

p-フェネチジンおよび APAP を HLM、NADPH 生成系およびマウス由来の赤血球とインキュベートし、赤血球中のヘモグロビンが Met-Hb に変換される量を検討したところ、フェナセチン (0.1、1、5 mM) および *p*-フェネチジン (0.01、0.1、1 mM) 処置群において濃度依存的な Met-Hb 濃度の上昇が認められ、APAP (0.01、0.1、1 mM) においては Met-Hb 濃度の上昇は認められなかった。このことからフェナセチンの脱エチル化に付随する代謝経路は Met-Hb 生成に関与しないことが示された。また、*p*-フェネチジンにおいてフェナセチンより低濃度から Met-Hb 濃度の上昇が認められていることから、フェナセチンの加水分解反応が毒性発現に関与していることが示唆された。Met-Hb 濃度の上昇の原因として、フェナセチンがインキュベート中に自然分解され生成した *p*-フェネチジンが CYP1A2 により代謝されたことが考えられた。よって、フェナセチン誘導性 Met-Hb 血症の発現には AADAC による加水分解とそれに続く CYP1A2 および CYP2E1 による水酸化反応が大きく寄与していることが考えられた。また、AADAC が触媒する加水分解反応は芳香族アミンを生成する可能性があり、AADAC により加水分解される医薬品が新たに開発された場合、Met-Hb 血症に対して注意を払わなければならない。

E. 結論

(E-1) フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および発症

メカニズムの検討:フルクロキサシリン

誘導性肝障害モデルマウスにおいて免疫学的因子が発症および増悪に関与していることを明らかにした。その中でも HMGB1 と TLR4 が関係するシグナル伝達が発症に関与している可能性、さらに IL-17 が増悪因子である可能性を示すことができた。本研究により得られた結果はフルクロキサシリン誘導性肝障害および他の薬物性肝障害の発症メカニズム解明に有用な情報を提供しうると考えられる。

(E-2) カルバマゼピン誘導性肝障害のモデルマウスの作製およびメカニ

ズム解析:本研究では CBZ 誘導性肝障害モデルマウスを作出に成功し、肝障害のメカニズムを代謝・免疫の両面から明らかにした。本研究で作製した肝障害モデルと肝障害メカニズムの情報は、臨床における薬物誘導性肝障害発症の回避に繋がる研究に役立つものと期待される。

(E-3) α -ナフチルイソチオシアネート (ANIT) 誘導性肝障害モデルマウスにおける IL-17 の関与

: ANIT 誘導性肝障害モデルを用いた検討結果から、Th17 細胞で産生された IL-17 が MIP-2 産生活活性化を介して、好中球の遊走および活性化を促すことで肝障害を誘導することが示唆された。このことは IL-17 が薬物誘導性肝障害において重要な役割を果たしていることが示唆された。また、Th 細胞に関与する転写調節因子、サイトカインおよびケモカインを網羅的に評価する手法が特に免疫系を介した肝障害メカニズムを考察する上で有用であると考えられた。

(E-4) アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討 : THP-1 細胞や PBMC を用いて AG の免疫毒性を評価することが可能であった。また、DCF-AG は免疫学的機序による薬物性肝障害に関与することが示唆された。

(E-5) NASH および Steatosis モデルマウスに対するタモキシフェンの影響 : Steatosis および NASH モデルマウスにおいて TAM が肝障害改善作用を有することを明らかにした。臨床において、乳がん患者への TAM 投与により steatosis および NASH が発症するという報告があり問題となっている。またその原因の一つとして肥満が挙げられているが、詳細なメカニズムは解明されていない部分が多い。また、通常マウスへの TAM 投与による脂肪酸の増加が、steatosis の原因の一つと考えられているが、本検討における steatosis および NASH モデルマウスへの TAM 投与において、脂肪酸合成因子の変動は認められなかった。マウスにおいて E2 が肝障害に対する防御因子であることが示唆されているため、本検討における steatosis および NASH モデルマウスに対しても TAM による E2 作用により肝障害が減弱したと考えられる。

(E-6) フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する酵素の検討 : 本研究ではフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症には加水分解反応とそれに続く水酸化反応が関与していることを示し、これらの反応に AADAC、CYP1A2 および CYP2E1 の寄与が高いことを明らかにした。本研究は AADAC が毒性発現に関与

することを初めて明らかにしており、AADAC が薬物代謝における重要性を示す新たな情報を提供することが出来た。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 横井 毅. 第 II 相代謝の評価と創薬「医薬品開発に必要なストラテジー上」日本薬理学会編, 224-231 (2011).

(2) Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Toxicological implications of modulation of gene expression by microRNAs. *Toxicol. Sci.*, 123 : 1-14 (2011).

(3) Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol. Ther.*, 131:330-337 (2011).

(4) 中島 美紀. 薬物動態と microRNA, *ファルマシア*, 47: 141-145 (2011).

(5) Katsuhiko Mizuno, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human

- monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.*, 85: 199-207 (2011).
- (6) Toshihisa Koga, Ryoichi Fujiwara, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Toxicological evaluation of acyl glucuronides of NSAIDs using HEK293 cells stably expressing human UGT and human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, 39: 54-60 (2011).
- (7) Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Yukitaka Yoshikawa, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.*, 200: 139-145 (2011).
- (8) Yuko Abe, Ryoichi Fujiwara, Shingo Oda, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Interpretation for the effects of protein kinase C inhibitors on human UDP-glucuronosyltransferase 1A (UGT1A) proteins in cellulo. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 26: 256-265 (2011).
- (9) Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Hiroko Hosomi, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. CYP2C9-mediated metabolic activation of losartan detected by a highly sensitive cell-based screening assay. *Drug Metab. Dispos.*, 39: 838-846 (2011).
- (10) 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.*, 204: 17-24 (2011).
- (11) Toru Usui, Takanori Hashizume, Takashi Katsumata, Tsuyoshi Yokoi, and Setsuko Komuro. In vivo investigation of the glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for troglitazone-induced liver injury. *Drug Metab. Dispos.*, 39: 1303-1310 (2011).
- (12) Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Atsushi Iwamura, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation. *Drug Metab. Dispos.*, 39: 1388-1395 (2011).
- (13) Shingo Oda, Miki Nakajima, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Progesterone receptor membrane component 1 modulates human cytochrome P450 activities in an isoform-dependent manner. *Drug Metab. Dispos.*, 39: 2057-2065 (2011).
- (14) Yasuyuki Toyoda, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Taishi Miyashita, Azusa Yano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.

Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, 126: 16-27 (2012).

(15) Azusa Yano, Satonori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice. *Toxicology*, 293: 107-114 (2012).

(16) Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J. Appl. Toxicol.*, in press.

(17) Masanori Kobayashi, Satonori Higuchi, Mika Ide, Satomi Nishikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Th2 cytokine-mediated methimazole-induced acute liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表

(1) Shingo Oda, Miki Nakajima, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. PGRMC1 interacts with human drug-metabolizing P450s to modulate their activities. 4th Asia Pacific ISSX

Meeting, 2011.4.22-25, Tainan, Taiwan.

(2) 古賀利久、藤原亮一、深見達基、中島美紀、樫山英二、横井 毅：アシルグルクロニドの細胞毒性および遺伝毒性に関する検討 第 18 回 HAB 研究機構学術年会 2011.5.21-22 ポスター 東京

(3) 宮下泰志、豊田泰之、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：Steatosis および NASH モデルマウスに対するタモキシフェンの影響、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 2011.7.11-13 口頭&ポスター 横浜

(4) 矢野 梓、樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：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、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 2011.7.11-13 口頭&ポスター 横浜

(5) 遠藤慎也、豊田泰之、深見達基、中島美紀、横井 毅：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、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 2011.7.11-13 口頭&ポスター 横浜

(6) 豊田泰之、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女性ホルモンの影響、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 2011.7.11-13
ポスター 横浜
- (7) 小林雅典、樋口悟法、深見達基、中島美紀、横井 毅：
Methimazole 誘導性肝障害への IL-4 の関与、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会
2011.7.11-13 ポスター 横浜
- (8) Toru Usui, Takanori Hashizume, Takashi Katsumata, Setsuko Komuro, Tsuyoshi Yokoi, and Masashi Yabuki. In vitro investigation of the glutathione transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for troglitazone-induced liver injury. 第 24 回日本薬物動態学会年会 2011.11.16-18 広島
- (9) Masakazu Kakuni, Mayu Morita, Yumiko Katoh, Miki Nakajima, Chise Tateno, and Tsuyoshi Yokoi.
Troglitazone-induced liver toxicity in chimeric mice with humanized liver. 第 24 回日本薬物動態学会年会 2011.11.16-18 広島
- (10) Shingo Oda, Miki Nakajima, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Epigenetic regulation contributes to defective expression of UGT1A1 in human kidney. 第 24 回日本薬物動態学会年会 2011.11.16-18
口頭 広島
- (11) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：カルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウス作製およびメカニズム解析 日本薬学会第 132 年会
2012.3.28-31 口頭 札幌
- (12) 高井翔平、樋口悟法、常山幸一、矢野 梓、深見達基、中島美紀、横井 毅：フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおける免疫学的因子の関与 日本薬学会第 132 年会 2012.3.28-31
ポスター 札幌
- (13) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：カルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウス作製およびメカニズム解析 日本薬学会第 132 年会
2012.3.28-31 口頭 札幌
- (14) 小林祐喜、深見達基、中島美紀、横井 毅：フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症における arylacetamide deacetylase

- (AADAC)および CYP1A2、
CYP2E1 の関与 日本薬学会第
132 年会 2012.3.28-31 口頭
札幌
- (15) 高井翔平、樋口悟法、常山幸一、
矢野 梓、深見達基、中島美紀、
横井 毅：フルクロキサシリン誘
導性肝障害モデルマウスにおけ
る免疫学的因子の関与 日本薬
学会第 132 年会 2012.3.28-31
ポスター 札幌
- (16) Shingo Oda, Miki Nakajima,
Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi
Yokoi: Epigenetic regulation is a
crucial factor for defective
expression of UGT1A1 in
human kidney. 19th
Microsomes and Drug
Oxidations and 12th European
International Society for the
Study of Xenobiotics Meeting.
2012.6.17-21 Poster, Noordwijk
aan Zee, the Netherlands.
- (17) 矢野 梓、深見達基、中島美紀、
横井 毅：薬物性肝障害の発症機
序の解明研究 第 39 回日本毒性
学会学術年会 2012.7.17-19
シンポジウム 仙台
- (18) 小林祐喜、深見達基、樋口良太、
中島美紀、横井 毅：フェナセチ
ンによるメトヘモグロビン血症
におけるアリルアセタミドデア
セチラーゼの関与 第 39 回日本
毒性学会学術年会
2012.7.17-19 ポスター 仙台
- (19) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、
中島美紀、横井 毅：カルバマゼ
ピン誘導性肝障害における代謝
的活性化と炎症の関与 第 39 回
日本毒性学会学術年会
2012.7.17-19 ポスター 仙台
- (20) 高井翔平、樋口悟法、矢野 梓、
常山幸一、深見達基、中島美紀、
横井 毅：フルクロキサシリン誘
導性肝障害モデルマウスによる
発症メカニズムの解析 第 39 回
日本毒性学会学術年会
2012.7.17-19 ポスター 仙台
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の
作用機序解明と予測評価試験系の開発研究

平成 23 年度 分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

分担研究者 中 島 美 紀

深 見 達 基

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスの作製および
発症メカニズムの検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

医薬品による重篤な副作用の中で薬物性肝障害の報告数は多く、我が国においては 2007 年に 2,473 例の報告がある。また、薬物性肝障害は市販後の警告および自主回収の主要な原因であり、臨床試験または市販後において肝毒性が明らかとなった場合には製薬企業の経営を圧迫する。したがって、医薬品開発の段階で新薬の肝毒性を回避することは患者および製薬企業にとって重要な課題である。

薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、特に抗菌薬は薬物性肝障害の注意喚起が多いことで知られている。抗菌薬の中でもイソキサゾリル系の合成ペニシリンであるフルクロキサシリンはペニシリンナーゼ耐性をもつ優れた抗生物質であり、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が関与する感染症に適用される。しかし、フルクロキサシリンを服用した患者においてまれに重篤な肝障害を発症することがあり、重篤化した患者の中には死亡例や肝移植例も報告されている。発症頻度は 10 万人に 8.5 人であり、比較的高い割合である。フルクロキサシリンにより肝障害を発症した患者の中には発熱、好酸球増多、免疫細胞の浸潤といったアレルギー様の症状を伴うことより、免疫反応の関与が示唆されている。現在までの報告では、ヒトにおいて CYP3A4 により代謝されることで生成される 5'-hydroxymethylflucloxacillin が肝細胞および胆管上皮細胞で毒性を示すこと、フルクロキサシリン投与によりラットで肝臓のタンパク質と adduct を形成すること、ヒト血清アルブミンとフルクロキサシリンが adduct を形成することが報告されている。しかし、フルクロキサシリン誘導性肝障害を実験動物で再現した例はなく、また免疫学的因子に着目してメカニズムを研究した報告もない。そこで、本研究はフルクロキサシリン誘導性肝障害をマウスで再現し、その発症メカニズムを解明することを目的とした。その結果、本研究においてフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおいて免疫学的因子が発症および増悪に関与していることを明らかにした。その中でも HMGB1 と TLR4 が関係するシグナル伝達が発症に関与している可能性、さらに IL-17 が増悪因子である可能性を示すことができた。本研究により得られた結果はフルクロキサシリン誘導性肝障害および他の薬物性肝障害の発症メカニズム解明に有用な情報を提供しうると考えられる。

A. 研究目的

医薬品による重篤な副作用の中で薬物性肝障害の報告数は多く、我が国においては 2007 年に 2,473 例の報告がある (Kaniwa and Hasegawa, 2009)。また、薬物性肝障害は市販後の警告および自主回収の主要な原因であり (Kaplowitz, 2005)、臨床試験または市販後において肝毒性が明らかとなった場合には製薬企業の経営を圧迫することは必至である。したがって、医薬品開発の段階で新薬の肝毒性を回避することは患者および製薬企業にとって重要な課題である。

薬物性肝障害は大きく中毒性と特異体質性の 2 つに分類できる。中毒性の薬物性肝障害は用量依存性であり、薬物または代謝物そのものが毒性を持つ。一方特異体質性の薬物性肝障害は用量非依存性であり、メカニズムによってアレルギー性および代謝性の 2 種類に分類される。アレルギー性による場合、薬物服用から 1 カ月前後で発症し、発熱、薬疹、好酸球増多を伴うことが多く、自己抗体が検出されることもある。一方、代謝性によるものは薬物服用から肝障害発症までの期間が数カ月と長く、肝臓への薬物の蓄積または薬物により軽度に肝細胞が炎症を受け、修復が追いつかないことが原因であると考えられている (Kaplowitz, 2005)。特異体質性の薬物性肝障害は実験動物での再現が困難であり、市販後に多くの患者が服用することで初めて肝毒性が明らかになることが多く、発症機序は不明な点が多い。例えば、経口糖尿病薬

であるトログリタゾンとは 2 年間のがん原性試験を含めた前臨床試験において肝毒性が一切認められていなかったが、市販後に劇症肝炎による死亡例が報告され、市場から撤退した (Watanabe et al., 1999)。したがって、現在肝毒性の報告がある薬物による肝障害の発症メカニズムを解明することは、今後開発される新薬の肝毒性を予測するための重要な情報を提供できると考えられるが、情報量が未だ少ないままである。

肝臓には Kupper 細胞、NKT 細胞、NK 細胞といった自然免疫細胞が多数存在することが知られており、近年これらの自然免疫細胞が薬物性肝障害の発症に寄与していると考えられている。現在までに、アセトアミノフェン誘導性肝障害において Kupper 細胞、好中球、NKT 細胞、NK 細胞の関与 (Liu and Kaplowitz, 2006)、ハロタン誘導性肝障害において好中球 (You et al., 2006)、NKT 細胞 (Cheng et al., 2010) および NK 細胞 (Dugan et al., 2011) の関与が報告されている。また、さらなる詳細なメカニズムとして、自然免疫細胞に発現する Toll like receptor (TLR) が注目を集めている。TLR は pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識するパターン認識受容体であり、リガンドの結合により炎症性サイトカインの産生を亢進し、免疫細胞を活性化することで宿主防衛に働く。また、TLR には壊死細胞および免疫細胞から放出される内因性のリガンドも多数報告されており、high mobility group box 1 (HMGB1) や S100 タンパク質を含めて、

damage-associated molecular patterns (DAMPs) と総称されている。また、TLR は感染症に対する防御だけではなく関節リウマチ、糖尿病、喘息およびアテローム性動脈硬化症といった疾患との関与が示唆されている (Keogh and Parker., 2011)。肝障害においても TLR の関与を示唆する報告があり、中でも TLR4 の関与についての報告が多く、現在までにアルコール性肝障害 (Uesugi et al., 2001)、肝虚血再灌流 (Tsong et al., 2005)、アセトアミノフェン誘導性肝障害 (Yohe et al., 2006) およびハロタン誘導性肝障害 (Dugan et al., 2011) において TLR4 との関与が報告されている。

Helper T (Th) 細胞に関連する因子の肝障害への関与も報告されている。例えば、ハロタン誘導性肝障害においては interleukin (IL)-17 (Kobayashi et al., 2009)、ジクロキサシリン誘導性肝障害およびフルタミド誘導性肝障害において IL-4 が関与することが報告されている (Higuchi et al., 2011; Higuchi et al., in press)。IL-17 は Th17 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、マクロファージから放出されるサイトカインであり、好中球の活性化に寄与する強力な炎症性サイトカインである。IL-4 は Th2 細胞に関与する因子であり、Th2 細胞を増殖させる作用がある。このように、Th 細胞に関連する免疫学的因子は肝障害を増悪させる作用がある。

薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、特に抗菌薬は薬物性肝障害の注意喚起が多いことで知られている

(Verma S and Kaplowitz N., 2009)。抗菌薬の中でもイソキサゾリル系の合成ペニシリンであるフルクロキサシリンはペニシリナーゼ耐性をもつ優れた抗生物質であり、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が関与する感染症に適用される。しかし、フルクロキサシリンを服用した患者においてまれに重篤な肝障害を発症することがあり、重篤化した患者の中には死亡例や肝移植例も報告されている (Björnsson and Olsson et al., 2005)。発症頻度は 10 万人に 8.5 人であり、比較的高い割合である。フルクロキサシリンにより肝障害を発症した患者の中には発熱、好酸球増多、免疫細胞の浸潤といったアレルギー様の症状を伴うことより、免疫反応の関与が示唆されている。現在までの報告では、ヒトにおいて CYP3A4 により代謝されることで生成される

5'-hydroxymethylflucloxacillin が肝細胞および胆管上皮細胞で毒性を示すこと (Lakehal et al., 2001)、フルクロキサシリン投与によりラットで肝臓のタンパク質と adduct を形成すること (Carey et al., 2005)、ヒト血清アルブミンとフルクロキサシリンが adduct を形成すること (Jenkins et al., 2009) が報告されている。しかし、フルクロキサシリン誘導性肝障害を実験動物で再現した例はなく、また免疫学的因子に着目してメカニズムを研究した報告もない。そこで、本研究はフルクロキサシリン誘導性肝障害をマウスで再現し、その発症メカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウス作製は、Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、フルクロキサシリンを 300, 600, 800 および 1,000 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 1.5、3、6、12 および 24 時間後に、下行大静脈より採血を行い、同時に肝臓を採取した。対照群へのアンピシリン投与については、Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢) を馴化飼育後、アンピシリンを 1,000 mg/kg で単回腹腔内投与した。投与 3 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った。血漿生化学値測定は、ヘパリナイズした器具を用いて採取したマウスの全血を 12,000×g、4°C で 2 分間遠心分離を行った後、上清をサンプルチューブに移し血漿とした。血漿中生化学値は DRI-CHEM 4000V (富士フィルム, Tokyo, Japan) を用いて、富士ドライケムスライドに血漿 10 µL を点着させ、吸光度を測定して値を求めた。Total RNA の調製および Reverse transcription (RT) 反応は、常法に従って行った。ELISA による血漿中 HMGB1 の定量は、ヘパリナイズした器具を用いて採取したマウスの全血を 12,000×g、4°C で 2 分間遠心分離を行った後、上清をサンプルチューブに移し血漿とした。血漿中の HMGB1 濃度は HMGB1 ELISA Kit II のマニュアルに従って測定した。Recombinant IL-17 (rIL-17) の投与については、Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢) を馴化飼育後、フルクロキサ

シリンを 1,000 mg/kg で単回腹腔内投与し、1 時間後に rIL-17 (2 µg/body) を単回腹腔内投与した。薬物投与 3 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った。抗 IL-17 抗体の投与については、Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢) を馴化飼育後、フルクロキサシリン投与 1 時間前に抗 IL-17 抗体 (0.1 mg/body) を投与し、その後フルクロキサシリンを 1,000 mg/kg で投与した。薬物投与から 3 時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った。

本検討における動物実験については、すべて金沢大学動物実験指針に従って行った。

C. 研究結果

C-1. フルクロキサシリン投与マウスの血漿生化学値の検討

Balb/c マウスを用いて、フルクロキサシリン投与による血漿生化学値への影響を検討した。投与 6 時間後の血漿中の ALT および AST の平均値に標準偏差を付した結果を Fig. 1 示した。フルクロキサシリンを 800 および 1,000 mg/kg で投与した群において 6 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値は対照群と比較して有意な上昇が認められた (Fig. 1A)。この結果から、フルクロキサシリンの投与量を 1,000 mg/kg とした。

次にフルクロキサシリンの投与量を

1,000 mg/kg として、投与後の時間依存的変化の検討を行った結果、ALT 値、AST 値およびT-Bilはいずれもフルクロキサシリン投与後 1.5 時間後から有意な上昇が認められ、ALT 値はフルクロキサシリン投与後 3 から 6 時間後、AST 値と T-Bil は 3 時間後に最も高値を示した (Fig. 1B)。

β -ラクタム系抗菌薬であり、肝障害報告がほとんどないアンピシリンを用いて肝障害に与える影響を検討した。フルクロキサシリンおよびアンピシリン投与後 3 時間の血漿試料中の ALT 値および AST 値の平均値に標準偏差を付した結果を示した。対照群と比較してフルクロキサシリンを投与した群では ALT 値および AST 値の有意な上昇が認められたが、一方でアンピシリンを投与した群では ALT 値および AST 値の上昇は認められなかった (Fig. 1C)。

C-2. S100A8/A9 の mRNA 発現変動および血漿中 HMGB1 の時間依存的変動

フルクロキサシリン投与 1.5、3、6、12 および 24 時間後のマウスの肝臓において TLR4 に関与する遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現変動を、検討した。各サンプルについて、S100A8、S100A9 および β -actin の mRNA 量を測定し、 β -actin

mRNA 発現量を補正に用いて、それぞれのサンプルの比の平均値に標準偏差を付した結果を示した (Fig. 3)。S100A8 mRNA は投与 3 時間後に、S100A9 mRNA は投与 1.5 時間後および 3 時間後に有意な上昇が認められた (Fig. 3A)。血漿中 HMGB1 は投与 1.5 時間後および 3 時間後において対照群と比較して有意な上昇が認められた (Fig. 3B)。

C-3. 炎症性因子の mRNA 発現変動解析

フルクロキサシリン投与 1.5、3、6、12 および 24 時間後のマウスの肝臓における炎症に関与する遺伝子の mRNA の発現変動を検討した。IL-1 β 、TNF α 、CXCL1、MIP-2、MCP-1 および β -actin の mRNA 量を測定し、 β -actin mRNA 発現量を補正に用いて、それぞれのサンプルの比の平均値に標準偏差を付した結果を示した (Fig. 3)。IL-1 β はフルクロキサシリン投与3および6時間後に対照群と比較して有意な上昇が認められた。TNF α はフルクロキサシリン投与6時間後に対照群と比較して有意な上昇が認められた。MCP-1 は投与 3 時間後および 12 時間後に、CXCL1 は 1.5 時間後および 3 時間後に、MIP-2 は投与 1.5 時間後および 3 時間後において対照群と比較して有意な上昇が認められた。

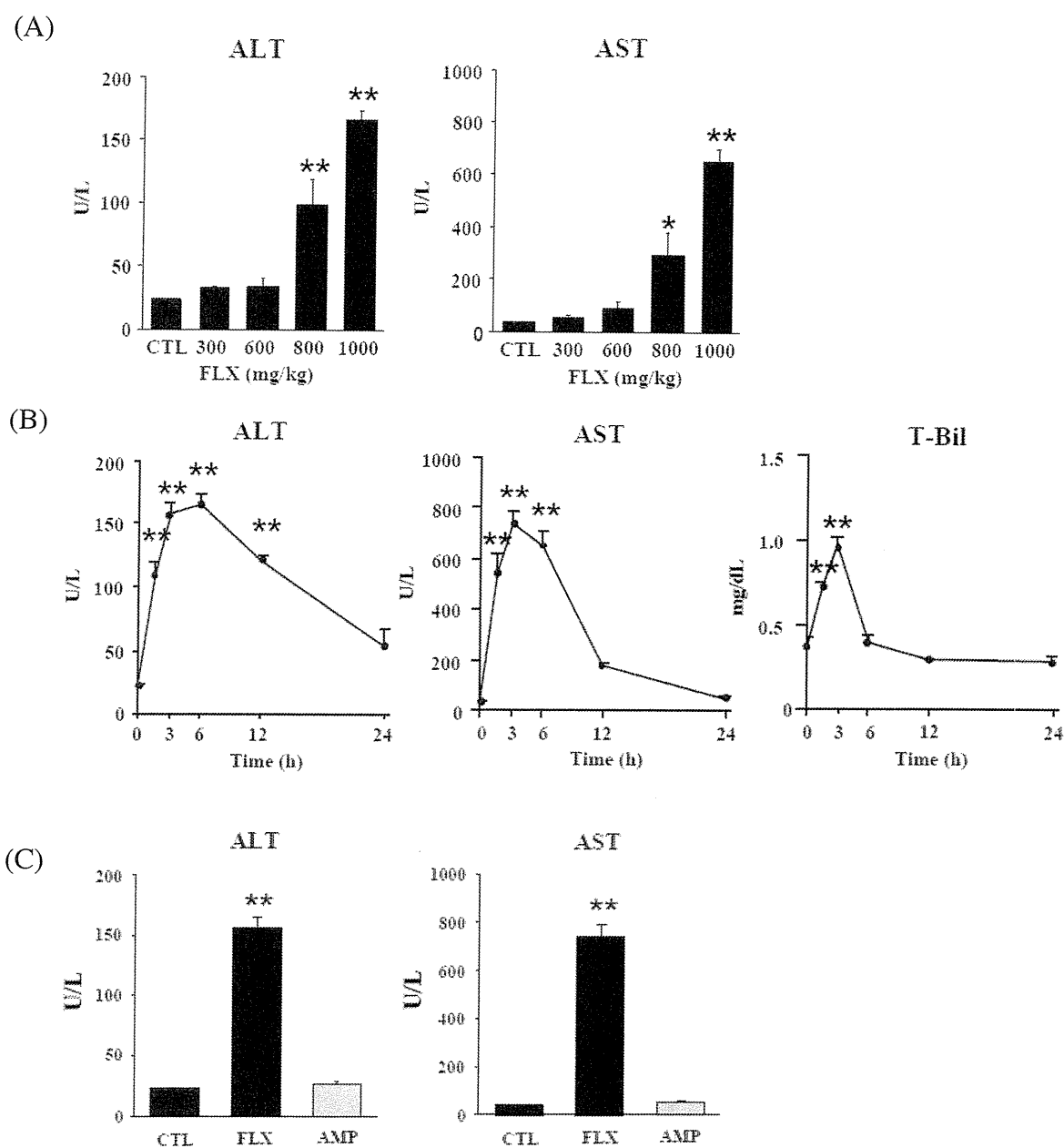
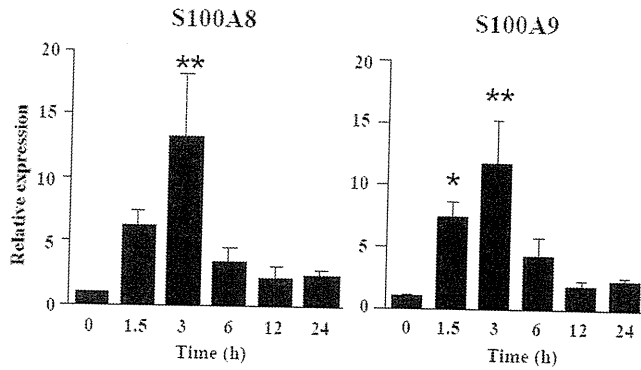


Fig 1. Dose- and time-dependent changes of plasma biomarkers in flucloxacillin (FLX)-administered or ampicillin (AMP)-administered mice. (A) Mice were administered FLX (300, 600, 800 and 1,000 mg/kg, *i.p.*). Six hours after the administration, plasma ALT and AST levels were measured. (B) Mice were administered FLX (1,000 mg/kg, *i.p.*). Various times (1.5, 3, 6, 12 and 24 h) after the administration, plasma ALT, AST and T-Bil levels were measured. (C) Mice were administered FLX (1,000 mg/kg, *i.p.*) or AMP (1,000 mg/kg, *i.p.*). Three hours after the administration, plasma ALT and AST levels were measured. Data are shown as the mean \pm SD of the results from 3 to 6 mice. Differences compared to the control mice were considered significant at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$.

(A)



(B)

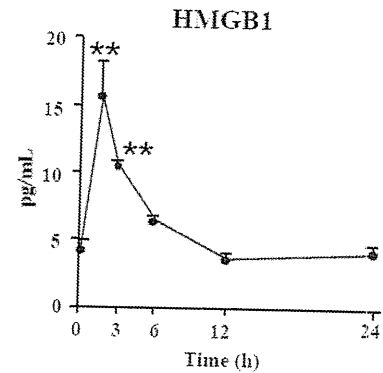


Fig 2. Time-dependent changes in hepatic expression levels of S100A8/A9 mRNA and plasma HMGB1 levels in FLX-administrated mice. Mice were administrated FLX (1,000 mg/kg, ip). (A) Expression levels of hepatic S100A8/A9 mRNA levels were measured by real-time RT-PCR at 1.5, 3, 6, 12 or 24 h after the administration. Expression levels of hepatic mRNA was normalized to that of β -actin mRNA. (B) Plasma HMGB1 protein level were measured by ELISA. Data are shown as the mean \pm SD of the results from 3 to 6 mice. Differences compared to the control mice were considered significant at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$.

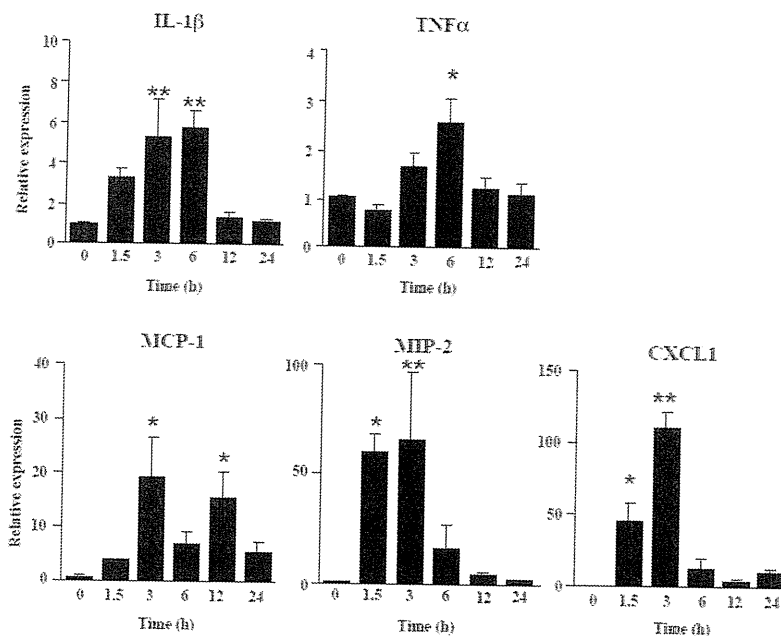


Fig 3. Time-dependent changes in hepatic mRNA expression levels of inflammatory factors in FLX-administrated mice. Mice were administrated FLX (1,000 mg/kg, ip). Hepatic mRNA levels were measured by real-time RT-PCR at 1.5, 3, 6, 12 or 24 h after the administration. Expression level of hepatic mRNA was normalized to that of β -actin mRNA. Data are shown as the mean \pm SD of the results from 3 to 6 mice. Differences compared to the control mice were considered significant at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$.

C-4. 転写因子と関連サイトカインの mRNA の発現変動解析

フルクロキサシリン投与 1.5、3、6、12 および 24 時間後のマウスの肝臓における転写因子とそれに関連するサイトカインの mRNA の発現変動を検討した。T-bet、GATA3、ROR- γ t、IFN γ 、IL-5、IL-6 および β -actin の mRNA 量を測定し、 β -actin mRNA 発現量を補正に用いて、それぞれのサンプルの比の平均値に標準偏差を付した結果を示した (Fig. 4)。T-bet はフルク

ロキサシリン投与 1.5、3、6、12 時間後において対照群と比較して有意な減少が認められた。GATA3 は対照群と比較して変化は認められなかった。ROR- γ t はフルクロキサシリン投与 3 時間後および 12 時間後において対照群と比較して有意な上昇が認められた。IFN γ は対照群と比較して変化は認められなかった。IL-5 はフルクロキサシリン投与 1.5 時間後において、IL-6 はフルクロキサシリン投与 1.5 時間後および 3 時間後において対照群と比較して有意な上昇が認められた。

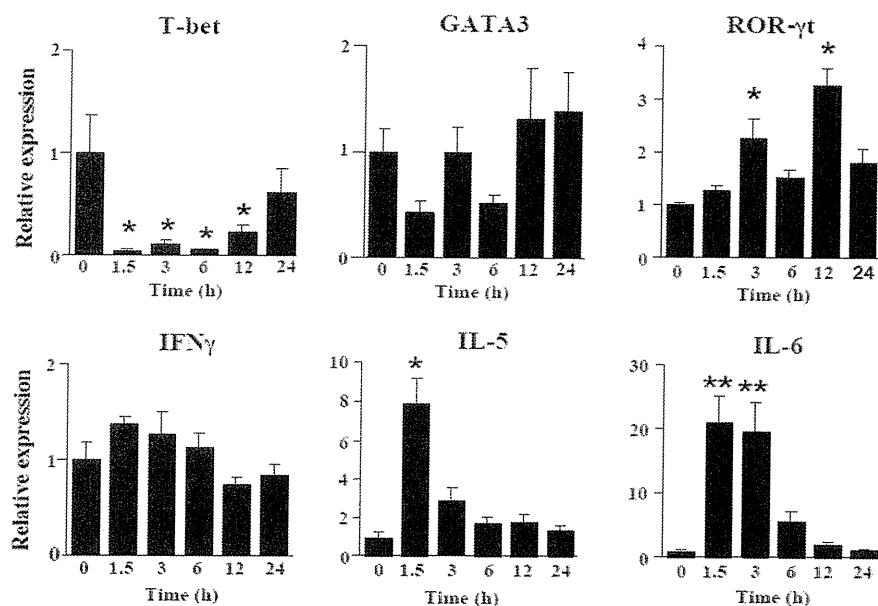


Fig 4. Time-dependent changes in hepatic expression levels of transcriptional factors and cytokines in FLX-administrated mice. Hepatic mRNA levels were measured by real-time RT-PCR at 1.5, 3, 6, 12 or 24 h after the administration. Expression level of hepatic mRNA was normalized to that of β -actin mRNA. Data are shown as the mean \pm SD of the results from 3 to 6 mice. Differences compared to the control mice were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

C-5. フルクロキサシリン誘導性肝障害における IL-17 の関与の検討

フルクロキサシリン誘導性肝障害における IL-17 の関与を検討するため、rIL-17 および抗 IL-17 抗体をフルクロキサシリンと併用投与した。薬物投与 3 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. 5)。フルクロキサシリン単独投与群と比較して rIL-17 併用投与群では ALT 値の有意な上昇が認められた。また、フルクロキサシリン単独投与群と比較して rIL-17 併用投与群の AST 値は上昇傾向が認められたが有意ではなかった (Fig. 5A)。また、フルクロキサシリン投与による肝障害の程度および肝組織への好中球の浸潤について、H&E 染色および抗 MPO 抗体を用いた免疫染色によって投与 3 時間後の肝組織像の評価を行った (Fig. 5B)。その結果、フルクロキサシリンと rIL-17 を併用投与したマウスでは、肝組織におけるネクロシスおよびリンパ球の浸潤が認められた。また、肝実質細胞に多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められた。

フルクロキサシリン単独投与群と比較してフルクロキサシリンおよび抗 IL-17 抗体併用投与群の ALT 値および AST 値の減少傾向が認められたものの、有意ではなかった (Fig. 5C)。

C-6. フルクロキサシリン誘導性肝障害におけるグルタチオンの関与

活性代謝物や酸化ストレスの解毒に働くグルタチオンの関与を検討するため、GSH、GSSG および GSH/GSSG 比を測定した。GSH はフルクロキサシリン投与 1.5 時間後および 3 時間後において減少傾向が認められたが有意ではなかった。GSSG はフルクロキサシリン投与 1.5 時間後および 6 時間後に対照群と比較して有意な減少が認められた。GSH/GSSG 比はフルクロキサシリン投与 1.5 時間後および 3 時間後にかけて減少傾向が認められたが有意ではなかった。

D. 考察

本検討では初めてフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルを作製し、発症に免疫学的因子が関与していることを示唆した。フルクロキサシリン誘導性肝障害の臨床報告は 1982 年以降多数報告されており、発症患者の症候から肝障害発症に免疫反応が関与している可能性が示唆されてきた (Olsson et al, 1992)。しかし、これまでフルクロキサシリンの毒性を明らかにした例はほとんどなく、動物モデルも存在しなかったため詳細な検討はなされてこなかった。本検討はフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスを用いて、肝障害発症に TLR4 リガンドが関与している可能性があること、IL-17 が増悪因子であることを示唆した初めての報告である。

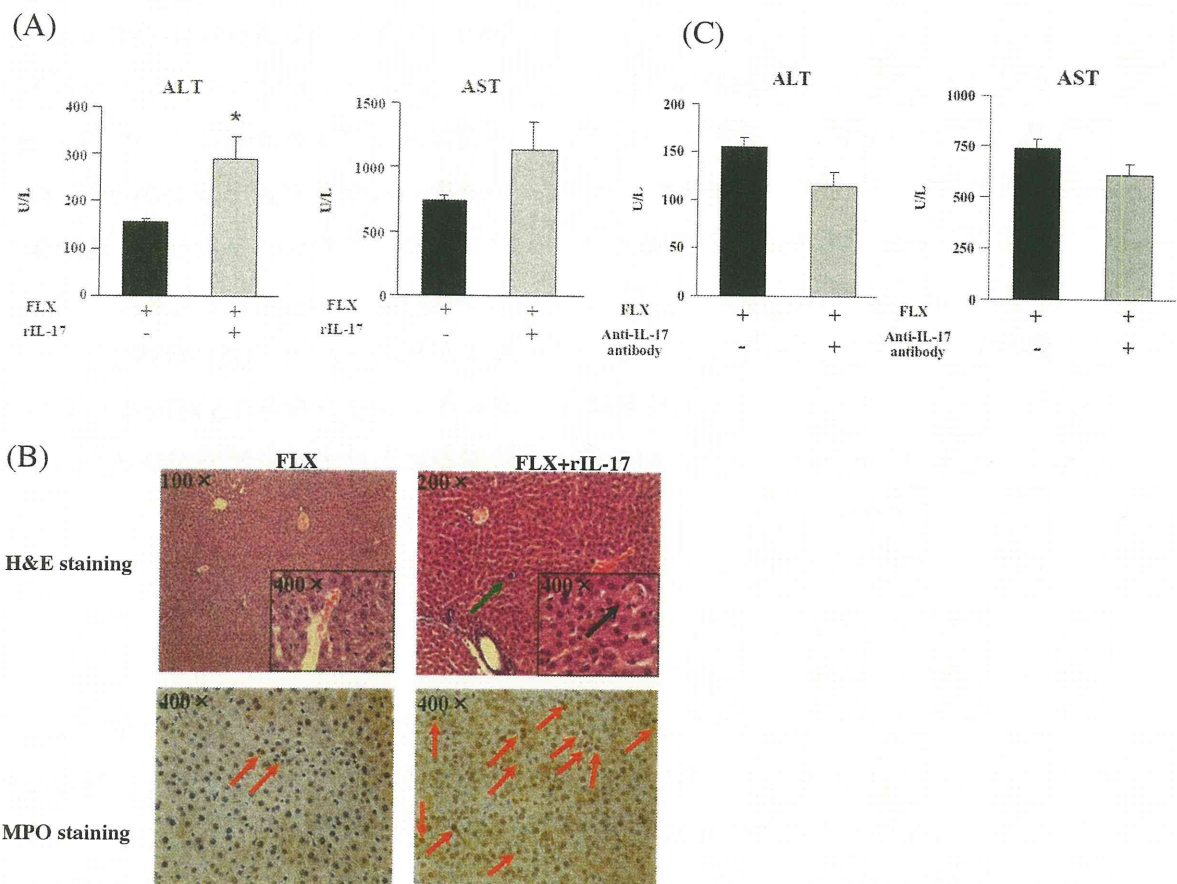


Fig 5. Involvement of IL-17 in FLX-induced liver injuries in mice. (A) Mice were administered FLX (1,000 mg/kg, *i.p.*). One hour after FLX administration, rIL-17 (2 µg/body, *i.p.*) was administered. Three hours after the administration of FLX, plasma ALT and AST levels were measured. (B) Liver sections were stained with H&E or immunostained with anti-myeloperoxidase (MPO) antibody. A green arrow indicates a immune cell infiltration, a black arrow indicates a necrotic cell, and red arrows indicate MPO-positive cells. (C) Mice were administered FLX (1,000 mg/kg, *i.p.*). One hour before FLX administration, anti-IL-17 antibody (100 µg/body, *i.p.*) was administered. Three hours after the administration of FLX, plasma ALT and AST levels were measured. Data are shown as the mean ± SD of the results from 3 to 6 mice. Differences compared to the control mice were considered significant at $*p < 0.05$.

マウスモデルを作製するにあたり、フルクロキサシリンにより肝障害を発症した患者においてアレルギー様症状が認められているため、アレルギーと関連性が強く、アレルギー様症状を伴う薬物性肝障害のマウスモデルの研究において用いられている Balb/c マウスを用いて検討す

ることとした。フルクロキサシリンを 1,000 mg/kg 投与した結果、血漿中パラメータの上昇が認められ、ALT 値と比較して AST 値が高い傾向が認められた (Figs. 1A and 1B)。これは AST 値が高値を示すという Törnhaage らの臨床報告と類似した結果である (Törnhaage et al., 2009)。T-Bil

が対照群と比較して有意に上昇していたことから (Fig 1B)、フルクロキサシリンにより胆汁うっ滞型の肝障害を発症していることが示唆された。フルクロキサシリン誘導性肝障害を発症した患者においても胆汁うっ滞が認められていることから (Devereaux et al., 1995)、ヒトにおける症状と似た病状を再現することができたと考えられる。次に、フルクロキサシリン誘導性肝障害における薬理作用の影響を検討するため、同効薬としてアンピシリンを投与した (Fig. 1C)。一般的に抗菌薬は肝毒性を持つものが多いが、アンピ

シリンはその中でも肝障害の発症頻度が極めて低い (Andrade and Tulkens., 2011)。また、アンピシリンは蜂巣炎治療を行うときにフルクロキサシリンと同時に、またはフルクロキサシリン - アンピシリン合剤として処方されることからフルクロキサシリンと関連性が強い (Li et al., 2009)。Fig. 1C の結果より、アンピシリン投与群において ALT 値の上昇が認められなかったことから、フルクロキサシリンの毒性に対して薬理作用が関与しない可能性が明らかとなった。

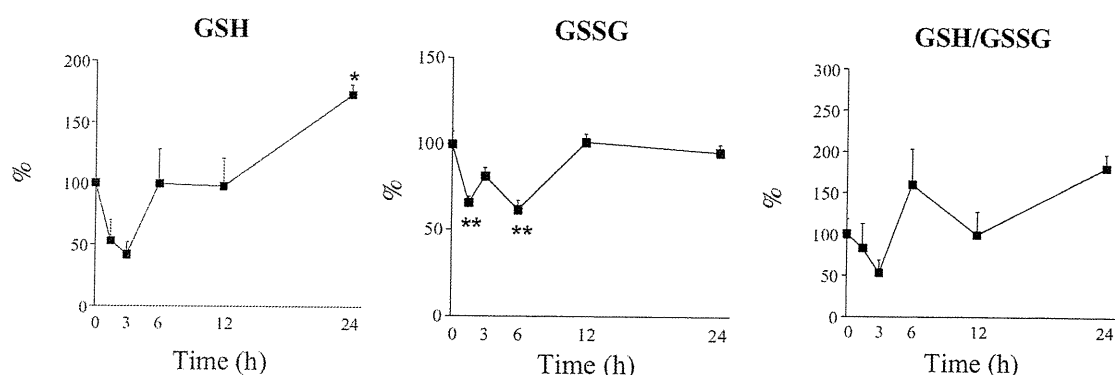


Fig 6. Time-dependent changes of hepatic GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio in FLX-administrated mice. GSH and GSSG were measured in liver tissue homogenate. Data are shown as the mean \pm SD of the results from 3 to 6 mice. Differences compared to the control mice were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

TLR4 は初め細菌感染に対する宿主防御のためのパターン認識受容体として同定されたが、内因性のリガンドが同定されるにつれて、様々な疾患において関与することが示唆されてきている。TLR4 のリガンドとしては特に S100A8、S100A9 および HMGB1 が知られている。ストレ

ス応答として食細胞から放出される S100A8 および S100A9 は、がんや自己免疫疾患などにおいて関与が認められているタンパク質であり、また HMGB1 はネクロシスを起こした細胞および免疫細胞から放出され、TLR4 に結合することで炎症性サイトカインおよびケモカインの

産生を亢進して炎症を促進することが知られている。現在までに肝虚血再灌流障害モデルマウス (Tsung et al., 2005)、アセトアミノフェン誘導性肝障害モデルマウス (Antoine et al., 2009) およびハロタン誘導性肝障害モデルマウス (Dugan et al., 2011) において HMGB1 の関与が報告されている。フルクロキサシリン投与により、S100A8 および S100A9 の mRNA がフルクロキサシリン投与から 1.5 時間後から上昇していたこと (Fig. 2A)、ELISA により血漿中 HMGB1 濃度を測定したところフルクロキサシリン投与 1.5 時間後および 3 時間後において増加が認められた (Fig 2B) ことから、フルクロキサシリン誘導性肝障害において、リガンドによる TLR4 の活性化を介して自然免疫細胞が活性化された可能性が示された。

さらに、TLR4 が炎症促進に関与している可能性を検討するため、TLR4 の活性化により産生される炎症性因子の発現変動を測定することとした (Fig. 3)。IL-1 β 、TNF α 、MCP-1、MIP-2 および CXCL1 はいずれも有意な上昇が認められたが、これらの発現は TLR4 リガンドの発現上昇より時間的に遅い傾向が認められた。これらの結果より TLR4 活性化によりサイトカインおよびケモカインが産生された可能性が示された。また、免疫細胞の遊走に関与する CXCL1 および MIP-2 の mRNA が顕著に上昇したことから、肝障害に免疫細胞の浸潤が関与する可能性が示された。

次に、フルクロキサシリン誘導性肝障害における増悪因子について検討するた

め、薬物性肝障害における増悪因子として知られる IFN γ 、IL-4 および IL-17 と、これらの誘導に関連する因子である T-bet、GATA3、IL-5、ROR- γ t および IL-6 の mRNA の発現変動解析を行った (Fig. 4)。T-bet および GATA3 の mRNA において変化が認められなかったこと、ROR- γ t および IL-6 の有意な上昇が認められたことから、IL-17 が関与している可能性を考えた。そこで、ELISA により IL-17 の検出を試みたが、全サンプルで検出限界以下であった。しかし、フルクロキサシリン投与 1.5 時間後および 3 時間後において吸光度が検出限界に近いものの検出できたため、微量であるが放出されていると考えた。ELISA を用いて測定するためには血漿が 100 μ L 必要であり、これは非常に多量であるため、血漿サンプルの節約のため 1 \times assay diluent で 2 倍希釈したことにより、血漿中 IL-17 濃度が低く検出されたのではないかと考えられる (data not shown)。

さらに、IL-17 の関与を検討するため、rIL-17 および抗 IL-17 抗体をフルクロキサシリンと併用投与した (Figs. 5A and 5B)。rIL-17 投与により肝障害の増悪が認められ (Fig. 5A)、H&E 染色により免疫細胞の浸潤と肝細胞のネクローシス、MPO 染色により MPO 陽性細胞数の増加が認められた (Fig. 5B)。フルクロキサシリンはグラム陽性菌である *S. aureus* が関与する感染症の治療薬として用いられている (Li et al., 2009)。*S. aureus* に対する宿主防衛には IL-17 が働くことが知られており (Miller et al., 2011)、*S. aureus* を排除するために活性化した Th17、NKT 細胞、NK 細

胞または $\gamma\delta$ T細胞により産生された IL-17 がフルクロキサシリン誘導性肝障害の増悪に働くことが考えられる。また、抗体投与により ALT 値および AST 値の有意な減少傾向が認められた (Fig. 5C)。以上の結果より、フルクロキサシリン誘導性肝障害において IL-17 は発症への寄与は小さいが、増悪因子としては作用することを示した。

グルタチオンは中間代謝物や酸化ストレスの解毒に働くことが知られている。フルクロキサシリンは親化合物ではなく CYP3A4 により代謝を受けることで生成する 5'-Hydroxymethylflucloxacillin が細胞毒性を示すことが明らかとなっている (Lakehal et al., 2001)。そこで、フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおいて代謝的活性化の影響を検討するため、GSH の濃度比を測定した。Fig. 6 に示すようにフルクロキサシリン投与により GSH の減少傾向が認められたことから、GSH が代謝物を抱合する可能性が考えられた。次に、酸化ストレスのマーカである GSH/GSSG 比を算出したが、フルクロキサシリン投与により GSH/GSSG 比は減少傾向が認められたものの有意ではなかった。以上の結果から、グルタチオンは酸化ストレスを緩和するだけでなく代謝物の抱合反応に働く可能性が考えられた。フルクロキサシリンは体内で β ラクタム環が加水分解され、親化合物がペニシロイン酸、代謝物がペニシロイン酸の 5 位水酸化体に代謝されることが知られている (Murai et al., 1983)。 β ラクタム系の抗菌薬であるベンジルペニシリンは加水

分解されてペニシロイン酸となり、 β ラクタム環のカルボニル炭素に生体高分子が結合することでハプテンを形成することが知られている (Park et al., 2011, Ariza et al., 2011)。フルクロキサシリンはヒト血清アルブミンと結合することが知られているため、代謝的活性化反応が生じ、次いで肝細胞にネクローシスを引き起こしている可能性がある (Jenkins et al., 2009)。

E. 結論

本研究においてフルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおいて免疫学的因子が発症および増悪に関与していることを明らかにした。その中でも HMGB1 と TLR4 が関係するシグナル伝達が発症に関与している可能性、さらに IL-17 が増悪因子である可能性を示すことができた (Fig 7)。本研究により得られた結果はフルクロキサシリン誘導性肝障害および他の薬物性肝障害の発症メカニズム解明に有用な情報を提供しうると考えられる。

<参考文献>

Andrade RJ and Tulkens PM (2011) Hepatic safety of antibiotics used in primary care. *J Antimicrob. Chemother.* **66**: 1431-1446.

Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Jenkins RE, Regan SL, Sathish JG, Kitteringham NR, and Park BK (2009) High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis *in vivo*. *Toxicol. Sci.* **112**: 521-531.

Ariza A, Montañez MI, and Pérez-Sala D. (2011) Proteomics in immunological reactions to drugs. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* **11**: 305-312.

Björnsson E and Olsson R (2005) Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* **42**: 481-89.