

Fig. 5. Effect of anti-mouse IL-17 antibody on plasma AST, ALT and T-Bil, hepatic mRNA expression of TNF α and MIP-2 and plasma IL-17 levels in ANIT-administered mice. Mice were injected monoclonal anti-mouse IL-17 antibody (100 μ g/mouse, *i.p.*) or rat IgG2a 9 h after the ANIT administration. Twenty-four hours after ANIT administration, plasma for the AST, ALT and T-Bil analyses was collected (A and B). Relative expressions of hepatic TNF α (C) and MIP-2 (D) mRNA were measured by real time RT-PCR and normalized to Gapdh mRNA. The plasma IL-17 level was measured using ELISA (E). Data are mean \pm SD of 5 - 6 mice. Significantly different from the ANIT- administered group (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

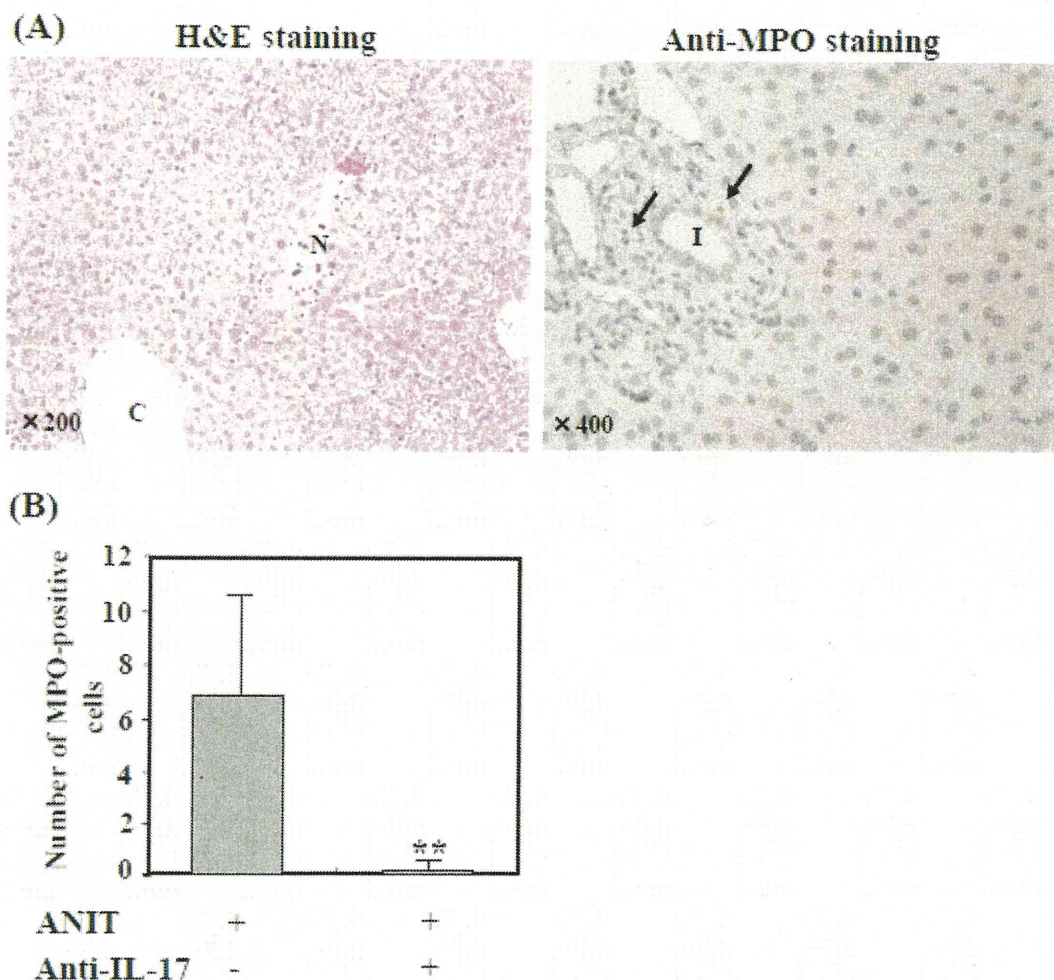


Fig. 6. Effect of anti-mouse IL-17 antibody on histopathological changes of liver injury in ANIT-administered mice and number of hepatic MPO-positive cells. Mice were injected monoclonal anti-mouse IL-17 antibody (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, *i.p.*) 9 h after the ANIT administration. Liver specimens were sampled 24 h after the ANIT administration. The liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody (A). Arrows indicated MPO-positive cells. C, central vein; N, necrotic area; I, intralobular bile duct. The number of MPO-positive mononuclear cells were counted from five pictures of each specimen. The total number of MPO-positive cells from five randomly selected visual fields were compared with mice administered ANIT alone (B). Significantly different from ANIT-administered group (** $P < 0.01$).

D. 考察

ANIT は、げっ歯類に投与することでヒト胆汁うっ滞および高ビリルビン血症モデル作出に多用されている肝障害性物質で、胆管上皮細胞に壊死性の障害を発現し、これに好中球が特に小葉辺縁部に浸潤することで肝細胞を障害する。ANIT

誘導性肝障害の原因として、胆汁中への分泌および肝細胞への再取り込みの繰り返しにより、胆管細胞付近で高濃度に曝露されるため直接的な細胞障害性が考えられているが、一方で、肝臓において過度の炎症性反応が誘導されていることも知られている (Dahm et al., 1991)。

Dahm ら (1991) は好中球の抗体を投与したモデル動物に ANIT を投与する検討結果から、好中球を介した炎症性反応が ANIT 誘導性肝障害の発現に重要な役割

の1つを果たしていることを示している。今回、ANIT 誘導性肝障害に免疫学的な因子が関与しているかどうかについて検討した。

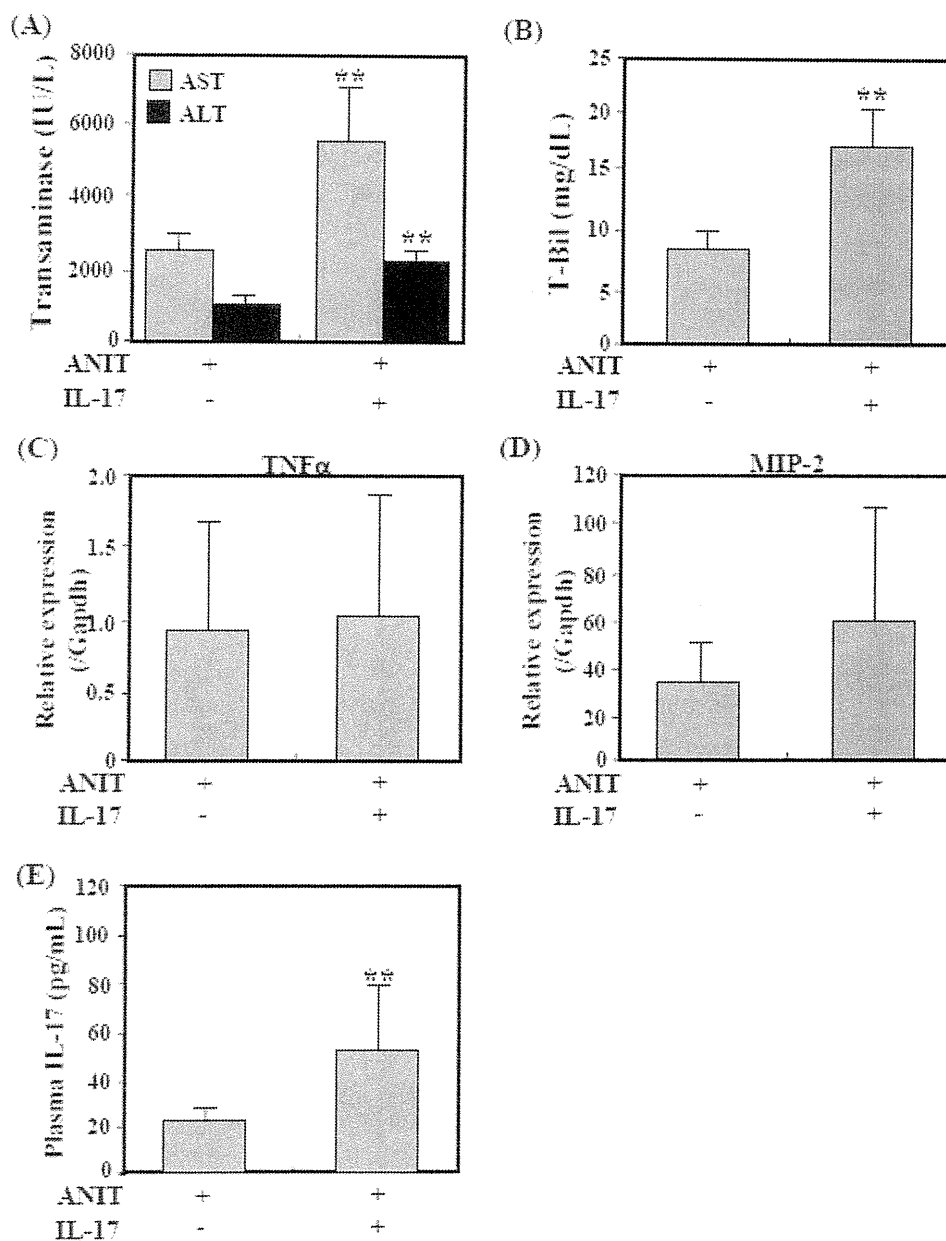


Fig. 7. Effect of recombinant mouse IL-17 on plasma AST, ALT and T-Bil, hepatic mRNA expression of TNF α and MIP-2 and plasma IL-17 levels in ANIT-administered mice. Immediately after the ANIT administration, recombinant mouse IL-17 (1 μ g per mouse, *i.p.*) was injected. Twenty-four hours after ANIT administration, plasma for the AST, ALT and T-Bil analyses was collected (A and B). Relative expressions of hepatic TNF α (C) and MIP-2 (D) mRNA were measured by real time RT-PCR and normalized to Gapdh mRNA. The plasma IL-17 level was measured using ELISA (E). Data are mean \pm SD of 6 mice. Significantly different from ANIT-administered group (** $P < 0.01$).

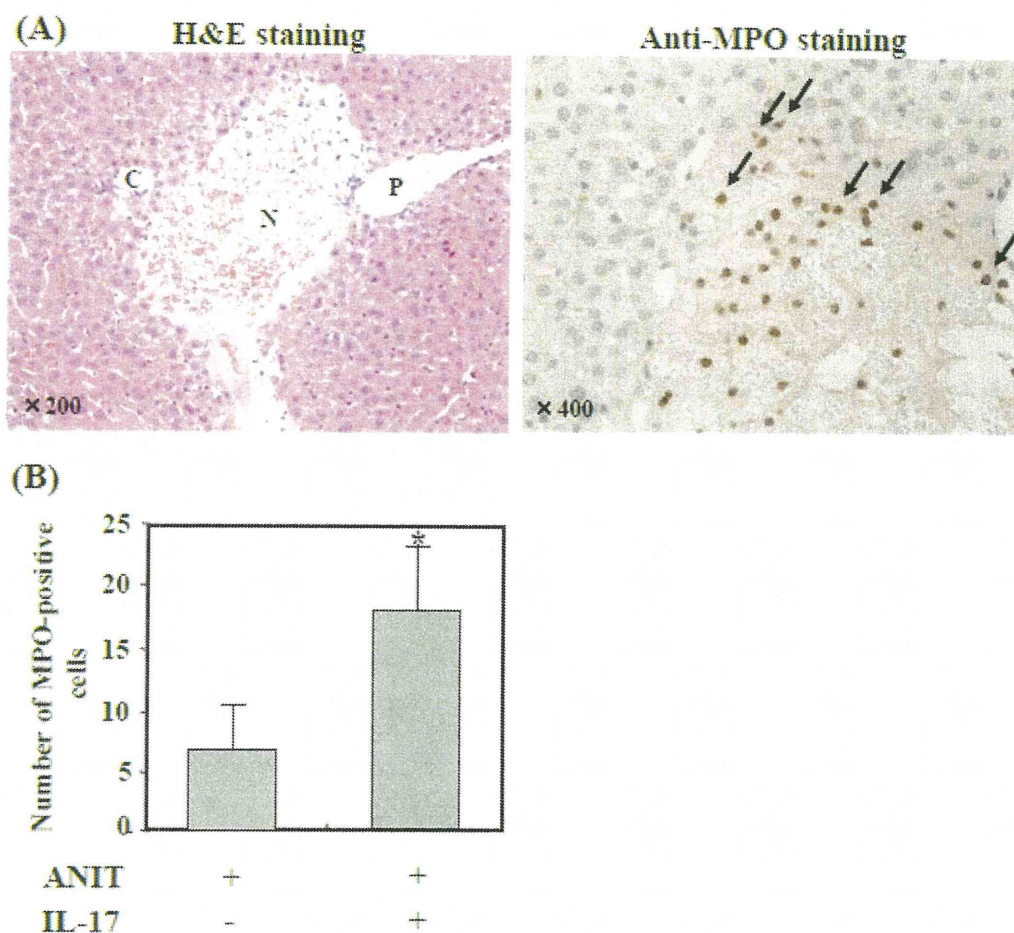


Fig. 8. Effect of recombinant mouse IL-17 on histopathological changes of liver injury in ANIT-administered mice and number of hepatic MPO-positive cells. Immediately after the ANIT administration, recombinant mouse IL-17 (1 μ g per mouse, *i.p.*) was injected. Liver specimens were sampled 24 h after the ANIT administration. The liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO antibody (A). Arrows indicated MPO-positive cells. C, central vein; N, necrotic area; P, portal vein. The number of MPO-positive mononuclear cells were counted from five pictures of each specimen. The total number of MPO-positive cells from five randomly selected visual fields were compared with mice administered ANIT alone (B). Significantly different from ANIT-administered group (* $P < 0.05$).

Kodali ら (2006) は、マウスに ANIT 50mg/kg を経口投与 6、12、18、24 および 48 時間後の ALT および T-Bil 値の測定および病理組織学的検査を実施しているが、投与 18 時間後以降で明確な肝障害を検出した。これらの情報を基に、今回の予備的な検討で、ANIT 50 mg/kg をマウスに投与し、その 24 時間後の血漿中 ALT および T-Bil 値を測定したところ血

漿中 ALT および T-Bil 値の明確な上昇が認められたため、投与量を 50 mg/kg に、血液および肝臓の採材時間を投与 24 時間後に設定することとした。

MPO 抗体を用いた免疫組織化学的検査の結果から、ANIT 投与マウスにおいて多くの MPO 陽性細胞が肝臓に浸潤していることが示され (Fig. 1C)、ANIT 投与マウスの肝臓で好中球の浸潤が誘導さ

れていることが推察された。そこで、肝臓中の Th 細胞の分化に関わる転写調節因子およびサイトカイン遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、Th17 細胞の主要な転写調節因子である ROR γ t および CXC ケモカインの 1 つである MIP-2 遺伝子の mRNA が ANIT 投与群において顕著に上昇した (Figs. 2F および 3B)。これらは、Th17 細胞および MIP-2 が ANIT 誘導性肝障害に関与している可能性を示す結果であった。Th17 細胞によって産生されるサイトカイン IL-17 について、肝臓組織中の IL-17 遺伝子の mRNA 発現変動解析を real time PCR 法により試みたが、定量的に検出することが困難であった。

Th17 細胞は自己免疫疾患の病態と関連していることが知られているとともに、病原体を排除するため、特に好中球を遊走させることで炎症を引き起こすと考えられている (Roark et al., 2008)。また、Th17 細胞が産生する IL-17 の血漿中濃度は、ANIT 投与後に顕著に上昇した (Fig. 4)。IL-17 は MIP-2 などの CXC ケモカインの産生を刺激するとともに好中球の活性化に重要な役割を果たすことが知られている (Zhu and Paul, 2008)。これら一連の知見は、ANIT 誘導性肝障害への IL-17 の関与の可能性を示すものであり、さらなる検討を行った。

ANIT 投与により血漿中 IL-17 濃度が上昇したことを受け (Fig. 4)、IL-17 抗体を用いた IL-17 中和実験を行った。ハロタン誘導性肝障害モデルマウスを用いた以前の検討結果から、IL-17 抗体 100

$\mu\text{g/body}$ をハロタン投与 9 時間後に投与することで肝障害が抑えられることを見出している (Kobayashi et al., 2009)。本検討においても ANIT 投与 9 時間後に IL-17 抗体 (100 $\mu\text{g/body}$) 投与することで血漿中 AST、ALT および T-Bil 値の上昇が抑えられた (Figs. 5A および 5B)。さらに、中和実験の結果から肝臓中 MIP-2 mRNA の発現上昇は IL-17 濃度と関連することが示された (Figs. 5D および 5E)。次に、ANIT 誘導性肝障害への IL-17 の関与について検証するため、rIL-17 投与実験を行った。以前の検討結果から、rIL-17 の投与量 (1 $\mu\text{g/body}$) および投与タイミングを決定した

(Kobayashi et al., 2009)。ANIT および rIL-17 の併用投与により血漿中 AST、ALT および T-Bil 値は顕著に上昇し (Figs. 7A および 7B)、ANIT 誘導性肝障害の悪化が見られた。しかしながら、肝臓中 MIP-2 mRNA は rIL-17 投与による上昇傾向を示したものの有意な変動は認められなかった (Fig. 7D)。この rIL-17 投与実験において、肝臓中 IL-10 mRNA の発現が ANIT および rIL-17 併用投与群で ANIT 単独投与群と比較して顕著に上昇した (data not shown)。IL-10 は抗炎症性サイトカインの 1 つであり、炎症性サイトカインの働きを阻害 (Glimcher and Murphy, 2000) するとともに炎症性サイトカインの mRNA の分解を促進することが知られている (Opal and DePalo, 2000)。そのため、ANIT および rIL-17 併用投与群では IL-10 が MIP-2 の産生を阻害している可能性が考えられた。これ

らの結果から、IL-17 が ANIT 誘導性肝障害の発症に関与していることが示唆された。

好中球は肝障害誘発に関わることが、虚血-再還流障害モデル (Jaeshke et al., 1990)、アルコール性肝炎モデル (Bautista, 2002; Jaeshke, 2002)、胆管結紮による胆汁うっ滞モデル (Gujral et al., 2003) およびアセトアミノフェン肝障害モデル (Liu et al., 2006) などの肝障害モデルにおいて示されている。Youら (2006) は、ハロタン誘導性肝障害において好中球が重要な役割を担っていることを示した。また、IL-17 が好中球の遊走および活性化のような多くの炎症および免疫反応を誘導していることが示されている (Zhu and Paul, 2008; Kolls and Linden, 2004)。今回の検討では、血漿中 IL-17 濃度の変動と肝障害の軽減および悪化との関係が示されたことから、マウスにおける ANIT 誘導性肝障害に IL-17 が重要な役割を果たしていることが示さ

れた。また、血清中の IL-17 が臨床における急性肝障害の程度を推定する有用なバイオマーカーとなりうること (Yasumi et al., 2007) が報告されており、今回の検討結果は、肝障害に対する IL-17 の重要性をさらに支持するものであった。

F. 結論

ANIT 誘導性肝障害モデルを用いた検討結果から、Fig. 9 に示すように、Th17 細胞で産生された IL-17 が MIP-2 産生活性化を介して、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。

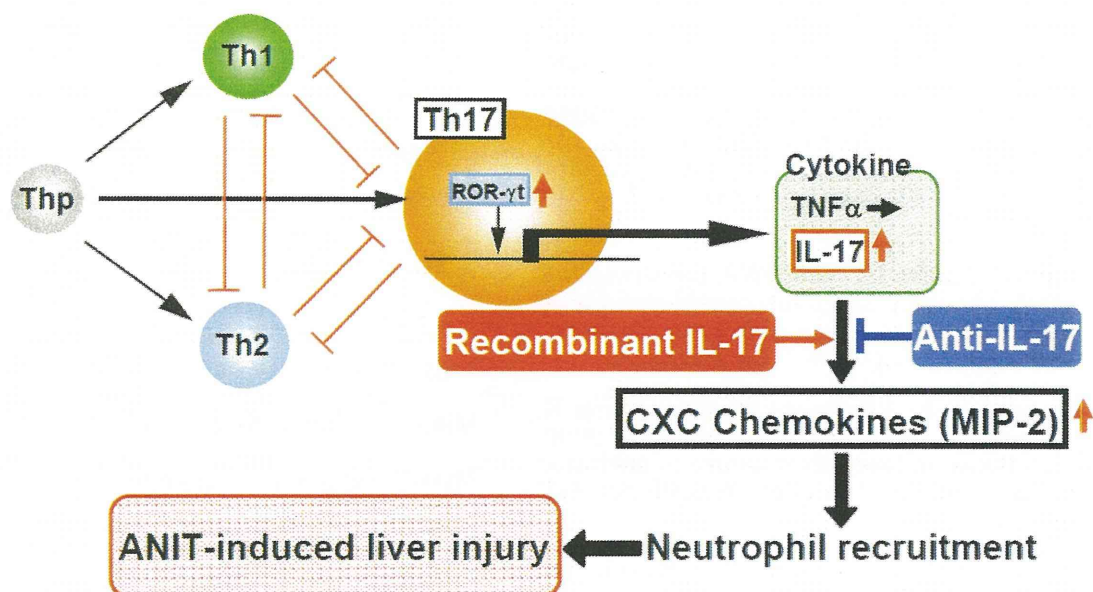


Fig. 9. Proposed mechanisms of ANIT-induced liver injury in mice

<参考論文>

- Bautista A. 2002. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 27: 17-21.
- Bugelski PJ. 2005. Genetic aspects of immune-mediated adverse drug effects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 59-69.
- Carpenter-Deyo J, Marchand DH, Jean PA, Roth RA, Reed DJ. 1991. Involvement of glutathione in 1-naphthylisothiocyanate (ANIT) metabolism and toxicity to isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 42: 2171-2180.
- Dahm LJ, Schultze AE, Roth RA. 1991. An antibody to neutrophils attenuate α -naphthylisothiocyanate-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 412-420.
- Dietrich CG, Ottenhoff R, de Waart DR, Oude Elferink RP. 2001. Role of MRP2 and GSH in intrahepatic cycling of toxins. *Toxicology* 167: 73-81.
- Glimcher LH, Murphy KM. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* 14: 1693-1711.
- Heneghan MA, McFarlane IG. 2002. Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis. *Hepatology* 35: 7-13.
- Jaeschke H. 2002. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 27: 23-27.
- Jaeschke H. 2003. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284: G15-G26.
- Jean PA, Roth RA. 1995. Naphthylisothiocyanate disposition in bile and its relationship to liver glutathione and toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 50: 1469-1474.
- Kita H, Macky IR, Van DWJ, 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, Yokoi T. 2009. Halothane-induced liver injury is mediated by interleukin-17 in mice. *Toxicol. Sci.* 111: 302-310.
- Kodali P, Wu P, Lahiji PA, Brown EJ, Maher JJ. 2006. ANIT toxicity toward mouse hepatocytes in vivo is mediated primarily by neutrophils via CD18. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G355-G363.
- Kolls JK, Linden A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467-478.
- Liu ZX, Han D, Gunawan B, Kaplowitz N. 2006. Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* 43: 1220-1230.
- Opal SM, DePalo VA. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117: 1162-1172.
- Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. 2008. γ delta T cells: an important source of IL-17. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 353-7
- Sobue S, Nomura T, Ishikawa T, Ito S, Saso K, Ohara H, Joh T, Itoh M, Kakumu S. 2001. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol.* 36: 544-551.
- Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. 2005. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Clinical Reviews in Toxicology* 35: 325-361.
- Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, Suzuki K. 2007. Interleukin-17 as a new marker of severity of acute hepatic injury. *Hepatology Res.* 37: 248-254.
- You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, Ju C. 2006. Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology* 44: 1421-1431.
- Zhu J, Paul WE. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112: 1557-1569.

G. 健康危険情報

該当なし。

H. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録
該当なし。

アシルグルクロン酸抱合体薬物の免疫毒性の検討

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

NSAID に代表される、カルボニル基を持つ薬物は第二相抱合反応によってグルクロン酸抱合を受け、アシルグルクロン酸抱合体（AG）を形成する可能性が高い。Acyl 基は比較的反応性が高いため、細胞内のタンパク質分子等と共有結合することで特異体質的な毒性を惹起すると考えられている。近年、特異体質的な反応が薬物とタンパクの結合体形成に関与していることが示唆されてはいるが、薬物とタンパクの結合体が形成されることと薬物の毒性とを結び付ける、メカニズムに基づいた直接的な証拠はない。また、本研究室において、これまでにヒト胎児腎臓細胞である HEK293 細胞を用いた検討において、AG が細胞毒性および遺伝毒性を持たないことが示唆された。近年、免疫学的な薬物性肝障害が注目され、その発症原因の一つとして薬物の代謝的活性化による反応性代謝物生成の関与が疑われている。本研究では、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞とヒト末梢血単核球である PBMC を用いて、代謝物による免疫関連因子の活性化を考慮した肝障害発症機構について検討した。ジクロフェナク（DCF）は COX (cyclooxygenase) を阻害することでプロスタグランジンの産生を抑制し、解熱・鎮痛作用を示す NSAID の 1 つである。ヒトにおいて DCF 起因する過敏性刺激が起こることが知られている。PBMC へ 5-OH DCF を処置したところ、IL-8、IL-6、GM-CSF および MCP-1 mRNA 発現量はコントロール処置群と比較して有意に上昇した。DCF 処置群に対しても IL-8、IL-6 および MCP-1 mRNA において有意に上昇した。DCF-AG 処置群は全ての因子、4'-OH DCF 処置群では IL-6 以外の因子において DCF 処置群に対しても有意な上昇を示した。DCF-AG は THP-1 細胞よりも PBMC の方が、5-OH DCF 処置によって免疫活性化が惹起された。一方で THP-1 細胞および PBMC とともに、4'-OH DCF および DCF-AG 処置によって免疫が活性化されたため、これらの免疫活性化機序はどちらの細胞においても同じであると考えられた。以上の結果より、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。

A. 研究目的

薬物性肝障害は臨床における重要な問題であり、米国では急性肝障害の50%以上が薬物に起因していると報告されている。また、600以上の医薬品に肝障害発症の可能性があるとされている (Lee, 2003; Park et al., 2005)。医薬品の承認販売後に肝障害が報告され、販売中止となる事例も少なくない。こういった薬物の多くは不安定な反応性代謝物が存在することが報告されている (Guengerich and MacDonald, 2007)。

薬物の多くは体内に吸収されると薬物代謝酵素により代謝される。一般に、薬物は薬物代謝酵素により酸化、還元および加水分解を受け水酸基や第一級、第二級アミン基を生成し、さらに抱合反応により極性が上がることで、排泄を促す。しかし、一部の薬物では代謝により化学的に不安定な反応性代謝物が生じる代謝的活性化を引き起こす。反応性代謝物は一般に求電子性であり、反応性代謝物の電子密度が低い部分が、生体内に豊富に存在する求核基 (CYP 中のヘム窒素、各種タンパク質中のリジン・システイン・ヒスチジン・セリン残基など、DNA 中のグアニン残基など) からの電子対供与を受けて共有結合を形成する。反応性代謝物による直接的な細胞毒性に加えて、共有結合を形成し修飾されたタンパク質は免疫原性を獲得し、免疫反応を惹起することが示唆されている (Utrecht, 1999; Knowles et al., 2000; Park et al., 2000)。

臨床で報告されている薬物誘導性肝障害の多くは、炎症などの免疫が関係して

いることが報告されている (Deng et al., 2006; Shaw et al., 2007)。免疫学的な肝障害発症機序のひとつに、免疫反応に伴う炎症ストレスの重要性が示唆されており、薬物などのストレスにより生体内の免疫機構が活性化されると、過剰な免疫反応に伴う炎症性ストレスが発現し、肝障害の発症原因となると考えられている (Roth et al., 2003; Ganey et al., 2004; Tafazoli et al., 2005)。肝臓における自然免疫には、肝臓へ浸潤している単球やマクロファージ、肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞などが関与する。これらの免疫細胞は活性化されると、表面抗原分子 (CD40, CD44, CD54, CD80, CD83, CD86)、炎症性サイトカイン (IL-1 β および TNF α) およびケモカイン (IL-8 および MCP-1) 産生量が増加し (Aiba et al., 1997)、T 細胞の効率的な増殖に必要な不可欠である共刺激シグナルを伝えることが知られている (Enk et al., 1993; Rougier et al., 1998; Scholer et al., 2008)。また、炎症性サイトカインやケモカインはリンパ球や好中球を刺激し、肝臓への浸潤を引き起こす炎症反応の引き金となることが知られている。

ヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 細胞は、単球やマクロファージなどの免疫細胞における分化や活性化のメカニズム解明に用いられる細胞株である。これまでに市場から撤退した薬物である抗凝固薬キシメラガトランまたは糖尿病治療薬トログリタゾンの暴露により、THP-1 細胞の炎症性サイトカインおよびケモカインの産生が増加することが報告されて

おり、炎症反応の活性化が肝障害性薬物の副作用に関与することが示唆された (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009)。

体内の代謝経路において、第二相抱合反応としてグルクロン酸抱合がある。この反応により極性が上がることで排泄を促す解毒反応であるが、カルボニル基を持つ薬物はグルクロン酸抱合を受けた時に不安定な代謝物である acyl glucuronide (AG) を形成する。Acyl 基は分子内の転移よりも、アシル転移によってタンパクおよび高分子の求核性基と反応し、結合する方が早いと言われており (Williams et al., 1992; Zia-Amirhosseini et al., 1995)、AG はその求電子的な反応性の高さから、細胞毒性および薬物過敏性反応に関する多くの副作用に関係していると考えられてきた (Ritter, 2000)。実際に、リン酸カリウム緩衝液、ヒト血清アルブミンおよびヒト新鮮血漿中における AG の安定性と特異体質性薬物毒性の発症頻度との相関が認められ、AG の安定性が副作用のリスクを予測する因子としてなり得ることが報告されている (Sawamura et al., 2010)。NSAIDs の多くのは細胞内外においてタンパクと共有結合し、免疫学的な副作用を惹起する因子の 1 つとして作用すると考えられている。また、細胞内タンパクの機能変化を惹起することで、細胞毒性を示すことが示唆されている (Boelsterli et al., 1995)。しかし、HEK (Human embryonic kidney) 293 細胞を用いた実験により、NSAIDs の AG は細胞毒性および遺伝毒性を示さないことが示唆された (Koga et al., 2010)。また、AG のタンパク

への共有結合能の高さと、AG の毒性発現メカニズムを繋ぐ直接的な証拠はない。

本研究では、AG による免疫反応への影響を評価することを目的とした。初めに、AG を形成する薬物において THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標とし、その免疫活性化能を評価することとした。

B. 研究方法

ヒト急性単球性白血病由来THP-1細胞は、理研ジーンバンク (Tsukuba, Japan) より購入した。ヒト末梢血単核球 (PBMC)、CTL-Anti Aggregate™およびCTL-Test™ mediumはCTL (Ohio, USA) より購入した。ヒト非実質細胞入りへパトサイト (UMIX) はADMET Technologies (North Carolina, USA) より購入した。ヒト急性単球性白血病THP-1細胞は10%FBSを含むRPMI1640を培養液として10 cmプレートで培養した。ヒト末梢血単核球PBMCは液体窒素中で凍結保存してあるものを融解した後、CTL-Anti Aggregate™を加えたFBS-FreeのRPMI1640をWash液として50 mLファルコンに回収し、3000 rpm、常温で10分間遠心分離した。得られた沈殿をCTL-Test™ mediumに懸濁し、24-wellもしくは48-well plateに 3×10^6 cells/mLにて播種した。ヒト非実質細胞入りへパトサイトTLC (Total liver cell) は液体窒素中で凍結保存してあるものを融解した後、HCM™ Single Quotsを加えた肝細胞基本培地HBM™を培養液として15 mLファルコンに回収し、1000 rpm、4°Cで10分間遠心分離した。得られた沈殿をHBM™に懸

濁し、30分以上コラーゲンコートした 12-well plate に 7.5×10^5 cells/well にて播種した。細胞培養上清中の IL-8 および CCL2 タンパク質濃度は Human IL-8 ELISA Ready-Set-Go!TM および Human CCL2 ELISA Ready-Set-Go!TM のマニュアルに従って測定した。Total RNA の調製および Real-time RT-PCR による GAPDH、IL-8、IL-6、TNF α 、CD54、MCP-1 および GM-CSF mRNA の定量は、常法に従って行った。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 Dunnett 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 AG 処置による THP-1 細胞における免疫関連因子の活性化検討

AG およびその親薬物が THP-1 細胞に及ぼす影響をサイトカインおよびケモカインの mRNA 発現量を指標としてスクリーニングを行った。Naproxen (NPX)、Ibuprofen (IBP)、Probenecid (PBC)、Diclofenac (DCF)、Tolmetin (TOL)、Mycophenolic acid (MPA) およびこれらの acyl glucuronide を 24 時間曝露し、その mRNA 発現変動により免疫活性化を評価した。検討した薬物名および処置濃度を Table 1 に示した。薬物処置濃度は *in vitro* の実験系において最もよく用いられる最高濃度である 100 μ M とした。しかし、当

研究室に保管してある薬物では NPX-AG (Naproxen acyl glucuronide) および IBP-AG は 50 μ M が最大濃度となったため、THP-1 における実験では NPX、NPX-AG、IBP および IBP-AG が 50 μ M となっている。上記の処置濃度で mRNA 発現量の検討を行った結果、THP-1 細胞での実験において DCF-AG 処置はコントロール処置に比べて IL-8、TNF α 、CD54 および MCP-1 において上昇傾向が認められ、その上昇幅は DCF 処置よりも高いものであった。MPA および MPA-AG 処置においてはコントロール処置に比べて mRNA 発現量の増加が認められたが、MPA と MPA-AG の間に有意な差は認められなかった。MPA に関しては、親薬物処置と比較して MPA-AG 処置において mRNA 発現量有意な増加が認められなかったことから (Fig. 1)、検討を保留とした。

C-2 AG の PBMC における免疫関連因子の活性化検討

PBMC (sample ID#48: Doner ID# 20080416) を用いてサイトカインおよびケモカインの mRNA 発現量を指標としてスクリーニングを行った。NPX、IBP、PBC、DCF、TOL およびこれらの AG を 24 時間曝露し、その mRNA 発現変動により免疫活性化を評価した。検討した薬物名および処置濃度を Table 1 に示した。上記の処置濃度で mRNA 発現量の検討を行った結果、DCF-AG 処置時に IL-8、IL-6、GM-CSF および MCP-1 において上昇傾向が認められ、DCF 処置時よりも高い発現変動を示

した。以上の結果から、これらの薬物の中でも特に、DCF が親薬物に対して代謝物である acyl glucuronide において THP-1 細胞および PBMC の活性化が認められた。従って、今後の検討は DCF に着目し、より詳細な検討を行うこととした。

C-3 THP-1 細胞における DCF および DCF-AG 処置時の mRNA の経時的変化

DCF および DCF-AG の処置時間依存的な THP-1 細胞における免疫関連因子の活性化を検討するため、薬物処置後 0、3、6、12 および 24 時間後における THP-1 細

胞の mRNA 発現量の変動を測定した。DCF-AG 処置後、IL-8 および TNF α mRNA 発現量は時間依存的に上昇傾向を示し、処置 12 時間後および 24 時間後においては、溶媒処置群および DCF 処置群と比較して有意な上昇が認められた (Figs. 3A, B)。CD54 mRNA 発現量は DCF 曝露細胞においては軽微な増加が認められたが、DCF-AG 曝露細胞においては DCF 処置群と比較して時間依存的に mRNA 発現量の有意な上昇が認められた。

以上の結果から、THP-1 細胞において DCF-AG 処置時間は 24 時間が最も適切であることが示された。

Table 1. Concentration of drugs and their acyl glucuronide on THP-1 cells and PBMC.

Dru			Concentration	
			THP-1 cell	PBM
Vehicle	(1%		-	-
			50	50
Naproxen	acyl		50	50
			50	100
Ibuprofen	acyl		50	100
Probeneci			100	100
Probenecid	acyl		100	100
Diclofena			100	100
Diclofenac	acyl		100	100
Tolmeti			100	100
Tolmetin	acyl		100	100
Mycophenolic			100	100
Mycophenolic	acid	acyl	100	100
0.1% DMSO			-	-
Mebendazol			10	
Concanavalin				0.5

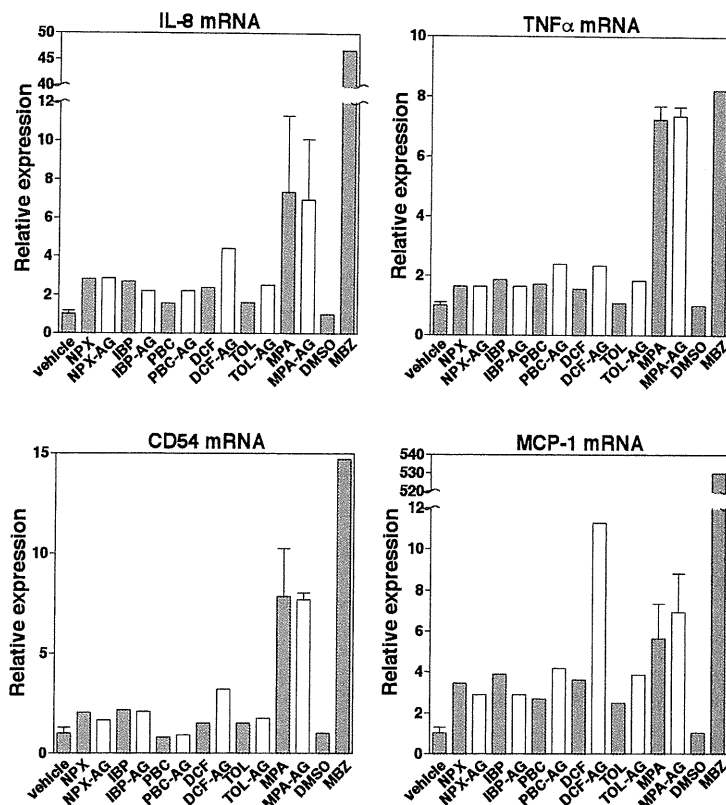


Fig. 1. Effect of drugs and their acyl glucuronide on expression level of IL-8, TNF α , CD54 and MCP-1 mRNA in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with the 1% methanol (vehicle), naproxen (NPX), ibuprofen (IBP), probenecid (PBC), diclofenac (DCF), tolmetin (TOL), mycophenolic acid (MPA), 0.1% DMSO, mebendazole (MBZ), and their acyl glucuronide for 24 hrs. After the incubation, the expression level of IL-8 (A), TNF α (B), CD54 (C) and MCP-1 (D) mRNA was measured by real time RT-PCR analysis. Data are shown from the single determination except MPA and MPA-AG (n = 3), and vehicle (n=5).

C-4 PBMCにおけるDCF-AG処置時のIL-8およびMCP-1タンパク量の経時的変化

PBMC (sample ID# 48: Doner ID# 20080416) においては DCF-AG 処置後 0、3、6、12、24、36 および 48 時間後における細胞の上清中の IL-8 および MCP-1 タンパク量を ELISA を用いて 2-5 の方法に従

って測定した。

DCF-AG 処置によって、IL-8 タンパクは時間依存的な上昇を示した (Fig. 4A)。一方、MCP-1 タンパクは処置後 24 時間においてピークを示した (Fig. 4B)。以上の結果から、PBMC においても 24 時間付近に処置時間の最適時間があると考えられたため、今後の検討は 24 時間処置によって行うこととした。

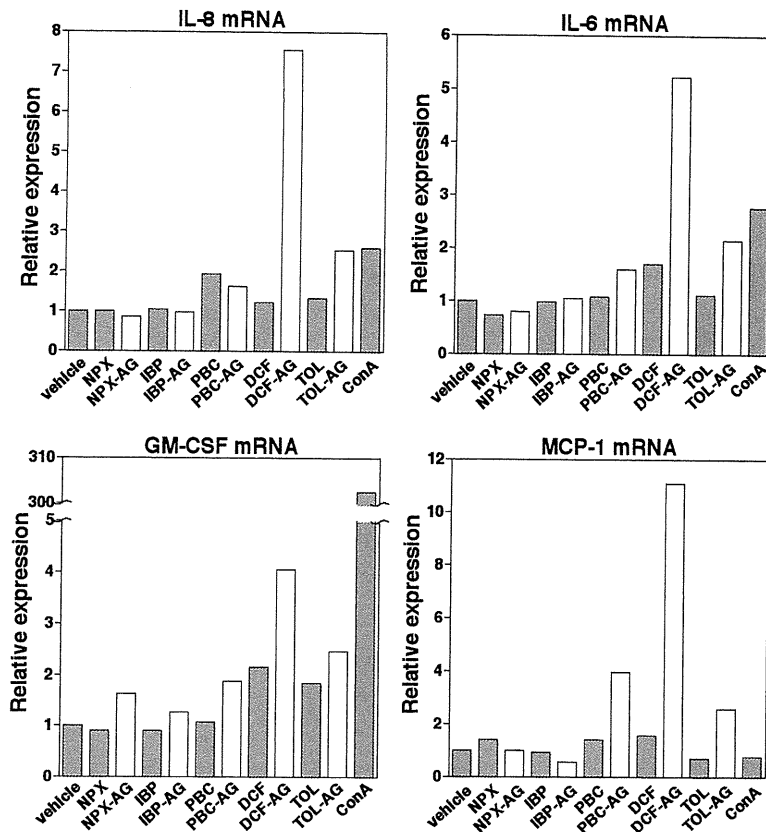


Fig. 2. Effect of drugs and their acyl glucuronide on expression level of IL-8, IL-6, GM-CSF and MCP-1 mRNA in PBMC. PBMC were treated with the 1% methanol (vehicle), naproxen (NPX), ibuprofen (IBP), probenecid (PBC), diclofenac (DCF), tolmetin (TOL), concanavalin A (ConA), and their acyl glucuronide for 24 hrs. After the incubation, the expression level of IL-8, IL-6, GM-CSF and MCP-1 mRNA was measured by real time RT-PCR analysis. Data are shown from single determination.

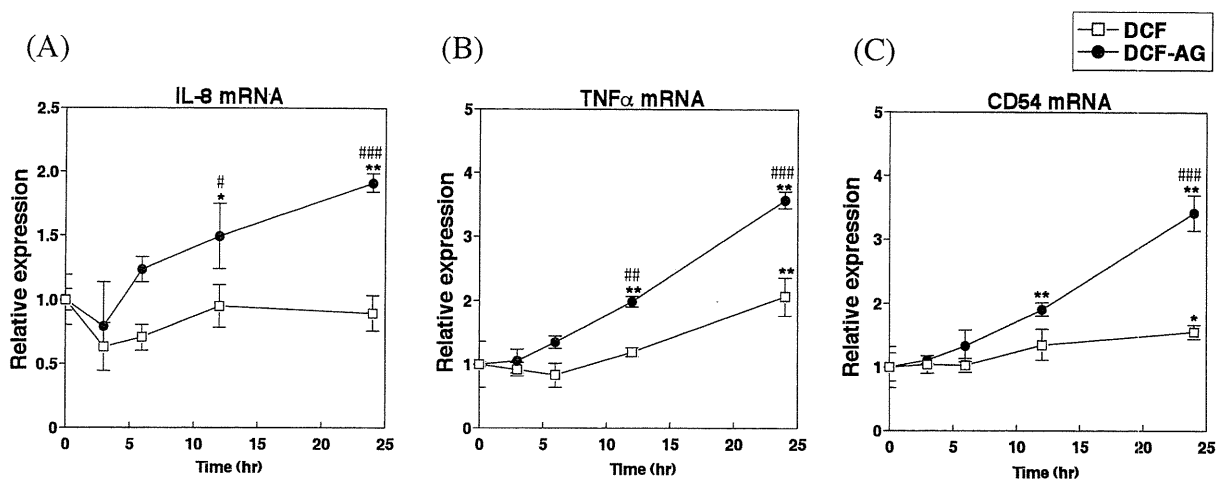


Fig. 3. Time-dependent changes in the mRNA expression level of IL-8, TNF α and CD54 in THP-1 cells treated with DCF or DCF-AG. THP-1 cells were treated with 100 μ M DCF or DCF-AG for various incubation times. The mRNA expression level of IL-8 (A), TNF α (B) and CD54 (C) in THP-1 cells was measured by real-time RT-PCR analysis. Data represent the mean \pm SD of triplicate determinations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control treated for 0 hr of each group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, compared with treated with DCF group in each time point.

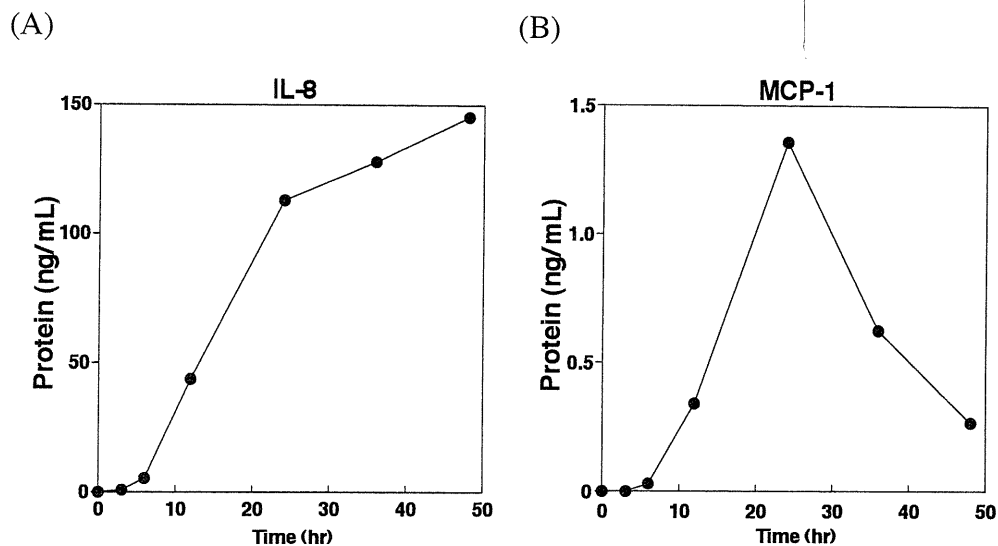


Fig. 4. Time-dependent changes in the release of IL-8 and MCP-1 protein in PBMC treated with DCF-AG. PBMC were treated with 100 μ M DCF-AG for various incubation times. The release of IL-8 (A) and MCP-1 (B) in the supernatant was measured by ELISA. Data are shown as the mean of the results from duplicate determinations.

C-5 DCF 代謝物処置による THP-1 細胞の mRNA 発現量の変化

DCF-AG と他の代謝産物の毒性を比較するため、100 μ M の 4'-OH DCF および 5-OH DCF を 24 時間処置し、検討を行った。DCF-AG 処置によって IL-8 mRNA 発現量は有意に増加し、DCF 処置群に対しても有意な上昇が認められた。また、5-OH DCF 処置によって IL-8 mRNA 発現量に変化はなかった (Fig. 5A)。TNF α mRNA 発現量は 4'-OH DCF よりも DCF-AG 処置群の方がより顕著な上昇が認められた。一方で DCF 処置群においても発現量の有意な増加が認められ、4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置群よりも高い値を示した (Fig. 5B)。CD54 mRNA 発現量は DCF-AG 処置群と 4'-OH DCF 処置群において同程度の発現上昇が認められ、DCF 処置群に対しても有意な上昇が認められた (Fig.

5C)。MCP-1 mRNA の発現量は IL-8 mRNA と同様の変動が見られ、DCF-AG および 4'-OH DCF 処置群において有意に増加した。これらは DCF 処置群に対しても有意な上昇が認められたが、DCF および 5-OH DCF 処置群においても溶媒処置に対して有意に上昇した (Fig. 5D)。

C-6 DCF 代謝物処置による PBMC の mRNA 発現量の変化

PBMC においても同様に、各代謝物処置による影響を検討した。その結果、IL-8、IL-6 および MCP-1 mRNA 発現量に関して、4'-OH DCF 処置群よりも DCF-AG 処置群の方が高い発現量を示した。また、IL-8、IL-6、GM-CSF および MCP-1 の mRNA 発現量は DCF-AG 処置群において溶媒処置および DCF 処置群に対して有意に上昇した (Fig. 6)。DCF 処置群においては溶媒処

置と比較して、各 mRNA 発現量に変化は認められなかった。

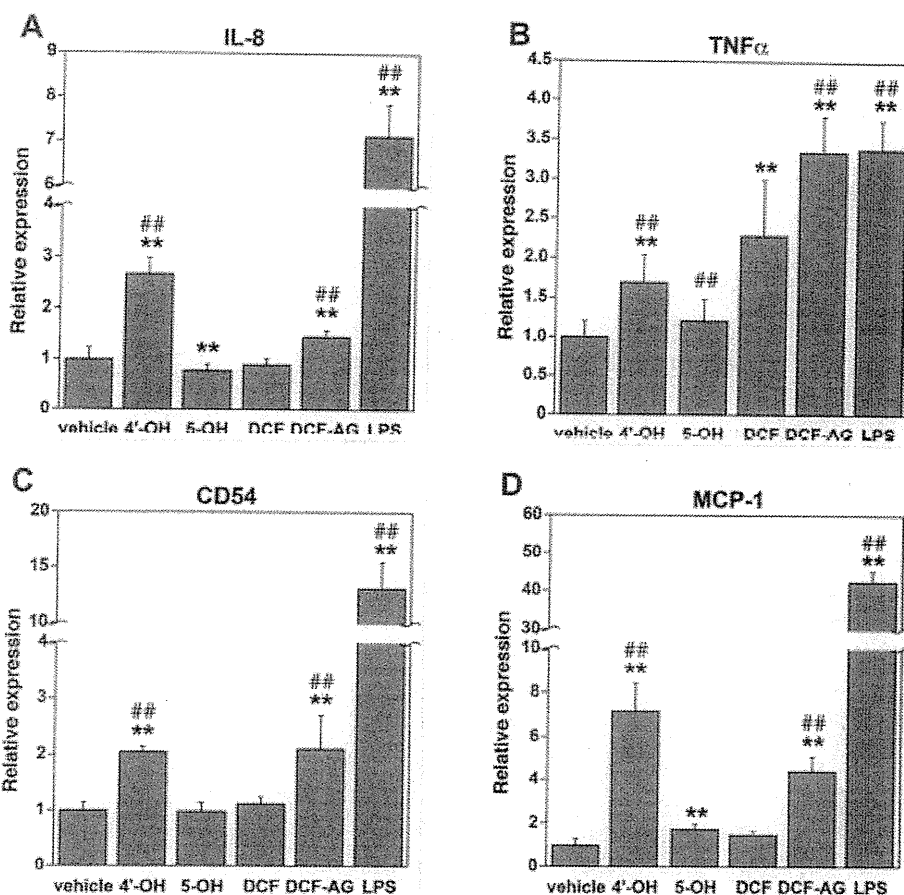
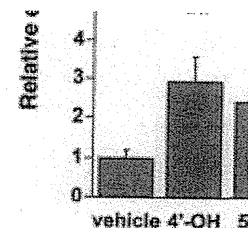


Fig. 5. Effect of DCF and its metabolites on expression level of IL-8, TNF α , CD54 and MCP-1 mRNA in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with 1% methanol (vehicle), 4'-OH DCF, 5-OH DCF, DCF-AG (each 100 μ M) and LPS (10 μ g/mL) for 24 hrs. After the incubation, the expression level of IL-8 (A), TNF α (B), CD54 (C) and MCP-1 (D) mRNA was measured by real time RT-PCR analysis. Data are shown as the mean \pm SD of the results from 3 experiments. Differences compared to the control group were considered significant of * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 and compared to the treated with DCF group were considered significant of # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001.

C-7 DCF-AG 処置による total liver cell の mRNA 発現量の変化

活性化された免疫系細胞と肝細胞の相互作用を検討するため、非実質細胞を含むへパトサイトである TLC (total liver cell) を用いた検討を行うこととした。

DCF-AG 処置濃度による炎症性サイトカイン産生量の変化を検討した。その結果、DCF-AG 処置時、IL-8 mRNA において溶媒処置の 5 倍近くまで mRNA 発現量が上昇した。また、TNF α 、IL-1 β および MIP-1 β mRNA においてはさらに高い発現量の増加が認められた。一方で、DCF 処置にお

いても各 mRNA の上昇傾向が認められた。このことから、DCF-AG の影響を受けた免疫系細胞と肝細胞自身との何らかの相互作用が、毒性発現に関与している可能性が示唆された。

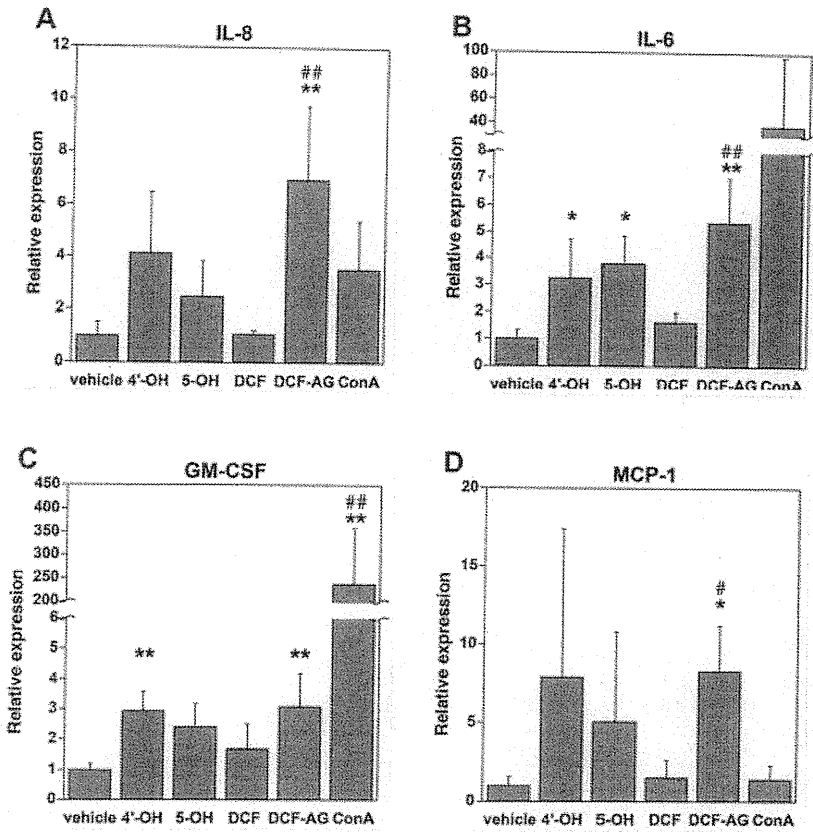


Fig. 6. Effect of DCF and its metabolites on expression level of IL-8, IL-6, GM-CSF and MCP-1 mRNA in PBMC. PBMC were treated with 1% methanol (vehicle), 4'-OH DCF, 5-OH DCF, DCF, DCF-AG (each 100 μ M) and ConA (0.5 μ g/mL) for 24 hrs. After the incubation, the expression level of IL-8 (A), IL-6 (B), GM-CSF (C) and MCP-1 (D) mRNA was measured by real time RT-PCR analysis. Data represent the mean \pm SD (n = 4, DCF and ConA: n = 3). ** P < 0.01 and *** P < 0.001, compared with control groups. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001, compared with treated with DCF group.

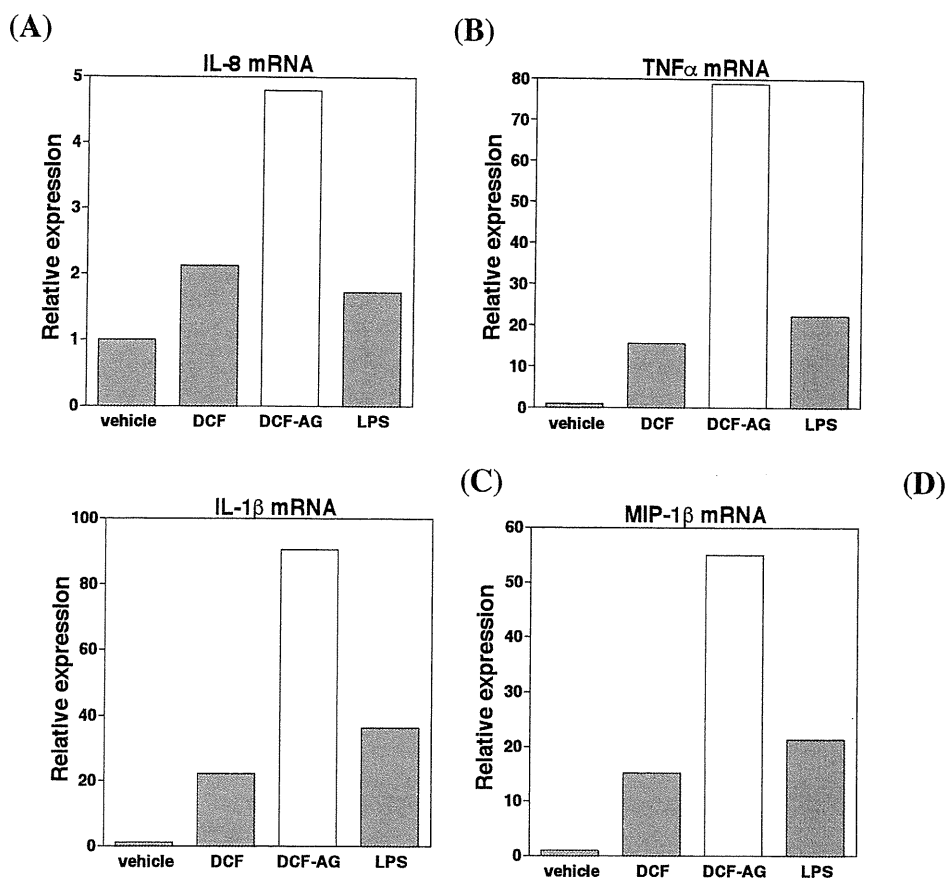


Fig. 7. Effect of DCF and DCF-AG on expression level of IL-8, TNF α , IL-1 β and MIP-1 β mRNA in TLC. TLC were treated with 1% methanol (vehicle), DCF, DCF-AG (each 100 μ M) and LPS (10 μ g/mL) for 24 hrs. After the incubation, the expression level of IL-8 (A), TNF α (B), IL-1 β (C) and MIP-1 β (D) mRNA was measured by real time RT-PCR analysis. Data represent the mean (n = 1).

D. 考察

NSAID に代表される、カルボニル基を持つ薬物は第二相抱合反応によってグルクロン酸抱合を受け、AG を形成する可能性が高い。Acyl 基は比較的反応性が高いため、細胞内のタンパク質分子等と共有結合することで特異体質的な毒性を惹起すると考えられている (Boelsteli et al., 1995)。近年、特異体質的な反応が薬物とタンパクの結合体形成に関与していることが示唆されてはいるが、薬物とタンパクの結合体

が形成されることと薬物の毒性とを結び付ける、メカニズムに基づいた直接的な証拠はない。また、本研究室においてヒト胎児腎臓細胞である HEK293 細胞を用いた検討において、AG が細胞毒性および遺伝毒性を持たないことが示唆された (Koga et al., 2010)。近年、免疫学的な薬物性肝障害が注目され、その発症原因の一つとして薬物の代謝的活性化による反応性代謝物生成の関与が疑われている (Holt et al., 2006; Adams et al., 2010; Lohse et al., 2010)。

本研究では、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細胞とヒト末梢血単核球である PBMC を用いて、代謝物による免疫関連因子の活性化を考慮した肝障害発症機構について検討した。

THP-1 細胞は皮膚感作性試験において、モルモットなどの動物を使用しない試験の *in vitro* 代替法として現在最も注目されており (Ashikaga et al., 2002)、肝障害を惹起する報告のあるキシメラガトラン、トログリタゾン、メベンダゾールおよびテルビナフィンによる炎症反応を評価した報告がなされている (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009; Mizuno et al., 2010; Mizuno et al., 2011)。

肝臓中の自然免疫反応においては、血液中から肝臓へ浸潤している単球やマクロファージ、肝臓に局在するマクロファージであるクッパー細胞などが関与する。これらの免疫細胞は活性化されると、表面抗原分子 (CD40、CD54 および CD86)、炎症性サイトカイン (IL-6 および TNF α) およびケモカイン (IL-8 および MCP-1) 産生量が増加し (Aiba et al., 1997)、T 細胞の効率的な増殖に必要な不可欠である共刺激シグナル (GM-CSF) を伝えることが知られている (Enk et al., 1993; Rougier et al., 1998; Scholer et al., 2008)。また、炎症性サイトカインやケモカインはリンパ球や好中球を刺激し、肝臓への浸潤を引き起こす炎症反応の引き金となることが知られている。

初めに、AG を形成する薬物において、THP-1 細胞のケモカインとして IL-8 および MCP-1、炎症性サイトカインとして TNF α 、表面抗原分子として CD54 の mRNA

発現量を炎症反応の指標としてスクリーニングを行った。

IL-8 は CXC ケモカインのひとつであり、主にマクロファージにより産生されるが、内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、上皮細胞、好中球などによっても産生される (Baggiolini et al., 1994)。また、IL-8 の産生は TNF や IL-1、LPS などの外毒素の暴露によって誘導される (Strieter et al., 1989)。IL-8 の主な作用は好中球の活性化であり、IL-8 内皮投与 (*in vivo*) によって、ヒトを含む多くの動物種における好中球浸潤を惹起することが知られている (Leonard et al., 1991; Baggiolini et al., 1994)。また、アセトアミノフェン、トロバフロキサシン、ラニチジン、ハロタンなどの薬物性肝障害モデル動物において、好中球の肝臓への浸潤は、肝障害の発症に関与する重要な因子であるとの報告がある (Luyendyk et al., 2005; Liu et al., 2006; You et al., 2006; Shaw et al., 2009a)。

TNF α は細胞傷害や宿主防御などの炎症反応に関わる重要なサイトカインである。TNF α の産生は肝臓における炎症の初期段階の一つであり、他のサイトカイン産生を刺激し、炎症細胞の活性化や、初期創傷治癒を促進する (Bradham et al., 1998; Luster et al., 2001)。また、TNF α は細胞傷害性を有し、肝細胞のアポトーシスやネクローシスを引き起こすことも報告されている (Wang et al., 1995; Bohlinger et al., 1996)。げっ歯類を用いた *in vivo* における研究では、アセトアミノフェン、トロバフロキサシン、スリダク、ラニチジンなどの免疫学的機序による肝障害に TNF α が重要な役割を