

薬物 (96.0%)、さらには EMA に関しては 258 薬物のうち 250 薬物 (96.9%) が、劇症化頻度の 99% CI が 1 を含むことが明らかとなった。そのため、ほとんどの薬物に関して、DILI は起因薬に依らず一定の頻度で劇症化すると考えて大きな矛盾は生じないことが示唆された。十分な根拠が乏しい状態で想定されていた DILI と劇症肝炎の関係性について、統計的に傍証したに過ぎないが、この結果は DILI 発症頻度が高い薬物ほど劇症化症例の出現リスクも高いことを示唆している。そのため、ほとんどの薬物に関しては、本研究で構築した評価モデルによって DILI 発症リスクを事前に予測し、DILI 発症前の段階で、代替薬への切り替えや頻繁な肝機能検査の実施などの適切なリスク管理を行うことが出来れば、結果として劇症化を防ぐことに繋がるものと期待される。

3. 消化管障害バイオマーカーの検討

実験—1

○胃潰瘍面積

表 2 に結果を記載した。

投与後、いずれの群においても死亡はみられなかった。アスピリンの 3 mg/kg 群では、投与後いずれの剖検時にも消化管障害を示す所見は認められなかった。アスピリンの 300 mg/kg 群では、投与後約 5 及び 8 時間で全例に腺胃粘膜の赤色巣が認められ、投与

後約 24 時間では 1 例 (No. 60) で腺胃粘膜の赤色巣が認められた。胃潰瘍 (粘膜の赤色巣) の面積が最大であったのは投与後約 5 時間であった。

イブプロフェンの 8 mg/kg 群では、投与後いずれの剖検時にも消化管障害を示す所見は認められなかった。イブプロフェンの 800 mg/kg 群では、投与後約 2 時間に 1 例 (No. 86) で腺胃粘膜の赤色巣が認められ、投与後約 5、8 及び 24 時間でも全例で腺胃粘膜の赤色巣が認められた。胃潰瘍 (粘膜の赤色巣) の面積の合計が最大であったのは投与後約 5 時間であった。

○胃抽出物中のメタボローム解析

CE-MS での測定により 580 の低分子代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

PCA の結果、各サンプルの PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示したものを図 12 に示す。投与後 1 時間及び 5 時間の臓器内代謝物濃度は Control と胃潰瘍が確認されたアスピリンの 300 mg/kg 群及びイブプロフェンの 800 mg/kg 群とでは大きな違いがある事が分かった。一方胃潰瘍が確認されなかったアスピリンの 3 mg/kg 群及びイブプロフェンの 8 mg/kg 群は Control と大きな差は確認

されなかった。

OPLS を実施し、その結果抽出された低分子代謝物の群の平均及び有意差検定の結果を表 3 に示す。citrate、cis-aconitate、succinate、O-acetylcarnitine、3-hydroxybutanoic acid、proline、hydroxyproline の有意な減少が臓器中で確認された。抽出した代謝物のピークは図 13 の様に確認された。これらの低分子代謝物を代謝マップ上で示したものを図 14 に示す。その結果、変化した代謝物は TCA サイクル、脂肪の β 酸化に関与している代謝物がほとんどであることが示された。一方で TCA サイクルの上流に存在する糖代謝には影響が出ていない事が分かった。

○血清のメタボローム解析

CE-MS での測定により 580 の低分子代謝物の血中濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

PCA の結果、各サンプルの PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示したものを図 15 に示す。投与後 1 時間及び 5 時間の臓器内代謝物濃度は Control と胃潰瘍が確認されたアスピリンの 300 mg/kg 群及びイブプロフェンの 800 mg/kg 群とでは大きな違

いがある事が分かった。一方胃潰瘍が確認されなかったアスピリンの 3 mg/kg 群及びイブプロフェンの 8 mg/kg 群は Control と大きな差は確認されなかった。

胃のメタボローム解析の結果抽出された低分子代謝物の群の平均、有意差検定及び臓器内濃度との相関性の検定の結果を表 4 に示す。cis-aconitate、succinate、O-acetylcarnitine、3-hydroxybutanoic acid、proline、hydroxyproline の有意な減少が血中においても確認された。しかしながら citrate の減少は血中においては有意性を示さなかった。また、血中で有意な減少が確認された代謝物群のうち succinate 以外は臓器内濃度と有意な相関を示していた。

実験 - 2

○胃潰瘍の診断

表 5 に結果を記載した。

投与後、いずれの群においても死亡はみられなかった。

アスピリンの 100 mg/kg 群のみを投与した群では全例に腺胃粘膜の赤色巣が認められた。アスピリンによるこの変化はファモチジン及びオメプラゾールを先に投与する事により抑制された。

○胃抽出物中のメタボローム解析

CE-MS での測定により 577 の低分子

代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

PCAの結果、各サンプルのPC1及びPC2のスコアを2次元プロットで示したものを図16に示す。2次元プロット上はControl群とアスピリンを投与した各群の間に明確な違いがみられたが、ファモチジン及びオメプラゾールを投与したことによる違いは2次元プロット上で確認する事は出来なかった。

実験-1でバイオマーカー候補として挙げられた6代謝物の変化を図17に示す。アスピリンのみを投与した群では citrate、cis-aconitate、O-acetylcarnitine、3-hydroxybutanoic acid、hydroxyproline の有意な減少確認された。一方で proline の減少は確認されなかった。アスピリンのみの投与で確認された変化のうち citrate、cis-aconitate、の有意な減少はファモチジンを共投与する事で、hydroxyproline の有意な減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与する事でControl群と同等レベルまで回復した。

○血清のメタボローム解析

CE-MSでの測定により515の低分子

代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

PCAの結果、各サンプルのPC1及びPC2のスコアを2次元プロットで示したものを図18に示す。2次元プロット上はControl群とアスピリンを投与した各群の間に明確な違いがみられたが、ファモチジン及びオメプラゾールを投与したことによる違いは2次元プロット上で確認する事は出来なかった。

実験-1でバイオマーカー候補として挙げられた6代謝物の変化を図19に示す。アスピリンのみを投与した群では 3-hydroxybutanoic acid、hydroxyproline の有意な減少が確認された。一方で citrate、cis-aconitate、O-acetylcarnitine、proline の減少は確認されなかった。アスピリンのみの投与で確認された変化のうち 3-hydroxybutanoic acid の有意な減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与しても変化は見られなかったが、hydroxyproline の有意な減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与する事でControl群と同等レベルまで回復した。

実験-3

○胃潰瘍の診断

表 6 に結果を記載した。

投与後、いずれの群においても死亡はみられなかった。

Control 群を除く全ての群で全例に腺胃粘膜の赤色巣が認められた。

○胃抽出物中のメタボローム解析

CE-MS での測定により 576 の低分子代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

PCA の結果、各サンプルの PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示したものを図 20 に示す。アスピリン及びエタノールで胃潰瘍を誘発したモデルは Control 群と明確な差を示したが、ストレスにより胃潰瘍を誘発した動物は Control 群とほぼ同じような位置にプロットされた。

実験-1 でバイオマーカー候補として挙げられた 6 代謝物の変化を図 21 に示す。citrate、cis-aconitate、及び O-acetylcarnitine の減少はアスピリンモデル以外では検出されなかった。3-hydroxybutanoic acid の減少もアスピリンモデルのみで検出され、ストレスモデルでは変化せず、エタノールモデルでは増加した。一方で hydroxyproline の減少については今回検討した全てのモデルで確認された。

○血清のメタボローム解析

CE-MS での測定により 577 の低分子代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

臓器内において 2 モデル以上で変化がみられた 3-hydroxybutanoic acid、hydroxyproline についてモデルごとの血中濃度の変化を図 22 に示す。血中においても 3-hydroxybutanoic acid 及び hydroxyproline は臓器内と同様の傾向を示した。

4. 新規肝障害マーカーの検討

○LPS ラットにおける薬剤投与による病理所見

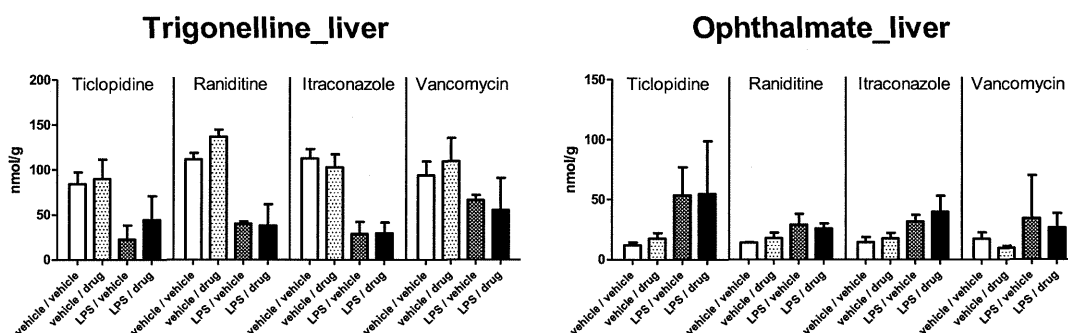
各薬剤はそれぞれ単独で投与しても、肝臓になんら変化はもたらさなかった。類洞内好中球増加及び肝細胞のグリコーゲン減少が LPS 単独及び LPS 薬剤併用群の全例で認められた。急性肝細胞壊死が LPS 単独投与群及び LPS 薬剤併用群で散発的に認められたが、LPS 薬剤併用群で若干その発現頻度が高いと考えられた。

○各薬剤における LPS ラットでの反応
それぞれの薬剤において、LPS 単独投与ラットと LPS 薬剤併用ラットの間で発現量に変動がある代謝物及び遺伝子を同定し、それらを用いたパスウェイ解析を実施した。チクロピジンは

グルタチオン枯渇関連、ラニチジンは IL-17 関連、イトラコナゾールはコレステロール生合成関連の反応が示唆され、バンコマイシンは特異的な反応が認められなかった。すなわち、この実験系において各薬剤は肝臓で異なる反応を惹起しており、肝障害として共通の反応を見出すことはできなかった。

○LPS 投与ラットにおける薬剤投与で肝細胞壊死が認められた動物における共通変動遺伝子の探索

LPS 単独投与及び LPS 薬剤併用投与の動物の中で、壊死を発現した動物で変動する物質を探索した。その結果、壊死が見られた動物において肝臓、血漿、尿サンプル全て共通した変化として trigonelline の減少と 3-hydroxybutyrate の増加が認められた。さらに、trigonelline に着目し、その量と相関のある物質を探索したところ、trigonelline 量と逆相関する物質として ophthalmate が見出された。



肝臓中 trigonelline 及び ophthalmate 量の比較

ophthalmate は肝臓の酸化ストレスとの関連が報告されている物質であり (Soga et al., 2006)、この物質と逆相関した変動をする trigonelline は ophthalmate 同様に肝臓酸化ストレスにおいて何らかの意義がある物質であることが示唆された。

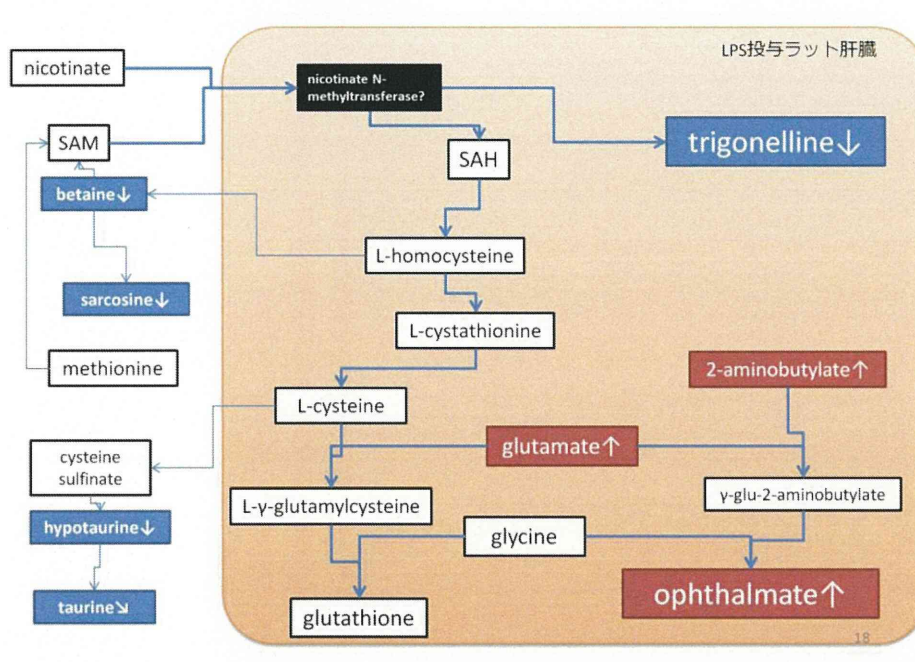
trigonelline は生体内でニコチン酸にメチル基が結合して産生される N-methylnicotinate と同一物質である。この反応において、trigonelline

にメチル基供与体となるのが S-adenosylmethionine (SAM) である。nicotinate と SAM の反応によって、N-methylnicotinate (trigonelline) と S-adenosylhomocysteine (SAH) が産生する。その産生は trigonelline 産生と同時に起こることから、trigonelline の減少は SAH の減少をも意味すると考えられた。SAM や SAH は肝臓内でグルタチオン合成の上流に位置する物質であり、グルタチ

オン産生におけるシステイン供給に寄与する。すなわち、trigonelline の減少は SAH の減少と同義であり、そしてそれに続くグルタチオンの減少及び同時に生じる ophthalmate の増加の前段階の反応であることが考えられた。アセトアミノフェン投与ラット尿のメタボローム解析でも trigonelline の減少が認められることが報告されており (Pathmasiri et al., 2011)、この仮説を支持していると考

えられた。

trigonelline は壊死が認められた動物から見出したが、壊死を伴わない LPS ラットでも減少が認められたことから、壊死というよりは LPS 投与と相関があると考えられた。LPS は肝臓中のグルタチオンを減少させることが知られていることから、trigonelline の減少が LPS ラットで見られたことは前述の考察と矛盾しない。



今回の検討においては SAH、SAM、glutathione の量の変化は捉える事が出来なかった。また、SAH からグルタチオンに至るまでにはいくつかの反応を経るが、その反応に関与する酵素遺伝子 (adenosylhomocysteinase、cystathionine beta-lyase、gamma-glutamylcysteine synthetase、glutathione

synthetase) の発現量は壊死発現サンプルにおいていずれも減少していた。ophthalmate の増加には glutathione synthetase が関与することから、相反するような状況はサンプリングのタイミングのずれによるものと考えられた。

前述の通り、肝臓中の trigonelline 量は血漿及び尿中濃度と相関した。この

ことは、trigonelline が非侵襲的に肝臓の状態をモニターできるサロゲートマーカーになる可能性を秘めていると考えられる。しかし、trigonelline のバイオマーカーとしての有用性を確認するには、経時的なサンプリングによってグルタチオン量等の変化と比較する必要があると考えられる。今後の研究の展開が望まれる。

D. 考察

平成 20 年度

薬物性肝障害は障害される部位の違いに基づいて、肝実質細胞が主に障害される「肝細胞障害型」と、胆管周辺細胞の障害により肝細胞障害は軽度にも関わらず胆汁分泌が主として傷害される「胆汁うっ滞型」、肝細胞障害と胆汁分泌が共に傷害される「混合型」とに分類される。この分類は急性ウイルス性肝炎やアルコール性肝障害、閉塞性黄疸など他の肝障害との鑑別診断に必要であり、画像検査が望ましいが、簡易的には AST 値, ALT 値, ALP 値, γ -GTP 値, ビリルビン値といった肝機能マーカーの血清中濃度を測定することで障害箇所を推定を行う。AST と ALT は、肝細胞の壊死とともに溶出し血液中濃度が上昇するため、肝細胞障害の進行を反映するマーカーとして扱われる。一方、ALP は胆管系組織の障害を反映するマーカーとして扱われる。血清中に存在する ALP のほとんどは肝臓もしくは骨芽細胞由来であり、胆汁うっ滞を生じると胆汁中 ALP の血流への逆流が生じて血清中 ALP 値が上昇する。このため、血清中の AST 値や ALT 値の上昇が軽度にも関わらず、ALP 値が顕著に上昇している症例では、胆汁うっ滞型の肝障害が疑われる。また、ビリルビンは赤血球などに存在するヘムの分解物で、血清アルブミンに結

合した状態で肝臓に運ばれ、グルクロン酸抱合を受けて水溶性の直接ビリルビンに変換されて胆汁排泄され、さらに一部は腸管循環を受けている。なお、肝臓で抱合をうける前のアルブミン結合型ビリルビンは間接ビリルビンと呼ばれ、直接ビリルビンと間接ビリルビンの合計値を総ビリルビン値と呼ぶ。肝細胞傷害により肝機能が低下すると、ビリルビン抱合能が低下するため、血清中間接ビリルビン値の上昇がみられることがある。一方、胆汁がうっ滞した際には、直接ビリルビンの血液中への逆流が生じ、血清中直接ビリルビン値の上昇を引き起こす。また、胆汁うっ滞下では、 γ -GTP の発現誘導と胆汁への排泄障害の結果、血清 γ -GTP 値が上昇することも知られている。ただし、 γ -GTP は、薬物やアルコールなどにより発現誘導され、値が上昇することもある。

本研究において胆汁うっ滞型肝障害モデルの作製に用いた ANIT に関しては、その肝障害誘発メカニズムについては現在も不明な点があるものの、ANIT とグルタチオン(GSH)が結合すること、ANIT 投与により GSH および ANIT の胆汁中量が上昇すること、および ANIT が好中球の活性化を誘発することなどから、肝細胞中の ANIT が GSH と結合することで胆管側に排出され、好中球などの活性化を介したアレルギー機序により、胆管

周辺の組織に障害を惹起し、胆汁うっ滞を誘発すると考えられている。一方、肝細胞障害型モデルの作製に用いた CCl₄ に関しても、ANIT 同様に肝障害誘発メカニズムについては不明な点があるが、CYP によって代謝的に生成する反応性フリーラジカル・CCl₃ による脂質の過酸化、あるいは細胞成分との共有結合が生じ、その結果、細胞膜や小胞体膜が傷害され、Ca²⁺チャネルなどの細胞膜透過性維持機構が機能不全に陥り、細胞内の異常な Ca²⁺上昇を引き起こすことで肝細胞の壊死に到ることが主な原因であると考えられている。このように、薬物による肝障害の誘発には複雑なメカニズムが関与していると考えられるが、最終的に肝障害に至る過程としては多くのケースで、親電子性をもつ薬物および代謝物による一次的な酸化ストレス、もしくはその酸化ストレスやアレルギー反応によって活性化された NFκB が TNFα や IL-1 などの炎症性サイトカイン産生を誘導し、これらのサイトカインが原因で惹起される二次的酸化ストレスが起因になると考えられる。これらの酸化ストレスによって細胞膜をはじめとする細胞器官障害の結果、細胞壊死にいたると推測される。GSH は抗酸化物質であり、代謝的に生成される親電子物質と反応することで一連の酸化ストレスに対する防御機能を有すると考

えられ、GSH が枯渇して防御機能が破綻することで細胞壊死につながり、肝障害が誘発されると考えられる。

臨床で肝障害が報告されている薬物の多くは、動物実験での再現が困難なケースが多く、特異体質性による作用機序が考えられている。例えば VCZ はトリアゾール系抗真菌薬の中でも特に幅広い抗菌スペクトルを有し、消化管吸収が良いなどの特性もあるため、臨床上高頻度で使用される一方で、重篤な肝障害を引き起こす症例が多く報告されている。しかしながら、トリアゾール系抗真菌薬においても、短期間の動物実験によって肝障害を再現することは難しく、肝障害メカニズムの研究はほとんど進んでいない。しかし近年、Roth らは、単独では肝障害誘発しない程度の低用量 LPS の腹腔内投与と、臨床で肝障害誘発の報告の多い化合物 (trovafloxacin, ranitidine など) の静脈内投与を併用することにより、モデル動物においても薬物性肝障害の再現が可能であることを報告している。臨床において肝障害発症頻度の低い薬物 (levofloxacin, famotidine など) では、低用量 LPS との併用で肝障害は誘発されないことから、臨床における薬物性肝障害を反映するモデルとして使用できる可能性が考えられている。本研究では低用量 LPS と VCZ を併用することにより、VCZ 単

回投与による肝障害誘発に成功した。低用量 LPS の併用により、p38 のリン酸化や TNF α の発現上昇が報告されている。また、LPS の単独投与では誘導されてこない IL-6 や GM-CSF の mRNA が、trovafloxacin 併用により誘導されることも報告されており、LPS の投与によって NF κ B の活性化が生じ、これに併用薬物による酸化ストレスが加わって、肝障害が進行している可能性が考えられた。このようなメカニズムは先述したとおり、薬物性肝障害に比較的共通していると考えられ、本研究で構築した VCZ 肝障害モデルは臨床における VCZ による肝障害を比較的良く反映していると考えている。また、薬物性肝障害の発症を臨床上予測することは困難であるが、その一因として肝細胞内の GSH 量や、酸化ストレスによる NF κ B の活性化度合など、肝障害に関わる各段階における応答性に、遺伝的要因もしくは環境的要因による個人差がある可能性も考えられた。なお、ヒトにおいては ALT 値と ALP 値により胆汁うっ滞型と肝細胞障害型を分類するケースが一般的であるが、ラットにおいては肝障害進行に伴う ALP 値の上昇が比較的軽微であった。ALP は胆道系の酵素であり、胆管周辺の細胞が障害されることで血清中濃度上昇を引き起こすが、骨代謝の活性に伴う血清中濃度上昇も報告されている。これ

はラットの成長が早く、骨代謝が活発なことが影響していると考えられ、正常値の高いことが原因で胆汁うっ滞による ALP 値上昇が軽微になっていると考えられた。この点を考慮し、ALP 値はラットモデルにおける肝障害マーカーとして不相当と考え、今後の検討においては、より変化が顕著なビリルビン値を指標として用いるべきと考えられた。

平成 21 年度

1. 薬剤誘発性肝障害の発症過程における、炎症性サイトカインの関与

臨床で肝障害が報告されている薬物の多くは、動物実験での再現が困難なケースが多く、特異体質性による作用機序が考えられている。例えば VCZ はトリアゾール系抗真菌薬の中でも特に幅広い抗菌スペクトルを有し、消化管吸収が良いなどの特性もあるため、臨床上高頻度で使用される一方で、重篤な肝障害を引き起こす症例が多く報告されている。しかしながら、トリアゾール系抗真菌薬においても、短期間の動物実験によって肝障害を再現することは難しく、肝障害メカニズムの研究はほとんど進んでいない。

昨年度までに、低用量 LPS と VCZ を併用することにより、VCZ 単回投与によって肝細胞障害型の肝障害誘発に成功していた。本年度はこれに加

え、DCLF 単回投与によって、胆汁うっ滞を伴う混合型の肝障害誘発モデルの作成にも成功した。Roth らは、単独では肝障害誘発しない程度の低用量 LPS の腹腔内投与と、臨床で肝障害誘発の報告の多い化合物の静脈内投与を併用することにより、モデル動物においても薬物性肝障害の再現が可能であることを既に報告している。また、臨床において肝障害発症頻度の低い薬物では、低用量 LPS との併用で肝障害は誘発されないことから、臨床における薬物性肝障害を反映するモデルとして使用できる可能性が考えられている。

低用量 LPS の併用効果に関しては、p38 のリン酸化や TNF α の発現上昇が報告されている。また、低用量 LPS の単独投与では誘導されていない IL-6 や GM-CSF の mRNA が、trovafloxacin 併用により誘導されることも報告されており、LPS の投与によって肝臓クッパー細胞などの活性化が生じ、これに併用薬物による酸化ストレスが加わって、肝障害が発症・進展するのが本モデルの特徴と考えられた。実際本研究においても、LPS 前感作動物モデルにおいて、炎症性サイトカインの産生阻害剤、あるいは中和抗体によって処理した場合に、薬剤誘発性肝障害の発症抑制が観察されている。

ヒト臨床における肝障害発症過程

を考えた場合にも、消化管内の細菌などに由来する LPS にある程度暴露されている可能性は十分に考えられ、このような LPS 暴露に伴う炎症反応が、薬剤誘発性肝障害発症の危険因子となる可能性も考えられる。実際、ヒト臨床検体の解析においても動物モデルと同様に、炎症性サイトカインの濃度上昇が観察されており、その経時変化は、肝障害の発症に同期、あるいはやや先行する傾向が観察された。

2. 薬剤誘発性肝障害の発症過程における、グルタチオンの関与

また、本研究におけるヒト肝障害検体のメタボローム解析の結果、肝臓内グルタチオン・レベルの低下も、広範な肝障害に共通する要因として同定された。さらに動物モデルを用いた検討から、肝臓グルタチオン・レベルの低下を回復させることで、肝障害の発症はコントロール・レベルに近い状態まで抑制されたことから、肝臓内グルタチオン・レベルも肝障害の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

薬物性肝障害の発症を臨床上予測することは現時点では困難であるが、本研究のこれまでの結果を踏まえると、一因として肝細胞内の GSH 量や、酸化ストレスによる NF κ B の活性化度合など、肝障害に関わる各段階における応答性に、遺伝的要因もしくは環

境的要因による個人差がある可能性も考えられた。LPS 前感作モデルにおいても、肝臓中のグルタチオン濃度がコントロール条件下の 70%程度まで低下し、還元型グルタチオンやその前駆体となる NAC を投与してこれを回復させることで、肝障害の発現が抑制された。これらの結果からも、肝臓中のグルタチオン濃度が薬剤誘発性肝障害の発症あるいは進展に関わっていることが示唆される。今回用いた 2 種類の薬物に関しては、DCLF の代謝物の一部がグルタチオン抱合を受けることが知られているものの、それ以外の代謝経路へのグルタチオン抱合代謝の関与は無いものと考えられている。そのため、本モデルでの肝障害の発症は肝臓中グルタチオン濃度低下による抱合代謝不全に直接起因するものではなく、機序は未だ不明なものの、薬物に対する感受性がグルタチオン濃度低下によって亢進した結果と考えられた。

3. 薬剤誘発性肝障害の新規バイオマーカー候補物質

セロトニンは、マウスを用いた検討より、肝再生に必須であることが報告されており、主に小腸で生合成されるセロトニンを循環血中で運搬する役割を担う血小板は、組織障害に伴う炎症反応にตอบสนองしてセロトニンを放出することが知られている。ウイルス性

肝炎などの慢性肝障害においては、病態の進行と共に肝機能は徐々に悪化していく一方で、薬物誘発性肝障害は急性の肝障害であり、起因薬投与中止後には肝機能が短期間で自然回復することが一般的である。従って、本研究で見出された、薬物誘発性肝障害患者の検体に特異的なセロトニン代謝物の濃度変動は、肝細胞増殖を伴う肝再生過程の活性化を反映している可能性が高いと考えられた。

ヒト慢性肝障害においては数カ月から数年に渡る慢性的な炎症反応に伴って、血小板数の減少や血小板の機能不全が生じることがこれまでに報告されており、慢性肝障害が進行した場合でも、血小板のセロトニン放出応答は、脱感作して十分には機能しないと考えられた。これに対し、薬物誘発性肝障害の発症時においては、正常に機能する血小板が循環血中に十分量存在する状態であるため、肝細胞の急性の炎症反応に伴って、肝再生機構が機能し得ると考えられた。

一方、リン脂質代謝物は、肝細胞増殖に伴う細胞膜リン脂質の原料消費の上昇を反映している可能性が考えられた。これらの可能性を踏まえ、①肝組織障害に伴って血小板が活性化され、セロトニンが肝組織近傍で放出される。②セロトニンが肝細胞膜上セロトニン受容体に結合して肝細胞増殖を活

性化する。

③細胞膜合成の増加に伴い細胞膜リン脂質原料の消費が上昇する。

④セロトニン受容体に結合したセロトニンは細胞内に内在化・代謝され、セロトニン代謝物が増加する。

という一連のスキームを仮説として考えている。今後は、新たな動物モデルを用いた検討や、肝移植患者の血清検体を用いた解析を進めることで、この仮説の妥当性と、これら新規バイオマーカー候補分子の、臨床における応用範囲に関して検討を進めていく予定である。

平成 22 年度

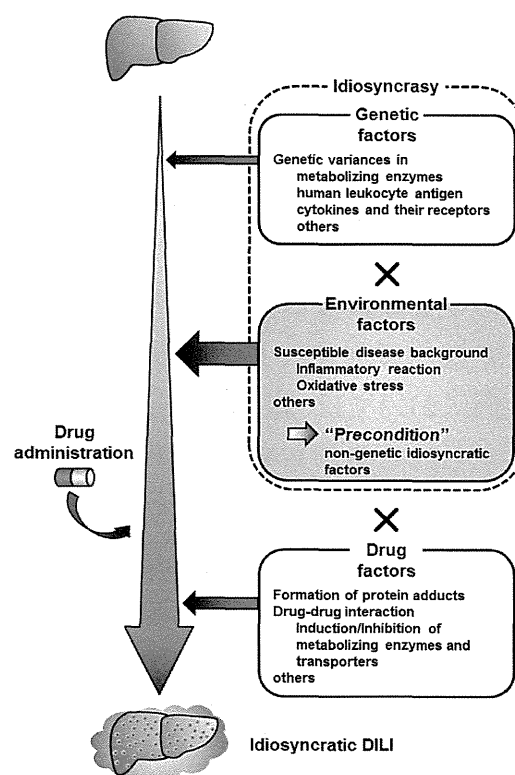
従来、薬物性肝障害の発症メカニズムは、中毒性のものと特異体質性のものに大別されてきた。中毒性の薬物性肝障害としては、アセトアミノフェンの大量服用に伴うものが代表的である。一方、特異体質性の薬物性肝障害は非常に広範な薬物の投与に関連して生じる副作用であり、薬物個々に見た際の発症頻度は低いが、広範囲の薬物によって生じうるため、臨床において遭遇する頻度は高い。特異体質性の肝障害の発症機序には不明確な点が多く残されており、また発症の予測は困難であるとされてきた。本研究のこれまでの検討で対象とした薬物性肝障害症例にはアセトアミノフェンによるものは含まれておらず、ほぼ全ての症

例が特異体質性機序によるものと考えられる。また、起因となっていると考えられる薬剤も多岐に渡っており、特定の薬剤の服用例が多くみられることも無かった。このような多様な症例を対象にした検討であるにも関わらず、症例に共通した事象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の高値が観察され、またこれらの現象は肝障害発症以前から生じており、肝障害発症に伴って大きな変動は観察されなかった。これらの結果は、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の高値が、薬物性肝障害を発症する機序に関連している可能性を示唆している。

実際、モデル動物や培養肝細胞を用いた検討からは、炎症性サイトカインに暴露された条件で、さらに肝臓内のグルタチオンを枯渇させる処理を加えると、薬物に対する毒性感受性が著しく亢進する結果が見出されている。すなわち、患者が有している基礎疾患などに起因して、血清中の炎症性サイトカインが上昇するような状況にあり、これに加えて肝臓内のグルタチオン消費が上昇して、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が生じている場合に、肝臓の薬物に対する毒性感受性が著しく亢進しており、その際にリスクの高い薬物を投与されると最終的に薬物性肝障害が発症するという機序が考えられる。このような複数の要因が

複雑に絡み合った結果、薬物性肝障害が発症すると考えれば、個々に見た際の薬物性肝障害の発症頻度が必ずしも高くないこと、および入院患者全体で見た際には、数%の頻度で発症例が観察されることなども説明が可能と思われる。

我々は、これらの検討結果に基づき、特異体質性という肝障害の発症機序をとらえ直す必要があるのではないかと考えている。「特異体質性」という言葉のニュアンスも寄与していると考えられるが、従来の特異体質性肝障害の発症素因の研究においては、主として遺伝的要因にフォーカスした研究が行われている。実際、HLAの遺伝子型などと相関が観察される薬物性肝障害の例は複数報告されているが、あくまでも極一部の薬物に限り、他多くの薬物に関しては、特に遺伝子型との相関関係は見出されていない。しかしながら、薬物性肝障害の発症過程は、①患者の遺伝的要因、②患者の病態など、生理的要因、③薬物自体の肝毒性リスクの強さ、の3種類の要因が重なり合うことで発症すると捉えるべきである。



これまでは主に①の遺伝的要因にフォーカスが置かれてきたが、本研究のこれまでの検討では、②の患者の背景疾患に影響される生理的要因が、広範囲の薬物による薬物性肝障害の発症に共通する要因として重要であり、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の高値がその条件に該当していることを示唆している。③の薬物自体のリスクに関しては、近年、プロテイン・アダクトの形成能が高い薬物ほど特異体質性肝障害の発症リスクが高いことが報告されている。

平成 23 年度

特異体質性の薬物性肝障害は非常に広範な薬物の投与に関連して生じる副作用であり、薬物個々に見た際の

発症頻度は低い、広範囲の薬物によって生じうるため、臨床において遭遇する頻度は高い。特異体質性の肝障害の発症機序には不明確な点が多く残されており、また発症の予測は困難であるとされてきた。本研究のこれまでの検討で対象とした薬物性肝障害症例においては、起因となっていると考えられる薬剤も多岐に渡っており、特定の薬剤の服用例が多くみられることも無かった。このような多様な症例を対象にした検討であるにも関わらず、症例に共通した事象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の高値が観察され、またこれらの現象は肝障害発症以前から生じており、肝障害発症に伴って大きな変動は観察されなかった。これらの結果は、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の高値が、薬物性肝障害を発症する機序に関連している可能性を示唆している。

本年度はこれらの結果を踏まえ、東大病院に入院した患者を対象として約 2,000 症例のカルテ情報を精査してデータベースを構築し、各時点の臨床検査値を基に、その患者がその後薬物性肝障害を発症するか否かを分離可能であるかを検証した。その結果、炎症を反映する臨床検査値である **CRP** が、各種の臨床検査値の中で最も良く、薬物性肝障害の発症群と非発症群を区別することが明らかとなっ

た。これはこれまでの研究から得られた、「何らかの理由で酸化ストレスと炎症の2つを背景因子として抱える患者が、薬物性肝障害を高頻度に発症し得る」という仮説を強く支持するものであった。

現状では酸化ストレスを良く反映する臨床検査値が存在しないため、十分な制度を持って薬物性肝障害の発症リスクを評価できる状況ではないが、本研究で見出されてきた γ -Glu-X ペプチド類の測定が一般的に臨床で利用可能となれば、この測定値と **CRP** 値をコンビネーションで用いることで、薬物性肝障害の発症リスクを精度良く評価する事が可能になる事が期待される。今後、薬物性肝障害の発症リスクを事前に予測評価するための方法論を、前向き臨床試験を通して確立していく必要がある。

また、将来的に特に重要な検討項目となる事としては、劇症症例の問題が挙げられる。薬物性肝障害の発症症例の中には、頻度は低いものの劇症化する症例が含まれていることが知られている。劇症肝炎を発症した際の死亡率は5割近くにも達し、また治療法も肝移植などに頼らざるを得ない。このため、劇症化症例を未然に防ぐことが出来れば、臨床的な有用性は非常に高い。本研究で見出された酸化ストレス・バイオマーカーと **CRP** 値を用いて薬物性肝障害発症の高リスク群を

予測することが可能となった場合、この劇症化症例が漏れることなく予測できるか否かが重要である。薬物性の劇症肝炎の発症頻度は非常に低いいため、現状では情報が少なく劇症化のメカニズムが不明の状況であるが、この点を解決すべく情報集積の努力を行っていききたい。

平成 24 年度

今年度の検討では、これまでの研究結果から DILI との関連性が示唆された、炎症反応や酸化ストレスといった患者側の因子を反映する指標だけではなく、その他の検査値の変動と DILI 発症の関連性を、改めて包括的に検証することで更なるリスク因子の探索を行った。その結果、また実臨床において広く用いられる臨床検査値に基づいて、起因薬に依らない、患者側の DILI 発症リスクを定量的に評価した初めての試みであり、複数の検査値を組み合わせた MLR モデルを構築することでその予測性改善に成功し、臨床現場においても直ちに利用可能な手法を構築出来たものと考えている。

包括的な臨床検査値の調査から、DILI を発症する以前から CRP および WBC の 2 種類が高値傾向にあることが明らかとなった。いずれも炎症反応に伴い上昇することが知られる CRP、WBC 値と DILI 発症との間に

関連性が見出されたことは、炎症反応の存在が DILI の発症リスクになるという、これまでの仮説を裏付ける結果となった。また、これらの臨床検査値はいずれも炎症反応が存在する場合に高値を示す傾向が知られているにもかかわらず、検査値間の相関性はあまり高くなく、DILI リスクを評価するために構築した MLR モデルには互いに独立した変数として組み込まれている。その理由としては、以下の 2 点が考えられる。第一に、WBC が上昇する要因は炎症反応以外にも存在することが挙げられ、白血病などの血液疾患や薬物の影響に伴い増減することもある。これに対して、CRP は炎症マーカーとして一般に用いられている急性相反応物質であり、感染症やリウマチなどの様々な炎症性疾患に応じて上昇する。そのため、患者の病態および服薬状況によっては両検査値の時間推移は必ずしも一致しないものと考えられる。また第二に、炎症反応に伴う CRP、WBC 値の上昇には一般的にタイムラグが生じることが知られている。代表的な炎症性疾患である感染症を例にとると、感染初期にマクロファージから分泌される顆粒球コロニー刺激因子により、肝臓や肺などに貯蔵されている好中球の放出が促進され血中の WBC 増加が早期に観察される一方、CRP はマクロファージから産生されるインター

ロイキン-6 を肝臓が受容した後に合成されるため、WBC よりも値が上昇するタイミングは遅れる。このような炎症反応に伴う各検査値の上昇時期のずれにより互いの相関性が低くなっている可能性が考えられ、炎症反応を反映するこれらの臨床検査値を包含する MLR モデルの予測精度向上に繋がる一因となったものと思われる。

解析対象とした患者群でも認められたが、一般的に、感染症等に使用される抗菌薬の DILI 発症率が高いことが知られている。これまでは薬物自体の DILI 誘発リスクが高いものと考えられてきたが、本研究結果を踏まえると、DILI 発症に必要な炎症状態等の条件を満たしやすい感染症患者を対象に使用されていることが、発症頻度を押し上げる理由の一つになっている可能性が想定された。関節リウマチや消化性潰瘍など、炎症性疾患は数多いが、あるいは原疾患別に層別化した上で DILI 発症に寄与する因子の探索を行うことで、さらなるリスク因子の同定に繋がる可能性も考えられる。

過去の調査研究でも議論にあるように、本研究においても DILI 発症率において性差が認められた。相反する報告も多いため、他施設・地域でのバリデーションを行う必要はあるが、男女間で層別化した上で DILI 発症を予測する MLR モデルを構築した結果、

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た。赤血球中には、ヘモグロビンの構成成分として鉄が多量に含まれているが、鉄の肝臓への過剰蓄積は肝臓での酸化ストレスの発生と肝細胞傷害を誘発することが知られている。これまでの検討より、起因薬を問わず、酸化ストレスの DILI 発症への関与が示唆されている点と併せて考えると、RBC 値が高値を示す患者においては、肝臓に鉄が過剰に取り込まれ酸化ストレスを生じており、薬物毒性に対する感受性が亢進している可能性が考えられた。肝臓中の酸化還元状態の間接的な指標である血清中 α -グルタミルジペプチド濃度の変動と比較することで、より詳細な解析が可能だと思われるが、簡便に測定出来る RBC や鉄濃度が酸化ストレスの程度を反映する指標として機能するならば、臨床応用には適している可能性も考えられる。

また、性別に関係なく MLR モデルに組み込まれた因子として、CRP、WBC 値の上昇に加え、PLT 値の低下が挙げられた。肝硬変などによる門脈圧亢進時には脾臓での血小板破壊が亢進されることや、肝機能低下時には血小板前駆細胞の分化・増殖因子であるトロンボポエチンの肝臓における産生量が低下することが知られている。そのため、PLT 値の低下は、肝

障害マーカー値の上昇を伴わない肝機能低下を反映している可能性も想定されるが、他に肝機能を反映することが知られている血清マーカーであるアルブミン等との相関性は認められなかった。血小板数の低下を伴う疾患背景が DILI 発症にどのように寄与するかは現時点では不明であり、今後、PLT との相関性の高い検査値の探索や、動物を用いた検討から DILI 発症との関連性を検証する必要がある。

構築した MLR モデルにより、DILI 発症リスクの高い患者を事前に予測することが可能となったが、高いスコアを示す患者には non-DILI 患者も多く含まれており、更なる改善が必要だと思われる。頻回に測定される臨床検査値だけでは DILI 発症に寄与する患者要因を完全には網羅できていないことも理由の一つとして考えられる一方で、同程度の MLR スコアを示す患者が同一の薬物を服用した場合でさえも反応性が異なることから、何らかの遺伝的な因子の関与も想定される。過去に報告されているように、特定の薬物による DILI 発症リスクを特定の HLA クラス II 遺伝子型が高める例が複数報告されていること、また薬物の反応性代謝物がタンパク質と共有結合することで形成されるプロテインアダクトの生成量とその DILI 誘発リスクに相関が認められることなどを併せて考えると、以下のよ

うな一連の DILI 発症スキームが推測される。すなわち、①炎症反応、酸化ストレスやその他の病的な要因により肝細胞の薬物への応答性が亢進し、②細胞死に至った一部の細胞から放出されたプロテインアダクトが近縁に存在する樹状細胞などの抗原提示能を持つ細胞に取り込まれる。③細胞内のプロテアソームにおいて分解・生成されたプロテインアダクト由来ペプチド断片は、特定の HLA ジェノタイプを発現する場合にのみ細胞表面に提示され、④免疫系を賦活化することで更なる炎症反応を誘発し、肝細胞死を拡大させるという一連のスキームが想定される。本研究で構築した MLR モデルでの閾値を満たす患者が全体の 30%程度であり、多くの HLA 遺伝子型のアリル頻度が 1%未満であることを考えると、全ての条件を満たす患者の確率は、臨床で遭遇する個々の薬物による DILI 発症率とおおよそ等しくなる。

また、将来的に特に重要な検討項目となる事としては、劇症症例の問題が挙げられる。薬物性肝障害の発症症例の中には、頻度は低いものの劇症化する症例が含まれていることが知られている。劇症肝炎を発症した際の死亡率は 5 割近くにも達し、また治療法も肝移植などに頼らざるを得ない。このため、劇症化症例を未然に防ぐことが出来れば、臨床的な有用性は非常に高

い。本研究で見出された酸化ストレス・バイオマーカーと CRP 値を用いて薬物性肝障害発症の高リスク群を予測することが可能となった場合、この劇症化症例が漏れることなく予測できるか否かが重要である。薬物性の劇症肝炎の発症頻度は非常に低いため、現状では情報が少なく劇症化のメカニズムが不明の状況であるが、この点を解決すべく情報集積の努力を行っていききたい。

続いて、消化管障害を反映するバイオマーカーの探索に関しての考察を記載する。実験-1 では、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、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。

その結果、胃潰瘍の惹起により臓器内で有意に減少する内因性代謝物とし

て citrate、cis-aconitate、succinate、O-acetylcarnitine、3-hydroxybutanoic acid、proline、hydroxyproline が見出された。これらのうち succinate を除く 6 つの代謝物は臓器内における変化が血中濃度の変化として捉えられる事が分かった。また 6 つのうち citrate を除く 5 つの代謝物は血中においても胃潰瘍の惹起した動物群で有意な減少を示しており、胃潰瘍の惹起を血中で検出出来るバイオマーカー候補として有望であると考えられた。

臓器内で見られた変化を代謝マップ上にプロットしたところ、NSAIDs を投与したことにより TCA サイクル、脂質の β 酸化と言ったミトコンドリア機能の低下と細胞外におけるコラゲナーゼの活性化が疑われた。

NSAIDs はミトコンドリアの膜電位を調整する mitochondria permeability pore を開口して (Szewczyk and Wojtczak, 2002) ミトコンドリアの膜電位を喪失させ、ミトコンドリアの機能を失わせることが知られている。胃潰瘍は胃酸やペプシンなどの攻撃因子と防御因子のバランスが崩れることによって起こるとされている。NSAIDs による胃潰瘍の惹起に関しては幾つかの理論が言われているが、その中の一つがミトコンドリアの機能障害による胃粘膜保護作用の低下である。

(Somasundaram et al., 1997) 本実験では citrate や cis-aconitate といった TCA 回路の中間代謝物の濃度が減少する一方で代謝マップ上 TCA 回路の上流にあり、ミトコンドリア外で行われる解糖系に関連する代謝物には影響は認められなかった。また脂質の代謝経路の一つである β 酸化はその最終産物として O-acetylcarnitine 及び 3-hydroxybutanoic acid を産生することが知られているが、本実験においてはこれらも減少した。この事からこれらの変化は NSAIDs によるミトコンドリアの機能低下及びそれに続く胃粘膜保護作用の低下を反映しているものと考えられた。

上記に加えて、proline 及び hydroxyproline の減少も確認された。hydroxyproline は生体内においてコラーゲンの中に特異的に含まれるアミノ酸であることが知られている。また proline も hydroxyproline の様なコラーゲン特異性は無いものの、コラーゲンを構成するアミノ酸の一つとして知られているアミノ酸である。この事から proline 及び hydroxyproline の減少は臓器内におけるコラーゲン量の減少を示唆しているものと考えられた。潰瘍部位においてはコラーゲンを分解するコラゲナーゼの活性が上昇し、コラーゲン量が増加している事が報告されており、(Hasebe et al., 1987) 本試験で見ら

れたコラーゲン量の減少はコラゲナーゼの活性上昇を反映したものであると考えられた。さらに proline 及び hydroxyproline の減少を経時的に観察すると、その減少は投与後 1 時間には既に観察されており、5 時間で最小になった後、24 時間では回復傾向を示した。剖検時の胃の観察では 1 時間では異常が認められなかったが、5 時間で最もひどい胃潰瘍になり、その後 24 時間に向けて回復しており、今回の proline 及び hydroxyproline の減少はそれらを反映している様に思われた。また、剖検時の観察では異常が認められていなかった投与後 1 時間においてもその変化が観察されていることから proline 及び hydroxyproline の減少は目視(臨床でいう内視鏡検査)よりも良いバイオマーカーとなりうると思われた。実験-2 では実験-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事を受けて、これらのバイオマーカー候補の変動機序を明らかにするために、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 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。つまり、ア