

201207003A・B

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

大規模生体内分子測定による
薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

平成 20 年度～平成 24 年度
総合・総括研究報告書

研究代表者 曾我 朋義

平成 25 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

大規模生体内分子測定による

薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

平成 20 年度～平成 24 年度

総合研究報告書

研究代表者 曾我 朋義

平成 25 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告書 大規模生体内分子測定による 薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究	1
II. 平成20年度総括研究報告書	105
III. 平成21年度総括研究報告書	115
IV. 平成22年度総括研究報告書	137
V. 平成23年度総括研究報告書	155
VI. 平成24年度総括研究報告書	173
VII. 研究成果の刊行に関する一覧表	227
VIII. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

大規模生体内分子測定による薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

研究代表者：

○曾我 朋義（慶應義塾大学先端生命科学研究所・教授）

研究分担者：

○本間 雅（東京大学医学部附属病院・助教）

○大島 武二（アステラス製薬（株）安全性研究所・室長）

○奈良岡 準（アステラス製薬（株）安全性研究所・主管研究員）

○竹内健一郎（アステラス製薬（株）安全性研究所・主任研究員）

○大村 功（アステラス製薬（株）安全性研究所・主任研究員）

○鈴村 謙一（アステラス製薬（株）安全性研究所・主管研究員）

研究要旨

一般に薬物誘発性毒性は肝障害として現れる例が多いが、薬物性肝障害に共通する特徴的な所見は必ずしも無く、現状では確定診断は困難である。また、糖尿病治療薬トログリタゾンのように投与中止後も症状が悪化する例も報告されており、薬物性肝障害の確定診断を可能にする所見の発見は急務である。本研究は、最新の測定技術を用いて生体内の内因性分子を大規模に測定し、薬物性肝障害の早期かつ正確な診断マーカーの開発を目指すものである。

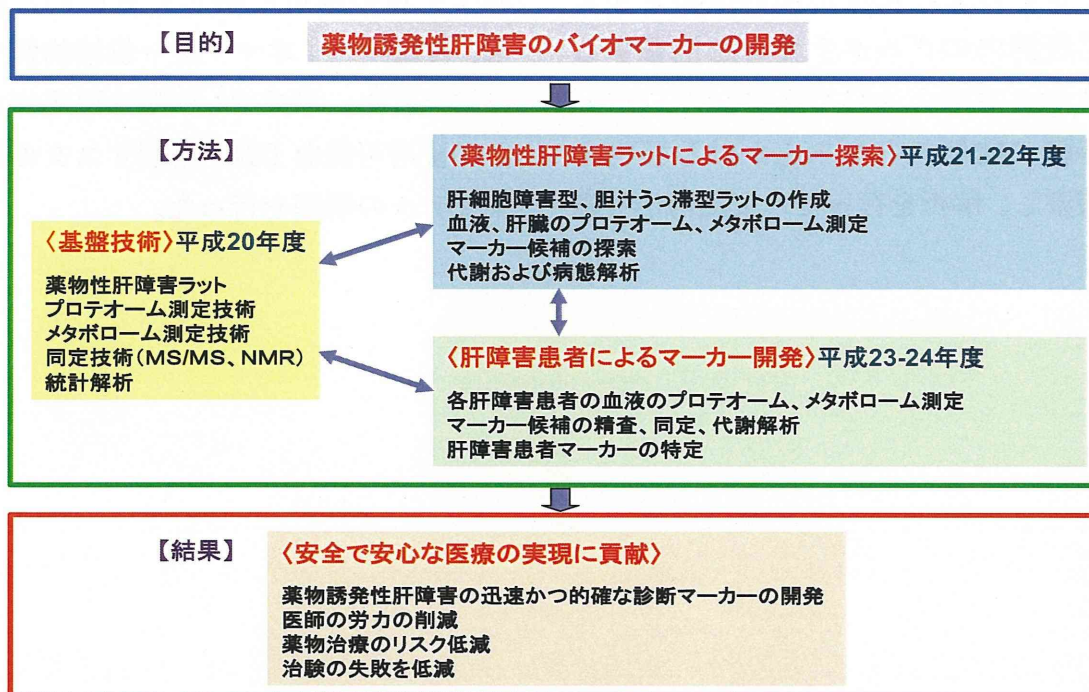
平成 20 年度は、低用量リポポリサッカライドの前感作を行うことで、薬物性肝障害モデル動物を作成する手法を確立した。また、各種肝障害患者の検体集積システムを構築し、大規模メタボローム解析の準備も進めた。平成 21 年度は、モデル動物の解析より見出されたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行い、 γ -Glu-X ジペプチドが肝障害患者において高値を示すバイオマーカーとして見出され、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が、肝障害発症に関連する重要なメカニズムの一つとなっている可能性が示唆された。平成 22 年度は、薬物性肝障害の発症メカニズムにフォーカスした検討を進め、薬物性肝障害の発症過程には、肝臓への酸化ストレスと血中の炎症性サイトカイン・レベルの上昇が大きく関与していることが明らかとなって。平成 23 年度はさらに大規模なカルテ調査も含めて解析を進めた結果、何らかの理由で酸化ストレスおよび炎症が背景因子としてある患者は、その後薬物性肝障害を発症するリスクが高いことが示唆された。また、 γ -Glu-X ジペプチド類は C 型肝炎の治療に伴って低下する傾向がある事も見出され、一部の肝疾患に関しては治療効果を反映するバイオマーカーとしても利用可能である可能性が示唆された。最終年度である平成 24 年度は、薬物性肝障害の発症リスクを評価するための、臨床において適用可能な手法の確立を目指して検討を進め CRP 値を含む複数の臨検値を用いてリスク評価手法を構築した。

A. 研究目的

全米の統計では、薬物の有害作用による死亡者は年間 10 万人超と、死因の第 4 位を占めており、医療上のみならず、医療経済学的にも大きな問題となっている。一般に薬物誘発性毒性は肝障害として現れる例が多く、東京大学医学部附属病院においても、薬物性肝障害発症患者は、年間約 100 名程度と見積もられている。厚生労働省が「重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害」で注意喚起しているように、薬物性肝障害は発症の予測が困難である上に、重篤化して死に至るケースもあり得る重要な薬物有害作用であるため、これを早期に発見し、重症化を予測可能な診断法の開発が強く望まれている。しかしながら、この疾患に対する正確で迅速な診断法は未だ充分には確立されておらず、実臨床で薬物性肝障害が疑われる症例では、従来から用いられている肝機能検査値の他、薬物投与から発症までの期間や、飲酒などの危険因子を考慮したスコアリングにより、薬物性肝障害の診断を行うが、薬物性肝障害に共通する特徴的な所見は必ずしも無く、現状では確定診断は困難である。このため薬物以外の原因を検討した上で消去法的に、「薬物誘発性の肝障害が強く

疑われる」という形で診断されるのが通例である。また、この段階で、疑わしい薬物の投与を中止し経過を観察するのが一般的であり、多くのケースでは症状は軽快に向かうが、中には糖尿病治療薬トログリタゾン（現在は市場撤退）のように投与中止後も症状が悪化する例も報告されており、薬物性肝障害の確定診断を可能にする所見の発見は急務である。また、現在の検査値は肝細胞壊死後に上昇する酵素群であるため、肝細胞壊死前の早期判断は不可能という問題点もある。

本研究では、肝細胞障害型および胆汁うっ滞型の肝障害を誘発するモデル動物をそれぞれ構築するとともに、実臨床で使用される薬物による肝障害を再現する動物モデルの作成を試みる。また、これらの肝障害モデルおよびコントロール動物の肝臓と血清の生体内分子（代謝物、ペプチド、タンパク質）を網羅的に測定し、肝細胞障害型、胆汁うっ滞型の薬物性肝障害のみに検出される薬物性肝障害マーカーを探索する。さらに薬物性肝障害およびウイルス性肝炎の患者および健常人の血液を測定し、肝細胞障害型あるいは胆汁うっ滞型薬物性肝障害を反映し、実臨床において有用な薬物性肝障害マーカーを開発する（図）。



このようなオミクス技術を駆使した大規模なマーカー探索は前例を見ないものであり、薬物性肝障害に特異的なマーカーが発見されれば世界で初めての事例となる。さらに、動物モデルと臨床研究試料の解析結果の比較、および動物モデルでの更なる検討等により、当該バイオマーカーの変動の分子メカニズムの解明も目指しており、これらの研究を通して創薬段階において、肝障害を誘発しうる薬剤の早期発見への道を拓き、また臨床においても、薬物治療のリスクが把握し、投与量や薬剤の変更など治療上取れるオプションを広げることが可能となり、安全で安心な医療の実現に大きく貢献すると考えている。

研究初年度である平成 20 年度は、

薬物誘発性肝障害モデルの作製を中心に検討を行い、また臨床検体の収集システムの構築も併せて行った。平成 21 年度は、肝障害モデル動物の解析より見出されていたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行い、 γ -Glu-X ペプチドがバイオマーカー候補として見出された。平成 22 年度は、より大規模な臨床検体を用いた検証と、薬物性肝障害発症機序の解明を目指した検討を行い、背景疾患としての炎症と酸化ストレスの存在が、薬物性肝障害の発症リスクを高める可能性が示唆された。平成 23 年度は、これまでの研究で見出された肝障害バイオマーカーが、肝疾患の治療に伴ってどのように変動するかを解析した。また、アセトアミノ

フェンのように反応性代謝物を生じて肝臓内のグルタチオンを消費するメカニズムとは異なるメカニズムで肝臓に酸化ストレスをかける薬物を探索し、解析を行った。また消化管障

害モデルの解析に関しても進めた結果、複数のバイオマーカー候補物質も見出された。平成 24 年度は臨床において使用可能な DILI 発症リスクの評価モデルの構築を行った。

B. 研究方法

平成 20 年度

1. 肝障害モデル動物の構築

まず、 α -ナフチルイソチオシアネート (ANIT) および四塩化炭素 (CCl₄) の単回投与による急性の薬物肝障害モデルの構築を検討した。また、実臨床で用いられる薬物の中で、肝障害の頻度が高いことが報告されている代表的な薬物としてポリコナゾール (VCZ) を選択し、VCZ による肝障害モデルの構築も検討した。ANIT は最終濃度が 5 mg/ml、CCl₄ は 2.5 μ l/ml となるよう olive oil を用いて希釈した。またコントロールとしては未添加の olive oil を使用した。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させたラットに、エーテル麻酔下それぞれ ANIT 50 mg/kg, CCl₄ 25 μ l/kg, コントロールとして olive oil 10 ml/kg を腹腔内投与し、麻酔を解除した状態で再びケージに戻し、薬物投与 6 hr 後から摂食再開、各実験のタイムプロトコルに従い、血清もしくは血漿用に麻酔下、頸静脈採血を行った。VCZ 肝障害に関して、リポポリサッカライド (LPS) は生理食塩水を用いて 1.48 mg/ml に希釈し、VCZ はブイフェンド (ファイザー、静注用 200 mg) を滅菌 milliQ 19 ml に溶解させることで 10 mg/ml 溶液を作成、分注液を -80 度保存し、実験時に必要量を適宜 4 度で融解し使用した。

LPS 投与 24 hr 前から水は自由に飲める状態で絶食を行ったラットに、エーテル麻酔下、LPS (5.0 ml/kg, 44.0 \times 10⁶ EU/kg) もしくはコントロール群として生理食塩水 (5.0 ml/kg) を腹腔内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、LPS 投与 2 hr 後に再びエーテル麻酔下固定した状態で、VCZ (3 ml/kg, 30 mg/kg) を右頸静脈から 1.0 ml/min の速度で静脈内投与した。コントロールとしては生理食塩水 (3 ml/kg) を等速度で投与した。再びケージに戻し、LPS 投与 6 hr 後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値である ALT 値、ALP 値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、頸静脈から採血した約 400 μ l の血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで 10 分以上静置、スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離 (1970g \times 10 min) した。チューブ上清から分種した 150 μ l に milliQ 150 μ l を混合した測定用サンプルを、和光純薬工業株式会社 (Lタイプワコー GPT・J2) 及び第一化学薬品株式会社 (クリニメイト BIL-2 試薬、クリニメイト D-BIL-2 試薬) 製の各キット及び、自動分析装置 (日立 7180, 日立 7181, 日立 7182 / 日立ハイテクノロジーズ社製) を用い

て測定した。

また、ANIT, CCl₄, VCZ に関して 2 週間反復投与による慢性肝障害モデルの構築に関しても検討を加えた。長期間の反復投与を行うため、薬物投与前の絶食処置は行わないこととした。ANIT を 5 および 15 mg/kg/回で 1 日 1 回、また CCl₄ を 30 および 100 mg/kg/回で 1 日 1 回、各群雄 6 匹に経口投与した。また、VCZ 処置群に関しては LPS 前感作を行わず、15 および 50 mg/kg/回で 1 日 2 回の静脈内投与を行った。

2. 肝障害検体の収集システムの構築

臨床において肝障害は様々な要因で発生するため、薬物誘発性およびそれ以外の肝障害患者症例から得られた検体を比較検討する必要がある。そこで、本研究では東京大学医学部倫理審査委員会への申請を行い、東京大学医学部附属病院内で発生した各肝障害症例を対象に、生化学検査に用いた血清検体の余剰分を回収するための枠組みを構築した。

平成 21 年度

1. ヒト肝障害検体を用いた、バイオマーカー候補物質の有用性検証

初年度に構築した患者血清検体の収集システムに従って、東京大学医学部附属病院内で発生した各種肝障害症例を対象に、生化学検査に用いた血清検体の余剰分を解析用の検体とし

て収集した。また、山形大学医学部河田純男先生らのグループにもご協力をいただき、最終的に本年度中に、薬物誘発性肝障害検体 31 検体、B 型ウイルス性肝炎 18 検体、C 型ウイルス性肝炎 58 検体、肝細胞癌 33 検体、非アルコール性脂肪性肝炎 11 検体、単純性脂肪肝 9 検体、健常コントロール 10 検体の収集が完了した。

引き続き、これらの検体に関して、前年度までを含めたこれまでの検討によって、薬物誘発性肝障害の動物モデルにおいて、血清中濃度が上昇することが明らかとなっていたオフタルミン酸関連ペプチド複数種類に特に着目して、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS/MS) の多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) 法を用いて高感度に一斉定量し、結果の解析を行った。

2. 肝細胞障害型および胆汁うっ滞型 (混合型) 肝障害モデル動物の確立

薬剤誘発性肝障害の動物モデルとしてはリポポリサッカライドの腹腔内前感作と、薬物の静脈内投与を組み合わせたラットモデルを用いることとした。また、実臨床で用いられる薬物の中で、肝障害の頻度が高いことが報告されている代表的な薬物としてポリコナゾールおよびジクロフェナクをモデルに用いることとした。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた

Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライド(LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg)もしくはコントロール群として生理食塩水(5.0 ml/kg)を腹腔内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、LPS 投与 2hr 後に再びエーテル麻酔下固定した状態で、VCZ (30 mg/kg) あるいはジクロフェナク(DCLF, 100mg/kg)を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。再びケージに戻し、薬物投与 6hr 後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値である ALT 値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約 400 μ l の血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで 10 分以上常温静置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離 (1970g \times 10 min) した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(株)製)と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

3. 肝障害モデル動物における肝臓内グルタチオン・レベルの変動解析

薬剤誘発性肝障害の発症過程における肝臓内グルタチオン・レベルの影

響を解析する目的で、まず LPS 投与後の肝臓内グルタチオン濃度推移の検討を行った。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライド(LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg)もしくはコントロール群として生理食塩水(5.0 ml/kg)を腹腔内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、LPS 投与後 2 時間、および 14 時間の 2 時点で肝臓を単離し、液体窒素にて急速凍結した後、ステンレス・ビーズを用いた振動ミル法にて破碎し、その後メタノール-クロロホルム-水系を用いた液-液抽出によって、肝臓内グルタチオンを水相側に回収した。得られたサンプルを、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計の多重反応モニタリング法を用いて高感度定量した。

4. 肝臓内グルタチオン・レベルが肝障害発症に与える影響の解析

さらに、グルタチオンまたはその前駆体を投与することで、LPS 前感作に伴う肝臓内のグルタチオン・レベルの低下を外因性に補った場合、薬剤誘発性肝障害の発症過程にどのような影響が生じるかを検証する目的で検討を行った。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライ

ド(LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg)もしくはコントロール群として生理食塩水(5.0 ml/kg)を腹腔内投与した。また、LPS 投与の1時間前から1時間ごとに合計4回に渡って、グルタチオン(GSH, 100mg/kg)あるいはN-アセチルシステイン(NAC, 100mg/kg)の皮下投与を行った。また、LPS 投与2hr後にVCZ (30 mg/kg)あるいはジクロフェナク(DCLF, 100mg/kg)を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、薬物投与6hr後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値であるALT値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約400 μ lの血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで10分以上常温静置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離(1970g \times 10 min)した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(株)製)と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

さらに、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が薬物投与による肝障害の発症に関わっていることをより直接的に示す目的で、肝臓内グルタチオン

の枯渇処理が、肝臓の薬物感受性にどのような影響を与えるか検討を加えた。水は自由に飲める状態で24 hr絶食させたWistar系雄ラットに、エーテル麻酔下、ジエチルマレエート(DEM, 3mmol/kg)もしくはコントロール群として生理食塩水(5.0 ml/kg)を腹腔内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、DEM投与1hr後に再びエーテル麻酔下固定した状態で、VCZ (30 mg/kg)あるいはジクロフェナク(DCLF, 100mg/kg)を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。再びケージに戻し、薬物投与6hr後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値であるALT値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約400 μ lの血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで10分以上常温静置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離(1970g \times 10 min)した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(株)製)と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

5. 肝障害モデル動物における炎症性

サイトカインの影響評価

さらに、LPS 前感作を用いた薬剤誘発性肝障害動物モデルの妥当性・応用性の検証の一環として、炎症性サイトカインに着目した検討も開始した。低投与量の LPS 腹腔内投与は、特に肝臓クッパー細胞に影響を与え、様々なサイトカイン・ケモカインの発現を誘導することが知られている。これら液性因子の関与を、LPS 前感作肝障害モデルを用いて検証した。水は自由に飲める状態で 24 hr 絶食させた Wistar 系雄ラットに、エーテル麻酔下、リポポリサッカライド(LPS 1mg/kg = 3.0×10^6 EU/kg)もしくはコントロール群として生理食塩水(5.0 ml/kg)を腹腔内投与した。また、LPS 投与の 1 時間前にサイトカインの合成阻害剤を静脈内に、あるいはモノクローナル中和抗体を皮下に投与した。また、LPS 投与 2hr 後にジクロフェナク(DCLF, 100mg/kg)を、コントロールとしては生理食塩水を、それぞれ右頸静脈から静脈内投与した。その後エーテル麻酔を解除し自由に活動できる状態でケージに戻し、薬物投与 6hr 後からは絶食を解除し、タイムコースに従い採血を行った。肝機能検査値である ALT 値、ビリルビン値は採血後の血清から測定した。エーテル麻酔下、左頸静脈から採血した約 400 μ l の血液をマイクロチューブにアプライし血液が凝固するまで 10 分以上常温静

置し、その後スイングローター式の遠心機を用いて遠心分離 (1970g \times 10 min) した。各検体の生化学検査値の測定は、自動分析装置・ディメンション Xpand Plus-HM (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス(株)製)と、対応する測定試薬キットを用いて行った。

6. 薬物誘発性肝障害ヒト検体におけるサイトカインの変動に関する検討

上述の炎症性サイトカインの薬剤誘発性肝障害発症過程への関与を検証する目的で、患者血清検体中の濃度を、ELISA を用いて測定した。これにより、肝障害の発症段階、あるいは進展段階のいずれに肝臓中グルタチオン濃度の低下、サイトカイン類の曝露が関わっているか検討を行った。

平成 22 年度

1. ヒト薬物性肝障害検体の分析

これまでに構築した患者血清検体の収集システムに従って、東京大学医学部附属病院内で発生した薬物性肝障害症例を対象に、生化学検査に用いた血清検体の余剰分を解析用の検体として収集してきた。本年度までに合計で 63 症例のリクルートが完了し、約 700 検体の収集が完了した。また、コントロール検体としては健常人 10 人および肝障害を発症していない入院患者 10 例をリクルートし、検体を採集した。

これらの検体に関して、前年度までを含めたこれまでの検討によって、薬物性肝障害の発症に伴って変動することが明らかとなった γ -Glu-X ペプチド類に関して、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS/MS) の多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM) 法を用いて高感度に一斉定量し、結果の解析を行った。

また前年度までの検討も含めたこれまでの検討からは、薬物性肝障害発症過程への炎症性サイトカインの関与が考えられた。そこで、代表的な炎症性サイトカインであり、動物モデルにおける LPS 投与に伴って大きく変動することが知られている TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 の4種類のサイトカインに関して、その血清中濃度を各サイトカインに対する ELISA 法を用いて測定し、結果の解析を行った。

2. 消化管障害モデル動物の解析

これまでの検討から、ラットに対する NSAID 投与によって、薬物性消化管障害モデルを作製できることが確認されていた。そこで、イブプロフェンおよびアセチルサリチル酸をラットに単回投与して、胃および血漿のメタボローム解析を実施した。(特許などの知財問題に関連するため、詳細な記載は省略する。)

3. 薬物性肝障害発症メカニズム解析

本年度の検討も含めたこれまでの検討からは、薬物性肝障害を発症した患者に共通する背景素因として、肝臓内グルタチオンの低下と、血清中炎症性サイトカイン・レベルの上昇が見出されてきた。そこで、肝臓内のグルタチオン低下が、肝障害発症にどのように寄与しているのかを検討することとした。

近年の報告では、薬物による肝障害発症リスクと、反応性代謝中間体が共有結合性に肝細胞内のたんぱく質に結合した、プロテイン・アダクトの生成量の間には相関関係が認められ、アダクト生成量が多いものはリスクが高い傾向が認められている。そこで、放射性標識したジクロフェナクをラットに投与し、肝臓内グルタチオン低下処理によって、肝臓内でのアダクト生成量に影響が出るかを評価した。

また、炎症性サイトカインが薬物による肝細胞の障害にどのような影響を与えるかを評価する目的で、ラット肝細胞の初代培養系を用いて検討を行った。本研究において関与が見出されている4種類の炎症性サイトカイン TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 に関して、ラットの組み換えタンパク質が入手困難であったため、まずラットの遺伝子クローニングと、大腸菌による組み換えタンパク質発現系の構築を行った。いずれのタンパク質に関しても、His タグ標識を付加したタンパク質とし

て発現させ、Ni レジンをを用いた精製手法によって組み換えタンパク質の単離精製を行った。次いで、得られたタンパク質を混合して、ラット初代培養肝細胞のメディウム中に添加し、ジクロフェナクの暴露に伴う細胞死を、細胞内 ATP 量の定量アッセイによって評価を行った。またこれに合わせて細胞内グルタチオンの枯渇処理をさらに加えた際の効果についても同様に評価した。

平成 23 年度

1. 肝炎の治療に伴うバイオマーカー変動の解析

山形大学病院においてインターフェロンによる治療を受けウィルスの消失が確認された C 型肝炎患者を 10 名リクルートし、治療前および治療後の血清検体を採集した。

これらの検体に対して、これまでの検討から、種々の肝障害の発症に伴って血清中濃度が顕著に上昇することが明らかとなっている γ -Glu-X ペプチド類に関して、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS/MS) の MRM 法を用いた高感度一斉定量手法によって分析し、結果の解析を行った。

2. 薬物性肝障害の発症予測に繋げるための大規模データベースの構築

薬物性肝障害の発症を事前に予測可能であるかを検証するため、東大病

院に入院している患者を対象として、大規模なカルテ調査を行い、データベースの構築を行っている。現在まで入院患者約 2,000 名のカルテを精査し、薬物性肝障害の発症症例約 70 名を同定すると共に、これら 2,000 名に関し、各種臨床検査値および患者背景情報、服薬履歴などを収集してデータベースへの登録を行った。

3. アセトアミノフェン型以外の薬物による肝酸化ストレス誘発メカニズムの解析

アセトアミノフェンのように、肝細胞内での CYP による代謝を受けることで反応性代謝物が生じ、これがグルタチオンを消費することで酸化ストレスが生じる事例が知られているが、このようなメカニズム以外にも肝臓に対して強い酸化ストレスを与える薬物は存在すると考えられる。

本年度の検討では、東大病院における過去の検討から、強い酸化ストレスを惹起する可能性が示唆されていた抗がん剤であるスニチニブをモデル化合物として、酸化ストレスが発生するメカニズムの解析を、マウスモデルを用いて行った。

4. 消化管障害モデルの解析

昨年度までに確立したラット消化管障害モデルを用い、胃組織内および血清サンプルのメタボローム解析を行い、消化管障害の発症に伴って変動

する内因性代謝物質を検索した。

平成 24 年度

1. 薬物性肝障害の発症予測に繋げるための大規模データベースの構築

薬物性肝障害の発症を事前に予測可能であるかを検証するため、東大病院に入院している患者を対象として、大規模なカルテ調査を行い、データベースの構築を行った。

○調査対象期間

- ・モデル構築セット

DILI の発症リスクを評価するモデルを構築するため、2010 年 10 月の 1 ヶ月間の東大病院への入院患者を対象にした予検討に基づき、DILI 発症患者数が 100 名を超えるように、2010 年 11 月～2011 年 12 月までの 13 か月間の東大病院の入院患者を対象とした。

- ・バリデーションセット

構築したモデルの妥当性を検証するため、2012 年 4 月～2012 年 7 月までの 4 ヶ月間の東大病院の入院患者を対象として選択した。

○入院日数

検査目的の入院患者や重症疾患による長期入院患者を除外するため、入院日数が 14 日～100 日の全患者を対象とした。

○DILI 発症患者の判定

肝機能を反映する臨床検査値である ALT または ALP 値に関して、CTCAE

v4.0 に基づく **Grade 2** (中等症) 以上の検査値異常に該当する患者のうち、以下のいずれかの条件を満たす患者を DILI 発症患者と判定した。

(1) カルテ上の記載中に、肝機能検査値異常を示す原因として、以下に挙げるような他の疾患の可能性が除外でき、薬物服用による影響が疑われると主治医が判断している場合

- ・肝炎ウイルスへの感染
- ・肝臓の器質的病変(肝硬変、肝不全、肝癌、胆道狭窄など)による影響
- ・肝切除や肝動脈塞栓術などの、肝臓に侵襲性のある手術に伴う反応
- ・胆石の落下に伴う一過性の上昇
- ・栄養剤の投与に伴う一過性の上昇
- ・骨病変に伴う ALP の上昇

(2) カルテ上に特記されていないが、ALT または ALP 値の時間推移と、服薬履歴を照合した際に、服用開始後に肝機能検査値が上昇し、その薬物の休止に伴って肝機能検査値の回復が認められる場合

また、(1) あるいは (2) の基準に合致する DILI 発症患者に関しては、服用期間と肝機能検査値の上昇および低下のタイミングが一致する薬物を DILI 発症の起因薬と考えて服薬歴より抽出を行った。さらに、DILI 発症の起因となっている薬物が抗がん剤などの明確な細胞毒性を有することが既知の薬物である場合を中毒性の DILI 症例、それら以外の薬剤である

場合を特異体質性の DILI 症例と定義した。本解析には、特異体質性の DILI を発症した症例のみを解析の対象とした。

○解析対象から除外した患者

以下の (1) ~ (3) のいずれかを満たす症例は解析対象から除外した。

(1) DILI 発症の有無を精査した患者の中で、カルテ上の記載だけでは判断がつかず、さらに上述した“DILI 発症患者の判定”の項目における DILI 発症の判断基準 (2) を満たすような薬物が同定できない場合

(2) DILI 発症の有無を精査した結果、DILI を発症した症例であると判定されたが、起因薬の服用開始時点が

入院前であり、服用開始時点における臨床検査値の値を収集できず、解析に用いることができないと判断した場合

(3) プライバシー保護の関係からカルテ情報へのアクセスに制限がかかっており、患者情報が収集できない場合

○臨床検査値

血清検査および血液検査として日常診療において測定される臨床検査値の中で、2010年10月の1ヶ月間の入院患者を対象とした予検討において、患者全体の全測定時点のうち9割以上で測定されていることが確認された以下の15種類を採用した。

略語標記	臨床検査値	反映する病態
Alb	アルブミン	肝機能低下、栄養不良など
BUN	尿素窒素	腎機能低下など
Cl	クロール	電解質異常など
Cre	クレアチニン	腎機能低下など
CRP	C 反応性タンパク質	炎症反応など
Hb	ヘモグロビン	貧血・多血症など
Hct	ヘマトクリット値	貧血・多血症など
K	カリウム	電解質異常など
LDH	乳酸脱水素酵素	組織障害など
Na	ナトリウム	電解質異常など
PCT	血小板クリット値	骨髄疾患、肝硬変など
PDW	血小板分布幅	骨髄疾患など
PLT	血小板数	骨髄疾患、肝硬変など
RBC	赤血球数	貧血・多血症など
WBC	白血球数	炎症反応、白血病など

2. 薬物性肝障害の劇症化頻度に関する調査

日米欧それぞれの地域における DILI および薬物性の劇症肝炎の報告を収集した。なお、抗がん剤に関しては、中毒性機序の肝毒性発現を示す薬物が多いと考えたため、解析対象から除外した。参照した各医薬品規制当局の副作用報告データベースおよび期間は以下の通り。

日本：医薬品医療機器総合機構 (PMDA, 2000年1月～2010年8月)

米国：アメリカ食品医薬品局 (FDA, 2004年1月～2011年6月)

欧州：欧州医薬品庁 (EMA, 2001年12月～2012年5月)

「DILI は起因薬に依らず一定の頻度で劇症化する」という仮説を検証するためには、すべての薬物に関して DILI が劇症化する頻度を推定する必要がある。そのため、薬物ごとの劇症化頻度の推定法として、多変量の推定に優れたギブスサンプリングを用いたベイズ推定を試みた。なお、統計解析ソフトは R 2.14.1 および WinBUGS 1.4 を用いた。

○統計モデル

薬物ごとに、報告された DILI 症例数を x_i 、劇症肝炎症例数を y_i

($i = 1, 2, \dots, n$; 薬物番号) と表記したとき、以下の統計モデルに従って解析を行った。

$$y_i = x_i \times r_i \times \beta$$

このとき、 β は全薬物の劇症化頻度の平均値、 r_i は薬物ごとの劇症化頻度を全体の平均値 β で規格化した値として表される。 r_i が平均 1 の対数正規分布に従うものと仮定して推定を行った結果、 r_i の 99% ベイズ信頼区間 (以下、99% CI) が 1 を含む場合に、その薬物は検証したい仮説に従うものとみなした。

この解析を PMDA、FDA、EMA の各副作用症例報告データベースに対して行い、それぞれの薬物が仮説に従うか否かを調査した。

○構築した統計モデルの理論

本解析は、各医薬品規制当局に対して報告された副作用症例数に基づいて行っている。しかしながら、基本的に副作用報告は自発報告に従うため、一定の確率で報告漏れが生じてしまう点、また服薬を継続すれば劇症化してしまったはずの症例でも、起因薬剤の休薬等の治療介入を行ったために、発症までには至らなかった症例も存在する可能性が想定される点を考えると、報告された症例数は実際に発症すると想定される症例数よりも少ないものと思われる。

ここで、実際に発症すると想定される DILI および劇症肝炎症例数をそれぞれ X_i 、 Y_i としたとき、 X_i と Y_i の間には、薬物に依らず一定の劇症化頻度 B を

仮定するとき、検証したい仮説が正しければ、

$$Y_i = X_i \times B$$

という関係式が成立する。このとき、治療介入の影響を考慮しない場合に対する、影響を考慮した場合に報告される DILI および劇症肝炎症例数の変化率を a_{X_i} 、 a_{Y_i} とし、さらに実際に発症した DILI および劇症肝炎症例のうち、当局に報告される頻度を b_{X_i} 、 b_{Y_i} としたとき、

$$Y_i \times a_{Y_i} \times b_{Y_i} = X_i \times a_{X_i} \times b_{X_i} \times \frac{a_{Y_i} \times b_{Y_i}}{a_{X_i} \times b_{X_i}} \times B$$

という関係式で表される。ここで、当局に報告された DILI および劇症肝炎の症例数である x_i 、 y_i はそれぞれ $x_i = X_i \times a_{X_i} \times b_{X_i}$ 、 $y_i = Y_i \times a_{Y_i} \times b_{Y_i}$ として表すことができるため、上記の式は、

$$y_i = x_i \times \frac{a_{Y_i} \times b_{Y_i}}{a_{X_i} \times b_{X_i}} \times B$$

となる。薬物ごとに異なる変数である a_{X_i} 、 a_{Y_i} 、 b_{X_i} 、 b_{Y_i} をそれぞれ分離して推定をすることは不可能であるため、これらの変数を

$$R_i = (a_{Y_i} \times b_{Y_i}) / (a_{X_i} \times b_{X_i})$$

なるパラメーター R_i を用いてまとめると、

$$y_i = x_i \times R_i \times B$$

となる。さらに、薬物ごとの変数である R_i の平均値 \bar{R} を用いて変形すると、

$$y_i = x_i \times \frac{R_i \times B}{\bar{R} \times B} \times (\bar{R} \times B)$$

このとき、 $\bar{R} \times B$ はそれぞれの薬物に関して報告された症例数に基づき算出した、見かけの劇症化頻度の平均として表され、これが β にあたる。また、 $R_i \times B$ は、薬物ごとに算出された劇症化頻度であり、これを全体の平均値 β で規格化した値が r_i にあたる。これらを考慮して、

$$y_i = x_i \times r_i \times \beta$$

という統計モデルを構築した。

○ギブスサンプリングの解析手順

以下に、ギブスサンプリングの手順を示す。なお、本解析で用いた DILI および劇症肝炎報告数のデータを、観測データ \mathbf{Y} として表すこととする。

(1) 最初に何らかの $\{\beta, r_1, r_2, \dots, r_N\}$ の初期値を設定しておく。

(2) r_1, r_2, \dots, r_N を固定したとき、 β を動かし、確率分布 $p(\beta | \mathbf{Y}, r_1, r_2, \dots, r_N)$ に従う乱数を一つ発生させて、それを新しい β とする。

(3) β および r_2, \dots, r_N を固定したとき、 r_1 を動かし、確率分布 $p(r_1 | \mathbf{Y}, \beta, r_2, \dots, r_N)$ に従う乱数を一つ発生させて、それを新しい r_1 とする。次に、 r_2 以外のパラメーターを固定したとき、 $p(r_2 | \mathbf{Y}, \beta, r_1, r_3, \dots, r_N)$ に従う乱数を一つ発生させて、それを新しい r_2 とする。この操作を r_N まで繰り返す。

(4) (2) ~ (3) の過程を 1 ステップとし、得られた $\{\beta, r_1, r_2, \dots, r_N\}$ の値を記録する。

(5) 十分な個数の $\{\beta, r_1, r_2, \dots, r_N\}$ のサンプルが得られるまで、(2) ~ (4) を繰り返す。

○解析条件

ギブスサンプリングの試行回数を 51,000 ステップとし、また初期値の影響を取り除くために、はじめの 1,000 ステップの結果を排除した。さらに、データ処理の効率を向上させるために、1,001 から 51,000 ステップまでの 50,000 ステップのうち、50 ステップおきにサンプリング結果を記録して、1,000 個のサンプルを得た。ここまでの試行を 3 回反復した。反復ごとのサンプルをサンプル列と呼ぶとき、1,000 個×3 本のサンプル列をもとにして解析を行った。

○パラメーターの収束診断

各パラメーターの収束診断は、 \hat{R} 指数を使用した。 \hat{R} 指数は、3 本のサンプル列を比較して評価される指標であり、

$$\hat{R} = \sqrt{\left(\frac{n-1}{n}W + \frac{1}{n}B\right)/W}$$

と定義される。 n はサンプル列の長さ、 W はサンプル列内の分散、 B はサンプル列間の分散である。この \hat{R} 指数が 1.0 に近ければ、サンプル列間よりもサンプル列内のバラつきが大きくなると

推測され、パラメーターは収束しているとみなす。本検証では $\hat{R} \leq 1.1$ となる時に、パラメーターは収束しているとみなした。

3. 消化管障害バイオマーカーの検討 実験—1

代表的な NSAIDs であるアスピリン及びイブプロフェンをラットに単回経口投与して、胃潰瘍を惹起させ、その程度を経時的に調べるとともに、その動物から採取した胃の抽出物及び血中の内因性代謝物がどの様に変化するかを調べた。胃潰瘍が惹起された動物と胃潰瘍が惹起されなかった動物との間で内因性代謝物の臓器内濃度が異なるか否かを検討し、胃潰瘍が惹起された動物で特異的に変化した代謝物を胃潰瘍のバイオマーカー候補とした。さらに抽出されたバイオマーカー候補が血中でも同様に変化するか否かを確認して、臓器内での変化が血中においても確認できるような代謝物をバイオマーカー候補とした。

○動物実験

アスピリンはナカライテスク株式会社からイブプロフェンは和光純薬工業株式会社から購入した。

日本チャールスリバー株式会社から CD(SD) 系のラットを 110 匹購入した。馴化期間に異常を示さなかった

100 匹を選択し、アスピリンの 3 及び 300 mg/kg、イブプロフェンの 8 及び 800 mg/kg を 0.5 w/v% メチルセルロース (MC) 溶液に懸濁して各群雄 20 匹のラットに単回経口投与した。投与後 1、2、5、8、24 時間に各 4 匹ずつ体重を測定後、ペントバルビタールナトリウム水溶液 (6.48 mg/mL、5 mL/kg) の腹腔内投与により麻酔を行い、血液を採取した後、放血安楽死させ、胃を摘出した。胃を大弯に沿って切開後、肉眼的に観察し、胃内部の写真撮影を行った。胃及び血液はその後 CE-MS を用いた内因性代謝物の濃度測定に供した。また、剖検時に撮影した写真から画像解析ソフトを用いて胃潰瘍面積を測定した。これと同時に、対照群として媒体として利用した 0.5 w/v% MC 溶液を被験物質群と同様の方法で雄 20 匹に投与し、投与群と同時に処理して投与による変化を調べた。

○サンプルの前処理及び CE-MS の測定
剖検及び胃潰瘍面積の結果、代表的なデータとなりうると判断した 1 時間、5 時間及び 24 時間の胃及び血液について CE-MS を用いて臓器内及び血中の低分子代謝物の濃度を測定した。サンプルの前処理及び測定は以下の通りに行った。

サンプルの前処理、測定 (胃)

Methionine sulfone、MES(2-(n-morpholino)-ethanesulfonic acid) および CSA(D-Camphol-10-sulfonic acid)を各 20 μ M となるように調製した MeOH 溶液 1mL に採取した胃を加えホモジネートした。さらに CHCl_3 500 μ L、MilliQ 水 200 μ L を加えて攪拌し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、4600 \times g で 20 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター (分画分子量 5000 Da) にとり 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9100 \times g で 12 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に CE-MS の移動時間補正用の 3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200 μ M 水溶液 50 μ L で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

サンプルの前処理、測定 (血清)
Methionine sulfone、MES および CSA(D-Camphol-10-sulfonic acid)を各 20 μ M となるように調製した MeOH 溶液 450 μ L に血清 50 μ L を加え攪拌した。さらに CHCl_3 500 μ L、MilliQ 水 200 μ L を加えて攪拌し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、4600 \times g で 8 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター (分画分子量 5000 Da) にとり 4 $^{\circ}\text{C}$ 、9100 \times g で 3 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に、3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200 μ M 水溶液 25 μ L で溶解し、