

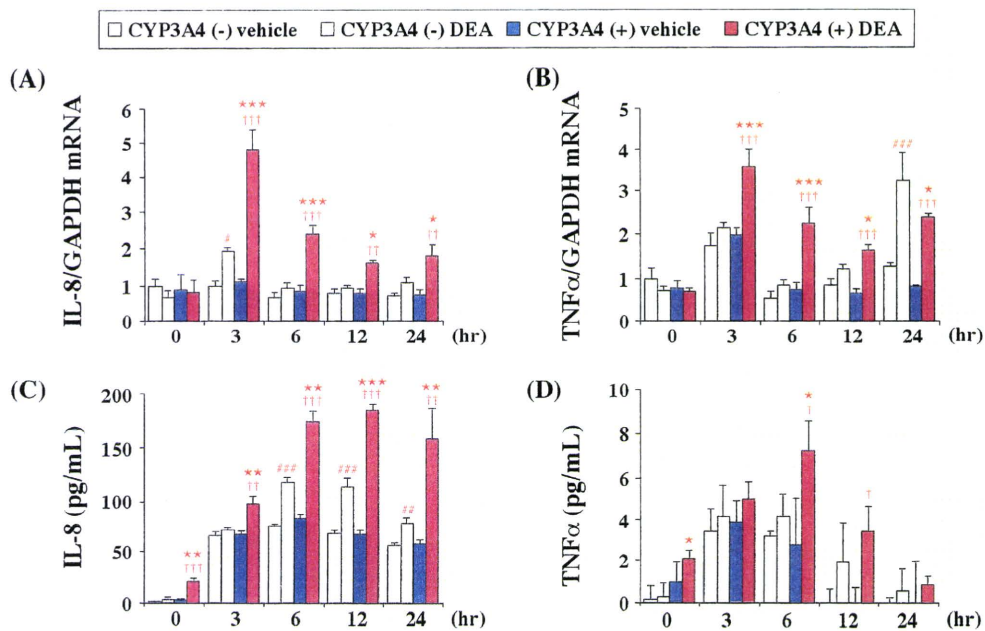
### C-5 DEA 処置時間依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化

DEA 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した。その結果、IL-8 mRNA 発現量は DEA 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 3 時間後から 24 時間後まで有意に増加し、3 時間後において最も高値を示した (Fig. 5A)。TNF $\alpha$  の mRNA 発現量は DEA 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 3 時間後から 12 時間後まで有意に増加し、3 時間後において最も高値を示し、24 時間後では有意な減少が認められた (Fig. 5B)。また、IL-8 タンパク質産生量は、DEA 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な増加が認められ、24 時間後において最も高値を示した (Fig. 5C)。TNF $\alpha$  タンパク質産生量は、DEA 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 時間後において有意に増加が認められた (Fig. 5D)。AMD と同様に DEA 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産生量も増加することが示された。また、AMD 処置での mRNA 発現量のピーク時間は 12 時間であったが (Figs. 4A and B)、代謝物である DEA 処置ではピーク

ク時間は 3 時間であった (Figs. 5A and B)。従って、AMD 処置による炎症性サイトカインの増加は代謝物である DEA 処置による代謝的活性化の寄与が大きいと考えられた。

### C-6 AMD 処置濃度依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化

AMD 処置濃度依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化を検討するため、10~30  $\mu$ M の AMD を THP-1 細胞に処置し、12 時間後の炎症性サイトカイン mRNA 発現量およびタンパク質産生量を定量した。AMD 処置により IL-8 および TNF $\alpha$  産生は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、濃度依存的な増加が認められた (Figs. 6C and D)。20  $\mu$ M の AMD 処置により IL-8 mRNA 発現量およびタンパク質産生量の有意な増加が認められた (Figs. 6A and C)。また、20  $\mu$ M の AMD 処置により TNF $\alpha$  mRNA 発現量は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有意に増加したが (Fig. 6B)、TNF $\alpha$  タンパク質産生量の有意な増加には 30  $\mu$ M ではじめて認められた (Fig. 6D)。



**Fig. 5. Time-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF $\alpha$  by 20  $\mu$ M desethylamidarone in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with 20  $\mu$ M desethylamidarone for various time points. The mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF $\alpha$  (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. The release of IL-8 (C) and TNF $\alpha$  (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01 and <sup>###</sup>*P* < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (-) groups. <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 and <sup>\*\*\*</sup>*P* < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (+) groups. <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 and <sup>\*\*\*</sup>*P* < 0.001, compared with CYP3A4 (-) groups in each time point.

### C-7 DEA 処置による炎症性サイトカイン産生の濃度依存的変化

DEA 処置濃度依存的な炎症性サイトカイン産生の変化を検討した。DEA 処置により IL-8 産生はコントロールミクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において、濃度依存的な増加が認められた (Fig. 7)。20  $\mu$ M の DEA 処置により IL-8 mRNA 発現量およびタンパク質産生量の有意な増加が認められた (Figs. 7A and C)。また、DEA 処置により TNF $\alpha$  産生はコントロールミクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において、濃度依存的な増加が認められなかった (Fig. 7D)。この原因として、経時的な変化

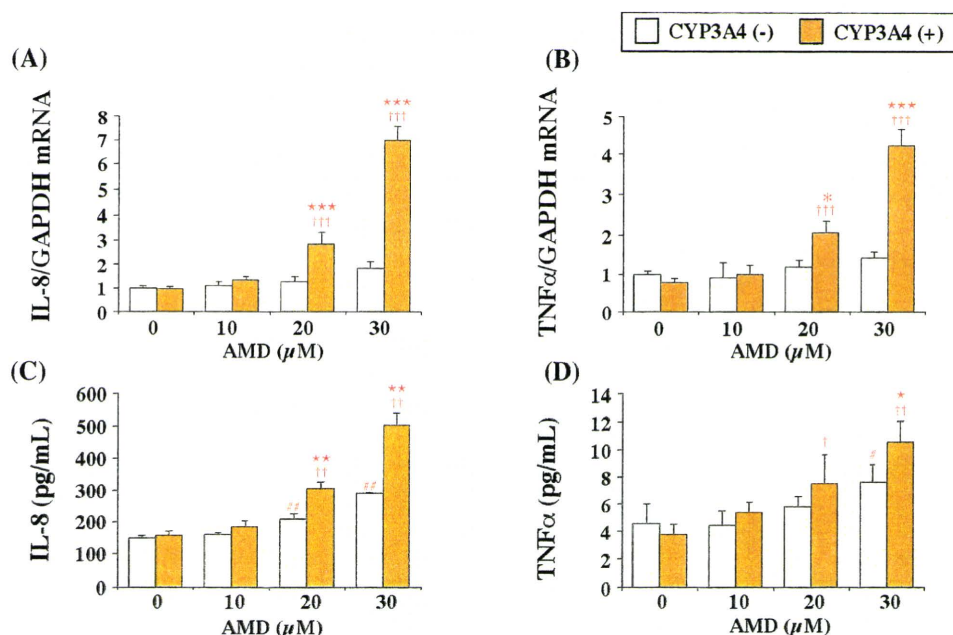
では mRNA 発現量は 3 時間、タンパク質産生量は 6 時間がピーク時間であったため (Fig. 5B and D)、今回測定した 12 時間では差が認められなくなったことが考えられた。

### C-8 HPLC による AMD、DEA および DiDEA の定量

薬物処置した CYP3A4 発現系処置により代謝物の生成量について検討した。AMD、DEA および DiDEA の生成量を HPLC を用いて 2-9 の方法に従い定量した。AMD および DEA 処置後 0、12、24 時間後の AMD、DEA および DiDEA 濃度を測定した。その結果、CYP3A4 発現系ミク

ロソーム処置群でのAMD処置12時間後、DEAは7.4  $\mu\text{M}$  生成し、DiDEAは検出されなかった (Table 3)。また、AMD濃度は処置時間依存的に減少した (Table 3)。また、CYP3A4発現系マイクロソーム処置群でのAMD処置24時間後、DEAは11.7  $\mu\text{M}$ 、DiDEAは0.4  $\mu\text{M}$  生成した (Table 3)。CYP3A4発現系マイクロソーム処置群での

DEA処置12時間後、DiDEAは0.3  $\mu\text{M}$  生成した (Table 4)。CYP3A4発現系マイクロソーム処置群でのDEA処置24時間後、DiDEAは0.5  $\mu\text{M}$  生成した (Table 4)。一方、コントロールマイクロソーム処置群においては、いずれの条件においても代謝物は検出されなかった (Tables 3 and 4)。

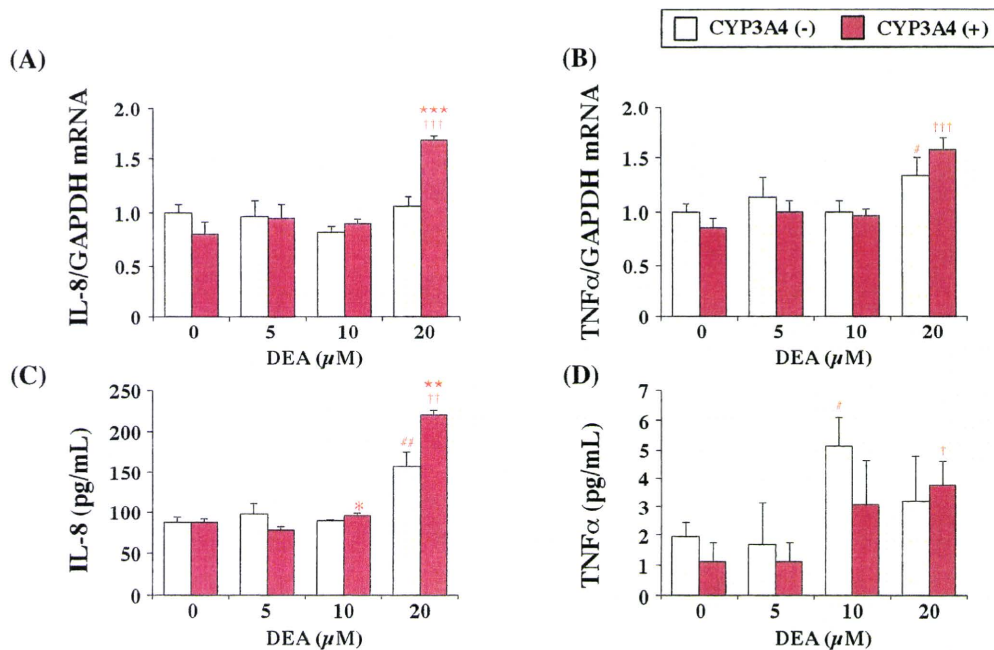


**Fig. 6. Dose-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF $\alpha$  by amiodarone 12 hrs-incubation in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of amiodarone. After incubation for 12 hrs, the mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF $\alpha$  (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. After incubation for 12 hrs, the release of IL-8 (C) and TNF $\alpha$  (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3).  $^{***}P < 0.01$ , compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (-) groups.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  and  $^{***}P < 0.001$ , compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (+) groups.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  and  $^{***}P < 0.001$ , compared with CYP3A4 (-) groups of each concentration point.

#### D. 考察

近年、免疫学的な薬物性肝障害が注目されており、その発症原因の一つとして薬物の代謝的活性化による反応性代謝物の生成が関与するといわれている (Holt et al., 2006; Lohse et al., 2010; Adams et al.,

2010)。本研究では、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞と CYP3A4 発現系マイクロソームを用いて、代謝的活性化を考慮した肝障害性薬物に対する免疫の関与について評価可能な *in vitro* の系を構築した。



**Fig. 7. Dose-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF $\alpha$  by desethylamiodarone 12 hrs-incubation in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of amiodarone. After incubation for 12 hrs, the mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF $\alpha$  (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. After incubation for 12 hrs, the release of IL-8 (C) and TNF $\alpha$  (D) in supernatant was measured by ELISA. 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, ††*P* < 0.01 and †††*P* < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (+) groups. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001, compared with CYP3A4 (-) groups of each concentration point.

**Table 3. Metabolism of amiodarone by CYP3A4 in vitro.**

(hr)	CYP3A4 (-)			CYP3A4 (+)		
	AMD ( $\mu$ M)	DEA ( $\mu$ M)	DiDEA ( $\mu$ M)	AMD ( $\mu$ M)	DEA ( $\mu$ M)	DiDEA ( $\mu$ M)
0	33.4 $\pm$ 8.0	ND	ND	24.2 $\pm$ 4.8	2.8 $\pm$ 0.7	ND
12	27.6 $\pm$ 2.1	ND	ND	18.3 $\pm$ 6.7	7.4 $\pm$ 3.8	ND
24	28.6 $\pm$ 2.6	ND	ND	17.1 $\pm$ 4.7	11.7 $\pm$ 4.5	0.4 $\pm$ 0.1

Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). ND: not detectable.

**Table 4. Metabolism of desethylamiodarone by CYP3A4 in vitro.**

(hr)	CYP3A4 (-)			CYP3A4 (+)		
	AMD ( $\mu$ M)	DEA ( $\mu$ M)	DiDEA ( $\mu$ M)	AMD ( $\mu$ M)	DEA ( $\mu$ M)	DiDEA ( $\mu$ M)
0	ND	16.0 $\pm$ 1.4	ND	ND	16.3 $\pm$ 3.4	0.3 $\pm$ 0.2
12	ND	19.4 $\pm$ 3.1	ND	ND	15.3 $\pm$ 5.0	0.3 $\pm$ 0.0
24	ND	19.2 $\pm$ 6.5	ND	ND	19.2 $\pm$ 6.2	0.5 $\pm$ 0.3

Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). ND: not detectable.

THP-1 細胞は皮膚感作性試験において、モルモットなどの動物を使用しない試験の *in vitro* 代替法として現在最も注目されており (Ashikaga et al., 2002)、肝障害を惹起する報告のあるキシメラガトラン、トログリタゾン、メベンダゾールおよびテルビナフィンによる炎症反応を評価している (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009; Mizuno et al., 2011; Mizuno et al., 2010)。はじめに CYP3A4 により代謝的活性化を受けることが知られている肝障害性薬物において、THP-1 細胞の 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。

CD54 は接着分子として、特に抗原提示細胞と T 細胞と細胞間相互作用時に働く。CD54 は別名 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) として知られ、T 細胞上の共刺激分子 lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) と結合し、T 細胞を活性化させる。また、ICAM-1 は細胞表面受容体としての機能を持ち、細胞内シグナル伝達の開始にも関与する (Lebedeva et al., 2005)。CD86 は補助刺激分子として、主にマクロファージまたは樹状細胞に発現し、第一シグナルとしての T 細胞への抗原提示の際に、第二シグナルとして T 細胞の活性化、活性化状態の維持に重要な役割を持つ (Greenwald et al., 2005)。また、THP-1 細胞上の CD54 および CD86 発現量は THP-1 細胞活性化の指標として、最も汎用されている (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2007)。THP-1 細胞はマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞 (Yoshida et al., 2003) も存在するが、分化

後よりも未分化の方が CD 発現量などの活性化マーカーは高感度であることが知られているため (An et al., 2009; Ashikaga et al., 2002)、今回の検討では未分化の THP-1 細胞を用いることとした。

また、詳細な実験条件として、Ashikaga ら (2006) の報告を参考にし、THP-1 細胞の前培養時間を 48 時間、細胞処置濃度  $1 \times 10^6$  cells/mL および薬物処置時間は 24 時間とした。THP-1 細胞では CD54 および CD86 発現量は化合物処置後 24 時間においてプラトーとなることが報告されている。CYP3A4 濃度は今回の検討に用いた処置濃度である 15 nM まで CD 発現量に濃度依存性が認められ (data not shown)、これまでの当研究室での検討結果により、24 時間において薬物が十分代謝されると考えられる濃度において検討を行った。

今回の検討において、肝障害を惹起する報告があり、CYP3A4 により代謝的活性化を受けることが知られているアルベンダゾール、AMD、デシプラミン、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、タクリン、タモキシフェンおよびテルビナフィンの 10 種の薬物と、アルベンダゾールスルフォキシドおよび DEA の 2 つの代謝物による CD54 および CD86 の発現量を検討した。各薬物濃度は臨床での最高血中濃度の 30 倍を超えない濃度を用いた。また、THP-1 細胞の細胞生存率は CD 発現量に死細胞の影響が認められない条件において行った (Table 1)。

CD54 発現量は AMD および DEA 処置群において、CYP3A4 処置群において、

有意に増加が認められ、CD86 発現量はアルベンダゾール処置により、CYP3A4 処置群において、有意に増加が認められた (Figs. 1A and B)。よって、アルベンダゾールおよび AMD に関して CYP3A4 による代謝的活性化を介し、THP-1 細胞の活性化が引き起こされることが示唆された。しかし、アルベンダゾールの反応性代謝物であるアルベンダゾールスルフォキシド処置では、CD86 発現量の有意な増加が認められなかった (Fig. 1B)。この結果は、アルベンダゾールスルフォキシドには THP-1 細胞からの炎症性サイトカインおよびケモカイン産生能を有しない報告 (Mizuno et al., 2011) と一致した。また、アルベンダゾールおよびアルベンダゾールスルフォキシド処置による CYP3A4 存在下での炎症性サイトカイン産生を測定した結果、増加傾向を示したが、軽微であった (data not shown)。また、アルベンダゾール処置では CYP3A4 存在下において CD86 発現量の増加は認められたが、CD54 発現量は CYP3A4 による変化は認められなかった (Figs. 1A and B)。一方、AMD および DEA 処置による CYP3A4 処置群において CD54 発現量の増加が認められたが、CD86 発現量は AMD および DEA 処置により変化は認められなかった。これらの原因として、THP-1 細胞の CD54 および CD86 の発現には細胞内シグナル伝達経路である MAPK が関与していることが報告されており (Miyazawa et al., 2008)、また、MAPK 同士はクロストークすることも報告されているため (Trompezinski et al., 2008)、これらの報告

が今回の各薬物による CD 発現量の反応性に差異が認められたことを説明できるかもしれない。なお、今回検討を行ったその他の薬物に関しては、これまでに CYP3A4 により代謝的活性化を受けることが報告されているが、本試験系においては陰性であった。その原因として、例えば、アルベンダゾールおよびテルビナフィンなどのように代謝物よりも親化合物が強い免疫活性化作用をもつために CYP3A4 による変化が小さいこと、ジクロフェナクおよびレフルノミドなどのように代謝的活性化に CYP3A4 関与することが知られているが、それぞれにおいて主として CYP2C9 および CYP1A2 が関与すること、また、代謝的活性化により肝細胞に対し直接的な細胞障害性を示すが、免疫への関与は小さいことなどが考えられた。また、代謝的活性化に複数の酵素を介する薬物は本試験系のような単一酵素の実験系では評価できなかった可能性もある。しかし、アルベンダゾールおよびテルビナフィンなど親化合物が免疫細胞活性化作用を持つものでは CD 発現量が高く、これまでの報告のように親化合物による免疫細胞の活性化を評価することも可能であった。また、HLM や S9 のような複数の酵素存在下ではどの酵素が関与しているかを評価出来ないが、単一酵素存在下ではどの酵素が代謝的活性化に重要であるかを評価することが可能である。したがって、本試験系ではこのように単一酵素存在下における代謝的活性化による免疫への関与を、親化合物と同様に代謝物も考慮した評価が可能である

という特長を持つと考えられる。本試験系により、AMD および DEA 処置により、CYP3A4 処置による CD54 発現量の増加が認められ、親化合物および代謝物のいずれもが CYP3A4 により代謝的活性化を受け、THP-1 細胞を活性化させることを初めて明らかとした。したがって、AMD およびその代謝物に関してより詳細な検討を行うこととした。

AMD は Vaughan Williams の分類で主にクラス III 群に属する作用を有し、心室細動や心室性頻拍などに用いられるヨウ化ベンゾフラン誘導体の抗不整脈薬である (Gill et al., 1992)。しかし、AMD 服用による副作用発現頻度は高く、重篤な副作用として間質性肺炎、甲状腺機能障害および肝障害などが発現することも報告されているため、治療上の使用は限定されている。さらに、非常に大きな分布容積と、それに応じた 40 - 50 日の消失半減期を有

し (Kannan et al., 1982; Stäubli et al., 1983)、脂肪組織、肝臓および肺に高濃度に蓄積する。AMD の血漿蛋白結合率は 96% であり、脂溶性が高いため、長期投与により広く体内に分布し、蓄積することが知られている (Lalloz et al., 1984)。

AMD の代謝に関しては、HLM を用いた *in vitro* の検討において DEA を生じることが報告され (Trivier et al., 1993)、ヒトにおいて DEA への代謝は主に肝臓中に存在する CYP3A4 および CYP2C8 が担うことが明らかにされた (Fabre et al., 1993; Ohyama et al., 2000a)。また、DEA は薬理的に AMD と同等の抗不整脈作用を有し (Pallandi and Campbell, 1987)、DEA の血中および組織中濃度は AMD よりも高い (Brien et al., 1987)。また、DEA は CYP3A4 によりさらに代謝を受け、DiDEA を生成することも報告されている (Zhano et al., 2010)。

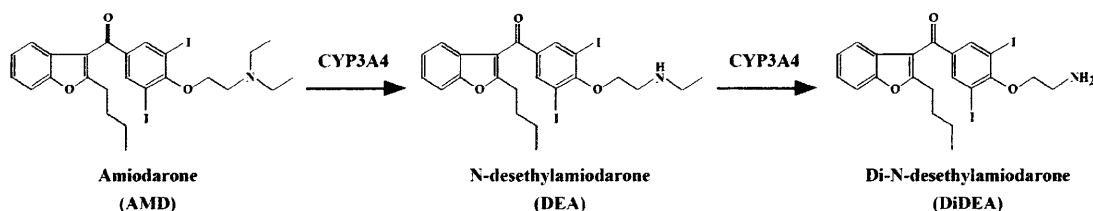


Fig. 8. Metabolisms of amiodarone by CYP3A4.

AMD による肝障害では、免疫学的な小葉中心壊死 (Lupon-Rosés et al., 1986; Breuer et al., 1998; Simon et al., 1990)、門脈域の炎症 (Lewis et al., 1990)、好中球の浸潤 (Atiq et al., 2009)、非アルコール性脂肪肝炎 (Singhal et al., 2003)、マロリー小体を伴う慢性肝障害 (Kang et al., 2007) および肝硬変 (Puli et al., 2005) などさまざ

まな病態を示す。AMD による肝障害の詳細な機序は不明であるが、AMD およびその代謝物である DEA および DiDEA の組織内蓄積によるミトコンドリア機能障害のため、毒性が発現することが示唆されている (Waldhauser et al., 2006; Bolt et al., 2001)。また、CYP3A4 の誘導により AMD がヒトヘパトサイトに及ぼす細胞障害性

が増強したことが示され、AMDの細胞毒性にCYP3A4がリスクファクターとなることが示唆されている (Zhano et al., 2010)。以上のように、AMDによる肝障害において、肝細胞に対する直接的な細胞障害性に関しては様々な研究がなされているが、AMDおよびその代謝物について代謝的活性化を介した免疫学的因子と肝障害との関連性を示した報告はない。

初めに、アミオダロンの肝障害に対する免疫学的因子の関与を明らかにするため、AMDおよびDEA処置による細胞生存率を測定した (Fig. 2)。12および24時間後においてAMDおよびDEA処置により薬物未処置と比較して、若干の有意な細胞生存率の低下が認められたが、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、有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2)。また、12時間後において認められたAMDおよびDEA処置による細胞生存率の低下は、24時間後には認められなかった。この原因として、THP-1細胞のdoubling timeが $3 \times 10^5$  cells/mLで播種後の継代時には24-48時間であるため、今回の処置条件においても24時間では薬物処置により障害を受けても、障害の程度が軽度であれば若干の細胞増殖が行われ、24時間後では細胞生存率の回復が認められたと考えられた。

次に、表面抗原分子としてCD54発現量、炎症性サイトカインとしてTNF $\alpha$ およびケモカインとしてIL-8の産生量を炎症反応の指標として検討を行った。

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などの外毒素の暴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 vivo*におけるIL-8の内皮投与は、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、肝障害の発症に関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., 2009a)。

TNF $\alpha$ 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 $\alpha$ 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、線維芽細胞、神経細胞などによっても産生される (Wajant et al., 2003)。TNF $\alpha$ の産生は肝臓における炎症の初期段階の一つであり、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 $\alpha$ 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)。げっ歯類を用いた*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 $\alpha$  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., 2009b; Tukov et al., 2007; Zou et al., 2009)。

本研究では、AMD および DEA の CYP3A4 による代謝的活性化により、細胞生存率の有意な変化は認められないが (Fig. 2)、THP-1 細胞の CD54 発現量および IL-8、TNF $\alpha$  のタンパク質産生量は増加した (Figs.3-7)。特に、CD54 発現量および IL-8 産生量は顕著な増加が認められた。このことは、CD54 と IL-8 は DCs および THP-1 細胞の活性化の指標として有用であるという報告 (Mitjans et al., 2008; Nukada et al., 2008; Sakaguchi et al., 2007) を支持する結果となった。AMD および DEA 処置による経時的な IL-8 の mRNA 発現量およびタンパク質産生量に関して相関は認められているが (Fig. 3 and 4)、溶媒処置群において mRNA 発現量では各時間において変化は認められなかったが、タンパク質産生量では 0-3 時間後において増加が認められた。この原因として、溶媒処置群においてはおそらく処置後 1 時間において mRNA 発現量の増加は認められ、mRNA 発現量の増加は 3 時間後では回復したが、タンパク質は培養液中に安定に存在するため、mRNA とタンパク質産生量との間で、相関が認められないような部分も生じたと考えられた。このため、3 時間よりもっと早い 1 時間などのデータも測定すればより明らかになると考えられる。これらのことが AMD 処置による経時的な TNF $\alpha$  の mRNA 発現量およびタンパク質産生量について、mRNA

発現量よりもタンパク質産生量のピーク時間が早いという (Fig. 4)、mRNA とタンパク質との相関が認められない結果を説明するかもしれない。

今回の検討では、AMD 濃度 20  $\mu$ M および DEA 濃度 10  $\mu$ M から炎症性サイトカイン産生量の有意な増加が認められた (Figs. 6 and 7)。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暴露量との関連性を考慮する必要がある。AMD を服用していた患者の部検試料における血漿中 AMD 濃度は 0.9-3.6  $\mu$ M、DEA 濃度は 0.6-5.7  $\mu$ M であり、肝臓中 AMD 濃度は 7.1-1379.2  $\mu$ M、DEA 濃度は 15.4-10530.2  $\mu$ M であると報告されている (Berger and Harris, 1986)。このように、肝臓における AMD と DEA の濃度は血漿より 2 桁から 3 桁ほど高く、非常に高い蓄積性を示している (Berger and Harris, 1986)。しかし、ヒト肝臓におけるアミオダロ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* へ外挿することは出来ない。アミオダロンが *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。

また、DEA はさらに脱エチル化し DiDEA を生成することが明らかとなり (Kozlik, 2003)、ヒトにおける DiDEA 血中濃度は約 0.057  $\mu$ M と、アミオダロンの 30 分の 1 以下であった (Ha et al., 2005)。このことは、今回の検討による、DiDEA 生成量が AMD の約 1%程度であったこと (Table 3) と一致した結果となった。

DiDEA の生成量が、AMD および DEA の存在量と比較して少ない理由として、DEA は CYP3A4 酵素活性を強く阻害すること (Ohya et al., 2000b)、つまり AMD の代謝により MBI が生じることが報告されているため、DiDEA への代謝が DEA により阻害されていることが考えられた。したがって、今回の検討より CYP3A4 存在下での AMD および DEA 処置による CD54 発現量および炎症性サイトカイン産生量の増加が DiDEA によることが考えられるが、上述のように生成量は微量であり、DiDEA のヒト組織中濃度はこれまでに報告されていないが、イヌにおいて心筋細胞には DiDEA の血中濃度の 80 から 190 倍以上もの高濃度に存在することが知られている (Latini et al., 1984)。このため、この代謝物が与える免疫因子への影響にはより詳細な検討が必要であると考えられる。

以上より、アミオダロ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が示されたと考えられる。また、CYP3A4 は臨床で使用されている薬物によって誘導される分子種でもあり、また酵素活性には個体差が認められている。従って、高用量で長期間服用する可能性がある AMD については、CYP3A4 による代謝的活性化が肝障害の原因として重要かもしれない。

アミオダロン以外の肝障害性薬物に関しては、重篤な肝障害を引き起こす可能性があるとして、市場から撤退した薬物であるキシメラガトランまたはトログリタゾンの暴露により、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アミオダロンの場合と異なるため、薬物ごとに THP-1 細胞活性化の機序が異なるのかもしれない。以上の結果より、THP-1 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。

今回の検討では、いくつかの免疫関連因子の活性化は認められたが、実際に薬物および反応性代謝物がタンパク質および細胞構成成分などと結合しているかを同定・評価できていない。そのため、CYP3A4 による THP-1 細胞の活性化が、AMD および DEA の代謝的活性化による生じる DiDEA の細胞構成成分との共有結合によるものか、AMD および DEA が細胞外に添加したタンパク質である CYP3A4 とのアダクト形成により免疫原性を生じたことによるものかは不明である。Chipinda ら (2010) は THP-1 細胞と酵素誘導処理したラット肝 S9 とを共培養し、感作物質のハプテン化を評価している。この報告では、ハプテン化は細胞表面および細胞内タンパク質に対して生じると考えられている。また、Megherbi ら (2009) の報告では、THP-1 細胞に dinitrophenyl (DNP) 構造類似体を培養した結果、MAPK などの細胞内シグナル伝達経路のリン酸化と DNP 抗体で検出した細胞構成成分である活性システイン残基とのアダクト生成量との相関が認められている。

本試験系においても、製薬企業が行っているようなタンパク質への共有結合量を指標としたアダクト生成量を評価しなくても、薬物の代謝的活性化による免疫関連因子への関与を評価することが可能であった。

#### E. 結論

今日、医薬品開発の初期において薬物の毒性を高感度に予測・評価することが重要であり、特に、代謝物の安全性を評価する試験系の開発が求められている。本試験系は、代謝物が安定に存在しないため合成出来ない場合や、未同定代謝物を含めた代謝物を総合的に評価可能であるため、代謝的活性化による免疫反応の関与および代謝物の安全性を評価する試験系として有用であると考えられる。以上より、*in vitro* において薬物および代謝物を考慮した安全性を評価し、免疫学的機序による肝障害を予測・評価する際の有用な手段となることが期待される。

#### <参考論文>

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

Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3031-3038.

Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, and Moldéus P (1985) Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* **28**: 306-311.

An S, Kim S, Huh Y, Lee TR, Kim HK, Park KL, and Eun HC (2009) Expression of surface markers on the human monocytic leukaemia cell line, THP-1, as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Contact Dermatitis* **60**:

185-192.

Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, and Aiba S (2002) Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol. In Vitro* **16**: 711-716.

Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, and Toyoda H (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro.* **20**: 767-773.

Atiq M, Davis JC, Lamps LW, Beland SS, and Rose JE (2009) Amiodarone induced liver cirrhosis. Report of two cases. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **18**: 233-235.

Azam P, Peiffer JL, Chamousset D, Tissier MH, Bonnet PA, Vian L, Fabre I, and Ourlin JC (2006) The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**: 14-23.

Baggiolini M, Dewald B, and Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**: 97-179.

Berger Y and Harris L (1986) Pharmacokinetics, in *AMIODARONE Pharmacology, Pharmacokinetics, Toxicology, and Clinical effects*, (Harris L and Roncucci R eds) pp45-98, Medecine et Science Internationales, Paris

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.

Bolt MW, Card JW, Racz WJ, Brien JF, and Massey TE (2001) Disruption of mitochondrial function and cellular ATP levels by amiodarone and N-desethylamiodarone in initiation of amiodarone-induced pulmonary cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**: 1280-1289.

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.

Breuer HW, Bossek W, Haferland C, Schmidt M, Neumann H, and Gruszka J (1998) Amiodarone-induced severe hepatitis mediated by immunological mechanisms. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **36**: 350-352.

Brien JF, Jimmo S, Brennan FJ, Ford SE, and Armstrong PW (1987) Distribution of amiodarone and its metabolite, desethylamiodarone, in human tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**: 360-364.

- Chipinda I, Ruwona TB, Templeton SP, and Siegel PD (2010) Use of the human monocytic leukemia THP-1 cell line and co-incubation with microsomes to identify and differentiate hapten and prohapten sensitizers. *Toxicology* **280**: 135-143.
- 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.
- 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.
- 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-Palmeritz 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.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, and Katz SI (1993) An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 $\beta$  in the initiation of primary immune responses in skin. *J. Immunol.* **150**: 3698-3704.
- Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA, and Baillie TA (2004) Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem. Res. Toxicol.* **17**: 3-16.
- Fabre G, Julian B, Joyeux H, and Berger Y (1993) Evidence for CYP3A4-mediated N-deethylation of amiodarone in human liver microsomal fraction. *Drug Metab. Dispos.* **21**: 978-985.
- 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.
- 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.
- Gill J, Heel RC, and Fitton A (1992) Amiodarone: An overview of its pharmacological properties, and review of its therapeutic use in cardiac arrhythmias. *Drug* **43**:69-110.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, and Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 515-548.
- Guengerich FP (1995) Human cytochrome P-450 enzymes, in Cytochrome P-450 (PR Ortiz de Montellano ed) pp. 473-535, New York Plenum, New York.
- Guengerich FP and McDonald JS (2007) Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem. Res. Toxicol.* **20**: 344-369.
- Guengerich FP (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**: 70-83.
- Ha HR, Bigler L, Wendt B, Maggiorini M, and Follath F (2005) Identification and quantitation of novel metabolites of amiodarone in plasma of treated patients. *Eur. J. Pharm. Sci.* **24**: 271-279.
- Hinson JA, Pumford NR, and Roberts DW (1995) Mechanisms of acetaminophen toxicity: Immunochemical detection of drug-protein adducts. *Drug Metab. Rev.* **27**: 72-92.
- Hoffmann KJ, Streeter AJ, Axworthy DB, and Baillie TA (1985) Identification of the major covalent adduct formed in vitro and in vivo between acetaminophen and mouse liver protein. *Mol. Pharmacol.* **27**: 566-573.
- Holt MP and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* **8**: E48-54
- Hongslo JK, Smith CV, Brunborg G, Söderlund EJ, and Holme JA (1994) Genotoxicity of paracetamol in mice and rats. *Mutagenesis* **9**: 93-100.
- 堀井 郁夫 (2001) 非臨床試験マニュアル (野村 讓、堀井 郁夫、吉田 武美 編) pp.335-347. 株式会社エル・アイ・シー、東京
- Hosomi H, Akai S, Minami K, Yoshikawa Y, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2010) An in vitro drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and g-glutamylcysteine synthetase knockdown cells. *Toxicol. In Vitro* **24**: 1032-1038.
- Hulette BA, Ryan CA, Gerberick G.F (2002) Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**: 226-233.
- Jaeschke H (2005) Role of inflammation in the mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*

- 1: 389-397.
- Jenden DJ (1991) Difficulties in using animal data to predict pharmacological response in man. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **15**: 105-107.
- Kalgutkar AS, Gardner I, Obach RS, Shaffer CL, Callegari E, Henne KR, Mutlib AE, Dalvie DK, Lee JS, Nakai Y, O'Donnell JP, Boer J, and Harriman SP (2005) A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.* **6**: 161-225.
- Kannan R, Nademance K, Hendrickson JA, Rostami HJ, and Singh BN (1982) Amiodarone kinetics after oral doses. *Clin. Pharmacol.* **31**: 438-444.
- Kang HM, Kang YS, Kim SH, Seong JK, Kang DY, Lee HY, and Lee BS (2007) Amiodarone-induced hepatitis and polyneuropathy. *Korean J. Intern. Med.* **22**: 225-229.
- Kaplowitz N (2001) Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf.* **24**: 483-490.
- Kenna J, Satoh H, Christ D, and Pohl L (1988) Metabolic basis for a drug hypersensitivity: antibodies in sera from patients with halothane hepatitis recognize liver neoantigens that contain the trifluoroacetyl group derived from halothane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**: 1103-1109.
- Knowles SR, Uetrecht J, and Shear NH (2000) Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* **356**: 1587-1591.
- Kozlik P (2003) Metabolism of amiodarone-biotransformation of mono-N-desethylamiodarone in vitro. Ph. D. Thesis Nr. 15287, ETH Zurich, Switzerland.
- Krishna DR and Klotz U (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* **26**: 144-160.
- Lalloz MRA, Byfield PGH, Greenwood RM, and Himsworth RL (1984) Binding of amiodarone by serum proteins and the effects of drugs, hormones and other interacting ligands. *J. Pharm. Pharmacol.* **36**: 366-372.
- Latini R, Tognoni G, and Kates ER (1984) Clinical pharmacokinetics of amiodarone. *Clin. Pharmacokinet.* **9**: 136-156.
- 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.
- Lewis JH, Mullick F, Ishak KG, Ranard RC, Ragsdale B, Perse RM, Rusnock EJ, Wolke A, Benjamin SB, Seeff LB, and Zimmerman HJ (1990) Histopathologic analysis of suspected amiodarone hepatotoxicity. *Hum. Pathol.* **21**: 59-67.
- Levedeva T, Dustin ML, and Sykulev Y (2005) ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 251-258.
- 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.
- Lohse AW, Weiler-Normann C, and Tiegs G (2009) Immune-mediated liver injury. *J. Hepatol.* **52**: 136-144.
- Lupon-Rosés J, Simó-Canonge R, Lu-Cortez L, Permanyer-Miralda G, and Allende-Monclús H (1986) Probable early acute hepatitis with parenteral amiodarone. *Clin. Cardiol.* **9**: 223-225.
- Mitjans M, Viviani B, Lucchi L, Galli CL, Marinovich M, and Corsini E (2008) Role of p38 MAPK in the selective release of IL-8 induced by chemical allergen in naive THP-1 cells. *Toxicol. In Vitro* **22**: 386-395.
- Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, and Nishiyama N. (2008) Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO<sub>4</sub>. *J. Toxicol. Sci.* **33**: 51-59.
- Mizuno K, Katoh M, Okumura H, Nakagawa N, Negishi T, Hashizume T, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.* **37**: 345-351.
- Mizuno K, Toyoda Y, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2011) Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.* In press.
- Mizuno K, Fukami T, Toyoda Y, Nakajima M, and Yokoi T (2010) Terbinafine stimulates the pro-inflammatory responses in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Life Sci.* **87**: 537-544.
- Nassar AE and Lopez-Anaya A (2004) Strategies for dealing with reactive intermediates in drug discovery and development. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **7**: 126-136.
- Njoku D, Laster M, Gong D, EInd Eger, Reed G, and Martin JL (1997) Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. *Anesth. Analg.* **84**: 173-178.

- Nukada Y, Miyazawa M, Kosaka N, Ito Y, Sakaguchi H, and Nishiyama N (2008) Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *J. Toxicol. Sci.* **33**: 175-185.
- Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, and Yokoi T (2000a) 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.
- Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H, and Yokoi T (2000b) Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: prediction of in vivo drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **49**: 244-253.
- Park BK, Kitteringham NR, Powell H, and Pirmohamed M (2000) Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**: 39-60.
- 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.
- Pallandi RT and Campbell TJ (1987) Resting, and rate-dependent depression of Vmax of guinea-pig ventricular action potentials by amiodarone and desethylamiodarone. *Br. J. Pharmacol.* **92**: 97-103.
- Puli SR, Fraley MA, Puli V, Kuperman AB, and Alpert MA (2005) Hepatic cirrhosis caused by low-dose oral amiodarone therapy. *Am. J. Med. Sci.* **330**: 257-261.
- Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, and Black M (1989) Acetaminophen activation by human liver cytochromes P4502E1 and P4501A2. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**: 270-283.
- Riley RJ, Maggs JL, Lambert C, Kitteringham NR, and Park BK (1998) An in vitro study of the microsomal metabolism and cellular toxicity of phenytoin, sorbinil and mianserin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **26**: 577-588.
- 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.
- Rougier N, Redziniak G., Schmitt D, and Vincent C (1998) Evaluation of the capacity of dendritic cells derived from cord blood CD34+ precursors to present haptens to unsensitized autologous T cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **110**: 348-352.
- Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, Yoneyama K, Hirota M, Itagaki H, Toyoda H, and Suzuki H (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human cell line activation test (hCLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* **20**: 774-784.
- Sakaguchi H, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, and Suzuki H (2007) Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1. *Arch. Dermatol. Res.* **298**: 427-437.
- Satoh H, Gillette JR, Davies HW, Schulick RD, and Pohl LR (1985) Immunochemical evidence of trifluoroacetylated cytochrome P-450 in the liver of halothane-treated rats. *Mol. Pharmacol.* **28**: 468-474.
- Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, and Amigorena S (2008) Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* **28**: 258-270.
- Shaw PJ, Hopfensperger MJ, Ganey PE, and Roth RA (2007) Lipopolysaccharide and trovafloxacin coexposure in mice causes idiosyncrasy-like liver injury dependent on tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Toxicol. Sci.* **100**: 259-266.
- Shaw PJ, Fullerton AM, Scott MA, Ganey PE, and Roth RA (2009a) The role of the hemostatic system in murine liver injury induced by coexposure to lipopolysaccharide and trovafloxacin, a drug with idiosyncratic liability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**: 293-300.
- Shaw PJ, Beggs KM, Sparkenbaugh EM, Dugan CM, Ganey PE, and Roth RA (2009b) 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.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 414-423.
- Singhal A, Ghosh P, and Khan SA (2003) Low dose amiodarone causing pseudo-alcoholic cirrhosis. *Age. Ageing* **32**: 224-225.
- Simon JP, Zannad F, Trechot P, Thisse JY, Houplon M, and Aliot E (1990) Acute hepatitis after a loading dose of intravenous amiodarone. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **4**: 1467-1468.
- Stäubli M, Bircher J, Galeazzi RL, Remund H, and Studer H (1983) Serum concentrations of amiodarone during long term therapy. Relation to dose, efficacy and toxicity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **24**: 485-494.
- 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** (4897): 1467-1469.
- Tafazoli S, Spehar DD, and O'Brien PJ (2005) Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab. Rev.* **37**: 311-325.
- Thummel KE, 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.
- Trivier JM, Libersa C, Belloc C, and Lhermitte M (1993) Amiodarone N-deethylation in human liver microsomes: involvement of cytochrome P450 3A enzymes (first report). *Life Sci.* **52**: 91-96.
- Trompezinski S, Migdal C, Tailhardat M, Le Varlet B, Courtellemont P, Haftek M, and Serres M (2008) Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**: 397-406.
- 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.
- 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.
- 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.
- Waldhauser KM, Torok M, Ha HR, Thomet U, Konrad D, Brecht K, Follath F, and Krähenbühl S (2006) Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**: 1413-1423.
- Walgren JL, Mitchell MD, and Thompson DC (2005) Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**: 325-361.
- Wajant H, Pfizenmaier K, and Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**: 45-65.
- Wang JH, Redmond HP, Watson RW, and Bouchier-Hayes D (1995) Role of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in induction of hepatocyte necrosis. *Am. J. Physiol.* **269**: G297-304.
- Yoshida Y, Sakaguchi H, Ito Y, Okuda M, and Suzuki H (2003) Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol. In Vitro* **17**: 221-228.
- Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M, and Asahi S (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol. In Vitro* **15**: 245-256.
- 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.
- Zahno A, Brecht K, Morand R, Maseneni S, Török M, Lindinger PW, and Krähenbühl S (2011) The role of CYP3A4 in amiodarone-associated toxicity on HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol.* **81**: 432-441.
- Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M, and Chen YZ (2005) Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab. Rev.* **37**: 41-213.
- Zimmerman HJ (1999) Drug-induced liver disease. In *Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs other chemicals on the liver*. 2<sup>nd</sup> 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- $\alpha$  in a drug-inflammation interaction model of idiosyncratic liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**: 114-121.

## 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。

## ハロタン誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

薬物誘導性肝障害は、薬物治療における重大な問題の一つである。一般に女性は男性に比べ重篤な肝障害発症例が多く報告されている。本研究は、女性において重篤な肝障害発症が多く認められる原因を解明することを目的としたものである。全身麻酔薬であるハロタン（HAL）は約 20%以上の患者に軽度な肝障害を引き起こし、さらに稀に重篤な肝障害を引き起こすことが知られている。また、HAL 誘導性肝障害発症のリスクファクターの一つに女性が挙げられており、実際に臨床における肝障害報告は女性が多い。近年 HAL 誘導性肝障害モデルを再現できるマウスモデルが開発され、ヒトと同様に雄性マウスと比較して雌性マウスで重篤な肝障害発症が認められることが報告されている。女性で重篤な肝障害発症が多いメカニズムを解明するために、女性ホルモンであるエストロゲン（E2）とプロゲステロン（Prog）が HAL 誘導性肝障害に与える影響について主としてマウスを用いて検討した。その結果、HAL 誘導性肝障害に対して E2 投与による肝障害減弱作用および Prog 投与による肝障害悪化作用が認められた。これらの作用は HAL の活性代謝物である TFA と肝臓中タンパク質とのアダクト形成には変化を示さず、HAL 投与後の炎症反応を介して肝障害の程度に影響を及ぼすことを示した。さらに、E2 および Prog は E2 レセプターおよび Prog レセプターを介して免疫反応を調節し、肝障害の程度を変化させることが示された。

### A. 研究目的

#### 薬物誘導性肝障害

(Drug-induced liver injury: DILI) は医薬品開発や臨床における薬物治療において重要な問題の一つである。米国では急性肝障害の 50%以上が薬物に起因していると報告されており、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)。現

在、DILI 発症に関して様々なメカニズムが提唱されている。一般的に薬物もしくは Cytochrome P450 (CYP) などの薬物代謝酵素により代謝された反応性代謝物とタンパク質や DNA など生体内高分子との共有結合が DILI 発症の最初の引き金であるとされている。解熱性鎮痛薬として臨床で使用され、最も広く研究されているアセトアミノフェン (APAP) では、過



剰投与および GSH 枯渇時において CYP による代謝を受けた反応性代謝物である NAPQI が細胞質内タンパク質と共有結合し、カルシウムホメオスタシスの障害、ミトコンドリア機能障害および酸化ストレスなどを引き起こすことで結果的に細胞障害および細胞死を引き起こすことが知られている。しかし、治療域でこのような直接的な細胞障害を引き起こす薬物は前臨床試験の安全性評価で開発中止になることが多く、臨床上問題になることは少ない。臨床で認められる DILI の多くは免疫細胞活性化を介した炎症ストレスを伴うことが認められており、これらの免疫システムが肝障害悪化や肝障害の程度を決める重要な役割を果たすことが示唆されている (Holt and Ju, 2006; Adams et al., 2010)。肝細胞がストレスや損傷を受けると、クッパー細胞、NK 細胞および NKT 細胞などの免疫細胞を活性化する様々なシグナルを放出する。これらの免疫細胞が活性化されると、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインやケモカインを放出しさらなる免疫活性化および好中球やリンパ球などの肝臓への浸潤を促進し、肝障害悪化に寄与する。また、これらの免疫細胞は IL-10 などの抗炎症性サイトカイン放出にも関与しており、炎症と抗炎症のバランスが DILI 発症の感受性に関与していることが示唆されている (Kaplowitz, 2005; Holt and Ju, 2006; Adams et al., 2010)。しかし、DILI 発症には薬物のみならず、年齢や性などの非遺伝的要因や、薬物代謝に関与する CYPs などの遺伝子多型による遺伝

的要因、食事や飲酒および疾患などの環境的要因などが複雑に重なり発症に関与すると報告されており、詳細な発症メカニズムについては不明のままである (Li, 2002)。

今日、DILI のリスクファクターの一つとして女性が挙げられている。臨床において DILI 患者の 78% が女性であるという報告が存在するが (Ostapowicz et al., 2002)、発症率に性による影響は認められないという報告も存在している (Lucena et al., 2009; Andrade et al., 2005)。しかし、女性は男性に比べ肝細胞障害型の DILI 発症が有意に多いこと (De Valle et al., 2006; Bjornsson and Olsson, 2005)、米国において劇症化 DILI が認められた患者の 90% が女性であったこと、および DILI が原因で肝移植を受けた患者の 76% が女性であったことが報告されており、女性では肝移植や死亡を伴う劇症化の頻度が高いことが報告されている (Russo et al., 2004; Lucena et al., 2009; Andrade et al., 2005)。また、米国では DILI に限らず、急性肝障害患者の 74% が女性であることや、アルコール性肝障害も女性において劇症化しやすいことが報告されている (Miller, 2001; Kono et al., 2000)。これらの多くの報告から、女性は重篤な肝障害を引き起こすリスクファクターであることが示唆されるが、その原因およびメカニズムについては不明である。

一般的に女性と男性では体重、血液量、CYP 酵素活性およびクリアランス活性など薬物動態に寄与する因子に性差が認め

られることが知られている (Franconi et al., 2007; Waxman and Holloway, 2009)。また、女性は男性に比べ、細菌などの感染に対する抵抗性や自己免疫疾患発症が多く認められ、免疫能が強いことが認められている (Ansar et al., 1985)。また、喘息や全身性エリトマトーデスのような免疫疾患は妊娠時や性周期によって悪化することが知られ、妊娠時に病態の悪化は Th1/Th2 バランスが Th2 に傾くことが原因であると示唆されており、性差だけでなく性周期も免疫に影響を与えることが示唆されている (Ostensen, 1999)。性周期においてエストラジオール (E2) やプロゲステロン (Prog) といった女性ホルモン濃度の周期的な変化を伴い、血中女性ホルモン濃度が免疫反応に影響を与えることが報告されている (Grossman, 1985; Bouman et al., 2005)。これまでに *in vitro* でマウス腹腔マクロファージや慢性 C 型肝炎患者の末梢血単核球を用いた検討において、E2 処置による炎症性サイトカインやケモカイン産生の減弱および Prog 処置による産生増加が報告されている (Huang et al., 2008; Yuan et al., 2008)。また、E2 に関しては広く研究され、肝虚血再灌流障害や出血性ショックによる肝障害に対して E2 が肝保護的に働くことが報告されているが、Prog と肝障害の関連性についてはほとんど研究されていない (Yokoyama et al., 2005)。以上のように、女性ホルモンが肝障害に影響することが示唆されているが、現在までに女性ホルモンと DILI との関連性について検討した報告はない。

吸入型全身麻酔薬である Halothane (HAL) は軽度なもの、または無症候性の症例を含めると 20% 以上の患者において血清中トランスアミナーゼの上昇が起これること (Spracklin et al., 1997)、さらに約 10,000 人に 1 人の割合で劇症化が生じることが報告されている (Moult and Sherlock, 1975)。また、HAL 誘導性肝障害は男性に比べ女性での肝障害発症例 (男性: 女性 = 1:2) が多いことも報告されている (Cousins et al., 1989)。Youら (2006) の検討においてマウスを用いて HAL 誘導性肝障害を再現性良く惹起できる投与方法が提唱された。この投与方法はヒトでの報告と同様に雄に比べ雌で強い肝障害悪化が認められている。一般的に発症メカニズムとしては、肝臓で主に CYP2E1 により代謝され、生成する活性代謝物のトリフルオロアセチルラジカルが生体内高分子と共有結合し、トリフルオロアセチル化タンパク質 (TFA-adduct) を生成することが知られている (Spracklin et al., 1997; Kennna et al., 1992)。HAL による肝障害患者の血清からは抗 TFA 抗体および抗 CYP2E1 抗体が検出されることが報告されている (Park et al., 2005)。しかし、TFA-adduct 生成は肝障害を引き起こさない実験動物においても認められており、adduct 生成以降に存在するメカニズムが肝障害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)。近年の報告において、HAL 誘導性肝障害発症に好中球や、NKT 細胞および Th17 などの様々な免疫因子の活性化が関与することが明らかに

されている (You et al., 2006; Kobayashi et al., 2009; Cheng et al., 2010)。女性で重篤な肝障害発症が多いメカニズムを解明するために、女性ホルモンである E2 と Prog が HAL 誘導性肝障害に与える影響について主としてマウスを用いて検討した。

## B. 研究方法

E2 および Prog 前投与 BALB/c マウスに対する薬物投与は、BALB/c マウス (雌性, 8 週齢 16~21 g; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) に E2 (0.3  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  in olive oil, *s.c.*), Prog (0.3  $\text{mg}/\text{mouse}$  in olive oil, *s.c.*) を 7 日間連続投与し、最終投与 1.5 時間後に薬物を投与した。また、レセプターアンタゴニストを用いた検討では、E2 および Prog 投与 30 分前に ER アンタゴニストである ICI (50  $\mu\text{g}/\text{head}$  in olive oil, *s.c.*) および PR アンタゴニストである RU (50  $\mu\text{g}/\text{head}$  in olive oil, *s.c.*) を投与した。薬物は HAL (15 or 30  $\text{mmol}/\text{kg}$  in olive oil, *i.p.*) または ISO (15  $\text{mmol}/\text{kg}$  in olive oil, *i.p.*) を投与し、投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。各群 4~5 匹のマウスを使用した。

プロテインカルボニル含量の測定は、Cell Biolabs (Tokyo, Japan) の OxiSelect Protein Carbonyl ELISA kit を用い、以下の方法でプロテインカルボニル含量の測定を行った。マウス肝臓ホモジネートを 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように精製水で希釈し、96-well protein binding plate に 100  $\mu\text{L}$  加え、37°C で 3 時間反応させた。ウェルを洗浄し、DNPH Working Solution を 100  $\mu\text{L}$  加え、遮光し室温で 45 分間反応させた。ウェル

を洗浄し、Blocking solution を 200  $\mu\text{L}$  加え反応させ、抗 DNP 抗体を 100  $\mu\text{L}$  加え、室温で 1 時間反応させた。ウェルを洗浄し、HRP 標識 2 次抗体を 100  $\mu\text{L}$  加え、室温で 30 分間反応させた。ウェルを洗浄し、Substrate solution を 100  $\mu\text{L}$  加え、室温で 10 分間反応させた後、Stop solution を 100  $\mu\text{L}$  加え反応を停止させ、450 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。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 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. HAL 誘導性肝障害に対する E2 および Prog の影響

E2 および Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害への影響を 8 週齢雌性 BALB/c マウスを用いて検討した。その結果、CTL と比較して HAL 30  $\text{mmol}/\text{kg}$  投与により有意な ALT 値の上昇が認められた (Fig. 2A)。E2 前投与により HAL (30  $\text{mmol}/\text{kg}$ ) 単独投与群と比較して有意な ALT 値と AST 値の減少が認められ、その肝障害減弱作用は ER アンタゴニストである ICI の併用により認められなくなった (Fig. 2A)。また、HAL 15  $\text{mmol}/\text{kg}$  投与では CTL と比較して、ALT 値および AST 値に増加傾向が認められた。Prog 前投与により HAL (15  $\text{mmol}/\text{kg}$ ) 単独投与群と比較して有意な ALT 値と AST 値の増加が認められ、その肝障害悪化作用は PR アンタゴニストである RU の投与により認められなくなっ

た (Fig. 2B)。また、E2、Prog、ICI および RU 単独投与のみでは血漿トランスアミ

ナーゼ値の上昇は認められなかった。

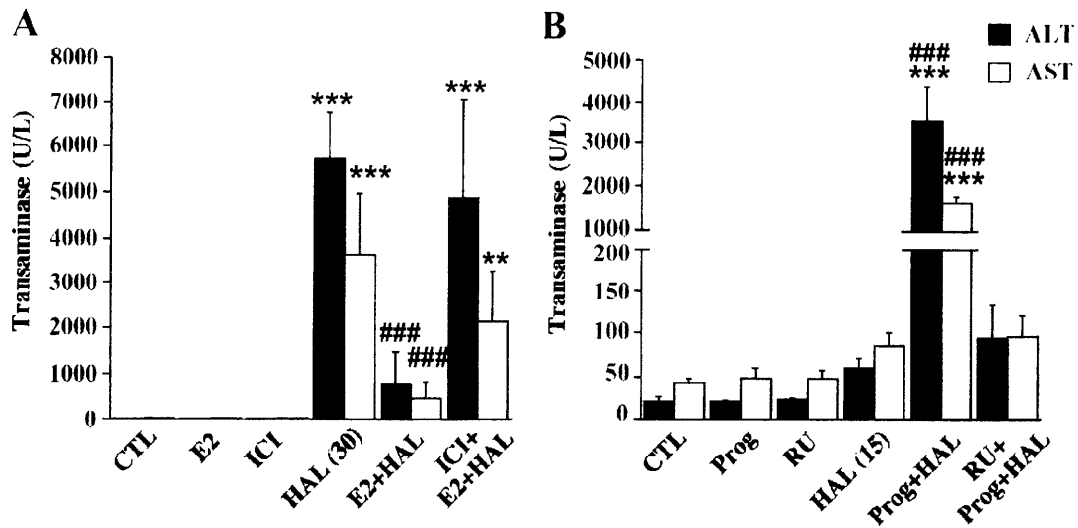


Fig. 2. Effects of E2 or Prog administration on HAL-induced liver injury. Mice (female, 8-week old) were pretreated with E2 (0.3 µg/mouse, s.c.), Prog (0.3 mg/mouse, s.c.) or vehicle (CTL: olive oil) for 7 days followed by HAL administration (15 or 30 mmol/kg, i.p.) 1.5 h after the last treatment of E2 or Prog. In experiments using antagonist, mice were treated with ICI (50 µg/mouse, s.c.) or RU (50 µg/mouse, s.c.) 0.5 h prior to the treatment with E2 or Prog, respectively, for 7 days. Twenty-four hours after HAL administration, serum samples were collected for assessment of the transaminase levels. The data are mean ± SD of 4-5 mice. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , compared with CTL. ### $P < 0.001$ , compared with only HAL-administered mice.

HAL 投与による肝障害の程度と好中球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。その結果、HAL (30 mmol/kg) 群、ICI+E2+HAL 群および Prog+HAL 群において肝細胞の脱落が認められ、ALT 値と同様に E2 前投与による肝細胞脱落の減弱、Prog 前投与による肝細胞脱落の増加が認められた。また、HAL (30) 群、ICI+E2+HAL 群および Prog+HAL 群において多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められ、HAL による肝障害および Prog による肝障害悪化と好中球浸潤が同じ傾向を示していた (Fig. 3)。以

上の結果から、血漿トランスアミナーゼ値と同様に肝組織学的評価においても、E2 による肝障害減弱および Prog による肝障害悪化が認められた。

Iso は HAL の同効薬および構造類似体であり、HAL よりも肝障害性が低く現在でも吸入型麻酔薬として使用されている (Njoku et al., 1997)。HAL の代わりに Iso を用いた検討において、Iso 30 mmol/kg 投与まで ALT 値および AST 値の増加が認められなかった。Prog による肝障害悪化作用を検討したが、Prog による ALT 値および AST 値の増加は認められなかった (Fig. 4)。