

Fig. 9. Activation of MAPK signaling pathways in THP-1 cells treated with terbinafine.

Immunoblot analyses of MAPK proteins in THP-1 cells were performed (A, C, and E) and quantified (B, D, and F). Before the treatment of 100 μ M terbinafine, THP-1 cells were pretreated with the indicated concentrations of MAPK inhibitors for 1 h. U0126, SB203580, and SP600125 were used as specific inhibitors of MEK1/2, p38 MAPK, and JNK1/2, respectively. After 1 h-incubation with terbinafine, cell lysates were subjected to immunoblot analyses using antibodies of anti-Thr202/Tyr204 phosphorylated ERK1/2 (A and B), anti-Thr180/Tyr182 phosphorylated p38 MAPK (C and D), and anti-Thr183/Tyr185 phosphorylated JNK1/2 (E and F). The same sample treated with 2 μ g/mL LPS was used as a positive control. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO). †, $P < 0.01$; †††, $P < 0.001$, compared with terbinafine only.

C-7. テルビナフィンによる炎症性サイトカイン産生増加に対する MAPK 阻害薬の影響

LPS を曝露した単球系細胞における IL-8 および TNF α の産生は、さまざまな MAPK 阻害薬により抑制されることが報告されており、LPS による炎症性サイトカイン産生増加には、MAPK 経路が重要な役割を果たすことが示唆されている (Guha and Mackman, 2001)。そこで、THP-1 細胞の炎症性サイトカイン産生増加に対する MAPK 経路の寄与を明らかとするため、テルビナフィンによ

る炎症性サイトカイン産生増加に対する MAPK 阻害薬の影響を検討した (Fig. 10)。100 μ M テルビナフィンの処置により増加した IL-8 および TNF α の mRNA 発現量およびタンパク質産生量は、U0126 の前処置により著しく抑制されたが、SB203580 と SP600125 の前処置によっては抑制されなかった。これより、テルビナフィンによる THP-1 細胞の炎症性サイトカイン産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示唆された。また、高濃度の SB203580 を前処置した群において、IL-8 および TNF

α の mRNA 発現量およびタンパク質産生量は増加した。

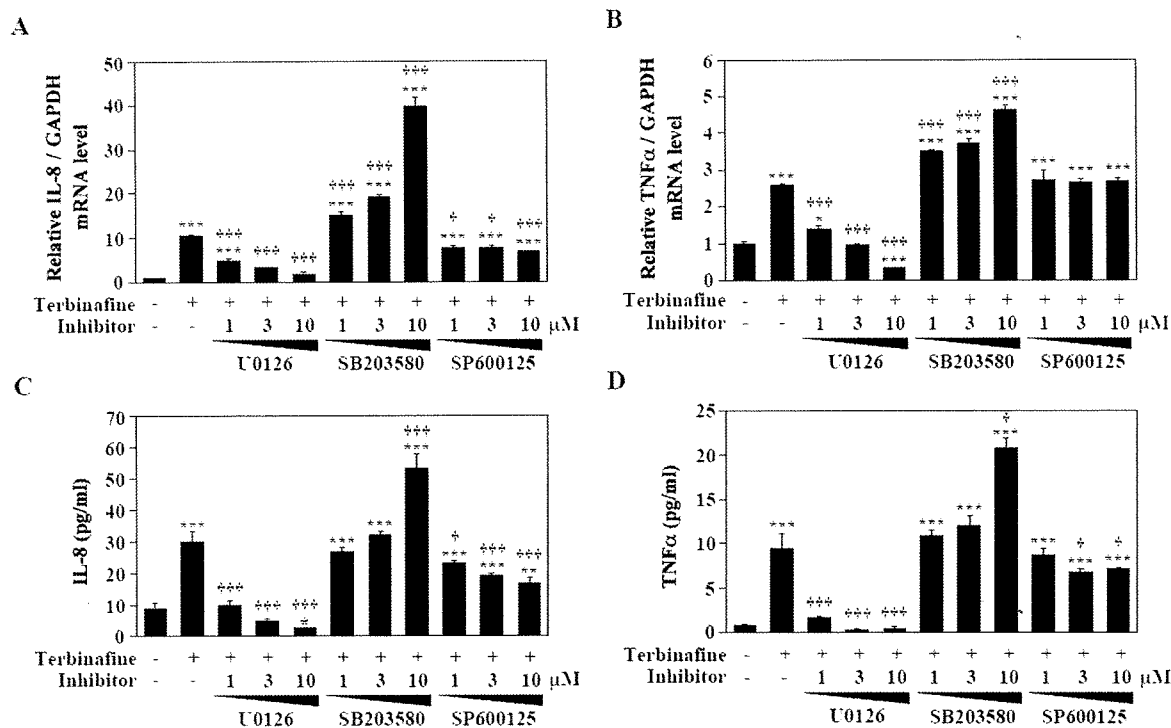


Fig. 10. Effects of MAPK inhibitors on the IL-8 and TNFα levels in THP-1 cells treated with terbinafine. Before the treatment of 100 μM terbinafine, THP-1 cells were pretreated with the indicated concentrations of MAPK inhibitors for 1 h. After 3 h-incubation with terbinafine, the mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNFα (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. After 6 h-incubation with terbinafine, the release of IL-8 (C) and TNFα (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean ± SD of triplicate determinations. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO). †, $P < 0.05$; †††, $P < 0.001$, compared with terbinafine only.

C-8. 抗真菌薬の炎症性サイトカイン産生増加に対する MAPK 阻害薬の影響

テルビナフィン以外の被験薬および DMSO 処置時に対する MAPK 阻害薬の影響を検討した (Fig. 11)。100 μM ブテナフィンの処置により増加した IL-8 および TNF α の mRNA 発現量およびタンパク質産生量は、U0126 の前処置により著しく抑制されたが、SB203580 と SP600125 の前処置によっては

抑制されなかった。これより、テルビナフィンと同様に、ブテナフィンによる THP-1 細胞の炎症性サイトカイン産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示唆された。またコントロール処置群において、IL-8 および TNF α の mRNA 発現量およびタンパク質産生量は、U0126 の前処置により減少し、SB203580 の前処置により増加した。これより、通常状態における IL-8

および TNF α の産生においても、ERK1/2 経路が重要であるのかもしれない。なお、フ

ルコナゾール処置群に関しては、コントロール処置群と同様の傾向を示した。

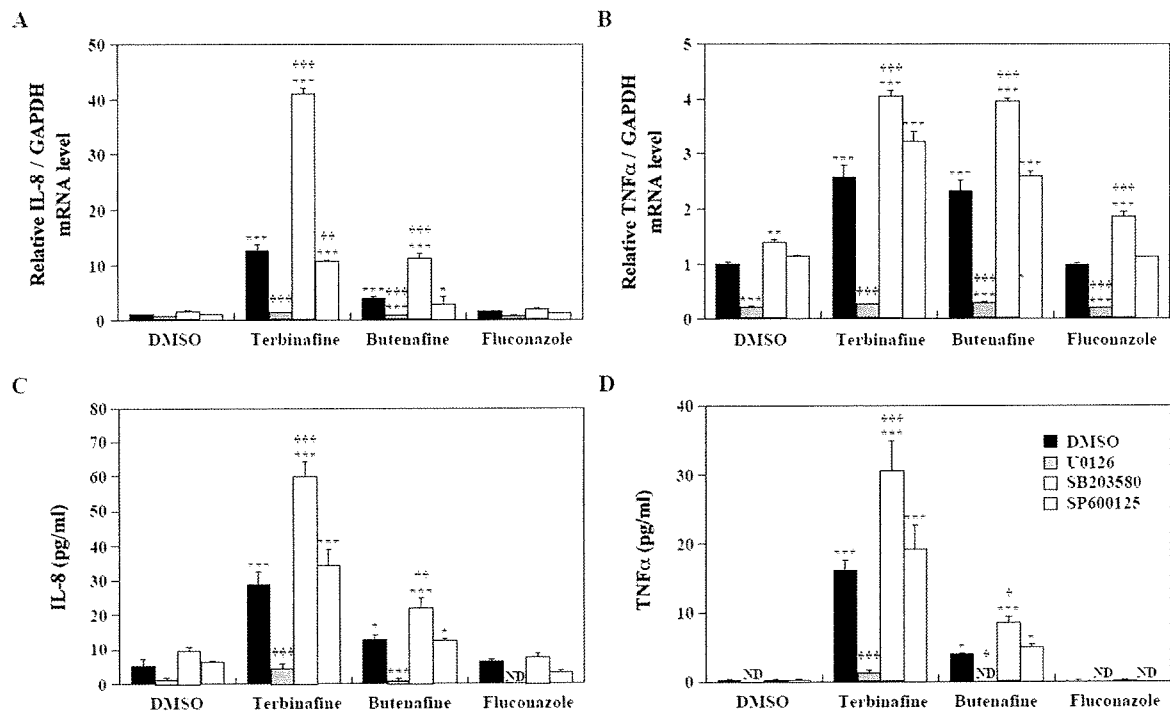


Fig. 11. Effects of MAPK inhibitors on the IL-8 and TNF α levels in THP-1 cells treated with antifungal drugs. Before the incubation with 100 μ M antifungal drugs, THP-1 cells were pretreated with 10 μ M MAPK inhibitors for 1 h. After 3 h-incubation with antifungal drugs, the mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF α (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. After 6 h-incubation with antifungal drugs, the release of IL-8 (C) and TNF α (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, compared with control (0.1% DMSO). †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$; †††, $P < 0.001$, compared with an antifungal drug only. ND, not detectable.

D. 考察

本研究において、100 μ M のテルビナフィンまたはブテナフィン処置により、THP-1 細胞、HL-60 細胞の IL-8 および TNF α タンパク質産生量はコントロール群と比較して有意に増加した (Figs. 3A-3D)。これより、テルビナフィンおよびブテナフィンはヒト単球系細胞による炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を刺激し、炎症反応を

進行させる作用を有することが示唆された。また、100 μ M フルコナゾールの処置において、IL-8 および TNF α タンパク質産生量の有意な増加は認められなかった。この結果は、フルコナゾールはテルビナフィンなど他の抗真菌薬と比較して、肝障害などの副作用に伴う休薬のリスクが低いという報告を支持する (Chang et al., 2007)。これ

より、フルコナゾールはテルビナフィンの陰性対照として使用できることが示唆された。一方、KG-1細胞による炎症性サイトカイン産生は3種の抗真菌薬により影響を受けなかった。Teobaldら(2008)の検討では、LPSなどの強力な免疫誘導剤の曝露でさえ、KG-1細胞の炎症性サイトカインの産生量は増加しなかった。そのため、KG-1細胞の炎症性サイトカイン産生量がテルビナフィンの処置により影響を受けなかったことは、KG-1細胞の感受性の低さに起因しているのかもしれない。さらに、PMAにより分化させたマクロファージ様 THP-1細胞においても、テルビナフィン処置により、TNF α タンパク産生量の増加が認められた(Fig. 7)。これより、テルビナフィンは単球系細胞のみならず、マクロファージや肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞も活性化させることが示唆された。また、テルビナフィンを処置したマクロファージ様 THP-1細胞および未分化の THP-1細胞を比較すると、未分化の THP-1細胞においてより炎症性サイトカインの産生量は顕著に増加した。これより、肝障害性薬物による炎症反応を予測する場合には、未分化のヒト単球系細胞を用いたほうが、炎症反応をより高感度に予測できると考えられる。

本研究では、TNF α および IL-8の産生量を炎症反応の指標として使用した。TNF α は細胞傷害や宿主防御などの炎症反応に

関わる重要なサイトカインである。TNF α は主にマクロファージにより産生されるが、マスト細胞、肝星細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、神経細胞などによっても産生される(Wajant et al., 2003)。TNF α の産生は肝臓における炎症の初期段階のひとつであり、他のサイトカイン産生を刺激し、炎症細胞の活性化や、初期創傷治癒を促進する(Braham et al., 1998; Luster et al., 2001)。また、TNF α は細胞傷害性を有し、肝細胞のアポトーシスやネクローシスを引き起こすことも報告されている(Bohlinger et al., 1996; Wang et al., 1995)。げっ菌類を用いた *in vivo* の研究では、アセトアミノフェン、トロバフロキサシン、スリンダク、ラニチジンなどの免疫学的機序による肝障害に TNF α が重要な役割を示すことが報告されている(Gardner et al., 2003; Shaw et al., 2009a; Tukov et al., 2007; Zou et al., 2009)。

IL-8はCXCケモカインのひとつであり、主にマクロファージにより産生されるが、内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、上皮細胞、好中球などによっても産生される(Baggiolini et al., 1994)。また、IL-8の産生はTNFやIL-1、LPSなどの外毒素の曝露によって誘導される(Strieter et al., 1989)。IL-8の主な作用は好中球の活性化であり、*in vitro*でのIL-8曝露は、好中球によるリソソーム酵素の放出促進や接着分子の発現誘導を引き起こす(Walz et al.,

1987; Detmers et al., 1990)。さらに *in vivo* におけるヒト IL-8 の皮内投与は、ヒトを含む多くの動物種における好中球浸潤を惹起する (Leonard et al., 1991; Baggiolini et al., 1994)。アセトアミノフェン、トロバフロキサシン、ラニチジン、ハロタンなどの薬物性肝障害モデル動物において、好中球の肝臓への浸潤は、肝障害の発症に關与する重要な因子であると報告されている (Luyendyk et al., 2005; Liu et al., 2006; You et al., 2006; Shaw et al., 2009b)。テルビナフィンでは、肝障害モデル動物を用いた研究はなされていないが、テルビナフィン誘導性肝障害を発症した患者の肝生検では、炎症細胞の浸潤が認められている (Mallat et al., 1997; Fernandes et al., 1998; Zapata Garrido et al., 2003)。本研究では、テルビナフィンの処置により、THP-1 細胞および HL-60 細胞の IL-8 および TNF α タンパク質産生量が増加した (Figs. 3A-3D)。これより本研究は、テルビナフィン誘導性肝障害における免疫学的機序の重要性を裏付ける結果であると考えられる。

本研究において、THP-1 細胞の IL-8 および TNF α のタンパク質産生量の有意な増加には、それぞれ 25 μ M および 50 μ M のテルビナフィンが必要であった (Fig. 6)。ヒト *in vitro* 試験系を用いて薬物の作用や副作用を評価する場合、試験系の薬物処置濃度と、臨床における薬物の曝露量との関連

性を考慮する必要がある。テルビナフィンのヒトにおける血漿中濃度は、250 mg テルビナフィンを経口投与した場合、約 3.9 μ M である (Kovarik et al., 1992)。また、放射線標識したテルビナフィン 5 mg/kg を雌雄ラットに経口投与した場合、肝臓での濃度曲線下面積は、血漿中の約 2.5 倍である (ラミシールインタビューフォーム, 2007)。しかし、ヒト肝臓におけるテルビナフィン濃度を予測することは困難であり、*in vitro* の結果を単純に *in vivo* へ外挿することできない。テルビナフィンが *in vivo* においても炎症反応を惹起させるかを明らかにするためには、さらなる研究が必要であると考えられる。

テルビナフィン以外の肝障害性薬物に関しては、特異体質性肝障害により市場から撤退した薬物であるキメラガトランまたはトログリタゾンの曝露により、THP-1 細胞の炎症性サイトカイン産生が増加したという報告がある (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009)。しかし、産生された炎症性サイトカインの種類、炎症性サイトカイン産生に要する薬物処置時間などはテルビナフィンの場合と異なるため、薬物ごとにヒト単球細胞活性化の機序が異なるのかもしれない。さらに、免疫学的機序による肝障害の発症が示唆される薬物であるアルベンダゾール、ヒドララジン、トログリタゾン、タモキシフェンなどの曝露によっても、THP-1 細胞の IL-8、TNF α タンパク

質産生量は増加した (data not shown)。以上の結果より、ヒト単球系細胞の炎症性サイトカイン産生能を評価することは、免疫学的機序による薬物性肝障害の予測に有用であると考えられる。

本章では、テルビナフィンヒト単球系細胞を活性化し、IL-8 および TNF α の産生を増加させることを明らかとした。単球やマクロファージによる炎症性サイトカインやケモカインの産生は、生体内における炎症反応を惹起するため、テルビナフィンの投与により生じる炎症反応は、肝障害発症の原因のひとつであると考えられる。

単球系細胞やマクロファージにおける ERK1/2、p38 MAPK、JNK1/2 など MAPK の活性化は、さまざまな転写因子の活性化や、

炎症性サイトカインの産生などマクロファージの機能に関わる重要な調節機構のひとつである (Payne et al., 1991; Defranco et al., 1998)。本研究において、テルビナフィンは THP-1 細胞の ERK1/2 および p38 MAPK 経路を活性化させることが示された (Fig. 10)。また、テルビナフィンによる炎症性サイトカイン産生増加は、ERK1/2 経路の阻害薬である U0126 の前処置により抑制されたが、p38 MAPK 阻害薬である SB203580 では抑制されなかった (Fig. 11)。以上より、テルビナフィンの処置による THP-1 細胞の IL-8 および TNF α 産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示された (Fig. 12)。

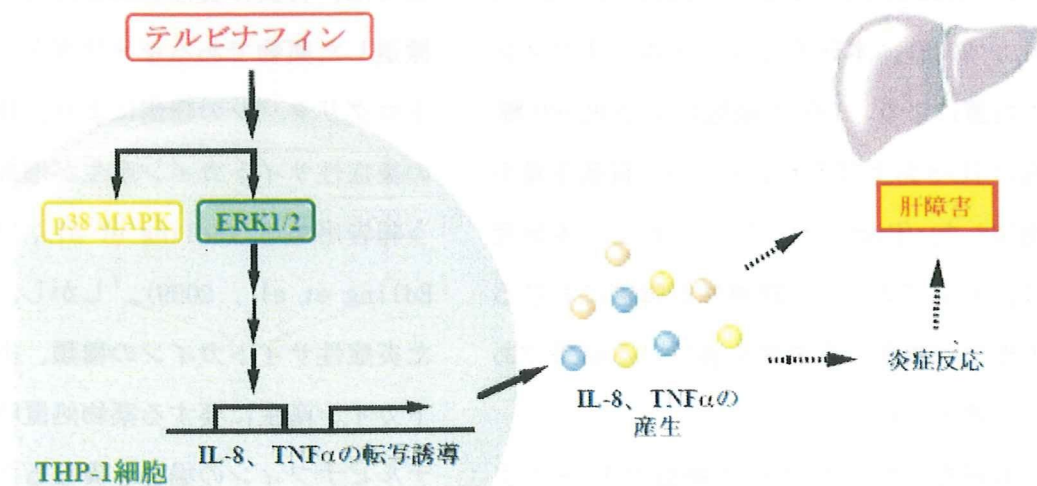


Fig. 12. Possible mechanisms of immune-mediated hepatic injury of terbinafine.

本研究では、MAPK の特異的阻害薬として U0126、SB203580、SP600125 を用いた。U0126 は MEK1/2 の非競合的な阻害薬で、下流の

ERK1/2 経路を抑制する。SB203580 は p38 α 、p38 β の ATP 結合部位を競合的に阻害する選択的な阻害薬である。SP600125 は JNK1/2

の選択的な阻害薬である (English and Cobb, 2002)。興味深いことに、SB203580 の前処置において、テルビナフィンによる THP-1 細胞の IL-8 および TNF α の産生はさらに増加した (Fig. 10)。SB203580 や SB202190 などの p38 MAPK 阻害薬を高濃度処置した場合、さまざまなヒト骨髄由来細胞株で ERK1/2 経路とその下流因子の活性化が起こることが報告されている (Ishii et al., 2001; Hirosawa et al., 2009)。Numazawa ら (2003) によると、THP-1 細胞においても同様に、SB203580 により ERK1/2 カスケードが促進される。これらの報告を考慮すると、SB203580 の前処置による炎症性サイトカイン産生の増加は、ERK1/2 経路の活性化に起因するのかもしれない。

本章では、テルビナフィンは THP-1 細胞の p38 MAPK および ERK1/2 経路を活性化すること、テルビナフィンによる IL-8 および TNF α 産生には ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示された。

E. 結論

ヒト *in vitro* において、免疫学的機序を考慮した薬物性肝障害の評価系はいまだに確立されていない。そこで、本研究では複数のヒト単球系細胞およびそのマクロファージ様細胞を用いて、肝障害性薬物による炎症反応の惹起を予測することとした。最初に、テルビナフィンおよびその類似薬がヒト単球系細胞による炎症性サイトカイン、ケモカインのタンパク質

産生に与える影響について検討した。テルビナフィンまたはブテナフィン処置により、THP-1 細胞および HL-60 細胞の IL-8 および TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。さらに、PMA により分化させたマクロファージ様 THP-1 細胞においても、テルビナフィン処置により TNF α タンパク質産生量の増加が認められた。これより、テルビナフィンはヒト単球系細胞やマクロファージによる炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を刺激し、炎症反応を惹起させる作用を有することが示唆された。次に、テルビナフィンによる THP-1 細胞のサイトカイン産生増加に対する MAPK 経路の寄与について検討した。テルビナフィンは THP-1 細胞の ERK1/2 および p38 MAPK 経路を活性化させること、テルビナフィンの処置による THP-1 細胞の IL-8 および TNF α 産生増加には、ERK1/2 経路が重要な役割を果たすことが示された。本研究では、ヒト単球系細胞において、テルビナフィンによる IL-8 および TNF α の産生増加が認められたこと、そのサイトカイン産生には主に ERK1/2 経路が関与することを明らかとした。今後は、他の肝障害性薬物での研究や、テルビナフィンを用いた *in vivo* の研究を行なうことにより、薬物性肝障害の予測にさらに役立つ有用な情報が提供できると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Eisuke Kobayashi, Masanori Kobayashi,

Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.
Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol. Sci.*, **111**: 302-310 (2009).

2. 学会発表

1. Katsuhiko Mizuno, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.
Terbinafine stimulates inflammatory cytokines release in human monocytic leukemia THP-1 cells. 第24回日本薬物動態学会年会 2009.11.27-29 口頭 京都
2. Eisuke Kobayashi, Masanori Kobayashi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.
Interleukin-17 is involved in halothane-induced liver injury. 第24回日本薬物動態学会年会 2009.11.27-29 口頭 京都
3. Eisuke Kobayashi, Masanori Kobayashi, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of interleukin-17 in drug-induced liver injury in mice. SOT 49th Annual Meeting, 2010.3.7-11 Salt Lake City-USA.
Poster&Oral
4. 水野克彦、深見達基、中島美紀、横井毅：テルビナフィン は ERK シグナル伝達経路を介してヒト単球性 THP-1 細胞の

炎症性サイトカイン産生を刺激する、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

参考文献

- Amichai B and Grunwald MH (1998) Adverse drug reactions of the new oral antifungal agents-terbinafine, fluconazole, and itraconazole. *Int. J. Dermatol.* **37**: 410-415.
- Baggiolini M, Dewald B, and Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**: 97-179.
- Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermüller S, Tiegs G, and Wendel A (1996) DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am. J. Pathol.* **149**: 1381-1393.
- 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.
- Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, and Trautwein C (1998) Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* **275**: G387-392.

- Chang CH, Young-Xu Y, Kurth T, Orav JE, and Chan AK (2007) The safety of oral antifungal treatments for superficial dermatophytosis and onychomycosis: a meta-analysis. *Am. J. Med.* **120**: 791-798
- Cosgrove BD, King BM, Hasan MA, Alexopoulos LG, Farazi PA, Hendriks BS, Griffith LG, Sorger PK, Tidor B, Xu JJ, and Lauffenburger DA (2009) Synergistic drug-cytokine induction of hepatocellular death as an in vitro approach for the study of inflammation-associated idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **237**: 317-330.
- Dambach DM, Andrews BA, and Moulin F (2005) New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of in vitro models. *Toxicol. Pathol.* **33**: 17-26.
- DeFranco AL, Crowley MT, Finn A, Hambleton J, and Weinstein SL (1998) The role of tyrosine kinases and map kinases in LPS-induced signaling. *Prog. Clin. Biol. Res.* **397**: 119-136.
- Deng X, Luyendyk JP, Ganey PE, and Roth RA (2009) Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: hints from animal models. *Pharmacol. Rev.* **61**: 262-282.
- Edling Y, Sivertsson L, Andersson TB, Porsmyr-Palmertz M, and Ingelman-Sundberg M (2008) Pro-inflammatory response and adverse drug reactions: mechanisms of action of ximelagatran on chemokine and cytokine activation in a monocyte in vitro model. *Toxicol. In Vitro.* **22**: 1588-1594.
- Edling Y, Sivertsson LK, Butura A, Ingelman-Sundberg M, and Ek M (2009) Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. *Toxicol. In Vitro.* **23**: 1387-1395.
- English JM and Cobb MH (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 40-45.
- Fernandes NF, Geller SA, and Fong TL (1998) Terbinafine hepatotoxicity: case report and review of the literature. *Am. J. Gastroenterol.* **93**: 459-460.
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, and Gallo R (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54**: 713-733.
- Ganey PE, Luyendyk JP, Maddox JF, and Roth RA (2004) Adverse hepatic drug reactions: inflammatory episodes as consequence and contributor. *Chem. Biol. Interact.* **150**: 35-51.
- García Rodríguez LA, Duque A, Castellsague J, Pérez-Gutthann S, and Stricker BH (1999) A cohort study on the risk of acute liver injury among users of ketoconazole and other antifungal drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **48**: 847-852.

- Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Chiu H, Durham SK, Zhou P, Bruno M, Gerecke DR, Gordon MK, and Laskin DL (2003) Exaggerated hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking tumor necrosis factor receptor-1. Potential role of inflammatory mediators. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**: 119-130.
- Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, and Fischer A (2002) In vitro models to study hepatotoxicity. *Toxicol. Pathol.* **30**: 394-399.
- Gupta AK, Kopstein JB, and Shear NH (1997) Hypersensitivity reaction to terbinafine. *J. Am. Acad. Dermatol.* **36**: 1018-1019.
- Gupta AK and Shear NH (1997) Terbinafine: an update. *J. Am. Acad. Dermatol.* **37**: 979-988.
- Gupta AK and Porges AJ (1998) Hypersensitivity syndrome reaction to oral terbinafine. *Australas. J. Dermatol.* **39**: 171-172.
- Guha M and Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**: 85-94.
- Hall M, Monka C, Krupp P, and O'Sullivan D (1997) Safety of oral terbinafine: results of a postmarketing surveillance study in 25,884 patients. *Arch. Dermatol.* **133**: 1213-1219.
- Hirosawa M, Nakahara M, Otosaka R, Imoto A, Okazaki T, and Takahashi S (2009) The p38 pathway inhibitor SB202190 activates MEK/MAPK to stimulate the growth of leukemia cells. *Leuk. Res.* **33**: 693-699.
- Ishii Y, Sakai S, and Honma Y (2001) Pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 activates p44/42 mitogen-activated protein kinase and induces the differentiation of human myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* **25**: 813-820.
- Jaeschke H (2005) Role of inflammation in the mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **1**: 389-397.
- Kaplowits N (2001) Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf* **24**: 483-490.
- Koeffler HP and Golde DW (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science* **200**: 1153-1154.
- Kovarik JM, Kirkesseli S, Humbert H, Grass P, and Kutz K (1992) Dose proportional pharmacokinetics of terbinafine and its N-demethylated metabolite in healthy volunteers. *Br. J. Dermatol.* **126**: 8-13.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Hirosawa M, Nakahara M, Otosaka R, Imoto A, Okazaki

- ラミシールインタビューフォーム (2007) ノバルティスファーマ株式会社 1-42.
- Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, and Raffeld M (1991) Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J. Invest. Dermatol.* **96**: 690-694.
- Liu ZX, Han D, Gunawan B, and Kaplowitz N (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* **43**: 1220-1230.
- Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Bruccoleri A, Blazka ME, and Yucesoy B (2001) Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* **120**: 317-321.
- Luyendyk JP, Shaw PJ, Green CD, Maddox JF, Ganey PE, and Roth RA (2005) Coagulation-mediated hypoxia and neutrophil-dependent hepatic injury in rats given lipopolysaccharide and ranitidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**: 1023-1031.
- Mallat A, Zafrani ES, Metreau JM, and Dhumeaux D (1997) Terbinafine-induced prolonged cholestasis with reduction of interlobular bile ducts. *Dig. Dis. Sci.* **42**: 1486-1488.
- Michael SL, Pumford NR, Mayeux PR, Niesman MR, and Hinson JA (1999) Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology* **30**: 186-195.
- Muriel P and Escobar Y (2003) Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J. Appl. Toxicol.* **23**: 103-108.
- Nagashima H, Nakamura K, and Goto T (2001) Hepatotoxin rubratoxin B induced the secretion of TNF- α , IL-8, and MCP-1 in HL60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**: 829-832.
- Numazawa S, Watabe M, Nishimura S, Kurosawa M, Izuno M, and Yoshida T (2003) Regulation of ERK-mediated signal transduction by p38 MAP kinase in human monocytic THP-1 cells. *J. Biochem.* **133**: 599-605.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, and Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**: 885-892.
- Roth RA, Luyendyk JP, Maddox JF, and Ganey PE (2003) Inflammation and drug idiosyncrasy—is there a connection? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**: 1-8.
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, and Dieter P (1996) Differences in the state of differentiation of THP-1 cells

- induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Leukoc. Biol.* **59**: 555-561.
- Shaw PJ, Beggs KM, Sparkenbaugh EM, Dugan CM, Ganey PE, and Roth RA (2009) Trovafloxacin enhances TNF-induced inflammatory stress and cell death signaling and reduces TNF clearance in a murine model of idiosyncratic hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **111**: 288-301.
- Shaw PJ, Ganey PE, and Roth RA (2009) Trovafloxacin enhances the inflammatory response to a Gram-negative or a Gram-positive bacterial stimulus, resulting in neutrophil-dependent liver injury in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**: 72-78.
- Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, and Marks RM (1989) Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. *Science* **243**: 1467-1469.
- Tafazoli S, Spehar DD, and O'Brien PJ (2005) Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab. Rev.* **37**: 311-325.
- Teobald I, Dunnion DJ, Whitbread M, Curnow SJ, and Browning MJ (2008) Phenotypic and functional differentiation of KG-1 into dendritic-like cells. *Immunobiology* **213**: 75-86.
- Tukov FF, Maddox JF, Amacher DE, Bobrowski WF, Roth RA, and Ganey PE. (2006) Modeling inflammation-drug interactions in vitro: a rat Kupffer cell-hepatocyte coculture system. *Toxicol. In Vitro* **20**: 1488-1499.
- 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.
- Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, and Tada K. (1982) Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* **42**: 1530-1536.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, and Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**: 171-176.
- Utrecht JP (1999) New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and innate immune system. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 387-395.
- van't Wout JW, Herrmann WA, de Vries RA, and Stricker

BH (1994) Terbinafine-associated hepatic injury. *J.*

Hepatol. **21**: 115-117.

Wajant H, Pfizenmaier K, and Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**: 45-65.

Walz A, Peveri P, Aschauer H, and Baggiolini M (1987) Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**: 755-761.

Wang JH, Redmond HP, Watson RW, and Bouchier-Hayes D (1995) Role of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α in induction of hepatocyte necrosis. *Am. J. Physiol.* **269**: G297-304.

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.

Zapata Garrido AJ, Romo AC, and Padilla FB (2003) Terbinafine hepatotoxicity. A case report and review of literature. *Ann. Hepatol.* **2**: 47-51.

Zimmerman HJ (1999) Drug-induced liver disease. in *Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs other chemicals on the liver. 2nd ed.* pp. 427-456, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Zou W, Beggs KM, Sparkenbaugh EM, Jones AD, Younis HS, Roth RA, and Ganey PE (2009) Sulindac metabolism and synergy with tumor necrosis factor- α in a drug-inflammation interaction model of idiosyncratic liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**: 114-121.

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

ジクロキサシリン誘導性肝障害における免疫学的因子の関与

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

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の一つであり、多くの医薬品が肝障害に惹起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。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。発熱や好酸球増多などのアレルギー症状を伴う肝障害が免疫性特異体質による肝障害であると考えられており、組織では実際に免疫系細胞の浸潤などが認められる。それらの免疫系の関与する肝障害を高感度に検出する系がないことが、薬物誘導性肝障害の予測を困難にする一因であると考えられた。

第 I 章ではジクロキサシリン誘導性肝障害の発症メカニズムおよび DK-PGD₂ 投与による影響を検討した。ジクロキサシリン誘導性肝障害の発症には IL-4 などの Th2 因子の関与が示唆された。DK-PGD₂ 併用投与により肝障害の増悪が認められ、GATA-3 や MIP-2 mRNA の上昇が認められ、組織染色でもジクロキサシリン単独投与群では認められなかったネクロシスが認められた。本研究により、ジクロキサシリンによる肝障害の発症機序および、DK-PGD₂ 併用投与によって肝障害が増悪することを示した。いずれの肝障害においても薬物投与 6 h 後において、ALT 値および IL-4 値の上昇が認められた。IL-4 は ConA 誘導性肝障害に関与することは報告されているが、薬物誘導性肝障害への関与の報告は未だに無く、本研究は薬物誘導性肝障害に IL-4 が関与することを示した最初の報告である。DK-PGD₂ 投与による肝障害の増悪はいずれの薬物でも認められており、免疫系の関与する肝障害を高感度に検出する有用な方法になることが期待される。

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により、臨床試験の安全性の確保や上市できない可能性のある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可能性があるが、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いる。また、実験動物とヒトの間には大きな種差が存在しており、さらにヒトにおける大きな個体差も、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いる。さらに、発症機序が明らかになっている場合はほとんどない。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、肝障害発症メカニズムについ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、シトクロム 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反応性代謝物は、非常に不安定で半減期が短いため、ほとんどの場合血漿から検出することができないが、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生体内に存在するグルタチオンによる抱合反応が重要な役割を担

っている。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。一部の抗がん薬、アセトアミノフェンなどの医薬品に加えて、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、また著しい個体差が存在するため予測不可能であり、臨床で問題となる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免疫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精査することで予測可能になりつつある。一方の免疫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。この肝障害には発熱、発疹、好酸球増多などのアレルギー症状を伴うことが多い。スリダク、ロキソプロフェン、リファンピシンやカルバマゼピンなどの多くの薬物がこれに該当するが、肝細胞内のなんらか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ほとんど解明されていない。

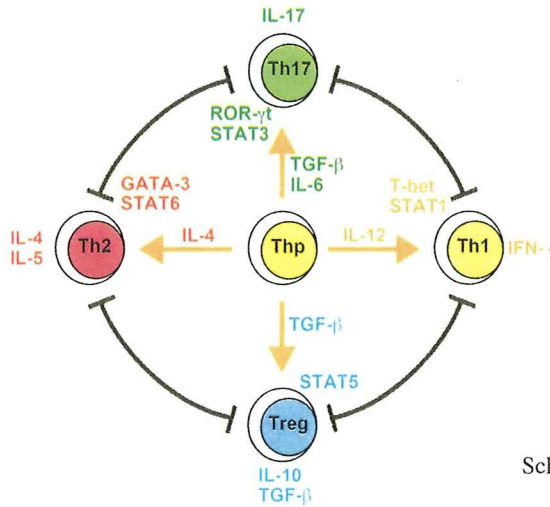
このような免疫性特異体質による肝障害には各種サイトカインを介した肝組織内の炎症および免疫反応が関与しているといわれている (Sobue et al., 2001)。肝内にはT細胞やマクロファージなどの浸潤細胞、クッパー細胞や類洞内皮細胞などの肝非実質細胞および肝実質細胞が存在しており、サイトカインを介した細胞間のネットワークを形成している。T細胞は細胞表面に発現している Cluster of differentiation (CD) 抗原によりさらに細かく分類されており CD4⁺CD8⁻のT細胞はヘルパーT (Th) 細胞と呼ばれている。Th precursor (Thp) はサイトカイン

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 Interleukin-2 (IL-2) と Interferon- γ (IFN- γ) 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 および 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、最近となり新たな Th 細胞サブセットである Th17 が発見された。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 β 、IL-6、IL-23、Transforming growth factor β (TGF β)、Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) および Retinoid-related orphan receptor γ t (ROR- γ 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多くの報告がなされている (Komiyama et al., 2006; Park et al., 2005b)。さらに、当研究室ではハロタンによる肝障害において Th17 が関与することを示した (Kobayashi et al., 2009)。Th 細胞のバランスが崩れることは様々な疾患の発症と関連が示唆されており、Th1 が過剰になると多発性硬化症および I 型糖尿病の、Th2 が過剰になると喘息、湿疹、花粉症および蕁麻疹の (Kidd P, 2003)、Th17 が過剰になると関節炎 (Sheibanie et al., 2007) のリスクファクターとなると考えられている。

ジクロキサシリンは合成ペニシリン系抗菌薬の一種であり、ペニシリナーゼにより分解されにくいため、グラム陽性菌を中心にペニシリン耐性菌にも有効な薬物である。日本ではアンピシリンとの合剤で販売されており、経口および静注の両方で用いられている。副作用として、稀ではあるが胆汁うっ滞型の肝障害を起こすことが知られており、好酸球増多や発熱などの症状を伴うことから、免疫学的因子の関与が考えられる



Scheme 1. Differentiation mechanism of Th cell subsets.

(Olsson et al., 1992)。好酸球増多や発熱などのアレルギー症状は主に Th2 細胞の因子が関与することが多い (Kay AB 2001)。Th2 サイトカインである IL-4 などが関与する肝障害としては、Con A による肝障害の報告 (Jaruga et al., 2003) はあるが、薬物誘導性肝障害では未だにその関与の報告はない。今回の検討では Th2 優位とされている Balb/c マウスの雌を使い、T 細胞ネットワークに対する影響について検討することとした。

Prostaglandin D₂ (PGD₂) は炎症の促進および抑制の両方に関わる生理活性物質であり、D-prostanoid (DP) 受容体と Chemoattractant receptor homologous-molecule expressed on Th2 cells (CRTh2) の 2 つの G タンパク質共役型膜受容体に結合する。DP および CRTh2 受容体は Th2 細胞、好酸球および好塩基

球などに発現しており、DP 受容体はこれらの細胞の働きを抑え、CRTh2 は活性化させることが知られている。CRTh2 の活性化により皮膚や肺での炎症など、アレルギー性の炎症が促進することが報告されており、CRTh2 を活性化させることで Th2 サイトカインの関与する肝障害に対して高感受性のマウスが作製できるのではないかと考えた。13,

14-dihydro-15-keto-PGD₂ (DK-PGD₂) は CRTh2 に特異的に結合し、作用することが報告されているため、本研究で検討することとした (Kostenis and Ulven 2006)。

本研究ではジクロキサシリン誘導性肝障害の発症機構に免疫学的な因子が関与をしていると考え検討を行った。抗菌薬であるジクロキサシリンは胆汁うっ滞を伴う肝障害を惹起することが知られている。処方後 1 週間以内に肝障害を引き起

こす場合が多く、発熱や好酸球の増多などのアレルギー症状を伴う患者も多い (Olsson et al., 1992)。最初に、ジクロキサシリン投与後の血中肝障害マーカーを測定し、肝臓における炎症および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。各々の肝サンプルを用いて、Th1、Th2 および Th17 に関与する免疫学的因子の測定を行った。

B. 実験材料および実験方法

B-1 実験材料および実験試薬

ジクロキサシリンは Sigma (St. Louis, MO) より購入した。富士ドライケムスライド GPT/ALT-PIII、GOT/AST-PIII および TBIL は富士フィルム (Tokyo, Japan) より、ReverTra Ace は東洋紡 (Osaka, Japan) より、逆転写用 dNTPs はグライナー・ジャパン (Tokyo, Japan) より、RNAiso、ランダムヘキサマー、SYBR Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time) は宝酒造 (Osaka, Japan) より購入した。プライマーは北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した。Reference Dye には Brilliant SYBR Green QPCR master mix (Stratagene, La Jolla, CA) 付属のものを使用した。Ready-SET-GO! Mouse Interleukin-4 (IL-4) は eBioscience, Inc (San Diego, CA) より、IL-4 は

Endogen, Inc. (Cambridge, MA) より、抗 IL-4 モノクローナル抗体は U-CyTech biosciences (Utrecht, Netherland) より、ラット IgG2a アイソタイプコントロールは R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) より、DK-PGD₂ は Cayman Chemical (Denver, CO) より購入した。その他の試薬類は市販品の特級、生化学用または高速液体クロマトグラフィー用のものを用いた。

B-2 ジクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウス作製

Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育した後、ジクロキサシリンを 600 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 6 時間後、下行大静脈より採血を行い、同時に肝臓を採取した。

B-3 血漿肝生化学値測定

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。血漿中肝生化学値は DRI-CHEM 4000V を用いて、富士ドライケムスライドに血漿 10 μL を点着させ、吸光度を測定して値を求めた。

B-4 ELISA による血漿中の IL-4 の定量
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。血漿中の IL-4 濃度を Ready-Set-Go! のマニュアルに従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 μ 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 μ 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、1 x Assay Diluent で 2 倍希釈した血漿および 1 x Assay Diluent を用いて段階希釈を行った recombinant mouse IL-4 を 1 well あたり 100 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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。

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 50 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、12,000 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 10 分間放置した後、12,000 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。

B-6 Reverse transcription (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 μ g、150 ng/ μ L ランダムヘキサマー 1 μ L に DEPC 処理精製水を加えて 23 μ L とした。70°C 水浴中で 10 分間反応後、氷冷した。5 x 逆転写用バッファー 8