interference (RNAi) による標的遺伝子のノックダウンが簡便なものとして利用されている。RNAi は二本鎖 RNA が生体内に取り込まれた後、RNase III ファミリーに属する Dicer という酵素によって 2 塩基のオーバーハングを持つ 20 塩基程度の small interfering RNA (siRNA) に分割され (Elbashir et al., 2001b)、その siRNA が RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、相補的な配列を持つ RNA を分解するという現象である (Hammond et al., 2000)。近年、哺乳類細胞に対する RNAi が盛んに行われるようになり、様々研究分野に応用されはじめている。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は *in vivo* での簡便な遺伝子導入法として注目されており、遺伝子治療の分野で様々な検討がなされている (Peng, 2005; Chu et al., 2004; Kruyt and Curiel, 2002)。さらに近年、生体内で siRNA として作用する short hairpin RNA (shRNA) を発現する配列を組み込んだアデノウイルスを用い

た検討がマウスで行われ、ノックダウンを行うことによる目的遺伝子の生体での役割、薬物開発のターゲット因子の決定等の検討がされている (Xu et al., 2006)。

本研究室では、 γ -GCS の heavy chain に相補的な short hairpin RNA を発現するアデノウイルス (AdGCSsh-shRNA) をすでに作製している。さらに、アデノウイルスが主に肝組織に感染することを利用し、ラット肝臓中の γ -GCS の heavy chain をノックダウンさせ、GSH 合成を抑制させた GSH 減少モデルラットにおいて、GSH 減少によって毒性が増強される典型的肝障害化合物であるアセトアミノフェン (APAP) による肝障害を高感度に検出した (Akai et al., 2007)。本研究では、GSH 減少ラットにジクロフェナクあるいはフルタミドを投与することで、薬物誘導性肝障害の発現について検討した。

薬物誘導性肝障害は、医薬品の販売中止の主な理由の一つであり、米国では、急性の肝障害の 50%以上を占めている (Lee, 2003)。肝機能の変化における最も重要な所見として“Hy’s Law”と呼ばれる法則に言及する報告がある (Temple, 2001)。この法則のひとつ

では、肝障害時に上昇する血清パラメーターである AST あるいは ALT 値が通常の状態と比較して3倍以上に上昇すると一般的に肝障害を示すと規定している。本研究では、AST および ALT 値に加えてビリルビン値と肝組織像によって肝障害の発現を検討することにした。

現在ヒトに使用されている多くの薬物には、頻度は低いものの肝障害の報告がある。中でも本研究では、ジクロフェナクおよびフルタミドに注目した。

ジクロフェナクは、非ステロイド性消炎鎮痛剤の一種であり、その作用機序は主としてアラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼの活性を阻害することにより、炎症、疼痛等に関連するプロスタグランジン (PG) の合成を阻害するものと考えられている。しかし、一部の患者に重篤な肝障害を引き起こすことが報告されている (Purcell et al., 1991; Walker, 1997)。

ジクロフェナクは活性代謝物となる経路として二つの経路が同定されており、一つ目は UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によって acyl glucuronide が、二つ目はシトクロム P450 (CYP) によって

quinoneimine が生成すると考えられている (Tange et al., 1999a; Poon et al., 2001; Kretz-Rommel and Boelsterli, 1993)。また、ジクロフェナクと GSH との複合体が、ジクロフェナクとともに培養したヒト肝細胞、ラット肝細胞やラット肝ミクロソーム、さらに、ジクロフェナクを投与したラットの胆汁およびジクロフェナクを服用したヒトの尿中から検出されている (Tang et al., 1999a; Grillo et al., 2003; Poon et al., 2001)。

フルタミドは、前立腺癌の治療に用いられる非ステロイド性抗アンドロゲン薬であり、その作用機序は、水酸化フルタミドに代謝され前立腺癌内に存在するアンドロゲンレセプターに結合し、アンドロゲン作用を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮するものと考えられている。しかし、肝障害のマーカーであるトランスアミナーゼが一時的に増加することや、稀に重篤な肝障害を引き起こすことが報告されている (Wysowski and Fourscroy, 1996; Osculati and Castiglioni, 2006; Gomez et al., 1992; Cetin et al., 1999; Nakagawa et al., 1999)。

フルタミドは CYP によって酸化され、活性代謝物を生成するとされてい