

- Carey MA, and van Pelt FN (2005) Immunochemical detection of flucloxacillin adduct formation in livers of treated rats. *Toxicology* **216**: 41-48
- 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
- Devereaux BM, Crawford DH, Purcell P, Powell LW and Roeser HP (1995) Flucloxacillin associated cholestatic hepatitis. An Australian and Swedish epidemic? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **49**: 81-85.
- Dugan CM, Fullerton AM, Roth RA, and Ganey PE.(2011) Natural killer cells mediate severe liver injury in a murine model of halothane hepatitis. *Toxicol. Sci.* **120**: 507-518.
- Higuchi S, Kobayashi M, Yano A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J. Appl. Toxicol.* in press
- Higuchi S, Kobayashi M, Yoshikawa Y, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T. (2011) IL-4 mediates dicloxacillin-induced liver injury in mice. *Toxicol. Lett.* **200**: 139-145
- Jenkins RE, Meng X, Elliott VL, Kitteringham NR, Pirmohamed M, and Park BK. (2009) Characterisation of flucloxacillin and 5-hydroxymethyl flucloxacillin haptenated HSA *in vitro* and *in vivo*. *Proteomics Clin. Appl.* **3**: 720-729
- Kaniwa N, and Hasegawa R (2009) Exploratory Studies on Genetic Biomarkers Related to Serious Drug Adverse Reaction. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* **127**: 1-14
- Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **4**: 489-499.
- Keogh B, and Parker AE. (2011) Toll-like receptors as targets for immune disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**: 435-442.
- Kobayashi E, Kobayashi M, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol. Sci.* **111**: 302-310
- Lakehal F, Dansette PM, Becquemont L, Lasnier E, Delele R, Balladur P, Poupon R, Beaune PH, and Housset C. (2001) Indirect cytotoxicity of flucloxacillin toward human biliary epithelium via metabolite formation in hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 694-701.
- Li L, Jick H, and Jick SS. (2009) Updated study on risk of cholestatic liver disease and flucloxacillin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **68**: 269-270.
- Liu ZX, Kaplowitz N (2006) Role of innate immunity in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**: 493-503.
- Miller LS and Cho JS. (2011) Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 505-518.
- Murai Y, Nakagawa T, Yamaoka K, and Uno T. (1983) High-performance liquid chromatographic determination and moment analysis of urinary excretion of flucloxacillin and its metabolites in man. *Int. J. Pharm.* **15**: 309-320.
- Olsson R, Wiholm BE, Sand C, Zettergren L, Hultcrantz R, and Myrhed M (1992) Liver damage from flucloxacillin, cloxacillin and dicloxacillin. *J. Hepatol.* **15**: 154-161.
- Park BK, Laverty H, Srivastava A, Antoine DJ, Naisbitt D, and Williams DP. (2011) Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **192**: 30-36.
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R and Coyle AJ (2010) HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **28**: 367-388.
- Törnåge CJ, Brunlöf G, and Wallerstedt SM (2009) Severe hepatotoxic adverse reaction in a healthy schoolgirl after treatment with flucloxacillin. *Drug Health. Patient Saf.* **1**: 17-19.
- Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, and Billiar TR (2005) The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* **201**: 1135-1143.
- Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, and Thurman RG (2001) Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* **34**: 101-108.
- Yohe HC, O'Hara KA, Hunt JA, Kitzmiller TJ, Wood SG, Bement JL, Bement WJ, Szakacs JG, Wrighton SA, Jacobs JM, Kostrubsky V, Sinclair PR, and Sinclair JF (2006) Involvement of Toll-like receptor 4 in acetaminophen hepatotoxicity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **290**: 1269-1279.
- 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
- 渡辺稔之、大橋芳彦、安田充也、高岡雅哉、

古川忠司、矢本敬、三分一所厚司、真鍋淳 (1999) トログリタゾンの肝障害は非臨床安全性試験で予知できなかったか？—安全性の再評価— 医薬品研究 **30**: 537-546.

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

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).

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.

2 学会発表

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

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

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

G. 知的財産権の出願・登録

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）
分担研究報告書

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

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

鎮痙薬である carbamazepine (CBZ) はごく稀に肝障害を惹起することが報告されている。CBZ の構造類似体で、同効薬の oxcarbazepine (OXC) は CBZ よりも薬物間相互作用や副作用が少ないとされている。CBZ はチトクローム P450 (CYP) 3A4 により、主代謝物である CBZ 10,11-エポキシドに代謝される。CBZ 連投により種々の CYP が誘導され、毒性を有する反応性代謝物を生成すると考えられている。これまでの *in vitro* における報告などから、反応性代謝物が肝臓のタンパク質と結合し、免疫反応およびネクロシスなどの細胞傷害が起きることで肝障害が惹起されると考えられているが、実験動物でその肝障害の再現に成功した例はない。そこで OXC をネガティブコントロールとして、CBZ 誘導性肝障害マウスモデルを確立し、そのメカニズムを免疫・代謝の両面から検討した。

10 週齢の雄性 BALB/c マウスに CBZ を 4 日間 400 mg/kg を、5 日目に 800 mg/kg を投与した群において血中 ALT と AST 値の有意な上昇が認められ、肝組織染色において、著しいネクロシスが認められた一方で、OXC 投与群では肝障害は惹起されなかった。以降、肝障害の惹起された条件におけるメカニズムの詳細な検討を行った。血中濃度は CBZ、CBZ-10,11-epoxide および Trans-10,11-diol CBZ において最終投与 1.5 時間後に最大値を示し、3-OH CBZ は 3 時間後に最大値を示した。Cyp3a 阻害剤を併用投与した際、CBZ 単独投与群と比較して、血中 ALT および AST 値の上昇が認められ、CBZ と 3-OH CBZ の血中濃度が上昇したが、CBZ-10,11-epoxide の血中濃度は減少した。また、肝障害が起きなかった CBZ の単回投与時の血中濃度は、CBZ と CBZ-10,11-epoxide の血中濃度の上昇と 3-OH CBZ の減少が認められた。3-OH CBZ はさらに代謝を受けると反応性代謝物となることが報告されており、CBZ 誘導性肝障害の発症に 3-OH CBZ が関与する可能性が示された。

炎症を惹起する S100A8、S100A9 およびそれらのレセプターである TLR4 と RAGE の肝臓 mRNA の上昇が認められた。また、CBZ 誘導性肝障害の発症に TLR4 または RAGE の活性化が関与するか検討し、TLR4 アンタゴニストまたは RAGE 抗体により、CBZ 誘導性肝障害が減弱された。TLR4 や RAGE の活性化は、炎症性サイトカインの

産生を誘導することが報告されており、CBZ 誘導性肝障害において、それらの関与が示唆された。炎症性サイトカインやケモカインの mRNA を網羅的に解析したところ、IL-6 や IL-23 の mRNA の上昇が認められた。IL-6 や IL-23 は IL-17 という強力な炎症性サイトカインを誘導することから、血中 IL-17 と IL-23 タンパク質量を測定したところ、CBZ 誘導性肝障害時に上昇が認められた。IL-17 が CBZ 誘導性肝障害の発症に関与するか検討するために、IL-17 抗体を CBZ と併用投与したところ、血中 ALT と AST 値の減少が認められ、肝組織染色では好中球およびマクロファージの浸潤の減少が認められた。以上より、IL-17 は免疫系細胞の浸潤を介して、CBZ 誘導性肝障害の発症に関与することが示された。以上、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。

A. 研究目的

医薬品の開発における前臨床試験の動物実験は、候補化合物のヒトにおける有効性、安全性を予測し、臨床試験の安全性の確保や上市できない可能性のある化合物の開発を早期に中止するために不可欠なものとなっている。しかし、新規候補化合物の 90% 以上は早期臨床試験における副作用のために開発中止になるといわれており (Jenkins et al., 2008)、財務上の大きな負荷を製薬企業に与え、医薬品の開発により長い期間を要する原因となっている。

医薬品の副作用は服用した患者の転帰に関わる重大な健康上の問題である。副作用には様々なものがあり、全ての臓器が影響を受け得る可能性があるが、肝臓における副作用は医薬品の販売が中止となる主要な原因となっている。また、実験動物とヒトの間には大きな種差が存在しており、さらにヒトにおける大きな個体差も、ヒトにおける薬物誘導性肝障

害の発症を予測することを困難にしている。さらに、発症機序が明らかになっている場合はほとんどない。薬物誘導性肝障害の病態は他の肝疾患とも類似性があり、肝障害発症メカニズムについて研究することは薬の安全性の確保に貢献するだけでなく、様々な肝疾患に対して新規の薬物治療戦略を提供し得ると考えられる (Park et al., 2005)。

肝臓は糖新生、胆汁の分泌など様々な働きを持つ臓器であるが、脂溶性の高い生体外異物を、より素早く排泄可能な水溶性の高い誘導体へと変換する異物代謝も、肝臓が担っている重要な役割のひとつである。肝臓に流入する血液の約 80% は消化管で吸収した栄養分を含む門脈血であり、肝臓は生体内において最も高濃度の異物に曝される臓器のひとつであるといえる。肝臓は高い薬物代謝酵素活性を有しており、シトクロム P450 (CYP) は薬物を含む様々な生体外異物の代謝を担う主要な酵素として知られている (Park

et al., 2005)。

薬物代謝酵素の主要な役割は本来その解毒作用にあるが、代謝物が高い反応性を獲得し、生体高分子と共有結合を形成することで副作用を発現する場合がある。代謝反応によって生じたこのような反応性代謝物は、非常に不安定で半減期が短いため、ほとんどの場合血漿から検出することができないが、肝臓において代謝的活性化を受けるが肝障害を起こさない化合物も数多く存在しており、これには生体内に存在する glutathione (GSH) による抱合反応が重要な役割を担っている。活性代謝物と生体内高分子の共有結合が必ずしも肝障害を引き起こすとは限らず、このことはヒトにおける肝障害の予測をより困難にしている。

鎮痙薬である carbamazepine (CBZ) は、稀に Stevens-Johnson 症候群、顆粒球減少症や肝炎などの重篤な副作用を引き起こすことが知られている (Pellock, 1987; Kaufman and Shapiro, 2000; Björnsson and Olsson, 2005)。CBZ を服用する患者のうちの約 20%において副作用が認められ、そのうちの 10~15%ほどが肝臓に関する副作用である。また、CBZ 誘導性肝障害の発症に関して、性差は認められないことや、1日の服用量とは依存性がないことが報告されている。CBZ 誘導性肝障害は、青年から高齢者に起こるとされる肉芽腫性の肝炎で hypersensitivity の症状を伴うものと、小児から青年に起こるとされる肝細胞のネクロシスや炎症を伴う肝障害とに分類できる (Björnsson, 2008; Björnsson and Olsson, 2005;)。好酸球の増

多などの hypersensitivity の症状が認められた患者において重症化や死亡した例はなく、hypersensitivity の症状が出た場合には一般的により転帰をとるとされているが、代謝的に誘導された肝障害は重症化しうる可能性があるとして報告されている (Björnsson, 2008)。ほぼ全ての肝障害患者において肝臓の炎症が認められることや、CBZ によって劇症肝炎が発症した患者では、肝臓ミクロソームに対する自己抗体が産生されると報告されていることなどから (Pirmohamed et al., 1992a)、CBZ 誘導性肝障害の発症には免疫系の因子が関与することが考えられている。CBZ の構造類似体で、同効薬の oxcarbazepine (OXC) は CBZ のあとに市場に出た抗てんかん薬である。OXC に関しても hypersensitivity などの副作用報告はあるものの、CBZ よりも薬物間相互作用や副作用が少ないとされている (Duncan et al., 2006; Tecoma 1999)。OXC のヒトにおける肝障害報告は少なく、肝逸脱酵素の若干の上昇が少数例報告されている程度であり、肝障害が重症化した報告はほとんどない (Björnsson and Olsson, 2005; Ahmed and Siddiqi, 2006)。

CBZ はヒトにおいて、30種類以上の代謝物が知られている。主代謝経路としては安定な CBZ-10,11-epoxide を形成し、続いて trans-10,11-dihydroxy (OH) CBZ となる経路が挙げられるが (Lertratanangkoon and Horning, 1982)、一方で CBZ から細胞傷害性をもつ反応性代謝物も産生されることが報告されている (Fig. 1)。特に CBZ 2,3-epoxide や 3-OH CBZ らは、タンパクと

の共有結合やreactive oxygen species (ROS) 産生を介してCBZの毒性発現に関与する可能性があること (Pirmohamed et al., 1992b; Lu and Utrecht, 2008)、GSHがそ

の解毒に関与すること (Pirmohamed et al., 1992b) がこれまでのin vitroの検討で示唆されているが、実験動物でそれらの毒性を示した報告は未だにない。

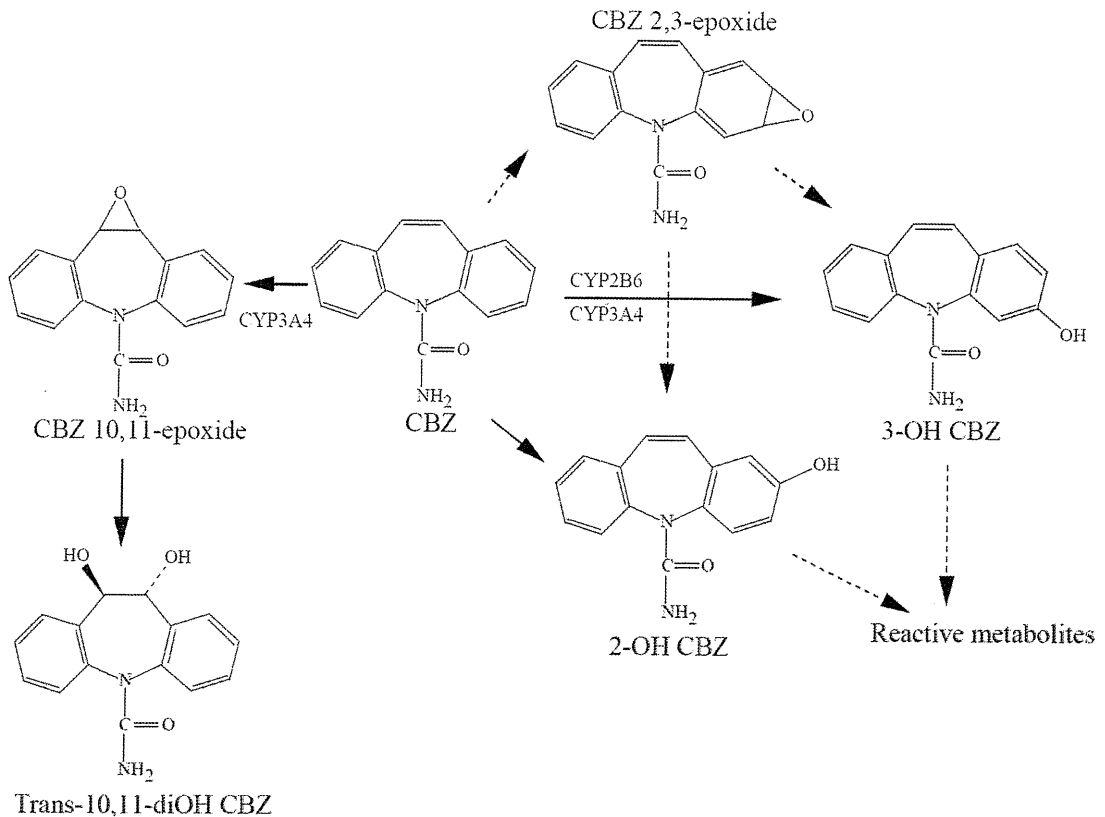


Fig. 1. Metabolic pathways of CBZ (Lu and Utrecht, 2008).

ROSはミトコンドリアの機能障害や肝細胞のネクロシスなど、様々な経路を介して薬物誘導性肝障害に関与することが知られているが (Jaeschke et al., 2002)、近年、ROSが toll-like receptor 4 (TLR4) を選択的に活性化すること (Matsuzawa et al., 2005) や receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) だけでなく、TLR4 や RAGE のリガンドである S100 タンパクや

high mobility group box 1 (HMGB1) などの danger signals の発現を上昇させることが報告された (Yao and Brownlee, 2010)。T 細胞やマクロファージの TLR や RAGE の活性化は炎症性のサイトカインやケモカインの産生を介して、炎症や肝細胞への免疫細胞の浸潤を惹起することで、免疫系の関与する肝障害の発症に関与すると考えられている (Lotze et al., 2007; Oo and Adams, 2009; Kita et al., 2001)。サイトカイ

ンの発現誘導には特定の転写因子が関与しており、例えば T-box expressed in T cells (T-bet) は interferon (IFN)- γ や interleukin (IL)-12 の産生誘導をするのに対し、GATA-binding domain-3 (GATA-3) は IL-4、IL-5 などを、retinoid-related orphan receptor (ROR)- γ t は IL-6、IL-23 および IL-17 の放出を促進すると報告されている (Kidd, 2003; Steinman, 2007; Langrish et al., 2005)。

強力な炎症性サイトカインである IL-17 はマクロファージ、natural killer T 細胞や helper T17 (Th17) 細胞から放出され、関節リウマチ、多発性硬化症および全身性エリテマトーデスなどの様々な自己免疫疾患に関与することに加えて (Kidd, 2003; Steinman, 2007)、Halothane 誘導性肝障害のような、免疫系の関与する薬物誘導性肝障害においても関与することが示唆されている (Kobayashi et al., 2009)。

現在、実験動物における薬物誘導性肝障害のメカニズムを検討する際には、APAP 誘導性肝障害モデルが広く用いられている。APAP 誘導性肝障害モデルによって様々な肝障害のメカニズムが明らかにされたが、未だに不明な部分も多く残っている。近年、発症に免疫系の関与する肝障害モデルとして halothane 誘導性肝障害モデルマウスが構築され、炎症性サイトカインやケモカイン、免疫系の細胞が肝障害の発症に関与することがこれまでに示唆されている (You et al., 2006; Kobayashi et al., 2009)。また、当研究室においても、dicloxacillin や flutamide 誘導性肝障害モデルマウスをこれまでに作製し、IL-4 などの免疫系の因子が肝障害の発症

に重要であることを示してきたが (Higuchi et al., 2011; Higuchi et al., in press)、それらの薬物誘導性肝障害モデルマウスは全て薬物の単回投与により作製されたものである。単回投与による薬物誘導性肝障害モデルでは薬物耐性や薬物による酵素誘導などのメカニズムを考慮した検討ができないことに加えて、実際の臨床における薬物誘導性肝障害のほとんどは薬物を反復投与した際に起きるため、反復投与で肝障害を起こす動物モデルが必要であるが、現在のところ、反復投与条件下における薬物誘導性肝障害のモデルはほとんどない。

本研究では CBZ 誘導性肝障害モデルを作製することおよび、そのメカニズムを代謝と炎症の両面から検討することを目的とした。はじめに肝障害報告の少ない OXC をネガティブコントロールとして、CBZ を単回投与または反復投与により肝障害モデルマウスを作製できるか検討し、研究を進める中で代謝と炎症が CBZ 誘導性肝障害の発症に寄与する結果が得られ、発症に関与する因子の特定の検討も行うことにより、そのメカニズムを明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

CBZ および OXC の投与方法は、Balb/cCrSlc マウス (雄性、8~10 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育した後、CBZ を 400 mg/kg (10 mL/kg of corn oil) で 4 日間、1 日 1 回経口投与し、5 日目に 400 または 800 mg/kg で経口投与した。

OXCにおいては、400 mg/kg (10 mL/kg of corn oil) で4日間経口投与し、5日目に800 mg/kg で経口投与した。連投中、マウスの体重を24時間ごとに測定した。最終投与から、1.5、3、6、12、24、48 および72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。投与量依存性の検討時には、CBZを400 mg/kg で4日間経口投与し、5日目に400、600 または800 mg/kg で経口投与した。CBZを単回投与検討時には、CBZを経口投与後、3(血中濃度測定用) または24時間後(血漿肝生化学値測定用) で解剖した。

血漿肝生化学値測定は、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 μ Lを点着させ、吸光度を測定して値を求めた。CBZ およびその代謝物の血中濃度測定は、Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) を用いて測定した。ミダゾラム 1',4-水酸化酵素活性は、Emoto ら (2000) の方法に修正を加えて測定した。

Cyp3a 阻害薬併用投与試験方法は、Balb/cCrSlc マウスを馴化飼育した後、CBZを400 mg/kg で4日間経口投与し、5日目にCyp3a 阻害薬である ketoconazole (KTZ: 50 mg/kg in corn oil) または troleandomycin (TAO: 100mg/kg in corn oil) を腹腔内投与し、その1時間後にCBZを800 mg/kg 投与した。CBZ最終投与24時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った後、肝臓を回収した。Total RNAの調製、Reverse transcription (RT) 反応、Real-time RT-PCR は、常法に従って行った。

Anti-mouse RAGE 抗体およびTLR4 アンタゴニストの投与方法は、Balb/cCrSlc マウスに、CBZ最終投与6時間後に monoclonal anti-mouse/rat RAGE 抗体 (100 μ g/mouse in 0.5 mL sterile saline) を腹腔内投与、または eritoran (50 μ g/mouse in 0.1 mL sterile saline) を静脈内投与した。CBZ最終投与24時間後に解剖し、下行大静脈より採血を行った後、肝臓を回収した。IL-17 抗体投与方法は、Balb/cCrSlc マウスに、最終投与の9時間後に monoclonal anti-IL-17 抗体 (100 μ g/mouse in 0.5 mL sterile saline) を腹腔内投与した。CBZ最終投与の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。対照群には rat IgG2 アイソタイプコントロールを腹腔内投与した。PGE₁ 投与方法は、Balb/cCrSlc マウスに、CBZを最終投与の9時間後に PGE₁ (50 μ g/mouse in sterile saline) を腹腔内投与した。CBZ最終投与の24時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を回収した。

統計解析は、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 検定により解析し、 $P < 0.05$ のとき、統計学的に有意であると判断した。

本検討における動物実験については、全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 CBZ 投与量依存性検討および単回投与検討

CBZ を反復投与または単回投与することで、肝障害モデルマウスが作製できるか検討するために、2-2の方法によって、反復投与時のCBZの投与量依存性および単回投与の検討をBalb/cマウスを用いて行い、最終投与24時間後のALT値を測定した(Figs. 2A and 2B)。投与量依存性検討において、5日目の投与量が800 mg/kgの群ではALT値の上昇が認められた。しかし、400または600 mg/kgの群ではALT値の有意な変化は認められなかった(Fig. 2A)。また、単回投与時にはいずれの投与量においてもALT値の変化は認められなかった(Fig. 2B)。以上の結果から、CBZを400 mg/kgで4日間連投後に、CBZを800 mg/kg投与することでCBZ誘導性肝障害モデルが作製できることが示された。この投与方法によって、CBZ誘導性肝障害モデルの詳細なデータを採取した。

C-2 CBZまたはOXC投与マウスのALTとAST値の時間推移および肝組織染色

Fig. 2Aにおいて、CBZを400 mg/kgで4日間連投後に、CBZを800 mg/kg投与した群においてALT値の上昇が認められたことから、最終投与後のALT値およびAST値の時間推移を検討するために、OXCをネガティブコントロールとして、2-2の方法によって、CBZまたはOXCを投与した。最終投与後0、6、12、24、48

および72時間後のALT値およびAST値を測定するとともに、最終投与24時間後の肝切片をH&E染色した(Figs. 3A and 3B)。CBZを400 mg/kgで5日間連投した群とOXCを400 mg/kgで4日間連投し、5日目に800 mg/kgを投与した群は、いずれの時間においてもALTおよびAST値の変化は認められなかった。CBZを400 mg/kgで4日間連投し、5日目に800 mg/kgを投与した群において、最終投与から24と48時間後にALTおよびAST値の有意な上昇が認められた(Fig. 3A)。肝組織染色の結果、no treatment (NT) 群、CBZを400 mg/kgで5日間連投した群およびOXCを投与した群では組織の変化は認められなかった(Fig. 3B)。CBZを400 mg/kgで4日間連投し、5日目に800 mg/kgを投与した群では広範に肝細胞のネクロシスが認められた。特に中心静脈周辺は肝細胞の脱落や出血が認められた。

C-3 CBZ最終投与後の血中濃度推移

CBZとその代謝物の血中濃度の時間推移と肝障害の時間推移が相関するか検討するために、CBZ最終投与後0、1.5、3、6、12および24時間後のCBZとその代謝物の血中濃度を測定した(Fig. 4)。CBZ、CBZ-10,11-epoxideおよびtrans-10,11-diOH CBZは最終投与1.5時間後に最大値を示し、その後ゆるやかに減少した。3-OH CBZは最終投与3時間後に最大値を示し、その後ゆるやかな減少が認められた。2-OH CBZは検出できなかった。

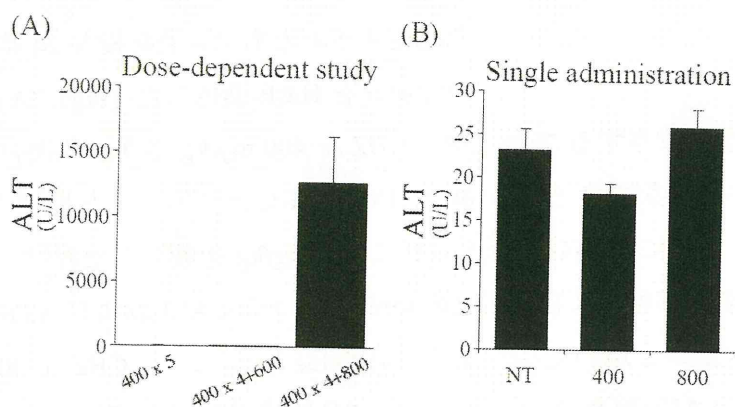


Fig. 2. Plasma ALT levels in dose-dependent study after the repetitive or single administration of CBZ. In dose-dependent study, mice were administered CBZ (in corn oil) at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 400 ~ 800 mg/kg in 5th day, and sacrificed at 24 h after the last administration (A). In single administration study, mice were administered CBZ 400 mg/kg or 800 mg/kg, and sacrificed at 24 h (B). Data are mean \pm SEM (n = CBZ 400 mg/kg for 4 days + 800 mg/kg: 8, others: 5).

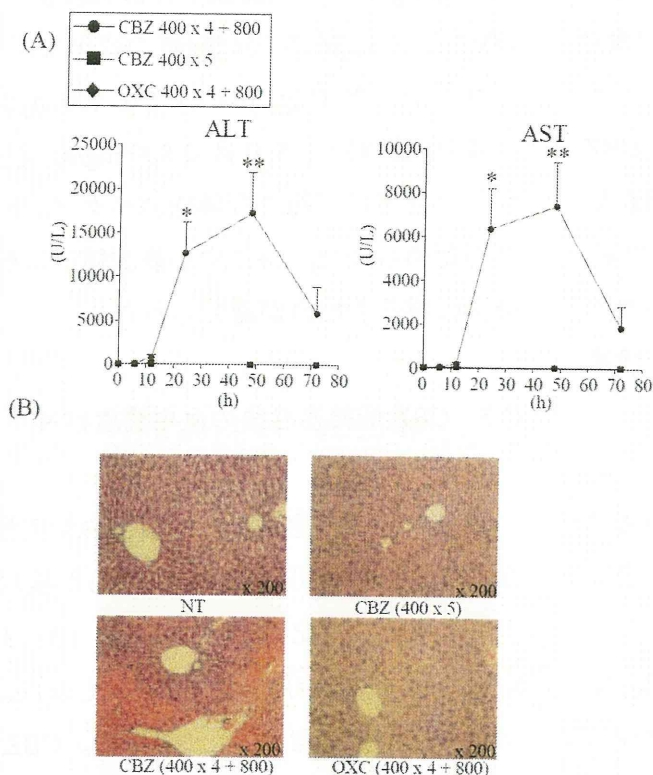


Fig. 3. Time-dependent changes of the plasma ALT and AST levels in CBZ- or OXC-induced liver injury. Mice were administered orally CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 400 or 800 mg/kg in 5th day. In experiment for OXC-induced liver injury, mice were administered OXC (in corn oil) at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day. At 6, 12, 24, 48 and 72 h after the last administration, the animals were sacrificed and the blood were collected for assessment of the plasma ALT and AST levels (A). Liver specimens were prepared 24 h after the last CBZ administration. Liver tissue sections were stained with H&E (B). Data are mean \pm SEM (n = CBZ 400 mg/kg for 4 days + 800 mg/kg: 8, others: 5). Significantly different from 0 h group (* p < 0.05 and ** p < 0.01).

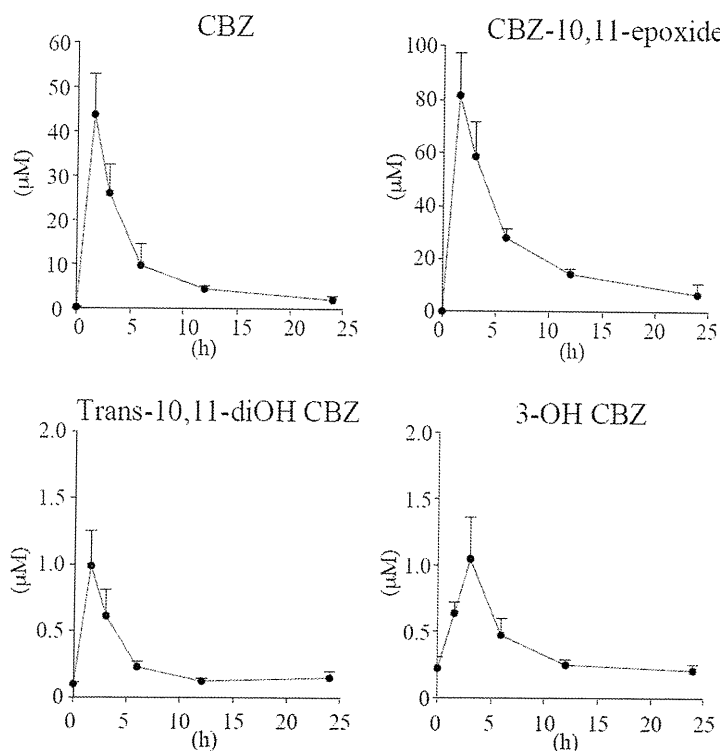


Fig. 4. Changes of plasma concentration of CBZ and its metabolites in CBZ-induced liver injury. Mice were orally administered CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day. At 1.5, 3, 6, 12, and 24 h after the last administration, the animals were sacrificed and the blood were collected for assessment of CBZ and its metabolites in plasma. Data are mean \pm SEM (n = 5).

C-4 Cyp3a 活性測定

CBZ は様々な転写因子を介して、多くの代謝酵素を誘導することが報告されている (Oscarson et al., 2006)。今回作製したモデルでも酵素誘導が起きているか確認するために、CBZ を 400 mg/kg で 4 日間連投し、24 時間後に解剖し、摘出した肝臓から調製したミクロソームを用いて、CBZ で誘導される代表的な薬物代謝酵素の一つである Cyp3a の活性を、ミダゾラム 4 および 1'-水酸化酵素活性を利用して測定した (Fig. 5)。CBZ 投与群と OXC 投与群のいずれにおいても、ミダゾラム 4-水酸化酵素活性とミダゾラム 1'-水酸化酵素活性の両方で有意な上昇が認められた。

また、この際の血漿中 ALT 値は 32.3 ± 8.3 U/L であった (data not shown)。

以上の結果より、今回のモデルにおいても CBZ によって Cyp3a を誘導することが示唆されたため、Cyp3a の CBZ 誘導性肝障害への関与を検討した。

C-5 Cyp3a 阻害薬併用投与の検討

Cyp3a の阻害薬は、細胞にフェノバルビタールで誘導されたマウスのミクロソームと CBZ を同時に処置した際の細胞障害性を減弱させるという報告 (Pirmohamed et al., 1992b) があることから、Cyp3a が *in vivo* でも毒性発現に関与するか検討するために Cyp3a 特異的な阻

害薬である KTZ または TAO を CBZ と併用投与して、CBZ 投与 24 時間後の ALT 値および AST 値を測定した (Fig. 6A)。CBZ 単独投与群と比較して、KTZ 併用投

与群で ALT 値および AST 値の上昇傾向が認められた。また、TAO 併用投与群においては ALT 値の有意な上昇と AST 値の上昇傾向が認められた。

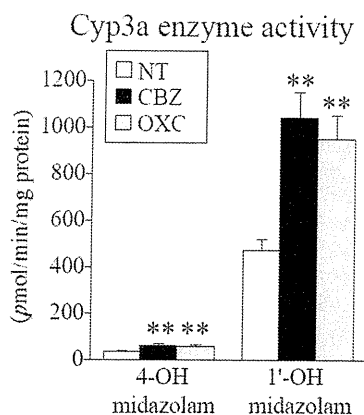


Fig. 5. Effects of CBZ or OXC administration on Cyp3a activity assessed by midazolam 4-OH or 1'-OH hydroxylation activity. Mice were orally administered CBZ or OXC at a dose of 400 mg/kg for 4 days and sacrificed at 24 h after the last drug administration and the livers were collected. Data are mean \pm SEM (n = 5). Significantly different from 0 h group (** $p < 0.01$).

阻害薬を併用投与した群、Fig. 2 で ALT 値に変化が認められなかった CBZ 800 mg/kg 単回投与群 (single) および、CBZ 単独を反復投与した群 (CBZ) の最終投与 3 時間後の血中濃度を Fig. 6B に示した。CBZ の血中濃度において、CBZ 単独投与群と比較して、KTZ 併用投与群、TAO 併用投与群および単回投与群において、CBZ 群の 3.1、3.4 および 3.0 倍の有意な血中濃度の上昇が認められた。

CBZ-10,11-epoxide の血中濃度においては、KTZ および TAO 併用投与群で有意な減少が認められ、単回投与群では有意な上昇が認められた。それぞれ CBZ 群の 0.07、0.09 および 2.2 倍の血中濃度であった。また、3-OH CBZ の血中濃度においては KTZ 併用投与群では上昇傾向が、TAO 併用投与群では有意な上昇が認められたが、単

回投与群では減少傾向が認められた。それぞれ CBZ 群の 2.0、3.0 および 0.48 倍の血中濃度であった。2-OH CBZ と trans-10,11-diOH CBZ は、阻害薬併用投与群および単回投与群のいずれにおいても検出できなかった (data not shown)。以上の結果より、3-OH CBZ が CBZ 誘導性肝障害の発症に関与する可能性が示唆された。

C-6 GSH と GSSG 量測定および酸化ストレスマーカーの測定

Pirmohamed ら (1992b) は、GSH がフェノバルビタールで誘導されたマウスのミクロソームと CBZ を同時に処置した際の細胞障害性を減弱させる働きがあると報告している。また、Fig. 6 で示された 3-OH CBZ はマクロファージを活性化し、GSH

が解毒する ROS の産生を誘導することが知られている (Pearce et al., 2008)。本研究においても GSH が解毒に関与するか検討するために、CBZ 最終投与の 0、1.5、3、6、12 および 24 時間後の肝臓中の還元型 GSH および酸化型 GSSG 量に加えて、酸化ストレスのマーカーである protein carbonyl 値を測定した (Figs. 7A and 7B)。CBZ 最終投与の 1.5、3、6、12 および 24 時間後において、GSH と GSSG 量の有意な減少が認められた。GSH と GSSG 値のいずれにおいても最終投与の 1.5 時間後に最低値を示した後、徐々に上昇することが認められた。また、CBZ 最終投与の

1.5、3 および 6 時間後において、酸化ストレスのマーカーとなる GSH/GSSG 比の有意な減少が認められた。最終投与 12 および 24 時間後の GSH/GSSG 比は 0 時間の群と比較して低値を示したが、有意ではなかった。加えて、CBZ 最終投与の 1.5 時間後において Protein carbonyl 値の有意な上昇が認められた。最終投与の 0 時間の群と比較して、Protein carbonyls は 3 および 6 時間後において、高い値を示したが有意ではなかった。以上の結果より、CBZ 誘導性肝障害時に酸化ストレスが上昇することが示され、肝臓中 GSH が減少することが示された。

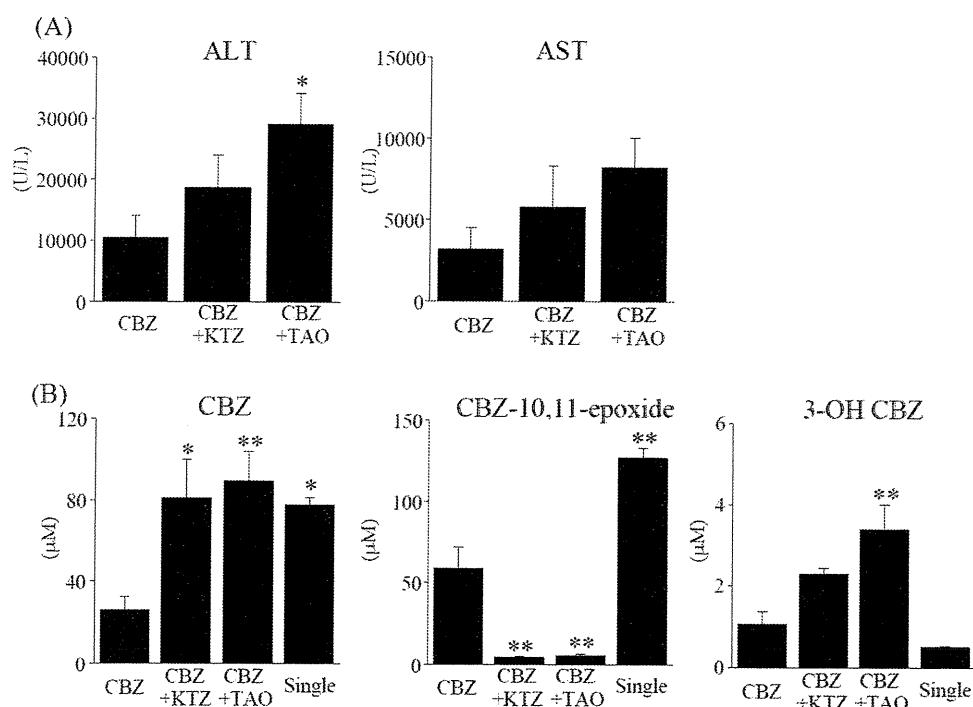


Fig. 6. Effects of Cyp3a inhibitors on plasma ALT, AST and the concentration of CBZ and its metabolites in CBZ-induced liver injury. Mice were orally administered CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day (CBZ). One hour before the last CBZ administration, TAO (100 mg/kg in corn oil) or KTZ (50 mg/kg in corn oil) were administered intraperitoneally. Mice were administered orally CBZ at a dose of 800 mg/kg only once (single). Blood samples were collected at 3 h or 24 h after the last CBZ administration. Data are mean ± SEM (n = 5). Significantly different from CBZ alone-administered group (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

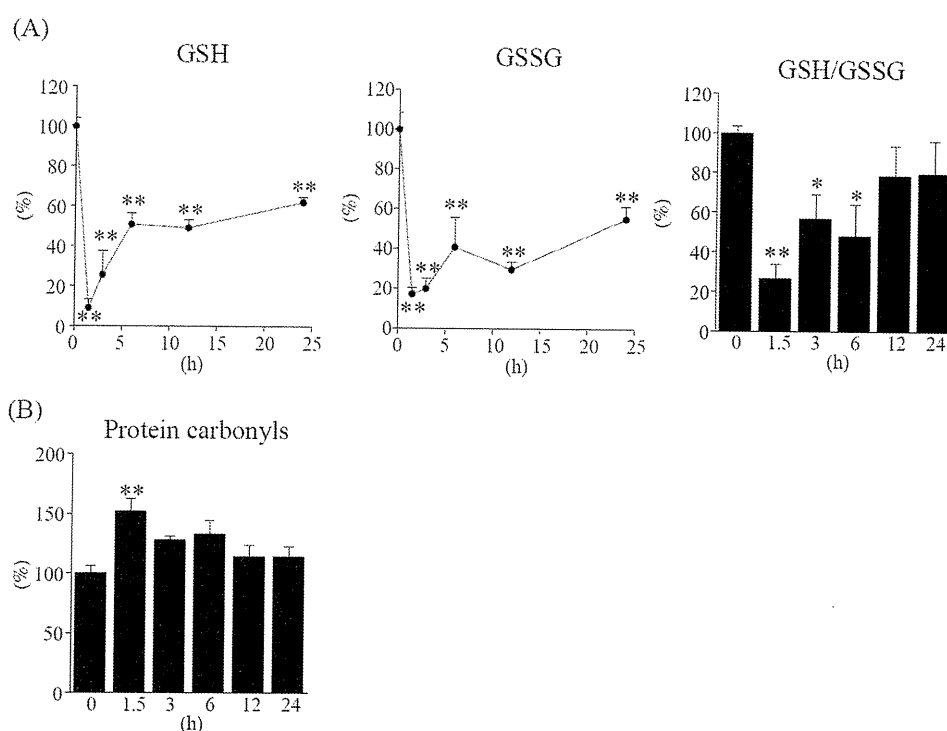


Fig. 7. Time-dependent changes of hepatic GSH and GSSG levels and expression levels of oxidative stress markers in mice. Mice were administered orally CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day. At 1.5, 3, 6, 12, and 24 h after the last CBZ administration, the animals were sacrificed and the livers and the plasma were collected for assessment of the hepatic GSH and GSSG levels and GSH/GSSG ratio (A), and plasma protein carbonyls (B). Data are mean \pm SEM (n = 5). Significantly different from 0 h group (* p < 0.05 and ** p < 0.01).

C-7 Danger signal 関連遺伝子の mRNA 変動解析

Fig. 7 で酸化ストレスマーカー値の上昇が認められたが、酸化ストレスは danger signal 関連遺伝子を誘導することが報告されている (Yao and Brownlee, 2010) ことから、NT 群、CBZ 最終投与後 0、6、12 および 24 時間後群および OXC 投与群のマウスにおける danger signal 関連遺伝子の肝 mRNA の時間依存的な変化を測定した (Fig. 8)。対照 (NT) 群と比較して、S100A8 に関しては 6 および 12 時間後に上昇傾向が認められ、24 時間後に有意な上昇が認められた。S100A9 では、

12 時間後に上昇傾向が認められ、24 時間後に有意な上昇が認められた。TLR4 は 6 時間後に有意な上昇が認められ、12 および 24 時間後には上昇傾向が認められた。RAGE は 6 時間後に上昇傾向が認められ、12 時間後に有意な上昇が認められた。HMGB1、TLR2 および TLR9 に関してはいずれの群においても変化は認められなかった。OXC 投与群においてはいずれの mRNA においても変化は認められなかった。以上の結果から、TLR4 と RAGE およびそのリガンドである S100A8 と S100A9 が CBZ 誘導性肝障害時に上昇することが示された。

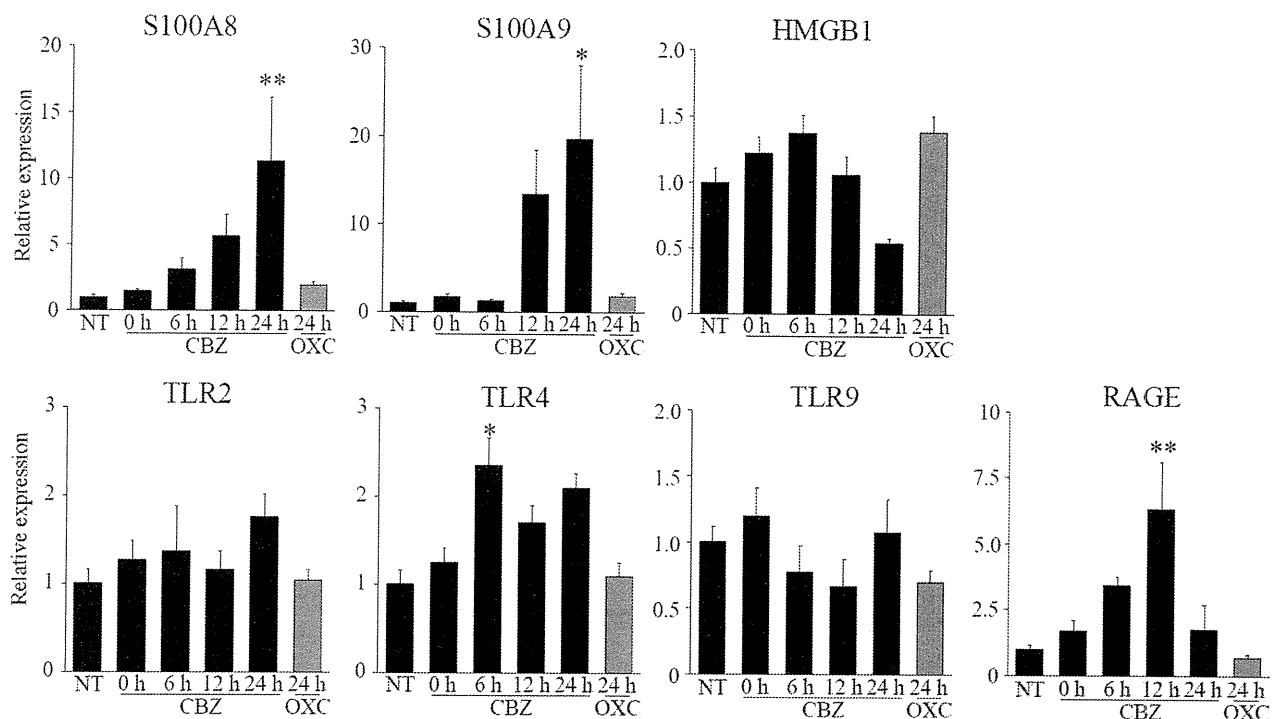


Fig. 8. Time-dependent changes of the mRNA expression levels of danger signal-related genes in CBZ- or OXC-administered mice. Mice were administered orally CBZ or OXC at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day. At 0, 6, 12, and 24 h after the last CBZ administration, the animals were sacrificed and livers were collected for assessment of the expression levels of the hepatic mRNAs. Expression of hepatic mRNA was normalized to β -actin. Data are mean \pm SEM (n = 5). Significantly different from NT group (* p < 0.05 and ** p < 0.01).

C-8 CBZ投与マウス血漿中のHMGB1タンパク質量の変動解析

C-7で、CBZ投与によりHMGB1の肝mRNA量の時間依存的な変化は認められなかった。しかし、HMGB1は活性化したマクロファージだけでなくネクロースした細胞からも放出されるために (Lotze et al., 2007)、CBZ最終投与0、1.5、3、6、12および24時間後の血中HMGB1タンパ

ク質をELISAで定量した (Fig. 9)。血中HMGB1は最終投与の6時間後からゆるやかな上昇が認められ、24時間後に有意に上昇した。CBZ最終投与の直前 (2.53 ± 3.75 ng/mL)と比較して、CBZ最終投与の24時間後 (120.08 ± 96.18 ng/mL)に血漿中HMGB1の有意な上昇が認められた。また、NT群は 1.66 ± 1.84 ng/mL、OXC投与群は 1.95 ± 1.46 ng/mLであった。

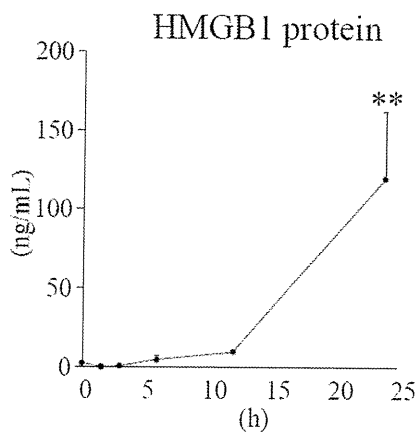


Fig. 9. Time-dependent changes of the plasma HMGB1 levels assessed using ELISA in CBZ-administered mice. Mice were administered orally CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day. At 0, 6, 12, and 24 h after the last CBZ administration, the animals were sacrificed and the plasma was collected for assessment of the plasma protein levels. Data are mean \pm SEM (n = 5). Significantly different from NT group (** $p < 0.01$).

C-9 TLR4 antagonist または anti-RAGE 抗体併用投与による CBZ 誘導性肝障害への影響

TLR4 や RAGE の活性化が CBZ 誘導性肝障害の発症に関与するか検討するために、TLR4 のアンタゴニストである eritoran、または monoclonal anti-RAGE 抗体を CBZ と併用投与して、CBZ 最終投与 24 時間後の血漿中 ALT 値および AST 値を測定した (Fig. 10)。CBZ 単独投与群と比較して、eritoran との併用投与群で ALT 値の有意な減少と AST 値の減少傾向が認められた。anti-RAGE 抗体併用投与群においては、ALT 値および AST 値の有意な減少が認められた。

以上の結果より、TLR4 および RAGE の活性化が CBZ 誘導性肝障害の発症に関与することが示唆された。

C-10 炎症反応に関与する転写因子、サイトカインおよびケモカインの mRNA 変

動解析

CBZ 誘導性肝障害の発症にどのような炎症性の因子が関与するか検討するために、NT 群、CBZ 最終投与後 0、6、12 および 24 時間後群および OXC 投与群における転写因子、炎症性サイトカインおよびケモカインの肝 mRNA の測定をした (Fig. 11)。NT 群と比較して、CBZ 最終投与 24 時間後に Th1 に関連する因子である T-bet および IFN- γ の有意な減少が認められた。また、Th1 サイトカインである IL-12p35 は CBZ 投与のいずれの時間においても減少傾向が認められ、12 時間後において有意な減少が認められた。Th2 に関連する因子である GATA-3 はいずれの時間においても変化は認められなかった。Th17 に関連する因子である ROR- γ t および IL-23p19 は 12 時間後に有意な上昇が認められた。Th17 サイトカインの IL-6 は 6 および 12 時間後において上昇傾向が認められ、24 時間後に有意な上昇が認められ

た。アポトーシスを誘導する FasL は 6 時間後に上昇傾向が認められ、12 時間後に有意な上昇が認められた。好中球の遊走に関与する MIP-2 は 6 および 12 時間後に上昇傾向が認められ、24 時間後に有意な上昇が認められた。また、いずれの因子においても OXC 投与群では変化は認め

られなかった。IL-17 の肝 mRNA は低すぎて定量することができなかった (data not shown)。以上の結果より、IL-6 および IL-23 などの Th17 系のサイトカインが CBZ 誘導性肝障害に関与する可能性が考えられた。

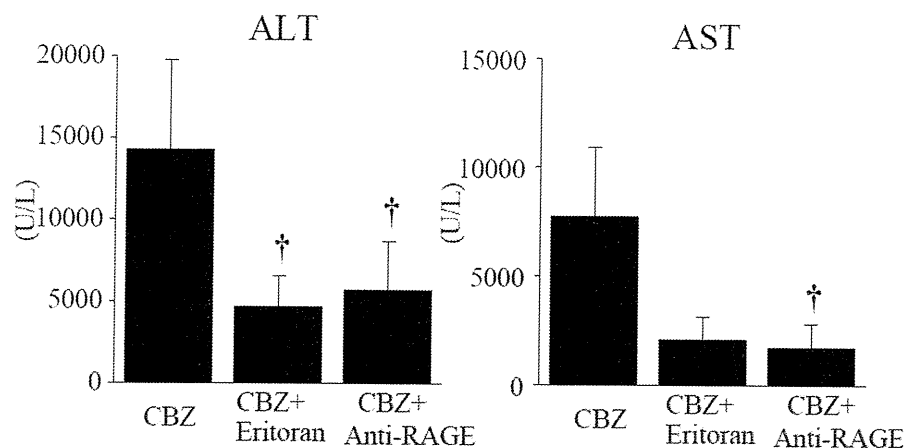


Fig. 10. Effects of the administration of eritoran, TLR4 antagonist, or RAGE-monoclonal antibody on CBZ-induced liver injury. Mice were administered eritoran intravenously (50 μ g/mouse in 0.1 mL of sterile saline) or monoclonal anti-mouse RAGE antibody intraperitoneally (100 μ g of anti-RAGE antibody in 0.5 ml of sterile PBS), 6 h after the last CBZ administration. Blood samples were collected at 24 h after the last CBZ administration. Data are mean \pm SEM (CBZ 400 mg/kg for 4 days + 800 mg/kg; n = 8, others: n = 5). Significantly different from CBZ alone-administered group ($\dagger p < 0.05$).

C-11 IL-17 と IL-23 のタンパク質量の変動解析

IL-17 の肝臓中 mRNA は検出限界以下の発現量のため測定できなかったため、血漿中 IL-17 タンパク量を定量するとともに、肝 mRNA とタンパク質量が相関するか検討するために、NT 群、CBZ 最終投与後 0、6、12 および 24 時間後群および OXC 投与群のマウス血漿中の IL-17 と IL-23 タンパク質量の変動について

ELISA を用いて検討した (Fig. 12)。NT 群と比較して、CBZ 最終投与の 24 時間後に血漿中の IL-17 と IL-23 の有意な上昇が認められた。また、NT 群、CBZ 最終投与より 0、6 と 12 時間後の群および OXC 投与群に関してはいずれにおいても検出限界以下であった。以上の結果より、IL-23 の血漿中タンパク質量と肝 mRNA 発現量に相関関係が認められた。

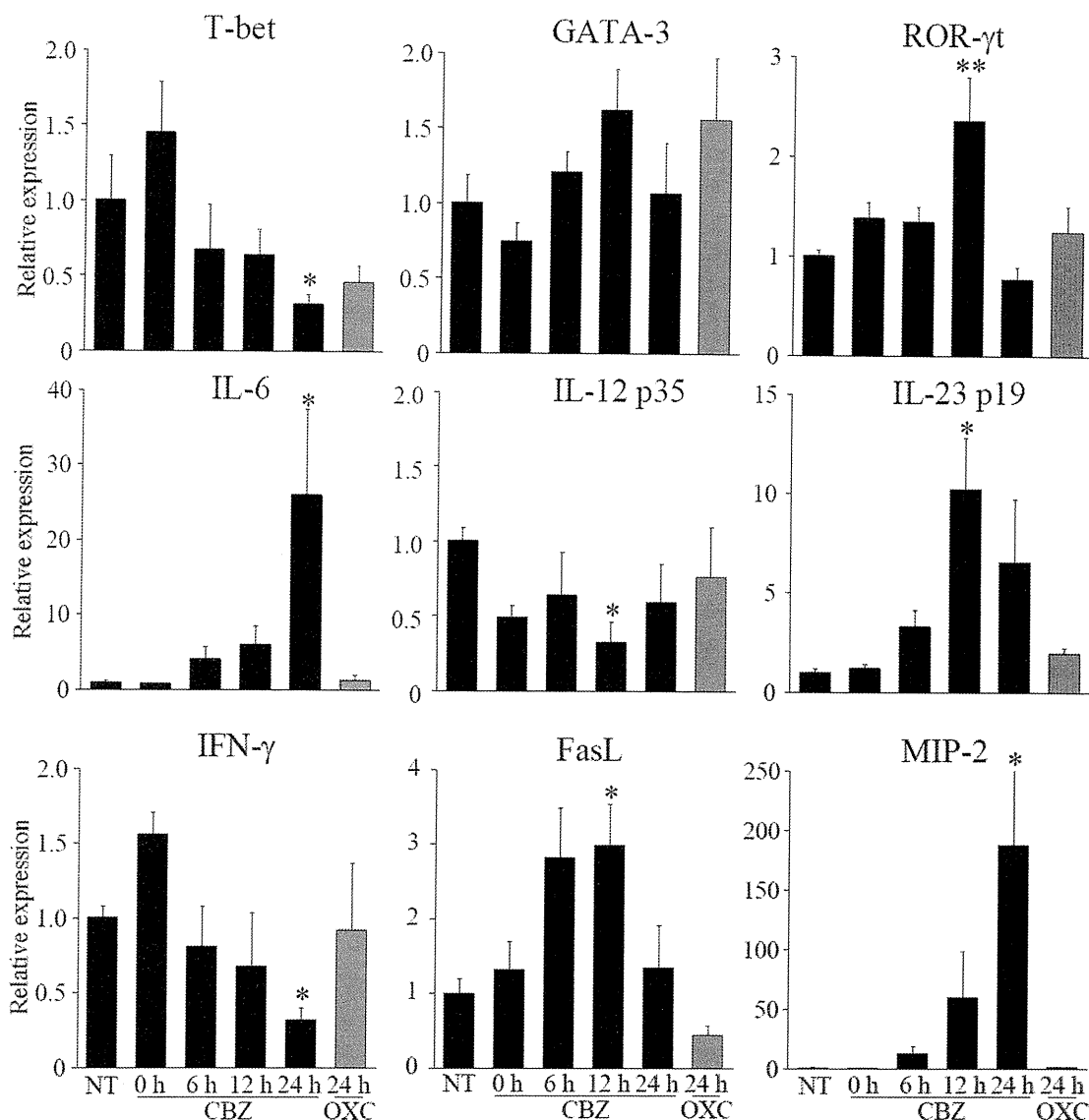


Fig. 11. Time-dependent changes of the mRNA expressions and plasma protein levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines in CBZ- or OXC-administered mice. Experimental conditions for animal treatments were the same as those in Fig. 8. Data are mean \pm SEM (n = 5). Significantly different from NT group (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

C-12 Anti-IL-17 抗体併用投与による CBZ 誘導性肝障害への影響

多くの自己免疫疾患に関与する IL-17 が CBZ 誘導性肝障害に関与するか検討するために、monoclonal anti-IL-17 抗体を CBZ と併用投与して、最終投与 24 時間後の ALT 値および AST 値を測定した (Fig. 13)。

CBZ 単独投与群と比較して、IgG アイ

ソタイプコントロールを併用投与した群では ALT 値および AST 値の変化は認められなかった。CBZ と IgG アイソタイプコントロールを併用投与した群と比較して、monoclonal anti-IL-17 抗体併用投与群において ALT 値および AST 値の有意な減少が認められた。CBZ と IgG アイソタイプコントロール併用投与群と monoclonal anti-IL-17 併用投与群において、免疫細胞

の肝臓への浸潤について検討するため、抗 MPO 抗体を用いた免疫染色による肝組織像の評価を行った (Fig. 14A)。また、MPO 陽性細胞を計数化した結果を Fig. 14B に示した。IgG アイソタイプコントロール併用投与群と比較して、monoclonal

anti-IL-17 抗体の併用投与により MPO 陽性細胞の有意な減少が認められた。

以上の結果より、IL-17 が MPO 陽性細胞の浸潤を介して CBZ 誘導性肝障害の病態に関与する可能性が示唆された。

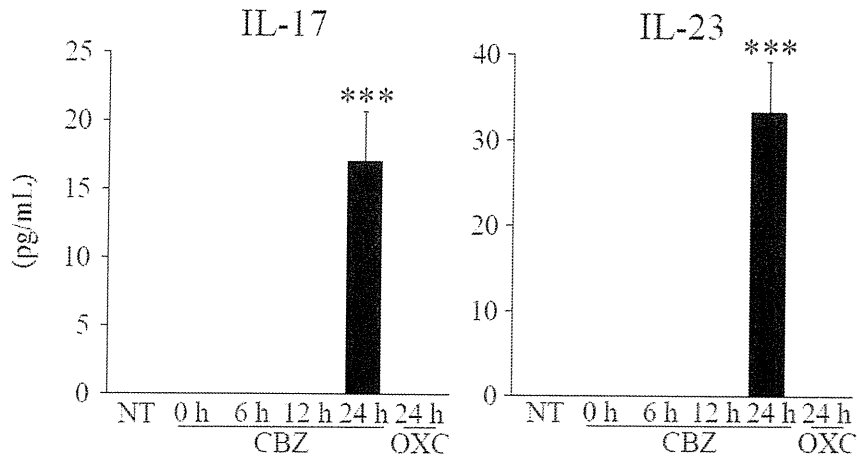


Fig. 12. Time-dependent changes of plasma protein levels of IL-17 and IL-23 in CBZ- or OXC-administered mice. Mice were administered orally CBZ or OXC at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day. At 0, 6, 12, and 24 h after the last CBZ administration, the plasma was collected for assessment of the plasma protein levels. Data are mean \pm SEM (n = 5). Significantly different from NT group (***) $p < 0.001$.

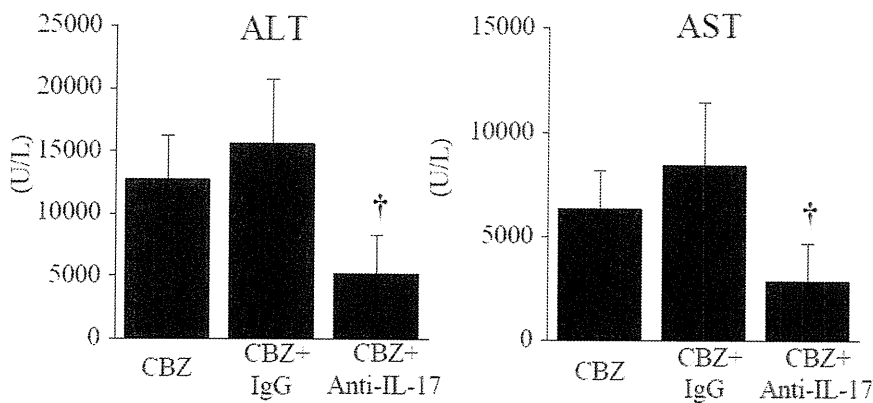


Fig. 13. Effects of monoclonal anti-IL-17 antibody on CBZ-induced liver injury. Mice were administered anti-mouse IL-17 antibody intraperitoneally (100 μ g of anti-mouse IL-17 antibody in 0.5 ml of sterile PBS) 9 h after the last CBZ administration in CBZ-induced liver injury mouse model. As a control, rat IgG2a was administered (100 μ g of rat IgG2a in 0.5 ml of sterile PBS). Data are mean \pm SEM (CBZ 400 mg/kg for 4 days + 800 mg/kg; n = 8, others: n = 6). Significantly different from CBZ + IgG administered group († $p < 0.05$).

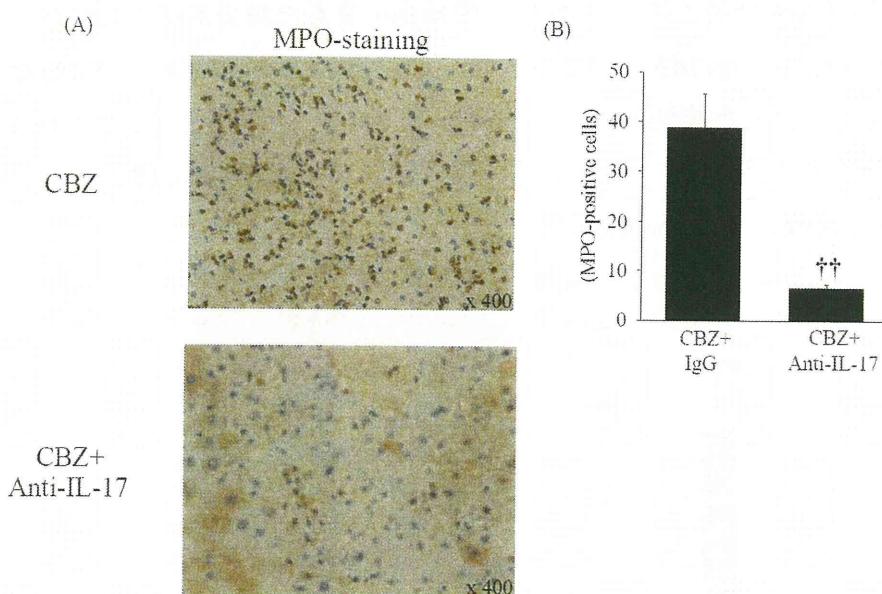


Fig. 14. Effect of monoclonal anti-IL-17 antibody on MPO-positive cells infiltration into hepatocytes. MPO-staining in CBZ alone-administered mice or CBZ/Anti-IL-17 administered (A). These samples were the same as those in Fig. 13. The mononuclear cells infiltration was assessed by immunostaining for MPO. The number counting for MPO-positive cells in CBZ alone-administered mice or CBZ/Anti-IL-17 administered (B). Data are mean \pm SEM ($n = 3$). Significantly different from CBZ + IgG administered group ($\dagger\dagger p < 0.01$).

C-13 PGE₁ 併用投与による CBZ 誘導性肝障害への影響

PGE₁ は好中球の働きを抑制することや、IL-17 の産生を抑えることで Halothane 誘導性肝障害を緩和することが報告されている (Talpain et al., 1995; Kobayashi et al., 2009)。PGE₁ が CBZ 誘導性肝障害を緩和させるのではないかと仮定し、PGE₁ を CBZ と併用投与し、最終投与 24 時間後における血漿中 ALT 値および AST 値、Fig. 11 で上昇が認められた炎症性サイトカインおよびケモカインの IL-6、IL-23p19 および MIP-2 の肝 mRNA に加えて、血漿中 IL-17 と IL-23 の測定を行った (Figs. 15A - 15C)。CBZ 単独投与群と比較して、PGE₁ 併用投与により ALT 値および AST 値の有意な減少が認められた (Fig.

15A)。また、IL-6、IL-23p19 および MIP-2 の肝 mRNA の有意な減少に加え (Fig. 15B)、IL-17 と IL-23 の血漿中タンパクの有意な減少が認められた。

D. 考察

薬物誘導性肝障害のメカニズムを解析するにあたって、動物モデルの不足は非常に大きな問題である。現在よく使用されているモデルは APAP 誘導性肝障害のマウスやラットが挙げられるが、このモデルだけでは種々の薬物誘導性肝障害の全てのメカニズムと全ての臨床の所見を包括することはできない。種々の薬物誘導性肝障害に適する他の動物モデルを作製し、そのメカニズムを解析することは前臨床段階の創薬において急務である。