

Fig. 3. Effects of E2 and Prog administration on HAL-induced liver injury. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 2. Liver sample were collected at 24 h after HAL administration. Liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody. Arrows indicated MPO-positive cells.

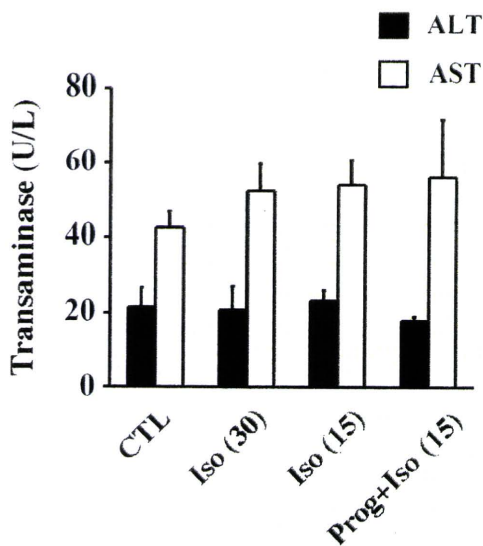


Fig. 4. Lack of Isoflurane-induced hepatotoxicity. Mice (female, 8-week old) were administered Iso (15 or 30 mmol/kg) and mice pretreated with Prog were administered Iso (15 mmol/kg). ALT and AST were measured at 24 h after Iso administration. The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice.

### C-2. 代謝的活性化および酸化ストレスに対する E2 および Prog の影響

HAL 誘導性肝障害に対する E2 および Prog 投与の影響を検討するために、HAL の代謝的活性化に關与する Cyp2e1 と GSH 含量の変化、直接的な細胞障害および炎症反応を惹起すると報告されている TFA-adduct および酸化ストレスに対する影響について検討した。その結果、肝臓中 TFA-protein adducts 生成量および生成

パターンに対して、HAL 投与により顕著な TFA-protein adducts 生成量および生成パターンの増加が認められたが、E2 または Prog 前投与時において顕著な変化は認められなかった (Fig. 5A)。また、HAL の代謝的活性化に關与する Cyp2e1 発現量は E2 および Prog 前投与による発現量の変化は認められなかった (Fig. 5B)。さらに、肝臓中 GSH 含量に対して、HAL 15 および 30 mmol/kg 投与時には、いずれも CTL

と比較して80%程度までの有意な減少が認められたが、E2およびProg前投与による変化は認められなかった (Fig. 5C)。酸化ストレスマーカーであるプロテインカルボニル量はHAL投与およびE2、Prog投与に関わらず有意な変化は認められなかった (Fig. 5D)。以上のことから、HAL誘導性肝障害に対するE2およびProgの影響は、HAL代謝的活性化や酸化ストレスに対する寄与が小さく、TFA-adduct生成以降の毒性発現に寄与している可能性が考えられた。

### C-3 炎症関連因子に対するE2およびProgの影響

E2やProgは免疫調節作用を有することが知られており、さらにFig. 2に示した肝組織学的評価から肝臓中への好中球浸潤と肝障害の程度に相関が認められたことから、E2およびProg前投与が炎症性サイトカインや好中球遊走活性を有するケモカインおよび接着因子に与える影響について検討した。その結果をFig. 6に示す。E2投与単独では炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)、CXCケモカイン (CXCL1、CXCL2) およびICAM-1のmRNA発現量に変化は認められなかった (Fig. 6A)。HAL (30 mmol/kg) 投与時には炎症性サイトカイン、CXCケモカインおよびICAM-1のmRNAの有意な増加が認められた (Fig. 6A)。さらに、E2前投与時のHAL

投与においては、HAL投与群と比較して炎症関連因子の有意な減弱が認められ、これらのE2の作用はERアンタゴニストであるICIの投与により認められなくなった (Fig. 6A)。以上の結果から、E2投与単独では炎症関連因子に有意な変化は認められなかったが、E2前投与はHAL投与後の炎症反応の有意な減弱を示すことが認められた。

Prog投与単独ではCXCL1 mRNA発現の有意な増加が認められたが、それ以外の炎症性サイトカインおよびCXCL2、ICAM-1のmRNA発現に変化は認められなかった (Fig. 6B)。また、HAL (15 mmol/kg) 投与ではIL-6とCXCL1のmRNA発現のみCTL群と比較して有意な増加が認められ、それ以外のmRNA発現量に変化は認められなかった (Fig. 6B)。Prog前投与時のHAL投与においては、HAL投与群と比較して炎症関連因子の有意な増加が認められ、これらのProgの作用は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. 6B)。これらのことから、Prog単独投与においてCXCL1の有意なmRNA発現増加が認められ、さらにProg前投与によりHAL投与後の炎症反応に顕著な変化を示すことが認められた。

以上の結果から、E2およびProgはHAL投与後の炎症反応を調節することによってHAL誘導性肝障害に影響を及ぼすことが示唆された。

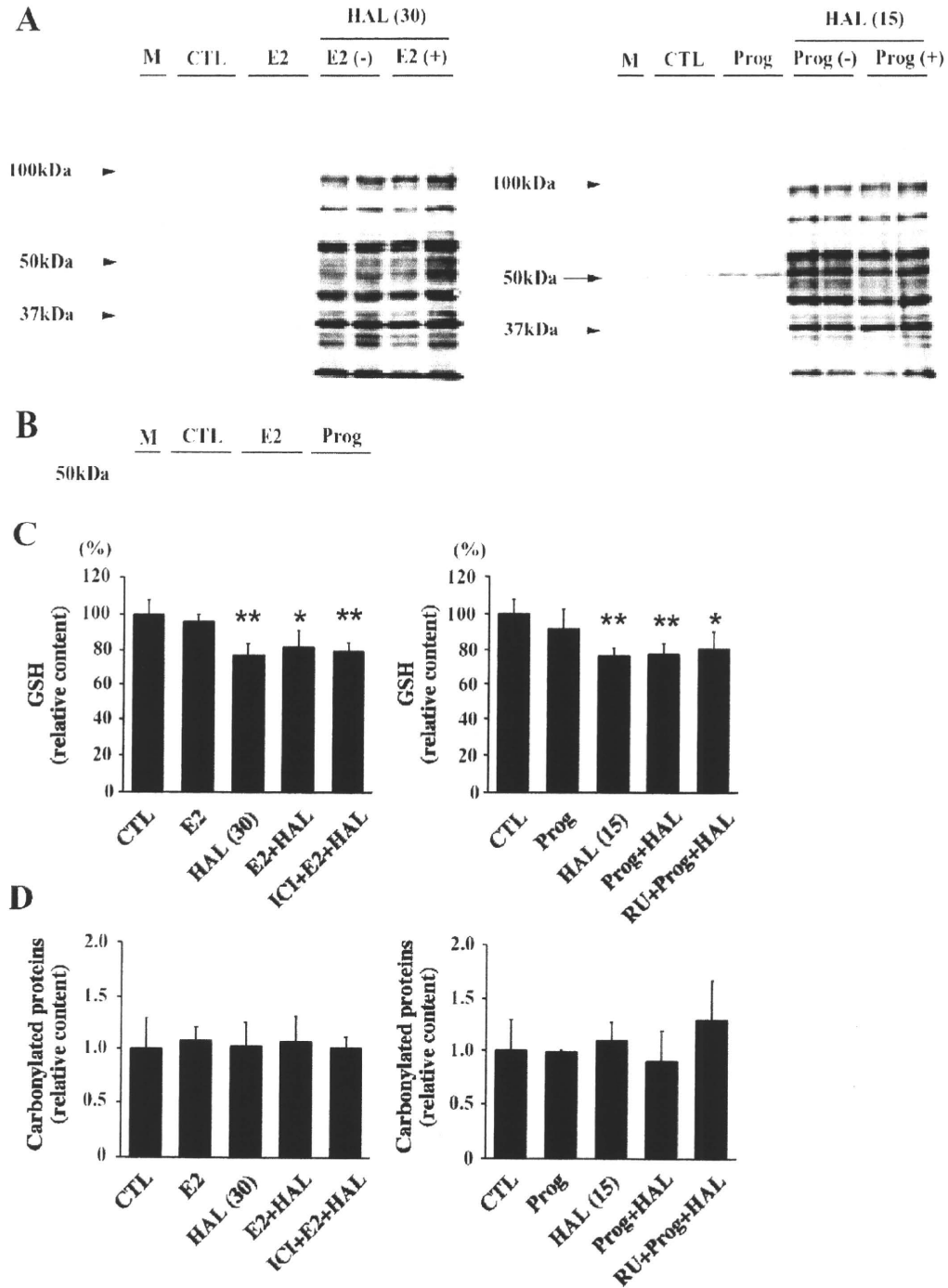


Fig. 5. Effects of E2 or Prog administration on the degree of metabolic activation, total GSH content and oxidative stress in the liver in HAL-induced liver injury. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 2. Twenty-four hours after the HAL administration, liver samples were collected. Immunoblot of TFA-protein adducts (A) and Cyp2e1 protein expression (B) were performed using whole liver homogenate. Each lane showed an individual mouse (30 µg/ lane). Total GSH content (C) and carbonylated protein (D) in whole liver homogenate were measured. The data are mean ± SD of 4 mice. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , compared with CTL. M: molecular weight marker.

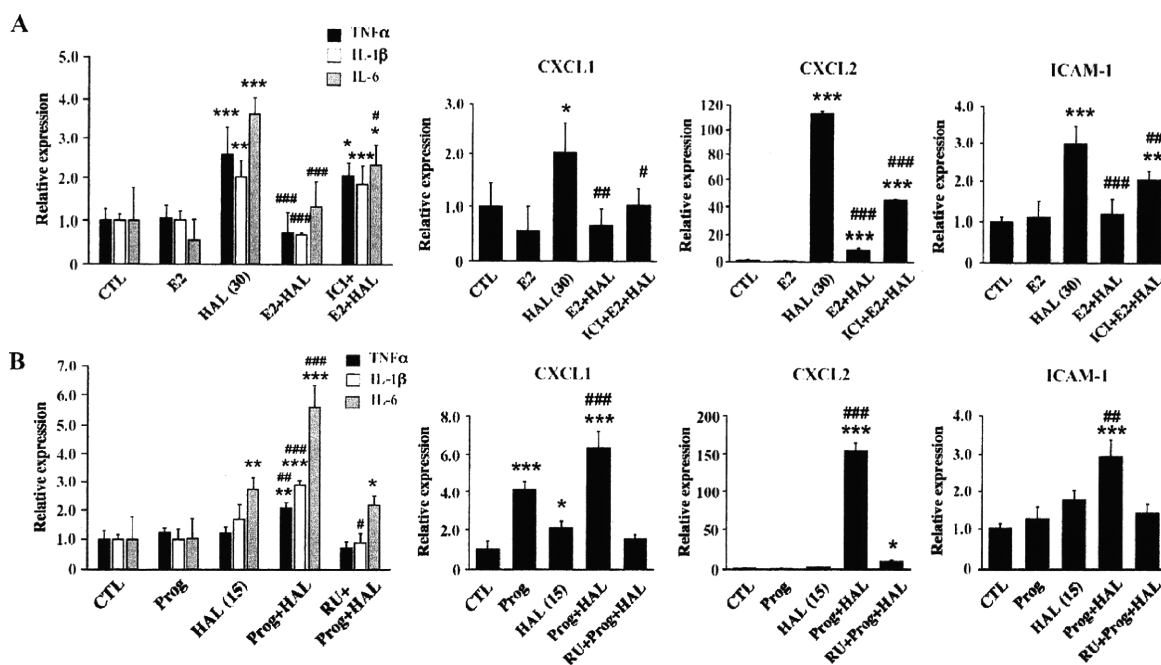


Fig. 6. Effects of E2 or Prog administration on immune responses in HAL-induced liver injury. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 2. Twenty-four hours after the HAL administration, relative expression of hepatic mRNA was measured for proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecule related neutrophil infiltration in the mouse liver pretreated with E2 (A) or Prog (B). Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean  $\pm$  SD of 4-5 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , compared with CTL. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  and ### $P < 0.001$ , compared with only HAL-administered mice.

#### D. 考察

一般的に女性は男性に比べ重篤な肝障害を引き起こしやす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、性周期や妊娠時において、自己免疫疾患などの免疫が関連した病態に影響を及ぼすことが報告されている (Ansar et al., 1985; Ostensen, 1999)。本章では性周期や妊娠時などで大きく変動することが知られている代表的な女性ホルモンである E2 と Prog に着目し、毒性発現機序に様々な免疫細胞活性化が関与することが知られている HAL 誘導性肝障害に対する女性ホルモンの影響について検討した。これまで

に E2 は肝虚血再灌流障害や、肝外傷性出血障害、APAP および diethylnitrosoamine 誘導性肝障害を減弱させることが報告され、E2 による肝保護作用が示唆されている (Yokoyama et al., 2005; Chandrasekaran et al., 2011; Naugler et al., 2007)。一方で、Prog の薬物誘導性肝障害に対する影響についてはほとんど研究されていない。通常、妊娠後期には E2 および Prog の血中濃度が最も高くなることが知られており (E2: 通常時 40-60 pg/mL、妊娠後期 60-120 pg/mL、Prog: 通常時 3-20 pg/mL、妊娠後期 60-120 ng/mL)、今回の投与法は妊娠後期とほぼ同じ血中濃度を与えるものであり (Sugaya et al., 2000; Barkley et

al., 1979; Wood et al., 2007)、生理条件下で最も高い濃度を示すと考えられる。また、今回は卵巣からの内因性のホルモン等の影響を検討するために卵巣摘出は行わなかった。

本研究では初めに E2 と Prog の影響を検討するために、HAL 単独による肝障害性があまり認められない 15 mmol/kg の投与を検討した結果、E2 前投与では変化はほとんど認められず (data not shown)、Prog 前投与では有意な ALT 値の上昇が認められた。したがって、E2 前投与時の投与量は HAL 単独で顕著な ALT 値の増加が認められる 30 mmol/kg、Prog 前投与時は 15 mmol/kg で投与した。その結果、E2 投与は HAL 誘導性肝障害を減弱し、Prog 投与は肝障害を悪化させる結果が得られ、さらにレセプターアンタゴニストを用いた検討からこれらの影響にはそれぞれのレセプターを介することが示唆された (Fig. 2)。肝組織学的評価において、HAL (30 mmol/kg) 投与群、ICI+E2+HAL 投与群および Prog 投与時の HAL (15 mmol/kg) 投与群において他の群よりも顕著な肝細胞脱落が認められた (Fig. 3)。好中球が HAL 誘導性肝障害に重要な役割を有していることが報告されている (You et al., 2006; Kobayashi et al., 2009)。したがって、H&E 染色による肝障害の程度の評価に加えて、抗 MPO 抗体を用いた免疫染色によって MPO 陽性細胞の肝臓への浸潤についての評価を行い、好中球の関与について検討した。HAL (30 mmol/kg) および Prog 投与時の HAL (15 mmol/kg) の肝臓において多数の MPO 陽性細胞の浸潤が

認められ、MPO 陽性細胞浸潤も肝障害の程度と同様に E2 による減少および Prog による増加が認められた (Fig. 3)。さらに、これらの好中球浸潤にもそれぞれのレセプターを介することが示唆された (Fig. 3)。以上の結果から、肝組織像の評価においても血漿トランスアミナーゼ値と同様に E2 による肝障害減弱作用および Prog による肝障害悪化作用が示され、これらの女性ホルモンの作用は好中球浸潤を介し肝障害の程度に影響を及ぼすことが示唆された (Fig. 3)。

現在、臨床で広く使用され、HAL より肝障害性の低い Iso 投与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. 4)。さらに、Prog 投与でも肝障害悪化が認められなかったことから、Prog 前投与は肝障害性を示す薬物のみで悪化作用を示すこと、および Prog は肝障害発症よりも悪化の段階に寄与していることが示唆された (Fig. 4)。ヒトでは吸収された HAL の 20%が TFA に代謝されるのに対し、Iso は HAL 同様に TFA に代謝されるが、その割合は HAL の 0.2%であることが報告されており (Cohen et al., 1975; Njoku et al., 1996)、この TFA の生成量の差が今回 Iso で肝障害が認められなかった原因のひとつとして考えられる。

HAL 誘導性肝障害の正確なメカニズムは明らかにされていないが、一般的には CYP2E1 による代謝的活性化を受けて生成する反応性代謝物である TFA による直接的な細胞機能障害や、生体内タンパク質の共有結合した TFA-adduct や HAL-modified macromolecule による免疫

活性化の関与が考えられている (Bourdi et al., 2001)。しかし、本検討では TFA-adduct の生成量および生成パターンに E2 および Prog 前投与による影響は認められなかった。また、HAL 代謝的活性化に主に関与する Cyp2e1 発現量も性ホルモンによる変化は認められなかった (Fig. 2)。HAL が CYP2E1 により代謝を受け生成する TFA は多くの肝臓中のタンパク質と結合することが認められており、現在までにジスルフィドイソメラーゼ、CYP、カルボキシエステラーゼ、ストレス応答タンパク質である ERp99、ERp72 生体内タンパク質、シャペロンタンパク質である GRP78 および Ca 結合タンパク質である Calreticulin が TFA と共有結合するタンパク質として同定されている (Gut et al., 1993)。しかし、HAL による肝障害患者以外の血清からもこれら TFA-adduct が検出されており、どの TFA-adduct が HAL 誘導性肝障害に対する免疫原性を示すかはわかっていない (Gut et al., 1993)。GSH 存在下で TFA-adduct 生成が減少すること、および、モルモットを用いた検討において肝臓中 GSH 含量の低下により肝障害増悪が認められることから、GSH が HAL 誘導性肝障害に対して保護作用を有することが報告されている (Lind et al., 1992)。また、APAP 誘導性肝障害に対して E2 が酸化ストレスを調節することで、肝保護作用を示すことが報告されている (Chandrasekaran et al., 2011)。以上の報告に基づき、肝臓 GSH 含量および酸化ストレスマーカーとしてプロテインカルボニル含量を測定したが、E2 および Prog 投与に

よる影響は認められなかった (Fig. 2)。これらのことから、E2 および Prog の影響は HAL 代謝的活性化や酸化ストレスに影響を与えずに、HAL 誘導性肝障害肝障害に影響していることが示唆された。

薬物誘導性肝障害では免疫システムの活性化が重要な因子の一つであることが示唆されており、HAL によってリジン残基を修飾されたタンパク質がクッパー細胞に取り込まれ (Furst et al., 1997)、免疫細胞に抗原として提示されることでアレルギー反応による肝細胞壊死が起こり肝障害が誘導されると考えられている。また、最近 HAL 誘導性肝障害に好中球や IL-17、NKT 細胞が関与することが報告されている (You et al., 2006; Kobayashi et al., 2009; Cheng et al., 2010)。本検討においても炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  および IL-6、好中球遊走に関わる CXCL1 および CXCL2、ICAM-1 mRNA の発現と肝障害の程度が相関する結果が得られた。また本検討と同様の HAL 投与において TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 や好中球の遊走に関わるケモカインである CXCL1 の mRNA の発現量が BALB/c マウスの肝臓において有意に増加することが報告され、好中球が HAL 誘導性肝障害に重要な役割を有することが報告されている (You et al., 2006)。好中球の肝血管系への蓄積には TNF $\alpha$ 、IL-1、CXC ケモカイン (IL-8、CXCL1、CXCL2)、PAF など様々な炎症調節因子が関与している。しかし類洞内への好中球の蓄積だけでは肝細胞を傷害するには不十分であり、好中球が血管外の肝実質細胞へ遊走されることが必要であ

ると言われており、それには好中球の  $\beta_2$  インテグリンと内皮細胞および肝実質細胞の ICAM-1 との接着が必要であると言われている (Ramaiah and Jaeschke, 2007)。虚血再灌流による肝障害、アルコール性肝炎、ANIT および APAP 誘導性肝障害などが好中球浸潤によって引き起こされる、または悪化することが報告されており (Ramaiah and Jaeschke, 2007)、本検討における MPO 陽性細胞の浸潤も肝細胞傷害の程度を決定するのに寄与していると考えられる。

本章での検討では、E2 および Prog 処置により HAL 誘導性肝障害の程度および炎症関連因子の mRNA 発現に関連性が認められ、さらにいずれもレセプターアンタゴニスト投与により、その作用が認められなくなることを示した。これまでに、マウス腹腔マクロファージやヒト末梢血単球に E2 や Prog を処置し、酸化ストレスを与えた際にも炎症性サイトカインやケモカイン産生に影響を与えることが報告されており、本章の結果と同様に E2 処置時には炎症性サイトカインの産生減少、Prog 処置時には炎症性サイトカイン産生増加が認められている (Huang et al., 2008; Yuan et al., 2008)。さらに、今回の検討と同様にこれらの効果がレセプターアンタゴニスト処置により認められなくなっている (Huang et al., 2008; Yuan et al., 2008)。以上のことより E2 および Prog は ER および PR 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唆された。

#### <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.
- Andrade RJ, Lucena MI, Fernández MC, Pelaez G, Pachkoria K, García-Ruiz E, García-Muñoz B, González-Grande R, Pizarro A, Durán JA, Jiménez M, Rodrigo L, Romero-Gomez M, Navarro JM, Planas R, Costa J, Borrás A, Soler A, Salmerón J, and Martín-Vivaldi R (2005) Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* **129**: 512-521.
- Ansar AS, Penhale WJ, and Talal N (1985) Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.* **121**: 531-551.
- Barkley MS, Geschwind II, and Bradford GE (1979) The gestational pattern of estradiol, testosterone and progesterone secretion in selected strains of mice. *Biol. Reprod.* **20**: 733-738.
- Bjornsson E, and Olsson R (2005) Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* **42**: 481-489.
- Bouman A, Heineman MJ, and Faas MM (2005) Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update.* **11**: 411-423.
- Chandrasekaran VR, Periasamy S, Liu LL, and Liu MY (2011) 17 $\beta$ -estradiol protects against acetaminophen-overdose-induced acute oxidative hepatic damage and increases the survival rate in mice. *Steroids* **76**: 118-124.
- 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**: 255-261.
- Cousins MJ, Plummer JL, and Hall PD (1989) Risk factors for halothane hepatitis. *Aust. N. Z. J. Surg.* **59**: 5-14.
- DeValle MB, Av Klinteberg V, Alem N, Olsson R, and Bjornsson E (2006) Drug-induced liver injury in a Swedish University hospital out-patient hepatology clinic. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **24**: 1187-1195.
- Feng D, Wang Y, Xu Y, Luo Q, Lan B, and Xu L (2009) Interleukin 10 deficiency exacerbates halothane induced liver injury by increasing interleukin 8 expression and neutrophil infiltration. *Biochem. Pharmacol.* **77**: 277-284.
- Franconi F, Brunelleschi S, Steardo L, and Cuomo V (2007) Gender differences in drug responses. *Pharmacol. Res.* **55**: 81-95.

- Furst SM, Luedke D, and Gandolfi AJ (1997) Kupffer cells from halothane-exposed guinea pigs carry trifluoroacetylated protein adducts. *Toxicology* **120**: 119-132.
- Grossman CJ (1985) Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science* **227**: 257-261.
- Gut J, Christen U, and Huwyler J (1993) Mechanisms of halothane toxicity: Novel insights. *Pharmac. Ther.* **58**: 133-155.
- Holt MP, and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* **3**: 48-54.
- Huang H, He J, Yin Y, Aoyagi E, Takenaka H, Itagaki T, Sannomiya K, Tamaki K, Harada N, Shono M, Shimizu I, and Takayama T (2008) Opposing effects of estradiol and progesterone on the oxidative stress-induced production of chemokine and proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages. *J. Med. Invest.* **55**: 133-141.
- Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**: 489-499.
- Kelly GS (1998) Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alt. Med. Rev.* **3**: 114-127.
- Kenna JG, Martin JL, and Pohl LR (1992) The topography of trifluoroacetylated protein antigens in liver microsomal fractions from halothane treated rats. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 621-629.
- Kobayashi E, Kobayashi M, Tsuneyama K, Fukami T, Nakijima 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, Nakijima M, and Yokoi T (2010) Interleukin-17 is involved in  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced liver injury in mice. *Toxicology* **275**: 50-57.
- Kono H, Wheeler MD, Rusyn L, Lin M, Seabra V, Rivera CA, Bradford BU, Forman DT, and Thurman RG (2000) Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **278**: 652-661.
- Lee WM (2003) Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis.* **23**: 217-226.
- Li AP (2002) A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the "multiple determinant hypothesis" for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **142**: 7-23.
- Lind RC, Gandolfi AJ, and Hall PM (1992) Glutathione depletion enhances subanesthetic halothane hepatotoxicity in guinea pigs. *Anesthesiology* **77**: 721-727.
- Lucena MI, Andrade RJ, Kaplowitz N, García-Cortes M, Fernández MC, Romero-Gomez M, Bruguera M, Hallal H, Robles-Diaz M, Rodriguez-González JF, Navarro JM, Salmeron J, Martinez-Odriozola P, Pérez-Alvarez R, Borraz Y, and Hidalgo R (2009) Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: The influence of age and sex. *Hepatology* **49**: 2001-2009.
- Miller MA (2001) Gender-based differences in the toxicity of pharmaceuticals - the Food and Drug Administration's perspective. *Int. J. Toxicol.* **20**: 149-152.
- Moult PJ and Sherlock S (1975) Halothane-related hepatitis. A clinical study of twenty-six cases. *Q. J. Med.* **44**: 99-114.
- Njoku D, Laster MJ, Gong DH, Eger II EI, Reed GF, 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.
- Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, and Lee WM (2002) Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann. Intern. Med.* **137**: 947-954.
- Ostensen M (1999) Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann. NY. Acad. Sci.* **876**: 131-143.
- 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.
- Ramaiah SK, and Jaeschke (2007) Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicol. Pathol.* **35**: 757-766.
- Russo MW, Galanko JA, Shrestha R, Fried MW, and Watkins P (2004) Liver transplantation for acute liver failure from drug induced liver injury in the United States. *Liver Transpl.* **10**: 1018-1023.
- Spracklin DK, Hankins DC, Fisher JM, Thummel KE, and Kharasch ED (1997) Cytochrome P450 2E1 is the principal catalyst of human oxidative halothane metabolism *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**: 400-411.
- Sugaya A, Sugiyama T, Yanase S, Shen XX, Minoura H, and Toyoda N (2000) Expression



of glucose transporter 4 mRNA in adipose tissue and skeletal muscle of ovariectomized rats treated with sex steroid hormones. *Life Sci.* **66**: 642-648.

Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, and Chaudry IH (2005) Current understanding of gender dimorphism in hepatic pathophysiology. *J. Surg. Res.* **128**: 147-156.

You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, and Ju C (2006) Role of neutrophils in mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology* **44**:1421-1431.

Yuan Y, Shimizu I, Shen M, Aoyagi E, Takenaka H, Itagaki T, Urada M, Sannomiya K, Kohno N, Shuno M, and Takayama T (2008) Effects of estradiol and progesterone on the proinflammatory cytokine production by mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.* **14**: 2200-2207.

Waxman DJ, and Holloway MG (2009) Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol. Pharmacol.* **76**: 215-228.

Wood GA, Fata JE, Watson KL, and Khokha R (2007) Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction* **133**: 1035-1044.

#### E. 結論

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。その結果、HAL 誘導性肝障害に対して、E2 は肝障害減弱作用、Prog が肝障害悪化作用を有することを明らかにし、これらの作用は主に免疫反応を調節して生じることが示唆された。さらに、Prog 投与によって HAL 誘導性肝障害の悪化が認められたことは、臨床報告において女性に肝障害悪化が生じやすいことと

関係があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yasuyuki Toyoda, Taishi Miyashita,

Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Tatsuki

Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.

Estradiol and progesterone modulate

halothane-induced liver injury in mice.

*Toxicol. Lett.*, in press.

##### 2. 学会発表

吉川幸孝、豊田泰之、津久井通、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：薬物誘導性肝障害に対する Tamoxifen による肝保護作用、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

Yukitaka Yoshikawa, Yasuyuki Toyoda, Satonori Higuchi, Tohru Tsuku, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Mechanism of hepatoprotective effect of tamoxifen against drug-induced liver injury. 9th International ISSX Meeting. 2010.9.4-8 Istanbul-Tukey

#### H. 知的財産権の出願・登録

該当なし。

プロゲステロンによる薬物誘導性肝障害悪化メカニズムの解明

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

前章において、Prog が肝障害悪化作用を有することが示唆されたことから、そのメカニズムを解明することを目的として検討を行った。HAL だけでなく他の肝障害性化合物においても Prog 投与による肝障害悪化作用が認められ、これらは CXCL1 を初めとする免疫因子の活性化を介していることを見出した。さらに、これらの免疫因子の活性化には ERK 経路の活性化や、クッパー細胞が関与し、Prog による肝障害悪化に寄与していることが示された。また、PR のアンタゴニストである RU を肝障害惹起後に投与した際にも、HAL 誘導性肝障害を減弱させることを示した。本研究では、女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の程度に影響を与えることを示した。また、Prog が ERK 経路やクッパー細胞を介して薬物誘導性肝障害の悪化に寄与することを初めて明らかにし、これらの女性ホルモンが薬物誘導性肝障害の性差メカニズムの一因になりうる可能性を示した。さらに、肝障害惹起後の RU 投与により肝障害減弱が認められたことから、薬物誘導性肝障害に対する新たな治療手段になりうることを期待される。

A. 研究目的

一般に DILI のリスクファクターの一つに女性が挙げられており、臨床において男性に比べ、女性で DILI 発症率や重篤な DILI 患者が多いことが報告されている。第 I 章での検討より、女性ホルモンである E2 および Prog が HAL 誘導性肝障害の程度に影響を及ぼすことが示された。E2 の肝保護作用については広く研究されているが、Prog と肝障害との関連性についてはほとんど報告されておらず、臨床で重篤な DILI 発症が女性に多いことのメカニズムについては不明のままである。本章では肝障害悪化作用の認められた Prog に

着目し、HAL に加え Thioacetamide (TA)、Dicloxacillin (DCX) および ANIT を用いて、Prog による DILI 悪化のメカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

Prog 前投与 BALB/c マウスに対する薬物投与については、BALB/c マウス（雄性および雌性、8 週齢 16~21 g; 日本 SLC）を用いた。薬物は HAL (15 or 30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*)、Iso (15 mmol/kg in olive oil, *i.p.*)、DCX (600 mg/kg in saline, *i.p.*)、ANIT (80 mg/kg in olive oil, *p.o.*) または TA (50 mg/kg in saline, *i.p.*) を投与し

た。各群3~5匹のマウスを使用した。HAL、Iso、ANIT および TA 投与群は投与 24 時間後に、DCX 投与群は投与 6 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。また、ANIT 投与群は投与前 18 時間絶食を行い、投与 2 時間後に給餌を再開した。

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、北海道システムサイエンスに依頼した。使用したアジレントアレイは Whole Mouse Genome Oligo であり、スライドに搭載されている 41,000 個以上の遺伝子および転写産物を解析した。遺伝子発現は Agilent Technologies Microarray Scanner を用いて 5  $\mu\text{m}$  の解像度でスキャンした。スキャンの結果得られた数値化データを、GeneSpring にインポートし、ノーマライゼーションを行い、各シグナル値やフラグ情報を集めた解析用データを作成した。

ELISA による CXCL1 および CXCL2 タンパク質の定量は、得られたマウス血漿中の CXCL1 および CXCL2 タンパク質濃度を Quantikine Mouse CXCL1/KC ELISA および Quantikine Mouse CXCL2/MIP-2 ELISA は以下の方法で測定を行った。96 well マイクロプレートに Assay diluent を 50  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、Calibrator Diluent で 2 倍希釈したサンプルおよび段階希釈を行った検量線サンプルを 50  $\mu\text{L}$  加え、室温で 2 時間静置した。Wash Buffer で 5 回洗浄した後、Mouse CXCL1 conjugate または Mouse CXCL2 conjugate を添加し、室温で 2 時間静置した。Wash Buffer で 5 回洗浄した後、100  $\mu\text{L}$  の Substrate Solution を加え、遮光し室温

で 30 分間静置後に、100  $\mu\text{L}$  の Stop Solution を 100  $\mu\text{L}$  添加し反応を停止させた。570 nm を対照とし、450 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定した。

薬物および阻害剤処置については、RAW264.7 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/well になるように 12 well plate に 1 mL/well ずつ播種し、24 時間後に Prog (0.01、0.1 および 1.0  $\mu\text{M}$ ) を含む DMEM に交換した。また、同時に PR アンタゴニストである RU (1  $\mu\text{M}$ ) および ER アンタゴニストである ICI (1  $\mu\text{M}$ ) を、MAPK 阻害剤として ERK 活性化阻害剤である U0126、P38 活性化阻害剤である SB203580 および JNK 活性化阻害剤である SP600125 を各 1  $\mu\text{M}$  処置した。Prog 処置 24 時間と 48 時間後に細胞を回収した。HAL 投与マウスに対する RU 投与については、BALB/c マウス (雌性、8 週齢 16~21 g) を用いた。RU 前投与の検討では、RU (50  $\mu\text{g}/\text{head}$  in olive oil, *s.c.*) を 7 日間連続投与し、最終投与 1.5 時間後に HAL (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) を投与した。RU 後投与の検討では、HAL (30 mmol/kg in olive oil, *i.p.*) 投与 1 時間後に RU (1 mg/kg in saline, *i.v.*) を投与した。いずれも HAL 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。

統計解析については、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 Dunnet 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. 肝障害性化合物誘導性肝障害に対する Prog 前投与の影響

Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害の悪化が、その他の毒性発現機序の異なる肝障害性化合物の投与においても認められるか検討するために、TA、ANIT および DCX 誘導性肝障害に対する Prog の影響について検討した。投与法は II-2-2 に記載した方法によった。TA、ANIT および DCX 投与において、化合物単独投与群と比較して Prog 前投与群で血漿 ALT 値および AST 値の有意な上昇が認められた (Fig. 1)。また、肝組織学的評価において、TA および ANIT 投与群と比較して、Prog 前投与群で肝細胞障害の悪化と好中球や好酸球の浸潤の増加が認められた (Fig. 2)。今回検討した全ての肝障害性を示す化合物投与において Prog 前投与による肝障害悪化が認められた。以上の結果から、Prog による肝障害悪化は HAL 特異的では

なく、TA や ANIT などその他の肝障害性を示す化合物においても認められることが示された。

雌性 BALB/c マウスにおいて Prog 前投与により肝障害性化合物による肝障害悪化が認められたことから、雄性 BALB/c マウスにおける Prog 前投与の影響について検討した。投与法は雌性マウスと同様に II-2-2 に記載した方法によった。HAL、TA および ANIT 投与では、雄性マウスは雌性マウスと同程度の ALT 値および AST 値の増加が認められたが、Prog 前投与による血漿 ALT 値および AST 値の変化は認められなかった (Fig. 9)。この結果から、雄性マウスではいずれの肝障害性化合物においても Prog 前投与による肝障害悪化は認められず、今回の Prog による肝障害悪化は雌性マウスでのみ顕著に認められることが示された。

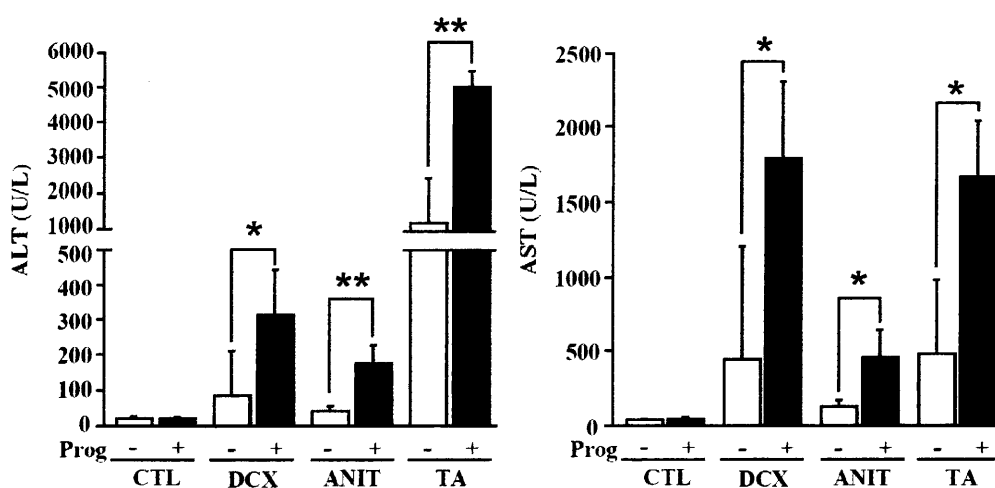


Fig. 7. Effects of Prog on various hepatotoxic compounds-induced liver injury. Mice (female, 8-week old) were pretreated with Prog (0.3 mg/mouse, *s.c.*) or vehicle (CTL: olive oil) for 7 days followed by administration of TA (50 mg/kg, *i.p.*), ANIT (80 mg/kg, *p.o.*) or DCX (600 mg/kg, *i.p.*) 1.5 h after the last treatment of Prog. ALT and AST were measured 6 h (DCX) or 24 h (TA and ANIT) after the compound administration. The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice.

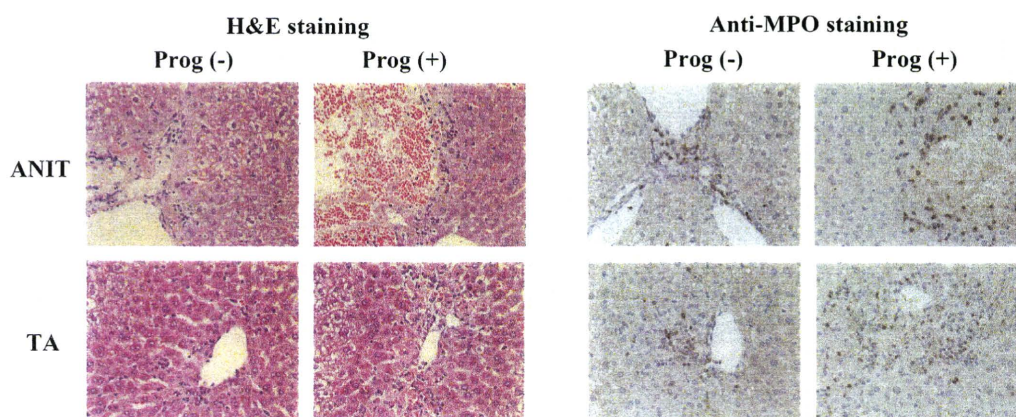


Fig. 8. Effects of Prog on various compounds-induced liver injury in female mouse. Mice pretreated with Prog for 7days were administered TA (50 mg/kg, *i.p.*) or ANIT (80 mg/kg, *p.o.*) 1.5 h after the last treatment of Prog. Liver sample were collected 24 h after the TA or ANIT administration. Liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody.

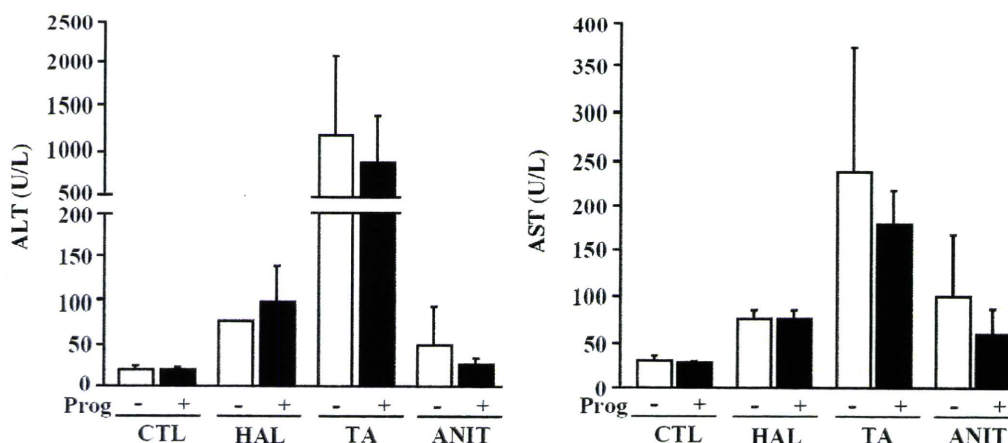


Fig. 9. Effects of Prog on various compounds-induced liver injury in male mouse. Male mice pretreated with Prog for 7days were administered HAL (15 mmol/kg, *i.p.*), TA (50 mg/kg, *i.p.*) or ANIT (80 mg/kg, *p.o.*) 1.5 h after the last treatment of Prog. ALT and AST were measured at 24 h after the administration. The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice.

### C-2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

Prog 前投与による肝障害悪化の原因およびメカニズムを解明するために、DNA マイクロアレイによるマウス全遺伝子の

網羅的解析を行った。DNA マイクロアレイは CTL 群、Prog 単独投与群、Prog+HAL 投与群、Prog+TA 投与群、Prog+ANIT 投与群、Prog+DCX 投与群および Prog+Iso 投与群のサンプルを用いて解析を行った。

CTL 群と比較して 2 倍以上の上昇が認められた遺伝子数は、Prog 単独投与群では 1419 個、Prog+HAL 群では 3208 個、Prog+TA 群では 4943 個、Prog+ANIT 群では 2562 個、Prog+DCX 群では 5055 個および Prog+Iso 投与群では 1829 個であった。また、CTL 群と比較して 0.5 倍以下に減少

した遺伝子数は Prog 単独投与群では 1279 個、Prog+HAL 群では 5277 個、Prog+TA 群では 5685 個、Prog+ANIT 群では 2623 個、Prog+DCX 群では 4284 個および Prog+Iso 投与群では 1332 個であった (Table 3)。

**Table 3. The number of genes altered by Prog treatment compared with CTL investigated by DNA array analyses.**

Sample	2.0 fold >	0.5 fold <
Prog	1419	1279
Prog+HAL	3208	5277
Prog+TA	4943	5685
Prog+ANIT	2562	2623
Prog+DCX	5055	4284
Prog+Iso	1829	1332

CTL 群と比較して全ての群に共通して 2 倍以上の上昇が認められた遺伝子数は 515 個であり、共通して 0.5 倍以下の減少が認められた遺伝子数は 709 個であった (Fig. 10)。また、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) のデータベースを用いて、Prog と肝障害性化合物を併用した群の中で、3 群以上で共通して 2 倍以上の上昇が認められた 1527 遺伝子および 0.5 倍以下の減少が認められた 2018 遺伝子と関連のある遺伝子セットを検索するために、GO

(Gene ontology) 解析を行った (Dennis et al., 2003; Huang et al., 2009)。2 倍以上の上昇が認められた遺伝子はサイトカインやケモカイン、アポトーシス、発がんおよび MAPK などに関する遺伝子群に含まれることが示された。また、0.5 倍以下の減少が認められた遺伝子の多くはホルモンや代謝に関与する遺伝子群に含まれることが示された (Table 4)。

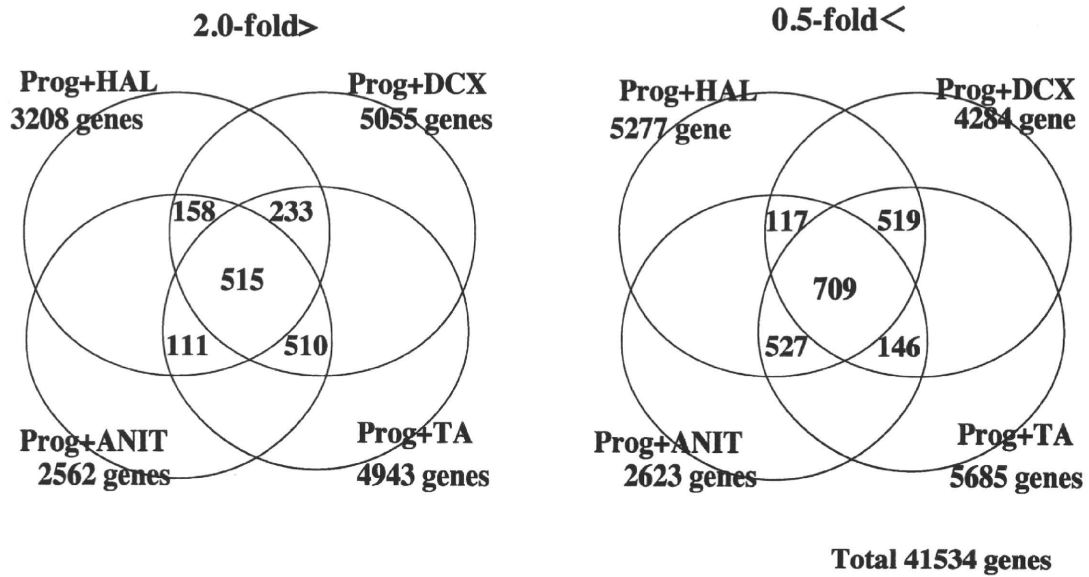


Fig. 10. Venn diagram depiction of probe set regulation of Prog-only-, Prog+HAL-, Prog+TA-, Prog+ANIT-, Prog+DCX and Prog+Iso-administered mice relative to CTL.

**Table 4. Gene categories associated with genes specifically changed by HAL-, TA-, ANIT-, or DCX-induced liver injury in mice pretreated with Prog.**

2-fold >			0.5-fold <		
Term	Genes	P-Value	Term	Genes	P-Value
Cytokine-cytokine receptor interaction	40	2.80E-11	ABC transporters	10	1.50E-03
Pathways in cancer	33	1.00E-04	Steroid hormone biosynthesis	10	1.50E-03
Jak-STAT signaling pathway	20	1.50E-04	Nitrogen metabolism	7	2.30E-03
NOD-like receptor signaling pathway	12	1.80E-04	Androgen and Estrogen metabolism	8	3.60E-03
MAPK signaling pathway	28	2.30E-04	Starch and sucrose metabolism	8	5.90E-03
Toll-like receptor signaling pathway	15	3.10E-04	Adipocytokine signaling pathway	11	7.90E-03
p53 signaling pathway	12	4.90E-04	Glycolate and dicarboxylate metabolism	5	1.50E-02
Chronic myeloid leukemia	11	3.90E-03	Arginine and proline metabolism	9	1.60E-02
Bladder cancer	8	4.00E-03	Histidine metabolism	6	6.30E-02
Hematopoietic cell lineage	11	7.90E-03	Calcium signaling pathway	19	5.00E-02
Small cell lung cancer	11	8.60E-03	Prion disease	6	6.30E-02
TGF-beta signaling pathway	11	1.00E-02	Galactose metabolism	5	8.30E-02
Type-1 diabetes mellitus	9	1.20E-02	Insulin signaling pathway	14	8.70E-02
Chemokine signaling pathway	17	1.70E-02	Drug metabolism	9	9.30E-02
Endocytosis	18	2.10E-02	Complement and coagulation cascade	9	9.30E-02
ErbB signaling pathway	10	2.70E-02			
Cell adhesion molecules	14	4.00E-02			
Cell cycle	12	5.00E-02			
Melanoma	8	5.90E-02			
Colorectal cancer	9	6.00E-02			
Pancreatic cancer	8	6.30E-02			
Apoptosis	9	6.40E-02			

本研究では Prog による肝障害悪化に関与する遺伝子の特定を目的としているため、0.5 倍以下の減少を示した遺伝子は肝保護的に働き、肝障害悪化に寄与する可能性が考えられるが、GO 解析の結果より肝障害悪化に対して直接的に作用する原因とはなり難いと考え、本検討において減少した遺伝子群は候補から外すこととした。

Prog と肝障害性化合物を併用した 3 群以上で共通して 2 倍以上の上昇が認められた 1527 遺伝子の中で、Prog 単独投与群においても 2 倍以上の上昇が認められ、Prog+Iso 群では Prog 単独投与群と同程度

の上昇が認められた遺伝子は 212 個であった。この 212 遺伝子の中から、Prog 単独投与で 5 倍以上の増加が認められた CXCL1 および C-type lectin domain family 4, member e (Clec4e)、Prog+肝障害性化合物投与群で Prog 単独投与群に比べ増加が認められた C-type lectin domain family 4, member d (Clec 4d) と Chitinase 3-like 3 (Chi3l3)、また PR 下流遺伝子と報告されており、Prog+肝障害性化合物投与群で顕著な増加が認められた Immunoresponsive gene 1 (Irg1) および Resistin like gamma (Retnlg) の 6 種類を候補遺伝子とした (Table 5)。

**Table 5. Candidate genes for Prog-induced exacerbation of liver injury.**

Gene name	Common name	Prog*	Prog +HAL*	Prog +TA*	Prog +ANIT*	Prog +DCX*	Prog +Iso*
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	5.4	2.88	5.27	14.02	15.09	2.36
C-type lectin domain family 4, member e	Clec4e	5.15	40.11	105.72	13.32	81.85	12.88
C-type lectin domain family 4, member d	Clec4d	2.96	24.59	34.14	12.55	114.99	6.08
Chitinase 3-like 3	Chi3l3	2.25	24.53	19.15	6.78	7.56	2.17
Immunoresponsive gene 1	Irg1	0.84	6.09	84.23	2.76	34.19	3.21
Resistin like gamma	Retnlg	1.84	36.77	19.24	7.96	54.52	3.26

\* fold change compared with CTL

### C-3 肝障害性化合物投与における候補遺伝子の発現変動

Prog 投与および化合物投与時における候補遺伝子の mRNA 発現変動を RT-PCR にて検討した。候補遺伝子全てにおいて Prog+HAL 群では、CTL 群と比較して顕著な増加が認められたが、Prog 単独投与群で

有意な発現増加が認められたのは CXCL1 のみであった。また、CXCL1 mRNA 発現は RU の併用による減少が認められた。Clec4e および Retnlg は肝障害悪化の認められなかった Iso 投与での有意な発現増加が認められた (Fig. 11)。



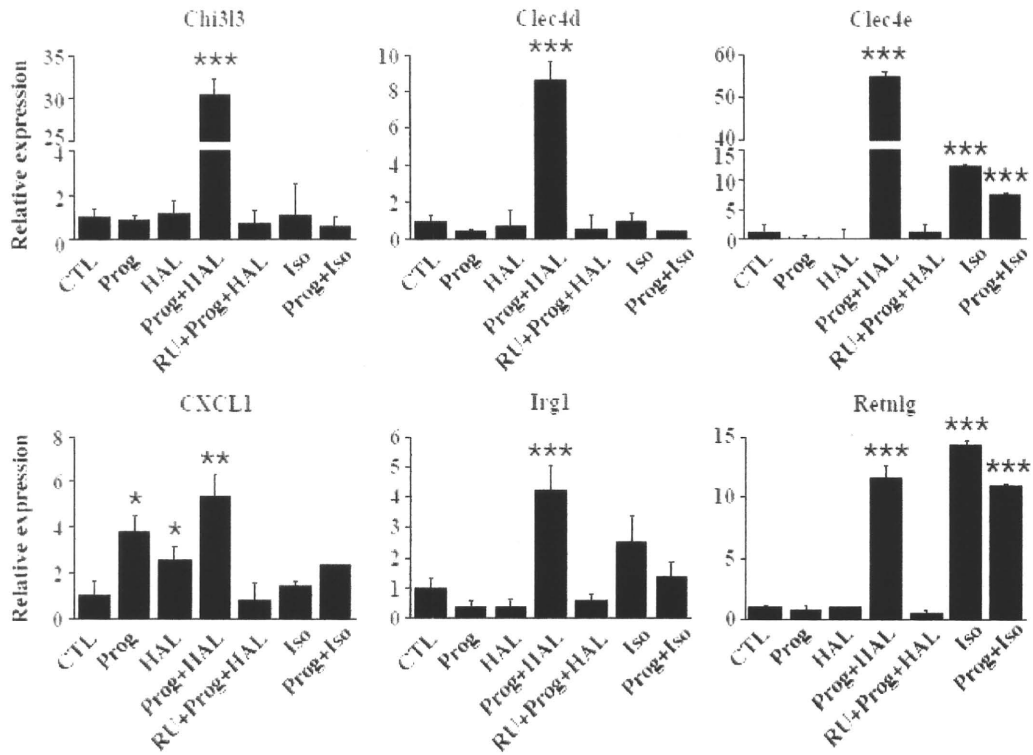


Fig. 11. Effects of HAL administration on the hepatic expression of candidate genes. Mice pretreated with Prog for 7 days were administered HAL or Iso. In experiments using RU, mice were treated with RU 0.5 h prior to the treatment with Prog. Liver samples are collected 24h after the HAL or Iso administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , compared with CTL.

続いて、TA、ANIT および DCX 投与時における候補遺伝子の mRNA 発現変動を検討した。その結果、Prog 投与時に全ての肝障害性化合物で、化合物単独投与群と比較して、Clec4d、Clec4e、CXCL1 および Retnlg mRNA 発現の有意な増加が認められた。Chi3l3 と Irg1 では全ての肝障害性化合物に共通して Prog 前投与時に発現増加は認められなかった (Fig. 12)。DNA マイクロアレイ解析の結果より、Prog 単独投与群において全ての候補遺伝

子で発現増加が認められると考えられたが、CXCL1 以外の遺伝子では増加が認められず、再現性が得られなかった。CXCL1 は好中球遊走に関わる CXC ケモカインの一つであることと、第 I 章において、Prog+HAL 群で好中球浸潤が強く認められていることから (Fig. 3)、Prog による肝障害悪化には CXCL1 が大きく寄与していることが示唆された。これより、CXCL1 を第一候補として詳細な検討を行うこととした。

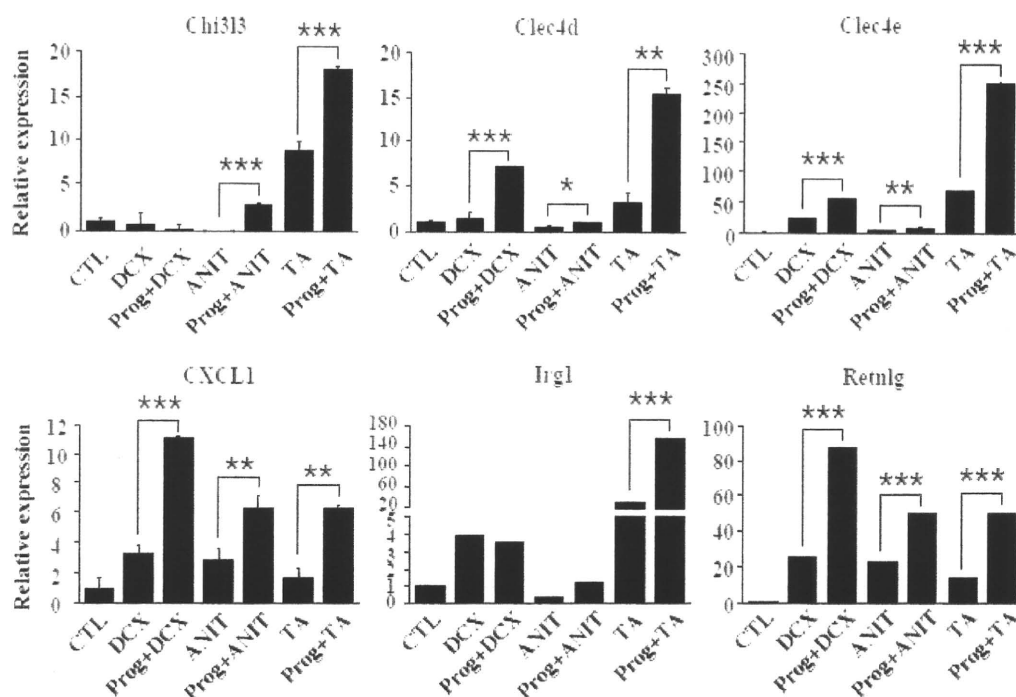


Fig. 12. Effects of various compounds administration on the hepatic expression of candidate genes. Mice pretreated with Prog for 7 days were administered DCX, ANIT or TA. Liver samples are collected 6h (DCX) or 24h (ANIT and TA) after the administration and relative expression of hepatic mRNA were measured. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice.

#### C-4 Prog 前投与による HAL 誘導性肝障害 に対する経時的変化

HAL 投与時間依存的な血漿トランスアミナーゼ値、TFA-adduct 生成量および CXCL1 など炎症に関与する因子の mRNA 発現量変動を II-2-9 の方法に従い検討した。これまでの結果同様に、雌性マウスでは各時間において HAL 15 mg/kg 投与による顕著な ALT 値の増加は認められなかった。Prog+HAL 群では HAL 投与 24 時間と 36 時間後に、HAL 単独投与群と比較して有意な ALT 値の増加および AST 値の増加傾向が認められた (Fig. 13)。続いて、投与時間依存的な TFA-adduct 生成量および肝臓

中 GSH 含量に与える影響について検討した。TFA-adduct 生成は HAL 投与 3 時間後から増加が認められ、時間依存的に増加し、投与 36 時間後に最も強いバンド強度が認められた。しかし、Prog 投与による TFA-adduct 生成パターンおよび生成量に変化は認められなかった (Fig. 14A)。また、肝臓中 GSH 含量は投与 3 時間から 24 時間後までの有意な減少が認められ、投与 12 時間後で最も低い値を示し、その後は回復傾向を示した。しかし、Prog 前投与による GSH 含量の変化は認められなかった (Fig. 14B)

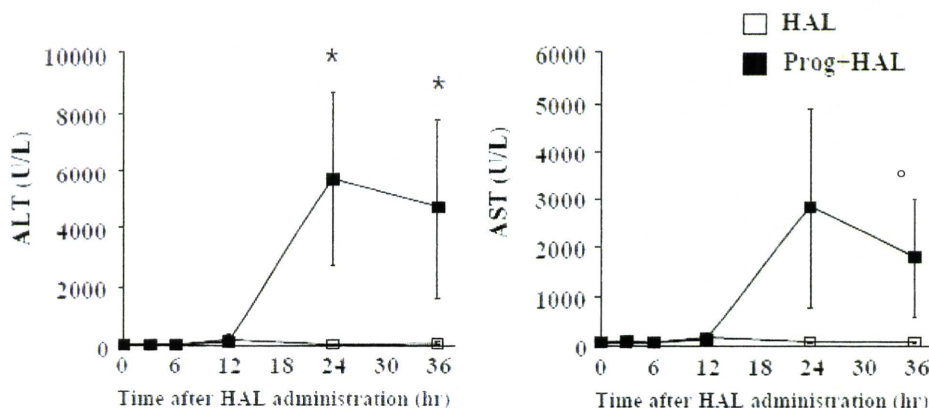


Fig. 13. Time-dependent effects of Prog treatment on HAL-induced liver injury. Female mice pretreated with Prog for 7 days were administered HAL (15 mmol/kg, *i.p.*). Plasma samples are collected 0, 3, 6, 12, 24 or 36 h after HAL administration. The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice. \* $P < 0.05$ , compared with only HAL administered mice.

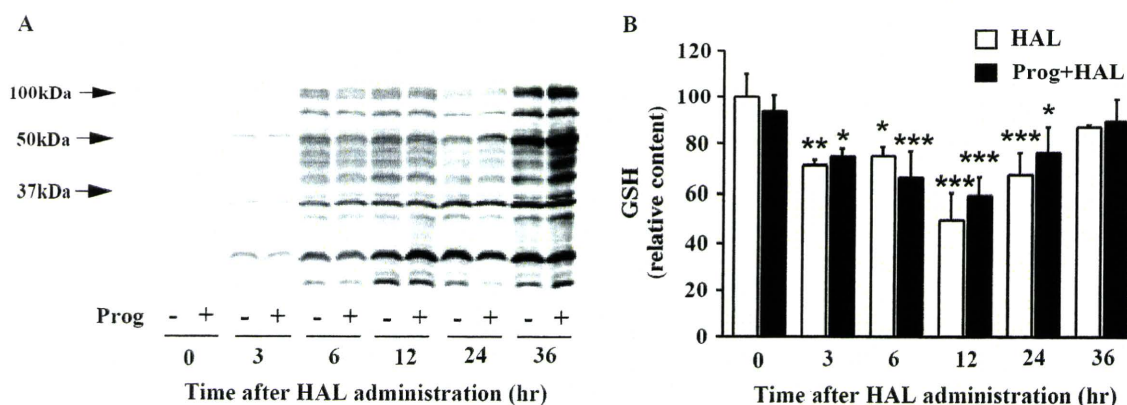


Fig. 14. Time-dependent changes of TFA-protein adducts and hepatic GSH content on HAL-induced liver injury. Female mice pretreated with Prog for 7 days were administered HAL (15 mmol/kg, *i.p.*). Liver samples are collected 0, 3, 6, 12, 24 or 36 h after HAL administration. Immunoblot of TFA-protein adducts were performed using whole liver homogenate. Each lane showed an individual mouse (30  $\mu$ g/lane) (A). Total GSH content in whole liver homogenate was measured (B). The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , compared with only HAL administered mice.

次に候補遺伝子として選択した CXCL1 に加えて、Prog による HAL 誘導性肝障害悪化時に上昇が認められ、CXCL1 と同じ好中球遊走に関わる CXC ケモカインである CXCL2、接着因子である ICAM-1 および炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  mRNA 発現量と血漿中タンパク質量を定量した。その結果を Fig. 15 に示す。CXCL1 では HAL 投与 3 時間後に最も高い mRNA 発現量を示し、36 時間後を除く全ての時点で HAL 群と比較して Prog+HAL 群での有意な増加が認められた。CXCL2 では HAL

投与 3 時間後から HAL 群と比較して Prog+HAL 群での有意な増加が認められ、HAL 投与 24 時間後に最も高い発現量を示した。ICAM-1 では HAL 投与 6 時間後に最も高い発現量を示し、投与後 6 時間から 24 時間にかけて HAL 群と比較して Prog+HAL 群での有意な発現増加が認められた。TNF $\alpha$  では投与 6 時間後から HAL 群と比較して Prog+HAL 群での有意な増加が認められた (Fig. 15A)。さらに、血漿中 CXCL1 および CXCL2 タンパク質を定量した結果、CXCL1 では HAL 投与 3 か

ら6時間後にピークを迎え、HAL投与0、3、6および24時間後にHAL群と比較してProg+HAL群での有意な増加が認められた (Fig. 15B)。また、CXCL2ではHAL投与24時間後にピークを迎え、HAL投与24および36時間後にHAL群と比較してProg+HAL群での有意な増加が認められた (Fig. 15B)。以上

の結果から、Prog前投与時においてHAL投与により早い時間でのCXCL1およびICAM-1の増加、さらにCXCL2やTNF $\alpha$ の増加が認められることを示した。また、血漿中タンパク質量と肝臓中mRNA発現量に相関関係が得られた。

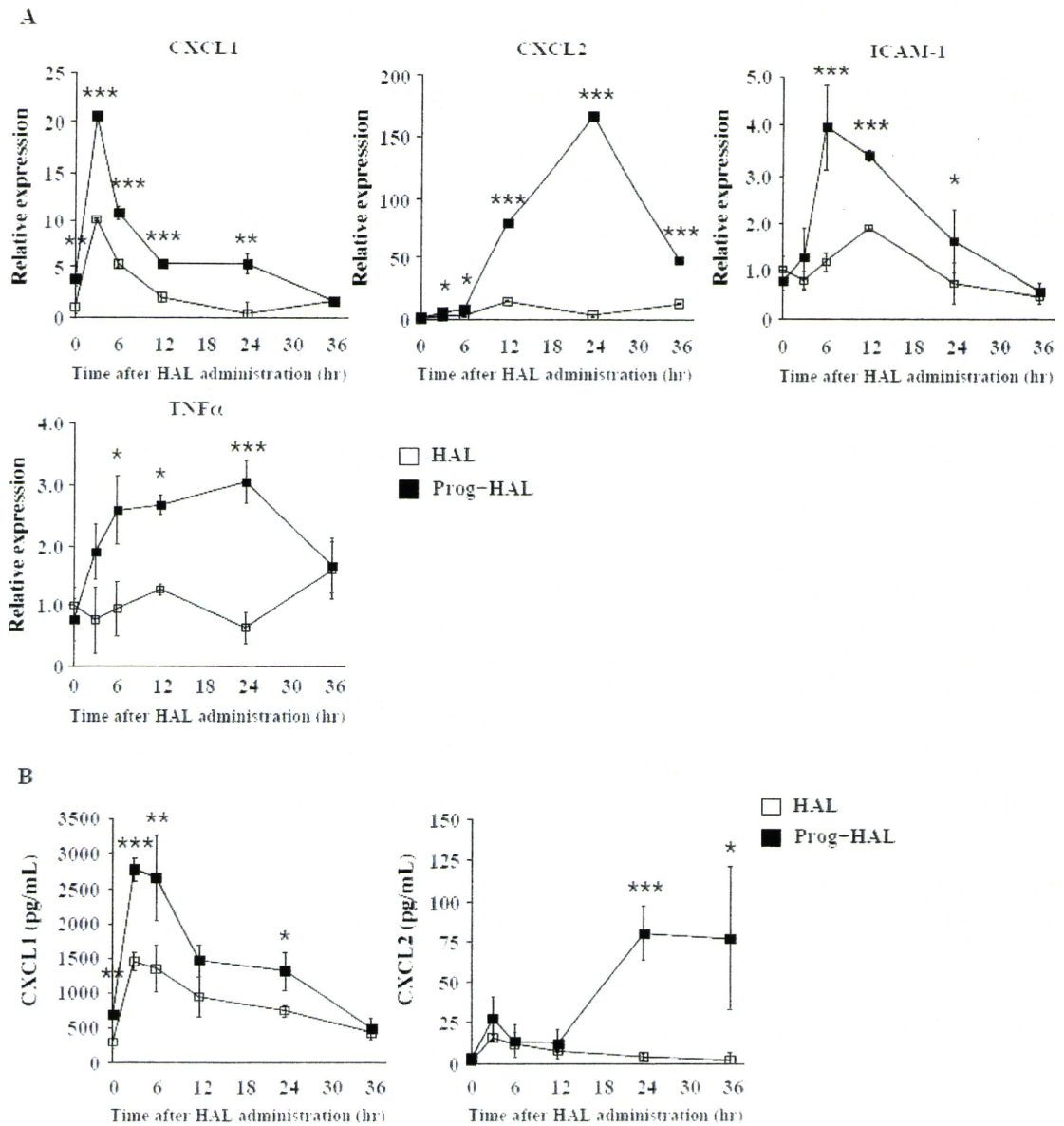


Fig. 15. Time-dependent changes of hepatic mRNA expression of Prog pretreatment on HAL-induced liver injury. Female mice pretreated with Prog for 7days were administered HAL (15 mmol/kg, *i.p.*). Liver and serum samples were collected 0, 3, 6, 12, 24 or 36 h after the HAL administration and relative expression of hepatic mRNA (A) and the release of protein (B) were measured. Expression of hepatic mRNA was normalized to Gapdh mRNA. The data are mean  $\pm$  SD of 3-4 mice. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001, compared with only HAL administered mice.