

- 10) Kyotaka Muta, Tatsuki Muta, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. *N*-glycosylation during translation is essential for human arylacetamide deacetylase enzyme activity. *Biochem. Pharmacol.*, **87**: 352-359 (2014).
- 11) Taishi Miyashita, Kento Kimura, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Evaluation and mechanistic analysis of the cytotoxicity of the acyl glucuronide of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Metab. Dispos.*, **42**: 1-8 (2014).
- 12) Kei Takahashi, Yuki Oda, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Regulation of cytochrome b5 expression by miR-223 in human liver; effects on cytochrome P450 activities. *Pharm. Res.*, **31**: 780-794 (2014).
- 13) Eita Sasaki, Kentaro Matsuo, Azumi Iida, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. *Toxicol. Sci.*, **136**: 250-263 (2013).
- 14) Kei Takahashi, Shin-ichi Yokota, Naoyuki Tatsumi, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **272**: 154-160 (2013).
- 15) Yukiko Kato, Takeshi Izukawa, Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Moshe Finel, Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima. Human UGT2B10 in drug N-glucuronidations: substrate screening and comparison with UGT1A3 and UGT1A4. *Drug Metab. Dispos.*, **41**: 1389-1397 (2013).
- 16) Ryota Higuchi, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Prilocaine- and lidocaine-induced methemoglobinemia is caused by human carbosylesterase-, CYP2E1- and CYP3A4-mediated metabolic activation. *Drug Metab. Dispos.*, **41**: 1220-1230 (2013).
- 17) Shingo 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.*, **41**: 1738-1743 (2013).
- 18) Ching Ho Poon, Tsz Yan Wong, Yanfei Wang, Yuki Tsuchiya, Miki Nakajima, Tsuyoshi Yokoi, and Lai K. Leung. The citrus flavanone naringenin suppresses

CYP1B1 transactivation through antagonizing xenobiotic-responsive element binding. *Br. J. Nutr.*, **109**: 1598-1605 (2013).

- 19) Makoto Kataoka, Yuki Terashima, Katsuhiko Miuno, Yoshie Masaoka, Shinji Saluma, Tsuyoshi Yokoi and Shinji Yamashita. Establishment of MDCKII cell monolayer with metabolic activity by CYP3A4 transduced with recombinant adovirus. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28**: 125-131 (2013).

#### F-5. 招待講演 (国内学会)

- 1) 横井 毅. 薬物性肝障害の動物モデルの作出と発症メカニズムの解析. シンポジウム「特異体質性薬物毒性の研究最前線」日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日 熊本市青年会館ホール、熊本
- 2) 中島美紀: 薬による microRNA の発現変動と薬効・副作用予測 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30 シンポジウム 熊本
- 3) 横井 毅. 薬の副作用発現の個人差と創薬. 名古屋大学 予防早期医療創成センター第 4 回ワークショップ 2014 年 1 月 29 日 名古屋大学野依記念学術交流館、名古屋
- 4) 横井 毅. 転写因子のマイクロ RNA に

よる発現制御機構. 近畿大学薬学部大学院特別講演、2013 年 12 月 7 日 近畿大学 39 号館講義室、大阪

- 5) 横井 毅. 薬物性肝障害における免疫学的因子の関与 シンポジウム「薬疹の理解に必要な免疫学」第 43 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 2013 年 11 月 29-31 日 ホテル日航金沢、金沢
- 6) 横井 毅. 薬物動態・毒性研究の創薬における重要性 2013 年 11 月 21 日 岐阜薬科大学特別講義 大学院講義室、岐阜薬科大学、岐阜
- 7) 横井 毅. 薬が効くヒトと効かないヒト-遺伝子多型と薬物相互作用- 第 9 回名古屋大学ホームカミングデイ公開講演会 2013 年 10 月 19 日 ES ホール、名古屋大、名古屋
- 8) 横井 毅. Biomarkers for Drug-induced Liver Injury. Symposium at 28<sup>th</sup> Japanese Society for the study of Xenobiotics (JSSX) 2013 年 10 月 9-11 日、船堀タワーホール、Tokyo
- 9) 中島美紀. New knowledge of the microRNA-mediated regulation of drug metabolism. Symposium at 28<sup>th</sup> Japanese Society for the study of Xenobiotics (JSSX) 2013 年 10 月 9-11 日、船堀タワーホール、Tokyo

- 10) 横井 毅. ミクロゾームの生化学. 金沢大学医学部 (特別講義) 2013 年 10 月 4 日、金沢大学医学部第 1 講義室、金沢.
- 11) 横井 毅. 薬効と毒性のバイオマーカーとしてのマイクロ RNA 第 50 回薬劑学懇談会研究討論会 (シンポジウム) 2013 年 6 月 26-28 日、ホテル シヤトレーゼガトーキングダムサッポロ、札幌
- 12) 横井 毅. 生体と薬物「薬物代謝酵素」福井大学医学部 (特別講義) 2013 年 6 月 6 日、福井大学医学部第 3 講義室、福井
- 13) 横井 毅. マイクロ RNA による薬物代謝酵素の活性変動と毒性バイオマーカーとしての可能性、(シンポジウム) 第 30 回日本 TDM 学会学術大会、2013 年 5 月 25-26 日、市民会館崇城大学ホール、熊本
- 14) 横井 毅. 転写因子のマイクロ RNA による発現制御機構、昭和薬科大学大学院特別講演、2013 年 5 月 16 日、昭和薬科大学講堂、町田
- 15) 横井 毅. 安全性・有効性のバイオマーカーとしてのマイクロ RNA、第 27 回日本薬物動態学会ワークショップ、基調講演、2013 年 5 月 9-10 日、学術総合センター一橋講堂、東京
1. Tsuyoshi Yokoi, Eita Sasaki, Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, Toshiyuki Kume. Identification of a P450-mediated hepatotoxicity-associated glutathione-conjugate of phenytoin in phenytoin-induced liver injury in mice. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March 23-27, 2014 Phoenix, USA
2. Eita Sasaki, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A novel mouse model for phenytoin-induced liver injury: involvement of immune-related factors and P450-mediated metabolism. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March 23-27, 2014 Phoenix, USA
3. Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Epigenetic regulation is a crucial factor for the tissue-specific expression of human UGT1A10. 53rd Annual Meeting and ToxExpo. March 23-27, 2014 Phoenix, USA
- F-7. 一般講演【国内学会】**
1. 黒川尚也、深見達基、中島美紀：ジルチアゼム加水分解酵素活性の種差の原因となる酵素の同定 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30 ポスター 熊本
- F-6. 一般講演【国際・国外学会】**
2. 古川陽一、織田進吾、加藤有紀子、深

- 見達基、中島美紀：ヒトおよびラットにおけるテルミサルタングルクロン酸抱合酵素活性の評価 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30  
ポスター 熊本
3. 加藤有紀子、織田進吾、畠山雅彦、岡崎道貴子、深見達基、横井 毅、中島美紀：ヒト UGT1A10 モノクローナル抗体の作製とその評価 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28-30  
ポスター 熊本
4. 深見達基、清水麻衣、渡邊旭延、中島彰紀、中島美紀、横井 毅：ヒト新規薬物加水分解酵素アリルアセタミドデアセチラーゼの基質特異性について 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 口頭 2013.11.17 金沢
5. 伊藤祐介、深見達基、中島美紀、横井 毅：ヒトにおけるプロベネシドアシルグルクロニド生成と分解を担う酵素の同定 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 口頭 2013.11.17 金沢
6. 岡崎道貴子、畠山雅彦、織田進吾、中島美紀：薬物代謝酵素ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)アイソザイムに対する特異的マウスモノクローナル抗体の作製 第 41 回静岡実験動物研究会 口頭 2013.10.18 静岡
7. Yukiko Kato, Takeshi Izukawa, Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Moshe Finel, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Human UGT2B10 in drug N-glucuronidation: substrate screening and comparison with UGT1A3 and UGT1A4. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, ポスター 東京
8. Eita Sasaki, Atsushi Iwamura, Toshiyuki Kume, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. A reactive metabolite formed by P450, which is readily subjected to glutathione conjugation, would be causal for phenytoin-induced liver injury. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, ポスター 東京
9. Masataka Nakano, Takuya Mohri, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Allele specific regulation of human CYP2E1 by a microRNA. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, 口頭 東京
10. Shingo Oda, Tatsuki Fukami, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima. Screening of specific inhibitors for human intestinal UGT1A8 and UGT1A10. 日本薬物動態学会第 28 回年会, 2013.10.9-11, ポスター 東京

11. 中野正隆、茂利拓也、深見達基、横井毅、中島美紀：ヒト CYP2E1 3'-UTR 上の SNP が miR-570 結合性およびヒト肝における CYP2E1 発現量に与える影響 第5回日本 RNAi 研究会 ポスター 2013.8.29-8.31 広島
12. 小田祐輝、中島美紀、深見達基、横井毅：miR-34a によるヒト retinoid X receptor a の発現制御は肝線維化の進行の一因となる 第5回日本 RNAi 研究会 ポスター 2013.8.29-8.31 広島
13. 中島美紀、山浦優、辰巳直之、高木信伍、深見達基、常山幸一、田尻和人、峯村正実、横井毅：肝疾患患者の血中 microRNA プロファイルを用いた病型診断法の検討 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
14. 辰巳直之、中島美紀、山浦優、深見達基、常山幸一、横井毅：NAFLD の進行に関与する肝臓中 microRNAs の解析：モデルラットを用いた検討 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
15. 宮下泰志、深見達基、中島美紀、横井毅：アシルグルクロニドによる細胞毒性のメカニズム解析 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
16. 松尾研太郎、樋口悟法、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：アザチオプリン誘導性肝障害マウスにおける発症メカニズムの解析 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
17. 伊藤祐介、深見達基、中島美紀、横井毅：プロベネシドからのアシルグルクロニド生成とその逆反応を担うヒト薬物代謝酵素の同定 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
18. 佐々木永太、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：フェニトイン誘導性肝障害マウスの作出と発症メカニズムの解明 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
19. 飯田あずみ、矢野 梓、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：ラットにおける代謝を考慮したカルバマゼピン誘導性肝障害のメカニズム解析 第40回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉
- G. 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）  
分担研究報告書

アミオダロン誘導性肝障害における代謝反応を考慮した  
毒性発現メカニズムに関する研究

主任研究者 横井 毅 名古屋大学大学院医学系研究科 教授

【背景・目的】 薬物性肝障害は本邦で 2007 年に合計 2,473 例の症例報告数がある重篤な副作用であり、900 以上の医薬品が原因薬物として挙げられている。薬物性肝障害は医薬品の臨床開発中止、市場撤退および警告の主要原因であるため、発症メカニズム解明に向けて代表的な肝毒性薬物であるアセトアミノフェンを用いて多くの検討がなされてきたが、毒性回避につながる情報を得るためには他の肝毒性薬物に関する知見を多く得る必要がある。

アミオダロン (AMD) は Vaughan-Williams 分類で III 群に分類される抗不整脈薬である。薬物性肝障害の発現頻度が高く、服用患者の約 4 分の 1 に血清中 ALT 値の上昇、1-3%に肝炎の症状が認められている。AMD の肝毒性発現には代謝物の関与が示唆されており、数種類ある AMD の代謝物の中でも主に CYP3A4 により生成されるデスエチルアミオダロン (DEA) はヒトにおいて最も高い血漿中濃度を示し、AMD 同様高い臓器蓄積性を示すことから毒性発現に関与していると考えられている。しかし、この仮説について実験動物を用いて検討した例はない。本研究では DEA 生成反応を触媒すると考えられる Cyp3a を誘導するデキサメタゾン (DEX) をマウスに投与することにより、AMD の代謝反応を考慮した肝毒性の発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【実験方法】 8 週齢の雄性 Balb/c マウスに DEX (60 mg/kg in corn oil *i.p.*) を 3 日間反復投与し、最終投与から 24 時間後に AMD (1000 mg/kg in corn oil., *p.o.*) を単回投与した。AMD 投与 0、1、3、6、12 および 24 時間後に血漿と肝臓を回収し、血漿中 ALT 値、血漿と肝臓中の AMD および DEA 濃度を測定した。同様の方法で AMD および DEX を投与したマウスに対して Cyp3a 阻害剤であるケトコナゾール (KTZ, 50 mg/kg in corn oil, *i.p.*) または Cyp 分子種非選択的阻害剤である 1-アミノベンゾトリ

アゾール (ABT, 100 mg/kg in saline, *i.p.*) を AMD 投与 1 時間前に投与し、AMD 投与 24 時間後の血漿中 ALT 値、血漿と肝臓中の AMD および DEA 濃度を測定した。また、AMD および DEX を投与したマウスにクッパー細胞の枯渇剤である GdCl<sub>3</sub> (10 mg/kg in saline, *i.v.*) を AMD 投与 48 および 24 時間前に投与し、AMD 投与 24 時間後の血漿中 ALT 値を測定した。さらに、肝臓中の炎症性因子の mRNA 発現量、GSH および GSSG 量、血漿中 triglyceride 量、肝臓中 ATP 量、肝細胞質中の cytochrome c および cleaved caspase-3 の発現量を測定した。

【結果・考察】 DEX 前投与により AMD 投与マウスにおいて ALT 値が有意に高値を示した。また、この投与群のマウスにおいて血漿中 AMD 濃度が、AMD 単独投与マウスと比較して有意に低値を示した一方、血漿中 DEA 濃度、肝臓中 AMD および DEA 濃度は有意な差異を示さなかった。DEA 濃度の上昇が認められなかったのは mechanism-based inhibition により DEA が cytochrome P450 に結合し、遊離 DEA として検出されなかったためと考えられる。一方、DEX 前投与した AMD 投与マウスにおいて血漿中 ALT 値と肝臓中 AMD もしくは DEA 濃度との間に有意な正の相関が認められ、肝臓中に AMD または DEA が貯留することが肝障害発症の原因である可能性が示された。続いて Cyp3a を阻害する KTZ を併用投与し、血漿中 ALT 値の低下が認められるか検討したが、差異は認められなかった。肝臓中 AMD 濃度は有意に低値を示したが、血漿および肝臓中の DEA 濃度の変化は認められなかったため、DEX による Cyp3a 誘導効果が KTZ による阻害効果より強力であったことが考えられる。一方、Cyp の全般的な阻害剤である ABT を併用投与したところ、ALT 値が有意に高値を示した。さらに血漿中 AMD 濃度、肝臓中 AMD もしくは DEA 濃度も有意に高値を示し、ALT 値とこれらの濃度との間に有意な相関関係が認められた。KTZ を併用投与したマウスにおいて肝臓中 AMD 濃度に変化が認められても血漿中 ALT 値に変動が認められなかったことから、親薬物の AMD 自身ではなく、肝臓中の DEA 濃度が AMD の肝毒性に関与することが示唆された。

DEX 前投与した AMD 投与マウスに GdCl<sub>3</sub> 併用投与したところ血漿中 ALT 値が有意に低値を示したため、肝障害に対するクッパー細胞の関与が考えられた。クッパー細胞は炎症性サイトカインの放出や活性酸素種等の産生による酸化ストレスの増強を介して肝障害を惹起させる。これら二つの因子の関与について検討したところ、

DEX 前処理した AMD 投与マウスにおいて IL-1 $\beta$ 、IL-18 等の炎症性サイトカインの mRNA の発現量は高値を示さず、酸化ストレスマーカーである肝臓中 GSH/GSSG 比は低値を示したことから、酸化ストレスの増強によりクッパー細胞が肝障害を発症させていることが示唆された。また、DEX 前投与した AMD 投与マウスにおいて血漿中 triglyceride 量が有意に高値を示したことからミトコンドリア内で起こる $\beta$ 酸化反応が低下していることが示唆され、ミトコンドリア毒性が発現していることが考えられた。ミトコンドリア毒性により細胞死が導かれる経路には ATP 減少によるネクロシス経路と cytochrome c がミトコンドリアから細胞質に放出された結果として caspase-3 が切断されることで生じるアポトーシス経路が存在する。DEX 前処理した AMD 投与マウスでは肝臓中 ATP 量に差異は認められず、cytochrome c および cleaved caspase-3 の発現が認められたため、デキサメタゾンによりアポトーシス経路が活性化され、肝細胞死が生じやすい条件となり、AMD による肝障害を増悪させている可能性が示された。

以上、本検討では DEX を前投与することで AMD 誘導性肝障害マウスを作製し、肝障害発症メカニズムとして、代謝物である DEA の肝臓への貯留、マクロファージによる酸化ストレスの増強、およびミトコンドリア毒性によるアポトーシス経路活性化が関わっていることを明らかにした。

#### A. 研究目的

薬物性肝障害は本邦において 2007 年までに 2,473 例の報告がある重篤な副作用であり (Kaniwa and Hasegawa, 2009)、900 以上の医薬品において肝障害が副作用として報告されている (Giri et al., 2010)。医薬品の臨床開発中止、市場撤退および警告の主要原因が薬物性肝障害であり (Kaplowitz, 2001, 2005)、近年では 2000 年にトログリタゾン、2004 年にネフアズドン、2005 年にペモリン、2006 年に

キシメラガトラン、2007 年にルミラコキシブが肝毒性が原因で市場から撤退している。また臨床でジクロフェナク、エリスロマイシン、フルクロキサシリンやハロタンなどの薬物により、薬物性肝障害が原因で死亡または肝移植に至ったケースも報告されている (Björnsson and Olsson, 2005)。このように薬物による肝毒性は製薬企業および薬物治療を受けている患者にとって考慮すべき重大な問題となっている。



薬物性肝障害の原因として肝臓で生成される反応性代謝物が注目されてきた。経口または静脈内に投与された薬物は門脈または循環血を通じて肝臓へ移行し、肝細胞中の CYP 等の薬物代謝酵素により代謝反応を受ける。この際、エポキシドやキノンなどの反応性の高い中間体が生成され、タンパク質や DNA のような生体高分子に結合することにより毒性を発現する。したがって、反応性代謝物生成の予測とその毒性への関与を実験レベルで証明することが前臨床試験において必要となる。

現在、肝毒性回避のために共有結合試験やトラッピング試験法などの *in vitro* 試験法が利用されているが、未だに肝毒性により臨床試験または医薬品の販売が中止される例があるため、現行の試験法でも肝毒性を完全に予測することは極めて難しいと考えられる。その原因は *in vitro* による毒性検出が細胞死やサイトカインの検出等に留まるため、実際に臓器特異的な毒性に帰結するかの判断が難しいことにある。したがって、実験動物に肝毒性を惹起させ、新規バイオマーカーの同定や反応性代謝物および免疫系の関与を明らかにし、発症メカニズムを解明することが薬物性肝障害の回避につながると考えられる。

これまで当研究室ではハロタン (Kobayashi et al., 2009)、カルバマゼピン (Higuchi et al., 2012c)、ジクロフェナク (Yano et al., 2012)、ジクロキサシリン (Higuchi et al., 2012b)、フルタミド (Higuchi et al., 2012a)、メチマゾール (Kobayashi et al., 2012) およびフェニトイン (Sasaki et al., 2013) を投与することでマウスに肝障害を惹起させ、免疫学的な視点から発症メカニズムを解析してきたが、*in vivo* において肝毒性に対する反応性代謝物の関与を示した例はカルバマゼピン (Higuchi et al., 2012c) とフェニトイン (Sasaki et al., 2013) のみであり、より多くの薬物について詳細に検討する必要がある。

アミオダロン (AMD) は Vaughan-Williams 分類で III 群に分類される抗不整脈薬であり、生命に危険のある再発性不整脈で他の抗不整脈薬が無効又は使用できない場合に経口剤が、生命に危険のある不整脈で難治性かつ緊急を要する場合および電氣的除細動抵抗性の心室細動あるいは無脈性心室頻拍による心停止に注射剤が用いられる (アンカロン錠 100 およびアンカロン注 150 インタビューフォーム)。AMD の代謝経路を Fig. 1 に示す (Ha et al., 2001, 2005; Kozlik et al., 2001; Trivier et al., 1992; Zahno et al., 2011)。

AMDの主代謝物はデスエチルアミオダロン (DEA) であり、主に CYP3A4 により *N*-脱アルキル化反応を受けることで生成される。DEA はさらに *N*-脱アルキル化を受けてジ-*N*-デスエチルアミオダロン (DiDEA) に変換される。AMD および DEA はそれぞれ水酸化を受けてヒドロキシアミオダロン (OH-AMD) および 3'-ヒドロキシデスエチルアミオダロン (3'-OH DEA) が生成する。OH-AMD の構造について詳細は不明である。また AMD、DEA および DiDEA から *O*-脱アルキル化や酸化的脱アミノ化を受けて *O*-デスアルキルアミオダロン (ODAA) やデアミノアミオダロン (DAA) も生成される。さらに脱ヨード化体の生成も報告されている (Trivier et al., 1992)。

AMD は薬物性肝障害の発現頻度が高いことが知られており、服用患者の約 4 分の 1 に血清中 ALT 値の上昇、1-3% に肝炎の症状が認められている (Lewis et al., 1989)。AMD の肝毒性発現には代謝物の関与が示唆されており、これまで *in vitro* において DEA、DiDEA、ODAA および DAA がミトコンドリア毒性や細胞毒性を示すことが報告されている (Spaniol et al., 2001; Waldhauser et al., 2006)。また、ラットの肝臓から単離したミトコンドリアに種々の AMD 誘導体を処置し、ミトコンド

リアに対する毒性を解析した結果から、ベンゾフラン環とそれに結合しているブチル基が毒性発現に関わっていること、脱ヨード体は毒性に関与しないことが示唆されている (Spaniol et al., 2001)。AMD の代謝物の中でも DEA はヒトにおいて最も高い血漿中濃度を示し (Ha et al., 2005; McDonald et al., 2012)、AMD 同様高い臓器蓄積性を示すことから (Adams et al., 1985) 毒性発現に大きく寄与していることが考えられる。これまで *in vitro* における検討により、HepG2 細胞に CYP3A4 発現系ミクロソーム存在下で AMD を処置することにより細胞毒性の増悪が認められたこと (Zahno et al., 2011)、ヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞に CYP3A4 発現系ミクロソーム存在下で AMD を処置することにより THP-1 細胞の活性化が認められたこと (Endo et al., 2012)、ラット肝細胞に AMD の誘導体を処置した結果より DEA、DiDEA、3'-OH DEA が毒性を示したこと (Waldhauser et al., 2006) が報告されており、いずれも CYP3A による代謝物が AMD の肝毒性に関与することを示唆している。Lu ら (2012) はラットに AMD とリポポリサッカライドを併用投与することで AMD 誘導性肝障害の惹起に成功しているが、DEA の生成量の観点から AMD 誘導性肝障害

の病状変化を検討していない。そのため、AMD 誘導性肝障害に代謝物が関与するか実験動物を用いて検討した例はない。

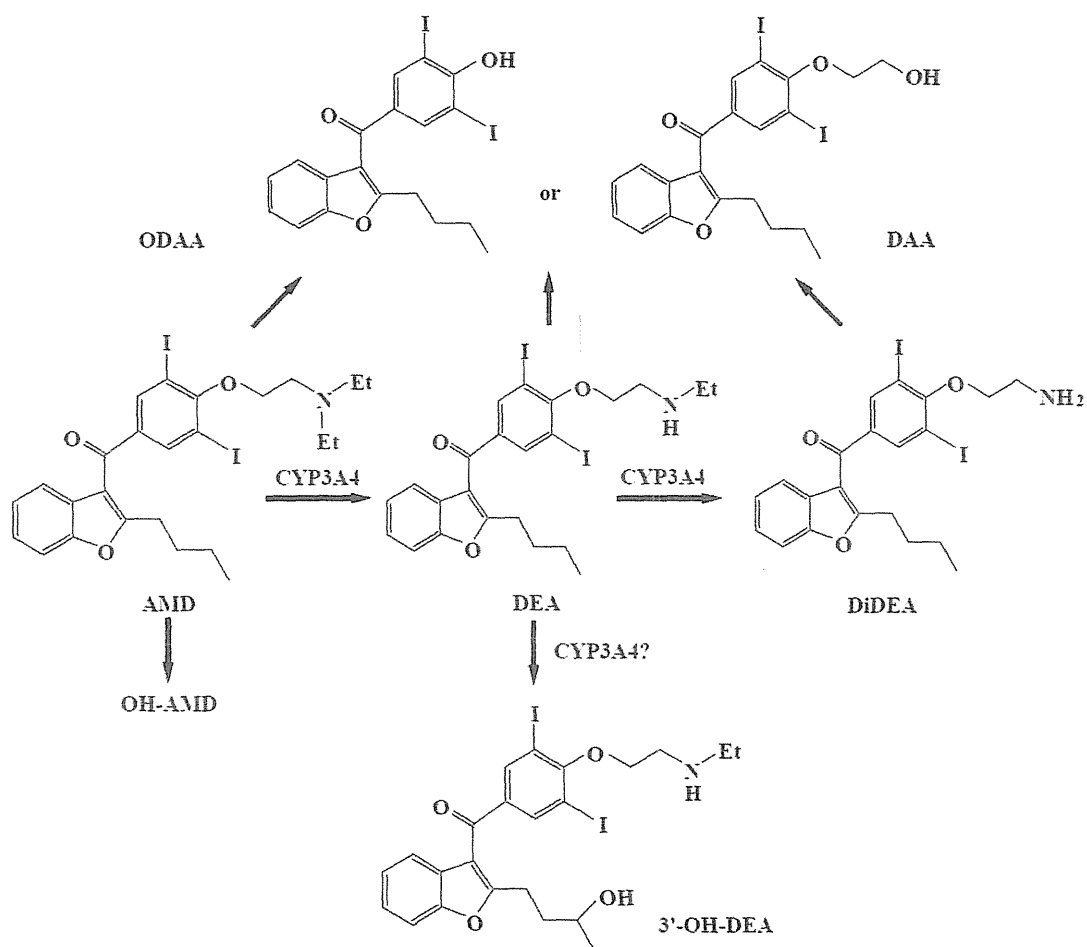


Fig. 1. Metabolic pathways of amiodarone in human. AMD: Amiodarone, DEA: Mono-*N*-desethylamiodarone, DiDEA; Di-*N*-desethylamiodarone, ODAA: *O*-Desalkylamiodarone, DAA: Deaminated-amiodarone, OH-AMD: Hydroxyamiodarone, 3'-OH DEA : 3'-Hydroxy-mono-*N*-desethylamiodarone.

本研究では AMD 誘導性肝障害に代謝物が関与するか検討するため、DEA 生成を触媒する Cyp3a を誘導するデキサメタゾン

をマウスに投与することにより、代謝反応を考慮した肝毒性の発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## B. 実験方法

## B-1 実験材料および実験試薬

アミオダロン塩酸塩と塩化ガドリニウムは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。デスエチルアミオダロンは大正製薬 (Tokyo, Japan) より御供与頂いた。1-アミノベンゾトリアゾールは東京化成工業より購入した (Tokyo, Japan)。5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)、デキサメタゾン、グルタチオン (GSH、還元型)、『組織の』ATP 測定キットは和光純薬工業 (Osaka, Japan) より、 $\beta$ -NADP<sup>+</sup>、 $\beta$ -NADPH およびグルタチオン還元酵素はオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) より購入した。富士ドライケムスライド GPT/ALT-PIII および TG-PIII は富士フィルム (Tokyo, Japan) より、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、RNAiso、ランダムヘキサマーおよび SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) は宝酒造 (Osaka, Japan) より購入した。Rox は (Stratagene, La Jolla, CA) 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。PVDF 膜 (Immobilon-P) は Millipore (Bedford, MA) より購入した。マウス抗 cytochrome c 抗体は Abcam (Cambridge, UK) より、ラット抗 cleaved caspase-3 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA) より、IRDye680 ヤギ抗マウ

ス IgG と IRDye680 ヤギ抗ラット IgG は LI-COR Biosciences (Cambridge, UK) より購入した。その他の試薬類は市販品の特級または生化学用のものを用いた。

## B-2 アミオダロンおよびデキサメタゾンの投与

本検討における動物実験については、すべて金沢大学動物実験指針に従って行った。Balb/cCrSlc マウス (雄性、8 週齢; 日本 SLC, Shizuoka, Japan) を馴化飼育後、デキサメタゾン (60 mg/kg in corn oil) を 10 mL/kg で 3 日間腹腔内投与した。デキサメタゾン最終投与から 24 時間後に AMD (1,000 mg/kg in corn oil) を 10 mL/kg で経口投与した。デキサメタゾンの投与量は Scheer ら (2010) の報告を、AMD の投与量は Kikkawa ら (2006) の報告を参考にした。AMD 投与 0、1、3、6、12 および 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

## B-3 ケトコナゾールの投与

ケトコナゾールの投与方法は Jin ら (2009) の方法に従った。2-2 に準じてデキサメタゾンおよび AMD を投与し、ケトコナゾール (50 mg/kg in corn oil) を AMD 投与 1 時間前に腹腔内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

## B-4 1-アミノベンゾトリアゾールの投与

1-アミノベンゾトリアゾールの投与方法

は Shimizu ら (2009, 2011) の方法を参考にした。2-2 に準じてデキサメタゾンおよび AMD を投与し、1-アミノベンゾトリアゾール (100 mg/kg in saline) を AMD 投与 1 時間前に腹腔内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

#### B-5 塩化ガドリニウムの投与

塩化ガドリニウムの投与法は Mosher ら (2001) の方法を参考にした。2-2 に準じてデキサメタゾンおよび AMD を投与し、塩化ガドリニウム (10 mg/kg in saline) を AMD 投与 48 および 24 時間前に静脈内投与した。AMD 投与 24 時間後に下行大静脈より採血し、肝臓を採取した。

#### B-6 血漿および肝臓中のアミオダロン およびデスエチルアミオダロンの定量

血漿からの AMD および DEA の抽出法は Shayeganpour ら (2007) の方法を参考にし、一部変更を加えた。血漿 50 mL にアセトニトリル 150 mL と内標準物質として 500 mM a-ナフトフラボン 20 mL を加えて激しく攪拌し、12,000g、4°C で 5 分間遠心分離を行った。上清を試験管に移し、ジクロロメタン 2 mL を加えて激しく攪拌し、2,000g、4°C で 5 分間遠心分離を行った。有機溶媒層を新たな試験管に移し、40°C で窒素気流下で留去した。残渣を 200 mL の移動相に溶解し、90 mL を HPLC に注入した。

肝臓からの AMD および DEA の抽出法は Merot ら (1999) の方法を参考にし、一部変更を加えた。肝臓 100 mg に対して精製水 100 mL を加えてエッペンホモジナイザーによりホモジナイズし、加えた精製水の 2 倍容のアセトニトリルと内標準物質として 500 mM a-ナフトフラボン 20 mL を加えて激しく攪拌し、12,000g、4°C で 5 分間遠心分離を行った。上清を試験管に移し、ジクロロメタン 2 mL を加えて激しく攪拌し、2,000g、4°C で 5 分間遠心分離を行った。有機溶媒層を新たな試験管に移し、40°C で窒素気流下で留去した。残渣を 200 mL の移動相に溶解し、90 mL を HPLC に注入した。

HPLC の測定条件は Ohyama ら (2000b) の方法を参考にした。HPLC 装置にはポンプ (日立、L-2400)、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> UG (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 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。

#### B-7 テストステロン 6β-水酸化酵素活性の測定

テストステロン 6β-水酸化酵素活性を以下のように測定した。最終濃度が 0.1

mg/mL マウス肝ミクロソーム、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、100 mM テストステロンとなるように精製水を加えて全量を 180 mL とした。37°C、3 分間プレインキュベーションし、NADPH 生成系を 20 mL 添加することで反応を開始した。37°C で 10 分間インキュベーションさせた後にジクロロメタン 2 mL と 3 M 塩化ナトリウム 1 mL を加えて反応を停止させた。内標準物質として 20 mM コルチコステロンを 20 mL 加えて激しく攪拌した後、2,000g、4°C で 5 分間遠心した。有機溶媒層を新たな試験管に移し、40°C で窒素気流下で留去した。残渣を 200 mL の移動相に溶解し、40 mL を HPLC に注入した。HPLC 装置は 2-6 と同じものを用いた。カラムは COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (4.6mmI.D.×150mm)、移動相は 50% メタノール / 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) とした。流速は 1 mL/min、カラム温度 35°C とし、溶離液を 240 nm でモニターした。

#### B-8 肝臓中 GSH および GSSG 量の測定

肝臓 100 mg に 5% 5-アセチルサリチル酸 1 mL を加えてエッペンホモジナイザーでホモジナイズし、4°C、6,500g で 10 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移して GSH 用サンプルとした。GSSG 測定用サンプルは GSH 用サンプル 100

mL に対して 4 mL の 2-ビニルピリジンを加えて 1 分間激しく攪拌し、60 分間室温でインキュベーションすることで調製した。96 well プレートに 0.3 mM β-NADPH を 140 mL、6 mM の 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) を 25 mL 加えて 5 分間室温で反応させた後、GSH 用または GSSG 用サンプルを 20 mL ずつ加えた。グルタチオン還元酵素溶液 (4 units/mL) を 25 mL 加え、5 分後 405 nm の吸光度を Biotrak II プレートリーダー (GE Healthcare) を用いて測定した。

#### B-9 肝臓中 ATP 量の定量

肝臓中 ATP 量の定量法はプロトコールの方法に、一部変更を加えた。肝臓 10 mg に対して精製水 1 mL を加えてエッペンホモジナイザーによりホモジナイズし、1,000 g、4°C で 10 分間遠心分離を行った。上清 100 mL を分取し、700 mL の homogenate buffer を加えた。この混合液から 100 mL を分取して ATP 抽出試薬 100 mL を加えた。4~5 回転倒混和を行った後で 30 分間静置した。混合した溶液 100 mL を 96 well プレートに加えた後、Wallac 1420 ARVOSx マルチラベルカウンタにセットし Luciferin/Luciferase 試薬 100 mL を添加することで発光強度を測定した。

Table 1. Sequences of primers for real-time RT-PCR.

Gene		Sequence
Fas	F	5' - CCTGACCCAGAATACCAAG - 3'
	R	5' - TAGGCGATTTCTGGGACTTTG - 3'
FasL	F	5' - AGAAGGAACTGGCAGAACTC - 3'
	R	5' - GCGGTTCCATATGTGTCTTC - 3'
IL-1 $\beta$	F	5' - GTT GAC GGA CCC CAA AAG AT - 3'
	R	5' - CAC ACA CCA GCA GGT TAT CA - 3'
IL-6	F	5' - CCA TAG CTA GGA GTA CA - 3'
	R	5' - GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA - 3'
IL-18	F	5' - GACATCTTCTGCAACCTCCA - 3'
	R	5' - CGGCCAAAGTTGTCTGATTC - 3'
IFN $\gamma$	F	5' - CCTAGCTCTGAGACAATGAACG - 3'
	R	5' - ACCATCCTTTTGCCAGTTCCTC - 3'
MIP-2	F	5' - AAG TTT GCC TTG ACC CTG AAG - 3'
	R	5' - ATC AGG TAC GAT CCA GGC TTC - 3'
MCP-1	F	5' - TGT CAT GCT TCT GGG CCT G - 3'
	R	5' - CCT CTC TCT TGA GCT TGG TG - 3'
T-bet	F	5' - CAAGTGGGTGCAGTGTGGAAAG - 3'
	R	5' - TGGAGAGACTGCAGGACGATC - 3'
TNF $\alpha$	F	5' - TGT CTC AGC CTC TTC TCA TTC C - 3'
	R	5' - TGA GGG TCT GGG CCA TAG AAC - 3'
$\beta$ -actin	F	5' - ACG GCC AGG TCA TCA TCA CTA TTG G - 3'
	R	5' - CTA GGA GCC AGA GCA GTA ATC TC - 3'

F: Forward, R: Reverse, FasL: Fas ligand, IL: Interleukin, IFN: Interferon, MIP: Macrophage inflammatory protein, MCP: Monocyte chemoattractant protein, TNF: Tumor necrosis factor.

B-10 SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング  
 プル処理液 160 mL と 2-メルカプトエタノール 25 mL を混合したものをサイトゾルタンパク質 50 mg に加え、100 °C で 3 分間煮沸し、厚さ 1 mm、15% ポリアクリルアミドゲル、電気泳動用緩衝液を用いて SDS-PAGE を行った。その後、transfer  
 Cytochrome c および cleaved caspase-3 のタンパク質発現量は 2-7 で得た肝サイトゾルを用いて SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングにより定量した。サン

cell を用い、電氣的にゲル上のタンパク質を PVDF 膜に 10 V で 30 分間転写した。その際、ろ紙、ポリアクリルアミドゲル、PVDF 膜は転写用緩衝液に浸して行った。転写後、PVDF 膜を PBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄し、Odyssey blocking buffer に浸し、ブロッキングを 1 時間行った。1 次抗体として、マウス抗 cytochrome c 抗体 (1:200) およびラット抗 cleaved caspase-3 抗体 (1:1000) を用いて、それぞれ 0.1 % Tween 20/Odyssey blocking buffer を用いて希釈した。2 次抗体として IRDye680 ヤギ抗マウス IgG または IRDye680 ヤギ抗ラット IgG を 0.1% Tween 20/Odyssey blocking buffer で 500 倍希釈したものをを用いた。1 次抗体反応、2 次抗体反応ともに室温で 1 時間反応させた。1 次抗体反応後は 0.1% PBST で 5 分間ずつ 4 回、2 次抗体反応後は 0.1% PBST で 5 分間ずつ 3 回、さらに PBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄した。バンドの検出には Odyssey インフラレッドイメージングシステム (LI-COR Biosciences, Cambridge, UK) を用いた。

#### B-11 統計解析

2 群間における統計学的評価は Student's *t*-test 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 アミオダロン投与マウスの血漿中 ALT 値に対するデキサメタゾンの影響

Balb/c マウスに AMD を単回投与したところ、血漿中 ALT 値は 6 時間後に軽微な上昇を示し、24 時間後には正常値まで低下した (Fig. 2)。そこで、デキサメタゾン前処理することで AMD による肝障害を惹起されるか検討を行った。デキサメタゾンを 3 日間反復投与することで ALT 値が上昇したものの、6 および 24 時間後においても同じ値で推移した。デキサメタゾン前処理したマウスに AMD を投与したところ、6 および 24 時間後における血漿中 ALT 値が有意に高値を示し、時間依存的な ALT 値の上昇が認められた (Fig. 2)。

#### C-2 血漿および肝臓中アミオダロンおよびデスエチルアミオダロンの濃度

AMD 投与 24 時間後の血漿および肝臓中の AMD および DEA 濃度の測定を行った。AMD のみを投与したマウスと比較して、デキサメタゾン前処理したマウスにおいて血漿中 AMD 濃度が有意に低い値を示し、血漿中 DEA 濃度は高値を示す傾向が認められた (Fig. 3)。また、肝臓中 AMD の濃度はデキサメタゾン前処理の有無による差が認められず、肝臓中デス



エチルアミオダロン濃度は高値を示す傾向が認められた (Fig. 3)。

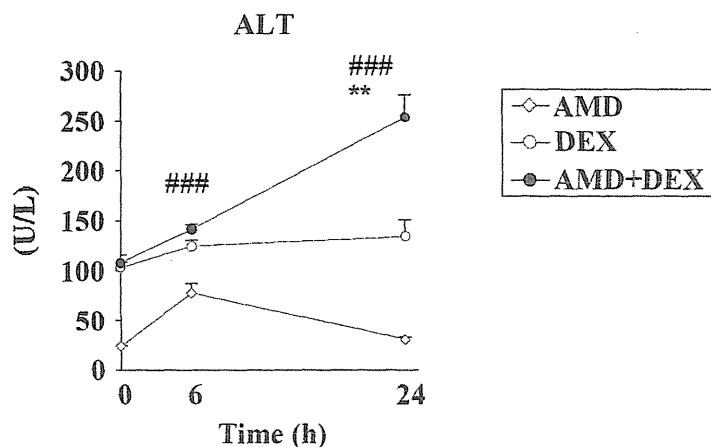


Fig. 2. Time-dependent changes of plasma ALT levels in AMD-, dexamethasone (DEX)- or AMD+DEX-administered mice. Mice were administered DEX (60 mg/kg, *i.p.*) for 3 days. Twenty-four hours after the final administration of DEX, mice were treated with AMD (1000 mg/kg, *p.o.*). At 0, 6 and 24 h after the AMD administration, blood was collected for assessment of the plasma ALT levels. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  to 8).  $^{###}p < 0.001$ , compared with AMD-administered mice.  $^{**}p < 0.01$ , compared with DEX-administered mice.

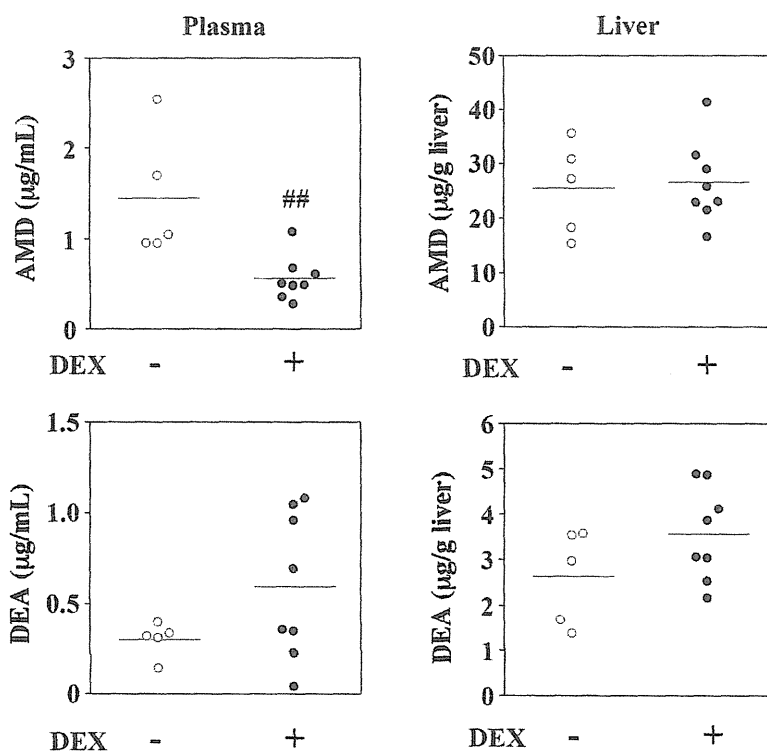


Fig. 3. Concentrations of AMD and DEA in plasma or liver in AMD- and AMD+DEX-administered mice.  $^{##}p < 0.01$ , compared with AMD-administered mice.

デキサメタゾン前処理した AMD 投与マウス 8 匹における血漿中 ALT 値と血漿および肝臓中 AMD および DEA 濃度との関係を評価した (Fig. 4)。血漿中 ALT 値と血漿中 AMD もしくは DEA 濃度には有意な相関関係が認められなかったが、肝

臓中 AMD もしくは DEA 濃度との間に有意な正の相関が認められた (Fig. 4)。したがって、肝臓中に AMD または DEA が貯留することが ALT 値上昇の原因である可能性が示された。

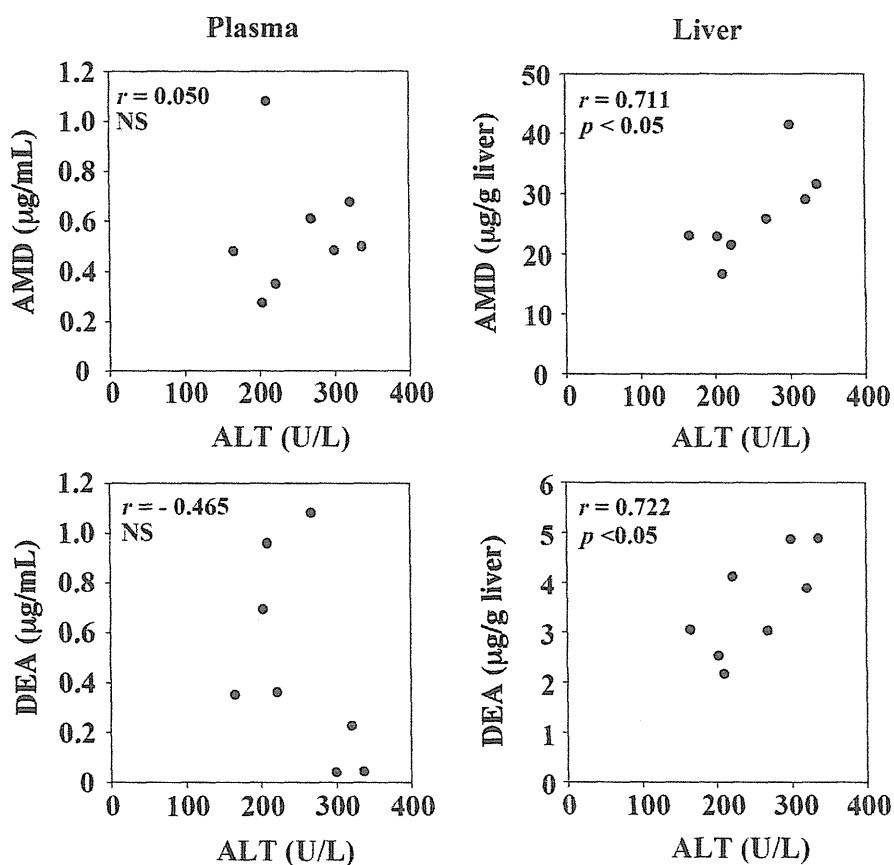


Fig. 4. Correlation between plasma ALT level and concentrations of AMD and DEA in plasma or liver. NS: Not significant.

C-3 ケトコナゾール併用投与がデキサメタゾンを前処理したアミオダロン投与マウスの肝障害に与える影響

ヒトにおいて AMD は主に CYP3A4 に

より DEA に代謝される (Fig. 1)。デキサメタゾン前処理により AMD 投与マウスの血漿中 ALT 値が上昇した原因が DEA によるものであるか検討するため、Cyp3a

を阻害することが知られているケトコナゾール (Wilson VS and LeBlanc GA , 2000) を併用投与し、血漿中 ALT 値に差異が認められるか検討し、Fig. 5 に示すように結

果としてケトコナゾール併用投与の有無により血漿中 ALT 値に差異が認められなかった。

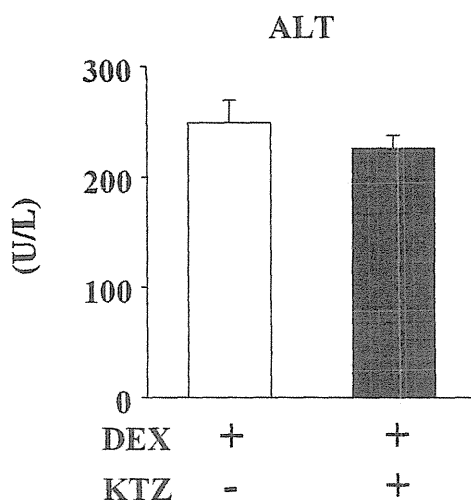


Fig. 5. Effects of ketoconazole (KTZ) on plasma ALT levels in AMD+DEX-administered mice. Mice were administered DEX (60 mg/kg, *i.p.*) for 3 days. One hour before AMD administration, mice were treated with KTZ (50 mg/kg, *i.p.*). Twenty-four hours after the final administration of DEX, mice were treated with AMD (1000 mg/kg, *p.o.*). Twenty-four hours after the AMD administration, blood was collected. Data are mean  $\pm$  SEM (n = 4 and 5)

ケトコナゾールにより血漿および肝臓中の AMD 濃度と DEA 濃度に変化が認められるか検討した。ケトコナゾールを併用投与したマウスにおいて併用投与しなかったマウスと比較して血漿中 AMD 濃度および DEA 濃度の差異は認められなかった。また肝臓中 AMD 濃度はケトコナゾールを併用投与したマウスにおいて有意に低いことが示され、肝臓中 DEA 濃度は低値を示す傾向が認められたものの、肝

臓中 AMD 濃度も低値を示したことからケトコナゾールが DEA 生成を阻害したことによるものか不明であった (Fig. 6)。したがって、ケトコナゾール投与により DEA 生成の阻害は確認できなかった。

C-4 1-アミノベンゾトリアゾール併用投与がデキサメタゾンを経前処理したアミオダロン投与マウスの肝障害に与える影響  
Cyp 分子種を非特異的に阻害する 1-ア

ミノベンゾトリアゾールをデキサメタゾン前処理した AMD 投与マウスに併用投与し、血漿中 ALT 値に違いが認められるか検討し、その結果 1-アミノベンゾトリ

アゾール併用投与を行っていないマウスと比較して併用投与を行ったマウスにおいて血漿中 ALT 値が有意に高値を示した (Fig. 7)。

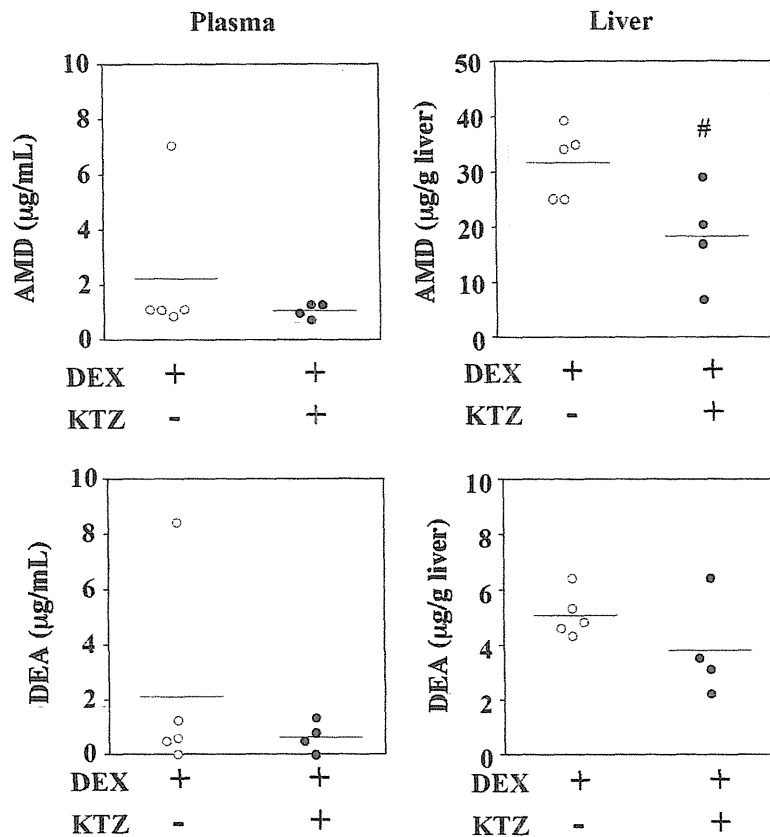


Fig. 6. Plasma and hepatic concentrations of AMD or DEA in AMD+DEX- or AMD+DEX+KTZ-administered mice. #  $p < 0.05$ , compared with AMD+DEX-administered mice.

この時の血漿中および肝臓中の AMD 濃度と DEA 濃度を測定したところ、1-アミノベンゾトリアゾール併用投与群の方が血漿中 AMD 濃度が有意に高値を示し、

血漿中 DEA 濃度も高値を示す傾向が認められた (Fig. 8)。また、肝臓中 AMD 濃度および DEA 濃度が有意に高値を示した (Fig. 8)。