

られた。

C-6. AMD 処置濃度依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化

AMD 処置濃度依存的な炎症性サイトカイン産生量の変化を検討するため、10~30 mM の AMD を THP-1 細胞に処置し、12 時間後の炎症性サイトカイン mRNA 発現量およびタンパク質産生量を定量した。AMD 処置により IL-8 および TNF α 産生は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、濃度依存的な増加が認められた (Figs. 6C and D)。20 mM の AMD 処置により IL-8 mRNA 発現量およびタンパク質産生量の有意な増加が認められた (Figs. 6A and C)。また、20 mM の AMD 処置により TNF α mRNA 発現量は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有意に増加したが (Fig. 6B)、TNF α タンパク質産生量の有意な増加には 30 mM ではじめて認められた (Fig. 6D)。

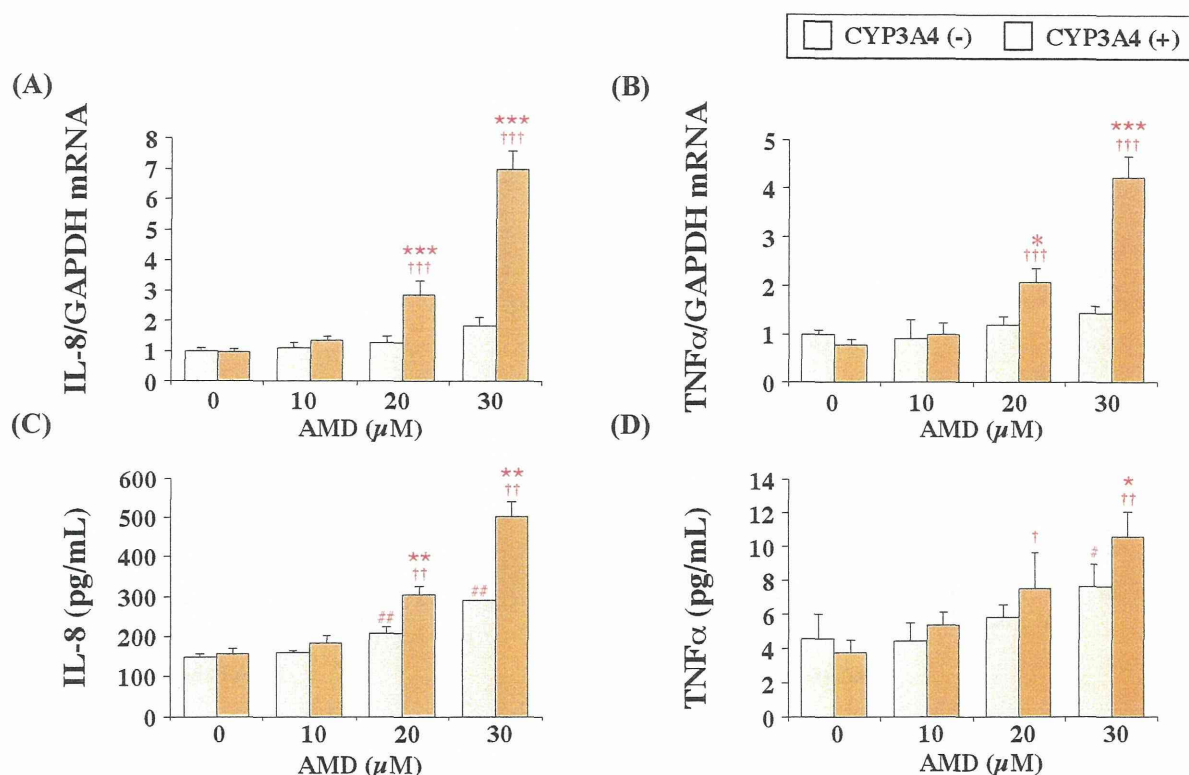


Fig. 6. Dose-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF α by amiodarone 12 hrs-incubation in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of amiodarone. After incubation for 12 hrs, the mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF α (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. After incubation for 12 hrs, the release of IL-8 (C) and TNF α (D) in supernatant was measured by ELISA. Data represent the mean \pm SD (n = 3). $^{##}P < 0.01$, compared with control (0.1% DMSO) 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) in CYP3A4 (+) groups. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$, compared with CYP3A4 (-) groups of each concentration point.

C-7. DEA 処置による炎症性サイトカイン産生の濃度依存的変化

DEA 処置濃度依存的な炎症性サイトカイン産生の変化を検討するため、2-8 の方法に従い検討を行った。DEA 処置により IL-8 産生は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、濃度依存的な増加が認められた (Fig. 7)。20 mM の DEA 処置により IL-8 mRNA 発現量およびタンパク質産生量の有意な増加が認め

られた (Figs. 7A and C)。また、DEA 処置により TNF α 産生は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、濃度依存的な増加が認められなかった (Fig. 7D)。この原因として、経時的な変化では mRNA 発現量は 3 時間、タンパク質産生量は 6 時間がピーク時間であったため (Fig. 5B and D)、今回測定した 12 時間では差が認められなくなったことが考えられた。

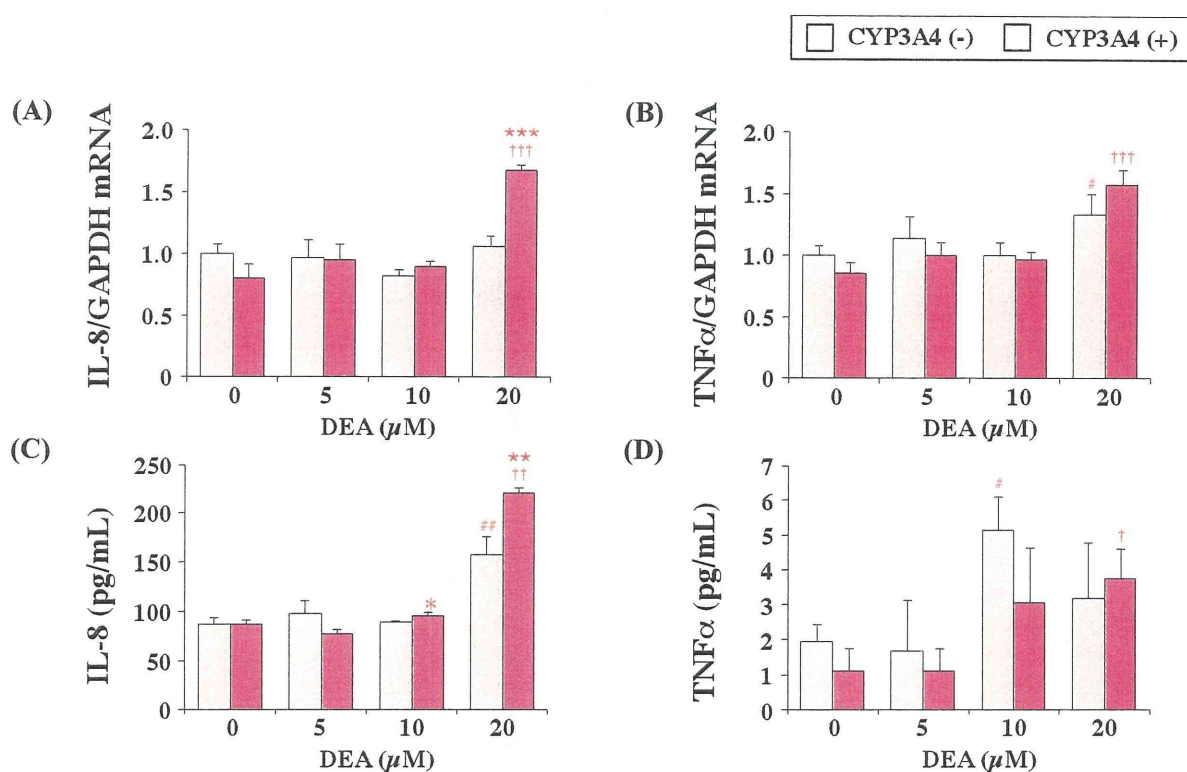


Fig. 7. Dose-dependent changes in mRNA levels and release of IL-8 and TNF α by desethylamiodarone 12 hrs-incubation in THP-1 cells. THP-1 cells were treated with the indicated concentrations of amiodarone. After incubation for 12 hrs, the mRNA expression levels of IL-8 (A) and TNF α (B) in THP-1 cells were measured by real-time RT-PCR analysis. After incubation for 12 hrs, the release of IL-8 (C) and TNF α (D) in supernatant was measured by ELISA. 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, †† P < 0.01 and ††† P < 0.001, compared with control (0.1% DMSO) in CYP3A4 (+) groups. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001, compared with CYP3A4 (-) groups of each concentration point.

C-8. HPLCによるAMD、DEAおよびDiDEAの定量

薬物処置したCYP3A4発現系処置により代謝物の生成量について検討した。AMD、DEAおよびDiDEAの生成量をHPLCを用いて2-9の方法に従い定量した。AMDおよびDEA処置後0、12、24時間後のAMD、DEAおよびDiDEA濃度を測定した。その結果、CYP3A4発現系マイクロソーム処置群でのAMD処置12時間後、DEAは7.4 mM生成し、DiDEAは検出されなかった (Table 3)。また、AMD濃度は処置時間依存的に減少した

(Table 3)。また、CYP3A4発現系マイクロソーム処置群でのAMD処置24時間後、DEAは11.7 mM、DiDEAは0.4 mM生成した (Table 3)。CYP3A4発現系マイクロソーム処置群でのDEA処置12時間後、DiDEAは0.3 mM生成した (Table 4)。CYP3A4発現系マイクロソーム処置群でのDEA処置24時間後、DiDEAは0.5 mM生成した (Table 4)。一方、コントロールマイクロソーム処置群においては、いずれの条件においても代謝物は検出されなかった (Tables 3 and 4)。

Table 3. Metabolism of amiodarone by CYP3A4 in vitro.

(hr)	CYP3A4 (-)			CYP3A4 (+)		
	AMD (μ M)	DEA (μ M)	DiDEA (μ M)	AMD (μ M)	DEA (μ M)	DiDEA (μ M)
0	33.4 \pm 8.0	ND	ND	24.2 \pm 4.8	2.8 \pm 0.7	ND
12	27.6 \pm 2.1	ND	ND	18.3 \pm 6.7	7.4 \pm 3.8	ND
24	28.6 \pm 2.6	ND	ND	17.1 \pm 4.7	11.7 \pm 4.5	0.4 \pm 0.1

Data represent the mean \pm SD (n = 3). ND: not detectable.

Table 4. Metabolism of desethylamiodarone by CYP3A4 in vitro.

(hr)	CYP3A4 (-)			CYP3A4 (+)		
	AMD (μ M)	DEA (μ M)	DiDEA (μ M)	AMD (μ M)	DEA (μ M)	DiDEA (μ M)
0	ND	16.0 \pm 1.4	ND	ND	16.3 \pm 3.4	0.3 \pm 0.2
12	ND	19.4 \pm 3.1	ND	ND	15.3 \pm 5.0	0.3 \pm 0.0
24	ND	19.2 \pm 6.5	ND	ND	19.2 \pm 6.2	0.5 \pm 0.3

Data represent the mean \pm SD (n = 3). ND: not detectable.

D. 考察

近年、免疫学的な薬物性肝障害が注目されており、その発症原因の一つとして薬物の代謝的活性化による反応性代謝物の生成が関与するといわれている (Holt et al., 2006; Lohse et al., 2010; Adams et al., 2010)。本研究では、ヒト単球由来細胞株である THP-1 細

胞と CYP3A4 発現系マイクロソームを用いて、代謝的活性化を考慮した肝障害性薬物に対する免疫の関与について評価可能な *in vitro* の系を構築した。

THP-1 細胞は皮膚感作性試験において、モルモットなどの動物を使用しない試験の *in vitro* 代替法として現在最も注目されており

(Ashikaga et al., 2002)、肝障害を惹起する報告のあるキシメラガトラン、トログリタゾン、メベンダゾールおよびテルビナフィンによる炎症反応を評価している (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009; Mizuno et al., 2011; Mizuno et al., 2010)。はじめに CYP3A4 により代謝的活性化を受けることが知られている肝障害性薬物において、THP-1 細胞の 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。

CD54 は接着分子として、特に抗原提示細胞と T 細胞と細胞間相互作用時に働く。CD54 は別名 intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) として知られ、T 細胞上の共刺激分子 lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) と結合し、T 細胞を活性化させる。また、ICAM-1 は細胞表面受容体としての機能を持ち、細胞内シグナル伝達の開始にも関与する (Lebedeva et al., 2005)。CD86 は補助刺激分子として、主にマクロファージまたは樹状細胞に発現し、第一シグナルとしての T 細胞への抗原提示の際に、第二シグナルとして T 細胞の活性化、活性化状態の維持に重要な役割を持つ (Greenwald et al., 2005)。また、THP-1 細胞上の CD54 および CD86 発現量は THP-1 細胞活性化の指標として、最も汎用されている (Ashikaga et al., 2006; Sakaguchi et al., 2007)。THP-1 細胞はマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞 (Yoshida et al., 2003) も存在するが、分化後よりも未分化の方が CD 発現量などの活性化マーカーは高感度であることが知られているため (An et al., 2009; Ashikaga et al., 2002)、今回の検討では未分化の THP-1 細胞を用いることとした。

また、詳細な実験条件として、Ashikaga ら (2006) の報告を参考にし、THP-1 細胞の前培養時間を 48 時間、細胞処置濃度 1×10^6 cells/mL および薬物処置時間は 24 時間とし

た。THP-1 細胞では CD54 および CD86 発現量は化合物処置後 24 時間においてプラトーとなることが報告されている。CYP3A4 濃度は今回の検討に用いた処置濃度である 15 nM まで CD 発現量に濃度依存性が認められ (data not shown)、これまでの当研究室での検討結果により、24 時間において薬物が十分代謝されると考えられる濃度において検討を行った。

今回の検討において、肝障害を惹起する報告があり、CYP3A4 により代謝的活性化を受けることが知られているアルベンダゾール、AMD、デシプラミン、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、タクリン、タモキシフェンおよびテルビナフィンの 10 種の薬物と、アルベンダゾールスルフォキシドおよび DEA の 2 つの代謝物による CD54 および CD86 の発現量を検討した。各薬物濃度は臨床での最高血中濃度の 30 倍を超えない濃度を用いた。また、THP-1 細胞の細胞生存率は CD 発現量に死細胞の影響が認められない条件において行った (Table 1)。

CD54 発現量は AMD および DEA 処置群において、CYP3A4 処置群において、有意に増加が認められ、CD86 発現量はアルベンダゾール処置により、CYP3A4 処置群において、有意に増加が認められた (Figs. 1A and B)。よって、アルベンダゾールおよび AMD に関して CYP3A4 による代謝的活性化を介し、THP-1 細胞の活性化が引き起こされることが示唆された。しかし、アルベンダゾールの反応性代謝物であるアルベンダゾールスルフォキシド処置では、CD86 発現量の有意な増加が認められなかった (Fig. 1B)。この結果は、アルベンダゾールスルフォキシドには THP-1 細胞からの炎症性サイトカインおよびケモカイン産生能を有しない報告 (Mizuno et al., 2011) と一致した。また、アル

ベンダゾールおよびアルベンダゾールスルフォキシド処置による CYP3A4 存在下での炎症性サイトカイン産生を測定した結果、増加傾向を示したが、軽微であった (data not shown)。また、アルベンダゾール処置では CYP3A4 存在下において CD86 発現量の増加は認められたが、CD54 発現量は CYP3A4 による変化は認められなかった (Figs. 1A and B)。一方、AMD および DEA 処置による CYP3A4 処置群において CD54 発現量の増加が認められたが、CD86 発現量は AMD および DEA 処置により変化は認められなかった。これらの原因として、THP-1 細胞の CD54 および CD86 の発現には細胞内シグナル伝達経路である MAPK が関与していることが報告されており (Miyazawa et al., 2008)、また、MAPK 同士はクロストークすることも報告されているため (Trompezinski et al., 2008)、これらの報告が今回の各薬物による CD 発現量の反応性に差異が認められたことを説明できるかもしれない。なお、今回検討を行ったその他の薬物に関しては、これまでに CYP3A4 により代謝的活性化を受けることが報告されているが、本試験系においては陰性であった。その原因として、例えば、アルベンダゾールおよびテルビナフィンなどのように代謝物よりも親化合物が強い免疫活性化作用をもつために CYP3A4 による変化が小さいこと、ジクロフェナクおよびレフルノミドなどのように代謝的活性化に CYP3A4 関与することが知られているが、それぞれにおいて主として CYP2C9 および CYP1A2 が関与すること、また、代謝的活性化により肝細胞に対し直接的な細胞障害性を示すが、免疫への関与は小さいことなどが考えられた。また、代謝的活性化に複数の酵素を介する薬物は本試験系のような単一酵素の実験系では評価できなかった可能性も

ある。しかし、アルベンダゾールおよびテルビナフィンなど親化合物が免疫細胞活性化作用を持つものでは CD 発現量が高く、これまでの報告のように親化合物による免疫細胞の活性化を評価することも可能であった。また、HLM や S9 のような複数の酵素存在下ではどの酵素が関与しているかを評価出来ないが、単一酵素存在下ではどの酵素が代謝的活性化に重要であるかを評価することが可能である。したがって、本試験系ではこのように単一酵素存在下における代謝的活性化による免疫への関与を、親化合物と同様に代謝物も考慮した評価が可能であるという特長を持つと考えられる。本試験系により、AMD および DEA 処置により、CYP3A4 処置による CD54 発現量の増加が認められ、親化合物および代謝物のいずれもが CYP3A4 により代謝的活性化を受け、THP-1 細胞を活性化させることを初めて明らかとした。したがって、AMD およびその代謝物に関してより詳細な検討を行うこととした。

AMD は Vaughan Williams の分類で主にクラス III 群に属する作用を有し、心室細動や心室性頻拍などに用いられるヨウ化ベンゾフラン誘導体の抗不整脈薬である (Gill et al., 1992)。しかし、AMD 服用による副作用発現頻度は高く、重篤な副作用として間質性肺炎、甲状腺機能障害および肝障害などが発現することも報告されているため、治療上の使用は限定されている。さらに、非常に大きな分布容積と、それに応じた 40–50 日の消失半減期を有し (Kannan et al., 1982; Stäubli et al., 1983)、脂肪組織、肝臓および肺に高濃度に蓄積する。AMD の血漿蛋白結合率は 96% であり、脂溶性が高いため、長期投与により広く体内に分布し、蓄積することが知られている (Lalloz et al., 1984)。

AMD の代謝に関しては、HLM を用いた *in*

in vitro の検討において DEA を生じることが報告され (Trivier et al., 1993)、ヒトにおいて DEA への代謝は主に肝臓中に存在する CYP3A4 および CYP2C8 が担うことが明らかにされた (Fabre et al., 1993; Ohyama et al., 2000a)。また、DEA は薬理的に AMD と同

等の抗不整脈作用を有し (Pallandi and Campbell, 1987)、DEA の血中および組織中濃度は AMD よりも高い (Brien et al., 1987)。また、DEA は CYP3A4 によりさらに代謝を受け、DiDEA を生成することも報告されている (Zhano et al., 2010)。

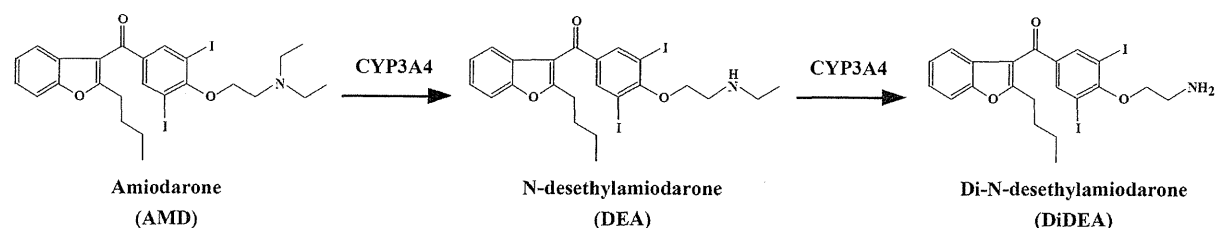


Fig. 8. Metabolisms of amiodarone by CYP3A4.

AMD による肝障害では、免疫学的な小葉中心壊死 (Lupon-Rosés et al., 1986; Breuer et al., 1998; Simon et al., 1990)、門脈域の炎症 (Lewis et al., 1990)、好中球の浸潤 (Atiq et al., 2009)、非アルコール性脂肪肝炎 (Singhal et al., 2003)、マロリー小体を伴う慢性肝障害 (Kang et al., 2007) および肝硬変 (Puli et al., 2005) などさまざまな病態を示す。AMD による肝障害の詳細な機序は不明であるが、AMD およびその代謝物である DEA および DiDEA の組織内蓄積によるミトコンドリア機能障害のため、毒性が発現することが示唆されている (Waldhauser et al., 2006; Bolt et al., 2001)。また、CYP3A4 の誘導により AMD がヒトへパトサイトに及ぼす細胞障害性が増強したことが示され、AMD の細胞毒性に CYP3A4 がリスクファクターとなることが示唆されている (Zhano et al., 2010)。以上のように、AMD による肝障害において、肝細胞に対する直接的な細胞障害性に関しては様々な研究がなされているが、AMD およびその代謝物について代謝的活性化を介した

免疫学的因子と肝障害との関連性を示した報告はない。

初めに、アミオダロンの肝障害に対する免疫学的因子の関与を明らかにするため、AMD および DEA 処置による細胞生存率を測定した (Fig. 2)。12 および 24 時間後において AMD および DEA 処置により薬物未処置と比較して、若干の有意な細胞生存率の低下が認められたが、コントロールミクロソーム処置群と CYP3A4 発現系処置群において、有意な細胞生存率の変化は認められなかった (Fig. 2)。また、12 時間後において認められた AMD および DEA 処置による細胞生存率の低下は、24 時間後には認められなかった。この原因として、THP-1 細胞の doubling time が 3×10^5 cells/mL で播種後の継代時には 24-48 時間であるため、今回の処置条件においても 24 時間では薬物処置により障害を受けても、障害の程度が軽度であれば若干の細胞増殖が行われ、24 時間後では細胞生存率の回復が認められたと考えられた。

次に、表面抗原分子として CD54 発現量、

炎症性サイトカインとして TNF α およびケモカインとして IL-8 の産生量を炎症反応の指標として検討を行った。

IL-8 は CXC ケモカインのひとつであり、主にマクロファージにより産生されるが、内皮細胞、繊維芽細胞、角化細胞、上皮細胞、好中球などによっても産生される (Baggiolini et al., 1994)。また、IL-8 の産生は TNF や IL-1、LPS などの外毒素の暴露によって誘導される (Strieter et al., 1989)。IL-8 の主な作用は好中球の活性化であり、*in vivo* における IL-8 の内皮投与は、ヒトを含む多くの動物種における好中球浸潤を惹起する (Leonard et al., 1991; Baggiolini et al., 1994)。アセトアミノフェン、トロバフロキサシン、ラニチジン、ハロタンなどの薬物性肝障害モデル動物において、好中球の肝臓への浸潤は、肝障害の発症に関与する重要な因子であると報告されている (Luyendyk et al., 2005; Liu et al., 2006; You et al., 2006; Shaw et al., 2009a)。

TNF α は細胞傷害や宿主防御などの炎症反応に関わる重要なサイトカインである。TNF α は主にマクロファージにより産生されるが、マスト細胞、肝星細胞、内皮細胞、線維芽細胞、神経細胞などによっても産生される (Wajant et al., 2003)。TNF α の産生は肝臓における炎症の初期段階の一つであり、他のサイトカイン産生を刺激し、炎症細胞の活性化や、初期創傷治癒を促進する (Braham et al., 1998; Luster et al., 2001)。また、TNF α は細胞傷害性を有し、肝細胞のアポトーシスやネクロシスを引き起こすことも報告されている (Bohlinger et al., 1996; Wang et al., 1995)。げっ歯類を用いた *in vivo* の研究では、アセトアミノフェン、トロバフロキサシン、スリンダク、ラニチジンなどの免疫学的機序による肝障害に TNF α が重要な役割を示すことが報告されている (Gardner et al., 2003;

Shaw et al., 2009b; Tukov et al., 2007; Zou et al., 2009)。

本研究では、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 (Fig. 2)、THP-1 細胞の CD54 発現量および IL-8、TNF α のタンパク産生量は増加した (Figs.3-7)。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。このことは、CD54 と IL-8 は DCs および THP-1 細胞の活性化の指標として有用であるという報告 (Mitjans et al., 2008; Nukada et al., 2008; Sakaguchi et al., 2007) を支持する結果となった。AMD および DEA 処置による経時的な IL-8 の mRNA 発現量およびタンパク質産生量に関して相関は認められているが (Fig. 3 and 4)、溶媒処置群において mRNA 発現量では各時間において変化は認められなかったが、タンパク質産生量では 0-3 時間後において増加が認められた。この原因として、溶媒処置群においてはおそらく処置後 1 時間において mRNA 発現量の増加は認められ、mRNA 発現量の増加は 3 時間後では回復したが、タンパク質は培養液中に安定に存在するため、mRNA とタンパク質産生量との間で、相関が認められないような部分も生じたと考えられた。このため、3 時間よりもっと早い 1 時間などのデータも測定すればより明らかとなると考えられる。これらのことが AMD 処置による経時的な TNF α の mRNA 発現量およびタンパク質産生量について、mRNA 発現量よりもタンパク質産生量のピーク時間が早いという (Fig. 4)、mRNA とタンパク質との相関が認められない結果を説明するかもしれない。

今回の検討では、AMD 濃度 20 mM および DEA 濃度 10 mM から炎症性サイトカイン産生量の有意な増加が認められた (Figs. 6 and 7)。ヒト *in vitro* 試験系を用いて薬物の作用

や副作用を評価する場合、試験系の薬物処置濃度と、臨床における薬物の暴露量との関連性を考慮する必要がある。AMD を服用していた患者の部検試料における血漿中AMD濃度は0.9-3.6 mM、DEA濃度は0.6-5.7 mMであり、肝臓中AMD濃度は7.1-1379.2 mM、DEA濃度は15.4-10530.2 mMであると報告されている (Berger and Harris, 1986)。このように、肝臓におけるAMDとDEAの濃度は血漿より2桁から3桁ほど高く、非常に高い蓄積性を示している (Berger and Harris, 1986)。しかし、ヒト肝臓におけるアミオダロン濃度を予測することは困難であり、*in vitro*の結果を単純に*in vivo*へ外挿することは出来ない。アミオダロンが*in vivo*においても炎症反応を惹起させ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と考えられる。

また、DEAはさらに脱エチル化しDiDEAを生成することが明らかとなり (Kozlik, 2003)、ヒトにおけるDiDEA血中濃度は約0.057 mMと、アミオダロンの30分の1以下であった (Ha et al., 2005)。このことは、今回の検討による、DiDEA生成量がAMDの約1%程度であったこと (Table 3) と一致した結果となった。DiDEAの生成量が、AMDおよびDEAの存在量と比較して少ない理由として、DEAはCYP3A4酵素活性を強く阻害すること (Ohyama et al., 2000b)、つまりAMDの代謝によりMBIが生じることが報告されているため、DiDEAへの代謝がDEAにより阻害されていることが考えられた。したがって、今回の検討よりCYP3A4存在下でのAMDおよびDEA処置によるCD54発現量および炎症性サイトカイン産生量の増加がDiDEAによることが考えられるが、上述のように生成量は微量であり、DiDEAのヒト組織中濃度はこれまでに報告されてい

いが、イヌにおいて心筋細胞にはDiDEAの血中濃度の80から190倍以上もの高濃度に存在することが知られている (Latini et al., 1984)。このため、この代謝物が与える免疫因子への影響にはより詳細な検討が必要であると考えられる。

以上より、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。

アミオダロン以外の肝障害性薬物に関しては、重篤な肝障害を引き起こす可能性があるとして、市場から撤退した薬物であるキシメラガトランまたはトログリタゾンの暴露により、THP-1細胞の炎症性サイトカイン産生が増加したという報告がある (Edling et al., 2008; Edling et al., 2009)。しかし、産生された炎症性サイトカインの種類、炎症性サイトカイン産生に要する薬物処置時間などはアミオダロンの場合と異なるため、薬物ごとにTHP-1細胞活性化の機序が異なるのかもしれない。以上の結果より、THP-1細胞の炎症性サイトカイン産生能を評価することは、免疫学的機序による薬物性肝障害の予測に有用であると考えられる。

今回の検討では、いくつかの免疫関連因子の活性化は認められたが、実際に薬物および反応性代謝物がタンパク質および細胞構成成分などと結合しているかを同定・評価できていない。そのため、CYP3A4によるTHP-1細胞の活性化が、AMDおよびDEAの代謝的活性化による生じるDiDEAの細胞構成成分との共有結合によるものか、AMDおよび

DEA が細胞外に添加したタンパク質である CYP3A4 とのアダクト形成により免疫原性を生じたことによるものかは不明である。Chipinda ら (2010) は THP-1 細胞と酵素誘導処理したラット肝 S9 とを共培養し、感作物質のハプテン化を評価している。この報告では、ハプテン化は細胞表面および細胞内タンパク質に対して生じると考えられている。また、Megherbi ら (2009) の報告では、THP-1 細胞に dinitrophenyl (DNP) 構造類似体を培養した結果、MAPK などの細胞内シグナル伝達経路のリン酸化と DNP 抗体で検出した細胞構成成分である活性システイン残基とのアダクト生成量との相関が認められている。本試験系においても、製薬企業が行っているような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。

今日、医薬品開発の初期において薬物の毒性を高感度に予測・評価することが重要であり、特に、代謝物の安全性を評価する試験系の開発が求められている。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。

<参考文献>

- Adams DH, Ju C, Ramaiah SK, Uetrecht J, and Jaeschke H (2010) Mechanisms of immune-mediated liver injury. *Toxicol. Sci.* **115**:307-321.
- Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3031-3038.
- Albano E, Rundgren M, Harvison PJ, Nelson SD, and Moldéus P (1985) Mechanisms of N-acetyl-p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* **28**: 306-311.
- An S, Kim S, Huh Y, Lee TR, Kim HK, Park KL, and Eun HC (2009) Expression of surface markers on the human monocytic leukaemia cell line, THP-1, as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Contact Dermatitis* **60**: 185-192.
- Ashikaga T, Hoya M, Itagaki H, Katsumura Y, and Aiba S (2002) Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol. In Vitro* **16**: 711-716.
- Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, and Toyoda H (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro.* **20**: 767-773.
- Atiq M, Davis JC, Lamps LW, Beland SS, and Rose JE (2009) Amiodarone induced liver cirrhosis. Report of two cases. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **18**: 233-235.
- Azam P, Peiffer JL, Chamousset D, Tissier MH, Bonnet PA, Vian L, Fabre I, and Ourlin JC (2006) The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **212**: 14-23.
- Baggiolini M, Dewald B, and Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**: 97-179.
- Berger Y and Harris L (1986) Pharmacokinetics, in *AMIODARONE Pharmacology, Pharmacokinetics, Toxicology, and Clinical effects*, (Harris L and Roncucci R eds) pp45-98, Medecine et Science Internationales, Paris
- Bohlinger I, Leist M, Gantner F, Angermüller S, Tiegs G, and Wendel A (1996) DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock. *Am. J. Pathol.* **149**: 1381-1393.
- Bolt MW, Card JW, Racz WJ, Brien JF, and Massey TE (2001) Disruption of mitochondrial function and cellular ATP levels by amiodarone and N-desethylamiodarone in

- initiation of amiodarone-induced pulmonary cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**: 1280-1289.
- Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, and Trautwein C (1998) Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* **275**: G387-392.
- Breuer HW, Bossek W, Haferland C, Schmidt M, Neumann H, and Gruszka J (1998) Amiodarone-induced severe hepatitis mediated by immunological mechanisms. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **36**: 350-352.
- Brien JF, Jimmo S, Brennan FJ, Ford SE, and Armstrong PW (1987) Distribution of amiodarone and its metabolite, desethylamiodarone, in human tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**: 360-364.
- Chipinda I, Ruwona TB, Templeton SP, and Siegel PD (2010) Use of the human monocytic leukemia THP-1 cell line and co-incubation with microsomes to identify and differentiate haptens and prohaptens sensitizers. *Toxicology* **280**: 135-143.
- Cosgrove BD, King BM, Hasan MA, Alexopoulos LG, Farazi PA, Hendriks BS, Griffith LG, Sorger PK, Tidor B, Xu JJ, and Lauffenburger DA (2009) Synergistic drug-cytokine induction of hepatocellular death as an in vitro approach for the study of inflammation-associated idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **237**: 317-330.
- Deng X, Stachlewitz RF, Liguori MJ, Blomme EA, Waring JF, Luyendyk JP, Maddox JF, Ganey PE, and Roth RA (2006) Modest inflammation enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: role of neutrophils and bacterial translocation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**: 1191-1199.
- Deng X, Luyendyk JP, Ganey PE, and Roth RA (2009) Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: hints from animal models. *Pharmacol. Rev.* **61**: 262-282.
- Edling Y, Sivertsson L, Andersson TB, Porsmyr-Palmertz M, and Ingelman-Sundberg M (2008) Pro-inflammatory response and adverse drug reactions: mechanisms of action of ximelagatran on chemokine and cytokine activation in a monocyte in vitro model. *Toxicol. In Vitro* **22**: 1588-1594.
- Edling Y, Sivertsson LK, Butura A, Ingelman-Sundberg M, and Ek M (2009) Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. *Toxicol. In Vitro* **23**: 1387-1395.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, and Katz SI (1993) An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 β in the initiation of primary immune responses in skin. *J. Immunol.* **150**: 3698-3704.
- Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA, and Baillie TA (2004) Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem. Res. Toxicol.* **17**: 3-16.
- Fabre G, Julian B, Joyeux H, and Berger Y (1993) Evidence for CYP3A4-mediated N-deethylation of amiodarone in human liver microsomal fraction. *Drug Metab. Dispos.* **21**: 978-985.
- Ganey PE, Luyendyk JP, Maddox JF, and Roth RA (2004) Adverse hepatic drug reactions: inflammatory episodes as consequence and contributor. *Chem. Biol. Interact.* **150**: 35-51.
- Gardner CR, Laskin JD, Dambach DM, Chiu H, Durham SK, Zhou P, Bruno M, Gerecke DR, Gordon MK, and Laskin DL (2003) Exaggerated hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking tumor necrosis factor receptor-1. Potential role of inflammatory mediators. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**: 119-130.
- Gill J, Heel RC, and Fitton A (1992) Amiodarone: An overview of its pharmacological properties, and review of its therapeutic use in cardiac arrhythmias. *Drug* **43**: 69-110.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, and Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 515-548.
- Guengerich FP (1995) Human cytochrome P-450 enzymes, in *Cytochrome P-450* (PR Ortiz de Montellano ed) pp. 473-535, New York Plenum, New York.
- Guengerich FP and McDonald JS (2007) Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem. Res. Toxicol.* **20**: 344-369.
- Guengerich FP (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**: 70-83.
- Ha HR, Bigler L, Wendt B, Maggiorini M, and Follath F (2005) Identification and quantitation of novel metabolites of amiodarone in plasma of treated patients. *Eur. J. Pharm. Sci.* **24**: 271-279.
- Hinson JA, Pumford NR, and Roberts DW (1995) Mechanisms of acetaminophen toxicity: Immunochemical

- detection of drug-protein adducts. *Drug Metab. Rev.* **27**: 72-92.
- Hoffmann KJ, Streeter AJ, Axworthy DB, and Baillie TA (1985) Identification of the major covalent adduct formed in vitro and in vivo between acetaminophen and mouse liver protein. *Mol. Pharmacol.* **27**: 566-573.
- Holt MP and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J.* **8**: E48-54
- Hongslo JK, Smith CV, Brunborg G, Søderlund EJ, and Holme JA (1994) Genotoxicity of paracetamol in mice and rats. *Mutagenesis* **9**: 93-100.
- 堀井 郁夫 (2001) 非臨床試験マニュアル (野村 謙、堀井 郁夫、吉田 武美 編) pp.335-347. 株式会社エル・アイ・シー、東京
- Hosomi H, Akai S, Minami K, Yoshikawa Y, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2010) An in vitro drug-induced hepatotoxicity screening system using CYP3A4-expressing and g-glutamylcysteine synthetase knockdown cells. *Toxicol. In Vitro* **24**: 1032-1038.
- Hulette BA, Ryan CA, Gerberick G.F (2002) Elucidating changes in surface marker expression of dendritic cells following chemical allergen treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**: 226-233.
- Jaeschke H (2005) Role of inflammation in the mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **1**: 389-397.
- Jenden DJ (1991) Difficulties in using animal data to predict pharmacological response in man. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **15**: 105-107.
- Kalgutkar AS, Gardner I, Obach RS, Shaffer CL, Callegari E, Henne KR, Mutlib AE, Dalvie DK, Lee JS, Nakai Y, O'Donnell JP, Boer J, and Harriman SP (2005) A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr. Drug Metab.* **6**: 161-225.
- Kannan R, Nademanee K, Hendrickson JA, Rostami HJ, and Singh BN (1982) Amiodarone kinetics after oral doses. *Clin. Pharmacol.* **31**: 438-444.
- Kang HM, Kang YS, Kim SH, Seong JK, Kang DY, Lee HY, and Lee BS (2007) Amiodarone-induced hepatitis and polyneuropathy. *Korean J. Intern. Med.* **22**: 225-229.
- Kaplowitz N (2001) Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf.* **24**: 483-490.
- Kenna J, Satoh H, Christ D, and Pohl L (1988) Metabolic basis for a drug hypersensitivity: antibodies in sera from patients with halothane hepatitis recognize liver neoantigens that contain the trifluoroacetyl group derived from halothane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**: 1103-1109.
- Knowles SR, Uetrecht J, and Shear NH (2000) Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* **356**: 1587-1591.
- Kozlik P (2003) Metabolism of amiodarone-biotransformation of mono-N-desethylamiodarone in vitro. Ph. D. Thesis Nr. 15287, ETH Zurich, Switzerland.
- Krishna DR and Klotz U (1994) Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin. Pharmacokinet.* **26**: 144-160.
- Lalloz MRA, Byfield PGH, Greenwood RM, and Himsworth RL (1984) Binding of amiodarone by serum proteins and the effects of drugs, hormones and other interacting ligands. *J. Pharm. Pharmacol.* **36**: 366-372.
- Latini R, Tognoni G, and Kates ER (1984) Clinical pharmacokinetics of amiodarone. *Clin. Pharmacokinet.* **9**: 136-156.
- Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, and Raffeld M (1991) Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J. Invest. Dermatol.* **96**: 690-694.
- Lewis JH, Mullick F, Ishak KG, Ranard RC, Ragsdale B, Perse RM, Rusnock EJ, Wolke A, Benjamin SB, Seeff LB, and Zimmerman HJ (1990) Histopathologic analysis of suspected amiodarone hepatotoxicity. *Hum. Pathol.* **21**: 59-67.
- Levedeva T, Dustin ML, and Sykulev Y (2005) ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 251-258.
- Liu ZX, Han D, Gunawan B, and Kaplowitz N (2006) Neutrophil depletion protects against murine acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* **43**: 1220-1230.
- Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Bruccoleri A, Blazka ME, and Yucesoy B (2001) Role of inflammation in

- chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* **120**: 317-321.
- Luyendyk JP, Shaw PJ, Green CD, Maddox JF, Ganey PE, and Roth RA (2005) Coagulation-mediated hypoxia and neutrophil-dependent hepatic injury in rats given lipopolysaccharide and ranitidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**: 1023-1031.
- Lohse AW, Weiler-Normann C, and Tiegs G (2009) Immune-mediated liver injury. *J. Hepatol.* **52**: 136-144.
- Lupon-Rosés J, Simó-Canonge R, Lu-Cortez L, Permanyer-Miralda G, and Allende-Monclús H (1986) Probable early acute hepatitis with parenteral amiodarone. *Clin. Cardiol.* **9**: 223-225.
- Mitjans M, Viviani B, Lucchi L, Galli CL, Marinovich M, and Corsini E (2008) Role of p38 MAPK in the selective release of IL-8 induced by chemical allergen in naive THP-1 cells. *Toxicol. In Vitro* **22**: 386-395.
- Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, and Nishiyama N. (2008) Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *J. Toxicol. Sci.* **33**: 51-59.
- Mizuno K, Katoh M, Okumura H, Nakagawa N, Negishi T, Hashizume T, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. *Drug Metab. Dispos.* **37**: 345-351.
- Mizuno K, Toyoda Y, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2011) Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.* In press.
- Mizuno K, Fukami T, Toyoda Y, Nakajima M, and Yokoi T (2010) Terbinafine stimulates the pro-inflammatory responses in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Life Sci.* **87**: 537-544.
- Nassar AE and Lopez-Anaya A (2004) Strategies for dealing with reactive intermediates in drug discovery and development. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **7**: 126-136.
- Njoku D, Laster M, Gong D, ElInd Eger, Reed G, and Martin JL (1997) Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. *Anesth. Analg.* **84**: 173-178.
- Nukada Y, Miyazawa M, Kosaka N, Ito Y, Sakaguchi H, and Nishiyama N (2008) Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor- α production. *J. Toxicol. Sci.* **33**: 175-185.
- Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, and Yokoi T (2000a) A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab. Dispos.* **28**: 1303-1310.
- Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H, and Yokoi T (2000b) Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: prediction of in vivo drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **49**: 244-253.
- Park BK, Kitteringham NR, Powell H, and Pirmohamed M (2000) Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**: 39-60.
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 177-202.
- Pallandi RT and Campbell TJ (1987) Resting, and rate-dependent depression of V_{max} of guinea-pig ventricular action potentials by amiodarone and desethylamiodarone. *Br. J. Pharmacol.* **92**: 97-103.
- Puli SR, Fraley MA, Puli V, Kuperman AB, and Alpert MA (2005) Hepatic cirrhosis caused by low-dose oral amiodarone therapy. *Am. J. Med. Sci.* **330**: 257-261.
- Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, and Black M (1989) Acetaminophen activation by human liver cytochromes P4502E1 and P4501A2. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**: 270-283.
- Riley RJ, Maggs JL, Lambert C, Kitteringham NR, and Park BK (1998) An in vitro study of the microsomal metabolism and cellular toxicity of phenytoin, sorbinil and mianserin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **26**: 577-588.
- Roth RA, Luyendyk JP, Maddox JF, and Ganey PE (2003) Inflammation and drug idiosyncrasy--is there a connection? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**: 1-8.

- Rougier N, Redziniak G., Schmitt D, and Vincent C (1998) Evaluation of the capacity of dendritic cells derived from cord blood CD34+ precursors to present haptens to unsensitized autologous T cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **110**: 348-352.
- Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, Yoneyama K, Hirota M, Itagaki H, Toyoda H, and Suzuki H (2006) Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human cell line activation test (hCLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro* **20**: 774-784.
- Sakaguchi H, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, and Suzuki H (2007) Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1. *Arch. Dermatol. Res.* **298**: 427-437.
- Satoh H, Gillette JR, Davies HW, Schulick RD, and Pohl LR (1985) Immunochemical evidence of trifluoroacetylated cytochrome P-450 in the liver of halothane-treated rats. *Mol. Pharmacol.* **28**: 468-474.
- Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, and Amigorena S (2008) Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity* **28**: 258-270.
- Shaw PJ, Hopfensperger MJ, Ganey PE, and Roth RA (2007) Lipopolysaccharide and trovafloxacin coexposure in mice causes idiosyncrasy-like liver injury dependent on tumor necrosis factor- α . *Toxicol. Sci.* **100**: 259-266.
- Shaw PJ, Fullerton AM, Scott MA, Ganey PE, and Roth RA (2009a) The role of the hemostatic system in murine liver injury induced by coexposure to lipopolysaccharide and trovafloxacin, a drug with idiosyncratic liability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **236**: 293-300.
- Shaw PJ, Beggs KM, Sparkenbaugh EM, Dugan CM, Ganey PE, and Roth RA (2009b) Trovafloxacin enhances TNF-induced inflammatory stress and cell death signaling and reduces TNF clearance in a murine model of idiosyncratic hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **111**: 288-301.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 414-423.
- Singhal A, Ghosh P, and Khan SA (2003) Low dose amiodarone causing pseudo-alcoholic cirrhosis. *Age. Ageing* **32**: 224-225.
- Simon JP, Zannad F, Trechot P, Thisse JY, Houplon M, and Aliot E (1990) Acute hepatitis after a loading dose of intravenous amiodarone. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **4**: 1467-1468.
- Stäubli M, Bircher J, Galeazzi RL, Remund H, and Studer H (1983) Serum concentrations of amiodarone during long term therapy. Relation to dose, efficacy and toxicity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **24**: 485-494.
- Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, and Marks RM (1989) Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- α , LPS, and IL-1 β . *Science* **243** (4897): 1467-1469.
- Tafazoli S, Spehar DD, and O'Brien PJ (2005) Oxidative stress mediated idiosyncratic drug toxicity. *Drug Metab. Rev.* **37**: 311-325.
- Thummel KE, Lee CA, Kunze KL, Nelson SD, and Slattery JT (1993) Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-p-aminobenzoquinone imine by human CYP3A4. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1563-1569.
- Trivier JM, Libersa C, Belloc C, and Lhermitte M (1993) Amiodarone N-deethylation in human liver microsomes: involvement of cytochrome P450 3A enzymes (first report). *Life Sci.* **52**: 91-96.
- Trompezinski S, Migdal C, Tailhardat M, Le Varlet B, Courtellemont P, Haftek M, and Serres M (2008) Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **230**: 397-406.
- Tukov FF, Maddox JF, Amacher DE, Bobrowski WF, Roth RA, and Ganey PE (2006) Modeling inflammation-drug interactions in vitro: a rat Kupffer cell-hepatocyte coculture system. *Toxicol. In Vitro* **20**: 1488-1499.
- Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, and Roth RA (2007) The role of tumor necrosis factor α in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury. *Toxicol. Sci.* **100**: 267-280.
- Utrecht JP (1999) New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the "danger hypothesis" and

- innate immune system. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 387-395.
- Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter R, and Monshouwer M (2005) An in vitro approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology* **216**: 154-167.
- Waldhauser KM, Torok M, Ha HR, Thomet U, Konrad D, Brecht K, Follath F, and Krähenbühl S (2006) Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**: 1413-1423.
- Walgren JL, Mitchell MD, and Thompson DC (2005) Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**: 325-361.
- Wajant H, Pfizenmaier K, and Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**: 45-65.
- Wang JH, Redmond HP, Watson RW, and Bouchier-Hayes D (1995) Role of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α in induction of hepatocyte necrosis. *Am. J. Physiol.* **269**: G297-304.
- Yoshida Y, Sakaguchi H, Ito Y, Okuda M, and Suzuki H (2003) Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line. *Toxicol. In Vitro* **17**: 221-228.
- Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M, and Asahi S (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol. In Vitro* **15**: 245-256.
- You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, and Ju C (2006) Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology* **44**: 1421-1431.
- Zahno A, Brecht K, Morand R, Maseneni S, Török M, Lindinger PW, and Krähenbühl S (2011) The role of CYP3A4 in amiodarone-associated toxicity on HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol.* **81**: 432-441.
- Zhou S, Chan E, Duan W, Huang M, and Chen YZ (2005) Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab. Rev.* **37**: 41-213.
- Zimmerman HJ (1999) Drug-induced liver disease. In *Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs other chemicals on the liver. 2nd ed.* pp. 427-456, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Zou W, Beggs KM, Sparkenbaugh EM, Jones AD, Younis HS, Roth RA, and Ganey PE (2009) Sulindac metabolism and synergy with tumor necrosis factor- α in a drug-inflammation interaction model of idiosyncratic liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**: 114-121.
- F. 健康危険情報
該当なし。
- G. 研究発表
1. 論文発表
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).
2. 学会発表
横井 毅、薬物代謝と毒性領域の前臨床試験の新たな展開、JBA バイオセミナーシリーズ；製薬、化学、食品、化粧品等に展開する安全創薬研、2013年1月8日、東京
- 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 2012年8月22-23日、三島.
- H. 知的財産券の出願・登録
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）
分担研究報告書

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

分担研究者 中島 美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授

近年、薬物または反応性代謝物による直接のストレスの他に、免疫細胞活性化に伴う炎症反応を介した肝障害が注目されている。アシルグルクロニド（AG）は比較的反応性が高いことから細胞毒性に対する関与が示唆されているが、その毒性を直接証明した報告はない。本研究では AG による細胞毒性について炎症性因子を指標として評価検討した。最初に、AG による炎症性因子の発現誘導についてヒト末梢血単球細胞（PBMC）を用いて評価し、ジクロフェナクアシルグルクロニド（DCF-AG）、プロベネシドアシルグルクロニド（Pro-AG）およびトルメチンアシルグルクロニド（Tol-AG）において炎症性因子の発現が誘導されることを見出した。また、DCF-AG が炎症性因子の発現を強く誘導することから、そのメカニズム解明のために MAPK 経路を解析した結果、DCF-AG による炎症性因子の発現誘導には p38 および c-Jun N-terminal kinase（JNK）経路が関与することが示された。次に、PBMC 中の各細胞に与える影響についてフローサイトメトリーにより検討した。PBMC 中の CD3 および CD19 陽性細胞に対する AG の影響は認められなかったが、CD14 陽性細胞においてのみ DCF-AG、Pro-AG および Tol-AG により細胞生存率の低下が認められた。また第 I 章と同様に、MAPK 経路の解析の結果、DCF-AG 処置による CD14 陽性細胞に対する細胞傷害には p38 経路が関与することを明らかにした。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。

A. 研究目的

薬物誘導性肝障害は、今日の医薬品開発や臨床における重大な問題の一つであり、医薬品の開発中止また販売中止となる主な原因である。臨床で使用されている 1000 以上の薬物は、発生頻度や重症度に差があるものの肝障害を起こす可能性

があると言われており、それら薬物の多くは、不安定な反応性代謝物が生成されることが報告されている (Kaplowitz, 2005; Oketani et al., 2011; Guengerich and MacDonald, 2007)。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し、これにより細胞毒性を示すと考えられている (Knowles et al., 2000; Park et al., 2000; Uetrecht, 1999)。

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。

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) による *N*-または *O*-グルクロニドの生成は主要な第 II 相薬物代謝反応の一つであり薬物の解毒に関与するが、カルボン酸含有薬物はグルクロン酸によりアシルグルクロニド (AG) を生成することが知られている。AG は反応性に富み、直接またはグルクロン酸内での分子内アシル転移を介して生体内タンパク質や高分子に共有結合することが知られており、これにより細胞毒性を示すと考えられている (Faed, 1984; Spahn-Langguth and Benet, 1992; Grillo et al., 2003)。また、リン酸カリウム緩衝液、ヒト血清アルブミンおよびヒト血漿中における AG の安定性と特異体質性の薬物毒性の発症頻度との相関関係を評価し、AG の安定性が副作用のリスクを予測する因子となり得ることが示唆されている (Sawamura et al., 2010)。しかしながら、実際に AG による細胞毒性を直接証明した報告はほとんどない。

近年、薬物あるいは反応性代謝物による細胞障害の機序に加え、免疫細胞の活性化による炎症反応が肝障害の発症および増悪に関与することが報告されている (Adams et al., 2010)。肝臓内には T 細胞、NK 細胞および NKT 細胞などのリンパ球や、クッパー細胞および類洞内皮細胞などの肝非実質細胞が豊富に存在しており、サイトカインを介した細胞間のネットワークを形成することにより免疫反応を制御している (Racanelli and Rehmann, 2006)。薬物あるいはその代謝物による刺激に加え、ストレスを受けた細胞や壊死細胞から放出される damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) などのシグナルは自然免疫および獲得免疫を含めた免疫応答の引き金になると考えられており、TNF α 、などの様々な炎症性サイトカインやケモカインが放出されることで、好中球やリンパ球の肝臓への浸潤や炎症反応を引き起こし、肝障害を悪化させると考えられている (Park et al., 2005; Holt and Ju, 2006; Kaplowitz, 2005) (Fig. 1)。当研究室においても、これら炎症反応を介した肝障害の研究について、*in vivo* および *in vitro* 両面からアプローチを行い、多くの研究成果を報告している (Higuchi et al., 2012; Yano et al., 2012; Endo et al., 2012)。

臓器移植後の拒絶反応の予防に用いられている Mycophenolic acid (MPA) は主に UGT2B7 によりアシル基がグルクロン酸抱合され MPA-AG が生成する (Shipkova et al., 1999; Picard et al., 2005)。MPA-AG はヒト単核白血球からの TNF α や IL-6 などのサイトカインの放出を促進させることが報告されている (Wieland et

al., 2000)。また、当研究室においてヒト UGT 発現系 HEK293 細胞およびヒトへパトサイトを用いて Diclofenac (DCF)、Ibuprofen (Ibu)、Ketoprofen および Naproxen (Nap) の AG による細胞傷害性および遺伝毒性を評価した結果、それらの毒性は認められなかったことから、AG の毒性に炎症反応が関与する可能性が考えられた (Koga et al., 2011)。

一般に、カルボン酸含有薬物はグルクロン酸により AG を生成することが知られている。本研究では AG を生成する薬物として下記に記す Diclofenac (DCF)、Ibuprofen (Ibu)、Naproxen (Nap)、Probenecid

(Pro) および Tolmetin (Tol) を選択した。Ibu、Nap および Pro は anaphylaxis、Stevens-Johnson 症候群の副作用を、DCF および Tol は上記に加え肝障害等の重篤な副作用発症を理由に、米国の Food and Drug Administration (FDA) で warning drugs に分類されている薬物であり、AG が毒性に関与することが疑われている (Sawamura et al., 2010)。

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 *in vitro* において評価し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

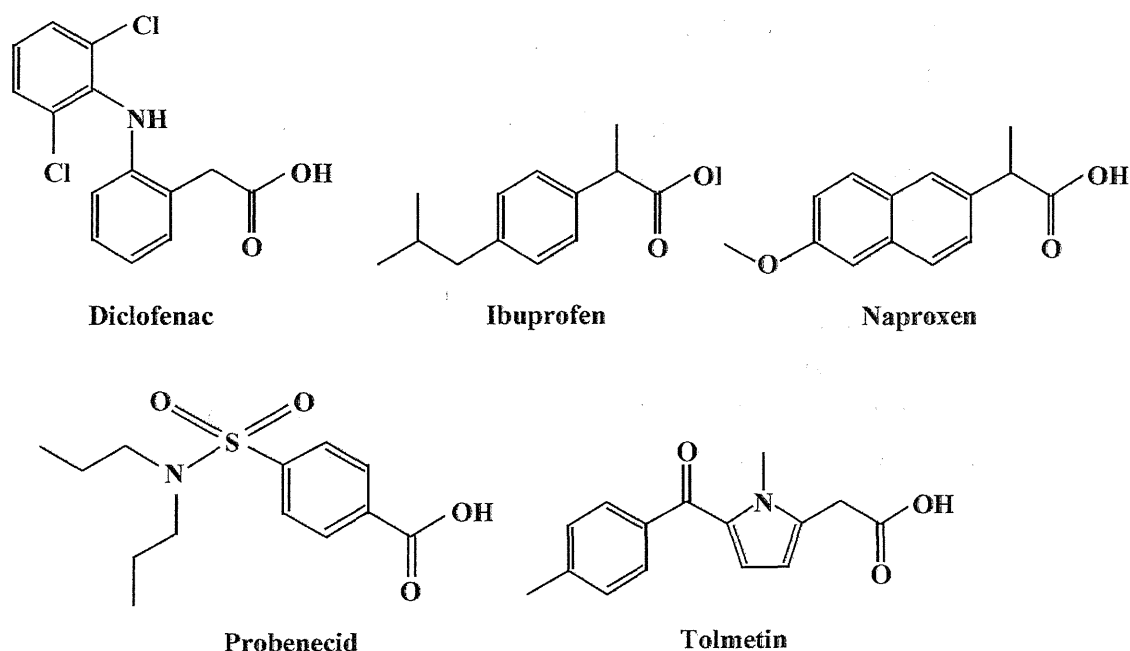


Fig. 1. Chemical structures of diclofenac, ibuprofen, naproxen, probenecid and tolmetin.

B. 実験方法

実験材料であるヒト末梢血単核球 (PBMC)、CTL-Anti Aggregate™ および CTL-Test™ medium は CTL (Ohio, USA) より購入した。ヒト非実質細胞入りへパ

トサイト (total liver cells) は ADMET Technologies (North Carolina, USA) より、肝細胞基本培地 (HBM™) および肝細胞添加セット (HCM™ single Quots) は Lonza (Basel, Swiss) より購入した。

Diclofenac Acyl- β -D-glucuronide、
4'-Hydroxy Diclofenac、5-Hydroxy
Diclofenac、(S)-Naproxen
Acyl- β -D-glucuronide、Ibuprofen
Acyl- β -D-glucuronide、Probenecid
Acyl- β -D-glucuronide、Tolmetin
Acyl- β -D-glucuronide は Toronto Research
Chemicals (Toronto, Canada) より購入した。
Diclofenac sodium salt および
(S)-(+)-6-Methoxy- α -methyl-2-naphthalene
acetic acid は Sigma-Aldrich (St Louis, MO)
より購入した。SB203580 は和光純薬工業
(Osaka, Japan) より、SP600125 は
Calbiochem (Los Angeles, CA) より購入し
た。ウサギ抗ヒト ERK1/2 抗体、ウサギ
抗ヒト Thr202/Thr204 リン酸化 ERK1/2 抗
体、ウサギ抗ヒト p38 抗体、ウサギ抗ヒ
ト Thr180/Thr182 リン酸化 p38 抗体、ウサ
ギ抗ヒト JNK1/2 抗体、ウサギ抗ヒト
Thr183/Thr185 リン酸化 JNK1/2 抗体は
Cell Signaling Technology (Beverly, MA)
より購入した。IRDye[®]680LT Conjugated
Goat (polyclonal) Anti-Rabbit IgG (H+L),
Highly Cross Adsorbed および Blocking
Buffer は Li-COR Biosciences (Lincoln, NE)
より購入した。

ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞
の培養および薬物処置は以下の方法で行
った。ヒト急性単球性白血病由来 THP-1
細胞は 10%FBS を含む RPMI1640 を培養
液として 10 cm プレートで培養した。継
代時、細胞培養液をピペッティングによ
り懸濁し、50 mL ファルコンに回収し、
3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。
得られた沈殿を再度培養液に懸濁し、10
cm プレートに播種し、5% CO₂ 存在下、
37°C で培養した。実験時、THP-1 細胞を

24-well または 96-well plate に 1×10^6
cells/well または 1×10^5 cells/well にて播種
し、同時に DCF および DCF-AG を処置し
5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。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。

ヒト末梢血単核球 PBMC の培養は以下
の方法で行った。ヒト末梢血単核球
PBMC は液体窒素中で凍結保存してある
ものを融解した後、19 mL の FBS-Free の
RPMI1640 に CTL-Anti Aggregate[™] を 1mL
加えた Wash 液に懸濁し 50 mL ファルコ
ンに回収した。2,000 rpm、常温で 10 分間
遠心分離した後、得られた沈殿を
CTL-Test[™] medium に懸濁し、24-well ま
たは 96-well plate に 3×10^6 cells/well ま
たは 5×10^5 cells/well にて播種した。同時
に各薬物を処置し 5% CO₂ 存在下、37°C で
培養した。薬物として DCF、DCF-AG、Pro、
Pro-AG、Tol、Tol-AG、Ibu、Ibu-AG、Nap
および Nap-AG を用いた。薬物処置後、
24-well plate を用いた検討では細胞培養
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。

ヒト非実質細胞入りヘパトサイトの培
養は以下の方法で行った。ヒト非実質細
胞入りヘパトサイト (Total liver cells) は
液体窒素中で凍結保存してあるものを融
解した後、HCM[™] single Quots を加えた肝
細胞基本培地 HBM[™] を培養液として 15
mL ファルコンに回収した。1,000 rpm、4°C
で 5 分間遠心分離した後、得られた沈殿
を HBM[™] に懸濁し、コラーゲンコートし
た 12-well plate に 7.5×10^5 cells/well にて
播種した。6 時間後、DCF および DCF-AG
を処置し 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。

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。

細胞生存率の測定は以下の方法で行った。24 時間培養した細胞生存率を CellTiter-Blue Cell viability Assay のマニュアルに従い、以下のように測定した。培

養後の 96-well plate に CellTiter-Blue Reagent 20 μ L を添加し、10 秒間振とう後、CO₂ インキュベーター内で 90 分間呈色反応を行った。その後、Wallac 1420 ARVOMX で蛍光 (excitation: 338 nm, emission: 458 nm) を測定した。

Table 1. Sequence of primers for real time PCR used in this study.

Target	Sequence
hGAPDH-FP	5'-AAA TGG GGT GAG GCC GGT-3'
hGAPDH-RP	5'-ATT GCT GAC AAT CTT GAGTGA-3'
hTNF α -FP	5'-CTT CTG CCT GCT GCA CTT TGG AG-3'
hTNF α -RP	5'-GGC TAC AGG CTT GTC ACT CGG-3'
hIL-8-FP	5'-CAG CCT TCC TGA TTT CTG CAG-3'
hIL-8-RP	5'-AGA CAG AGC TCT CTT CCA TCA
hMCP-1-FP	5'-ACC GAG AGG CTG AGA CTA AC-3'
hMCP-1-RP	5'-CAG GTG ACT GGG GCA TTG AT-3'
hGM-CSF-FP	5'-ATG ATG GCC AGC CAC TAC AA-3'
hGM-CSF-RP	5'-GCA GAA AGT CCT TCA GGT TC-3'
hIL-6-FP	5'-GAT TCC AAA GAT GTA GCC GC-3'
hIL-6-RP	5'-TGC CTC TTT GCT GCT TTC AC-3'

FP, forward primer; RP, reverse primer, GAPDH: Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, IL: Interleukin, MCP: Monocyte chemoattractant protein, TNF α : Tumor necrosis factor α , GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤処置は以下の方法で行った。PBMC を 3×10^6 cells/well にて 24-well plate に播種した。同時に MAPK 阻害剤として p38 活性化阻害剤である SB203580 を 2.5 μ M、または JNK 活性化阻害剤である SP600125

を 1 μ M、ERK 活性化阻害剤である U0126 を 10 μ M 処置した。阻害剤処置後 1 時間後に DCF および DCF-AG を 100 μ M 処置し、3 時間後および 24 時間後に細胞を回収した。

Total RNA の調製、Reverse transcription

(RT) 反応、Real-time RT-PCR による mRNA の測定、ホモジネートの調製およびタンパク質定量、SDS-PAGE および Western blot 解析は常法に従って行った。

統計解析において、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. DCF および DCF-AG が THP-1 細胞に与える影響の検討

DCF および DCF-AG が THP-1 細胞に与える影響について、細胞傷害性および炎症性因子の mRNA 発現変動の観点から解析した。処置濃度を 0、50 および 100 μM にて検討したところ、いずれの処置濃度においても THP-1 細胞の生存率は 70 % 以上であり、DCF-AG による THP-1 細胞に対する細胞傷害性は認められなかった (Fig. 2A)。また、上記の濃度において炎症性因子 mRNA の発現変動を解析した結果、DCF-AG 処置群において TNF α および IL-8 mRNA の濃度依存的な発現増加が認められた (Fig. 2B)。続いてこれら炎症性因子の経時的な発現変動を解析するために薬物処置 0、3、6、12 および 24 時間後における THP-1 細胞の mRNA 発現変動を解析した。その結果、DCF-AG 処置群において TNF α および IL-8 mRNA の時間依存的な発現増加が認められた。また TNF α では、DCF 処置群と比較し、DCF-AG 処置後 12 および 24 時間において、IL-8 では DCF 処置群と比較し、DCF-AG 処置後

6、12 および 24 時間において有意な発現の増加が認められた (Fig. 2B)。

以上より、DCF-AG により炎症性因子の発現が増加することが示唆された。AG による細胞障害性に、炎症性因子が関与することが考えられたことから、AG による免疫細胞に対する炎症性因子の発現変動に着目し、より詳細な検討を行うこととした。

C-2. DCF および DCF-AG が各細胞に与える影響の検討

薬物や化合物による炎症性因子が関与する反応を評価するヒト *in vitro* 試験系としては、ヒト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。THP-1 細胞以外にヒト PBMC、非実質細胞入りへパトサイトであるヒト total liver cells を用いて、DCF-AG による炎症性因子の発現変動を比較し、いずれの細胞においてより高感度に評価できるか検討した。THP-1 細胞において、DCF 処置群と比較し DCF-AG 処置群において IL-8、MCP-1 および TNF α mRNA の有意な増加が認められた (Fig. 3A)。GM-CSF および IL-6 mRNA に関しては検出限界以下であった (Data not shown)。PBMC (#48) において DCF 処置群と比較し DCF-AG 処置により IL-8、MCP-1、GM-CSF および IL-6 mRNA の有意な増加が認められた (Fig. 3B)。TNF α mRNA に関しては DCF および DCF-AG 処置による発現変動は認められなかった。Total liver cells (lot #H0614) において、DCF および DCF-AG 処置による炎症性因子の発現変動は認められなかつ