

μL と 2.5 M dNTPs 8 μL、ReverTra Ace を 1 μL 加え、全量を 40 μL 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。

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

mRNA 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 1 μL、10 μM Forward primer (FP) 1.0 μL、10 μM Reverse primer (RP) 1.0 μL、SYBR Premix Ex Taq™バッファー 12.5 μL、5 μM Reference Dye 0.375 μL に滅菌精製水を加え、全量を 25 μL とした。PCR に用いたプライマーの配列を示した。

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。Gapdh、IL-5、STAT1、STAT6、Eotaxin-2 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 64 °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。T-bet、IFN-γ、Eotaxin-1 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。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。STAT3 では熱変性反応を 95 °C、20 秒の後、解離反応を 95 °C、5 秒、アニーリングを 55 °C、10 秒、伸長反応を 72 °C、15 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。Ror-gt では熱変性反応を 95 °C、60 秒の後、解離反応を 95 °C、15 秒、アニーリングを 68 °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

Table 1. Sequences of primers for real time PCR

Gene		Sequences
mIFN- $\gamma$	F (5'-3')	GGC CAT CAG CAA CAT AAG C
	R (5'-3')	TGG ACC ACT CGG ATG AGC TCA
mIL-5	F (5'-3')	AAA GAG ACC TTG ACA CAG CTG
	R (5'-3')	CCA CGG ACA GTT TGA TTC TTC
mEotaxin-1	F (5'-3')	TCC ACA GCG CTT CTA TTC CT
	R (5'-3')	CTA TGG CTT TCA GGG TGC AT
mEotaxin-2	F (5'-3')	ACC CCA GCT TTG AAC TCT GA
	R (5'-3')	AAG GAC GTG CAG CAA GATG
mMIP-2	F (5'-3')	AAG TTT GCC TTG ACC CTG AAG
	R (5'-3')	ATC AGG TAC GAT CCA GGC TTC
mMCP-1	F (5'-3')	TGT CAT GCT TCT GGG CCT G
	R (5'-3')	CCT CTC TCT TGA GCT TGG TG
mT-bet	F (5'-3')	CAA GTG GGT GCA GTG TGG AAA G
	R (5'-3')	TGG AGA GAC TGC AGG ACG ATC
mGATA-3	F (5'-3')	GGA GGA CTT CCC CAA GAG CA
	R (5'-3')	CAT GCT GGA AGG GTG GTG A
mROR- $\gamma$ t	F (5'-3')	ACC TCC ACT GCC AGC TGT GTG CTG TC
	R (5'-3')	TCA TTT CTG CAC TTC TGC ATG TAG ACT GTC CC
mSTAT1	F (5'-3')	GTT TCA GCT CTG CTC CAT AC
	R (5'-3')	CTG CTG AAG CTC GAA CCA C
mSTAT3	F (5'-3')	TGC AGA GCA GGT ATC TTG AG
	R (5'-3')	TGC TGC TTC TCT GTC ACT AC
mSTAT6	F (5'-3')	ATC TTC AAC GAC AAC AGC CTC A
	R (5'-3')	GGA GAA GGC TAG TGA CAT ATT G
mGapdh	F (5'-3')	AAA TGG GGT GAG GCC GGT
	R (5'-3')	ATT GCT GAC AAT CTT GAG TGA

F; Forward R; Reverse MIP-2; Macrophage inflammatory protein

MCP-1; Monocyte chemoattractant protein T-bet; T box expressed in T cells

GATA-3; GATA-binding protein-3 Ror- $\gamma$ t; Retinoid-related orphan receptor

STAT; Signal transducer and activator of transcription

Gapdh; Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase

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。

B-8 Recombinant mouse IL-4 (rIL-4)、モノクローナル IL-4 抗体および DK-PGD<sub>2</sub> 投与

Balb/cCrSlc マウスを馴化飼育した後、ジクロキサシリンを 600 mg/kg で単回腹腔内投与し、その 1 時間後に rIL-4 を 0.5 もしくは 2.0  $\mu$ g/body で投与した。IL-4 抗体はジクロキサシリン投与 1 時間前に 0.1 mg/body で単回腹腔内投与した。DK-PGD<sub>2</sub> はジクロキサシリン投与 1 時間後に 10  $\mu$ g/body で単回腹腔内投与した。ジクロキサシリン投与 6 時間後の下行大静脈より採血を行った後、肝臓を回収した。

## C 実験結果

C-1 ジクロキサシリン投与マウスの血漿生化学検査

Balb/c マウスにジクロキサシリンを 600 mg/kg で単回腹腔内投与し、投与 6 時間後の血漿試料中の ALT、AST および総ビリルビン (T-Bil) の平均値に標準偏差を付した結果を示した (Figs. 1A - C)。

対照群と比して、ジクロキサシリン投与 6 時間後の ALT、AST および T-Bil 値はいずれも有意な上昇が認められた。また、ジクロキサシリン投与による肝障害の程度と好中球の肝臓への浸潤について検討するため、Hematoxylin-eosin (H&E) 染色および抗 Myeloperoxidase (MPO) 抗体を用いた免疫染色による肝組織像の評価を行った (Fig. 1D)。H&E 染色では、ジクロキサシリン投与マウスの肝切片で、対照群では認められなかった脂肪滴と思われる細胞質内微小空胞が認められた。また、MPO 陽性細胞も少数だが認められた。

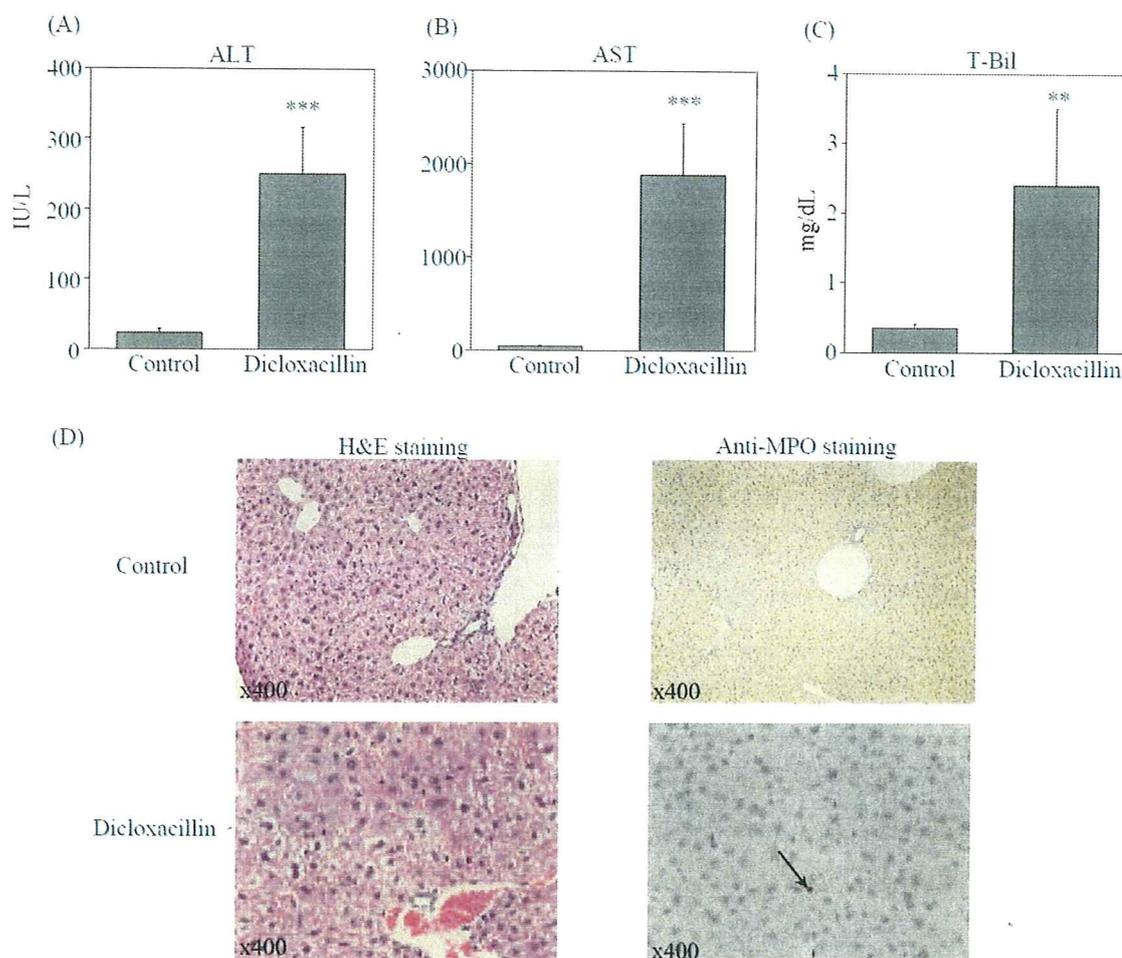


Fig. 1. Plasma ALT, AST and total-bilirubin (T-Bil) levels in dicloxacillin-administered mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.), and plasma for ALT (A), AST (B) and T-Bil (C) were collected 6 h after administration. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3 to 5). Significantly different from saline administered mice (\*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001). Liver specimens were sampled 6 h after dicloxacillin administration (D). Then, liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody. Arrows indicate MPO-positive cells.

## C-2 ジクロキサシリン投与マウス肝における炎症および免疫に関与する遺伝子の mRNA の変動解析

ジクロキサシリン投与後 6 h 後のマウスの肝臓における炎症・免疫に関与する遺伝子の mRNA の発現変動を、real time RT-PCR を用いて検討した。各サンプルに

ついて IL-5、IFN-g、GATA-3、T-bet、ROR-gt、STAT6、STAT1、STAT3、Eotaxin-1、Eotaxin-2、MIP-2、MCP-1 および Gapdh の mRNA の量を測定し、Gapdh の mRNA 量を補正に用いて、それぞれのサンプルの比の平均値に標準偏差を付した結果を示した (Fig. 2)。

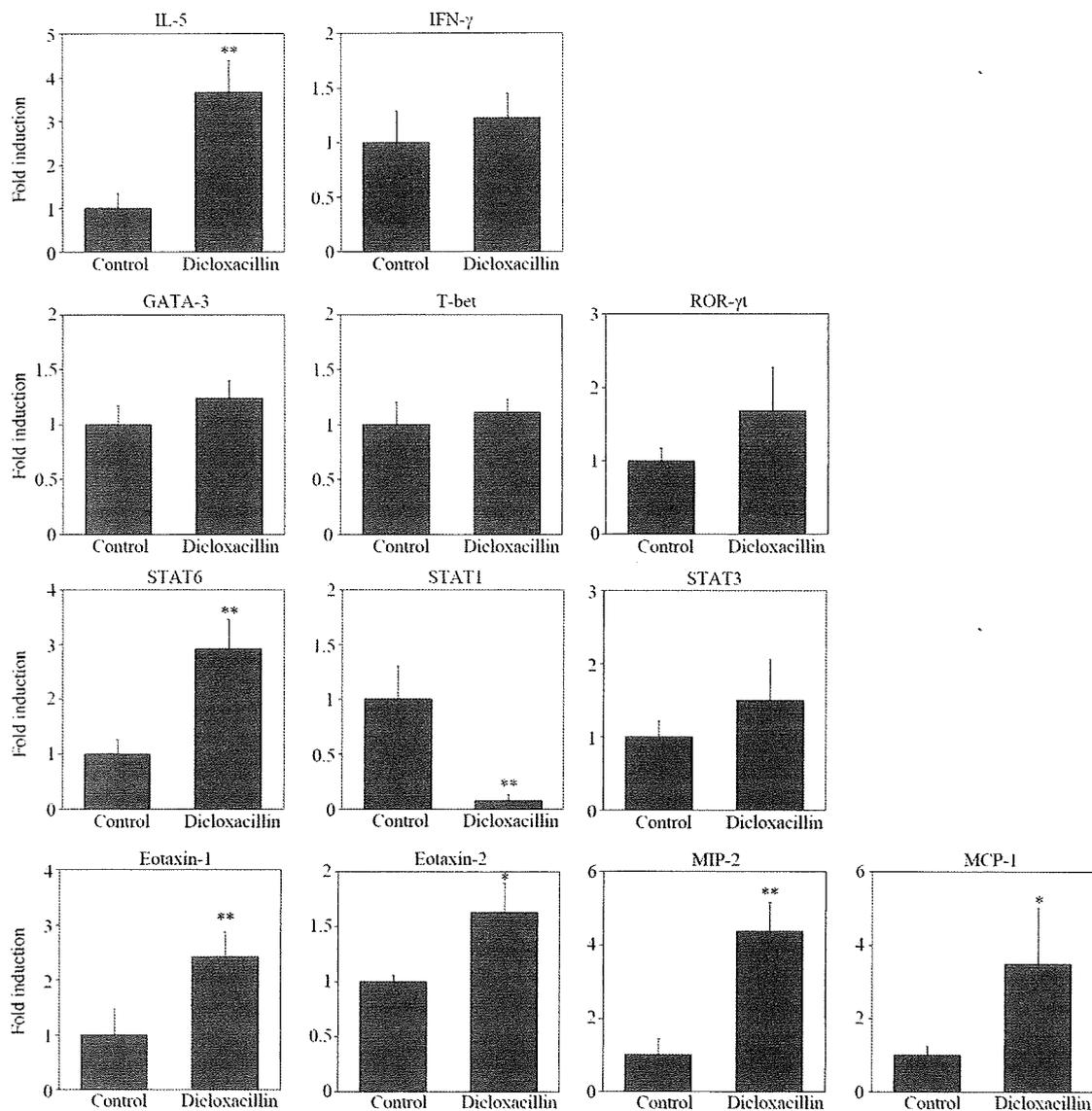


Fig. 2. Hepatic mRNA levels in dicloxacillin-administered mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.), and after 6 h, hepatic mRNA levels were measured by real time RT-PCR. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3 to 5). Significantly different from saline administered mice (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001).

対照群と比して、ジクロキサシリン投与マウスにおいて IL-5、STAT6、Eotaxin-1、Eotaxin-2、MIP-2 および MCP-1 の有意な上昇が認められた。一方、IFN- $\gamma$ 、GATA-3、T-bet、ROR- $\gamma$  t および STAT3 の mRNA 量にはいずれも有意な変化は認められなかった。また、STAT1 の有意な減少が認められ

た。

C-3 ジクロキサシリン投与マウス血漿中の IL-4 タンパク質量の変動解析

ジクロキサシリン投与後 6 h のマウス血漿中の IL-4 タンパク質量の変動を ELISA を用いて検討した。それぞれのサン

プルの平均値に標準偏差を付した結果を

以下に示した (Fig. 3)。

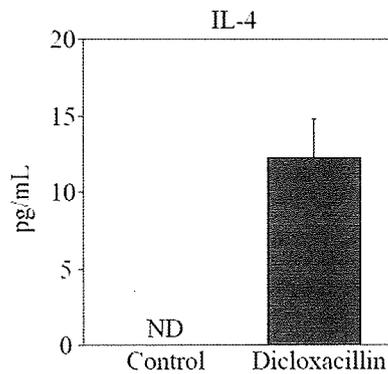


Fig. 3. Plasma level of IL-4 in dicloxacillin-administered mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.), and plasma were collected 6 h after administration. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3 to 5).

ジクロキサシリン未投与マウスでは IL-4 は検出されなかったため有意差の検定はできなかった。ジクロキサシリン投与マウスでは IL-4 が検出された。

抗体を用いた免疫染色による肝組織像の評価を行った (Fig. 4B)。

#### C-4 rIL-4 投与によるジクロキサシリン誘導性肝障害への影響

rIL-4 単独投与群では ALT 値の上昇は認められず、rIL-4 の投与量が 0.5  $\mu$ g/body の場合、dicloxacillin 単独投与群と比較すると ALT 値は上昇傾向が認められ、rIL-4 の投与量が 2.0  $\mu$ g/body の場合には有意な上昇が認められた。H&E 染色では、rIL-4 単独投与のマウスの肝切片において、変化は認められなかったが rIL-4 併用投与群では単核細胞の浸潤や細胞質内空胞が認められた。MPO 陽性細胞は rIL-4 単独投与群および併用投与群いずれにおいても、比較的多く認められた。

rIL-4 の投与量を 2 段階とし、ジクロキサシリン投与 1 時間後に IL-4 を単回腹腔内投与し、ジクロキサシリン投与 6 時間後の血漿中の ALT の平均値に標準偏差を付した結果を示した (Fig. 4A)。rIL-4 投与によるジクロキサシリン誘導性肝障害の程度と好中球の肝臓への浸潤について検討するため、H&E 染色および抗 MPO

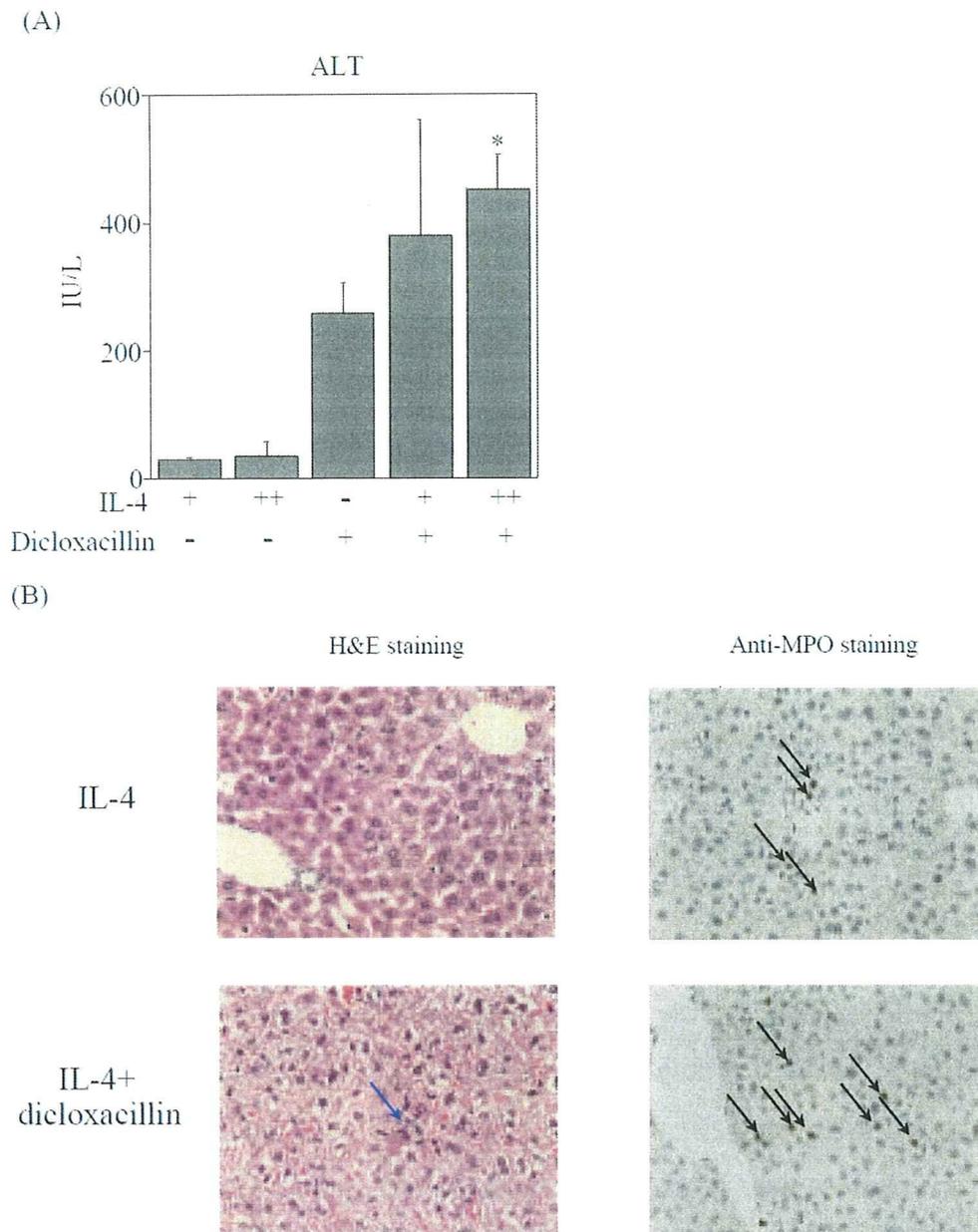


Fig. 4. Effects of recombinant mouse IL-4 (rIL-4) administration on plasma ALT in dicloxacillin-administered mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.). One hour after dicloxacillin administration, rIL-4 (0.5 or 2.0  $\mu$ g/body indicate by + or ++, respectively) was administered. After 6 h, plasma ALT levels (A) were measured. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3 to 5). Significantly different from dicloxacillin-administered group (\* $p$  < 0.05). Liver specimens were prepared 6 h after dicloxacillin administration (B). Liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody. Blue arrow indicates infiltration of monocyte. Black arrows indicate MPO-positive cells.

C-5 モノクローナル IL-4 抗体投与によるジクロキサシリン誘導性肝障害への影響

ジクロキサシリン投与 1 時間前にモノクローナル IL-4 抗体、または rat IgG2A アイソタイプコントロールを単回腹腔内

投与し、薬物投与 6 時間後の血漿中の ALT の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 5)。

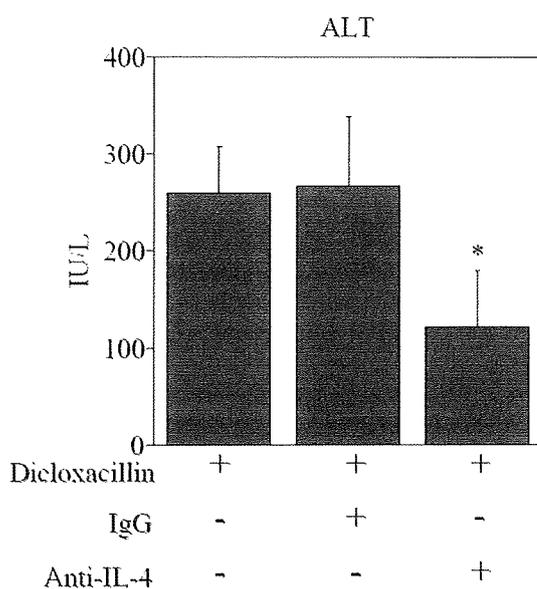


Fig. 5. Effects of anti-mouse IL-4 antibody administration on plasma ALT levels in dicloxacillin-administered mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.). One hour before dicloxacillin administration, anti-mouse IL-4 antibody (0.1 mg/body) was administered. After 6 h, plasma ALT levels were measured. Data are mean  $\pm$  SD (n = 3 to 5). Significantly different from dicloxacillin-plus IgG2a administered group (\* $p < 0.05$ ).

ジクロキサシリン単独投与群と比して、IgG2a 併用投与では ALT 値に変化は認められず、IgG2a 併用投与群と比して、IL-4 抗体を投与することにより ALT 値が有意に減少した。

害に与える影響を検討するために、最初に DK-PGD<sub>2</sub> の投与量を検討した。3、10、30 および 50  $\mu$ g/body で DK-PGD<sub>2</sub> を投与した 6 時間後の血漿中の ALT 値の平均値を示した (Fig. 6.)。

C-6 DK-PGD<sub>2</sub> 投与量の検討

DK-PGD<sub>2</sub> 投与が免疫系が関与する肝障

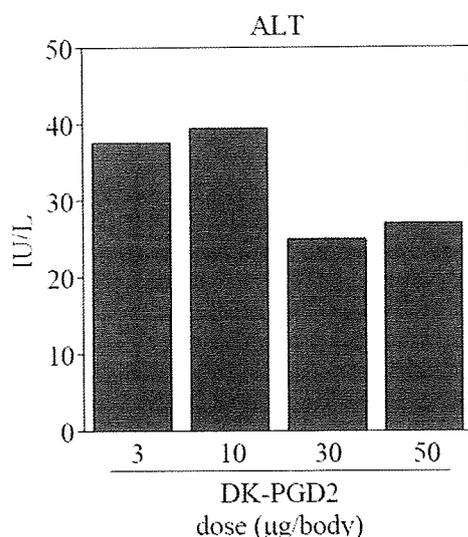


Fig. 6. Plasma ALT levels in DK-PGD<sub>2</sub>-administered mice. Mice were given DK-PGD<sub>2</sub> (3-50 µg/body i.p.), and plasma were collected 6 h after administration. Data are mean of two independent experiments.

ALT 値は投与量が 3 および 10 µg/body のときに軽微な上昇が認められた。一方、30 および 50 µg/body で投与した場合には ALT 値の上昇は認められなかった。

#### C-7 ジクロキサシリン誘導性肝障害における DK-PGD<sub>2</sub> の影響

ジクロキサシリン投与 1 時間後に DK-PGD<sub>2</sub> を投与し、ジクロキサシリン投与 6 時間後の血漿中の ALT 値の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 7A)。DK-PGD<sub>2</sub> (10 µg/body) 単独投与では ALT 値の上昇は認められなかった。ジクロキサシリン単独投与群と比較して、DK-PGD<sub>2</sub> 併用投与群で ALT 値の有意

な上昇が認められた。DK-PGD<sub>2</sub> 投与によるジクロキサシリン誘導性肝障害の程度と好中球の肝臓への浸潤について検討するため、H&E 染色および抗 MPO 抗体を用いた免疫染色による肝組織像の評価を行った (Fig. 7B)。H&E 染色の結果、ジクロキサシリン単独投与群では細胞質内微小空胞が認められたが、DK-PGD<sub>2</sub> 併用投与群において、肝実質に巣状の変性壊死が認められた。また、MPO 染色ではジクロキサシリン単独投与群では少数の好中球が認められたのに対し、ジクロキサシリンと DK-PGD<sub>2</sub> 併用投与群では、変性壊死部への多数の浸潤が認められた。

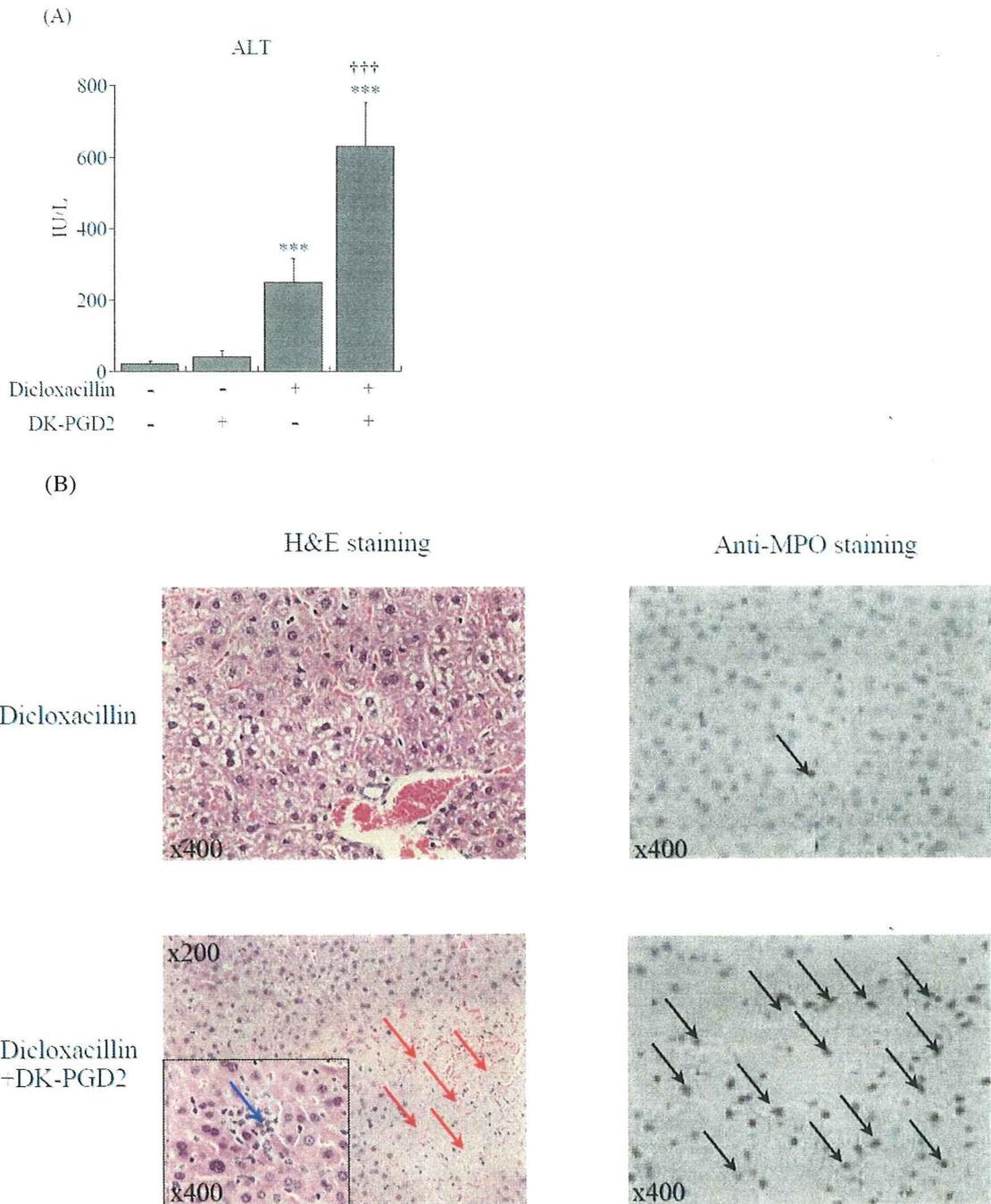


Fig. 7. Effects of DK-PGD<sub>2</sub> administration on dicloxacillin induced liver injury in mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.). One hour after dicloxacillin administration, DK-PGD<sub>2</sub> (10 µg/body i.p.) was administered. After 6 h, ALT levels were measured (A). Data are mean ± SD (n = 3 to 5). Significantly different from dicloxacillin-administered group (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; significantly different from dicloxacillin administered group (†††  $p < 0.001$ ). Liver specimens were prepared 6 h after dicloxacillin-administration (B). Liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody. Arrows indicate necrotic cells and MPO-positive cells.

C-8 ジクロキサシリンおよびDK-PGD<sub>2</sub>併用投与マウス肝における mRNA 変動解析  
 ジクロキサシリン投与1時間後にDK-PGD<sub>2</sub>を投与し、薬物投与6時間後のマウス肝における炎症および免疫に関与する遺伝子の mRNA の発現変動を、real time

RT-PCR を用いて検討した。GATA-3、Eotaxin-1、MIP-2 および MCP-1 の mRNA を測定した。それぞれのサンプルの比の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 8)。

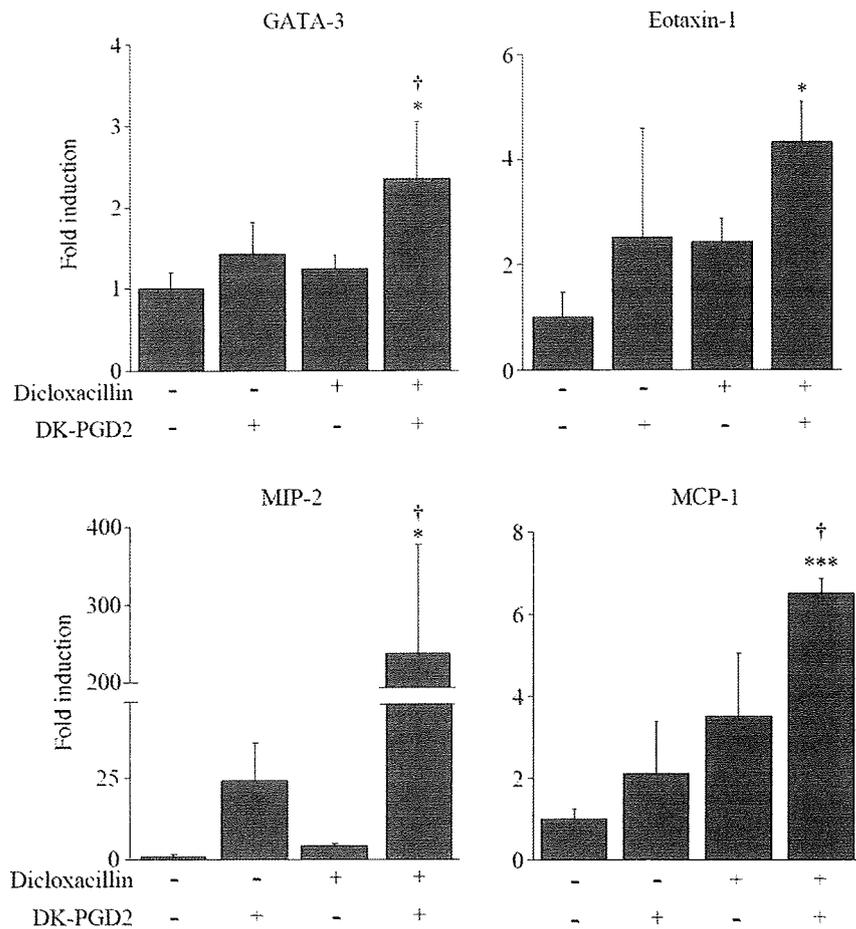


Fig. 8. Effects of DK-PGD<sub>2</sub> administration in dicloxacillin-administered mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.). One hour after dicloxacillin administration, DK-PGD<sub>2</sub> (10μg/body i.p.) was administered. After 6 h, hepatic mRNA levels of GATA-3, Eotaxin-1, MIP-2, and MCP-1 were measured by real time RT-PCR. Data are mean ± SD (n = 3 to 5). Significantly different from saline administered control (\**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001); significantly different from dicloxacillin-administered group (†*p* < 0.05).

GATA-3 の mRNA は DK-PGD<sub>2</sub> 単独投与群およびジクロキサシリン単独投与群では変化は認められなかった。ジクロキサシリン単独投与群と比して、DK-PGD<sub>2</sub> とジクロキサシリンを併用投与した群で有意な上昇が認められた。Eotaxin-1 の mRNA はジクロキサシリン単独投与群および DK-PGD<sub>2</sub> 単独投与群で上昇傾向が認められ、併用投与群では対照群と比して、有意な上昇が認められた。MIP-2 の mRNA は DK-PGD<sub>2</sub> 投与で上昇傾向が認められ、併用投与群では対照群の 200 倍程度の顕著な上昇が認められた。MCP-1 の mRNA はジク

ロキサシリン単独投与群および DK-PGD<sub>2</sub> 単独投与群で上昇傾向が認められ、併用投与群では有意な上昇が認められた。

C-9 DK-PGD<sub>2</sub> およびジクロキサシリン併用投与マウス血漿中の IL-4 タンパク質量への影響

ジクロキサシリン投与 1 時間後に DK-PGD<sub>2</sub> を投与し、薬物投与 6 時間後の血漿中の IL-4 のタンパク質量の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 9)。

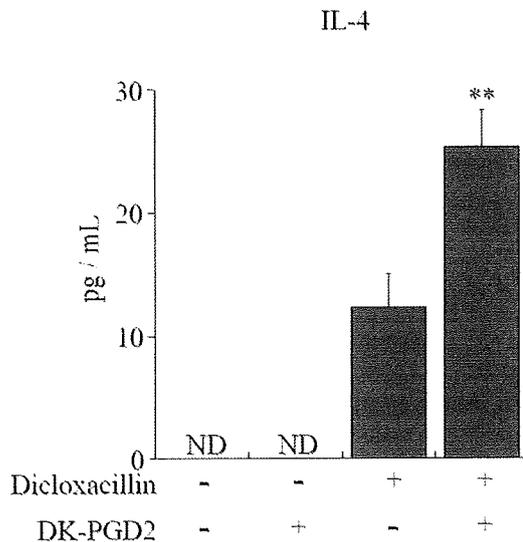


Fig. 9. Effects of DK-PGD<sub>2</sub> administration on plasma IL-4 in dicloxacillin-administered mice. Mice were given dicloxacillin (600 mg/kg i.p.). One hour after dicloxacillin administration, DK-PGD<sub>2</sub> (10µg/body i.p.) was administered. After 6 h, IL-4 levels were measured. Data are mean ± SD (n = 3 to 5). Significantly different from dicloxacillin-administered group (\*\**p* < 0.01).

未処置群、DK-PGD<sub>2</sub> 単独投与群においてはいずれも IL-4 は検出できなかった。ジ

クロキサシリン単独投与群においては IL-4 を検出することができ、その群と比

較して、DK-PGD<sub>2</sub>を併用投与した群ではIL-4の有意な上昇が認められた。

#### D. 考察

本研究ではジクロキサシリン誘導性肝障害の発症にIL-4などのTh2の因子が関与することを示し、DK-PGD<sub>2</sub>投与がジクロキサシリン肝障害を増悪させることを見出した。Con A誘導性肝障害にIL-4が関与することは報告されているが(Jaruga et al., 2003)、薬物誘導性肝障害にその関与が示された報告は未だにないことより、本研究は薬物誘導性肝障害にIL-4の関与を初めて示したものである。また、DK-PGD<sub>2</sub>がTh2因子の関与する肝障害を増悪させることを示した最初の報告である。

ジクロキサシリンの投与によりALT、AST、T-Bil値の有意な上昇が認められた。組織染色では、ジクロキサシリン投与マウスの肝切片に脂肪滴と思われる細胞質内微小空胞が認められ、MPO陽性細胞も少数だが認められた。ジクロキサシリンを投与したマウスにおいて転写因子のSTAT1は有意な減少が認められた一方、Th2の因子であるIL-5、STAT6およびEotaxin-2の有意な上昇が認められた。以上よりジクロキサシリン誘導性肝障害の発症にTh2の因子が関与することが示唆された。血漿中のIL-4はジクロキサシリン

を投与することで検出することができた。IL-4はSTAT6を活性化することや、Suppressors of cytokine signaling (SOCS)1,3を介することでSTAT1の働きを抑えることが報告されている(Palmer and Restifo, 2009)。このことから血漿中のIL-4が上昇したことによりSTAT6の発現が上昇、STAT1の発現が減少したのだと考えられる。しかし、GATA-3の上昇は認められていないことからTh2細胞が増加したのではなく、肝臓の上皮細胞や実質細胞のSTAT6の発現が上昇し、それに伴ってEotaxinなどが上昇したと考えられる。

Th細胞のサブセットにはTh1、Th2およびTh17があり、それぞれ放出するサイトカインや分化に必要な転写因子が異なる。Th1はIFN- $\gamma$ やIL-12などを放出し、その分化にはSTAT1とT-betが、Th2はIL-4、IL-5およびIL-13などを放出し、分化にはSTAT6とGATA-3が、Th17はIL-17やIL-22などを放出、分化にはSTAT3とROR- $\gamma$ tがそれぞれ必要であることが報告されている(Steinman 2007; Agnello et al., 2003)。また、Eotaxin-1,2は好中球、好酸球などの浸潤に関わるケモカインであり、IL-4によって上昇することが知られている(Jaruga et al., 2003)。MIP-2は好中球の浸潤に関わり、ハロタン

による肝障害の際には顕著な上昇を示すケモカインである (Kobayashi et al., 2009)。

rIL-4 を投与する検討では、ジクロキサシリン単独投与群と比較して、rIL-4 とジクロキサシリンを併用投与することで ALT 値の上昇が認められた。rIL-4 は生体内での半減期が非常に短いことから、薬物投与 1 h 後に投与した。rIL-4 の投与量を 0.5  $\mu\text{g/body}$  にした場合は ALT 値の上昇傾向を示し、2.0  $\mu\text{g/body}$  の場合は有意な上昇が認められ、rIL-4 の投与量依存的に ALT 値が上昇した。IL-4 モノクローナル抗体を用いた検討では、IL-4 抗体投与により ALT 値の有意な減少が認められた。IL-4 抗体は同じ抗体を投与している報告を参考にし (Frendscho et al., 1992)、ジクロキサシリン投与の 1 h 後に投与した。上記の rIL-4 および IL-4 抗体を用いた検討からジクロキサシリンによる肝障害には IL-4 が関与することが示唆された。IL-4 はヒトおよびマウス間で働きが似ており、アレルギーの発症に関与するサイトカインである。今回の検討から、IL-4 を放出しやすい人は免疫系の関与する肝障害を引き起こす可能性が高いことが考えられる。IL-4 の放出を調節する転写因子の Minc は Single nucleotide polymorphism (SNP) が複数あることが報

告されており (Okamoto et al., 2009)、その SNP により副作用の発現に個人差がある可能性が考えられる。

DK-PGD<sub>2</sub> は Th2 細胞などを活性化する CRTh2 に作用すること (Kostenis and Ulven, 2006) から、IL-4 が関与するジクロキサシリン誘導性肝障害を増悪させる可能性が考えられた。最初に、DK-PGD<sub>2</sub> 投与による肝障害への影響を検討した報告は未だにないため、投与量の検討から行った (Fig. 6)。DK-PGD<sub>2</sub> の投与量が 30、50  $\mu\text{g/body}$  の際には ALT 値の変化は認められなかったが、3、10  $\mu\text{g/body}$  において軽微な上昇が認められ、投与量依存的な ALT 値の上昇は認められなかった。これは、皮膚炎における DK-PGD<sub>2</sub> の投与の検討において、投与量と炎症の程度の相関は認められなかったという報告 (Takeshita et al., 2004) と一致した。DK-PGD<sub>2</sub> 投与量は ALT 値が軽微に上昇した 3、10  $\mu\text{g/body}$  として、ジクロキサシリンと併用投与することにした。投与量 3  $\mu\text{g/body}$  ではジクロキサシリン単独投与群と比して、ALT 値に変化は認められなかったが (data not shown)、10  $\mu\text{g/body}$  では ALT 値が 2.5 倍ほどに上昇した。この ALT 値の上昇は rIL-4 併用投与の場合よりも高値であった。この理由としては、DK-PGD<sub>2</sub> が Th2 細胞に加え他の免疫系細胞

にも作用し、脱顆粒および遊走を惹起するためだと考えられる (Kostenis and Ulven 2006)。組織染色でもジクロキサシリン単独投与の場合には認められていなかった巣状のネクロシスや単核細胞、多数の好中球の浸潤が認められたことから、組織診断と ALT 値の両方で肝障害の増悪が示唆された。DK-PGD<sub>2</sub>併用投与で認められたネクロシスは多数の好中球の浸潤によるものだと考えられる。肝臓においては GATA-3、Eotaxin-1 および MIP-2 の mRNA の有意な上昇が認められた。Eotaxin-1 や MIP-2 などのケモカインの上昇により単核細胞や好中球の浸潤が引き起こされたと考えられる。DK-PGD<sub>2</sub>投与の際に MIP-2 の mRNA が上昇するという結果は、CRTh2 を活性化したときに血漿中 MIP-2 が上昇するという報告 (Takeshita et al., 2004) と一致した。血漿中の IL-4 値はジクロキサシリンのみを投与した場合と比較して有意な上昇が認められた。DK-PGD<sub>2</sub>を併用投与した場合は GATA-3 の上昇が認められていることから、肝臓での Th2 細胞数が上昇し、IL-4 を放出したことで血漿中の IL-4 濃度も上昇したと考えられる。DK-PGD<sub>2</sub>投与によりジクロキサシリンによる肝障害が増悪したことから多数の免疫系細胞の浸潤が認められたこと、DK-PGD<sub>2</sub>併用投与は免疫学的な因子が

関与する薬物誘導性肝障害を *in vivo* で高感度に検出する方法の 1 つになり得るかもしれない。

#### E. 結論

本研究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-PGD<sub>2</sub>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-PGD<sub>2</sub>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-PGD<sub>2</sub>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-PGD<sub>2</sub>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。

## G. 研究発表

### 2. 学会発表

Tsuyoshi Yokoi, Eisuke Kobayashi, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima. Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. 16<sup>th</sup> North American Regional ISSX Meeting, 2009. 10.18-22, Baltimore, USA.

樋口悟法、小林雅典、吉川幸孝、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：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、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

小林雅典、樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅： $\alpha$ -Naphthylisothiocyanate (ANIT) 誘導性肝障害への interleukin-17 (IL-17) の関与、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

Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, and Frucht DM (2003) Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* **23**: 147-161.

Castelo-Branco C and Del Pino M (2009) Hepatotoxicity during low-dose flutamide treatment for hirsutism. *Gynecol Endocrinol* **25**: 419-422.

Frendscho MH, Brown JF, Iizawa Y, Wagner RD, and Czuprynski CJ (1992) Administration of anti-IL-4 monoclonal antibody 11B11 increases the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **148**: 3978-3985.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, and Locksley RM (1989) Reciprocal expression of interferon- $\gamma$  or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* **169**: 59-72.

Jaruga B, Hong F, Sun R, Radaeva S, and Gao B (2003) Crucial role of IL-4/STAT6 in T cell-mediated hepatitis: up-regulating Eotaxins and IL-5 and recruiting leukocytes. *J Immunol* **171**: 3233-3244.

Jenkins RE, Kitteringham NR, Goldring CE, Dowdall SM, Hamlett J, Lane CS, Boerma JS, Vermeulen NP, and Park BK (2008) Glutathione-S-transferase pi as a model protein for the characterisation of chemically reactive metabolites. *Proteomics* **8**: 301-315.

Kay AB (2001) Allergy and allergic diseases. *N Engl J Med* **344**: 30-37.

Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis,

- its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**: 223-246.
- Kobayashi E, Kobayashi M, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol Sci* **111**: 302-310.
- Kostenis E and Ulven T (2006) Emerging roles of DPand CRTh2 in allergic inflammation. *Trends Mol Med* **12**: 148-158.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, and Iwakura Y (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **177**: 566-573.
- Lawrence S (2007) A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis if T cell-mediated tissue damage. *Nat. Rev. Med.* **13**: 139-145.
- Morita M, Akai S, Hosomi H, Tsuneyama K, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Drug-induced hepatotoxicity test using  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol Lett* **189**: 159-165.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, and Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**: 2348-2357.
- Okamoto M, Stry MV, Chung L, Koyanagi M, Sun X, Suzuki Y, Ohara O, Kitamura H, Atsushi H, Kubo M, and Bix M (2009) Mina, an IL4 repressor, controls T helper type 2 bias. *Nat Immunol* **10**: 872-879.
- Olsson R, Wiholm BE, Sand C, Zettergren L, Hultcrantz R, and Myehed M (1992) Liver damage from flucloxacillin, cloxacillin, dicloxacillin. *J Hepatol* **15**: 154-161.
- Palmer CD and Restifo PN (2009) Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* **30**: 592-602.
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, and Williams DP (2005a) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 177-202.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nürleva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, and Dong C (2005b) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**: 1133-1141.
- Rengarajan J, Szabo SJ, and Glimcher LH (2000) Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* **21**: 479-483.
- Sheibanie AF, Khayrullina T, Safadi FF, and Ganea D (2007) Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. *Arthritis Rheum* **56**: 2608-2619.

Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H, Joh T, Itoh M, and Kakumu S (2001) Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* **36**: 544-551.

Takeshita K, Yamasaki T, Nagano K, Sugimoto H, Shichijo M, Gantner F, and Bacon B K (2004) CRTH2 is a prominent effector in contact hypersensitivity-induced neutrophil inflammation. *Int Immunol* **16**, 947-959.

Tirmenstein MA and Nelson SD (1989) Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Biol Chem* **264**: 9814-9819.

Usui T (2007) Transcription factors that regulate helper T cell differentiation. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **30**: 419-427.

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

薬物誘導性肝障害に対するタモキシフェンによる肝保護作用機序

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

肝虚血再灌流など様々な肝障害にエストロゲンが保護作用を示すことが報告されているが、薬物誘導性肝障害に対する影響は不明である。本研究では、薬物誘導性肝障害に対する種々のエストロゲン関連化合物の肝保護作用を検討し、その機序を解明することを目的とした。エストロゲン受容体（ER）アゴニストである Ethinylestradiol（EE2）、ER modulator である Tamoxifen（TAM）と Raloxifene（RAL）および ER アンタゴニストである ICI 182,780（ICI）をそれぞれマウスに5日間投与後、Thioacetamide（TA）など肝障害を惹起する化合物を投与し、血漿パラメータ値を測定した。また、DNA マイクロアレイ解析を行い、肝保護を担う候補遺伝子を探索した。候補遺伝子に対する siRNA を設計し、マウス *in vivo* ノックダウンを行い TAM による肝保護作用との関連について検討した。さらに、ERα ノックアウト（KO）マウスを用いた検討も行った。EE2、TAM および RAL の前投与により TA 誘導性肝障害の軽減が認められ、特に TAM で顕著であった。ICI の前投与では軽減は認められなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、monocyte to macrophage differentiation-associated 2（Mmd2）の発現が TAM により顕著に誘導されたことに注目し詳細な検討を行った。Mmd2 に対する siRNA（siMmd2）をマウス尾静脈内に投与することにより肝 Mmd2 mRNA の約 70% の減少が得られ、さらに TA 誘導性肝障害の増強および TAM による肝保護作用の減弱が認められた。また、ERα KO マウスにおいては TAM による Mmd2 mRNA の誘導は認められず、肝保護作用も認められなかった。また、Mmd2 の肝保護作用のメカニズムを明らかにするため、ERα を介して肝再生を担うことで知られる Amphiregulin（Areg）の mRNA を測定した。TAM 投与により Areg

mRNAの上昇が認められ、ERα KO マウスにおいてはその上昇は認められなかった。また、siMmd2 投与により、肝臓における Areg mRNA の減少が認められ、Mmd2 との関連が示唆された。Mmd2 による肝保護作用メカニズムの一つとして、Areg を上昇させることによる肝再生促進が考えられた。以上より、TAM による肝保護作用は ERα を介した Mmd2 発現の上昇、およびそれに伴う Areg 発現の上昇が関与していることが示された。

#### A. 研究目的

薬物誘導性肝障害は医薬品開発および臨床での薬物療法における主要な問題の一つである。米国では急性肝障害の50%以上は薬物誘導性であり、600以上の医薬品に肝障害発症の可能性があるとされている (Lee, 2003; Park et al., 2005)。薬物誘導性肝障害惹起の原因として様々な因子が考えられている。典型的な肝障害薬物である Acetaminophen (APAP) を用いた検討の報告が最も多く、その肝障害惹起の原因として Mitogen-activated protein kinase の一種である c-jun N-terminal kinase (JNK) の関与、血液凝固系に関わる Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 および Protease-activated receptor (PAR) 1 の関与などが知られている (Gunawan et al., 2006; Bajt et al., 2008; Ganey et

al., 2007)。しかしながら、JNK、PAI-1、PAR-1 などは Diclofenac (DIC) など APAP 以外の肝障害性への関与の程度は薄く、薬物誘導性肝障害惹起の根本的な原因解明には至っていない。また、薬物誘導性肝障害の10%以上は特異的体質によるもので、この原因に関しては不明な点が多いためといわれている (Kaplowitz, 2005)。

Estrogen (E2) は Estrogen receptor (ER) に結合し、様々な生態反応に関与していることが知られており、ERにはERα、ERβの2つの subtype が存在する。肝臓において、ERαは高く発現しているが、ERβはほとんど発現が認められないことが知られている (Kuiper et al., 1997)。ERα agonist である Ethinylestradiol (EE2) の過量投与により、肝胆汁うっ滞が惹起されることが知られており、ERαは肝障害