

- Esworthy RS, Ho YS, and Chu FF (1997) The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **340**, 59-63.
- Fang J, Coutts RT, McKenna KF, and Baker GB (1998) Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **358**, 592-599.
- Fau D, Berson A, Eugene D, Fromenty B, Fisch C, and Pessayre D (1992) Mechanism for the hepatotoxicity of the antiandrogen, nilutamide. Evidence suggesting that redox cycling of this nitroaromatic drug leads to oxidative stress in isolated hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 69-77.
- Fau D, Eugene D, Berson A, Letteron P, Fromenty B, Fisch C, and Pessayre D (1994) Toxicity of the antiandrogen flutamide in isolated rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 954-962.
- Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, Yamauchi S, Saitoh M, Takeda K, and Ichijo H (2007) Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8152-8163.
- Gal J, Zirrolli JA, and Lichtenstein PS (1988) Labetalol is metabolized oxidatively in humans. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **62**, 3-17.
- Girgis NI, Yassin MW, Sippel JE, Sorensen K, Hassan A, Miner WF, Farid Z, and Abu el Ella A (1976) The value of ethambutol in the treatment of tuberculous meningitis. *J. Trop. Med. Hyg.* **79**, 14-17.
- Gitlin N, Julie NL, Spurr CL, Lim KN, and Juarbe HM (1998) Two cases of severe clinical and histologic hepatotoxicity associated with troglitazone. *Ann. Intern. Med.* **129**, 36-38.
- Glatt H, Gemperlein I, Setiabudi F, Platt KL, and Oesch F (1990) Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* **5**, 241-249.
- Goda R, Nagai D, Akiyama Y, Nishikawa K, Ikemoto I, Aizawa Y, Nagata K, and Yamazoe Y (2006) Detection of a new N-oxidized metabolite of flutamide, N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl) phenyl] hydroxylamine, in human liver microsomes and urine of prostate cancer patients. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 828-835.
- Grover PL and Sims P (1964) Conjugations with glutathione distribution of glutathione S-aryltransferase in vertebrate species. *Biochem. J.* **90**, 603-606.
- Hummer M, Kurz M, Kurthaler I, Oberbauer H, Miller C, and Fleischhacker WW (1997) Hepatotoxicity of clozapine. *J. Clin. Psychopharmacol.* **17**, 314-317.
- Hashimoto H, Nakagawa T, Yokoi T, Sawada

- M, Itoh S, and Kamataki T (1995) Fetus-specific CYP3A7 and adult-specific CYP3A4 expressed in Chinese hamster CHL cells have similar capacity to active carcinogenic mycotoxins. *Cancer Res.* **55**, 787-791.
- Hayes JD, Flanagan JU, and Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51-88.
- Henry RR (1997) Thiazolidinediones. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **26**, 553-573.
- Higashi T, Furukawa M, Hikita K, Naruse A, Tateishi N, and Sakamoto Y (1985) Re-evaluation of protein-bound glutathione in rat liver. *J. Biochem.* **98**, 1661-1667.
- 堀井 郁夫 (2001) 非臨床試験マニュアル (野村 譲、堀井 郁夫、吉田 武美 編) pp 335-347. 株式会社エル・アイ・シー、東京.
- Hussain Z, Kar P, and Husain SA (2003) Antituberculosis drug-induced hepatitis: risk factors, prevention and management. *Indian J. Exp. Biol.* **41**, 1226-1232.
- Isobe T, Hichiya H, Hanioka N, Yamamoto S, Shinoda S, Funae Y, Satoh T, Yamano S, and Narimatsu S (2005) Different effects of desipramine on bufuralol 1<sup>st</sup>-hydroxylation by rat and human CYP2D enzymes. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 634-40.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, and Nabeshima Y (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313-322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, and Yamamoto M (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76-86.
- Iverson SL and Uetrecht JP (2001) Identification of a reactive metabolite of terbinafine: insights into terbinafine-induced hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 175-181.
- Jeyapaul J and Jaiswal AK (2000) Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE) -mediated expression and induction of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 1433-1439.
- Kalgutkar AS, Nguyen HT, Vaz AD, Doan A, Dalvie DK, McLeod DG, and Murray JC (2003) In vitro metabolism studies on the isoxazole ring scission in the anti-inflammatory agent leflunomide to its active  $\alpha$ -cyanoenol metabolite A771726: mechanistic similarities with the cytochrome P450-catalyzed dehydration of aldoximes. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1240-1250.

Kalgutkar AS, Vaz AD, Lame ME, Henne KR, Soglia J, Zhao SX, Abramov YA, Lombardo F, Collin C, Hensch ZS, and Hop CE (2005) Bioactivation of the nontricyclic antidepressant nefazodone to a reactive quinone-imine species in human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 3A4. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 243-253.

Kanebratt KP and Andersson TB (2008) Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1444-1452.

Kapetanovic IM, Torchin CD, Strong JM, Yonekawa WD, Lu C, Li AP, Dieckhaus CM, Santos WL, Macdonald TL, Sofia RD, and Kupferberg HJ (2002) Reactivity of atropaldehyde, a felbamate metabolite in human liver tissue in vitro. *Chem. Biol. Interact.* **10**, 119-134.

Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 489-499.

Kassahun K, Person PG, Tang W, McIntosh I, Leung K, Elmore C, Dean D, Wang R, Doss G, and Baillie TA (2001) Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates in vitro and in vivo. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 62-70.

Kato R and Yamazoe Y (1992) Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex-and

species-related differences in drug toxicity. *Toxicol. Lett.* **64-65**, 661-667.

加藤 隆一 (2000) 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として 第2版 (加藤 隆一、鎌滝 哲也 編), pp 6-8. 東京化学同人、東京.

Keyse SM and Tyrrell RM (1989) Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 99-103.

Kretz-Rommel A and Boelsterli UA (1993) Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**, 155-161.

Le Vee M, Jigorel E, Glaise D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, and Fardel O (2006) Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. *Eur. J. Pharm. Sci.* **28**, 109-117.

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, and Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 9782-9787.

Lee YH, Chung MC, Lin Q, and Boelsterli UA (2008) Troglitazone-induced hepatic mitochondrial proteome expression dynamics in heterozygous Sod2 (+/-) mice: two-stage

oxidative injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **231**, 43-51.

Legault J, Carrier C, Petrov P, Renard P, Remacle J, and Mirault ME (2000) Mitochondrial GPx1 decreases induced but not basal oxidative damage to mtDNA in T47D cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 416-422.

Lloyd S, Hayden MJ, Sakai Y, Fackett A, Silber PM, Hewitt NJ, and Li AP (2002) Differential in vitro hepatotoxicity of troglitazone and rosiglitazone among cryopreserved human hepatocytes from 37 donors. *Chem. Biol. Interact.* **10**, 57-71.

Lucena MI, Andrade RJ, Martínez C, Ulzurrun E, García-Martín E, Borraz Y, Fernández MC, Romero-Gomez M, Castiella A, Planas R, Costa J, Anzola S, and Agúndez JA (2008) Glutathione S-transferase m1 and t1 null genotypes increase susceptibility to idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology* **48**, 588-596.

Maines MD, Trakshel GM, and Kutty RK (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* **261**, 411-419.

Maines MD (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* **2**, 2557-2568.

Marklund SL (1984) Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase

isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* **15**, 649-655.

Martin LE, Hopkins R, and Bland R (1976) Metabolism of labetalol by animals and man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **3**, 695-710.

Martinez-Jimenez CP, Jover R, Donato MT, Castell JV, and Gomez-Lechon MJ (2007) Transcriptional regulation and expression of CYP3A4 in hepatocytes. *Cur. Drug Metab.* **8**, 185-194.

Masubuchi Y, Kano S, and Horie T (2006) Mitochondrial permeability transition as a potential determinant of hepatotoxicity of antidiabetic thiazolidinediones. *Toxicology* **15**, 233-239.

Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, and Taketo MM (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* **25**, 179-185.

Matsuzaki Y, Nagai D, Ichimura E, Goda R, Tomura A, Doi M, and Nishikawa K (2006) Metabolism and hepatic toxicity of flutamide in cytochrome P450 1A2 knockout SV129 mice. *J. Gastroenterol.* **41**, 231-239.

McLeod DG (1993) Antiandrogenic drugs. *Cancer* **71**, 1046-1049.

McLeod DG (1997) Tolerability of nonsteroidal antiandrogens in the treatment of advanced prostate cancer. *Oncologist* **2**, 18-27.

- Michiels C, Raes M, Toussaint O, and Remacle J (1994) Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **17**, 235-248.
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, and Kan YW (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the  $\beta$ -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 9926-9930.
- Mukherjee S, Gangopadhyay H, and Das DK (2008) Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 609-617.
- Nedeicheva V and Gut I (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**, 1151-1175.
- Nelson EB (1980) The pharmacology and toxicology of meta-substituted acetanilide I: acute toxicity of 3-hydroxyacetanilide in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **28**, 447-456.
- Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 1-10.
- Neuschwander-Tetri BA, Isley WL, Oki J C, Ramrakhiani S, Quiason S G, Phillips NJ, and Brunt EM (1998) Troglitazone-induced hepatic failure leading to liver transplantation. A case report. *Ann. Intern. Med.* **129**, 38-41.
- Nonn L, Williams RR, Erickson RP, and Powis G (2003) The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell Biol.* **23**, 916-922.
- Oesch F, Jerina DM, and Daly JW (1971) Substrate specificity of hepatic epoxide hydase in microsomes and in a purified preparation: evidence for homologous enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 253-261.
- Oesch F (1973) Mammalian epoxide hydrases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* **3**, 305-340.
- Ohbuchi M, Miyata M, Nagai D, Shimada M, Yoshinari K, and Yamazoe Y (2008) Role of enzymatic N-hydroxylation and reduction in flutamide metabolite-induced liver toxicity. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 97-105.
- Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, and Yokoi T (2000) A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1303-1310.
- 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.

Ong MM, Latchoumycandane C, and Boelsterli UA (2007) Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicol. Sci.* **97**, 205-213.

Ozkan A and Fiskin K (2004) Epirubicin HCl toxicity in human-liver derived hepatoma G2 cells. *Pol. J. Pharmacol.* **56**, 435-444.

Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP, and Yang CS (1993) Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 511-518.

Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, and Park BK (1995) Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 984-990.

Polasek TM and Miners JO (2008) Time-dependent inhibition of human drug metabolizing cytochromes P450 by tricyclic antidepressants. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **65**, 87-97.

Prescott LF, Roscore P, Wright N, and Brown SS (1971) Plasma-paracetamol half-life and hepatic necrosis in patients with paracetamol overdose. *Lancet* **1**, 519-522.

Rubiolo JA, Mithieux G, and Vega FV (2008) Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented

activities of antioxidant enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* **4**, 66-72.

Purcell P, Henry D, and Melville G (1991) Diclofenac hepatitis. *Gut* **32**, 1381-1385.

Radi R, Sims S, Cassina A, and Turrens JF (1993) Roles of catalase and cytochrome c in hydroperoxide-dependent lipid peroxidation and chemiluminescence in rat heart and kidney mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **15**, 653-659.

Rendic S and Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab. Rev.* **29**, 413-580.

Sarich TC, Adams SP, Petricca G, and Wright JM (1999) Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 695-702.

Scheen AJ (2001) Thiazolidinediones and liver toxicity. *Diabetes Metab.* **27**, 305-313.

Shi EC, Fisher R, McEvoy M, Vantol R, Rose M, and Ham JM (1982) Factors influencing hepatic glutathione concentrations: a study in surgical patients. *Clin. Sci (Lond)* **62**, 279-283.

Simon T, Becquemont L, Mary-Krause M, de Waziers I, Beaune P, Funck-Brentano C, and Jaillon P (2000) Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic

polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clin. Pharmacol. Ther.* **67**, 432-437.

Smith KS, Smith PL, Heady TN, Trugman JM, Harman WD, and Macdonald TL (2003) In vitro metabolism of tolcapone to reactive intermediates: relevance to tolcapone liver toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 123-128.

Thompson CD, Kinter MT, and Macdonald TL (1996) Synthesis and in vitro reactivity of 3-carbamoyl-2-phenylpropionaldehyde and 2-phenylpropenal: putative reactive metabolites of felbamate. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 1225-1229.

Thummel KE, T Lee CA, Kunze KL, Nelson SD, and Slattery JT (1993) Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1563-1569.

Tietze F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522.

Tyrrell RM, Applegate LA, and Tromvoukis Y (1993) The proximal promoter region of the human heme oxygenase gene contains elements involved in stimulation of transcriptional activity by a variety of agents including oxidants. *Carcinogenesis* **14**, 761-765.

U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2007) AASLD-FDA-NIH-PhRMA-Hepatotoxicity Special Interest Group Meeting, 2007

Presentations. Immune Mechanisms of DILI. Available et al.

<http://www.fda.gov/cder/livertox/presentations2007/uetrecht.htm>.

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.

Vickers AE, Sinclair JR, Zollinger M, Heitz F, Glänzel U, Johanson L, and Fischer V (1999) Multiple cytochrome P-450s involved in the metabolism of terbinafine suggest a limited potential for drug-drug interactions. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 1029-1038.

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.

Walgren JL, Mitchel MD, and Thompson DC (2005) Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 325-361.

Walsky RL and Obach RS (2004) Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 647-60.

Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M, and Rajan T (1987) Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J. Clin. Invest.* **80**, 1446-1454.

Wen X, Wang JS, Neuvonen PJ, and Backman JT (2002) Isoniazid is a mechanism-based inhibitor of cytochrome P450 1A2, 2A6, 2C19 and 3A4 isoforms in human liver microsomes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **57**, 799-804.

Xu JJ, Henstock PV, Dunn MC, Smith AR, Chabot JR, and de Graaf D (2008) Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. *Toxicol. Sci.* **105**, 97-105.

Yamazaki H and Shimada T (1997) Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 161-169.

Yamazaki H, Shibata A, Suzuki M, Nakajima M, Shimada N, Guengerich FP, and Yokoi T (1999) Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 1260-1266.

Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW, and Dalton TP (2002) Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit *gclm*(<sup>-/-</sup>) knockout mouse. *J. Biol. Chem.* **277**, 49446-49452.

Yeleswaram K, Rurak DW, Kwan E, Hall C, Doroudian A, Abbott FS, and Axelson JE (1993) Disposition, metabolism, and pharmacodynamics of labetalol in adult sheep. *Drug Metab. Dispos.* **21**, 284-92.



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤研究推進事業）

分担研究報告書

ハロタンによる肝障害誘導メカニズム

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系

分担研究者 中島美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系

研究要旨

薬物誘導性肝障害は医薬品の開発が中止となる主要な原因であり、多くの医薬品が肝障害に関連すると言われている。しかしアセトアミノフェンの過剰投与による肝障害のように古くから研究がなされているものを除き、そのメカニズムは断片的にしか明らかにされていない。また非臨床試験で用いられる実験動物とヒトとの間にある種差およびヒトにおける個体差が薬物誘導性肝障害の発症の予測を困難にしている。免疫担当細胞であるT細胞の機能の違いが様々な疾患の発症に関連していると考えられるが、薬物誘導性肝障害の種差や系統差については、一部の薬物についてのみ研究がなされているに過ぎない。I章ではハロタンによる肝障害モデル動物の作成、肝組織像の評価および炎症や免疫に関連した遺伝子の発現変動について検討した。ハロタンに対し高い感受性を示すBALB/cマウスにおいて肝組織の障害、好中球の浸潤、Th1とTh2のバランスの変化およびMIP-2の発現の顕著な誘導が認められた。II章ではハロタンによる肝障害に対する脾臓細胞の寄与を調べるために初代培養脾臓細胞のIFN $\gamma$ およびIL-4の産生能の変化をマイトジェンに対する応答性を測定することで評価した。BALB/cマウスにおいて脾臓細胞のIFN $\gamma$ およびIL-4の産生能はハロタンの投与によって減少することを示唆する結果となり、脾臓に由来するこれらサイトカインの肝障害に対する寄与は低いと考えられた。III章ではPGE $_1$ をBALB/cマウスに投与することでTh1とTh2のバランスや好中球の浸潤が変化し、肝障害の程度に影響が現れるかについて検討した。PGE $_1$ の投与によって肝障害の軽減、好中球の浸潤の抑制、変動していたTh1とTh2の balan

スの回復および MIP-2 の誘導の抑制が認められた。Th1 と Th2 のバランスおよび好中球の肝臓への浸潤については肝障害の発症に関わることが報告されて。IV 章ではハロタンによる肝障害に対する IL-17 の影響について検討した。抗 IL-17 抗体による IL-17 の中和は MIP-2 の発現を抑制し、肝障害を軽減することが明らかとなった。

本研究によってハロタン誘導性肝障害の発症には Th1 と Th2 のバランスの変動および IL-17 を介した MIP-2 の誘導による好中球の肝臓への浸潤が関与しており、これらの変動は PGE<sub>1</sub> の投与によって抑制されることを明らかにした。本研究は薬物誘導性肝障害のメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

#### A. 研究目的

医薬品の開発における前臨床試験は実験動物を用いて候補化合物のヒトにおける有効性、安全性を予測することで、臨床試験の安全性の確保や上市できない可能性の高い化合物の開発を早期に中止するために不可欠なものとなっている。しかし新規候補化合物の 90%以上は早期臨床試験における副作用のために開発中止になるといわれており (Jenkins et al., 2008)、財務上の大きな負荷を製薬企業に与え、医薬品の開発により長い期間を要する原因となっている。

医薬品の副作用は服用した患者の転帰に関わる重大な健康上の問題である。副作用には様々なものがあり、全ての臓器が影響を受け得るが肝臓における副作用は医薬品の販売が中止となる主要な原因となっており、600 以上の医薬品が肝障害と関連があるといわれている。しかし種

差や個体差の問題がヒトにおける薬物誘導性肝障害の発症を予測することを困難にしており、また発症機序も断片的に明らかになっているにすぎない。薬物誘導性肝障害の病態は他の肝疾患とも類似性があり、肝毒性発症メカニズムに関して研究することは薬の安全性の確保に貢献するだけでなく、様々な肝疾患に対して新規の薬物治療戦略を提供し得ると考えられる (Park et al., 2005a)。

肝臓は糖新生、胆汁の分泌など様々な働きを持つ臓器であるが、脂溶性の高い生体外異物を、より素早く排泄可能な水溶性の高い誘導体へと変換する異物代謝も肝臓が担っている重要な役割のひとつである。肝臓に流入する血液の約 80%は消化管で吸収した栄養分を含む門脈血であり、肝臓は生体内において最も高濃度の異物に曝される臓器のひとつであるといえる。肝臓は高い薬物代謝酵素活性を

有しており、チトクロム P450 (CYP) は薬物を含む様々な生体外異物の代謝を担う主要な酵素として知られている (Park et al., 2005a)。

薬物代謝酵素の主要な役割は本来その解毒作用にあるが、代謝物が高い反応性を獲得し、生体高分子と共有結合を形成することで副作用を発現する場合がある。代謝反応によって生じたこのような活性代謝物は非常に不安定で半減期が短いため、血漿からはほとんどの場合検出することができない。そのため製薬企業においては還元型グルタチオン等を用い、化合物の生体内における代謝的活性化によって生じる付加体形成についての試験が行われている。しかし肝臓において代謝的活性化を受けるが肝障害を起こさない化合物も数多く存在している。その原因のひとつとしても生体内に存在するグルタチオンによる抱合反応が重要であると考えられており、その最も典型的な例として常用量のアセトアミノフェンの投与が挙げられる。さらにアセトアミノフェンの位置異性体は肝障害を起こさないことが報告されており (Tirmenstein and Nelson, 1989)、活性代謝物と生体内高分子の共有結合が必ずしも肝障害を引き起こすとは限らず、このことはヒトにおける肝障害の予測をより困難にしている。

厚生労働省は現在、薬物誘導性肝障害を中毒性と特異体質性に分類しており、前者は薬物自体またはその代謝物が肝障害性を持ち、用量依存的な肝障害が全てのヒトに発生するものを指しており、これは実験動物においても再現可能である。一部の抗がん剤、アセトアミノフェンなどの医薬品のほか臨床では用いられないパラコート、四塩化炭素、キノコ毒などが中毒性肝障害の起因物質として知られている。一方、後者の特異体質性肝障害は実験動物において再現できず、また個体差が存在するため予測不可能であり、大部分の症例はこちらに分類される。これは現在さらに、代謝性特異体質によるものとアレルギー性特異体質によるものに分類されている。代謝性特異体質は薬物代謝関連酵素の遺伝的素因などの個人差に起因しており、発症の予測が困難な場合が多いが、代謝関連遺伝子異常などについて調査することで予測可能になりつつある。一方のアレルギー性特異体質による肝障害は薬物、またはその反応性中間代謝物がハプテンとなり、肝細胞の種々の構成成分と結合して免疫原性を獲得することによって生じるアレルギー反応に起因している。非常に多くの薬物がアレルギー性特異体質性肝障害に分類されるが、肝細胞内の物質が免疫原性を獲

得して肝細胞障害が生じるメカニズムについては十分に解明されていない。

このようなアレルギー性特異体質による肝障害には各種サイトカインを介した肝組織内の炎症および免疫反応が関与しているといわれている (Sobue et al., 2001)。肝内にはT細胞やマクロファージなどの浸潤細胞、クッパー細胞や類洞内皮細胞などの肝非実質細胞および肝実質細胞が存在しており、サイトカインを介した細胞間のネットワークを形成している。T細胞は細胞表面に発現しているCD抗原によりさらに細かく分類されておりCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>のT細胞はヘルパーT(Th)細胞と呼ばれている。Th precursor (Thp) はサイトカインの産生特性がそれぞれ異なる1型(Th1)および2型(Th2)へと分化することが知られており (Mosmann et al., 1986)、様々な因子が分化に関与している (Agnello et al., 2003)。Th1細胞は主にIL-2とIFN $\gamma$ を分泌し、他のT細胞やマクロファージを活性化することで細胞性免疫

を誘導するといわれている。一方Th2細胞は、Bリンパ球による抗体産生や好酸球の増殖、分化を促進するサイトカインであるIL-4、IL-5、IL-10、IL-13を分泌することで体液性免疫を誘導する (Agnello et al., 2003; Rengarajan et al., 2000)。またIFN $\gamma$ はTh2細胞由来のIL-4の産生を、IL-4はTh1細胞によるサイトカインの産生を抑制している。このようにTh1細胞とTh2細胞は互いに制御し合うことで体内におけるバランスを保っているが、性ホルモン、衛生環境、食事、医薬品などによりそのバランスが変動するといわれており、様々な疾患の発症との関連が示唆されている (Kidd P, 2003)。Th2に対しTh1が過剰になることは関節リウマチ、多発性硬化症および1型糖尿病の、Th1に対しTh2が過剰になることはアレルギー、喘息、湿疹、花粉症および蕁麻疹のリスクファクターになると考えられている (Kidd P, 2003)。

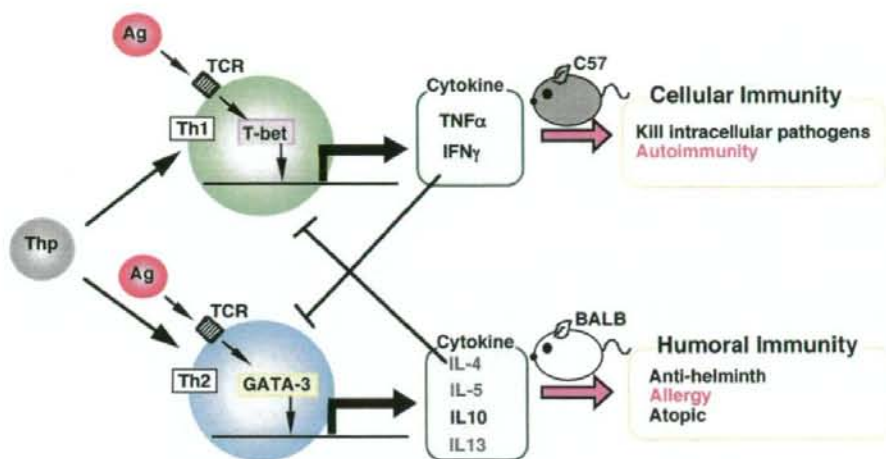


Fig. 1. Overview of Th cell differentiation and cytokine secretion in mice.

前臨床試験において用いられるマウスやラットなどのげっ歯類には免疫学的なバックグラウンドの異なる様々な系統が存在することが知られている。最も一般的に動物実験に用いられるマウスである C57BL/6 マウスと BALB/c マウスとではリーシュマニア原虫に対する抵抗性に系統差が存在し、C57BL/6 マウスは感染によって Th1 反応を誘導し抵抗性を示すのに対し、BALB/c マウスは Th2 反応が誘導されるため抵抗性を持たないことが古くから知られている (Heinzel et al., 1989)。また BALB/c マウスと C57BL/6 マウスとでは免疫性疾患の実験動物モデルの病態が異なることが、関節リウマチ (Nandakumar and

Holmdahl, 2006)、多発性硬化症 (Kigerl et al., 2006)、気管支喘息 (Fukunaga et al., 2007) などについて報告されている。また C57BL/6 マウスと BALB/c マウスとで誘導される肝障害の重篤さが異なる化合物としてアセトアミノフェン (Masubuchi et al., 2008)、四塩化炭素 (Shi et al., 1997)、LPS (Tanaka et al., 1996) および Con A (Mizuhara et al., 1998) などが報告されている。

吸入型全身麻酔薬であるハロタンは個体特異的な肝障害を引き起こすことが知られており、軽度なものや無症候性のものも含めると 20%以上の患者において血清中のトランスアミナーゼの上昇が起こること (Spracklin et al., 1997)、

およそ 10,000 人に 1 人の割合で劇症肝炎が起こることが知られている (Moult and Sherlock, 1975)。このようなハロタンによる肝障害はモルモットや特殊な条件下の実験動物を除き再現することができず、ヒトとの間に大きな種差が存在している (Utrecht, 2007)。生体内に取り込まれたハロタンは肝臓の第 I 相酵素によって代謝を受けることが知られてお

り、主に CYP の 2E1 分子種が触媒するといわれている (Spracklin et al., 1997)。CYP2E1 によってハロタンが代謝を受けると反応性中間体であるトリフルオロアセチルラジカルを生じ、生体の高分子と共有結合し、トリフルオロアセチルタンパク質を生成する (Kenna et al., 1992)。

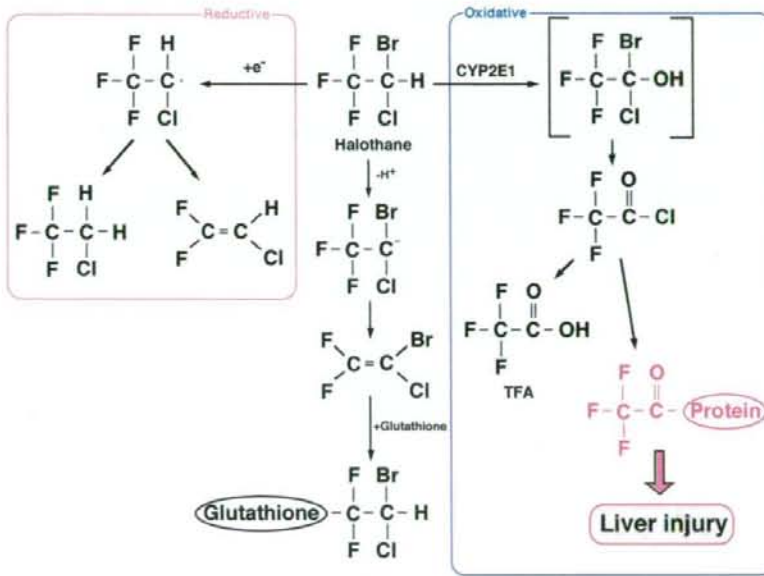


Fig. 2. Metabolic pathway of halothane.

ハロタンによって肝障害を生じた患者の血清からは抗 TFA 抗体、抗組織抗体、抗 CYP2E1 抗体が検出されること (Park et al., 2005a)、曝露する回数を重ねるほど発症しやすいこと (Hoet et al., 2002)

が知られている。ハロタンによってリジン残基を修飾されたタンパク質がクッパー細胞に取り込まれ (Furst et al., 1997)、免疫細胞に抗原として提示されることでアレルギー反応による肝細胞

の壊死が起こり肝障害が誘導されると考えられている。

ハロタンによる肝障害について行われた最近の研究によって、マウスの系統や雌雄の違いによって肝障害の程度が異なることが明らかとなっており (You et al., 2006)、ヒトにおいても男性に比べ女性においてハロタンによる肝障害の発症例が多いことが報告されている (Cousins et al., 1989)。またトリフルオロアセチル化されたタンパク質はハロタンを曝露した様々な実験動物において検出されるが肝障害を起こす種は限られており、付加体の生成以降に存在する何らかのメカニズムの違いがこのような系統差の原因として重要であることが示唆されている (Feng et al., 2009)。

そこで本研究では薬物によるアレルギー性肝障害の発症には他のいくつかの免疫性の疾患と同様に、Th1/Th2 サイトカインが関与しており、Th1/Th2 のバランスの個人差は肝障害のリスクファクターとなるという仮説を立て、それに

ついて検証するために、アレルギー性肝障害を起こす典型的な薬物であるハロタンを肝障害の程度と免疫学的なバックグラウンドの異なる 2 種類の系統のマウスに投与し、Th1/Th2 サイトカインの産生能の変動等について評価した。

さらに研究を進めていくうちに近年脚光を浴びている新たな Th 細胞サブセットである Th17 がハロタン誘導性肝障害に関与することを示唆する実験データが得られた。Th17 細胞は Th1 や Th2 などの Th 細胞サブセットと同様に Thp より分化することが知られており、その分化には IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-23、TGF $\beta$ 、stat-3 および ROR $\gamma$ t シグナルが重要であると言われている (Usui, 2007)。また Th17 によって産生される IL-17 が組織の炎症を誘導することを示した数多くの報告がなされている (Komiya et al., 2006; Park et al., 2005b)。そこで Th1 および Th2 サイトカインの産生能の変動に加えて、ハロタン誘導性肝障害と IL-17 の関与についての検討も併せて行った。

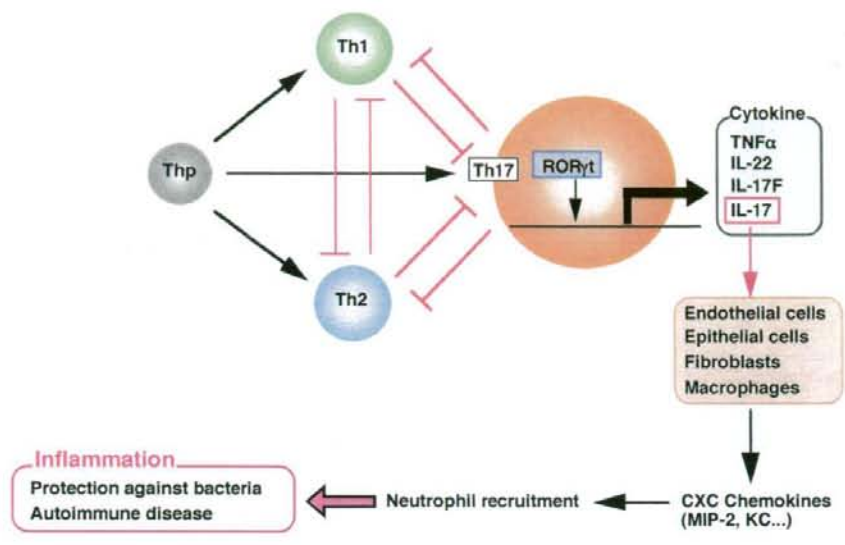


Fig. 3. The cell regulation and inflammatory.



## I 章 ハロタン誘導性急性肝障害モデルマウス作成および炎症・免疫関連遺伝子の発現変動解析

### I-A. 緒言

全身麻酔薬ハロタンは個体特異的に肝障害を引き起こすことが知られており、ハロタンを使用した患者の約 20% で血清トランスアミナーゼが増加すると言われている。古くからラットやモルモットなどの実験動物においてハロタンの急性肝障害の研究が行われてきたが、近年マウスを用いた肝障害モデルが開発され、BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの間には非常に大きな系統差が存在することが報告されている。そこでハロタンの毒性発現機序の解明に用いるために、本章ではこれら 2 種類の系統のマウスにハロタンを投与し、経時的に血中の肝障害マーカーを測定することで肝障害レベルの評価を行った。同時に肝臓における炎症・免疫に関与する転写因子およびサイトカイン類の mRNA の定量を行った。

### I-B. 研究方法

#### I-B-1 実験材料および実験試薬

ハロタンは武田薬品工業 (Osaka,

Japan) より購入した。オリーブ油、トランスアミナーゼ CII-テストワコーキッドは和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。ReverTra 水に加え、37°C で 2 時間加温した。

#### I-B-2 ハロタンによる肝障害マウスの作成

BALB/cCrSlc マウス (雌性、7 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) および C57BL/6JlmsSlc マウス (雌性、7 週齢; 日本 SLC) を馴化飼育した後、体重を測定し、群分けを行った。ハロタン投与群にはハロタン 100、300 または 600  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$  を単回腹腔内投与した。投与時間は 3、6、12 および 24 時間とし、下行大静脈より採血を行い I-2-3 および I-2-4 で使用した。ハロタンの投与量の検討の際には投与から 24 時間後に採血を行った。同時に肝臓を採取し、1.15% 塩化カリウム溶液で洗浄後、I-2-5 で使用した。

#### I-B-3 血漿中 AST および ALT 値の測定

ヘパリナイズした器具を用いて採取したマウスの全血を 1,500 g、4°C で 15 分間遠心分離を行った後、上清をサンプルチューブに移し血漿とした。血漿中

AST および ALT 値は、トランスアミナーゼ CII-テストワコーキットを用いて、マニュアルに従い以下の方法で定量した。血漿 5  $\mu$ L に ALT 用基質酵素液を 125  $\mu$ L 加え混合し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、発色試薬を加えよく混合し、37°C で正確に 20 分間加温した。20 分後に反応停止液を加え、混合した後、555 nm での吸光度を測定し、AST および ALT 値を求めた。

#### I-B-4 ELISA による血漿中の IFN $\gamma$ および IL-4 の定量

I-B-2 で採取したマウスの全血を 1 時間室温で放置し、1,500 g、4°C で 15 分間遠心分離を行った後、上清をサンプルチューブに移し血漿とした。血漿中の IFN $\gamma$  濃度 および IL-4 濃度を Redy-Set-Go! のマニュアルにしたがって以下の方法で測定した。96 well plate に coating buffer に溶かした capture antibody を 1 well あたり 100  $\mu$ L 加え、4°C で 18 時間静置した。Wash buffer で well を 5 回洗浄し well の水分を除き、1 x Assay Diluent を 1 well あたり 200  $\mu$ L 加え、25°C で 1 時間静置した。Wash buffer で well を 1 回洗浄し well の水分を除き、血漿 および 1 x Assay Diluent を用いて段階希釈を行った recombinant mouse IFN $\gamma$  ま

たは recombinant mouse IL-4 を 1 well あたり 100  $\mu$ L 加え、25°C で 2 時間静置した。Wash buffer で well を 5 回洗浄し well の水分を除き、1 x Assay Diluent に溶かした detection antibody を 1 well あたり 100  $\mu$ L 加え、25°C で 1 時間静置した。Wash buffer で well を 5 回洗浄し well の水分を除き、1 x Assay Diluent に溶かした Avidin - HRP を 1 well あたり 100  $\mu$ L 加え、25°C で 30 分間静置した。Wash buffer で well を 7 回洗浄し well の水分を除き、1 x TMB solution を 1 well あたり 100  $\mu$ L 加え、25°C で 15 分間インキュベートし、1 M リン酸を 1 well あたり 50  $\mu$ L 加え反応を停止させた。450 nm の吸光度を測定することにより定量した。

#### I-B-5 Total RNA の調製

RNAiso のマニュアルに修正を加え、以下の方法で肝臓から total RNA を調製した。約 100 mg の肝臓に、RNAiso 1 mL を加えてホモジナイズ後、サンプルチューブに分注し、クロロホルム 0.2 mL を加えて激しく 15 秒間攪拌した。室温で 3 分間放置した後、10,000 g、4°C で 15 分間遠心分離した。上清を別のチューブに採取し、0.5 mL のイソプロパノールを加えて室温にて 8 分間放置した後、10,000 g、4°C で 10 分間遠心分離した。

沈殿を70%エタノールで洗浄した。この沈殿を乾燥させた後、DEPC処理精製水に溶解させ、260 nmにおける吸光度を測定することにより定量した。

#### I-B-6 RT反応

I-2-5より得られたtotal RNAを用い、以下の方法に従ってRT反応を行った。Total RNA 10  $\mu$ g、150 ng/ $\mu$ L ランダムヘキサマー1  $\mu$ LにDEPC処理精製水を加えて23  $\mu$ Lとした。70°C水浴中で10分間反応後、氷冷した。5x逆転写用バッファ8  $\mu$ Lと2.5 M dNTPs 8  $\mu$ L、ReverTra Aceを1  $\mu$ L加え、全量を40  $\mu$ Lとした後、30°Cで10分間、42°Cで60分間反応させた。その後、98°Cで10分間インキュベートし、RT酵素を失活させた後、PCRに供した。

#### I-B-7 Real-time RT-PCR

T-bet、GATA-3、IFN $\gamma$ 、IL-10、TNF $\alpha$ 、MIP-2および補正用の $\beta$ -actinのRNA含量の測定は、Mx3000P (Stratagene)を用いてreal-time RT-PCRにて行った。反応条件を以下に示した。I-2-6で得られたcDNA試料2  $\mu$ L、10  $\mu$ M FP 0.8  $\mu$ L、10  $\mu$ M RP 0.8  $\mu$ L、SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>バッファ10  $\mu$ L、5  $\mu$ M Reference Dye 0.3  $\mu$ Lに滅菌精製水を加

え、全量を20  $\mu$ Lとした。使用したプライマーの配列を以下に示す。T-bet, FP: 5'-CAA GTG GGT GCA GTG TGG AAA G-3', RP: 5'-TGG AGA GAC TGC AGG ACG ATC-3'; GATA-3, FP: 5'-GGA GGA CTT CCC CAA GAG CA-3', RP: 5'-CAT GCT GGA AGG GTG GTG A-3'; IFN $\gamma$ , FP: 5'-GGC CAT CAG CAA CAT AAG C-3', RP: 5'-TGG ACC ACT CGG ATG AGC TCA-3'; IL-10, FP: 5'-TGA AGA CCC TCA GGA TGC GG-3', RP: 5'-AGA GCT CTG TCT AGG TCC TGG-3'; TNF $\alpha$ , FP: 5'-TGT CTC AGC CTC TTC TCA TTC C-3', RP: 5'-TGA GGG TCT GGG CCA TAG AAC-3'; MIP-2, FP: 5'-AAG TTT GCC TTG ACC CTG AAG-3', RP: 5'-ATC AGG TAC GAT CCA GGC TTC-3';  $\beta$ -actin, FP: 5'-ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG G-3', RP: 5'-CTA GGA GCC AGA GCA GTA ATC TC-3'。調製した反応液を専用のサンプルチューブに入れ、以下のプロトコールで反応を行った。T-bet、IFN $\gamma$ 、 $\beta$ -actinでは熱変性反応を95°C、60秒の後、解離反応を95°C、15秒、アニーリングと伸長反応を同時に68°C、20秒を1サイクルとし40サイクル行った。アニーリングと伸長反応の際に、蛍光をreal timeで検出した。IL-10では熱変性反応を

95°C、30 秒の後、解離反応を 94°C、4 秒、アニーリングと伸長反応を同時に 66°C、20 秒を 1 サイクルとし 40 サイクル行った。アニーリングと伸長反応の際に、蛍光を real time で検出した。TNF $\alpha$  では熱変性反応を 95°C、60 秒の後、解離反応を 95°C、15 秒、アニーリングと伸長反応を同時に 66°C、20 秒を 1 サイクルとし 40 サイクル行った。アニーリングと伸長反応の際に、蛍光を real time で検出した。MIP-2 では熱変性反応を 95°C、60 秒の後、解離反応を 94°C、4 秒、アニーリングと伸長反応を同時に 64°C、20 秒を 1 サイクルとし 45 サイクル行った。アニーリングと伸長反応の際に、蛍光を real time で検出した。GATA-3 では熱変性反応を 95°C、60 秒の後、解離反応を 94°C、15 秒、アニーリングを 62°C、15 秒、伸長反応を 72°C、30 秒を

1 サイクルとし、40 サイクル行った。伸長反応の際に、蛍光を real time で検出した。40 サイクルの反応を終了後、60°C から 95°C まで、0.2°C/sec 温度を上昇させて融解曲線の測定を行った。融解曲線の測定により、産物が単一物であるかを推定することができる。反応終了後、2-4%アガロースゲルで電気泳動を行い特異的に増幅されるバンドの再確認を行った。

#### I-C. 研究結果

##### I-C-1 ハロタン投与マウスの血漿試料の生化学検査

BALB/c マウスに対しハロタンを 100、300 または 600  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$  で単回腹腔内投与し、24 時間の血漿試料中の ALT の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 4)

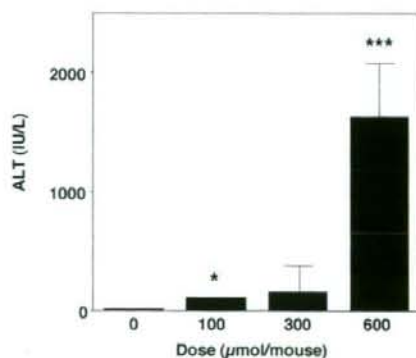


Fig. 4. Plasma ALT levels in halothane-treated BALB/c mice. Mice were given halothane (100, 300, or 600  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ , i.p.), and plasma for the ALT assay were collected 24 h after administration. The data are means  $\pm$  S.D. of three mice. Significantly different from 0  $\mu\text{mol}/\text{mouse}$  group (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).