

における免疫学的機序の重要性を裏付ける結果が示されたと考えられる。また、CYP3A4 は臨床で使用されている薬物によって誘導される分子種でもあり、また酵素活性には個体差が認められている。従って、高用量で長期間服用する可能性がある AMD については、CYP3A4 による代謝的活性化が肝障害の原因として重要かもしれない。

(2) アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析：本研究では、AG により生じる細胞障害性を、炎症性因子を指標として評価し、そのメカニズムを解明することを目的として検討した。その結果、DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG により、IL-8、MCP-1 または IL-6 などの炎症性サイトカインの放出が促進され、DCF-AG による炎症性因子の発現増加には MAPK 経路活性化が重要な役割を有していることを示した。本研究では初めにリン酸緩衝液中、血清アルブミン中および血漿中における半減期が短く、FDA により warning drug に分類されている DCF に着目し、DCF-AG を THP-1 細胞に処置することにより、細胞傷害性および炎症性因子の発現変動を解析した。当研究室で THP-1 細胞を用いた研究において、駆虫薬メベンダゾール、抗真菌薬テルビナフィンおよび抗不整脈薬アミオダロンの処置により炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ 、ケモカインである IL-8 産生が増加したことを報告しており、本検討においてもこれら炎症性因子を指標として検討を行った。DCF-AG 処置による

THP-1 細胞の細胞生存率に対する影響は認められなかったが、DCF と比較し炎症性因子である IL-8 および TNF $\alpha$  mRNA の有意な増加が認められたことから、DCF-AG が炎症性因子の発現を誘導させることが示唆された。ヒト単球系 THP-1 細胞と比較しヒト末梢血単核球 PBMC において、薬物処置による IL-8 および IL-6 の産生量が多いという報告や、単球を単一培養した場合と比較し、単球とリンパ球を共培養した場合において、薬物処置による MCP-1 といった炎症性因子の産生増加が認められていることから、THP-1 細胞と比較し、PBMC において DCF-AG に対する反応性が高いことが考えられる。また、PBMC には lot 差が存在することが示されたが、反応性の高い lot (#48) を選択することで、DCF-AG による炎症性因子の発現誘導を高感度に評価できることが示唆された。IL-6 は MCP-1 および IL-8 を誘導することが報告されており、本検討においても DCF-AG による IL-6 mRNA の発現は、IL-8 および MCP-1 mRNA 発現よりも早い時間で高値を示すことから、IL-6 が IL-8 および MCP-1 の誘導を引き起こし、さらなる炎症反応を惹起させる可能性が考えられた。本検討における評価では AG 処置濃度を *in vitro* 試験における最大処置濃度である、100  $\mu$ M に統一し検討を行ったが、実際に *in vitro* で得られた結果を *in vivo* に外挿するためには臨床における 1 日投与量、血漿中および肝臓における AG の濃度などを考慮する必要がある。*In vivo* においても AG により炎症反応が惹起されるかを明らかにするため

にはさらなる研究が必要である。DCF-AGとこれら代謝物が炎症性の反応に与える影響について検討したところ 4'-OH DCF および 5-OH DCF 処置においても炎症性因子の発現増加が認められた。各代謝物による炎症性因子の発現増加は、DCF-AG、4'-OH DCF および 5-OH DCF において異なることから、各代謝物により PBMC に対する反応性が異なることが考えられる。

(3) 薬物性肝障害の動物モデルの確立と機序解析とスクリーニング試験系の開発研究：薬物性肝障害の発症メカニズムに関する多くの研究は、薬物ごとに行われてきたが、薬物性肝障害の発症機序を捉えるためには薬物間において、比較検討することが肝要であると考えられる。複数の薬物性肝障害モデルマウスを用いて肝臓中の炎症関連因子の mRNA 発現変動を解析することにより、肝障害性薬物に共通して発現変動する因子を見出した。本研究は、薬物性肝障害発症メカニズムを複数の薬物を比較解析した初めての報告である。本検討の解析には、雌性 Balb/c マウスを用いた。Balb/c マウスは免疫学的因子を検討する際に、多くの研究で用いられている。また、雄性マウスと比較して雌性マウスの方がハロタン誘導性肝障害の感受性が高いことや、薬物性肝障害発症のリスクファクターとしては女性が挙げられていることから、本検討では雌性マウスを解析に使用した。

薬物投与後の mRNA 発現変動を解析した結果、薬物によって変動する因子、時間、上昇する程度および発現変動パタ

ーンが異なることが明らかとなった (Fig. 8)。また、肝障害性薬物だけでなく、薬効類似薬物においても多くの因子の発現上昇が認められた。例えば、イブプロフェンやビカルタミド投与後に TNF $\alpha$  mRNA 発現量の顕著な上昇が認められており、肝障害性薬物であるジクロフェナクと同程度であった (Fig. 8)。解析した因子の中から、1) 薬効類似薬物と比較して肝障害性薬物において顕著な発現量の増加が認められた因子、2) 解析に用いた 5 種類の肝障害性薬物のうち 4 種類以上の肝障害性薬物に共通して発現量の増加が認められた因子に該当したのは、S100A8、S100A9、RAGE、NALP3 および IL-1 $\beta$  であった。近年では、ROS が TLR4 を選択的に活性化することや (Matsuzawa et al., 2005)、大動脈内皮細胞において S100 タンパクや HMGB1 などの DAMPs の発現を増加させることが報告された。また、NALP3 インフラマソーム活性化は ROS や細胞内に取り込まれた ATP に起因すると考えられている。従って、本検討における各炎症性因子の発現量増加には、薬物暴露による細胞内ストレスに起因することが予想される。しかしながら、薬物が細胞ストレスに与える影響を評価するだけでは、薬物性肝障害の発症機序を十分に説明することや、肝障害リスクを評価することができないため、炎症性因子が誘導されるためには細胞ストレス以外にも重要な事象が存在することが予想される。本章では詳細な検討は行っていないが、これら因子が肝臓において薬物により誘導されるメカニズムを明らかにす

ることは、さらなる薬物性肝障害の発症機序の解明のためにも重要な結果であると考えられる。

## E. 結論

(1) THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの肝障害性評価試験系の構築: AMD などの肝障害性薬物について、CYP3A4 による代謝的活性化を介した免疫反応の活性化が示唆されたことより、本試験系は *in vitro* において代謝的活性化による免疫反応の関与を評価し得る手段となると考えられる。

(2) アシルグルクロニドによる細胞毒性の評価およびメカニズム解析: 本研究では、AG が炎症性因子の発現を誘導すること、PBMC 中の CD14 陽性細胞特異的に細胞傷害性を示すこと、それらに p38 経路が関与することを初めて明らかにし、AG が薬物誘導性肝傷害の原因の一因になる可能性を示した。本研究で明らかにした AG の細胞毒性およびメカニズムの情報は、臨床における薬物誘導性肝障害の予測に役立ち、医薬品開発に資することが期待される。

(3) 薬物性肝障害の動物モデルの確立と機序解析とスクリーニング試験系の開発研究: 薬物性肝障害において関与することが報告されてきた因子が、一般的なメカニズムとして提唱できるかについて検討するために、複数の薬物性肝障害を

マウスに惹起させ、肝臓中の mRNA 発現変動解析により肝障害発症に重要なメディエーターの探索を行った。薬物性肝障害における炎症性因子の発現変動パターンは薬物によって多様であることが明らかとなった。S100A8、S100A9、RAGE および NALP3 は複数の薬物性肝障害に共通して発現量の増加が認められ、これらの因子が免疫を介した肝障害を予測する毒性マーカーとして有用である可能性が示唆された。また、薬物投与によって TLR4 および RAGE のリガンドが誘導されることが、薬物性肝障害の発症の一因である可能性を示した。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (含#1-3 総説)

- 1) Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. MicroRNAs as mediators of drug toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **53**: 377-400 (2013).
- 2) Tsuyoshi Yokoi. A new era in the study of individual differences in drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28**: 1-2 (2013).
- 3) 中島美紀. シトクロム P450 と転写因子の microRNA による発現制御. *薬学雑誌*, **132**: 107-116 (2012)
- 4) Singo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Epigenetic regulation is a crucial factor in the

- repression of UGT1A1 expression in the human kidney. *Drug Metab. Dispos., in press* (2013).
- 5) Masakazu Kakuni, Mayu Morita, Kentaro Matsuo, Yumiko Katoh, Miki Nakajima, Chise Tateno, and Tsuyoshi Yokoi. Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol. Lett., 214: 9-18* (2012).
  - 6) Satonori Higuchi, Azusa Yano, Shohei Takai, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol. Sci., 130: 4-16* (2012).
  - 7) Taisha Miyashita, Yasuyuki Toyoda, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Hepatoprotective effect of tamoxifen on steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in mouse models. *J. Toxicol. Sci., 37: 931-942* (2012).
  - 8) Yukitaka Yoshikawa, Taishi Miyashita, Satorori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Shinya Endo, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Mechanisms of the hepatoprotective effects of tamoxifen against drug-induced and chemical-induced acute liver injuries. *Toxicol. Appl. Pharmacol., 264: 42-50* (2012).
  - 9) Shinya Endo, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Activation of human monocytic THP-1 cells by metabolic activation of hepatotoxic drugs. *Drug Metab. Pharmacokinet., 27: 621-630* (2012).
  - 10) Singo Oda, Miki Nakajima, Masahiko Hatakeyama, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi. Preparation of a specific monoclonal antibody against human UGT1A9 and evaluation of UGT1A9 protein levels in human tissues. *Drug Metab. Dispos., 40: 1620-1627* (2012).
  - 11) Azusa Yano, Satonori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver in mice. *Toxicology, 293: 107-114* (2012).
  - 12) Masanori Kobayashi, Satorori Higuchi, Mika Ide, Satomi Nishikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Th2 cytokines-mediated methimazole-induced liver injury in mice. *J. Appl. Toxicol., 32: 823-833* (2012).
  - 13) Yu Yamaura, Miki Nakajima, Shingo Takagi, Tatsuki Fukami, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. Plasma microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis. *PLoS One, 7: e30250* (2012).

- 14) Yasuyuki Toyoda, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Taishi Miyashita, Azusa Yano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, **126**: 16-27 (2012).
- 15) Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury. *J. Appl. Toxicol.*, **32**: 815-822 (2012).
2. 学会発表 (含特別講演等)
- 1) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：カルバマゼピン誘導性肝障害モデルマウス作製およびメカニズム解析 日本薬学会第132年会 2012.3.28-31 口頭 札幌
- 2) 山浦 優、中島美紀、佐藤達哉、高木信伍、深見達基、常山幸一、横井 毅：肝細胞障害モデルラットにおける中心静脈域および門脈域 miRNAs 発現変動と血中 miRNAs 発現変動との関係 日本薬学会第132年会 2012.3.28-31 ポスター 札幌
- 3) 高井翔平、樋口悟法、常山幸一、矢野 梓、深見達基、中島美紀、横井 毅：フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスにおける免疫学的因子の関与 日本薬学会第132年会 2012.3.28-31 ポスター 札幌
- 4) 横井 毅. 薬物誘発性肝障害における代謝と免疫の役割. 第26回日本薬物動態学会ワークショップ 2012.4.22-23 東京
- 5) 横井 毅. 特異体質性薬物性肝障害モデル. シンポジウム「医薬品開発に貢献した疾病モデル-成果と課題、今後の期待-」第59回日本実験動物学会総会、2012.5.24-26 別府
- 6) Miki Nakajima, Yu Yamaura, Shingo Takagi, Naoyuki Tatsumi, Tatsuya Sato, Tatsuki Fukami, Koichi Tsuneyama, and Tsuyoshi Yokoi. MicroRNAs as biomarkers of liver injury: profiles in plasma and liver from rat models. 19th Microsomes and Drug Oxidations and 12th European International Society for the Study of Xenobiotics Meeting. 2012.6.17-21 Poster, Noordwijk aan Zee, the Netherlands.
- 7) 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
- 8) 樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：カルバマゼピン誘導性肝障害における代謝的活性化と炎症の関与 第39回日本毒性学会学

- 術年会 2012.7.17-19 ポスター 仙台
- 9) 高井翔平、樋口悟法、矢野 梓、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：フルクロキサシリン誘導性肝障害モデルマウスによる発症メカニズムの解析 第39回日本毒性学会学術年会 2012.7.17-19 ポスター 仙台
- 10) 横井 毅. 特異体質性薬物性肝障害の前臨床基礎研究. シンポジウム「薬物性肝障害-最新知見を基に-」 第39回日本毒性学会学術年会、2012.7.17-19 仙台
- 11) 横井 毅. 薬物性肝障害の予測試験系とバイオマーカー. 第16回薬物動態談話会セミナー (特別講演) 2012.8.22-23 三島
- 12) Tsuyoshi Yokoi. Approaches to predict drug-induced liver injury. Seminar in Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 2012.9.14. Khon Kaen, Thailand.
- 13) 横井 毅. 体内動態と薬物相互作用の基礎と応用～食品成分への展開～. 第10回日本食品・機械研究会フォーラム (特別講演) 2012.9.26-27 裾野
- 14) Tsuyoshi Yokoi, Satonori Higuchi, Azusa Yano, Shohei Takai, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima. Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. 18th North American Regional Meeting, 2012.10.14-18, Poster, Dallas, USA
- 15) Taishi Miyashita, Kento Kimura, Shinya Endo, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. An in vitro investigation of immunotoxicology of diclofenac acyl glucuronide. 日本薬物動態学会第27回年会, 2012.11.20-22, ポスター 東京
- 16) Shingo Oda, Masahiko Hatakeyama, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Preparation of specific monoclonal antibodies against each human UGT1A6, -1A8, -1A9, -1A10, -2B4, and -2B10. 日本薬物動態学会第27回年会, 2012.11.20-22, ポスター, 東京
- 17) Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. The reason why human UGT1A10 is expressed in intestine but not in liver. 日本薬物動態学会第27回年会, 2012.11.20-22, ポスター 東京
- 18) 宮下泰志、木村健人、深見達基、中島美紀、横井 毅：ジクロフェナクアシルグルクロニドの細胞毒性に関する検討 日本動物実験代替法学会第25回大会 2012.12.7-9 ポスター

東京

- 19) 辰巳直之、中島美紀、山浦優、深見達基、常山幸一、横井 毅：慢性肝障害の進行に伴って発現変動するラット肝臓中 microRNA とその意義  
日本薬学会第 133 年会 2013.3.28-30  
ポスター 横浜

- 20) 横井 毅、薬物誘導性肝障害に免疫学的機序が果たす役割、第 155 回日本獣医学会学術集会、2013.3.30 東京  
大学農学部 東京

- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物性肝障害における免疫学的因子の  
作用機序解明と予測試験系の開発研究

平成 24 年度 分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

分担研究者 中 島 美 紀

深 見 達 基

平成 25 (2013) 年 5 月



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標としたアミオダロンの  
肝障害性評価試験系の構築

主任研究者 横井 毅 金沢大学医薬保健研究域薬学系教授

薬物性肝障害は臨床における急性肝障害の約半数を占める。一般に、吸収された薬物は血中に移行後、肝臓に運ばれるため、肝臓は高濃度の薬物に暴露されることになる。従って、肝臓は薬物による障害を受ける可能性が他の臓器より高いとされている。反応性代謝物は主に CYP による代謝的活性化により産生され、タンパク質や DNA などの生体内高分子と共有結合し、細胞の機能障害を引き起こす。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。薬物や化合物による免疫反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒトの末梢血から単離した単核球や T 細胞、B 細胞などを用いることが多い。しかし、ヒト末梢血から調製する試料の使用では、ロット間の個体差や、コストの問題が生じるため、*in vitro* の大規模スクリーニングには適さない。近年、このような問題を回避した *in vitro* 評価系として、ヒト単球系細胞株の有用性が注目されている。本研究では、代謝的活性化を介した反応性代謝物による免疫活性化を評価することを目的とし、初めに THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標とし、活性代謝物による代謝的活性化を評価可能な試験系を構築し、様々な肝障害性薬物における CYP3A4 による代謝的活性化の評価を行った。その結果、AMD および DEA の CYP3A4 による代謝的活性化により、細胞生存率の有意な変化は認められないが、THP-1 細胞の CD54 発現量および IL-8、TNF $\alpha$  のタンパク質産生量は増加した。特に、CD54 発現量および IL-8 産生量は顕著な増加が認められた。アミオダロン誘導性肝障害における免疫学的機序の重要性を裏付ける結果が示されたと考えられる。また、CYP3A4 は臨床で使用されている薬物によって誘導される分子種でもあり、また酵素活性には個体差が認められている。従って、高用量で長期間服用する可能性がある AMD については、CYP3A4 による代謝的活性化が肝障害の原因として重要かもしれない。本試験系においては、タンパク質への共有結合量を指標としたアダクト生成量を評価しなくても、薬物の代謝的活性化による免疫関連因子への関与を評価することが可能であった。よって、本試験系は代謝物が安定に存在しないため合成出来ない場合や、未同定代謝物を含めた代謝物を総合的に評価可能であるため、代謝的活性化による免疫反応の関与および代謝物の安全性を評価する試験系として有用であると考えられる。以上より、*in vitro* において薬物および代謝物を考慮した安全性を評価し、

免疫学的機序による肝障害を予測・評価する際の有用な手段となることが期待される。

#### A. 研究目的

薬物性肝障害は臨床における急性肝障害の約半数を占める (Kaplowitz, 2001)。一般に、吸収された薬物は血中に移行後、肝臓に運ばれるため、肝臓は高濃度の薬物に暴露されることになる。従って、肝臓は薬物による障害を受ける可能性が他の臓器より高いとされている。これまでに肝障害との関連が示唆されている薬物は約1000種類にのぼる (Zimmerman, 1999)。また、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ある。販売中止となる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。薬物代謝酵素の中でも、Cytochrome P450 (CYP) は肝臓に高く発現しており、また、腸管、腎臓、肺および皮膚などの多くの臓器に分布している (Krishna and Klotz, 1994)。CYPは主に酸化反応を触媒し、薬物代謝の約75%に関与し、薬物代謝において中心的な役割を果たしているが、代謝的活性化に関与することも報告されている (Guengerich, 2008)。CYP分子種の中でもCYP3A4はヒト肝総CYPの約30%を占め (Shimada et al., 1994)、臨床で使用されている薬物の約50%の代謝に関与するといわれている (Guengerich, 1995)。そのため、CYP3A4はヒト肝において解毒だけで

なく代謝的活性化への寄与も高いと考えられる。また、CYPの発現量には大きな個体差が存在し、この個体差が薬物による毒性発現の個体差に寄与している可能性が考えられる (Shimada et al., 1994)。

反応性代謝物は主にCYPによる代謝的活性化により産生され、タンパク質やDNAなどの生体内高分子と共有結合し、細胞の機能障害を引き起こす (Park et al., 2005; Riley et al., 1988)。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 (Knowles et al., 2000; Park et al., 2000; Utrecht, 1999)。

最も多くの研究がなされているアセトアミノフェン (APAP) の例では、過量投与およびGSH減少時に、重篤な肝障害が生じることが知られ、毒性発現にCYP1A2、CYP2E1およびCYP3A4による代謝的活性化により生じるNAPQIが重要であることが報告されている (Albano et al., 1985)。APAPは通常の投与量においては、硫酸抱合やグルクロン酸抱合体に代謝され体外に排泄されるが、過量投与時には、抱合代謝過程が飽和し、NAPQIが生成する (Raucy et al., 1989; Thummel et al., 1993)。通常、NAPQIは生体内のGSHにより捕捉され解毒されるが、過剰のNAPQI生成時には細胞内のGSHが枯渇し、細胞内

に存在する様々な生体高分子と結合し、細胞毒性を引き起こす (Hoffmann et al., 1985; Hinson et al., 1995; Hongslo et al., 1994)。このように、代謝的活性化により生じる反応性代謝物が毒性発現初期に重要な役割を担うことが示唆されている (Utrecht, 1999; Walgren et al., 2005)。APAP と同様に CYP による代謝的活性化を受け、肝障害を示す薬物としてハロゲン化吸入麻酔薬が挙げられる。これらの麻酔薬は主に CYP2E1 により反応性代謝物であるトリフルオロ酢酸クロリドが生成し、タンパク質に対して非特異的にトリフルオロ酢酸化して肝障害に関与すると考えられている (Sato et al., 1985; Kenna et al., 1988)。ハロタン、イソフルランおよびデスフルランでは反応性代謝物の生成量が順に約 10 分の 1 ずつに減少し、その生成量に伴い肝障害発症率が減少していることから、反応性代謝物の生成が肝障害発現に影響していることが示唆されている (Njoku et al., 1997)。このように、反応性代謝物が肝障害発症に重要な役割を示すことが数多く報告されている。

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 (Ganey et al., 2004; Roth et al., 2003; 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-1b および TNF $\alpha$ ) 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。

これまでに、げっ歯類を用いた検討において、APAP や非ステロイド性抗炎症薬、抗菌薬などの肝障害において、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  産生や好中球などの免疫因子浸潤が、肝障害発症に重要な役割を果たすことが明らかにされている (Jaeschke, 2005; Deng et al., 2009)。Tukov ら (2006) はラットから単離したクッパー細胞と肝実質細胞を共培養し、肝障害性薬物の評価を行っている。しかし、げっ歯類を用いた研究では薬物代謝酵素活性などの種差の問題があるため、必ずしもヒトにおける反応を予測できるとは限らない (Jenden, 1991)。実際に臨床試験中に開発中止となる候補化合物は約 90% に達し、その原因の約 80% は種差に起因するものであると言われている。実験動物から得た肝障害に関する知見から、ヒトにおける肝障害性を予測することは困難である。そのため、*in vitro* 試験でより簡便に、多くの化合物を短期間で評価可能な試験系の開発が求められている (堀井, 2001)。これまでに、*in vitro* において代謝的活性化を介した薬物の毒性を評価するため、さまざまな検討が報告されている。薬物の求電子性およびタンパク質への共有結合が肝障害と関連があるとされ (Zhou et al., 2005)、多くの製薬企業は、薬物代謝酵素の不可逆的阻害を利用した阻害アッセイ、GSH

などの捕捉剤を用いたトラッピングアッセイおよび、放射性標識した薬物を用いた共有結合量測定などを段階的に実施することにより反応性代謝物による毒性を評価している (Nassar et al., 2004; Evans et al., 2004; Kalgutkar et al., 2005)。共有結合性試験やトラッピング試験などは、医薬品候補の優先順位付けという観点からは有用であるが、毒性予測という観点からはまだ不十分なものである。また、肝障害を惹起する薬物でCYPによる反応性代謝物が同定されているものも少なくはないが、反応性代謝物自身の肝障害性および免疫学的な肝障害性に関して確認されていない場合が多い。Vignati ら (2005) は、CYP3A4による代謝的活性化を評価する系として、HepG2細胞の細胞障害性を指標とした*in vitro*評価系を構築した。当研究室においても、バキュロウイルス発現系またはアデノウイルスを用いたCYP3A4による代謝的活性化を評価する試験系を構築してきた (Mizuno et al., 2009; Hosomi et al., 2010)。しかし、いずれも代謝的活性化を介した直接的な細胞障害性は評価可能であるが、免疫反応に関しては検討することは困難である。Cosgrove ら (2009) は、肝障害性薬物と炎症性因子 (外毒素であるLPS、炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ など) の同時暴露により、ヒトまたはラット初代培養肝細胞とヒト肝癌由来HepG2細胞を用いて細胞毒性を評価している。この評価系では、肝障害性薬物と炎症性因子の相乗効果について検討することが可能であるが、肝障害性薬物が直接的に免疫担当細胞を活性化しているか否かを判別することはできない。

薬物や化合物による免疫反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒトの末梢血から単離した単核球やT細胞、B細胞などを用いることが多い。しかし、ヒト末梢血から

調製する試料の使用では、ロット間の個体差や、コストの問題が生じるため、*in vitro* の大規模スクリーニングには適さない。近年、このような問題を回避した *in vitro* 評価系として、ヒト単球系細胞株の有用性が注目されている (Ashikaga et al., 2002; Hulette et al., 2002; Azam et al., 2006; Sakaguchi et al., 2006)。ヒト単球系細胞株は、単球やマクロファージ、骨髄球などの免疫担当細胞における分化や活性化のメカニズム解明に頻用されている細胞株である。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、ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 細胞の炎症性サイトカインやケモカインの産生が増加することが報告され、炎症反応活性化が肝障害の副作用に関与することが示された (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009)。また、当研究室においても、駆虫薬メベンダゾールおよび抗真菌薬テルビナフィンの暴露により THP-1 細胞の炎症性サイトカインおよびケモカイン産生量が増加したことを報告した (Mizuno et al., 2011; Mizuno et al., 2010)。しかし、これらの検討において代謝物の評価は検討しておらず、これまでに免疫学的な肝障害に関与する代謝的活性化を評価した報告はない。

本研究では、代謝的活性化を介した反応性代謝物による免疫活性化を評価することを目的とした。初めに、THP-1 細胞の免疫因子の変動を指標とし、活性代謝物による代謝的活性化を評価可能な試験系を構築し、様々な肝障害性薬物における CYP3A4 による代謝的活性化の評価を行った。

## B. 実験方法

実験材料である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。アミオダロンは大正製薬(Tokyo, Japan)より御供与いただいた。Human CYP3A4 + P450 Reductase + Cytochrome b<sub>5</sub> SUPERSOMES<sup>TM</sup> (CYP3A4 発現系マイクロソーム) および P450 Reductase + Cytochrome b<sub>5</sub> Insect Cell Control SUPERSOMES<sup>TM</sup> (コントロールマイクロソーム) は BD Gentest (Woburn, MA) より購入した。Human IL-8 ELISA Ready-Set-Go!<sup>TM</sup> および Human TNF $\alpha$  ELISA Ready-Set-Go!<sup>TM</sup> は eBioscience (San Diego, CA, USA) より購入した。イムノモジュール (ストリップ&フレーム) は Nalge Nunc International K.K. (Tokyo,

Japan) より購入した。ReverTra Ace は東洋紡 (Osaka, Japan) より、逆転写用 dNTPs はグライナー・ジャパン (Tokyo, Japan) より購入した。RNAiso、ランダムヘキサマー、SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (Perfect Real Time) はタカラバイオ (Shiga, Japan) より購入した。プライマーは北海道システムサイエンス (Sapporo, Japan) に合成を依頼した(Table 1)。Reference Dye には Brilliant SYBR Green QPCR master mix (Stratagene, La Jolla, CA) 付属のものを使用した。フローサイトメトリー分析には FACS Calibur Cell Quest (Becton Dickinson, CA, USA) を使用した。

**Table 1. Sequence of primers used in the present study.**

Prime	Sequenc
Human	5'-GGC CAT CAG CAA CAT AAG
Human	5'-TGG ACC ACT CGG ATG AGC
Human -	5'-GGC CAT CAG CAA CAT AAG
Human -A	5'-TGG ACC ACT CGG ATG AGC
Human	5'-AAA TGG GGT GAG GCC
Human GAPDH-AS	5'-ATT GCT GAC AAT CTT GAG

AS: antisense primer, S: sense primer

CYP3A4 による代謝的活性化の検討は、 $1 \times 10^6$  cells/mL の THP-1 細胞、CYP3A4 発現系マイクロソーム (CYP3A4 として 15 nM) および 1 mM NADPH となるように調製した溶液に被験薬を加え、24 well plate に 1 mL ずつ播種し、培養した。被験薬としてアルベンダゾール、アルベンダゾールスルフォキシド、アミオダロン塩酸塩、デスエチルアミオダロン、デシプラミン塩酸塩、ジクロフェナク、ヒド

ララジン、レフルノミド、ネファゾドン塩酸塩、タクリン塩酸塩、タモキシフェンクエン酸塩、テルビナフィン塩酸塩を用いた。なお、DMSO の最終濃度は 0.1%とした。また、対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。以上の条件にて培養後、細胞培養液をピペッティングにより懸濁し、1.5 mL チューブに移した。3,000 rpm、4°C で

5 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、-70°C で凍結保存した。

FACS による CD86 および CD54 発現量の定量および細胞生存率の測定は、以下の方法で行った。沈殿した細胞は 0.1% BSA を含む 1 × PBS で 2 回洗浄した後、新しく用意した 1.5 mL チューブに FITC 標識モノクローナル抗体 (抗ヒト CD86 抗体 (clone: Fun-1)、抗ヒト CD54 抗体 (clone, 6.5B5) および FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識マウス IgG1 κ アイソタイプコントロール (clone, MOPC-21)) を加え、そこに洗浄した細胞を分注し、4°C、暗所において 30 分間インキュベーションを行い、細胞染色を行った。その後、0.1% BSA を含む 1 × PBS で 1 回洗浄した後、FACS flow に PI (propidium iodide) を 0.625 mg/mL とした溶液に懸濁し、フローサイトメトリーを用いて分析を行った。なお、CD 発現量の解析の際には死細胞はゲートにより取り除き、計 10,000 個の生細胞を解析した。CD86 および CD54 発現の指標として用いた相対発現量は次の算出式により計算した。

(相対発現量の算出式)

相対発現量 (%)  
= 被験薬物処置細胞の MFI - 被験薬物処置細胞での Isotype control の MFI / 溶媒処置細胞の MFI - 溶媒処置細胞での Isotype control の MFI

\* MFI: Mean Fluorescence Intensity (平均蛍光強度)

Total RNA の調製、逆転写酵素による cDNA の合成、Real-time RT-PCR による TNFα、IL-8、GAPDH mRNA の定量、ELISA による IL-8 および TNFα タンパク質の定量は常法に従って行った。

HPLC によるアミオダロン、デスエチルアミオダロンおよびジデスエチルアミオダ

ロンの定量は、細胞培養後、細胞懸濁液をピペティングにより懸濁し、そのうち 150 mL を 1.5 mL チューブに移した。凍結融解を 3 回繰り返す、細胞を破砕した後、50 mM トルブタミドを内標準物質として添加した。また、3 M NaCl を 400 mL 加えた。得られた混合溶液をジクロロメタン 4 mL で 1 分間抽出した。3,000 rpm、5 分間の遠心分離後、有機溶媒層を試験管に移し、40°C で窒素気流下留去した。残渣を 150 mL の移動相に溶解し、そのうちの 90 mL を HPLC に注入した。HPLC 装置にはポンプ (日立、L-2130)、オートサンプラー (日立、L-2200)、UV 検出器 (日立、L-2400)、カラムオープン (日立、L-2350) を用いた。カラムは Capcell Pack C<sub>N</sub> UG120 (4.6 mm × 150 mm; 5 mm) を用い、移動相は 24% アセトニトリル、1% 酢酸、0.2% ジエチルアミンとした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度 35°C として、溶離液を 240 nm でモニターした。保持時間は AMD が 18.8 分、DEA が 11.8 分、DiDEA が 8.5 分であった。内部標準物質であるトルブタミドの保持時間は 3.2 分であった。

統計解析は、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. 実験結果

### C-1. 肝障害性薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

肝障害性薬物に対して、CYP3A4 による薬物の代謝的活性化が THP-1 細胞に及ぼす影響を CD54 および CD86 発現量を指標としてスクリーニングを行った。はじめに薬物処置による THP-1 細胞の細胞生存率に対する影響について検討した。実験方法は 2-1 に示した方法に従った。検討した薬物名、処置濃度

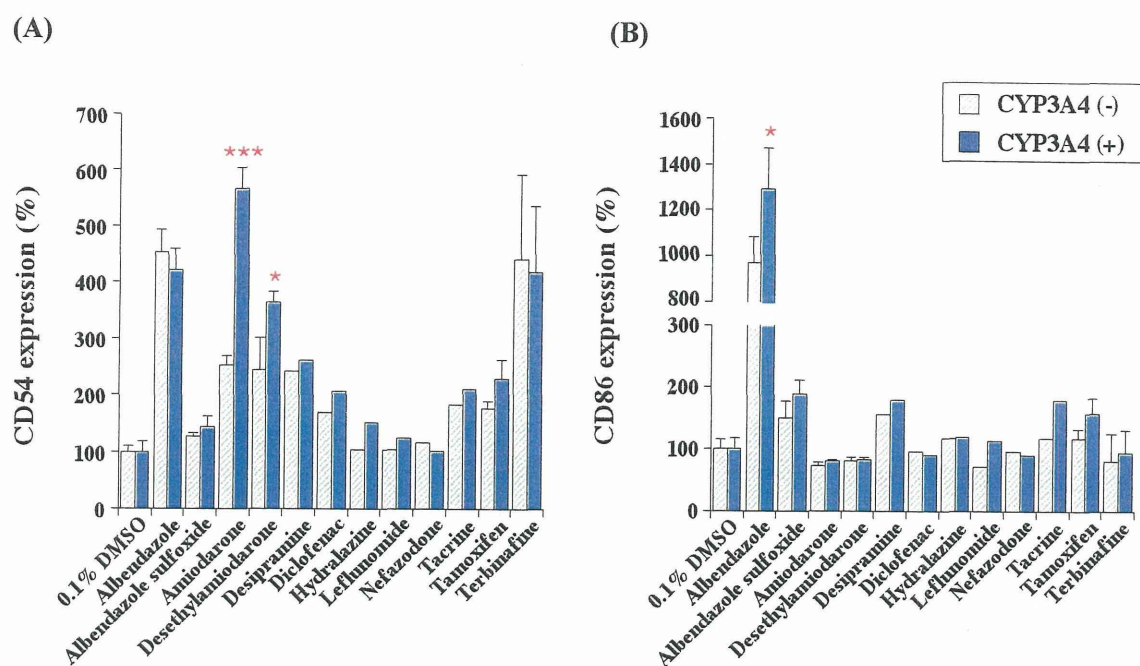
および細胞生存率を Table 1 に示した。薬物処置濃度はバキュロ CYP3A4 発現系またはアデノ CYP3A4 感染下においてヒト肝癌由来 HepG2 細胞に対して、代謝的活性化による細胞毒性を示すことが報告されている濃度を用いた。その結果、いずれの薬物処置濃度においても THP-1 細胞の細胞生存率は 70%以上であり、細胞死により CD 発現量に影響を与えない濃度であった (Table 1)。上記の処置濃度で CD 発現量の検討を行った結果、アミオダロン (AMD) およびデスエチルアミオダロン (DEA) 処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD54 発現量の有意な増加が認められた (Fig. 1A)。アルベンダゾール処置において、コントロールマイクロソーム処置群に比べて CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群で CD86 発現量の有意な増加が認められた (Fig. 1B)。一方、そ

他の薬物ではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群の間に CD 発現量の顕著な変動は認められなかった (Fig. 1)。

以上より、アルベンダゾール、アミオダロンおよびデスエチルアミオダロンは代謝的活性化により、THP-1 細胞を活性化することが考えられた。しかし、アルベンダゾールではその代謝物であるアルベンダゾールスルフォキシドにおいて CD 発現量の有意な増加が認められなかったこと (Fig. 1)、および代謝物が炎症性サイトカイン産生能を有しないことが報告されていることから (Mizuno et al., 2011)、検討を保留とした。AMD およびその代謝物である DEA において CD54 発現量に顕著な増加が認められたため、これらの薬物に着目して、より詳細な検討を行うこととした。

**Table 1. Effect of drugs on cell viability in THP-1 cells.**

Drug	Concentration ( $\mu$ M)	Cell viability (%)	
		CYP3A4 (-)	CYP3A4 (+)
0.1% DMSO	-	100.0 $\pm$ 1.5	100.0 $\pm$ 2.0
Albendazole	50	84.3 $\pm$ 2.1	84.7 $\pm$ 3.0
Albendazole sulfoxide	50	85.9 $\pm$ 2.6	87.4 $\pm$ 2.5
Amiodarone	30	90.4 $\pm$ 1.5	71.7 $\pm$ 7.6
Desethylamiodarone	20	91.6 $\pm$ 2.3	87.8 $\pm$ 1.4
Desipramine	30	92.6	94.3
Diclofenac	100	89.2	91.7
Hydralazine	100	80.2	82.4
Leflunomide	20	97.6	99.5
Nefazodone	10	96.4	100.8
Tacrine	100	100.1	99.9
Tamoxifen	20	88.1 $\pm$ 5.5	88.5 $\pm$ 5.1
Terbinafine	100	77.5 $\pm$ 5.7	80.4 $\pm$ 6.4



**Fig. 1. Effect of drugs on CD54 and CD86 expression level in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with the albendazole, albendazole sulfoxide, amiodarone, desethylamiodarone, desipramine, diclofenac, hydralazine, nefazodone, tacrine, tamoxifen or terbinafine for 24 hrs. After the incubation, the expression of CD54 (A) and CD86 (B) was measured by flow cytometry and CD expression levels were calculated. CD expression levels are expressed as percentage of vehicle (0.1% DMSO) treated cells of each group. Data represent the mean (n = 2) or mean  $\pm$  SD (n = 3). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ , compared with each CYP3A4 (-) group. Data represent the mean (n = 2) or mean  $\pm$  SD (n = 3).

## C-2. AMDおよびDEA処置による細胞毒性

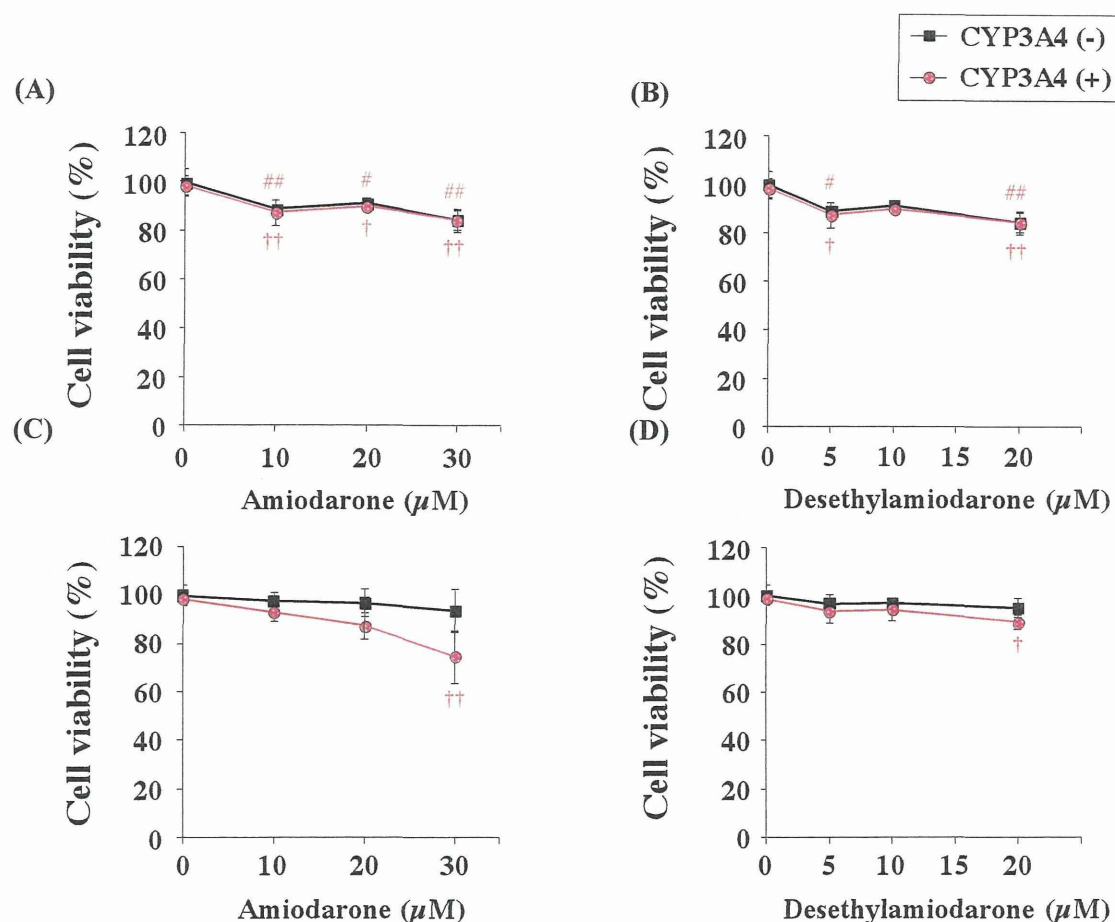
AMDおよびDEAの各濃度におけるTHP-1細胞に対する細胞毒性を明らかにするため、各濃度における薬物処置12または24時間後におけるTHP-1細胞の細胞生存率を2-4の方法に従い測定した。AMD処置12時間後において、コントロールマイクロソームおよびCYP3A4発現系いずれの処置群においても、薬物未処置群と比較して、10 mM処置から細胞生存率の有意な低下が認められ、濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。(Fig. 2A)。コントロールマイクロソーム処置群とCYP3A4発現系処置群においてAMD処置において、CYP3A4発現系処置による有意な細

胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2A)。AMD処置24時間後において、コントロールマイクロソーム処置群では、いずれの濃度においても溶媒処置と比較して細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2C)。CYP3A4発現系処置群においては、溶媒処置と比較して、30 mM処置において細胞生存率の有意な低下が認められた (Fig. 2C)。AMD処置において、CYP3A4発現系処置による有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2C)。DEA処置12時間後において、コントロールマイクロソームおよびCYP3A4発現系いずれの処置群においても、各処置群の溶媒処置と比較して、5 mM処置から細胞生存率の有意な低下が認められ、10



mM 処置では有意ではないが低下傾向を示し、20 mM 処置では細胞生存率の低下が認められた (Fig. 2B)。DEA 処置において、CYP3A4 発現系処置による有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2B)。DEA 処置 24 時間後において、コントロールミクロソーム処置群では、いずれの濃度においても溶媒処置と比較して細胞生存率の変

化は認められなかった (Fig. 2D)。CYP3A4 発現系処置群においては、溶媒処置と比較して、20 mM 処置において細胞生存率の有意な低下が認められた (Fig. 2D)。DEA 処置において、CYP3A4 発現系処置による有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2D)。CYP3A4 発現系処置群による有意な細胞生存率の変化は認められなかった。



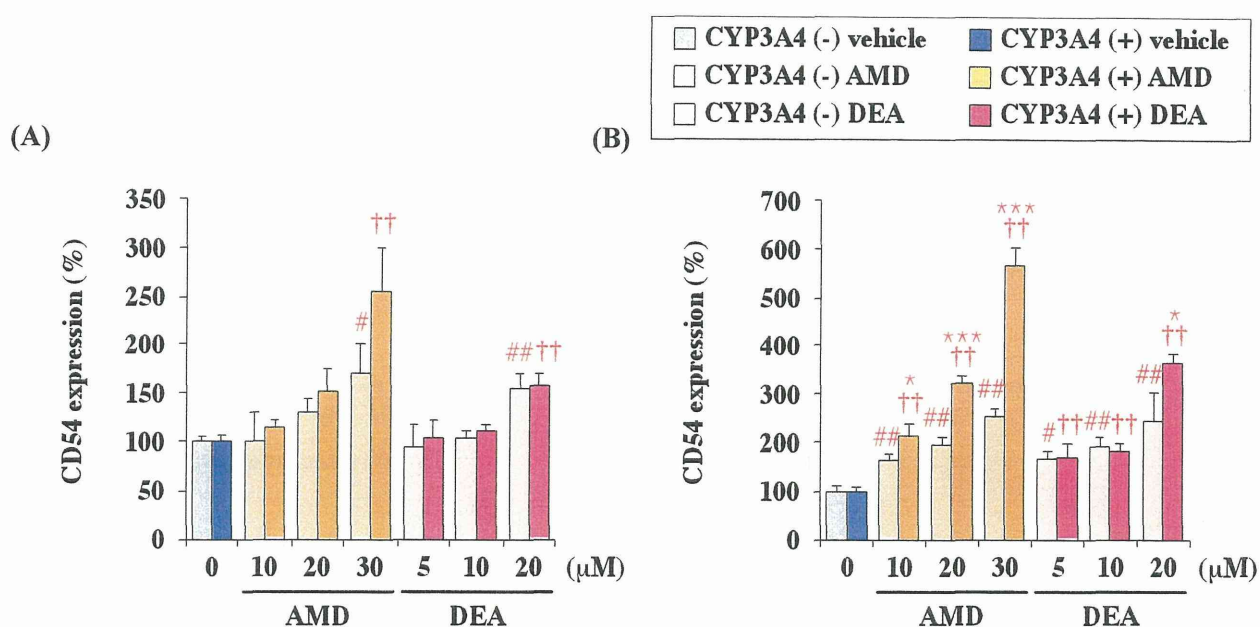
**Fig. 2. Effects of CYP3A4 on cytotoxicity of amiodarone or desethylamiodarone in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of amiodarone (A, C) and desethylamiodarone (B, D) for 12 hrs (A, B) and 24 hrs (C, D). Cell viability in THP-1 cells was measured by PI assay as described in Material and Methods. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). #*P* < 0.05 and ##*P* < 0.01, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (-) groups. †*P* < 0.05 and ††*P* < 0.01, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (+) groups.

C-3. AMD および DEA 処置濃度依存的な CD54 発現量の変化

AMD および DEA 処置濃度依存的な CD54 発現量の変化を検討するため、2-4 の方法に

従い検討を行った。12 および 24 時間後において、溶媒処置と比較して AMD および DEA 処置による有意な CD54 発現量の増加が認められた (Fig. 3)。12 時間後において、AMD および DEA 処置による CD54 発現量は CYP3A4 発現系処置群により有意な変化は認められなかった (Fig. 3A)。AMD および DEA 処置による CD54 発現量は CYP3A4 発

現系処置群により濃度依存的な増加が認められた (Fig. 3B)。また、12 時間後よりも 24 時間後において CD 発現量は高値を示した。今回の結果より THP-1 細胞における CD 発現量は他の薬物による検討でも 24 時間で最大となる (Sakaguchi et al., 2006) ことを支持する結果となった。



**Fig. 3. Dose-dependent changes in CD54 expression level by amiodarone or desethylamiodarone for 12 (A) or 24 (B) hrs-incubation in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with the indicated concentration of amiodarone and desethylamiodarone for 24 hrs. CD expression level is expressed as percentage of vehicle (0.1% DMSO) treated cells of each group. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). # $P$  < 0.05 and ## $P$  < 0.01, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (-) groups. †† $P$  < 0.01, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (+) groups. \* $P$  < 0.05 and \*\*\* $P$  < 0.001, compared with CYP3A4 (-) groups of each concentration point.

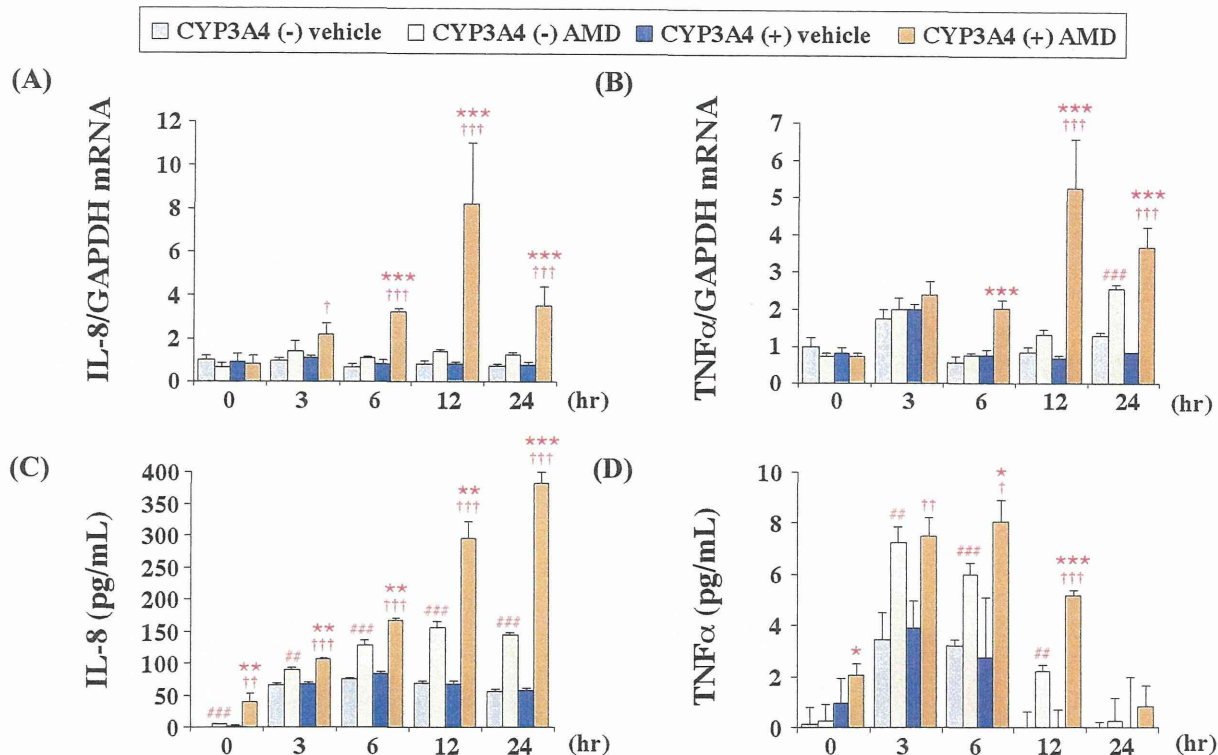
#### C-4. AMD 処置時間依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化

AMD 処置時間による炎症性サイトカイン産生量の変化を検討するため、2-8 の方法に従い検討を行った。その結果、IL-8 および TNF $\alpha$  の mRNA 発現量は AMD 処置によりコントロールミクロソーム処置群と比較して

CYP3A4 発現系処置群において 6 時間後から 24 時間後まで有意に増加し、12 時間後において最も高値を示した (Figs. 4A and B)。また、IL-8 タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールミクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において時間依存的に増加が認められ、24 時間後におい

て最も高値を示した (Fig. 4C)。TNF $\alpha$  タンパク質産生量は、AMD 処置によりコントロールミクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 6 時間後から 12 時間後まで認められ、12 時間後において最も高

値を示した (Fig. 4D)。以上のことから、AMD 処置による CYP3A4 の代謝的活性化により CD54 発現量だけでなく、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生量も増加することが示された。



**Fig. 4. Time-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF $\alpha$  by 30 mM amiodarone in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with 30 mM amiodarone for various time points. The mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF $\alpha$  (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. The release of IL-8 (C) and TNF $\alpha$  (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).  $###P < 0.01$  and  $####P < 0.001$ , compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (-) groups.  $\dagger P < 0.05$ ,  $\dagger\dagger P < 0.01$  and  $\dagger\dagger\dagger P < 0.001$ , compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (+) groups.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$ , compared with CYP3A4 (-) groups in each time point.

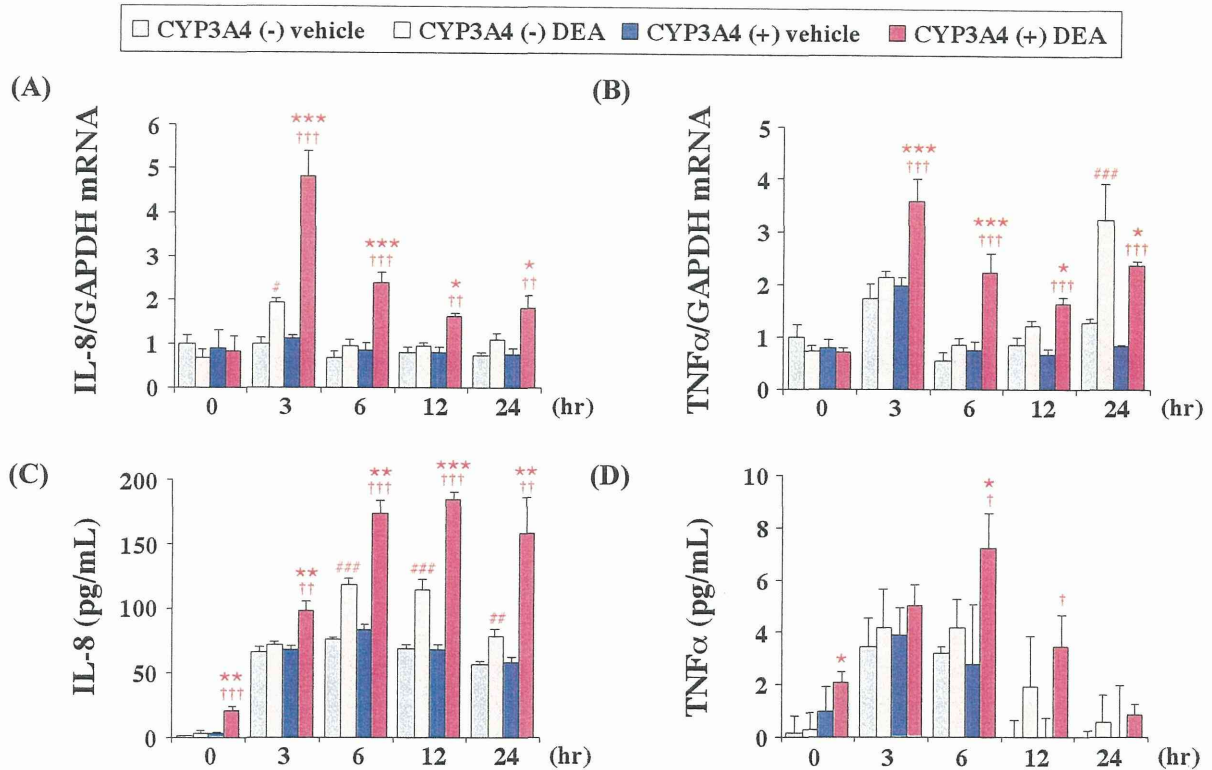
#### C-5. DEA 処置時間依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化

DEA 処置時間による炎症性サイトカイン産生量の変化を検討するため、2-8 の方法に従い検討を行った。その結果、IL-8 mRNA 発現量は DEA 処置によりコントロールミク

ロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において 3 時間後から 24 時間後まで有意に増加し、3 時間後において最も高値を示した (Fig. 5A)。TNF $\alpha$  の mRNA 発現量は DEA 処置によりコントロールミクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群に

において3時間後から12時間後まで有意に増加し、3時間後において最も高値を示し、24時間後では有意な減少が認められた (Fig. 5B)。また、IL-8 タンパク質産生量は、DEA

処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において時間依存的な増加が認められ、24時間後において最も高値を示した (Fig. 5C)。



**Fig. 5. Time-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF $\alpha$  by 20 mM desethylamiodarone in THP-1 cells.** THP-1 cells were treated with 20 mM desethylamiodarone for various time points. The mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF $\alpha$  (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. The release of IL-8 (C) and TNF $\alpha$  (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean  $\pm$  SD (n = 3). # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 and ### $P$  < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (-) groups.  $\dagger P$  < 0.05,  $\dagger\dagger P$  < 0.01 and  $\dagger\dagger\dagger P$  < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) of each time point in CYP3A4 (+) groups. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001, compared with CYP3A4 (-) groups in each time point.

TNF $\alpha$  タンパク質産生量は、DEA 処置によりコントロールマイクロソーム処置群と比較して CYP3A4 発現系処置群において6時間後において有意に増加が認められた (Fig. 5D)。AMDと同様にDEA処置によるCYP3A4の代謝的活性化によりCD54発現量だけでなく、炎症性サイトカイン産生量も増加するこ

とが示された。また、AMD処置でのmRNA発現量のピーク時間は12時間であったが (Figs. 4A and B)、代謝物であるDEA処置ではピーク時間は3時間であった (Figs. 5A and B)。従って、AMD処置による炎症性サイトカインの増加は代謝物であるDEA処置による代謝的活性化の寄与が大きいと考え