

Fig. 15. Effects of PGE₁ administration on CBZ-induced liver injury. Mice were administered orally CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg in 5th day. Nine hours after the last CBZ administration, mice were treated with PGE₁ intraperitoneally (50 μg/mouse, dissolved in 0.5 mL of sterile saline). As a control, vehicle was administered. At 24 h after the last CBZ administration, the livers and the plasma were collected for assessment of plasma ALT and AST levels (A), the expressions of the hepatic mRNA of IL-6, IL-23p19 and MIP-2 (B), and plasma protein levels of IL-17 and IL-23 (C). Expression of hepatic mRNA was normalized to β-actin. Data are mean ± SEM (CBZ 400 mg/kg for 4 days + 800 mg/kg; n = 7, CBZ+ PGE₁; n = 6). Significantly different from CBZ alone-administered group (**p* < 0.05 and ***p* < 0.01).

近年、発症に免疫系が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示唆されている (You et al., 2006; Kobayashi et al., 2009)。当研究室においても、dicloxacillin を 600 mg/kg で単回腹腔内投与した肝障害モデ

ルや、flutamide を 1500 mg/kg で単回経口投与した肝障害モデルを作製し、それらの発症に IL-4 を中心とする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 (Higuchi et al., 2011; Higuchi et al., in press)。また、GSH 減少モデルラットに薬物を投与することで diclofenac および flutamide 薬物誘導性肝障害を惹起させるラットモデルも作製したが (Morita et al., 2009)、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。今までに報告されている連投条件下での薬物誘導性肝障害惹起モデルは、superoxide dismutase-2 のヘテロノックアウトマウスに flutamide を 50 または 100 mg/kg で腹腔内投与により 4 週間連投したマウスモデルや、azathioprine を 25 mg/kg で経口投与により 4 週間連投したラットモデルなどが挙げられるが、いずれにおいても肝組織のごく一部でネクロシスが認められる程度の軽微な肝障害であり (Kashimshetty et al., 2009; El-Ashmawy et al., 2010)、肝障害の発症メカニズムを検討するのに適している動物モデルは現在のところ無い。

APAP の大量服用による例を除き、臨床における薬物誘導性肝障害はそのほとんどが薬物の反復投与により惹起されることを考慮すると、実際の臨床に近い反復投与条件による薬物誘導性肝障害モデルが必要である。単回投与と反復投与の際の血中濃度を比較すると、CBZ の投与量は同じだったにも関わらず、CBZ の血中濃度で 3.0 倍、CBZ-10,11-epoxide で 2.2 倍、3-OH CBZ で 0.48 倍となり (Fig. 6)、

投与条件により、薬物の体内動態が大きく変化したことが示された。今回作製したモデルは APAP などの単回投与のモデルマウスとは異なり、酵素誘導、薬物耐性や自己抗体など、連投の肝障害モデルでのみ得られる情報を提供できるものと考えている。今後、反復投与条件での、薬物誘導性肝障害のさらなる動物モデルが必要であると思われる。

本研究において、CBZ を腹腔内投与法により連投するとマウスが針によるストレスを受ける可能性が高いこと、さらに実際に臨床で CBZ および OXC を処置する際には経口投与で処置されることを考慮に入れ、CBZ および OXC をマウスに投与する際には経口投与とした。

本研究では初めに、CBZ を 400 mg/kg で 5 日間連投しても肝障害が起きないのに対し、400 mg/kg で 4 日間連投後、5 日目に 800 mg/kg で投与した際に肝障害が惹起されることを初めて見出した (Fig. 3A)。肝障害が惹起される状態での最大血中濃度 ($10.36 \pm 2.18 \mu\text{g/mL}$) はヒトでの CBZ の至適血中濃度 ($4 \sim 12 \mu\text{g/mL}$) の範囲に入っていた (Fig. 4)。しかし、連投中の血中濃度は測定していないので、連投中も至適血中濃度の範囲内に入っていたかは不明である。CBZ を 800 mg/kg で単回投与した群 ($18.52 \pm 0.78 \mu\text{g/mL}$) と、KTZ または TAO 併用投与群 (19.18 ± 4.39 、 $21.17 \pm 3.28 \mu\text{g/mL}$) における血中濃度は全て中毒濃度 ($> 15 \mu\text{g/mL}$) に達していた (Fig. 6)。このことから、臨床において CYP3A を阻害する作用がある薬物と CBZ を併用投与するのは危険であると考

えられる。添付文書においても CYP3A を阻害する作用を持つイトラコナゾールなどとは併用を注意するように記載されている。Eichelbaum ら (1975) は、男性患者に 200 mg/kg の CBZ を 1 日 3 回で、6 日間服用させ、8 時間後の血中濃度を測定したところ、CBZ 血中濃度は $8.47 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$ で CBZ 10,11-epoxide の血中濃度は $0.85 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$ で、半減期はそれぞれ 20.9 ± 5.0 時間および 16.7 ± 5.0 時間であり、CBZ よりも CBZ 10,11-epoxide のほうが低い血中濃度を示すことを報告している。ヒトにおける CBZ と CBZ 10,11-epoxide の血中濃度を測定した他の報告でも同様の結果を示している (Van Rooyen et al., 2002) が、これは Fig. 4 で示した結果と逆の結果である。しかし、Taylor ら (1985) は餌に CBZ を入れてマウスに 2 週間給餌させ、血中濃度を測定したところ、CBZ の血中濃度 $2.6 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$ だったのに対し、CBZ 10,11-epoxide は $16.2 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$ であり、本研究と同様に CBZ-10,11-epoxide のほうが高い血中濃度を示した。以上の論文報告などから CBZ と CBZ 10,11-epoxide の血中濃度比には、種差が大きく関与している可能性が考えられる。

今回のモデルにおいて、CBZ は自身を代謝する酵素である Cyp3a の活性を上昇させていた (Fig. 5)。CBZ を服用していた患者の肝臓において、種々の CYP や薬物代謝酵素を誘導する転写因子である pregnane X receptor (PXR) や constitutive androstane receptor の発現量の上昇が認められたと報告されており、CBZ が hPXR

を活性化させて CYP の発現量を上昇させるという報告もあるが、マウスにおいて CBZ が Cyp3a 発現量を上昇させる詳細なメカニズムは未だに不明である

(Oscarson et al., 2006; El-Sankary et al., 2001; Chang and Waxman 2006)。ヒトにおける CBZ の投与量は通常、400 mg 程度から始まるが、自身を代謝する酵素を誘導するので、治療有効域を保つために徐々に投与量を上げることが一般的である。本研究で作製したモデルマウスのように治療有効域を保つために CBZ の投与量を上昇させることが CBZ 誘導性肝障害の発症の一因であることが考えられる。加えて、CBZ の血中濃度が中毒域に達していたにも関わらず (Fig. 6B)、単回投与時にはいかなる投与量においても肝障害が惹起されなかったことから (Fig. 2B)、連投時の代謝酵素の誘導または自己抗体の産生などが CBZ 誘導性肝障害の発症において非常に大きな役割を果たしていると考えられる。肝組織染色の結果 (Fig. 3B)、CBZ 投与マウス (400 mg/kg for 4 days and 800 mg/kg at 5th day) において、中心静脈周辺の肝細胞のネクロシスおよび脱落が認められた。これは APAP 誘導性肝障害の肝組織所見と類似したものである (Antoine et al., 2009)。Cyp は主に中心静脈の周辺に存在しているため、この所見は CBZ 誘導性肝障害の発症に何らかの Cyp が関与することを示唆している。CBZ 誘導性肝障害は肉芽腫性の肝炎で hypersensitivity を伴うものと、肝細胞のネクロシスや炎症を伴う肝障害の 2 つのパターンに分類できるが (Björnsson,

2008; Björnsson and Olsson, 2005)、肝組織の所見などから、今回作製したモデルは後者の検討に適したモデルと考えられる。

Cyp3aの阻害薬はCBZの細胞障害性を減弱させるという *in vitro* の報告 (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 と併用投与した結果、予想と反して阻害薬を併用投与した群で肝障害の増悪が認められた (Fig. 6A)。Pirmohamed ら (1992b) はフェノバルビタールによって酵素誘導されたミクロソームを用いて、KTZ により CBZ の細胞傷害性が減弱することを示した。今回の結果と一致しなかった主因は、誘導薬が異なることであり、誘導される代謝酵素の違いによって、CBZ から産生される解毒代謝物と反応性代謝物が異なったためであると考えられる。また、KTZ や TAO を併用投与したマウスにおける血漿中肝障害マーカー値や血中濃度の測定から (Figs. 6A and 6B)、3-OH CBZ が CBZ 誘導性肝障害の発症に関与することが示唆された。3-OH CBZ はマクロファージを活性化し、ROS 産生を誘導することに加え、種々の Cyp や MPO により反応性代謝物にさらに代謝されることが報告されている (Pearce et al., 2008; Lu and Uetrecht, 2008)。ヒトにおいて、3-OH CBZ を産生する酵素反応は CYP3A4 と CYP2B6 が担うが、CYP3A4 と CYP2B6 は CBZ の投与により誘導されるため (Oscarson et al., 2006; Pearce et al., 2002)、反復投与下で CBZ の投与量を上げるこ

は 3-OH CBZ の産生を増大させることにつながり、肝障害のリスクを高くすると考えられる。

GSH は反応性代謝物やフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護する役割を果たしており、Fig. 7A で示された GSH の減少は ROS および反応性代謝物によるものだと考えられる。GSH が CBZ の細胞傷害性を抑制するという点に関しては、Pirmohamed ら (1992b) の細胞を用いた検討結果と一致した。GSSG は酸化型の GSH であり、GSH/GSSG 比は酸化ストレスが発生したときに減少するマーカーとして用いられる。ラットの肝臓ミクロソームを用いた検討から、CBZ の代謝物は肝臓のミトコンドリアを傷害することにより酸化ストレスを生じ、細胞中の GSH 量を減少させ、GSSG 量を上昇させることが明らかになっており (Santos et al., 2008)、CBZ 誘導性肝障害時にはこの経路からも ROS 産生が起こっていることが考えられる。

ROS は近年炎症性因子の発現に影響を与えることが注目されている。抗酸化剤が転写因子の核内への移行を抑制することでサイトカインの転写を抑制すること、および ROS が TLR4 や RAGE のリガンドである S100A8、S100A9 および HMGB1 を誘導し、それらの活性化を調節する報告に加えて、ROS によってネクローシスを起こした肝細胞からも HMGB1 が放出されることが知られている (Yao and Brownlee, 2010; Ryan et al., 2004; Lotze et al., 2007)。また、ROS は apoptosis

signal-relating kinase 1 という p38 を活性化
するタンパクを介して TLR4 を選択的に
活性化することが報告された
(Matsuzawa et al., 2005)。これらのことか
ら、ROS を介した TLR4 や RAGE の活性
化が CBZ 誘導性肝障害において代謝的活
性化と炎症をつなぐものではないかと仮
定して考えた。Figs. 8 から 10 で示したよ
うに、CBZ 誘導性肝障害モデルマウスに
おいて TLR4 や RAGE のリガンドやレセ
プター自身の mRNA またはタンパク質量
の上昇が認められたことに加えて、TLR4
のアンタゴニストまたは monoclonal
anti-RAGE 抗体投与により肝障害の程度
が減弱したことから、TLR4 と RAGE が
CBZ 誘導性肝障害に関与することが明ら
かになった。HMGB1 の放出は、大別して
活性化したマクロファージから放出され
る経路と、ネクローシスした細胞から放
出されるという 2 つのパターンがあるが
(Lotze et al., 2007)、Fig. 8 で HMGB1 の肝
mRNA は変化が認められなかった一方で、
血漿中タンパク質量は CBZ 最終投与 24
時間後において顕著な上昇が認められた
ことから、CBZ 誘導性肝障害時の HMGB1
の上昇はネクローシスした細胞由来だと
考えられる。TLR4 および RAGE の不活
化はそれぞれ、halothane 誘導性肝障害お
よび APAP 誘導性肝障害を緩和すること
が示されており (Dugan et al., 2011; Ekong
et al., 2006)、今回の結果はそれらの報告と
一致した。TLR4 アンタゴニストである
eritoran は Lipid A というエンドトキシ
ンの毒性本体の構造類似体であり、重症敗
血症の治療薬となることが期待されてい

る。RAGE のアンタゴニストである
TTP488 もアルツハイマー治療薬や糖尿
病性腎症などの治療薬になりうると期待
されている。TLR4 や RAGE の活性化は
糖尿病、癌および APAP 誘導性肝障害な
ど、様々な疾患での関与が示唆されてお
り (Yao and Brownlee, 2010; Lotze et al.,
2007; Antoine et al., 2009)、CBZ 誘導性肝
障害だけでなく、他の薬物誘導性肝障害
の発症においても関与する可能性が考え
られる。

TLR4 の活性化は多くの種類のサイト
カインを誘導することが知られているが、
最近、Th17 サイトカインである IL-6、
IL-17、および IL-23 の産生を誘導する
ことが明らかにされた (Wang et al., 2011;
Mu et al., 2011)。また、Mu ら (2011) は、
TLR4 が Th17 サイトカインの放出を促進
するのに対し、TLR2 は抑制に働くことを
報告した。加えて、細胞を用いた検討に
おいて、CBZ は TLR2 には影響を与えず
に TLR4 を活性化する一方で、OXC は
TLR4 と TLR2 の両方を活性化することか
ら (Hutchinson et al., 2010)、この CBZ と
OXC の TLR の活性化の違いが肝障害の
発現の差に影響を与えている可能性が考
えられる。また、paclitaxel や amitriptyline
など CBZ 以外にも TLR シグナリングに影
響を与える薬物は報告されており
(Hutchinson et al., 2010; Szajnik et al., 2009)、
それら薬物の副作用発現に関与している
可能性も考えられる。TLR4 の活性化は
Th1 サイトカインである IFN- γ などを誘導
することが知られているが (Pirmohamed
et al., 1992)、Fig. 11 の結果では CBZ 投与

マウスにおいて Th1 関連遺伝子の T-bet、IFN- γ および IL-12p35 の有意な減少が認められた。種々のサイトカインの発現は、suppressors of cytokine signaling (SOCS) を介して他のサイトカインにより調節を受けることが知られている。SOCS ファミリーはサイトカインシグナリングの負のフィードバックを介して自然免疫と獲得免疫の両方の反応に多大な影響を与える (Palmer and Restifo, 2009)。特に IL-6 と IL-23 は Th1 サイトカインの発現を抑制する SOCS3 の発現を誘導するため、SOCS3 が T-bet、IFN- γ および IL-12p35 の発現を抑制した可能性が考えられる。

炎症性サイトカインの網羅的な解析、血漿中タンパクの測定および IL-17 抗体の併用投与検討より、CBZ 誘導性肝障害の発症に、IL-6、IL-23 および IL-17 などの Th17 系サイトカインや MIP-2 などのケモカインが関与することが示唆された (Figs. 11- 14)。IL-17 は強力な炎症性サイトカインであり、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)。さらに、IL-17 は MIP-2 などのケモカインを強く誘導することや、好中球などの免疫系細胞の浸潤を惹起することが報告されている (Ferretti et al., 2003; Caldwell et al., 2005)。MIP-2 は好中球などの細胞の肝臓への蓄積を促進することが知られており、好中

球の浸潤に起因する気道や肝臓の炎症は抗 MIP-2 抗体の処置で軽減されることが報告されている (Muruve et al., 1999; Laan et al., 1999)。また、lipopolysaccharide (LPS) によって誘導した肺の炎症や虚血再灌流による肝障害において、抗 IL-17 抗体は MIP-2 などのケモカインの誘導や好中球の浸潤を抑制することが報告されており (Ferretti et al., 2003; Caldwell et al., 2005)、これらのことは Fig.14 の IL-17 抗体で MPO 陽性細胞数が減少した結果と一致した。IL-17 の放出に関与する IL-23 は、p19 と p40 というサブユニットからなるヘテロダイマーであるが、p40 を共有して、IL-12 も p35 と p40 からなるヘテロダイマーを形成することが知られている (Steinman, 2007; Langrish et al., 2005)。両者はそれぞれ Th17 系サイトカインと Th1 系サイトカインの放出に関与しており、IL-23p19 と IL-12p35 のバランスにより、産生されるサイトカインが決定される。Fig. 11 の mRNA 解析から、CBZ 投与マウスにおいて IL-23p19 の上昇とともに、IL-12p35 の減少が認められた。このことから CBZ 誘導性肝障害には Th17 系サイトカインが上昇することが考えられる。CBZ 最終投与後に PGE₁ を投与することで CBZ 誘導性肝障害の程度が減弱した (Fig. 15A)。また、PGE₁ 投与により IL-6、IL-23p19 および MIP-2 の肝 mRNA 値と血漿中 IL-17 と IL-23 タンパク量の有意な減少が認められた (Figs. 15B and 15C)。本検討において用いた PGE₁ 製剤は PGE₁ を α -シクロデキストリンで包接し、安定化したものであり、血小板凝集抑制作用およ

び末梢血管拡張作用を有することから様々な末梢循環障害の治療に用いられている。PGEs は炎症性サイトカインの産生を負に調節することで薬物誘導性肝障害や免疫の関与する肝障害からの保護作用は以前から検討されており、PGE₁ は好中球の働きを抑制して superoxide の産生を抑えることや、IL-17 の産生を減少させることで halothane 誘導性肝障害に対して保護作用があることが報告されている (Talpain et al., 1995; Kobayashi et al., 2009)。また、PGE₁ は四塩化炭素の投与によって誘導した劇症肝炎を軽減すること (Akamatsu et al., 2001)、LPS によって誘導される肝障害を軽減し、血清中の IL-12

の減少、IL-10 の増加および肝臓のリンパ球の IL-4 の産生能を増加させることが報告されている (Mokuno et al., 1999)。ヒトにおいても、PGE₁ は血漿中 IL-6 を減少させることにより、肝の虚血再かん流に対して保護作用を示すことが報告されている (Sugawara et al., 1998)。炎症性サイトカインの産生を抑制して肝を保護する作用はヒトでも認められていることと、本研究において post 投与で CBZ 誘導性肝障害を緩和したことから、臨床において PGE₁ は CBZ 誘導性肝障害の治療にも使用できる可能性があると考えられる。以上、本研究により明らかになった CBZ 誘導性肝障害メカニズムを Fig. 16 に示した。

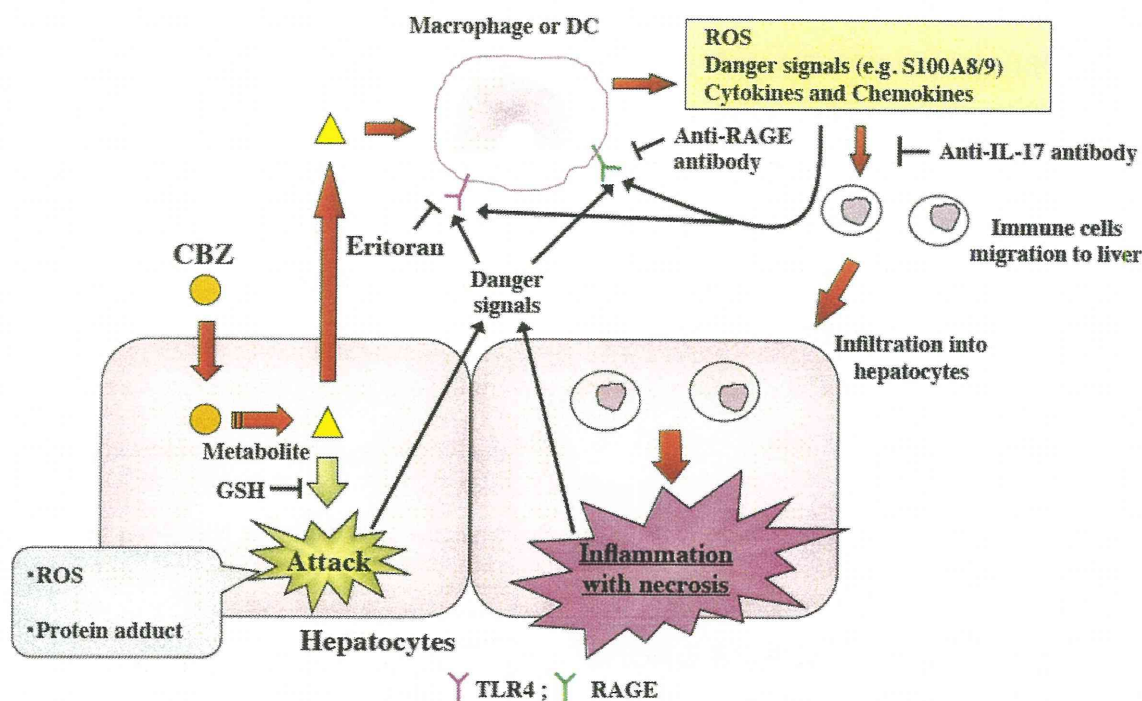


Fig. 16. A proposed mechanistic model of CBZ-induced liver injury. A proposed mechanism based on the data of present study is as follows; first, CBZ is metabolized in hepatocyte by CyPs, then the produced reactive metabolites induce ROS production in macrophages and danger signals which activate TLR4 and RAGE. The activation of TLR4 and RAGE leads the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, resulting in inflammation in the liver. The necrotic hepatocytes secrete the ligands of TLR4 and RAGE, and, therefore, necrosis of hepatocytes induces further inflammation in the liver.

CBZ は肝障害だけでなく、hypersensitivity、Stevens-Johnson 症候群および toxic epidermal necrolysis (TEN) などの皮膚に関する副作用報告が多く、約 1000~10000 人に 1 人の可能性で起こるとされている (Hung et al., 2006)。CBZ による薬疹は TEN まで重症化すると約 40%致死率であるが、皮膚での副作用の動物モデルがほとんどないため発症メカニズムがほとんど分かっていない。Hung ら (2006) は human leukocyte antigen alleles は CBZ による皮膚の副作用と強い関連がある一方、CYP2B6 の変異も hypersensitivity の発症と強くはないが相関関係にあることを報告した。CYP2B6 は 3-OH CBZ を産生する主要な代謝酵素であり、3-OH CBZ は MPO という好中球に主に発現する酵素により酸化代謝を受け、反応性代謝物になるとされている。皮膚における副作用の場合、肝臓で 3-OH CBZ が産生され、血中に放出され、皮膚近傍で MPO により代謝を受け薬疹を起こす可能性が考えられている (Lu and Utrecht, 2008)。3-OH CBZ が毒性発現に関与するという類似点など、本研究で得られたデータが CBZ の皮膚の副作用のメカニズム検討に適用できる部分はある可能性があるが、今回のモデルではマウスの毛などに異常は認められなかったため、CBZ による薬疹のメカニズム検討をする際には新しいモデルが必要であると思われる。

今回、CBZ 誘導性肝障害モデルマウス

を作製し、そ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. 結論

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。

<参考文献>

Ahmed SY and Siddiqi ZA (2006) Antiepileptic drugs and liver disease. *Seizure* **15**: 156-164.

Akamatsu K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y, and Hashida M (2001) Synthesis and pharmacological activity of a novel water-soluble hepatocyte-specific polymeric prodrug of prostaglandin E₁ using lactosylated poly(L-glutamic hydrazide) as a carrier. *Biochem Pharmacol* **62**: 1531-1536.

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**: 521-530.

Björnsson E (2008) Hepatotoxicity associated with antiepileptic drugs. *Acta Neurol Scand* **118**: 281-290.

- Biörnsson E and Olsson R (2005) Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology* **42**: 481-489.
- Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, and Lentsch AB (2005) Divergent functions of CD4⁺ T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G969-976.
- Chang TK and Waxman DJ (2006) Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). *Drug Metab Rev* **38**: 51-73.
- 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.
- Duncan JS, Sander JW, Sisodiva SM, and Walker MC (2006) Adult epilepsy. *Lancet* **367**: 1087-1100.
- Eichelbaum M, Ekbom K, Bertilsson L, Ringberger VA, and Rane A (1975) Plasma kinetics of carbamazepine and its epoxide metabolite in man after single and multiple doses. *Eur J Clin Pharmacol* **8**: 337-341.
- Ekong U, Zeng S, Dun H, Feirt N, Guo J, Ippagunta N, Guarrera JV, Lu Y, Weinberg A, Qu W, Ramasamy R, Schmidt AM, and Emond JC (2006) Blockade of the receptor for advanced glycation end products attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Gastroenterol Hepatol* **21**: 682-688.
- El-Ashmawy IM, Gad SB, and Salama OM (2009) Grape seed extract prevents azathioprine toxicity in rats. *Phytother Res* **24**: 1710-1715.
- El-Sankary W, Gibson GG, Avrton A, and Plant N (2006) Use of a reporter gene assay to predict and rank the potency and efficacy of CYP3A4 inducers. *Drug Metab Dispos* **29**: 1499-1504.
- Emoto C, Yamazaki H, Yamasaki S, Shimada N, Nakajima M, and Yokoi T (2000) Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidations in mouse intestinal microsomes. *Xenobiotica* **10**: 943-953.
- Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, and Trifilieff A (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* **170**: 2106-2112.
- 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.
- Hung SI, Chung WH, Jee SH, Chen WC, Chang YT, Lee WR, Hu SL, Wu MT, Chen GS, Wong TW, Hsiao PF, Chen WH, Shih HY, Fang WH, Wei CY, Lou YH, Huang YL, Lin JJ, and Chen YT (2006) Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. *Pharmacogenet Genomics* **16**: 297-306.
- Hutchinson MR, Loram LC, Zhang Y, Shridhar M, Rezvani N, Berkelhammer D, Phipps S, Foster PS, Landgraf K, Falke JJ, Rice KC, Maier SF, Yin H, and Watkins LR (2010) Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience* **168**: 551-563.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, and Lemasters JJ (2002) Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* **65**: 166-176.
- Jenkins RE, Kitteringham NR, Goldring CE, Dowdall SM, Hamlett J, Lane CS, Boerma JS, Vermeulen NP, and Park BK (2008) Glutathione-S-transferase pi as a model protein for the characterisation of chemically reactive metabolites. *Proteomics* **8**: 301-315.
- Kashimshetty R, Desai VG, Kale VM, Lee T, Moland CL, Branham WS, New LS, Chan EC, Younis H, and Boelsterli UA (2009) Underlying mitochondrial dysfunction triggers flutamide-induced oxidative liver injury in a mouse model of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **238**: 150-159.
- Kaufman DW and Shapiro S (2000) Epidemiological assessment of drug-induced disease. *Lancet* **356**: 1339-1343.
- Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**: 223-246.
- Kita H, Mackay IR, Van DWJ, and Gershwin ME (2001) The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* **120**: 1485-1501.
- 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.
- Kumada T, Tsuneyama K, Hatta H, Ishizawa S, and Takano Y (2004) Improved 1-h rapid immunostaining method using intermittent microwave irradiation: practicability based on 5 years application in Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital. *Mod Pathol* **17**: 1141-1149.
- Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvall J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, and Lindén A (1999) Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* **162**: 2347-2352.

- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, and Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**: 233-240.
- Lertratanangkoon K and Horning MG (1982) Metabolism of carbamazepine. *Drug Metab Dispos* **10**: 1-10.
- Lotze MT, Zef HJ, Rubarteli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tor M, and Billiar T (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**: 60-81.
- Lu W and Uetrecht JP (2008) Peroxidase-mediated bioactivation of hydroxylated metabolites of carbamazepine and phenytoin. *Drug Metab Dispos* **36**: 1624-1636.
- Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, Koyasu S, Matsumoto K, Takeda K, and Ichijo H (2005) ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**: 587-592.
- Mokuno Y, Takano M, Matsuguchi T, Nishimura H, Washizu J, Naiki Y, Nimura Y, and Yoshikai Y (1999) Prostaglandin E₁ protects against liver injury induced by *Escherichia coli* infection via a dominant Th2-like response of liver T cells in mice. *Hepatology* **30**: 1464-1472.
- Morita M, Akai S, Hosomi H, Tsuneyama K, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Drug-induced hepatotoxicity test using γ -glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol Lett* **189**: 159-165.
- Mu HH, Hasebe A, Van Schelt A, and Cole BC (2011) Novel interactions of a microbial superantigen with TLR2 and TLR4 differentially regulate IL-17 and Th17-associated cytokines. *Cell Microbiol* **13**: 374-387.
- Muruve DA, Barnes MJ, Stillman IE, and Libermann TA (1999) Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther* **10**: 965-976.
- Oo YH and Adams DH (2009) The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J Autoimmun* **34**: 45-54.
- Oscarson M, Zanger UM, Rifki OF, Klein K, Eichelbaum M, and Meyer UA (2006) Transcriptional profiling of genes induced in the livers of patients treated with carbamazepine. *Clin Pharmacol Ther* **80**: 440-456.
- Palmer CD and Restifo PN (2009) Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* **30**: 592-602.
- 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.
- Pearce RE, Lu Wei, Wang YQ, Uetrecht JP, Correia MA, and Leeder JS (2008) Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro III. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2,3-dihydroxycarbamazepine. *Drug Metab Dispos* **36**: 1637-1649.
- Pearce RE, Vakkalagadda GR, and Leeder JS (2002) Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro I. Characterization of human cytochromes P450 responsible for the formation of 2- and 3-hydroxylated metabolites. *Drug Metab Dispos* **30**: 1170-1179.
- Pellock JM (1987) Carbamazepine side effects in children and adults. *Epilepsia* **28**: 64-70.
- Pirmohamed M, Kitteringham NR, Breckenridge AM, and Park BK (1992a) Detection of an autoantibody directed against human liver microsomal protein in a patient with carbamazepine hypersensitivity. *Br J Clin Pharmacol* **33**: 183-186.
- Pirmohamed M, Kitteringham NR, Guenther TM, Breckenridge AM, and Park BK (1992b) An investigation of the formation of cytotoxic, protein-reactive and stable metabolites from carbamazepine in vitro. *Biochem Pharmacol* **43**: 1675-1682.
- Ryan KA, Smith MF Jr, Sanders MK, and Ernst PB (2004) Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF- κ B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* **72**: 2123-2130.
- Santos NA, Medina WS, Martins NM, Rodrigues MA, Curti C, and Santos AC (2008) Involvement of oxidative stress in the hepatotoxicity induced by aromatic antiepileptic drugs. *Toxicol In Vitro* **22**: 1820-1824.
- Steinman L (2007) A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis if T cell-mediated tissue damage. *Nat Rev Med* **13**: 139-145.
- Sugawara Y, Kubota K, Ogura T, Esumi H, Inoue K, Takayama T, and Makuuchi M (1998) Protective effect of prostaglandin E₁ against ischemia/reperfusion-induced liver injury: results of a prospective, randomized study in cirrhotic patients undergoing subsegmentectomy. *J Hepatol* **29**: 969-976.
- Szajnik M, Szczepanski MJ, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, Spaczynski M, and Whiteside TL (2009) TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene* **28**: 4353-4363.

Talpain E, Armstrong RA, Coleman RA, and Vardey CJ (1995) Characterization of the PGE receptor subtype mediating inhibition of superoxide production in human neutrophils. *Br J Pharmacol* **114**: 1459-1465.

Taylor SM, Bennett GD, Abbott LC, and Finnell RH (1985) Seizure control following administration of anticonvulsant drugs in the quaking mouse. *Eur J Pharmacol* **118**: 163-170.

Tecoma ES (1999) Oxcarbazepine. *Epilepsia* **40**: 38-46.

Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**: 502-522.

Van Rooyen GF, Badenhorst D, Swart KJ, Hundt HK, Scanes T, and Hundt AF (2002) Determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **769**: 1-7.

Wang Q, Franks HA, Porte J, El Refaie M, Shah S, Crooks J, Patel PM, and Jackson AM (2011) Novel approach for interleukin-23 up-regulation in human dendritic cells and the impact on T helper type 17 generation. *Immunology* **134**: 60-72.

Yao D and Brownlee M (2010) Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* **59**: 249-255.

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

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表 投稿準備中

2. 学会発表

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

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

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

H. 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

α -ナフチルイソチオシアネート(ANIT)誘導性肝障害モデル
マウスにおけるインターロキン-17の関与

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、医薬品が市場撤退を余儀なくされる最も多い理由の1つであり (Wilke et al, 2007)、近年では、nefazodone (2004年)、troglitazone (2000年) および bromfenac sodium (1998年) が肝障害性により市場から撤退しており、bosentan (2001年)、trovafloxacin (1999年)、tolcapone (1998年) および felbamate (1997年) には肝毒性に関する警告 (black box warning) が出されている (Walgren et al, 2005)。薬物誘導性肝障害の発症メカニズムは中毒性肝障害および特異体質性肝障害に分類され、特異体質性肝障害はさらに代謝性およびアレルギー性特異体質性肝障害に分類される。代謝性特異体質性肝障害の発症の予測は困難な場合が多いが、代謝関連酵素遺伝子の異常などについて詳細に調査することで予測可能になりつつある。一方、アレルギー性特異体質性肝障害は、一般的に投与量との相関を示さず、臨床での発症頻度も 1/1000~1/10000 と著しく低いため、臨床試験でも見つからない場合がほとんどである。正常動物を用いた非臨床試験での再現性はなく、また肝障害モデル動物が少ないためその発生機序の解明が困難となっている。

一方で、アレルギー性特異体質性肝障害は薬物またはその活性代謝物（反応性中間体を含む）が肝細胞の種々の構成成分と共有結合してハプテンとなり、免疫応答を介して誘発されることが知られている。また、このような免疫性特異体質による肝障害には各種サイトカインを介した肝組織内の免疫および炎症反応が関与しているといわれている。しかしながら、薬物誘導性肝障害モデルを用いて免疫応答および炎症反応に関して網羅的に評価をした報告はほとんどない。

T細胞は細胞表面に発現している Cluster of differentiation (CD) 抗原によりさらに細かく分類されており CD4⁺CD8⁻の T細胞はヘルパーT (Th) 細胞と呼ばれている。Th細胞はさまざまなヒト肝障害の発症に関わる重要な調節因子である。Th前駆細胞は、サイトカインの産生特性および特徴的な転写調節因子によって Th1、Th2、regulatory T cells および Th17細胞に分類化されることが知られている。今回、モデルマウスを用いた薬物誘導性肝障害と Th細胞に関連する転写調節因子、サイトカイ

ンおよびケモカインとの関係について検討を行った。

α -ナフチルイソチオシアネート (α -naphthylisothiocyanate, ANIT) 誘導性肝障害モデルを用いて検討を行った。ANIT 投与により Th17 細胞の分化に関わる主要な転写調節因子である ROR γ t の肝臓中 mRNA 発現上昇および Th17 細胞から産生されるインターロイキン (IL) -17 の血漿中濃度が上昇した。また、IL-17 により好中球の遊走・活性化を促す CXC ケモカインである macrophage inflammatory protein (MIP-2) の肝臓中 mRNA 発現が ANIT 投与で上昇した。これら一連の動きは、IL-17 抗体投与により肝障害の程度とともに抑制され、rIL-17 投与では上昇したことから、IL-17 が MIP-2 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誘導に寄与していること示された。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されるとともに、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。

A. 研究目的

薬物誘導性肝障害は、薬剤の市場撤退の主要因の 1 つである。チエニル酸 (tienilic acid)、アモジアキン (amodiaquine) およびハロタン (halothane) などのいくつかの薬剤は肝臓において高感受性の反応を惹起し肝障害を誘発する (Bugelski, 2005)。薬物投

与により引き起こされる肝障害は、一般的に親薬物あるいは代謝物が直接的に細胞障害性を示すことにより、あるいは免疫反応を介して誘導されることが知られている。しかしながら、多くの場合、薬物誘導性肝障害の発症メカニズムはまだまだ完全に解明されていない。

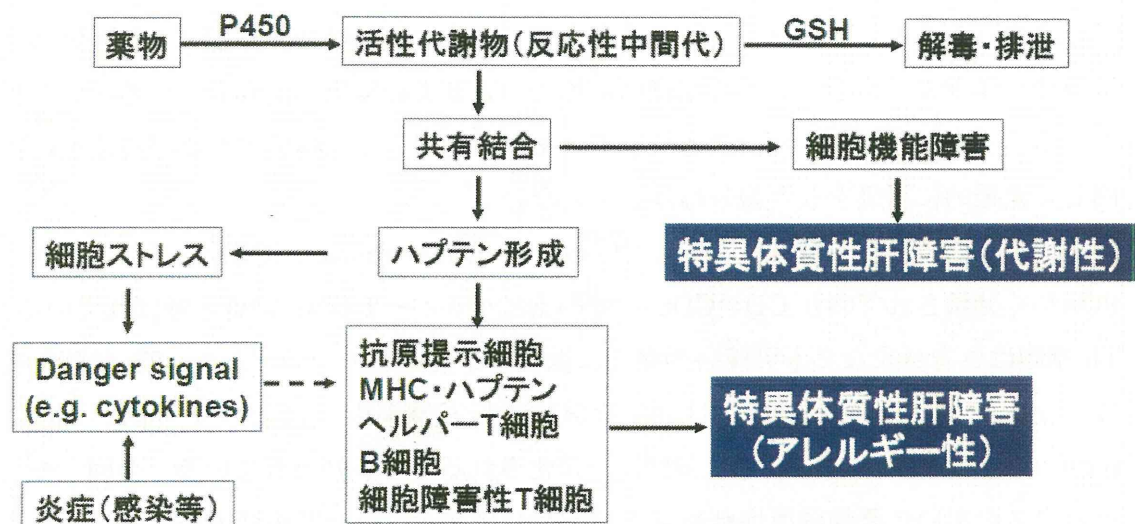


Fig. 1. Mechanisms of drug-induced liver injury

また、肝障害性を予測しうる実験動物モデルが欠如しているのが現状である。

ヘルパーT細胞 (Th細胞) は、獲得免疫機構の重要なレギュレーターである。Th細胞は、サイトカインの産生特性および特徴的な転写調節因子によって、Th1、Th2、regulatory T cells (Treg) およびTh17細胞に分化する。Th1細胞は細胞内の病原体に対して免疫反応を惹起し、mycobacterial 感染への抵抗性を示すための重要な役割を担っている。Th2細胞は細胞外の病原体から宿主を防御する作用を示す一方で、喘息や他のアレルギー性疾患の誘導や持続に関わることが知ら

れている。Treg細胞は免疫反応を調節するとともに自己寛容を維持するための重要な役割を果たしている (Zhu and Paul, 2008)。IL-17を産生するTh17細胞は、感染性微生物に対する抵抗性および自己免疫疾患の誘導に重要な役割を果たしており、IL-17はさまざまな炎症性サイトカインおよびCXCケモカインを強く誘導することで好中球の遊走および活性化を促進することが知られており (Zhu and Paul, 2008)、当研究室ではIL-17がhalothane誘導性肝障害に関与していることを報告している (Kobayashi et al., 2009)。

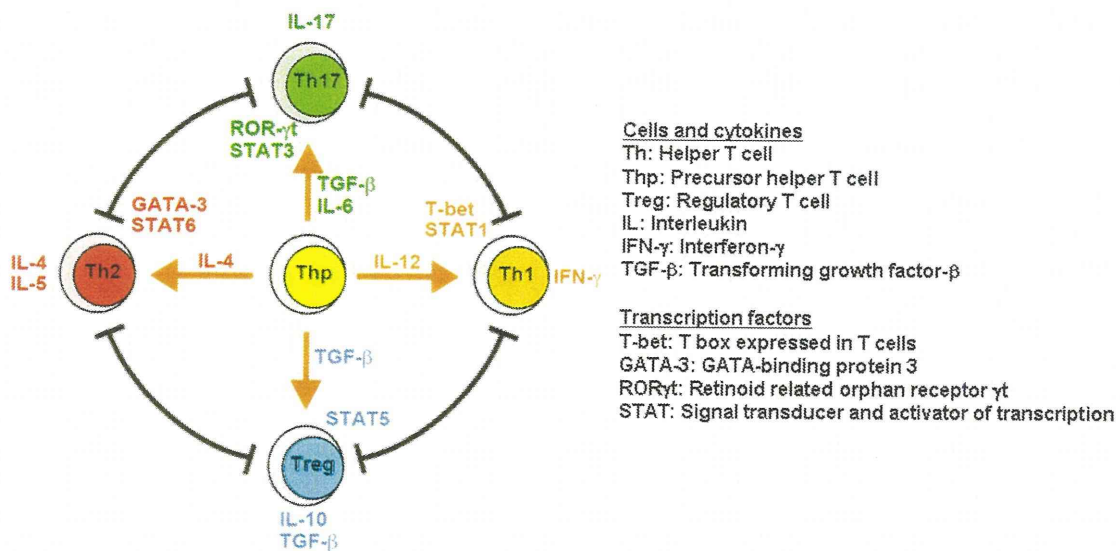


Fig. 2. Differentiation mechanism of Th cells subsets

ANIT は胆管および肝細胞を障害する肝毒性物質であり、げっ歯類に投与することでヒト胆汁うっ滞のモデルとして利用されることが知られている。ANIT は肝細胞中でグルタチオン抱合を受け (Carpenter-Deyo et al., 1991)、グルタチオン抱合を受けた ANIT は、胆管側に

発現する薬剤排出に関わるトランスポーターである multiple resistance-associated protein 2 により胆汁中に排泄され、そこでグルタチオンおよび ANIT に解離される (Dietrich et al., 2001)。肝細胞による胆汁中の ANIT の取り込みによって胆管細胞中では ANIT 濃度が上昇

する。胆汁中への分泌および取り込み作用の繰り返しによって直接的な肝細胞の障害に繋がっていると考えられている (Dietrich et al., 2001; Jean and Roth, 1995)。一方で、ANIT は主に肝小葉辺縁において好中球の浸潤が強く見られることが知られている (Dahm et al., 1991)。さらに Dahm (1991) らは、マウスに好中球の抗体を投与し、好中球を中和・減少させた状態にすることで ANIT 誘導性肝障害を軽減させており、この結果は肝障害における炎症反応の重要性を示している。

本研究では、マウスにおける ANIT 誘導性肝障害に免疫学的因子が関与しているかどうかについて検討を行った。第一に、ANIT 投与マウスの肝臓において Th1、Th2、Treg および Th17 細胞への分化に関わるそれぞれの転写調節因子 T box expressed in T cells (T-bet)、GATA-binding protein (GATA-3)、forkhead box P3 (FoxP3) および retinoid related orphan receptor γ (ROR γ t) 遺伝子ならびにそれぞれ Th 細胞に特徴的なサイトカイン遺伝子の mRNA 発現変動について解析を行った。次に、ANIT 誘導性肝障害への IL-17 の関与を検討するために、血漿中 IL-17 濃度を測定するとともに IL-17 抗体投与による IL-17 中和実験および recombinant マウス IL-17 (rIL-17) 併用投与実験を行った。

B. 研究方法

Balb/cCrSlc マウス (雌性、6 週齢) は日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、

馴化飼育した後に実験に使用した。ANIT 投与液は、オリーブ油を投与媒体として 10 mg/mL の濃度に用時調製した。一晩、絶食したマウスに ANIT 50 mg/kg を投与容量 5 mL/kg で単回経口投与し、ANIT 投与 1 時間後に給餌を再開した。投与 24 時間後、下行大静脈より採血を行い、同時に肝臓を採取した。ヘパリン処理したシリンジを用いて採取したマウス全血は 1,500 g、4°C で 15 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、血漿中アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (aspartate aminotransferase: AST)、アラニンアミノ基転移酵素 (alanine aminotransferase: ALT)、総ビリルビン濃度 (total bilirubin: T-Bil) および IL-17 濃度の測定に供した。採取した肝臓は、一部は病理組織学的検査に使用するために 10% 中性ホルマリン緩衝液で保存し、残りの組織を液体窒素で急速凍結し、mRNA の測定まで -80°C で凍結保存した。

AST、ALT および T-Bil 値は、富士ドライケムスライドに血漿 10 μ L を点着させ、Dri-Chem 4000 (富士フィルム, Tokyo, Japan) の操作手順に従って測定した。ELISA による血漿中 IL-17 の定量は、採取した血漿を用い、血漿中 IL-17 濃度を Ready-Set-Go! のマニュアルに従って測定した。mRNA の測定は、Mx3000P (Stratagene) を用いて real time RT-PCR を常法に従って行った。マウスモノクローナル IL-17 抗体を用いた IL-17 中和実験では、ANIT を単回経口投与し、その 9 時間後にマウスモノクロー

ナル IL-17 抗体 100 µg/body (100 µg の IL-17 抗体を PBS 0.5 mL に溶解し投与液を調製) を腹腔内投与した。コントロールとして、ラット IgG2a 100µg/body (100 µg の rat IgG2a を PBS 0.5 mL に溶解し投与液を調製) を ANIT 投与 9 時間後に腹腔内投与した。rIL-17 を用いた肝障害の増悪に関する検討では、ANIT 投与直後に rIL-17 1 µg/body (rIL-17 1 µg を 0.5% BSA 含有 PBS 200 µL で溶解し投与液を調製) を投与した。いずれの検討においても ANIT 投与 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。ヘパリン処理したシリンジを用いて採取したマウス全血は 1,500 g、4°C で 15 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、血漿中 AST、ALT、T-Bil および IL-17 濃度の測定に供した。採取した肝臓は、一部は病理組織学的検査用に使用するために 10% 中性ホルマリン緩衝液で保存し、残りの組織を液体窒素で急速凍結し、mRNA の測定まで -80°C で凍結保存した。

病理組織学的検査は、ANIT 投与による肝障害の程度および肝臓への好中球浸潤について検討するため、Hematoxylin-eosin (HE) 染色および抗 Myeloperoxidase (MPO) 抗体を用いた免疫染色による肝組織像の評価を実施した。MPO 陽性細胞数のカウントは、デジタルカメラ (D-33E, OLYMPUS, Tokyo)

を用いて 400 倍視野の顕微鏡写真を 1 サンプルあたり 5 か所、ランダムに撮影し、その画像中の MPO 陽性細胞数を 0.1mm² の領域を 5 か所ずつ観察し、MPO 陽性細胞をカウントした。統計学的評価には SAS 9.1.3 を用いた。2 群比較および多群比較はそれぞれ Wilcoxon test および non-parametrical Dunnet test により解析し、P<0.05 の時、統計学的に有意と判断した。

本研究における動物実験は全て金沢大学動物実験指針に従って実施した。

C. 研究結果

C-1. ANIT 投与マウスの血漿生化学的検査および病理組織学的検査

雌性 Balb/c マウスに ANIT 50 mg/kg を単回経口投与し、投与 24 時間後の血漿試料中の ALT、AST および T-Bil の測定結果を示した (Figs. 1A および 1B)。対照群と比較して、ANIT 投与 24 時間後の ALT、AST および T-Bil 値はいずれも有意な上昇が認められた。また、Fig. 1C に HE 染色および MPO 抗体を用いた免疫染色による肝組織像を示した。HE 染色では、ANIT 投与により小葉辺縁に肝細胞の変性・壊死および炎症性細胞の浸潤による小葉内胆管の脱落が認められた。MPO 染色による免疫組織化学的検査では浸潤細胞の多くが MPO 陽性であった。

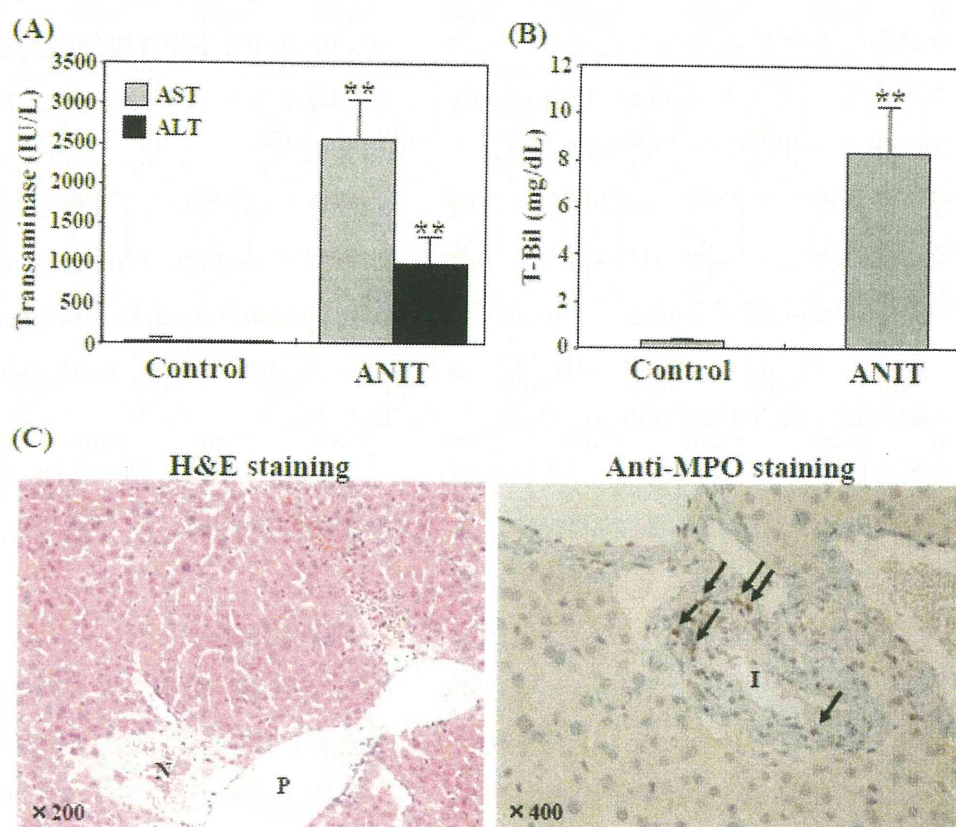


Fig. 1. Plasma AST, ALT and T-Bil levels and histopathological presentation of liver injury in ANIT-administered mice. Mice were administered ANIT (50 mg/kg, *p.o.*), and plasma for AST and ALT (A) and T-Bil (B) was collected 24 h after administration. Data are mean \pm SD of 6 mice. Significantly different from control group (** $P < 0.01$). Histopathological examination of the liver (C). Liver specimens were sampled 24 h after ANIT administration. The liver tissue sections were stained with HE or immunostained with anti-MPO antibody. Arrows indicated MPO-positive cells. N, necrotic area; P, portal vein; I, intralobular bile duct.

C-2 ANIT 投与マウス肝臓における Helper T cells (CD4⁺ Th cells) に関与する転写因子およびサイトカイン遺伝子の mRNA の発現変動解析

ANIT 誘導性肝障害への Th 細胞の関与について検討するために、ANIT 投与 24 時間後のマウス肝臓における Th 細胞の分化に関わる転写因子およびサイトカイン遺伝子の mRNA の発現変動を、real time RT-PCR を用いて測定した。各肝臓サンプルについて T-bet、IFN- γ 、GATA-3、

FoxP3、IL-10、ROR γ t および Gapdh の mRNA の量を測定し、Gapdh の mRNA 量を補正に用いて、コントロールサンプルの値を 1 とした時の ANIT 投与サンプルの値を算出した結果を示した (Fig. 2)。Th1 細胞の主要な転写調節因子である T-bet の肝臓での mRNA 発現は、ANIT 投与群でコントロール群と比較して 16% まで顕著に低下した (Fig. 2A)。また、Th1 細胞から産生されるサイトカインである IFN- γ の肝臓における mRNA の発現

は顕著に低下した (Fig. 2B)。Th2 細胞の主要な転写調節因子である GATA-3 および T reg 細胞の主要な転写調節因子である FoxP3 については、それぞれ上昇および低下の傾向を示した (Figs. 2C および 2D)。T reg 細胞で主に産生されるサイ

トカイン IL-10 についてはコントロール群と同様の値を示した (Fig. 2E)。Th17 細胞の主要な転写調節因子である ROR γ t は ANIT 投与群で約 2.5 倍の上昇を示した (Fig. 2F)。

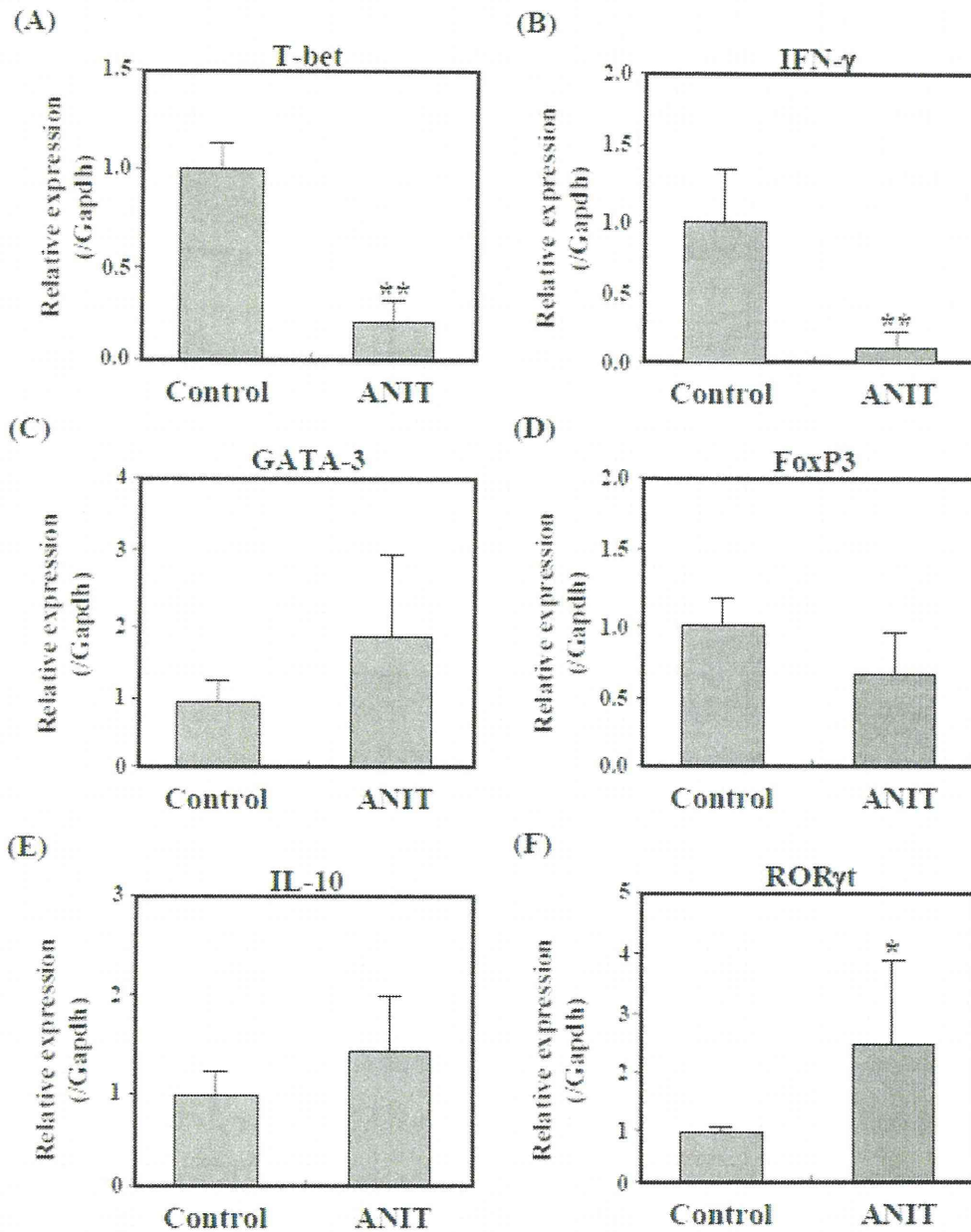


Fig. 2. Hepatic mRNA expression of transcriptional factors and cytokine genes 24 h after ANIT administration. Relative expressions of T-bet (A), IFN- γ (B), GATA-3 (C), FoxP3 (D), IL-10 (E) and ROR γ t (F) were measured by real time RT-PCR and normalized to Gapdh mRNA. Data are mean \pm SD of 6 mice. Significantly different from control group (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

C-3 ANIT 投与マウス肝臓における炎症性サイトカインおよびケモカイン遺伝子の mRNA の発現変動解析

ANIT 投与マウスで観察された肝障害性および好中球浸潤が炎症性サイトカインおよびケモカインの上昇によって誘導されたかどうかについて検討するために、炎症性サイトカインである TNF α および

CXC ケモカインである MIP-2 (Macrophage inflammatory protein-2) 遺伝子の肝臓における mRNA 発現変動を、real time RT-PCR を用いて測定した。ANIT 投与群において TNF α は発現変動を示さなかったが (Fig. 3A)、MIP-2 は著しく上昇した (Fig. 3B)。

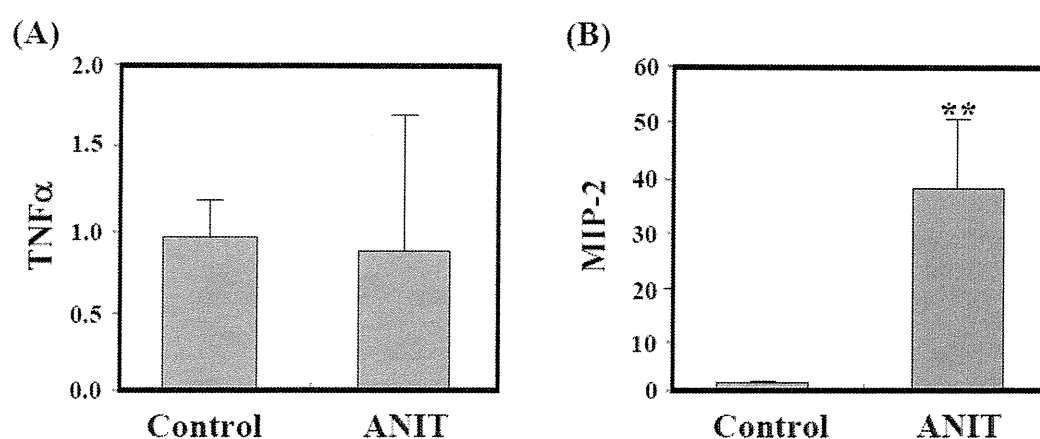


Fig. 3. Hepatic mRNA expression of proinflammatory cytokine and CXC chemokine. Relative expressions of TNF α (A) and MIP-2 (B) were measured by real time RT-PCR and normalized to Gapdh mRNA. Data are mean \pm SD of 6 mice. Significantly different from control group (** $P < 0.01$).

C-4 ANIT 投与マウスの血漿中 IL-17 濃度の変化

IL-17 は好中球の浸潤および活性化に重要な役割を果たしている。また、Th17 細胞の主要な転写調節因子である ROR γ t 遺伝子の肝臓における mRNA が ANIT 投与により上昇した。よって、血漿中 IL-17 タンパク濃度を ELISA 法にて測定した。血漿中 IL-17 濃度は ANIT 投与により 9.5 倍の上昇を示した (Fig. 4)。

C-5 モノクローナル IL-17 抗体投与による ANIT 誘導性肝障害への影響

ANIT 誘導性肝障害への IL-17 の関与を検討するために、IL-17 抗体投与による中和実験を実施した。IL-17 抗体の投与により、血漿中 AST、ALT および T-Bil 値は ANIT 単独投与群と比較して顕著に低下した (Figs. 5A および 5B)。

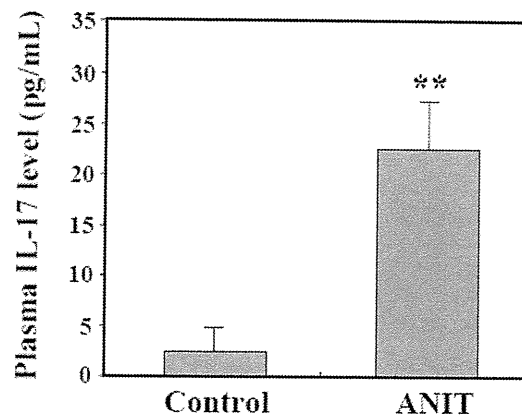


Fig. 4. Plasma IL-17 levels 24 h after ANIT administration. The plasma IL-17 level was measured 24 h after ANIT administration to mice using ELISA. Data are mean \pm SD of 6 mice. Significantly different from control group (** $P < 0.01$).

また、肝臓における $\text{TNF}\alpha$ の mRNA 発現は変化しなかったが、MIP-2 mRNA の発現は顕著に低下した (Figs. 5C および D)。血漿中 IL-17 濃度は、IL-17 抗体投与により顕著に減少した (Fig. 5E)。病理組織学的検査において、IL-17 抗体投与群では小葉辺縁での肝細胞の脱落および小葉内胆管の脱落は認められなかった (Fig. 6A)。また、MPO 抗体陽性細胞数は、IL-17 抗体投与群で顕著に減少した (Fig. 6B)。Rat IgG2a を用いたコントロール群では、このような変化は起こらなかった。

C-6 rIL-17 投与による ANIT 誘導性肝障害の増悪

ANIT 誘導性肝障害への IL-17 の関与を検討するため、rIL-17 投与実験を実施した。当研究室で以前実施された検討の結果から、IL-17 の単独投与が AST、ALT

および T-Bil などの生化学的パラメータに影響を及ぼさないことが示されている (Kobayashi et al., 2009)。ANIT 投与直後に rIL-17 を投与することで、血漿中 AST、ALT および T-Bil 値は顕著に上昇した (Figs. 7A および 7B)。肝臓における $\text{TNF}\alpha$ は rIL-17 投与による変動はみられなかったが、MIP-2 は上昇傾向を示した (Figs. 7C および 7D)。さらに血漿中 IL-17 濃度は、rIL-17 投与により上昇を示した (Fig. 7E)。病理組織学的検査において rIL-17 投与群では、小葉辺縁での肝細胞の脱落および小葉内胆管の脱落の程度がより増悪されていた。また、MPO 陽性細胞数は ANIT 単独投与群と比較して ANIT および rIL-17 投与群で顕著に増加した (Figs 8A および 8B)。これらの結果から、rIL-17 投与により、ANIT 誘導性肝障害が悪化することが示された。