

CE-TOFMS で測定した。

#### サンプルの同定

代謝物質標準液(STD)は表 1 の濃度に調整し、各測定条件の最初に対応する STD を測定した後、サンプルを測定した。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。

検出されたピークに対して  $m/z$  と MT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は MT で  $\pm 0.5$  min、 $m/z$  では  $\pm 10$  ppm とした。血清中及び臓器中の濃度は内部標準検量法に従い算出した。

#### データの解析

胃潰瘍で特異的に変化する内因性低分子代謝物を見つけるため、胃抽出物から得られたデータについて Principal components analysis (PCA) を用いて外れ値となる動物を除去した後、Orthogonal PLS (OPLS) を用いて胃潰瘍が確認された動物で特異的に変化する内因性代謝物を抽出した。PCA 及び OPLS は SIMCA-P+ (Umetrics) を用いて行った。抽出さ

れた代謝物は群間比較を行うため、GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化している代謝物をバイオマーカー候補とした。さらに同一代謝物の臓器内濃度と血中濃度が有意性を持って相関している事を確認するため、それぞれのマーカー候補についての各動物における臓器内濃度と血中濃度の Pearson の積率相関係数を算出し、その有意性を確認した。これらの算出及び検定は GraphPad Prism を用いて実施した。さらにマーカー候補の血中濃度は GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化している事を確認した。

#### 実験-2

実験-1 において 2 つの NSAIDs に共通して変動する複数のバイオマーカー候補を見出した。しかしながらこれらのバイオマーカー候補の変動機序は不明である。そこでその変動機序を見出すため胃酸の放出を抑制する事で NSAIDs による胃潰瘍の惹起を抑制する作用がある事が知られている (Takeda et al., 1982) ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 (ファモチジン) 及びプロトンポンプインヒビター (オメプラゾール) をアスピリンの投与 30 分前に投与した場合の低分子代謝物の変

化を調べた。

#### ○動物実験

アスピリンはナカライテスク株式会社からファモチジン及びオメプラゾール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 20 匹購入した。馴化期間に異常を示さなかった 16 匹を選択し、4 匹にはファモチジンの 5mg/kg を、他の 4 匹にはオメプラゾールの 60mg/kg を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して経口投与した。残りの 8 匹には媒体である 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した。これらの薬物を投与した 30 分後にファモチジンの 5mg/kg、オメプラゾールの 60mg/kg、及び 0.5 w/v% MC 溶液を投与した各 4 匹についてアスピリンの 100 mg/k を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して経口投与した。0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した動物のうち残りの 4 匹には再度 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与し、Control 群とした。アスピリンの投与後 5 時間にイソフルランを吸引させて麻酔を行い、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。

#### ○サンプルの前処理及び CE-MS の測

定

全ての動物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 および CSA(D-Camphol-10-sulfonic acid)を各 20  $\mu$ 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  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ 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  $\mu$ M 水溶液 50  $\mu$ 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  $\mu$ M となるように調製した MeOH 溶液 450  $\mu$ L に血清 50  $\mu$ L を加え攪拌した。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ 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 °C、9100 ×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 μM 水溶液 25 μL で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

#### サンプルの同定

代謝物質標準液(STD)は表 1 の濃度に調整し、各測定条件の最初に対応する STD を測定した後、サンプルを測定した。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。

検出されたピークに対して  $m/z$  と MT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は MT で  $\pm 0.5$  min、 $m/z$  では  $\pm 10$  ppm とした。血清中及び臓器中の濃度は内部標準検量法に従い、式(1)を用いて算出した。

#### データの解析

胃抽出物から得られたデータについて Principal components analysis (PCA)を用いて外れ値となる動物を除去するとともに、全体の代謝物パター

ンの傾向を確認した。PCA は SIMCA-P+ (Umetrics) を用いて行った。さらに、実験-1 抽出されたマーカー候補について群間比較を行うため、GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、ファモチジン及びオメプラゾールがアスピリンによるこれらの代謝物の変化に与える影響について検討した。さらにマーカー候補の血中濃度は GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、ファモチジン及びオメプラゾールがアスピリンによるこれらの代謝物の血中濃度変化に与える影響についても検討した。

#### 実験-3

実験-1 において 2 つの NSAIDs に共通して変動する複数のバイオマーカー候補を見出した。また実験-2 においてヒスタミン H2 受容体拮抗薬(ファモチジン)及びプロトンポンプインヒビター(オメプラゾール)をアスピリンと共投与して、バイオマーカー候補の変動パターンを見る事で、それらの変動する原因をおおよそ確認する事が出来た。実験-3 では NSAIDs 以外のモデルで胃潰瘍を誘発させたモデルについてもバイオマーカー候補の変動パターンを見る事で、バイオマーカー候補の変動する原因を再確認するとともに、バイオマーカー候補がどのような目的に使えるかを明らかにす

る。

#### ○動物実験

アスピリンはナカライテスク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 24 匹購入し、馴化期間に異常を示さなかった 20 匹を選択して試験に供した。これら 20 匹のうち 4 匹にアスピリンの 300 mg/kg を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して単回経口投与した。また他の 4 匹にはエタノールの 5mL/kg を単回経口投与した。残りの 12 匹には媒体である 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した。0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した動物のうち 4 匹は低温室(室温 4-6°C)で飼育し、ストレス負荷による胃潰瘍を惹起した。残りの 8 匹は 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した後室温で飼育し、この試験の Control 群とした。残りのそれぞれの投与後 5 時間にイソフルランを吸引させて麻酔を行い、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。

#### ○サンプルの前処理及び CE-MS の測定

全ての動物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 および CSA(D-Camphol-10-sulfonic acid)を各 20  $\mu$ 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  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ 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  $\mu$ M 水溶液 50  $\mu$ 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  $\mu$ M となるように調製した MeOH 溶液 450  $\mu$ L に血清 50  $\mu$ L を加え攪拌した。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ 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  $\mu$ M 水溶液 25  $\mu$ L で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

#### サンプルの同定

代謝物質標準液(STD)は表 1 の濃度に調整し、各測定条件の最初に対応する STD を測定した後、サンプルを測定した。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。

検出されたピークに対して  $m/z$  と MT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は MT で  $\pm 0.5$  min、 $m/z$  では  $\pm 10$  ppm とした。血清中及び臓器中の濃度は内部標準検量法に従い、式(1)を用いて算出した。

#### データの解析

胃抽出物から得られたデータについて Principal components analysis (PCA)を用いて外れ値となる動物を除去するとともに、全体の代謝物パターンの傾向を確認した。PCA は SIMCA-P+ (Umetrics) を用いて行った。さらに、実験-1 抽出されたマーカー

候補について群間比較を行うため、GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、各モデルにおけるこれらの代謝物の変化を検討した。さらにマーカー候補の血中濃度は GraphPad Prism を用いて Dunnett の他群比較検定を行い、各モデルにおけるバイオマーカー候補の変化を検討した。

#### 4. 新規肝障害マーカーの検討

##### ○薬剤、動物の入手

チクロピジン塩酸塩、ラニチジン塩酸塩及びバンコマイシン塩酸塩は和光純薬株式会社から購入した。イトラコナゾールはイトリゾール注 1%をヤンセンファーマ株式会社から購入した。LPS (Lot No. 051M4004) を Sigma-Aldrich 社より購入した。動物は Crlj:WI 系統の雄性ラットを日本チャールスリバーから購入し、8 週齢として使用した。

##### ○投与、サンプリング及び検査

24 時間の絶食の後、0.1 及び 0.3 mg/kg の LPS を腹腔内投与した。その 2 時間後に薬剤を静脈内投与した。その後、給餌可能な状態とし、薬剤投与 12 時間後に肝臓、血漿、尿を採取した。チクロピジンは 3 及び 10 mg/kg、ラニチジンは 30 及び 100 mg/kg、イトラコナゾールは 10 及び 20 mg/kg、バンコマイシンは 30 及び 100 mg/kg を投与した。尿は薬剤投与直後から 12

時間の蓄尿を氷冷下で採取した。病理組織学的検査用としてホルマリン固定した肝臓とトランスクリプトーム解析用の肝臓サンプルを採取したほか、血液学、凝固検査用に EDTA 及びクエン酸血漿、生化学検査用にヘパリン血漿を採取した。メタボローム解析はキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) を用いて測定した。網羅的発現解析には Affymetrix 社の GeneChip Rat 230 2.0 を使用し、定法に従って遺伝子発現データを取得した。データの解析には Agilent 社の GeneSpring GX を使用した。得られたメタボローム及びトランスクリプトームデータについて、LPS 単独投与群と LPS 薬剤併用群での比較及び壊死が認められた個体群と認められていない個体群での比較を実施し、LPS ラットで生じる薬剤の反応や肝障害発生と相関する代謝物及び遺伝子を検索した。それらについては、Ingenuity 社の IPA 及び Thomson Reuters 社の MetaCore を用いてパスウェイ解析を実施した。

#### (研究の倫理的側面への配慮)

本研究には、ラットあるいはマウスを用いた動物実験が含まれる。動物実験に関しては、東京大学においては、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成18年6月1日

文部科学省告示第71号) を遵守した上で、東京大学医学部動物実験委員会によりプロトコルの承認を受けたのち、東京大学医学部動物実験指針に従い、実験を行っている。また、アステラス製薬 (株) 安全性研究所においては、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成18年6月厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) を遵守した上で、当該施設の規程に従い、実験を行っている。

また本研究には、ヒト臨床研究も含まれる。ヒトにおける臨床研究については、疫学研究に関する倫理指針 (平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成16年厚生労働省告示第459号) を遵守した上で、東京大学医学部倫理委員会およびアステラス製薬ヒト組織研究倫理審査委員会による承認を得た後、下記の倫理的配慮(a, b)を適切に行い、研究を進めている。

a) 試料は匿名化し、個人情報個人が特定できる形で研究機関の外部に持ち出すことを禁止する。

b) 文書にて研究の目的および方法を十分に説明して了解を得た後、提供者の自由意思に基づき書面によるインフォームド・コンセントを得て試料の提供を受ける。

## C. 研究結果

### 平成 20 年度

ANIT 処理により胆汁排泄の障害、肝機能の障害が誘発され、胆汁うっ滞型の肝障害が誘起されることが知られている。24 hr 絶食させたラットに対し、ANIT (50 mg/kg) を腹腔内投与し、血清中の ALT 値, ALP 値, ビリルビン値の変動を経時的に測定したところ、ANIT 投与 18 hr 後から血清 ALT 値, ビリルビン値の上昇が確認され、48 hr 後には最大となった。48 hr での肝機能マーカーの変動は、CCl<sub>4</sub> 処理群と比較すると ALT の上昇は比較的軽度である一方、ビリルビン値の上昇は著しく、また ALP 値も有意に上昇していることが判明した。ビリルビンは胆汁中に含まれるヘム分解物であり、血清中直接ビリルビン値の上昇は胆道系の障害を意味するため、ANIT 処理により従来の報告通り、胆汁うっ滞型の肝障害を誘起することが確認された。一方、CCl<sub>4</sub> を投与したラットでは 24 hr~48 hr にかけて著しい ALT 値の上昇が観察されたが、ビリルビン値の変動はほとんど観察されなかった。ALT は肝細胞中に存在する酵素で、肝細胞が障害されることで血液中濃度が上昇する肝逸脱酵素であり、ALT 値の顕著な上昇はおもに肝細胞が傷害されていることを意味するため、CCl<sub>4</sub> 誘発性肝障害は肝細胞障害

型であることが確認された。また、ALP は胆管系酵素でありヒトの胆汁うっ滞時には顕著な上昇が観察されることが知られているが、今回の結果では、ALP 値は胆汁うっ滞型に分類される ANIT 投与によっても、ビリルビン値ほどの顕著な上昇は確認されなかった。胆管結紮によって直接的に胆汁うっ滞を誘起したラットにおいても、ALP 値とビリルビン値の変動は ANIT 処理群とほぼ同程度であった。

VCZ 単独の単回投与では肝障害誘発が困難であるため、過去の報告に従い、VCZ 投与 2 hr 前に低用量の LPS を腹腔内投与し、前感作した状態で VCZ (30 mg/kg) を静脈内投与した。低用量 LPS と VCZ を併用した群においては、投与後 12, 24 hr 後の血清中 ALT 値が著しい上昇を示し、肝障害が誘発していると考えられた。一方で、LPS 単独、VCZ 単独の各群では併用群ほどの ALT 値の上昇は観察されず、LPS 前感作処置によりラットの VCZ 負荷に対する感受性が增大していると考えられた。また、血清ビリルビン値はいずれの群においてもほとんど変動を示さず、本検討で確立した VCZ 肝障害モデルは肝細胞障害型と判断された。

また、自由摂食下での 2 週間投与群では、いずれの群においても死亡は認められなかった。VCZ 投与群では、

50 mg/kg/回群で、投与直後に自発運動の低下（軽度～高度）、失調歩行、振戦が散見されたが、直ちに消失する変化であった。肝臓重量の増加が 15 及び 50 mg/kg/回投与群において認められた。血液生化学的検査では、15 及び 50 mg/kg/回投与群でトリグリセリド、グルコース及び無機リンの低値傾向がみられたが、肝機能検査値に大きな変動は認められなかった。ANIT 投与群では、概ね投与による変化は認められなかった。一方、CCl<sub>4</sub> 投与群では、肝臓重量の増加・AST 値および ALT 値の高値傾向が観察され、肝臓の淡褐色化が認められたことから、肝臓に対する影響が示唆された。

## 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

本研究および慶應義塾大学におけるこれまでの検討によって、薬物誘発性肝障害モデル動物においては、オフタルミン酸、およびオフタルミン酸に構造的に類似する複数のペプチドに関して、肝障害の発症に伴って血清中の濃度が著しく上昇することが見出された（論文投稿中のため化合物名は開示しない）（図 1）。また、それらのペプチド類の生合成経路はグルタチオンの生合成経路と同一であり、肝細胞中グルタチオン濃度によりフィードバック制御を受けている（図 2）。従

って、これらのバイオマーカー候補物質の血清中濃度上昇は、種々の機序の肝障害発症に広く共通する事象として、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が生じていることを強く示唆している。

また、セロトニン代謝物の血清中濃度が薬物誘発性肝障害患者検体において上昇していること、およびリン脂質代謝物濃度が減少していることが明らかとなった。これらの物質の血清中濃度変動は、いずれも、ウィルス性肝障害を始めとする他の慢性肝障害患者の血清検体においては有意な変動傾向が観察されず、薬物誘発性肝障害に特異的な傾向であった（論文投稿・特許出願中のため化合物名・データは開示しない）。これらの化合物は、薬剤誘発性肝障害の特異的なバイオマーカー候補として非常に有力であると考えられた。

### 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

LPS、薬物(VCZ、DCLF)の単独投与では肝障害が起こらなかったのに対して、両者を併用することで肝障害を誘発することが可能であることが確認された。肝機能マーカーの変動から、VCZ 投与ラットでは肝細胞障害型、DCLF 投与ラットでは混合型の肝障害が発症していることが示唆された（図 3）。



### 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

LPS による前感作から 2 時間後、すなわち薬物投与時点における肝臓中グルタチオン・レベルを測定した結果、非投与群に比較して約 70%程度までの有意な低下が認められた (図 4)。LPS 感作後 14 時間の時点では、肝臓内グルタチオン・レベルはコントロール・レベルまで回復していることも確認された。

### 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、GSH 及び NAC の事前投与により肝臓中グルタチオン濃度をコントロールまで回復させた場合には、ALT 値・ビリルビン値上昇の有意な抑制が認められた (図 5)。

一方で、DEM 処理により一過性に肝臓中グルタチオンを低下させた場合には、薬物との併用により、LPS 併用モデルと比較して程度は低いものの、肝障害の誘発が認められた。この際に、VCZ・DCLF とともに LPS との併用モデルと同様の肝障害パターンが観察された (図 6)。

### 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

また、LPS により発現が誘導されることが知られているサイトカインの一種が、DILI 患者の血清検体中で上昇傾向にあることが観察された。LPS

併用ラット DILI モデルにおいても、このサイトカインに対する産生阻害剤、および受容体に対する中和抗体投与により肝障害は有意に抑制され、GSH 併用により、その抑制効果は更に顕著に観察された (図 7)。なお、GSH 併用による、このサイトカインの血清中濃度に有意な差は観察されなかった。

### 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

次に、複数の薬剤誘発性肝障害患者血清検体に関して、各マーカー値の経時的変化を解析した結果、炎症性サイトカイン濃度は、ALT 値や AST 値、ALP 値などの肝機能マーカー値と同期、あるいはやや先行して上昇する傾向が見られた。現在、より多数の血清検体を対象に同様の解析を進めている段階である (論文投稿準備中のため、サイトカイン名およびデータは開示しない)。

## 平成 22 年度

### 1. ヒト薬物性肝障害検体の分析

本研究におけるこれまでの検討からは、ヒトの薬物性肝障害においては、 $\gamma$ -Glu-X ジペプチドの血清中濃度の上昇が観察されることが見出されている。動物モデルにおける検討からは、肝臓内のグルタチオン低下に伴って、オフタルミン酸などの  $\gamma$ -Glu-X-Y トリペプチドの肝臓内濃度と血清中濃度

に上昇が観察されることが明らかとなっているが、ヒトにおいてはその前駆体である $\gamma$ -Glu-Xジペプチドの方がより適切な、薬物性肝障害マーカーとなることが考えられた。なお、これらのペプチド類の生合成経路はグルタチオンの生合成経路と同一であり、肝細胞中グルタチオン濃度によりフィードバック制御を受けていることは、動物モデルの解析から明らかとなっている。

本年度は、薬物性肝障害を発症した患者に関し、症例のリクルート継続と検体の集積を進め、最終的には約700におよぶ検体の集積が完了した。それらの検体を、古典的な肝障害指標である血清中ALT値あるいはALP値の上昇を指標として、肝障害の発症以前の検体、検査値のピークを含んで肝障害発症中の検体、検査値が低下傾向に移った後の肝障害発症後の検体の3種類に分類を行い、解析を行った。(図8)

その結果、薬物性肝障害を発症した患者においては、 $\gamma$ -Glu-Xジペプチドの血清中レベルは、コントロール群の値と比較して、いずれのタイミングにおいても高値を示しており、かつ肝障害発症ピークの前後で大きく変動することは無いことが明らかとなった(図8)。これらの結果は、薬物性肝障害を発症した患者においては、薬物性肝障害の発症によって肝臓内のグルタチオンの消費が生じるのではなく、

発症前の段階から何らかの理由で肝臓内のグルタチオン・レベルの低下が生じており、そのことが薬物性肝障害患者に共通する素因となっていることを示唆している。

また、同時に前年度までの検討から薬物性肝障害に伴って特異的に変動する可能性の考えられたセロトニン代謝物に着目した測定も行ったが、これらの代謝物に関しては個人差が非常に大きく有用なバイオマーカーにはなり得ないことが明らかとなったため、以降のこの点に関しては検討を行わないこととした。

さらに、上述の肝障害検体に関して、血清中の炎症性サイトカインのレベルについても検討を行った。その結果、 $\gamma$ -Glu-Xジペプチドのケースと同様に、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6のいずれのサイトカインに関しても、肝障害発症前の段階から、コントロール群と比較して高値を示しており、薬物性肝障害の発症経過に伴って大きな変動を伴わないことが明らかとなった。これらの結果は、薬物性肝障害を発症した患者においては、薬物性肝障害の発症によって肝臓が炎症を起こして炎症性サイトカインの血清中レベルが上昇するのではなく、発症前の段階から別の病態的要因によって血清中の炎症性サイトカインのレベル上昇が生じており、このことが薬物性肝障害患者に共通する素因となっていること

を示唆している。

これまでの研究においては、薬物性肝障害は特異体質性に発現し、予測は困難であると考えられてきたが、本研究のこれまでの結果を総合すると、薬物性肝障害を発症する患者には発症前の段階から肝臓内グルタチオンの低下と血清中の炎症性サイトカインの上昇という共通する素因を有していることが考えられ、これらのバイオマーカーを事前に測定してから薬物の投与を行うことによって、薬物性肝障害の発症を予測することができる可能性が示唆される。実際、本研究においてリクルートした患者のうち、肝障害発症ピークの10日以上前の検体が得られている42症例に関して、これらのバイオマーカーの測定値をスコア化した(図9)。その結果、薬物性肝障害の重症度とスコアの間に一定の関連性が見出された。すなわち、本検討で見出されたこれらのバイオマーカーは発症予測バイオマーカーの可能性が考えられる。また、薬物性肝障害の発症リスクの高い状態の患者にはリスクのある薬剤の投与を避けることで、肝障害の発症を未然に抑制できる可能性が見出された。今後は特にこの点にフォーカスした検討を進める予定である。

## 2. 消化管障害モデル動物の解析

NSAIDs 単回経口投与による、ラッ

ト消化管障害モデルを用いて、胃および血漿中のメタボローム解析を実施した。その結果、薬物の種類に依らず消化管障害の進展及びその回復に伴って変動するバイオマーカー候補物質が複数見出された。(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

ラット *in vivo* の検討からは、肝臓内のグルタチオンを枯渇させる処理を行った条件下では、肝臓内におけるジクロフェナクのアダクト形成量が上昇する傾向にある事が判明した。特にマイクロソーム画分に共有結合した放射性ジクロフェナクの量は、グルタチオン枯渇処理に伴って有意に増大した(図10)。

また、ラット初代培養肝細胞を用いた *in vitro* の実験系においては、4種類のサイトカインである TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 の混合物に暴露された条件においては、肝細胞のジクロフェナクに対する毒性感受性は EC50 値で 10 倍以上と著しく増大することが明らかとなった(図11)。

さらに、グルタチオン枯渇処理条件下においては、グルタチオン枯渇処理単独では、ジクロフェナクに対する毒性感受性にほとんど影響を及ぼさない一方で、炎症性サイトカインに対する暴露と同時に行った際には、炎症性

サイトカインのみへの暴露条件と比較してもさらにジクロフェナクに対する毒性感受性が増大する傾向が観察され、コントロール条件と比較した場合には、EC50 値で 100 倍以上の著しい毒性感受性の増大が生じることが明らかとなった (図 11)。

さらに、この条件においてアポトーシスの指標となるミトコンドリアからの cytochrome c の放出を、イムノブロット法にて確認したところ、グルタチオン枯渇処理およびサイトカインへの暴露を同時に行ったサンプルにおいては、ジクロフェナクの濃度に依存的に cytochrome c の放出が著しく増大することが確認され、アポトーシスがエンハンスされていると考えられた (図 11)。

## 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

本研究におけるこれまでの検討からは、種々の肝障害に罹患した患者の血清においては、 $\gamma$ -Glu-X ペプチド類の濃度上昇が観察されることが見出されている。しかしながら、このバイオマーカーが治療による病態の改善を反映するか否かは不明である。

本年度は C 型慢性肝炎患者を対象として、インターフェロン療法を行いウイルスが消失した患者のインターフェロン療法前 (SVR-pre) と後

(SVR-post) で血清中の代謝物質の濃度の変動を網羅的に測定した。その結果、図に示したようにほとんどの症例においてインターフェロン療法の施行によって  $\gamma$ -Glu-X ペプチド類の血清中レベルは低下していることが明らかとなった。一方他の代謝物質に変化は見られなかった。以上の結果から、 $\gamma$ -Glu-X ペプチドは治療効果も反映するバイオマーカーとして利用可能であると考えられた。

### 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

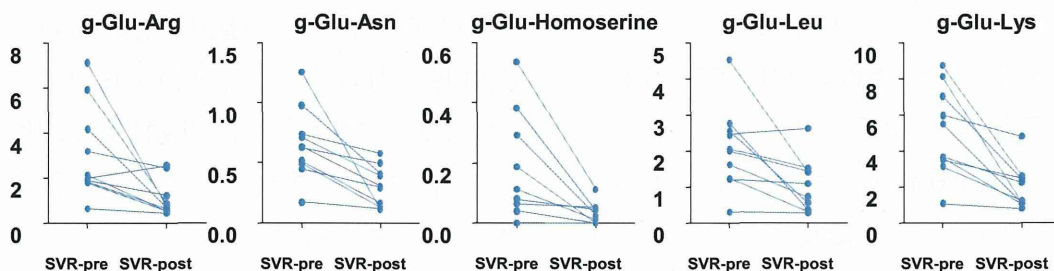
昨年度までの検討から、薬物性肝障害の発症に関わる背景因子として、酸化ストレスに加えて炎症も重要であることが判明している。本研究で見出された  $\gamma$ -Glu-X ペプチド類は酸化ストレスを反映するバイオマーカーとして利用可能であるため、ここに炎症を反映する臨床検査値の情報を入れることで、薬物性肝障害を発症するリスクの高い患者群を精密に予測することが出来るのではないかと考えて検討を進めている。

現在まで約 2,000 名の入院患者に関してカルテの精査を行い、各種臨床検査値の推移を基に多重ロジスティック回帰手法を用いて統計解析を行った。その結果、現在広く用いられている臨床検査値の中で最も良く薬物性肝障害の発症を予測したのは、炎症を

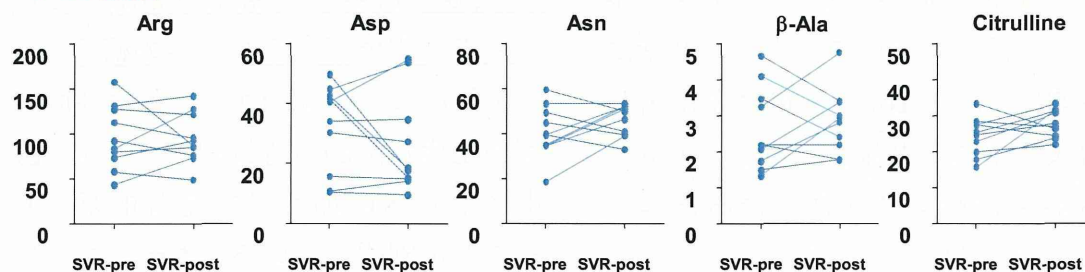
反映する臨床検査値である CRP であった。この結果は、薬物性肝障害の発症において、昨年度までの研究結果を支持するものであった。今後、 $\gamma$ -Glu-X

ペプチド類の測定結果を併せて用いることで、薬物性肝障害の発症を予測する精度がどの程度向上できるかを検討していく必要がある。

### $\gamma$ -Glu-Xペプチド類



### アミノ酸類



### 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

本研究のこれまでの解析結果から、薬物性肝障害の発症過程においては、肝臓に対する酸化ストレスの負荷が重要な役割を果たしていると考えられる。実際本研究より見出された  $\gamma$ -Glu-X ペプチド類は酸化ストレスを反映するバイオマーカーであり、薬物性も含む種々の肝障害において高値を示すことが明らかとなっている。また少なくとも薬物性肝障害に関して

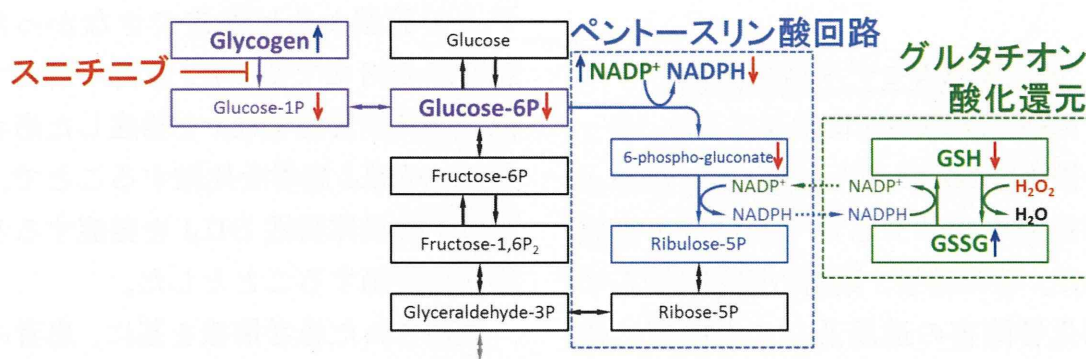
は、肝臓における酸化ストレスは肝障害の結果生じるものではなく、肝障害を発症した患者においては発症以前の段階から酸化ストレスが生じていることが明らかとなっている。一方で、なぜこれらの患者において事前に酸化ストレスが発生しているのかという点は明らかになっていない。特に、投与されている薬物の影響によって肝障害の原因となりうる酸化ストレスが発生するのか、あるいは他の疾患要因が寄与しているのかを明らかにする必要があり、本検討では薬物の作

用によって酸化ストレスが発生するメカニズムを探索した。

過去の研究より、アセトアミノフェンは肝臓において CYP2E1 によって代謝を受け、反応性代謝物を生成し、肝細胞内のグルタチオンと結合することで消費し、結果として肝臓に強い酸化ストレスをかけることが知られている。肝臓内で酸化代謝を受けることで反応性代謝物を生成する例は複数知られており、グルタチオンの消費による酸化ストレスの発生は1つのメカニズムとして想定される。

一方、東大病院における過去の研究から、腎細胞癌や GIST の治療に用いられるチロシンキナーゼ阻害薬であるスニチニブは、VEGFR や PDGFR といった治療標的以外にも種々のキナーゼを阻害することが明らかとなっている。特にスニチニブに特徴的な

オフターゲット阻害として、グリコーゲンの分解を制御するホスホリラーゼ・キナーゼが挙げられる。一方で過去の検討から、スニチニブによる副作用の多くはビタミン E の併用によって軽減できることが動物実験の結果から示唆されており、酸化ストレスが副作用発症に関与している可能性も示唆されていた。そこでスニチニブを混餌投与したマウスモデルを用い、血清中オファルミン酸の濃度を検討したところ、スニチニブの投与に伴って著しい上昇が観察されることが明らかとなった。またこの際、肝臓中の還元型グルタチオン・レベルは顕著に低下し、酸化型グルタチオンのレベルが上昇していることも確認された。



グリコーゲンは肝臓においてグルコース-6-リン酸を供給する主要な供給源の1つであり、ホスホリラーゼ・キナーゼの阻害は、グルコース-6-リン

酸の供給低下に繋がると考えられる。細胞内の物質代謝経路において、グルコース-6-リン酸は解糖系の出発点に位置すると共に、ペントース・リン酸



回路の出発点にも位置している。このためグルコース-6-リン酸の供給低下はペントース・リン酸回路の回転が低下することに繋がると考えられる。ペントース・リン酸回路は NADP<sup>+</sup>から NADPH への還元反応と共役していることが知られており、さらに NADPH は酸化型グルタチオンの還元反応に必須である。従って、これら一連の細胞内代謝回路の正常な回転が阻害されることで、グルタチオンの還元が正常に生じることが出来ず、酸化ストレスの発生に至っていると推定された。現在、スニチニブを服用している患者を対象とした臨床研究をスタートしており、患者においても実際に酸化ストレスが発生しているのか、本研究から見出されたバイオマーカーである  $\gamma$ -Glu-X ジペプチドの血清中レベルの顕著な変動が見出されるのか、を検討中である。

#### 4. 消化管障害モデル動物の解析

NSAIDs 単回経口投与による、ラット消化管障害モデルを用いて、胃および血漿中のメタボローム解析を実施した。その結果、薬物の種類に依らず消化管障害の進展及びその回復に伴って変動するバイオマーカー候補物質が複数見出された。

特にヒドロキシプロリンおよび 3-ヒドロキシ酪酸に関しては、胃組織内の濃度と血清中濃度の間に良好な相

関関係が見出された。また、消化管障害の発症に伴って低下する傾向が観察された。

#### 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

###### ○DILI 発症頻度の性差

各種臨床検査値から DILI の発症リスクを評価するモデルを構築するために、2010 年 11 月～2011 年 12 月までの 13 か月間の入院患者の情報をモデル構築に用いることとした。まずカルテ上の記載をもとに DILI 発症の有無を調査した結果、DILI を発症しなかった (non-DILI) 患者 6,244 名に対し、抗がん剤などによる中毒性 DILI と考えられる患者が 55 名、特異体質性 DILI を発症したと考えられる患者が 218 名であった。また、肝機能検査値の異常が認められたが、原因がカルテ上の記載からは特定できなかった患者が 398 名であった。以降の解析では、特異体質性 DILI を発症した患者と non-DILI 患者を比較することで、患者が特異体質性 DILI を発症するリスクを評価することとした。

集積された患者情報を基に、患者の年齢および性別が DILI 発症に関連するか否かを解析した結果、年齢に関しては DILI 発症との間に有意な相関性は認められなかった ( $p=0.19$ )。一方性別に関しては、男性の方が女性よりも DILI を発症しやすい傾向が認めら

れ、そのオッズ比は 1.76 であった ( $p<0.001$ )。DILI の発症率における性差は過去にも複数報告されているが、統一的な見解は得られていない。今後、他施設・地域での検証を行う必

要があると思われる。また、同定された起因薬は多岐に渡るが、過去に多く報告されているように、感染症等に使用される抗菌薬が多数認められた。

	DILI	non-DILI	( <i>p</i> -value)
<age>			
Age (year)	61±18	60±21	0.19
<gender>			
Total (n)	218	6244	<0.001
Male	142	3218	
Female	76	3026	

モデル構築セットとして採用した患者の特徴

モデル構築セットとして採用した 218 名の特異体質性 DILI 患者および 6,244 名の non-DILI 患者に関して、年齢および性別の傾向をまとめた。

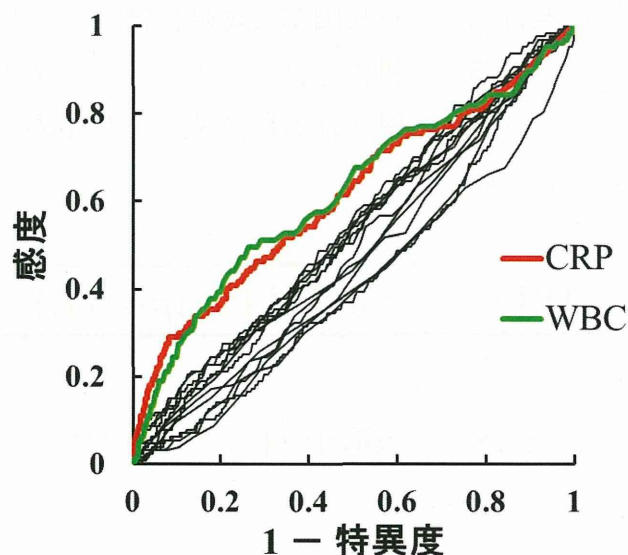
○ROC 解析

DILI 発症に関連しうる患者側の要因を反映する臨床検査値が得られれば、患者が薬物の服用を開始する時点で、その患者の DILI 発症リスクを評価することができ、臨床上有用な指標となりうる。そこで臨床での実用性を考慮し、実臨床において高頻度に測定されていた 15 種類の臨床検査値を選択し、調査・解析を行った。DILI 患者に関し、DILI 発症の起因となった

薬剤の服用を開始した時点における各種臨床検査値を収集し、non-DILI 患者の臨床検査値（全入院期間内の全測定点）と比較することで、両患者群の分離が可能であるか否かを、ROC 曲線を用いて解析した。その結果、CRP および WBC の 2 種類の臨床検査値に関しては AUC 値が 0.6 を超え、DILI 発症と正の相関性が認められることが明らかとなった。



各臨床検査値のROC曲線



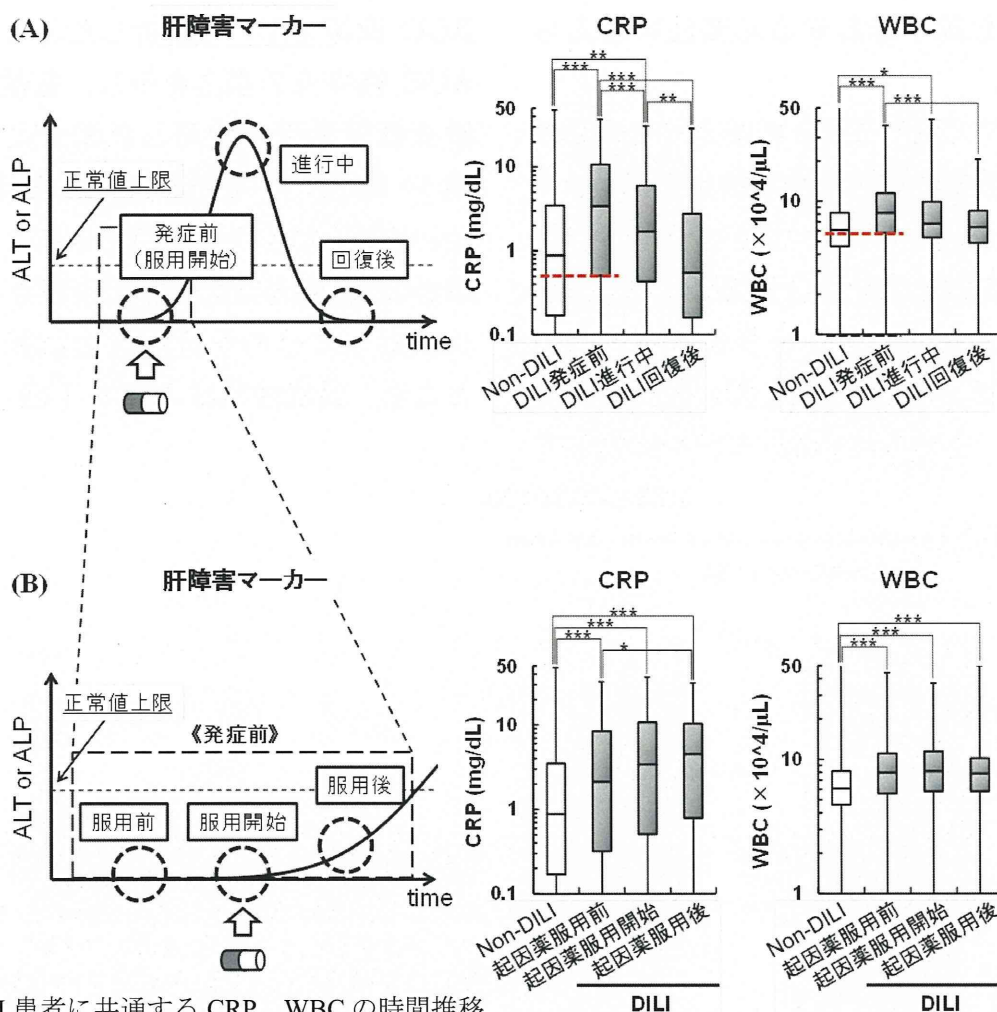
	AUC
Alb	(0.415)
BUN	(0.536)
Cl	(0.490)
Cre	(0.479)
CRP	(0.611)
Hb	(0.536)
Hct	(0.524)
K	(0.454)
LDH	(0.540)
Na	(0.447)
PCT	(0.466)
PDW	(0.529)
PLT	(0.424)
RBC	(0.533)
WBC	(0.616)

各臨床検査値における DILI 発症リスク予測精度の評価

予検討において頻回に測定することが確認された 15 種類の臨床検査値に関して、DILI 発症患者を non-DILI 患者からどの程度分離するか ROC 曲線により評価した。右表には、そのときの各検査値の AUC 値を示している。このとき、AUC 値が 0.6 を超えた検査値については灰色地で表示した。

そこで次に、これら 2 種類の臨床検査値に関して、DILI 発症患者における検査値変動の時間推移を詳細に検証することとした。起因薬の服用開始時点、および肝障害マーカー値がピークとなった時点、さらに、休薬に伴って DILI から回復したと考えられる時点の 3 点における測定値を抽出した。前述の ROC 曲線を用いた解析からも示唆されているように、DILI 患者においては、CRP、WBC とともに、起因薬の服用開始時点で既に non-DILI 患者と比較して高値を示していることが確認された。また、肝障害の進展に伴って大きく上昇することはなく、むしろ

若干低下していく傾向が観察された。次いで、このような検査値の高値傾向が起因薬の服用による影響であるか否かを検証するため、起因薬の服用開始前後における検査値の経時的な変化を解析した。するといずれの臨床検査値に関しても、起因薬の服用を開始する以前の段階から、non-DILI 患者と比較して有意に高値を示していることが明らかとなり、これら臨床検査値の高値は、起因薬の服用に伴うものではなく、DILI 発症患者が有する原疾患などの影響を反映するものと考えられた。



#### DILI 患者に共通する CRP、WBC の時間推移

(A) 起因薬の服用開始時点、肝障害マーカー値がピークをとる時点、DILI からの回復以降の 3 点における CRP、WBC 値を抽出し、DILI 発症前から回復後までの経時的な変化を追った。また、赤色の点線は、起因薬の服用開始時点での CRP、WBC 値における、偽陰性率が 25% となるような閾値を表している。

(B) 起因薬の服用前後における CRP、WBC 値の経時的な変化を追った。

(\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$ )

#### ○DILI 発症リスク予測モデル

一般的に、バイオマーカーを用いたリスク評価手法に関して、その予測性・有効性は ROC 曲線解析における AUC 値が 0.7 未満の場合には十分とは言えないと考えられている。起因薬の服用開始時点での CRP、WBC 値をそれぞれ単独で評価指標として用いた場合の予測精度を検証するため、偽

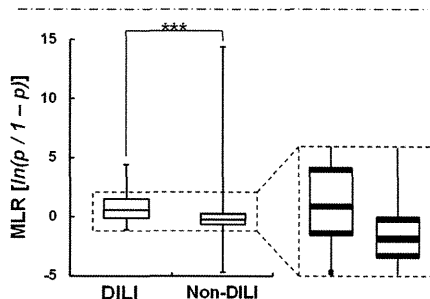
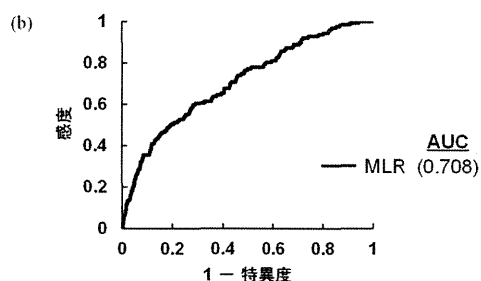
陰性率が 25% になるように各検査値の閾値を設定して解析を行った。すると、CRP、WBC いずれの臨床検査値に関しても、50% 以上の non-DILI 患者を DILI 患者と判別することができなかった。患者の母数も併せて考慮すると、CRP あるいは WBC 値を単独で指標として用いるだけでは DILI 患者を分離するのに十分とは言えず、他の

因子を組み合わせる必要性が考えられた。

そこで CRP、WBC に加えてその他の臨床検査値を組み合わせた DILI リスクの予測モデルを構築し予測精度の向上を図るため、検査値間の相関性が高く従属的にふるまう検査値を除いた上で、MLR 手法を用いた解析を行った。得られた MLR モデルに関して

( $p$ : DILI を発症する確率)

$$(a) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -0.31 \times \text{Alb} + 0.53 \times \text{CRP} + 0.44 \times \text{Hb} - 0.13 \times \text{PDW} - 0.45 \times \text{PLT} + 0.35 \times \text{WBC}$$



また、上述したように、DILI 発症率に関して男女間での有意な差が認められたため、性別ごとに層別化した上で、上述と同様の手法での解析も試みた。得られた MLR モデルに関して ROC 曲線を用いて解析したところ、男女ともに AUC 値は 0.7 以上を示した (male: 0.734, female: 0.731)。またこのとき、性別に依らず MLR モデ

ROC 曲線を用いて解析したところ、AUC 値は 0.7 以上を示し、各種臨床検査値を単独で使用した場合よりも高い精度で DILI 発症患者を non-DILI 患者から分離できることが示された。前述同様、偽陰性率を 25% に設定してその予測精度を検証したところ、偽陽性率は 50% を下回った。

複数の要因に基づいた患者個々のリスク評価モデル構築セットとして採用した患者データに対して、DILI 発症リスクを予測する MLR モデルを構築し(a)、これを用いた際の DILI 発症の予測精度を、ROC 曲線を用いて解析した(b)。 (\*\*\*:  $p < 0.001$ )

ルに組み込まれる因子としては、CRP、WBC 値の上昇に加え、PLT 値の低下が挙げられた。さらに、DILI 発症率の高い男性群において、RBC 値の上昇が最も係数の大きな因子として組み込まれることも明らかとなった。各検査値に関して、その値の分布(分散)が異なるため、単純にその項の係数の大小を比較することで DILI 発症に与

える影響を評価することは出来ないが、これらの指標の変動が示す何らかの患者背景が、DILI のリスク因子となっている可能性が示唆された。

さらに、患者全体の情報を基に構築した MLR モデルの妥当性を検証するため、モデル構築セットとは異なる期間（2012年4月～2012年7月）に入院された患者を対象としてバリデーションを行った。モデル構築セットと同様に、DILI 発症の有無を調査した結果、DILI を発症しなかった（non-DILI）患者 2,111 名に対し、抗がん剤などによる中毒性 DILI と考えられる患者が 14 名、特異体質性 DILI を発症したと考えられる患者が 70 名であった。また、肝機能検査値の異常が認められたが、原因がカルテ上の記載からは特定できなかった患者が 103 名であった。そこでこの期間を対象として、構築した MLR モデルが DILI 発症患者と non-DILI 患者を分離可能であるか、ROC 曲線解析により検証した。その結果、モデル構築セットと同程度の AUC 値を示すことが明らかとなり（0.709）、構築した MLR モデルが妥当であることが示唆された。

## 2. 薬物性肝障害の劇症化頻度に関する調査

劇症肝炎の発症頻度は極めて低いいため、劇症化に至った患者の検体を集積して解析を行うことは非常に困難

であり、劇症化機構には未解明な点が多く存在する。一般に免疫系の過剰な活性化によって DILI の症状が極度に増悪した結果だと漠然と考えられてきたが、これまでこの点を実証した例はない。本研究では、DILI 発症リスクの評価モデルの構築を試みると共に、DILI と劇症肝炎の包含関係について、統計的な面からの検証も行った。

「DILI は起因薬に依らず一定の頻度で劇症化する」という仮説のもと、日米欧3地域の医薬品規制当局である医薬品医療機器総合機構（Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; PMDA）、アメリカ食品医薬品局（Food and Drug Administration; FDA）、欧州医薬品庁（European Medicines Agency; EMA）が公開する副作用データベースから、起因薬ごとに DILI および劇症肝炎報告数を抽出した。全 DILI 報告数に占める劇症肝炎報告数を劇症化頻度と定義し、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採用した。このとき、薬物ごとに算出した劇症化頻度を全体の平均値で規格化した値の 99% CI が 1 を含むか否かで、その薬物が仮説に従う薬物であるかを検証することとした。PMDA に肝障害症例が報告された 374 薬物のうち 372 薬物（99.5%）、FDA に関しては 351 薬物のうち 337