

Fig. 5. Histopathological examination of the liver from diclofenac-administered mice. Liver specimens were sampled 24 hr after the diclofenac administration. The liver sections were stained with H&E or immunostained with anti-myeloperoxidase (MPO) antibody. Black arrow indicated apoptotic cell and red arrows indicated necrotic cell.

T-bet はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な低下が認められ、投与時間依存的な低下を示した (Fig. 6A)。

ROR- γ t は対照群と比較して、ジクロフェナク投与 12 時間において増加傾向を示し、24 時間では有意な増加が認められた (Fig. 6A)。STAT1 はジクロフェナク投与後 12 および 24 時間において対照群と比較して有意な減少が認められ、時間依存的な減少を示した (Fig. 6A)。STAT3 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、12 時間で最も高値を示した (Fig. 6A)。STAT6 はいずれの時間においても対照群と比較して有意な減少が認められたが時間依存性は認められなかった (Fig. 6A)。IL-1 β はジクロフェナク投与

後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、6 時間で最も高値を示し、その後は減少傾向を示した (Fig. 6B)。IL-6 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、時間依存的な増加を示した (Fig. 6B)。MIP-2 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対照群と比較して有意な増加が認められ、投与時間依存的な増加を示した (Fig. 6C)。MCP-1 はジクロフェナク投与後 6 および 12 時間において有意な増加が認められ、24 時間においては有意ではないが増加が認められた。MCP-1 の発現量は投与時間依存的な増加を示した (Fig. 6C)。CXCL1 はジクロフェナク投与後 6、12 および 24 時間のいずれにおいても対

照群と比較して有意な増加が認められ、

投与時間依存的な増加を示した (Fig. 6C)。

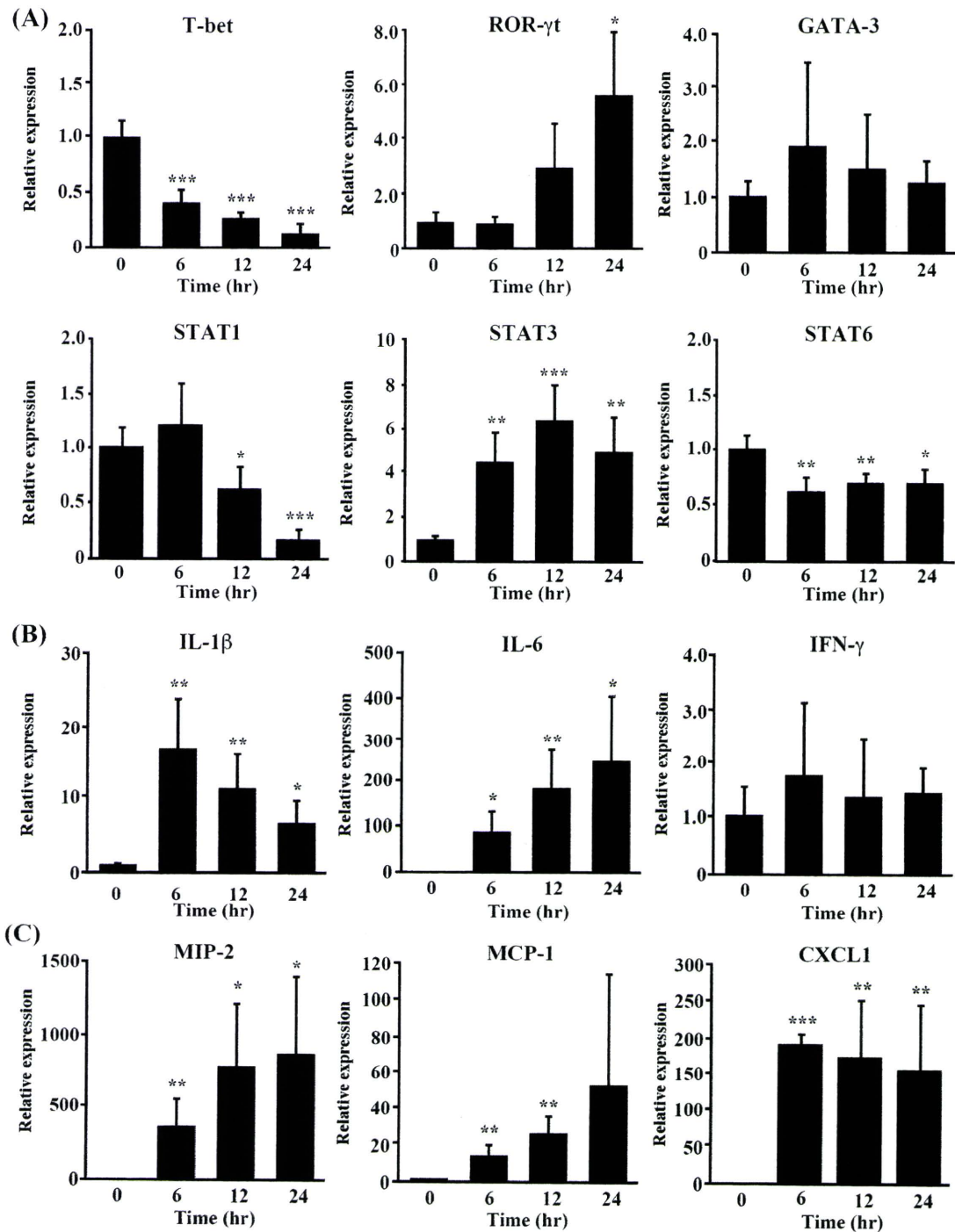


Fig. 6. Changes hepatic mRNA levels of various immune-mediated genes in diclofenac-administered mice. Mice were administered diclofenac (80 mg/kg, i.p.). After 6, 12 and 24 hr, hepatic mRNA levels were measured by real time RT-PCR. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. Data are mean \pm SD (n = 4 to 5). Significantly different from control mice (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

GATA-3 および IFN- γ はジクロフェナク投与後のいずれの時間においても対照群と比較して変化は認められなかった (Figs.

6A and B)。

C-3 ジクロフェナク誘導性肝障害に与えるクッパー細胞の影響

クッパー細胞を枯渇するために多くの研究で使用されている GdCl₃ を用いて、ジクロフェナク誘導性肝障害に与える影響について検討した。投与法は 2-8 に記載

した方法によって、薬物投与 24 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した。

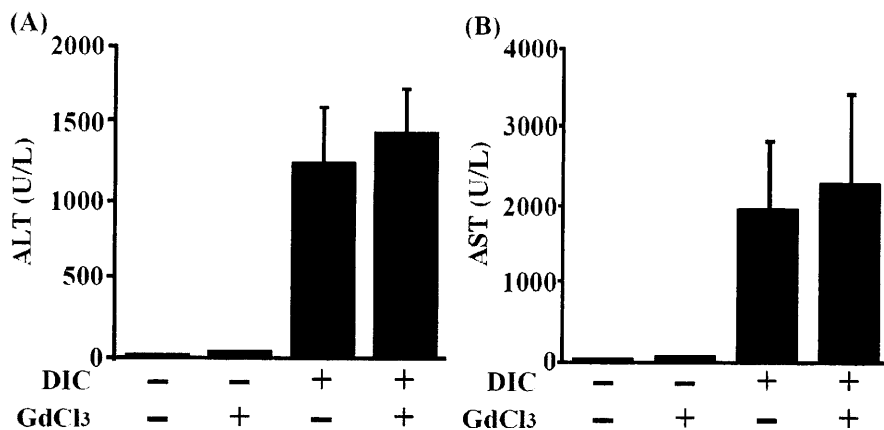


Fig. 7. Role of kupffer cells in diclofenac-induced liver injury. Mice were administered GdCl₃ 24 hr prior to diclofenac administration. Plasma were collected 24 hr after diclofenac administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5).

C-4 ジクロフェナク投与マウス血漿中の IL-17 タンパク質量の測定

ジクロフェナク誘導性肝障害に IL-17 が関与しているか検討するために、2-9 の方法により、ジクロフェナク投与 24 時間

後のマウスの血漿中 IL-17 タンパク質量を測定した。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。

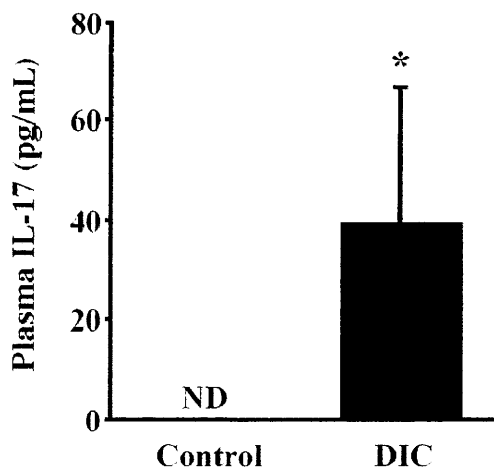


Fig. 8. Plasma IL-17 levels in diclofenac-administered mice. Mice were administered diclofenac (80 mg/kg in corn oil, *i.p.*), and plasma were collected 24 hr after administration. Data are mean \pm SD (n = 3). Significantly different from control mice. (* $P < 0.05$)

対照群と比較してジクロフェナク投与マウスにおいて血漿中 IL-17 の有意な増加が認められた (Fig. 8)。

C-5 rIL-17 投与によるジクロフェナク誘導性肝障害への影響

ジクロフェナク誘導性肝障害における

IL-17の関与を検討するために、rIL-17を用いて、薬物投与24時間後の血漿中ALT値の平均値の結果を以下に示した。ジク

ロフェナク単独投与群と比較してrIL-17併用投与により血漿中ALT値の増加が認められた (Fig. 9)。

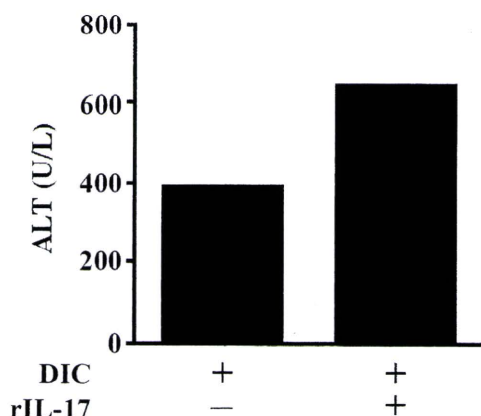


Fig. 9. Effects of recombinant mouse IL-17 (rIL-17) administration on plasma ALT in diclofenac-administered mice. Mice were administered diclofenac (50 mg/kg, *i.p.*). Six hour after diclofenac administration, rIL-17 (1 µg/body, *i.p.*) was administered. After 24 hr, plasma ALT levels were measured. Data are mean (n = 2).

D. 考察

本検討では、ジクロフェナク誘導性肝障害の新しいモデル動物を作製し、その肝障害における様々な炎症性サイトカインおよびケモカインなどの免疫学的因子の発現変動を見出した。中でも Th17 因子である IL-17 が発症に関与していることを新たに示した。これまでに、臨床報告からジクロフェナク誘導性肝障害の発症機序には、免疫学的因子の関与が疑われていたが、詳細な検討はされていなかった。本研究は、ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の関与について詳細に検討した初めての報告である。

初めに、ジクロフェナク誘導性肝障害モデルマウスを作製した。免疫学的因子に関して検討する際に、多くの研究で用いられている Balb/c マウスを用いることとし、投与方法の検討を行った

(Kobayashi et al., 2009)。一般に、薬物の投与経路としては臨床投与時と同様の経路が望ましいが、ジクロフェナクは副作用として消化管潰瘍などの消化器系の症状が知られている (ボルタレンインタビューフォーム, 2010)。したがって、消化器系の副作用を避けるため、投与経路は腹腔内投与とした。これまでの *in vivo* におけるジクロフェナク誘導性肝障害についての検討を参考にし (Deng et al., 2006)、生理食塩水に溶解させたジクロフェナク (150 mg/kg, *i.p.*) を投与した結果、ALT 値の上昇が軽微であり (184±63 U/L)、免疫学的因子の関与について検討するに至らなかった (data not shown)。しかし、本検討において、ジクロフェナクを corn oil に溶解させ投与した結果、血漿中 ALT 値および AST 値の有意な上昇が認められ、肝障害を再現良く強く惹起させることができた (Figs. 3A and B)。生理食塩水を溶媒

として投与した際と比較して、溶媒を corn oil に変更したことにより薬物の体内への吸収、代謝および排出などの体内動態が異なること、および体内で代謝物の生成や肝臓内への蓄積などに変化が生じたことが肝障害を惹起できた一因であると考えられるが、詳細な理由は不明である。

ジクロフェナクを 80 mg/kg および 120 mg/kg で投与した群のいずれにおいても、投与 24 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値の有意な上昇が認められた (Figs. 3A and B)。しかし、ジクロフェナクを 80 mg/kg で投与した群と 120 mg/kg で投与した群の血漿中 ALT 値の上昇が同程度であることに対し (Fig. 3A)、AST 値は 80 mg/kg を投与した群と比較して 120mg/kg を投与した群では高い値を示した (Fig. 3B)。ALT 値および AST 値はいずれも肝細胞中に多く存在しており、肝細胞傷害により血中に逸脱するため、血漿中の ALT 値および AST 値の測定は、肝機能障害のマーカーとなることが知られている (Ozer et al., 2008)。しかし、ALT が主に肝臓に存在しているのに対し、AST は肝臓のみならず心筋、骨格筋、腎臓および赤血球などにも広く存在している (Ozer et al., 2008)。このことから 120 mg/kg 投与した群では 80 mg/kg 投与した群と比較して肝臓以外の臓器における障害が悪化していることが示唆された。ジクロフェナクは重大な副作用として肝障害以外にうっ血性心不全が知られており、今回の AST 値の上昇は心臓障害が寄与している可能性が考えられた。その他の臓器の

副作用をなるべく回避することで肝障害について検討しやすくなると考え、以降の検討ではジクロフェナクの投与量は 80 mg/kg とした。

ジクロフェナクの同効薬であり、臨床で広く使用され、肝障害性が低いと考えられているイブプロフェン (Rainsford, 2009) をマウスに投与した時には血漿中 ALT 値および AST 値の上昇は認められなかった (Figs. 3A and B)。このことから、ジクロフェナク誘導性肝障害の発症には薬理作用であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 活性阻害ではなく、ジクロフェナク自体の寄与が大きいことが示唆された。

ジクロフェナク投与後の経時的な変動を解析した結果、ジクロフェナク投与後の血漿中 ALT 値および AST 値は 24 時間に最も高値を示した (Figs. 4A and B)。また、24 時間後において H&E 染色および MPO 抗体を用いた染色により組織学的評価を行った。H&E 染色は、組織の形態を観察する目的で細胞核および細胞質を染色する方法であり、肝細胞の損傷について確認するために行った。また、MPO 染色は好中球を確認するために多くの研究で頻用されており、MPO が主に好中球に存在していることを利用した染色法である (Kumada et al., 2004)。発症に免疫が関与すると考えられているアセトアミノフェンおよびハロタン誘導性肝障害モデルマウスにおいても肝細胞壊死や、肝組織への好中球浸潤が認められている (Liu et al., 2004; Liu et al., 2006; Kobayashi et al., 2009)。組織染色の結果、肝細胞の損傷および好中球の浸潤が認められたことから、

ジクロフェナクにより肝障害が引き起こされていること、および好中球による炎症反応が関与していることが示唆された。

ジクロフェナク誘導性肝障害においてどのような免疫学的因子が関与しているか検討するために、ジクロフェナク投与後の肝臓中 mRNA 発現変動を解析した。IL-1 β などの炎症性サイトカインや MCP-1、MIP-2 および CXCL1 などの好中球の浸潤に関与するケモカインの mRNA 発現上昇が認められた (Figs. 6B and C)。IL-1 β は、内皮細胞、単球およびマクロファージなどから放出される炎症性サイトカインであり、自然および獲得系の免疫応答に関与し、様々な自己免疫疾患の発症の一因であると考えられている (Kapoor et al., 2011)。また、MCP-1、MIP-2 および CXCL1 はクッパー細胞、好中球、単球および内皮細胞などから放出され、炎症部位への免疫細胞の浸潤に関与することが知られている (Oo and Adams, 2010)。中でも MIP-2 は好中球の遊走作用が強く、ハロタン誘導性肝障害においても顕著な上昇が認められている (Kobayashi et al., 2009)。これら MIP-2 などのケモカインの上昇により、ジクロフェナク投与後の肝組織において好中球の浸潤が認められた可能性が考えられる。

次に、多くの炎症性サイトカインやケモカインを産生し、様々な肝障害発症への関与が報告されているクッパー細胞に着目し、ジクロフェナク誘導性肝障害における役割について検討した (Fig. 7)。実験には、多くの研究においてクッパー細胞を枯渇させるために用いられている

GdCl₃ を使用し、今回の投与方法では肝臓中におけるクッパー細胞の 75%程度の減少が認められることが報告されている (Xu et al., 2010)。その結果、クッパー細胞を枯渇させたことによるジクロフェナク誘導性肝障害への影響は認められず、ジクロフェナク誘導性肝障害においてクッパー細胞の寄与は小さいことが示唆された (Fig. 7)。これまでに、Concanavalin A 誘導性肝障害においてクッパー細胞を枯渇させることにより肝障害の減弱が認められることが報告されている (Hatano et al., 2008)。一方で、ハロタン誘導性肝障害においてはクッパー細胞が関与しないことが報告されており (Cheng et al., 2010)、薬物によって肝障害の発症メカニズムに関与する免疫学的因子が異なることが考えられている。これらのことから、ジクロフェナク誘導性肝障害の発症においてもクッパー細胞以外の関与が示唆された。

mRNA 解析の結果から、ジクロフェナク投与により ROR γ t、STAT3 および IL-6 などの Th17 関連因子の発現上昇が認められたため、ジクロフェナク誘導性肝障害に Th17 因子が関与している可能性が示唆された (Figs. 6A-C)。Th17 細胞への分化には IL-1 β 、IL-6、IL-23、transforming growth factor (TGF) - β 、STAT3 および ROR γ t シグナルが重要であると言われている (Usui, 2007)。Th17 細胞から産生される IL-17 は、ハロタンおよび ANIT 誘導性肝障害の発症に関与することが明らかにされているため (Kobayashi et al., 2009; Kobayashi et al., 2010)、ジクロフェナク誘

導性肝障害において IL-17 が関与しているか検討することとした。ジクロフェナク投与後の血漿中 IL-17 濃度を測定した結果、ジクロフェナク投与により血漿中 IL-17 の上昇が認められ (Fig. 8)、また rIL-17 を用いた検討ではジクロフェナク単独投与と比較して、rIL-17 とジクロフェナクの併用投与により ALT 値の上昇が認められた (Fig. 9)。この結果から、IL-17 がジクロフェナク誘導性肝障害に関与している可能性が示唆された。

本検討では、ジクロフェナク誘導性肝障害において様々な免疫学的因子が発現変動することを明らかにし、その中でも Th17 因子である IL-17 が肝障害の悪化に関与している可能性を見出した。Th17 細胞は、Thp から分化するサブセットとして新たに発見され、Th17 から産生される IL-17 は MIP-2 などのケモカインを強く誘導することにより組織炎症を誘導し、関節リウマチなどの自己免疫疾患に関与することが知られている (Linden, 2001; Korn et al., 2009)。また、IL-17 はハロタンおよび ANIT 誘導性肝障害の発症に関与することに加え、薬物誘導性肝障害を発症した約 60% の患者において血漿中で IL-17 が検出されることが報告されていることから (Li et al., 2009)、薬物誘導性肝障害の発症に関与する因子の一つとして、注目されている。

また、ジクロフェナクにより重篤な肝障害を引き起こした患者の約 77% が骨関節炎を発症していることが報告されており (Banks et al., 1995)、骨関節炎の病態では局所において IL-17 を始めとする

様々な炎症性サイトカインの濃度が上昇している (Kapoor et al., 2011)。骨関節炎を発症した患者がジクロフェナク誘導性肝障害を発症する場合は多い一因として、関節炎などの病態により生体内の IL-17 などの炎症性サイトカイン量が比較的に高い状態にある場合、肝障害に伴う炎症反応が強く惹起され、重篤な肝障害発症に至る可能性が考えられた。

さらに、免疫学的因子の SNP がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与していることも genome-wide association study (GWAS) での検討により明らかにされており、主に Regulatory T cell (Treg) から産生される抗炎症性サイトカインである IL-10 の転写活性が低下しているヒトでは、変異を持たないヒトと比較してジクロフェナク誘導性肝障害を 3 倍程度引き起こしやすいことが報告されている (Aithal et al., 2004)。このことから、免疫応答における個体差がジクロフェナク誘導性肝障害の発症に関与してくること、また、IL-17 だけでなく IL-10 などを含めた複数のサイトカインによりジクロフェナクによる炎症反応が制御されていることが考えられる。IL-17 を始めとする炎症性因子は NK、NKT 細胞、樹状細胞および単球などの複数の免疫細胞から産生される (Korn et al., 2009; Racanelli and Rehermann, 2006)。肝臓内の免疫応答のネットワークは非常に複雑なものであり IL-17 だけでなく IL-6 および IL-1 β などの炎症性サイトカインやケモカインの mRNA の発現量の増加も認められていることから、様々な免疫学的因子がジクロ

フェナク誘導性肝障害を発症する一因になることが考えられる。

E. 結論

DIC 投与により血漿中 ALT 値および AST 値の上昇が認められ、薬物投与 24 時間に最も高値を示した。また、肝細胞壊死および肝組織への好中球の浸潤が認められた。肝臓中における免疫学的因子の mRNA 発現変動を解析した結果、IL-1b、IL-6、macrophage inflammatory protein (MIP) -2 および monocyte chemo-attractant protein (MCP) -1 などの様々な炎症性サイトカインおよびケモカインの発現上昇が認められた。また、Th17 への分化に関与する転写因子である retinoid-related orphan receptor (ROR) - γ t の発現上昇および、Th1 分化に関与する転写因子である T box expressed in T cells (T-bet) の発現低下が認められた。さらに、ハロタンなどの薬物誘導性肝障害への関与が明らかにされている IL-17 のタンパク質量の増加が認められた。以上より、DIC 誘導性肝障害において様々な免疫学的因子が発現変動すること、その中でも IL-17 を初めとする Th17 因子の関与が示唆された。本検討は、ジクロフェナク誘導性肝障害における免疫学的因子の関与についての検討の一部であり、発症機序解明にはさらなる検討が必要であると考えられる。しかし、今回明らかにした結果は、今後のジクロフェナク誘導性肝障害に関する検討や、その他の薬物誘導性肝障害の発症メカニズム解明の手がかりになると考えられる。

<参考文献>

Adams DH, Ju C, Ramaiah SK, Uetrecht J, and Jaeschke H (2010) Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicol. Sci.* **115**: 307-321.

Aithal GP, Ramsay L, Daly AK, Sonchit N, Leathart JBS, Alexander G, Kenna JG, Galdwell J, and Day CP (2004) Hepatic adducts, circulating antibodies, and cytokine polymorphisms in patients with diclofenac hepatotoxicity. *Hepatology* **39**: 1430-1440.

Banks AT, Zimmerman HJ, Ishak KG, and Harter JG (1995) Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the food and drug administration as adverse reactions. *Hepatology* **22**: 820-827.

Bhogaraju A, Nazeer S, AL-Baghdadi Y, Rahman M, Wrestler F, and Patel N (1999) Diclofenac-associated hepatitis. *South. Med. J.* **92**: 711-713.

Boelsterli UA (2003) Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**: 307-322.

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

Cheng L, You Q, Yin H, Holt MP, and Ju C (2010) Involvement of natural killer T cells in halothane-induced liver injury in mice. *Biochem. Pharmacol.* **80**: 225-261.

Deng X, Stachlewitz RF, Liguori MJ, Blomme EA, Waring JF, Luyendyk JP, Maddox JF, Ganey PE, and Roth RA (2006) Modest inflammation enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: Role of neutrophils and bacterial translocation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**: 1191-1199.

Hatano M, Sasaki S, Ohata S, Shiratsuchi Y, Yamazaki T, Nagata K, and Kobayashi Y (2008) Effects of kupffer cell-depletion on concanavalin A-induced hepatitis. *Cell. Immunol.* **251**: 25-30.

Higuchi S, Kobayashi M, Yoshikawa Y, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2011) IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.* **200**: 139-145.

Holt MP and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *The AAPS Journal* **8**: 48-54.

池田敏彦 (2006) 肝機能障害、日本薬理学雑誌 127: 454-459.

[Kaplowitz N](#) (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **4**: 489-499.

[Kapoor M](#), [Martel-Pelletier J](#), [Lajeunesse D](#), [Pelletier JP](#), and [Fahmi H](#) (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**: 33-42.

[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.

[Kobayashi M](#), [Higuchi S](#), [Mizuno K](#), [Tsuneyama K](#), [Fukami T](#), [Nakajima M](#), and [Yokoi T](#) (2010) Interleukin-17 is involved in α -naphthylisothiocyanate-induced liver injury in mice. *Toxicology* **275**: 50-57.

[Korn T](#), [Bettelli E](#), [Oukka M](#), and [Kuchroo VK](#) (2009) IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**: 485-517.

[Kumada T](#), [Tsuneyama K](#), [Hatta H](#), [Ishizawa S](#), and [Takano Y](#) (2004) Improved 1-h rapid immunostaining method using intermittent microwave irradiation: practicability based on 5 years application in Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital. *Mod. Pathol.* **17**: 1141-1149.

[Lagas JS](#), [Sparidans RW](#), [Wagenaar E](#), [Beijnen JH](#), and [Schinkel AH](#) (2010) Hepatic clearance of reactive glucuronide metabolites of diclofenac in the mouse is dependent on multiple ATP-binding cassette efflux transporters. *Mol. Pharmacol.* **77**: 687-694.

[Li J](#), [Zhu X](#), [Liu F](#), [Cai P](#), [Sanders C](#), [Lee WM](#), and [Utrecht J](#) (2009) Cytokine and autoantibody patterns in acute liver failure. *J. Immunotoxicol.* **7**: 157-164.

[Liu ZX](#), [Govindarajan S](#), and [Kaplowitz N](#) (2004) Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* **127**: 1760-1774.

[Liu ZX](#), [Han D](#), [Gunawan B](#), and [Kaplowitz N](#) (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* **43**: 1220-1230.

[Morita M](#), [Akai S](#), [Hosomi H](#), [Tsuneyama K](#), [Nakajima M](#), and [Yokoi T](#) (2009) Drug-induced hepatotoxicity test using γ -glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol. Lett.* **189**: 159-165.

[Oketani M](#), [Ido A](#), and [Tsubouchi H](#) (2011) Changing etiologies and outcomes of acute liver

failure: A perspective from Japan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**: 65-71.

[Oo YH](#) and [Adams DH](#) (2010) The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J. Autoimmun.* **34**: 45-54.

[Ozer J](#), [Ratner M](#), [Shaw M](#), [Bailey W](#), and [Schomaker S](#) (2008) The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* **245**: 194-205.

[Park BK](#), [Kitteringham NR](#), [Maggs JL](#), [Pirmohamed M](#), and [Williams DP](#) (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 177-202.

[Racanelli V](#) and [Rehermann B](#) (2006) The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**: 54-62.

[Rainsford KD](#) (2009) Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacol.* **17**: 275-342.

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

寺西宗広、真鍋 淳 (2008) 肝毒性 日本薬理学雑誌 **132**: 347-350.

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

ボルトレンインタビューフォーム (2010) ノバルティス ファーマ株式会社 1-33.

[Xu L](#), [Qi J](#), [Zhao P](#), [Liang X](#), [Ju Y](#), [Liu P](#), [Liu B](#), [Guo C](#), [Zhang L](#), [Ma C](#), and [Gao L](#) (2010) T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-4 attenuates concanavalin A-induced hepatitis by regulating macrophage. *J. Leukoc. Biol.* **88**: 329-336.

[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.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 投稿準備中

2. 学会発表 2011 年第 38 回日本ト

キシコロジー学会年会（横浜）にて
発表予定

H. 知的財産権の出願・登録
該当なし。

免疫学的機序による薬物性肝障害における代謝的活性化の評価

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

薬物性肝障害の発症機序の一つとして、シトクロム P450 (CYP) による代謝的活性化によって生成する反応性代謝物が免疫学的因子に影響を及ぼすことが示唆されているが、*in vitro* において代謝的活性化を介した免疫反応の活性化を評価した報告はない。本研究では、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞を用いて代謝的活性化を考慮した *in vitro* 試験系を構築し、反応性代謝物による免疫学的因子の活性化について評価した。バキュロ CYP3A4 発現系マイクロソーム、補酵素 NADPH および薬物を THP-1 細胞に暴露し、THP-1 細胞上の表面分子 CD86 および CD54 の発現量をフローサイトメトリーにより測定した。炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF) α およびケモカインである interleukin (IL) -8 mRNA 発現量を real time RT-PCR により、タンパク質産生量を ELISA にて測定した。その結果、肝障害を惹起する報告のある 10 種の薬物について検討した結果、アルベンダゾール、アミオダロン (AMD) および代謝物であるデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、CYP3A4 による CD 発現量の有意な増加が認められた。AMD 処置 24 時間後の DEA およびその代謝物であるジデスエチルアミオダロン (DiDEA) 生成量を HPLC により定量した結果、AMD の約 40% が DEA に、約 1.3% が DiDEA に代謝されていることを明らかとした。また、AMD および DEA 処置により、TNF α および IL-8 の mRNA 発現量およびタンパク質産生量を測定した結果、CYP3A4 存在下において処置濃度依存的な増加が認められた。以上、AMD などの肝障害性薬物について、CYP3A4 による代謝的活性化を介した免疫反応の活性化が示唆されたことより、本試験系は *in vitro* において代謝的活性化による免疫反応の関与を評価し得る手段となると考えられる。

A. 研究目的

薬物性肝障害は臨床における急性肝障害の約半数を占める (Kaplowitz, 2001)。一般に、吸収された薬物は血中に移行後、肝臓に運ばれるため、肝臓は高濃度の薬物に暴露されることになる。従って、肝臓は薬物による障害を受ける可能性が他

の臓器より高いとされている。これまでに肝障害との関連が示唆されている薬物は約1000種類にのぼる (Zimmerman, 1999)。また、医薬品の承認販売後に肝障害が報告され、販売中止となる事例もある。販売中止となる薬物の多くは不安定な反応性代謝物が存在することが報告さ

れている (Guengerich and MacDonald, 2007)。

薬物の多くは体内に吸収されると薬物代謝酵素により代謝される。一般に、薬物は薬物代謝酵素により酸化、還元および加水分解を受け水酸基や第一級、第二級アミン基を生成し、さらに抱合反応により極性が上がることで、排泄を促す。しかし、一部の薬物では代謝により化学的に不安定な反応性代謝物が生じる代謝的活性化を引き起こす。薬物代謝酵素の中でも、Cytochrome P450 (CYP) は肝臓に高く発現しており、また、腸管、腎臓、肺および皮膚などの多くの臓器に分布している (Krishna and Klotz, 1994)。CYP は主に酸化反応を触媒し、薬物代謝の約 75%に関与し、薬物代謝において中心的な役割を果たしているが、代謝的活性化に関与することも報告されている

(Guengerich, 2008)。CYP 分子種の中でも CYP3A4 はヒト肝総 CYP の約 30%を占め (Shimada et al., 1994)、臨床で使用されている薬物の約 50%の代謝に関与するといわれている (Guengerich, 1995)。そのため、CYP3A4 はヒト肝において解毒だけでなく代謝的活性化への寄与も高いと考えられる。また、CYP の発現量には大きな個体差が存在し、この個体差が薬物による毒性発現の個体差に寄与している可能性が考えられる (Shimada et al., 1994)。

反応性代謝物は主にCYPによる代謝的活性化により産生され、タンパク質やDNAなどの生体内高分子と共有結合し、細胞の機能障害を引き起こす (Park et al., 2005; Riley et al., 1988)。反応性代謝物は一

般に求電子性であり、反応性代謝物の電子密度が低い部分が、生体内に豊富に存在する求核基 (CYP中のヘム窒素、各種タンパク質中のリジン・システイン・ヒスチジン・セリン残基など、DNA中のグアニン残基など) からの電子対供与を受けて共有結合を形成する。反応性代謝物による直接的な細胞毒性に加えて、共有結合を形成し修飾されたタンパク質は免疫原性を獲得し、免疫反応を惹起することが示唆されている (Knowles et al., 2000; Park et al., 2000; Uetrecht, 1999)。

最も多くの研究がなされているアセトアミノフェン (APAP) の例では、過量投与および GSH 減少時に、重篤な肝障害が生じることが知られ、毒性発現に CYP1A2、CYP2E1 および CYP3A4 による代謝的活性化により生じる NAPQI が重要であることが報告されている (Albano et al., 1985)。APAP は通常の投与量においては、硫酸抱合やグルクロン酸抱合体に代謝され体外に排泄されるが、過量投与時には、抱合代謝過程が飽和し、NAPQI が生成する (Raucy et al., 1989; Thummel et al., 1993)。通常、NAPQI は生体内の GSH により捕捉され解毒されるが、過剰の NAPQI 生成時には細胞内の GSH が枯渇し、細胞内に存在する様々な生体高分子と結合し、細胞毒性を引き起こす (Hoffmann et al., 1985; Hinson et al., 1995; Hongslo et al., 1994)。このように、代謝的活性化により生じる反応性代謝物が毒性発現初期に重要な役割を担うことが示唆されている (Uetrecht, 1999; Walgren et al., 2005)。APAP と同様に CYP による代謝的

活性化を受け、肝障害を示す薬物としてハロゲン化吸入麻酔薬が挙げられる。これらの麻酔薬は主に CYP2E1 により反応性代謝物であるトリフルオロ酢酸クロリドが生成し、タンパク質に対して非特異的にトリフルオロ酢酸化して肝障害に関与すると考えられている (Sato et al., 1985; Kenna et al., 1988)。ハロタン、イソフルランおよびデスフルランでは反応性代謝物の生成量が順に約 10 分の 1 ずつに減少し、その生成量に伴い肝障害発症率が減少していることから、反応性代謝物の生成が肝障害発現に影響していることが示唆されている (Njoku et al., 1997)。このように、反応性代謝物が肝障害発症に重要な役割を示すことが数多く報告されている。

臨床で報告されている薬物誘導性肝障害の多くは、炎症などの免疫が関係していることが報告されている (Deng et al., 2006; Shaw et al., 2007)。免疫学的な肝障害発症機序のひとつに、免疫反応に伴う炎症ストレスの重要性が示唆されており、薬物などのストレスにより生体内の免疫機構が活性化されると、過剰な免疫反応に伴う炎症性ストレスが発現し、肝障害の発症原因となると考えられている (Ganey et al., 2004; Roth et al., 2003; Tafazoli et al., 2005)。肝臓における自然免疫には、肝臓へ浸潤している単球やマクロファージ、肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞などが関与する。これらの免疫細胞は活性化されると、表面抗原分子 (CD40、CD44、CD54、CD80、CD83、CD86)、炎症性サイトカイン (IL-1 β

および TNF α) およびケモカイン (IL-8 および MCP-1) 産生量が増加し (Aiba et al., 1997)、T 細胞の効率的な増殖に必要な不可欠である共刺激シグナルを伝えることが知られている (Enk et al., 1993; Rougier et al., 1998; Scholer et al., 2008)。また、炎症性サイトカインやケモカインはリンパ球や好中球を刺激し、肝臓への浸潤を引き起こす炎症反応の引き金となることが知られている。

これまでに、げっ歯類を用いた検討において、APAP や非ステロイド性抗炎症薬、抗菌薬などの肝障害において、炎症性サイトカイン TNF α 産生や好中球などの免疫因子浸潤が、肝障害発症に重要な役割を果たすことが明らかにされている (Jaeschke, 2005; Deng et al., 2009)。Tukov ら (2006) はラットから単離したクッパー細胞と肝実質細胞を共培養し、肝障害性薬物の評価を行っている。しかし、げっ歯類を用いた研究では薬物代謝酵素活性などの種差の問題があるため、必ずしもヒトにおける反応を予測できるとは限らない (Jenden, 1991)。実際に臨床試験中に開発中止となる候補化合物は約 90% 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。実験動物から得た肝障害に関する知見から、ヒトにおける肝障害性を予測することは困難である。そのため、*in vitro* 試験でより簡便に、多くの化合物を短期間で評価可能な試験系の開発が求められている (堀井, 2001)。これまでに、*in vitro* において代謝的活性化を介した薬物の毒性を評価するため、さまざまな検討が報告されている。

薬物の求電子性およびタンパク質への共有結合が肝障害と関連があるとされ (Zhou et al., 2005)、多くの製薬企業は、薬物代謝酵素の不可逆的阻害を利用した阻害アッセイ、GSHなどの捕捉剤を用いたトラッピングアッセイおよび、放射性標識した薬物を用いた共有結合量測定などを段階的に実施することにより反応性代謝物による毒性を評価している (Nassar et al., 2004; Evans et al., 2004; Kalgutkar et al., 2005)。共有結合性試験やトラッピング試験などは、医薬品候補の優先順位付けという観点からは有用であるが、毒性予測という観点からはまだ不十分なものである。また、肝障害を惹起する薬物でCYPによる反応性代謝物が同定されているものも少なくはないが、反応性代謝物自身の肝障害性および免疫学的な肝障害性に関して確認されていない場合が多い。Vignati ら (2005) は、CYP3A4による代謝的活性化を評価する系として、HepG2細胞の細胞障害性を指標とした*in vitro*評価系を構築した。当研究室においても、バキュロウイルス発現系またはアデノウイルスを用いたCYP3A4による代謝的活性化を評価する試験系を構築してきた (Mizuno et al., 2009; Hosomi et al., 2010)。しかし、いずれも代謝的活性化を介した直接的な細胞障害性は評価可能であるが、免疫反応に関しては検討することは困難である。Cosgrove ら (2009) は、肝障害性薬物と炎症性因子 (外毒素であるLPS、炎症性サイトカインであるTNF α など) の同時暴露により、ヒトまたはラット初代培養肝細胞とヒト肝癌由来HepG2細胞を

用いて細胞毒性を評価している。この評価系では、肝障害性薬物と炎症性因子の相乗効果について検討することが可能であるが、肝障害性薬物が直接的に免疫担当細胞を活性化しているか否かを判別することはできない。

薬物や化合物による免疫反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒトの末梢血から単離した単核球やT細胞、B細胞などを用いることが多い。しかし、ヒト末梢血から調製する試料の使用では、ロット間の個体差や、コストの問題が生じるため、*in vitro* の大規模スクリーニングには適さない。近年、このような問題を回避した *in vitro* 評価系として、ヒト単球系細胞株の有用性が注目されている (Ashikaga et al., 2002; Hulette et al., 2002; Azam et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006)。ヒト単球系細胞株は、単球やマクロファージ、骨髄球などの免疫担当細胞における分化や活性化のメカニズム解明に頻用されている細胞株である。これまでに市場から撤退した薬物である抗凝固薬キシメラガトランまたは糖尿病治療薬トログリタゾンの暴露により、ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 細胞の炎症性サイトカインやケモカインの産生が増加することが報告され、炎症反応活性化が肝障害の副作用に関与することが示された (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009)。また、当研究室においても、駆虫薬メベンダゾールおよび抗真菌薬テルビナフィンの暴露により THP-1 細胞の炎症性サイトカインおよびケモカイン産生量が増加したことを報告した (Mizuno et al., 2011);

Mizuno et al., 2010)。しかし、これらの検討において代謝物の評価は検討しておらず、これまでに免疫学的な肝障害に関与する代謝的活性化を評価した報告はない。

本研究では、代謝的活性化を介した反応性代謝物による免疫活性化を評価することを目的とした。初めに、THP-1細胞の免疫因子の変動を指標とし、活性代謝物による代謝的活性化を評価可能な試験系を構築し、様々な肝障害性薬物におけるCYP3A4による代謝的活性化の評価を行った。

B. 研究方法

ヒト急性単球性白血病 THP-1 細胞の培養は 10%FBS を含む RPMI1640 を培養液として 10 cm プレートで培養した。継代時、細胞培養液をピペッティングにより懸濁し、50 mL ファルコンに回収し、3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培養液に懸濁し、10 cm プレートに播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

CYP3A4 による代謝的活性化の検討は、 1×10^6 cells/mL の THP-1 細胞、CYP3A4 発現系マイクロソーム (CYP3A4 として 15 nM) および 1 mM NADPH となるように調製した溶液に被験薬を加え、24 well plate に 1 mL ずつ播種し、培養した。被験薬としてアルベンダゾール、アルベンダゾールスルフォキシド、アミオダロン塩酸塩、デスエチルアミオダロン、デシプラミン塩酸塩、ジクロフェナク、ヒドララジン、レフルノミド、ネファゾドン塩酸塩、タクリン塩酸塩、タモキシフェンクエン酸

塩、テルピナフィン塩酸塩を用いた。なお、DMSO の最終濃度は 0.1% とした。また、対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。以上の条件にて培養後、細胞培養液をピペッティングにより懸濁し、1.5 mL チューブに移した。3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、-70°C で凍結保存した。

FACS による CD86 および CD54 発現量の定量および細胞生存率の測定については細胞を 0.1% BSA を含む 1 × PBS で 2 回洗浄した後、新しく用意した 1.5 mL チューブに FITC 標識モノクローナル抗体 (抗ヒト CD86 抗体 (clone: Fun-1)、抗ヒト CD54 抗体 (clone, 6.5B5) および FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識マウス IgG1 κ アイソタイプコントロール (clone, MOPC-21)) を加え、そこに洗浄した細胞を分注し、4°C、暗所において 30 分間インキュベーションを行い、細胞染色を行った。その後、0.1% BSA を含む 1 × PBS で 1 回洗浄した後、FACS flow に PI (propidium iodide) を 0.625 μ g/mL とした溶液に懸濁し、フローサイトメトリーを用いて分析を行った。なお、CD 発現量の解析の際には死細胞はゲートにより取り除き、計 10,000 個の生細胞を解析した。CD86 および CD54 発現の指標として用いた相対発現量は次の算出式により計算した。

(相対発現量の算出式)

相対発現量 (%) = 被験薬物処置細胞の MFI - 被験薬物処置細胞での Isotype

control の MFI / 溶媒処置細胞の MFI -
溶媒処置細胞での Isotype control の MFI

* MFI: Mean Fluorescence Intensity (平均蛍光強度)

ELISA による IL-8 および TNF α タンパク質の定量は、回収した細胞培養上清中の IL-8 および TNF α タンパク質濃度は Human IL-8 ELISA Ready-Set-Go!TM および Human TNF α ELISA Ready-Set-Go!TM のマニュアルに従って測定した。2 群間における統計学的評価は Student's *t*-test により、多群間における統計学的評価は ANOVA および Tukey または Dunnett 検定により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

C. 研究結果

C-1 肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

肝障害性薬物に対して、CYP3A4 による薬物の代謝的活性化が THP-1 細胞に及ぼす影響を CD54 および CD86 発現量を指標としてスクリーニングを行った。はじめに薬物処置による THP-1 細胞の細胞生存率に対する影響について検討した。検討した薬物名、処置濃度および細胞生存率を Table 1 に示した。薬物処置濃度はバキュロ CYP3A4 発現系またはアデノ CYP3A4 感染下においてヒト肝癌由来 HepG2 細胞に対して、代謝的活性化による細胞毒性を示すことが報告されている濃度を用いた。その結果、いずれの薬物処置濃度においても THP-1 細胞の細胞生

存率は 70%以上であり、細胞死により CD 発現量に影響を与えない濃度であった

(Table 1)。上記の処置濃度で CD 発現量の検討を行った結果、アミオダロン (AMD) およびデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD54 発現量の有意な増加が認められた (Fig. 1A)。アルベンダゾール処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD86 発現量の有意な増加が認められた (Fig. 1B)。一方、その他の薬物ではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群の間に CD 発現量の顕著な変動は認められなかった (Fig. 1)。

以上より、アルベンダゾール、アミオダロンおよびデスエチルアミオダロンは代謝的活性化により、THP-1 細胞を活性化することが考えられた。しかし、アルベンダゾールではその代謝物であるアルベンダゾールスルフォキシドにおいて CD 発現量の有意な増加が認められなかったこと (Fig. 1)、および代謝物が炎症性サイトカイン産生能を有しないことが報告されていることから (Mizuno et al., 2011)、検討を保留とした。AMD およびその代謝物である DEA において CD54 発現量に顕著な増加が認められたため、これらの薬物に着目して、より詳細な検討を行うこととした。

Table 1. Effect of drugs on cell viability in THP-1 cells.

Drug	Concentration (μM)	Cell viability (%)	
		CYP3A4 (-)	CYP3A4 (+)
0.1% DMSO	-	100.0 \pm 1.5	100.0 \pm 2.0
Albendazole	50	84.3 \pm 2.1	84.7 \pm 3.0
Albendazole sulfoxide	50	85.9 \pm 2.6	87.4 \pm 2.5
Amiodarone	30	90.4 \pm 1.5	71.7 \pm 7.6
Desethylamiodarone	20	91.6 \pm 2.3	87.8 \pm 1.4
Desipramine	30	92.6	94.3
Diclofenac	100	89.2	91.7
Hydralazine	100	80.2	82.4
Leflunomide	20	97.6	99.5
Nefazodone	10	96.4	100.8
Tacrine	100	100.1	99.9
Tamoxifen	20	88.1 \pm 5.5	88.5 \pm 5.1
Terbinafine	100	77.5 \pm 5.7	80.4 \pm 6.4

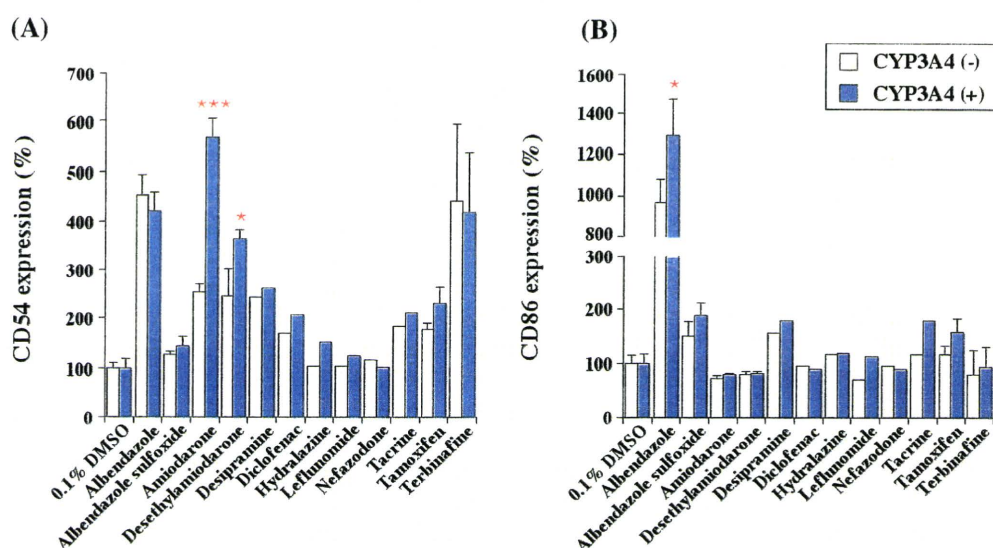


Fig. 1. Effect of drugs on CD54 and CD86 expression level in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with the albendazole, albendazole sulfoxide, amiodarone, desethylamiodarone, desipramine, diclofenac, hydralazine, nefazodone, tacrine, tamoxifen or terbinafine for 24 hrs. After the incubation, the expression of CD54 (A) and CD86 (B) was measured by flow cytometry and CD expression levels were calculated. CD expression levels are expressed as percentage of vehicle (0.1% DMSO) treated cells of each group. Data represent the mean (n = 2) or mean \pm SD (n = 3). * P < 0.05 and *** P < 0.001, compared with each CYP3A4 (-) group. Data represent the mean (n = 2) or mean \pm SD (n = 3).

C-2 AMDおよびDEA処置による細胞毒性

AMDおよびDEAの各濃度におけるTHP-1細胞に対する細胞毒性を明らかに

するため、各濃度における薬物処置12または24時間後におけるTHP-1細胞の細胞生存率を測定した。その結果図2に示すように、AMD処置12時間後において、

コントロールマイクロソームおよび CYP3A4 発現系いずれの処置群においても、薬物未処置群と比較して、10 μM 処

置から細胞生存率の有意な低下が認められ、濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。

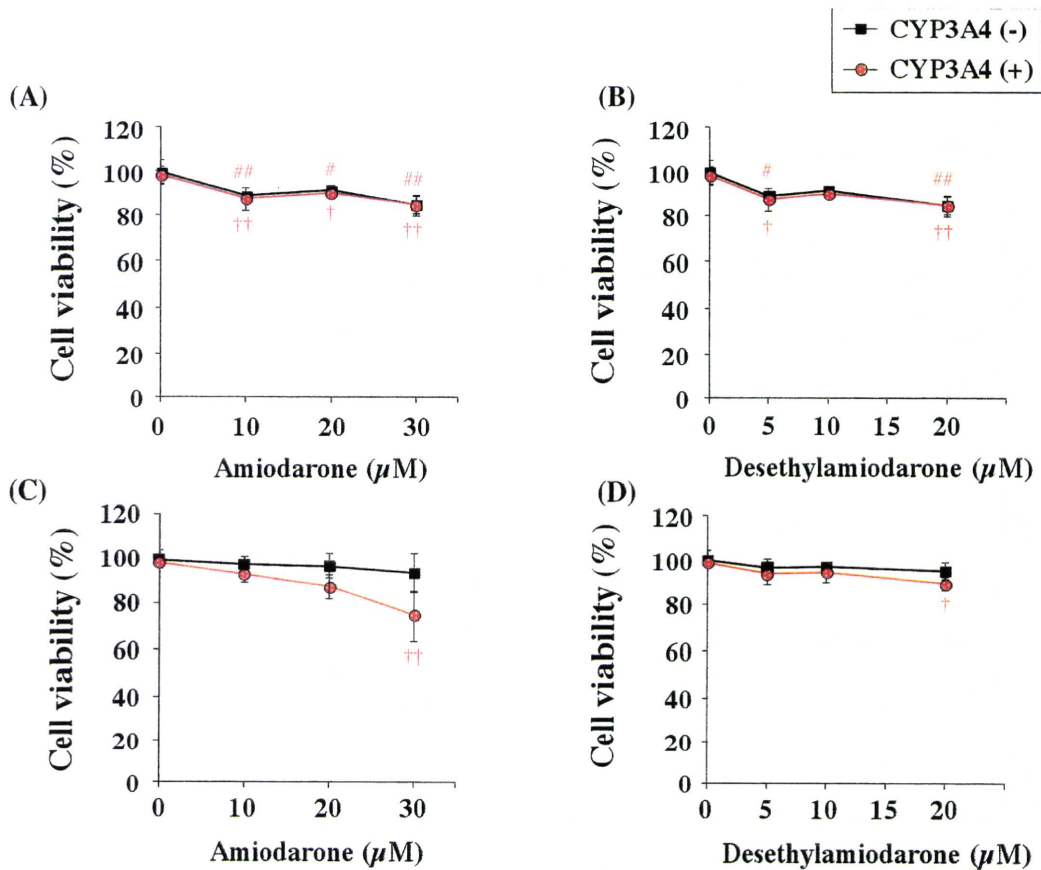


Fig. 2. Effects of CYP3A4 on cytotoxicity of amiodarone or desethylamiodarone in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of amiodarone (A, C) and desethylamiodarone (B, D) for 12 hrs (A, B) and 24 hrs (C, D). Cell viability in THP-1 cells was measured by PI assay as described in Material and Methods. Data represent the mean \pm SD ($n = 3$). # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (-) groups. † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (+) groups.

AMD 処置 12 時間後において、コントロールマイクロソームおよび CYP3A4 発現系いずれの処置群においても、薬物未処置群と比較して、10 μM 処置から細胞生存率の有意な低下が認められ、濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた (Fig. 2A)。コントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系処置群において AMD 処置において、CYP3A4 発現系処置

による有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2A)。AMD 処置 24 時間後において、コントロールマイクロソーム処置群では、いずれの濃度においても溶媒処置と比較して細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2C)。CYP3A4 発現系処置群においては、溶媒処置と比較して、30 μM 処置において細胞生存率の有意な低下が認められた (Fig. 2C)。AMD 処

置において、CYP3A4 発現系処置による有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2C)。DEA 処置 12 時間後において、コントロールマイクロソームおよび CYP3A4 発現系いずれの処置群においても、各処置群の溶媒処置と比較して、5 μM 処置から細胞生存率の有意な低下が認められ、10 μM 処置では有意ではないが低下傾向を示し、20 μM 処置では細胞生存率の低下が認められた (Fig. 2B)。DEA 処置において、CYP3A4 発現系処置による有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2B)。DEA 処置 24 時間後において、コントロールマイクロソーム処置群では、いずれの濃度においても溶媒処置と比較して細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2D)。CYP3A4 発現系処置群においては、溶媒処置と比較して、20 μM 処置において細胞生存率の有意な低下が認められた (Fig. 2D)。DEA 処置において、CYP3A4 発現系処置による有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2D)。CYP3A4 発現系処置群による有意な細胞生存率の変化は認められなかった。

C-3 AMD および DEA 処置濃度依存的な CD54 発現量の変化

AMD および DEA 処置濃度依存的な CD54 発現量の変化を検討した。12 および 24 時間後において、溶媒処置と比較して AMD および DEA 処置による有意な CD54 発現量の増加が認められた (Fig. 3)。12 時間後において、AMD および DEA 処置による CD54 発現量は CYP3A4 発現系

処置群により有意な変化は認められなかった (Fig. 3A)。AMD および DEA 処置による CD54 発現量は CYP3A4 発現系処置群により濃度依存的な増加が認められた (Fig. 3B)。また、今回の結果より THP-1 細胞における CD 発現量は他の薬物による検討でも 24 時間で最大となる (Sakaguchi et al., 2006) ことを支持する結果となった。

C-4 AMD 処置時間依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化

AMD 処置時間による炎症性サイトカイン産生量の変化を検討するため、2-8 の方法に従い検討を行った。その結果、IL-8 および TNF α の mRNA 発現量は AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 6 時間後から 24 時間後まで有意に増加し、12 時間後において最も高値を示した (Figs. 4A and B)。また、IL-8 タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において時間依存的に増加が認められ、24 時間後において最も高値を示した (Fig. 4C)。TNF α タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 6 時間から 12 時間後まで認められ、12 時間後において最も高値を示した (Fig. 4D)。以上のことから、AMD 処置による CYP3A4 の代謝的活性化により CD54 発現量だけでなく、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生量も増加することが示された。

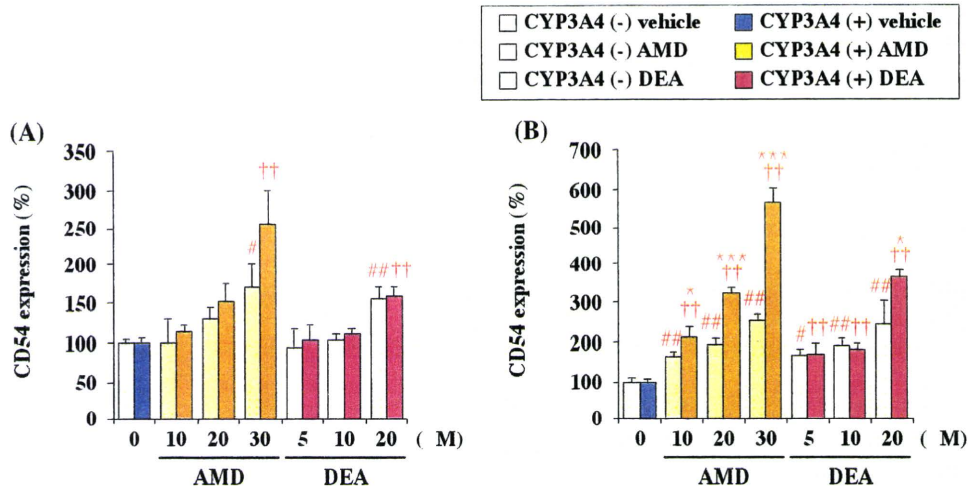


Fig. 3. Dose-dependent changes in CD54 expression level by amiodarone or desethylamiodarone for 12 (A) or 24 (B) hrs-incubation in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with the indicated concentration of amiodarone and desethylamiodarone for 24 hrs. CD expression level is expressed as percentage of vehicle (0.1% DMSO) treated cells of each group. Data represent the mean \pm SD (n = 3). #*P* < 0.05 and ##*P* < 0.01, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (-) groups. ###*P* < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (+) groups. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01, compared with CYP3A4 (-) groups of each concentration point.

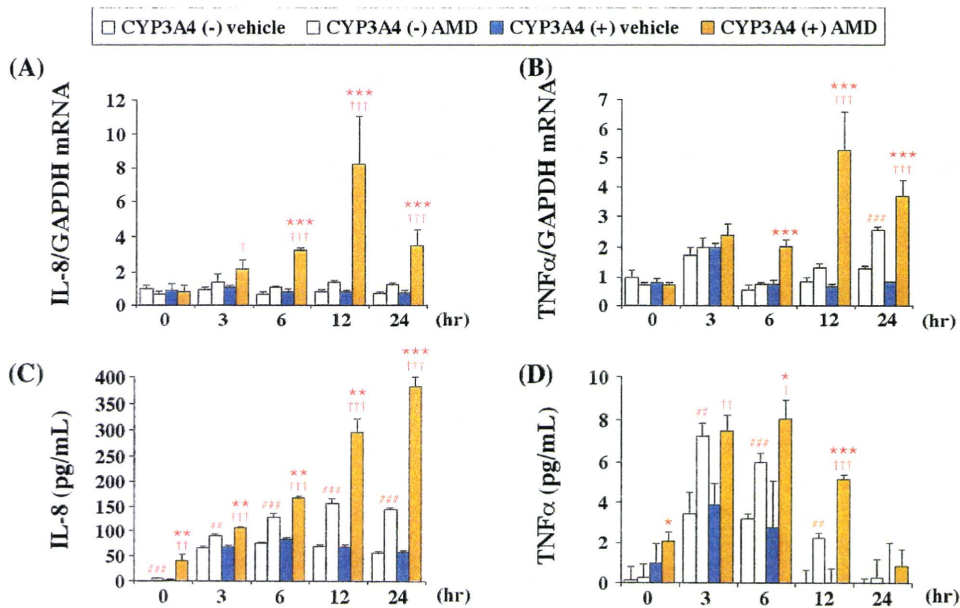


Fig. 4. Time-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF α by 30 μ M amiodarone in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with 30 μ M amiodarone for various time points. The mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF α (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. The release of IL-8 (C) and TNF α (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean \pm SD (n = 3). ##*P* < 0.01 and ###*P* < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (-) groups. †*P* < 0.05, ††*P* < 0.01 and †††*P* < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (+) groups. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001, compared with CYP3A4 (-) groups in each time point.