

表 2 胃潰瘍の面積 (実験-1)

	Control	Aspirin		Ibuprofen	
		3 mg/kg	300 mg/kg	8 mg/kg	800 mg/kg
1 hr	ND (0/4)	ND (0/4)	ND (0/4)	ND (0/4)	ND (0/4)
5 hr	ND (0/4)	ND (0/4)	2.48 ± 1.14 (4/4)	ND (0/4)	18.08 ± 18.72 (4/4)
24 hr	ND (0/4)	ND (0/4)	0.08 ± 0.15 (1/4)	ND (0/4)	3.76 ± 4.33 (4/4)

Data are expressed as mean + standard deviation of the area of ulceration (mm²)

Values in parentheses are the incidence rate of animals with gastric ulceration.

ND: not detected

表 3 抽出された低分子代謝物の臓器内濃度の群平均及び有意差検定の結果

Metabolite	Time point	Control	Aspirin		Ibuprofen	
			3 mg/kg	300 mg/kg	8 mg/kg	800 mg/kg
Citrate	1 hr	194±21	202±23	120±25 (**)	202±26	135±39 (*)
	5 hr	190±18	187±33	120±8 (**)	172±23	124±19 (**)
	24 hr	269±75	203±42	213±50	175±60	169±52
Cis-aconitate	1 hr	4.7±0.3	4.4±0.5	2.8±0.7	4.6±0.6	3.6±1.0
	5 hr	5.4±0.6	4.6±1.0	3.1±0.4 (**)	4.1±1.0 (*)	3.1±0.9 (**)
	24 hr	7.7±2.0	5.6±0.7	5.7±1.0	4.9±1.6 (*)	3.7±1.1 (**)
Succinate	1 hr	235±34	252±30	227±28	229±29	139±27 (**)
	5 hr	220±7	231±14	195±8 (*)	205±11	155±11 (**)
	24 hr	349±60	323±44	295±80	270±110	278±87
o-Acetyl carnitine	1 hr	201±14	196±9	150±20 (*)	206±36	149±29 (*)
	5 hr	205±9	198±39	128±13 (**)	164±12	131±25 (**)
	24 hr	237±41	237±33	193±41	195±75	145±39
3-Hydroxybutanoic acid	1 hr	565±141	575±110	285±67 (*)	445±234	188±60 (**)
	5 hr	690±326	610±211	206±40 (*)	394±130	404±134
	24 hr	596±298	397±217	317±227	326±206	175±70 (*)
Proline	1 hr	339±23	325±28	274±24 (**)	329±25	317±18
	5 hr	274±23	303±24	247±10	292±22	233±17 (*)
	24 hr	434±78	433±35	428±131	367±134	385±98
Hydroxyproline	1 hr	158±14	130±10 (*)	113±8 (**)	128±19 (*)	130±10 (*)
	5 hr	118±23	128±13	65±11 (**)	118±24	89±21 (*)
	24 hr	171±46	154±28	145±36	122±37	100±26

Mean concentration (nmol/g tissue) and standard deviation.

Asterisks indicate statistically significant differences. **, p<0.01 *, p<0.05.

表 4 抽出された低分子代謝物の血中濃度の群平均及び有意差検定の結果

Metabolite	Time point	Control	Aspirin		Ibuprofen		Correlation
			3 mg/kg	300 mg/kg	8 mg/kg	800 mg/kg	
Citrate	1 hr	112±5	99±10	99±14	112±13	113±8	p<0.01
	5 hr	116±9	106±10	97±13	103±6	100±10	
	24 hr	106±7	96±6	94±18	96±5	84±3	
Cis-aconitate	1 hr	5.3±0.2	5.0±0.8	4.7±0.5	5.4±0.5	5.7±0.6	p<0.01
	5 hr	5.8±0.6	5.6±0.6	4.2±0.3 (**)	5.3±0.5	5.1±0.4	
	24 hr	5.8±0.9	5.4±0.1	5.0±0.8	5.5±0.1	5.2±0.3	
Succinate	1 hr	20±2	19±3	18±1	18±1	18±2	NS
	5 hr	22±2	20±1 (*)	24±1	20±1	19±0 (**)	
	24 hr	19±1	19±2	17±1	18±2	21±3	
o-Acetylcarnitine	1 hr	11.4±1.5	11.6±1.6	11.8±4.4	12.4±2.1	8.8±1.4	p<0.01
	5 hr	15.6±3.9	14.3±1.6	8.7±1.0 (**)	9.8±1.3 (*)	7.3±2.6 (**)	
	24 hr	15.1±3.6	17.0±2.6	15.1±0.7	20.6±8.9	8.0±2.4	
3-Hydroxybutanoic acid	1 hr	1299±241	1253±130	579±101 (**)	983±343	466±152 (*)	p<0.01
	5 hr	1515±731	1260±261	320±102 (**)	880±203 (*)	660±213 (**)	
	24 hr	971±477	725±235	501±299	699±293	311±128 (*)	
Proline	1 hr	160±18	157±19	116±18 (**)	137±13	135±14	p<0.01
	5 hr	150±14	141±10	118±14 (*)	149±16	104±16 (**)	
	24 hr	138±5	153±13	139±26	140±10	127±20	
Hydroxyproline	1 hr	57±5	51±5	40±8 (**)	50±3	51±3	p<0.01
	5 hr	52±6	53±4	28±4 (**)	52±6	41±5 (*)	
	24 hr	47±5	46±10	38±10	43±5	30±8 (*)	

Mean concentration (nmol/mL) and standard deviation.

Asterisks indicate statistically significant differences. **, p<0.01 *, p<0.05.

NS: not significant

表 5 胃潰瘍の面積 (実験-2)

Group	Control	Aspirin	Aspirin with Omeprazole	Aspirin with Famotidine
Test article	Vehicle	Aspirin 100mg/kg	Aspirin 100mg/kg	Aspirin 100mg/kg
Co-administration (administrated 30 min. before test article administration)	Vehicle	Vehicle	Omeprazole 60 mg/kg	Famotidine 5mg/kg
Number of animals	4	4	4	4
Severity of gastric ulceration	ND (0/4)	0.863 ± 0.426 (4/4)	ND (0/4)	ND (0/4)

Data are expressed as mean + standard deviation of the area of ulceration (mm²)

Values in parentheses are the incidence rate of animals with gastric ulceration.

ND: not detected

表 5 胃潰瘍の発現例数(実験-2)

Group / Model	Control	Aspirin	Ethanol	Stress
Test article	Vehicle	Aspirin 100mg/kg	Ethanol 5mL/kg	Vehicle
Experimental room temperature	Room temperature	Room temperature	Room temperature	Cold room (4°C)
Number of animals	8	4	4	4
Gastric ulceration	ND	4/4	4/4	4/4

Values are the incidence rate of animals with gastric ulceration.

ND: not detected

目 次

I. 総括研究報告書

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・・・・・・・・・・105

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

研究課題：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
課題番号：H20-バイオ-一般-011

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）

○渡部 浩治（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・主任研究員）

○竹内健一郎（アステラス製薬（株）安全性研究所・研究員）

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。しかしながら、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、最新のプロテオミクスとメタボロミクス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り、平成 20 年度より 5 年計画で実施する。初年度に当たる本年度は申請時の計画に従って、薬物の単回投与によって肝細胞障害型および胆汁うっ滞型の各急性薬物性肝障害モデル動物の作成が可能であることを確認した。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ボリコナゾール (VCZ) を選択し、低用量リポポリサッカライドの前感作を行うことで、VCZ 投与後に肝細胞障害型の急性肝障害が生じることが明らかとした。さらに、2 週間の反復投与を行った際の毒性評価も行ったが、非絶食条件下では十分な肝障害の誘導は生じず、長期反復投与モデルに関しては投与量や投与条件をさらに検討する必要があると考えられた。また、各種肝障害の患者検体を集積するシステムの構築を行った。平成 21・22 年度には、肝障害モデル動物を用いたメタボローム解析を進め、バイオマーカー候補となる物質を探索するとともに、その変動メカニズムを分子レベルで解明することを目標として検討を進める。また、薬物性肝障害およびウイルス性肝障害の症例を集積し、平成 23 年度以降は、それまでに集積した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。

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。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。

B. 研究方法

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ついても検討を加えた。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。

（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ー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

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、CCl₄ 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、CCl₄ 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、CCl₄ 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増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、CCl₄ 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。

D. 考察

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、临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適當と考え、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。

E. 結論

上述のように平成 20 年度には研究遂行に必要な技術的基盤の整備を積極的に推進した。平成 21 年度・22 年度には、肝障害モデル動物を用いたメタボローム解析を進め、バイオマーカー候補となる物質を探索するとともに、その変動メカニズムを分子レベルで解明することを目標として検討を進める。また、薬物性肝障害およびウイルス性肝障害の症例を集積し、平成 23 年度以降にヒトにおける診断バイオマーカーの確立・検証に向けた準備

を進める予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

研究代表者：曾我朋義

①Shintani, T., Iwabuchi, T., Soga, T., Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakurakawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Yitagawa, Y., Kajiyama, M., Matsumoto, K., *Suematsu, M., "Cystathionine β -synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion" *Hepatology* 49, 141-150, 2009.

②*Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., Soga, T., Yoshimoto, H., "Developing Bottom-fermenting Yeast Strains That Produce High SO₂ Levels by Integrated Metabolome and Transcriptome Analysis", *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2787-2796, 2008.

③ Sato, S., Arita, M., Soga, T., Nishioka, T., Tomita, M., "Time-resolved Metabolomics Reveals Metabolic Modulation in Rice Foliage", *BMC Systems Biology* doi:10.1186/1752-0509-2-51, 2, 51, 2008.

④ Ohashi, Y., Hirayama, A.,

Ishikawa, T., Nakamura, S., Shimizu, K., Ueno, Y., Tomita, M., *Soga, T., "Depiction of Metabolome Changes in Histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS", *Mol. BioSyst.* 4, 135-147, 2008.

研究分担者：本間雅

① Kozawa, M.*, Honma, M.* and Suzuki, H. "Quantitative prediction of in vivo profiles of CYP3A4 induction in humans from in vitro results with reporter gene assay." *Drug Metab Dispos* 2009 in press, (*equally first)

② Minami, S., Ito, K., Honma, M., Ikebuchi, Y., Anzai, N., Kanai, Y., Nishida, T., Tsukita, S., Sekine, S., Horie, T., Suzuki, H. "Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G406-413.

研究分担者：奈良岡準

① Naraoka H., Suzumura K., Takeuchi K., Sasayama T. "The role of biomarkers in toxicity treatment "Metabonomics" as a New biomarker discovery method." *Rinsyo Byori*, 56, 335-42, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.登録

①曾我朋義、末松誠、本間雅、山本武

人、鈴木洋史「薬剤性肝炎マーカー、
並びに、それらの利用方法」特願
2008-328133.

②本間雅、鈴木洋史、山本武人、千葉
厚、辻省次、曾我朋義「肝疾患予防治
療剤」特願 2008-322262.

③阿部高明、曾我朋義「ヒト OATP-R
遺伝子導入モデル非ヒト動物」特願
2008-264674

④辻彰、加藤将生、久保義行、金子周
一、加賀谷尚史、曾我朋義「エルゴチ
オネインを利用したクローン病の診
断および治療」特願 2008-033588.

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 21 年度

総括研究報告書

研究代表者 曾我 朋義

分担研究者 本間 雅

分担研究者 渡部 浩治

分担研究者 奈良岡 準

分担研究者 竹内健一郎

平成 22 年 4 月

目 次

- I. 総括研究報告書
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・・・・・・・・・・115

- II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・227

- III. 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）
総括研究報告書

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）

○渡部 浩治（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・主任研究員）

○竹内健一郎（アステラス製薬（株）安全性研究所・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。しかしながら、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。本年度は、昨年度に確立した技術的基盤をさらに整備すると共に、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った。また、薬物性肝障害の発症メカニズムとの関連についても検討を加えた。その結果、肝障害に広く共通するバイオマーカーとして、複数のオフタルミン酸関連ペプチドを見出し、またそれらの濃度変動を組み合わせることで、発症原因を峻別診断できる可能性が示された。この結果は同時に、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を強く示唆している。この点は、動物モデルを用いた薬物性肝障害の発症メカニズム解析からも、強く支持される結果となった。さらに、薬物誘発性肝障害が急性肝障害であることを反映して、特異的に変動すると考えられるバイオマーカー候補物質を新たに 2 種類見出すことができた。平成 22 年度以降はこれら新規バイオマーカーの変動メカニズムを臨床検体および動物モデルを用いた検討を通じて明らかにし、ヒトにおける診断バイオマーカーの確立・検証に向けた準備を進める予定である。

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）。