

より好中球の浸潤が確認されたことから (Fig. 12)、AZA 誘導性肝障害に炎症反応と好中球の浸潤が関与することが明らかとなった。Fig. 11 から Th 細胞が肝障害に関与していないことが示唆されたため、この炎症反応は DAMPs や自然免疫系の活性化により誘導されたと思われる。

Fig. 2A から血漿中 ALT 値の上昇は、3 日間 AZA 投与後から認められているが、Fig. 8 および Fig. 11 から自然免疫系や炎症反応関連因子の mRNA は、主に 5 日間および 6 日間 AZA 投与後に認められている。このことから自然免疫系や炎症反応関連因子の因子は、AZA 誘導性肝障害の増悪に関与することが示唆される。一方、Fig. 3 から GSH/GSSG は AZA の 1 日後から低下が認められ、Fig. 4 から、プロテインカルボニルおよび SOD 活性も 3 日間 AZA 投与後から、それぞれ上昇および低下傾向が認められた。そのため、3 日間 AZA 投与後の血漿中 ALT 値の上昇は主に酸化ストレスが関与すると考えられる。

以上の結果から推定される AZA 誘導性肝障害のメカニズムを Fig. 13 に示した。まず AZA が生体内に取り込まれ、肝臓中で代謝を受ける過程において ROS が産生される。ROS が酸化ストレスの原因となり、肝細胞の壊死が起こることで肝障害が惹起されると考えられる。さらに、ROS

および壊死細胞から放出される HMGB1 や S100 タンパク質等の DAMPs は、TLR や RAGE を介して、クッパー細胞や樹状細胞を活性化し、炎症性サイトカインやケモカインを誘導する。これらのメディエーターにより好中球等の白血球が肝臓に遊走されると、炎症反応が引き起こされ、肝障害が増悪する。

本研究においては、酸化ストレスおよび免疫反応の両側面から AZA 誘導性肝障害のメカニズム解析を行ったが、他の因子がさらに複雑に関与している可能性も考えられる。APAP 誘導性肝障害においては、シトクロム P450 による代謝で生成される APAP の代謝物が、ミトコンドリアタンパク質に共有結合することで肝障害が惹起される (Holt and Ju, 2006; Park et al., 2005)。臨床において、AZA の代謝物である 6-MP のメチル化を担う TPMT が高く発現している患者において、AZA 誘導性肝障害が高頻度に発症することが報告されている (Dubinsky et al., 2002; *Van Asseldonk* et al., 2012)。そのため、AZA 代謝物の一つである 6-methyl-MP が反応性代謝物として作用し、肝障害の発症に関わる可能性も考えられる。また、AZA 誘導性肝障害を発症した約 2/3 の患者は、類似した HLA ハプロタイプを有することも報告されており (Jeurissen et al., 1990)、遺

伝的な因子も示唆される。これらの因子を考慮することが、DILI メカニズムのより詳細な理解には必要であると思われる。

以上、本研究においては AZA 誘導性肝障害モデルマウスを作製し、発症メカニズムに ROS 産生に伴う酸化ストレスおよ

び自然免疫系を介した炎症反応が関与することを明らかとした。本研究で作製した肝障害モデルと肝障害メカニズムの情報は、臨床における DILI 発症の回避に繋がるものと期待される。

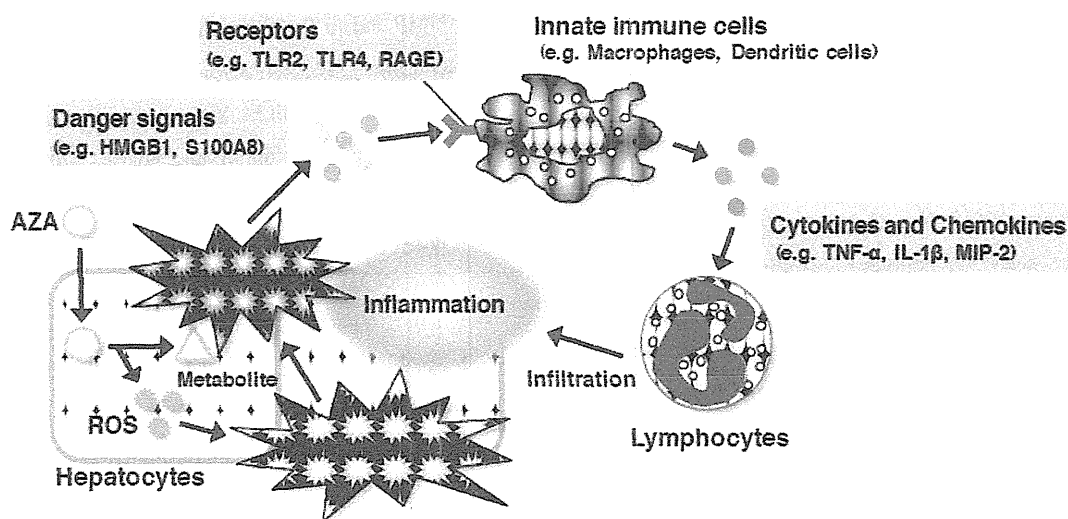


Fig. 13. The putative mechanism of AZA-induced liver injury. During metabolism of AZA in hepatocytes, ROS are produced. ROS-induced oxidative stress cause necrosis of hepatocytes. Danger signals released from hepatocytes activate innate immune cells via their receptors. Activated innate immune cells lead to the secretion of cytokines and chemokines, which resulted in inflammation in the liver.

<参考文献>

Agarwal R, MacMillan-Crow LA, Rafferty TM, Saba H, Roberts DW, Fifer EK, James LP, and Hinson JA (2011) *Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase.* *J Pharmacol Exp Ther* 337: 110-116.

Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, and Tschopp J (2004) NALP3 forms an IL-1 β -processing

inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20: 319-325.

Aithal GP (2011) Hepatotoxicity related to antirheumatic drugs. *Nat Rev Rheumatol* 7: 139-150.

Amin A and Hamza AA (2005) *Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats.* *Life Sci* 77: 266-278.

- Andersson U and Tracey KJ (2003) HMGB1 in sepsis. *Scand J Infect Dis* **35**: 577-584.
- Ansari A, Elliott T, Baburajan B, Mayhead P, O'Donohue J, Chocair P, Sanderson J, and Duley J (2008) *Long-term outcome of using allopurinol co-therapy* as a strategy for overcoming thiopurine hepatotoxicity in treating inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **28**: 734-741.
- Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Jenkins RE, Regan SL, Sathish JG, Kitteringham NR, and Park BK (2009) High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicol Sci* **112**: 521-531.
- Arend WP, Palmer G, and Gabay C (2008) IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* **223**: 20-38.
- Bajt ML, Farhood A, and Jaeschke H (2001) Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G1188-G1195.
- Dejaco C, Mittermaier C, Reinisch W, Gasche C, Waldhoer T, Strohmmer H, and Moser G (2003) Azathioprine treatment and male fertility in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **121**: 1048-1053.
- Dubinsky MC (2004) Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol* **2**: 731-743.
- Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, Targan SR, and Vasiliauskas EA (2002) *6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology* **122**: 904-915.
- El-Beshbishy HA, Tork OM, El-Bab MF, and Autifi MA (2011) Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats. *Pathophysiology* **18**: 125-135.
- Foell D, Wittkowski H, Vogl T, and Roth J (2007) S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* **81**: 28-37.
- Fridovich I (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* **264**: 7761-7764.
- Hennessy EJ, Parker AE, and O'Neill LA (2010) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 293-307.
- Holt MP and Ju C (2006) Mechanisms of drug-induced liver injury. *The AAPS Journal* **8**: 48-54.
- Higuchi S, Kobayashi M, Yano A, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012-1) *Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury*. *J Appl Toxicol* **32**: 815-822.
- Higuchi S, Yano A, Takai S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012-2) Metabolic activation and inflammation reactions involved in carbamazepine-induced liver injury. *Toxicol Sci* **130**: 4-16.
- Hisamuddin IM, Wehbi MA, and Yang VW (2007) Pharmacogenetics and diseases of the colon. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 60-66.
- イムラン インタビューフォーム (2011) グラクソ・スミスクライン株式会社 1-38.
- Jeurissen ME, Boerbooms AM, van de Putte LB, and Kruijssen MW (1990) *Azathioprine induced fever, chills, rash, and hepatotoxicity* in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **49**: 25-27.
- Kidd P (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* **8**: 223-246.
- Lo Coco D, Veglianesi P, Allievi E and Bendotti C (2007) Distribution and cellular localization of high mobility group box protein 1 (HMGB1) in the spinal cord of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Lett* **412**: 73-77.
- Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang

- X, Tor M, and Billiar T (2007) The grateful dead: Damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**: 60-81.
- Maltzman J and Koretzky G (2003) Azathioprine: old drug new actions. *J Clin Invest* **111**: 1122-1124.
- Marinaki AM, Ansari A, Duley JA, Arenas M, Sumi S, Lewis CM, Shobowale-Bakre el-M, Escuredo E, Fairbanks LD, and Sanderson JD (2004) **Adverse drug reactions to azathioprine therapy are associated with polymorphism in the gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPase).** *Pharmacogenetics* **14**: 181-187.
- Perk BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rv Pharmacol Toxicol* **45**: 177-202.
- Petit E, Langouet S, Akhdar H, Nicolas-Nicolaz C, Guillouzo A, and Morel F (2008) **Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes.** *Toxicol In Vitro* **22**: 632-642.
- Steinman L (2007) A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis if T cell-mediated tissue damage. *Nat Rev Med* **13**: 139-145.
- Takatsu N, Matsui T, Murakami Y, Ishihara H, Hisabe T, Nagahama T, Maki S, Beppu T, Takaki Y, Hirai F, and Yao K (2009) **Adverse reactions to azathioprine cannot be predicted by thiopurine S-methyltransferase genotype in Japanese patients with inflammatory bowel disease.** *J Gastroenterol Hepatol* **24**: 1258-1264.
- Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S and Maruyama I (2003) High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* **48**: 971-981.
- Thornalley PJ (1998) **Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs.** *Cell Mol Biol* **44**: 1013-1023.
- Tietze F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**: 502-522.
- Tracey KJ (1994) Tumor necrosis factor- α . In: Thomson, A. (Ed.), *The Cytokine Handbook*. Academic Press, London, pp. 289-304.
- Van Asseldonk DP, Seinen ML, De Boer NK, Van Bodegraven AA, and Mulder CJ (2012) **Hepatotoxicity associated with 6-methyl mercaptopurine formation during azathioprine and 6-mercaptopurine therapy does not occur on the short-term during 6-thioguanine therapy in IBD treatment.** *J Crohns Colitis* **6**: 95-101.
- Wang H, Yang H, and Tracey KJ (2004) Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* **255**: 320-331.
- Wong DR, Derijks LJ, den Dulk MO, Gemmeke EH, and Hooymans PM (2007) **The role of xanthine oxidase in thiopurine metabolism: a case report.** *Ther Drug Monit* **29**: 845-848.
- Wilke RA, Lin DW, Roden DM, Watkins PB, Flockhart D, Zineh I, Giacomini KM, and Krass RM (2007) Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 904-916.
- Yano A, Higuchi S, Tsuneyama K, Fukami T, Nakajima M, and Yokoi T (2012) **Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice.** *Toxicology* **293**: 107-114.
- Yao D and Brownlee M (2010) Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* **59**: 249-255.
- E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kentaro Matsuo, Eita Sasaki, Satonori Higuchi, Shohei Takai, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi. Involvement of oxidative stress and immune- and inflammation-related factors in azathioprine-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, 224: 215-224 (2014).

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・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

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

分担研究者 深見 達基 金沢大学医薬保健研究域薬学系 助教

【目的】薬物誘導性肝障害は医薬品開発および薬物治療において重大な問題である。肝障害発症には代謝酵素により生成される反応性代謝物の関与が示唆されている。薬物誘導性肝障害の動物モデルを用いて肝障害と代謝物の関係を明らかにした報告は極めて少ない。本検討ではラットを用いて、肝障害性の薬物として知られている carbamazepine (CBZ) により肝障害モデルを作製し、経時的に代謝物の血漿中濃度を測定することにより発症に寄与する代謝物および代謝酵素を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】9週齢の雄性F344ラットにCBZ (400 mg/kg in corn oil, *p.o.*)を4日間投与し、5日目にCBZ (600 mg/kg) と glutathione (GSH) 合成阻害剤である L-buthionine sulfoximine (BSO: 700 mg/kg in saline, *i.p.*) を併用投与した後に、経時的に血漿および肝臓を採取し、血漿中のALT値、AST値の測定および肝臓の組織学的評価を行った。また、HPLCを用いてCBZおよびその代謝物血漿中濃度測定を行った。CYP3A阻害剤であるketoconazole (KTZ)、troleandomycin (TAO) および誘導剤であるdexamethazone (DEX) を併用投与し、CYP3Aの影響を検討した。

【結果および考察】BSO併用投与によりCBZ最終投与24時間後に約半数の個体においてALT値およびAST値の顕著な上昇と肝臓において広範なネクロシスが認められ、GSH枯渇下での反応性代謝物の生成が肝障害発症に寄与する可能性が考えられた。肝障害発症発症個体において3-OH CBZ血漿中濃度が極めて低値を示したことから、代謝物が肝障害発症に関与する可能性が示された。CYP3A阻害剤であるKTZまたはTAOを併用投与すると全ての個体においてALT値の上昇が認められず、DEXによるCYP3A誘導により、CBZとBSO単回投与による肝障害が惹起された。

以上の結果からCYP3A誘導が肝障害発症に寄与することが示唆された。

A. 研究目的

肝臓は経口投与され全身循環に移行した医薬品が高濃度で流入する臓器であるため、必然的に医薬品の影響を受けやすい環境下にある。さらに肝臓は代謝反応によって薬物を解毒する役割を有するが、薬物によっては活性化体（反応性代謝物）を生成するため、肝細胞が損傷を受ける場合がある。このため肝臓における副作用の報告数は少なくない。医薬品による重篤な副作用の中で薬物性肝障害の報告数は多く、我が国においては2007年に2,473例の報告があり（Kaniwa and Hasegawa, 2009）、約600品目の医薬品に副作用として肝障害が記載されている。また、薬物性肝障害は市販後の警告および自主回収の主要な原因であり（Kaplowitz, 2005; Park et al., 2005）、このような場合には製薬企業の経営を圧迫することは必至である。したがって、開発の段階で新薬の肝障害性を予測し回避することは製薬企業にとって重要な課題である。

薬物性肝障害は発症機構上、「中毒性」と「特異体質性」の2つに分類できる。「中毒性」の薬物性肝障害は用量依存性であり、薬物または代謝物そのものが毒性を有するもので、acetaminophen (APAP) が例として挙げられる（Sudo et al., 2012）。一方、「特異体質性」の薬物性肝障害は用

量非依存性であり、メカニズムによってアレルギー性および代謝性の2種類に分類される。アレルギー性による場合、薬物そのものや中間代謝物がハプテンとなり担体タンパクと結合して抗原性を獲得しT細胞依存性肝細胞障害により惹起される。一方、代謝性は遺伝的素因による代謝関連酵素の特殊な個人差に起因するとされている。

代謝反応により生じた反応性の高い代謝物は通常、glutathione (GSH) などにより抱合反応を受け脂溶性が上昇することにより細胞外に排出され解毒される。例えばAPAPは約90%がグルクロン酸抱合や硫酸抱合により代謝され（Jaeschke, 2005）、残りの4 - 8%はCYP2A6により3-hydroxy APAPへと解毒代謝される（Chen et al., 1997）が、5 - 10%がCYP2E1, CYP1A2およびCYP3A4により反応性代謝物である*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI)へと代謝される。APAP低投与量ではGSHによる抱合反応により無毒化されるが、高投与量では肝細胞中のGSHが枯渇し生体内高分子と共有結合することにより肝障害が生じることが知られている（Jaeschke, 2005）。実際に、APAPを投与したマウスにGSH合成阻害剤であるL-buthionine sulfoximine (BSO)を併用投与するとalanine aminotransferase

(ALT) 値の有意な上昇が認められる (Watanabe et al., 2003)。また、GSH 合成酵素の一つである g-glutamylcysteine synthetase をノックダウンすることにより、ラットにおいて APAP 投与による ALT および aspartate aminotransferase (AST) 値の有意な上昇が認められている (Akai et al., 2007)。Methimazole、tienilic acid (TA)、amodiaquine、ticlopidine などの肝障害を発症することが知られている薬物についても、ラットまたはマウスを用いた検討において BSO 併用投与により ALT 値の上昇が認められている (Kobayashi et al., 2012; Nishiya et al., 2008; Shimizu et al., 2009 and 2011)。このように、肝障害発症に対する GSH および反応性代謝物の関与が示唆されている。

しかし、肝障害発症に反応性代謝物の関与が示唆されているものの、実際に肝障害に関与している代謝物が明らかにされている場合は極めて少ない。現在、薬物の生体内活性化は主に GSH や *N*-acetylcystein (NAC) などの求核剤を用いてトラップする方法や内因性タンパク質への共有結合率を測定する方法により評価されており、*in vitro* または *in vivo* で肝障害に対する反応性代謝物の直接的な関与を示すことは困難である (Park et al., 2005)。

薬物性肝障害の原因薬物は多岐にわたるが、その中でも抗てんかん薬である carbamazepine (CBZ) は、服用する患者の約 20% において副作用が認められ、そのうち 10 - 15% が肝臓に関連したものである (Björnsson, 2008)。CBZ による肝障害および肝機能障害は我が国において 2005 - 2011 年までの間で 215 例報告されている (Sudo et al., 2012)。CBZ 誘導性肝障害は「特異体質性」に分類され、肝障害の発症に関して性差は認められず、1 日の服用量に依存しない。また、CBZ 誘導性肝障害は予後不良 (死亡や肝移植例) のものと予後良好なもの 2 つが存在する。前者は小児に多く治療期間が 30 週間程度の時期に生じ、後者は青年から高齢者に多く治療期間が 4 週間程度で生じる。前者は肝細胞のネクロシスや炎症を伴うが、後者は hypersensitivity の症状や好酸球の増多が認められる (Björnsson, 2008)。しかし、CBZ の構造類似体であり同効薬である oxcarbazepine (OXC) は CBZ と比較して副作用が少なく、hypersensitivity は生じるものの発症率は 10 % 以下と低く、肝障害の報告数も少ない (Duncan et al., 2006; Shorvon, 2000)。

ヒトにおいて CBZ は CYP3A4 により、主に安定で薬理活性を有する CBZ-10, 11-epoxide へ代謝され、その後

trans-10,11-dihydroxy CBZ へ代謝される (Fig. 1) (Pearce et al, 2008; Lu and Uetrecht., 2008)。CBZ は CYP3A4 を自己誘導するため、反復投与により CBZ の血漿中濃度が減少することが Novartis 社の添付文書に記載されている。ヒトにおける CBZ の投与量は最初、1日 200 - 400 mg 程度から始まるが、至適効果が得

られるまで (通常 1日 600 mg/kg) 徐々に増量し、症状によっては最大 1日 1,200 mg まで増量する。また、CBZ から細胞障害性を有する反応性代謝物が産生され、GSH や NAC により解毒されることが報告されている (Pirmohamed et al., 1992; Ju et al., 1998)。

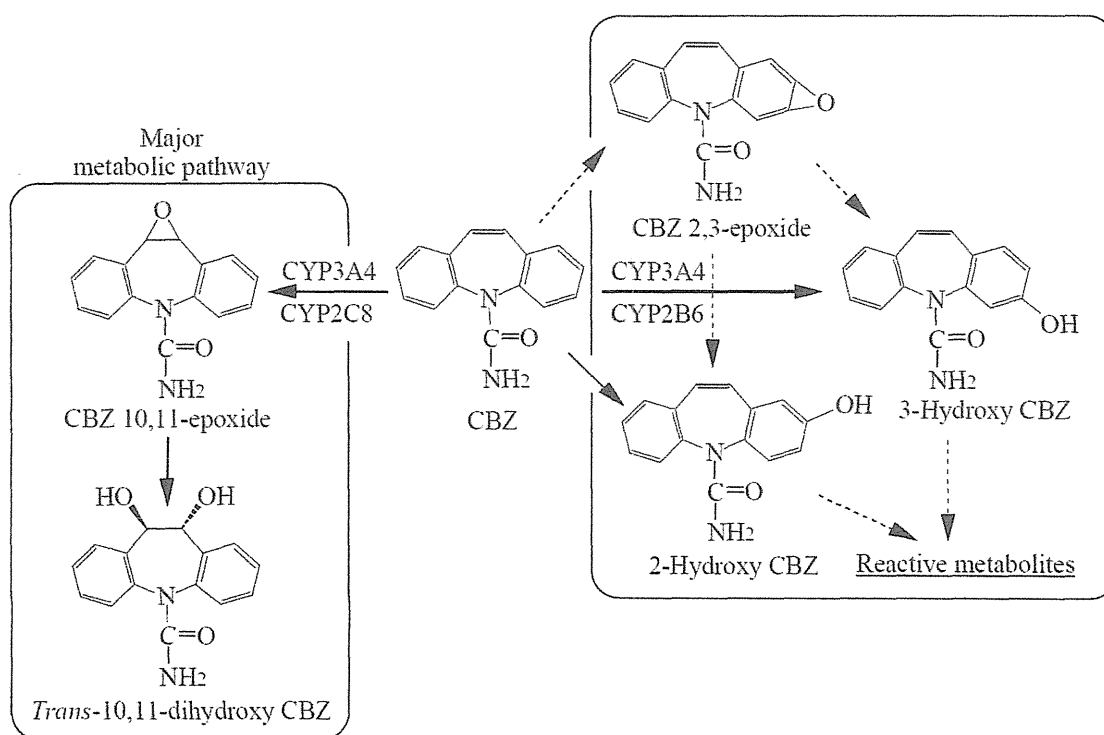


Fig. 1. Proposed metabolic pathways of CBZ in human.

以前、当研究室ではマウスを用いて CBZ 誘導性肝障害モデルを作製し、炎症と代謝の両面からメカニズムの検討を行った。その結果、炎症および免疫学的因子が肝障害の発症に関与することを明らかにした。また肝障害時では肝臓中 GSH

量が減少することや Cyp3a 阻害薬である troleandomycin (TAO) や ketoconazole (KTZ) を併用投与すると肝障害が増悪し、CBZ の代謝物である 3-hydroxy CBZ の血漿中濃度が上昇することを報告した (Higuchi et al., 2012)。しかし、3-hydroxy

CBZがCBZ誘導性肝障害発症に関与しているかは不明である。

本研究では、前臨床開発で最も使用頻度が高く、同一個体からの経時的な採血が可能な実験動物であるラットを用いてCBZ誘導性肝障害モデルを作製し、肝障害と代謝物の血漿中濃度推移から肝障害発症に関与する代謝物および代謝酵素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

9週齢の雄性F344ラットは日本SLC (Hamamatsu, Japan) より購入した。CBZ、BSOおよびdexamethazone (DEX) は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。OXCおよびKTZはLKT Laboratories (St. Paul, MN) より購入した。2-hydroxy CBZと3-hydroxy CBZはToronto Research Chemicals (Toronto, Canada) より購入した。TAOはSigma (St. Louis, MO) より購入した。CBZ-10,11-epoxideと*trans*-10,11-dihydroxy CBZはNovartis Pharma Inc (Basel, Switzerland) より供与して頂いた。Midazolam (MDZ)、1'-hydroxy MDZおよび4-hydroxy MDZはRoche Diagnostic Japan (Tokyo, Japan) より供与して頂いた。富士ドライケムスライド GPT/ALT-PIIIおよびGOT/AST-PIIIは富士

フィルム (Tokyo, Japan) より購入した。

Bio-Rad Protein Assay kitはBio-Rad

(Hercules, CA) より購入した。ヤギ抗ラット

CYP3A2抗体は第一化学薬品 (Tokyo,

Japan) より、IRDye 680ロバ抗ヤギIgGは

LI-COR Biosciences (Lincoln, NE) より購

入した。PVDF膜はMillipore (Bedford, MA)

より購入した。

B-2. CBZ、OXC および BSO の投与方法

CBZ 単回投与の検討では、F344 ラット (雄性、9 週齢) を 3 日間馴化飼育した後、CBZ 400 または 600 mg/kg (10 mL/kg in corn oil) を経口投与し、CBZ 投与 2 時間前に GSH 合成阻害剤である BSO (10 mL/kg in saline) を腹腔内投与した。CBZ 投与 24 時間後に解剖して下行大静脈より採血を行った。

CBZ 反復投与の検討では、F344 ラットを 3 日間馴化飼育した後、CBZ 400 mg/kg を 4 日間、1 日 1 回経口投与し、5 日目に CBZ 400、600 または 800 mg/kg を経口投与した。また、5 日目の CBZ 投与 2 時間前に BSO を腹腔内投与した。OXC 反復投与の検討では、F344 ラットを 3 日間馴化飼育した後、OXC 400 mg/kg (10 mL/kg in corn oil) を 4 日間、1 日 1 回経口投与し、5 日目に OXC 600 mg/kg を経口投与した。また、5 日目の OXC 投与 2 時間前に BSO

を腹腔内投与した。CBZ と OXC 投与の検討共に最終投与から、0、1、3、6、12、24、48 および 72 時間後に尾静脈または頸静脈より採血を行い、最終採血時 (CBZ 最終投与から 24 または 72 時間後) に解剖して下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-3. 血漿中生化学値測定

ヘパライズした器具を用いて採取したマウスの全血を 12,000 g、4°C で 2 分間遠心分離を行った後、上清を血漿として得た。ALT および AST 値は DRI-CHEM 4000V (富士フィルム, Tokyo, Japan) を用いて、富士ドライケムスライドに血漿 10 μ L を点着させ、吸光度を測定して値を求めた。

B-4. 血漿中薬物および代謝物濃度測定

CBZ とその代謝物の血漿中濃度を HPLC を用いて測定した。血漿からの抽出は Grimsley ら (1991) の方法に修正を加え、以下の方法により行った。血漿 50 mL と精製水 100 mL に 1 nmol の Bromazepam を内標準物質として加えたものを混合し、5 mL のクロロホルムを加え 5 分間攪拌し、2,500 rpm で 10 分間遠心分離した。その後、クロロホルム層を別の試験管に移し窒素気流下乾固させた。溶液全てを乾固

させた後、試験管に移動相 100 mL を加え、30 秒間ボルテックスミキサーで激しく攪拌し、50 mL を HPLC にインジェクションした。HPLC による分析には L-2130 ポンプ (HITACHI, Tokyo, Japan)、L-2200 オートサンプラー (HITACHI)、L-2400UV 検出器 (HITACHI)、L-2350 カラムオープン (HITACHI)、Uni-3 ノイズベークリナー (ユニオン)、D-2500 インテグレーター (HITACHI) を用いて溶出液を UV 235 nm でモニターした。カラムは Cosmosil C18-MS-II (4.6 \times 250 mm ID, 5 mm; Nacalaitesque, Kyoto, Japan) を用いた。移動相は 20%アセトニトリル、カラム温度は 35°C、流速は 1 mL/min とした。

B-5. MDZ 1'位および 4 位水酸化酵素活性

Emoto ら (2000) の方法に修正を加え、以下の方法により測定をした。反応系は酵素源、MDZ (5 mM) およびリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4, 100 mM) に精製水を加え、全量を 180 mL とした。なお反応液中の有機溶媒の濃度は 1%以下となるようにした。酵素源として 2-5 で作製したラット肝ミクロソームを用い、最終濃度を 0.1 mg/mL とした。37°C で 2 分間プレインキュベーションした後、NADPH 生成系をそれぞれ 20 mL 添加することにより反

応を開始した。水浴上 37°C で 15 分間反応させた後、氷冷メタノールを 200 mL 加え、激しく攪拌することにより反応を停止させた。6,200 g、4°C で 10 分間遠心し、得られた上清 80 mL を HPLC に注入した。HPLC による分析には L-2130 ポンプ (HITACHI)、L-2200 オートサンプラー (HITACHI)、L-2400UV 検出器 (HITACHI)、L-2350 カラムオープン (HITACHI)、Uni-3 ノイズベースクリーン (ユニオン)、D-2500 インテグレーター (HITACHI) を用いて溶出液を UV 254 nm でモニターした。カラムは Inertsil ODS-3 (4.6 × 250 mm ID, 5 mm: GL Science, Tokyo, Japan) を用いた。移動相は 30%メタノール/20%アセトニトリル/5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、カラム温度は 35°C、流速は 1 mL/min とした。

B-6. CBZ 投与ラットに対する CYP3A 阻害薬の投与

F344 ラットを 3 日間馴化飼育した後、CBZ 400 mg/kg を 4 日間経口投与し、5 日目に BSO 700 mg/kg を腹腔内投与し、30 分後に CYP3A 阻害薬である KTZ (50 mg/kg in corn oil) または TAO (300 mg/kg in corn oil) を腹腔内投与し、その 1 時間 30 分後に CBZ 600 mg/kg を投与した。CBZ 最終投与 24 時間後に解剖して下行大静脈

より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-7. CBZ 投与ラットに対する CYP3A 誘導薬の投与

F344 ラットを 3 日間馴化飼育した後、DEX (80 mg/kg, 10 mL/kg in corn oil) を 3 日間腹腔内投与し、4 日目に CBZ 400 mg/kg を経口投与した。CBZ 投与 2 時間前に BSO を腹腔内投与した。CBZ 最終投与 0、3 および 6 時間後に尾静脈または頸静脈から採血し、12 時間後に解剖して下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-8. 統計解析

多群間における統計学的評価は 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. CBZ 単回投与および最終投与量の検討

CBZ を単回投与または反復投与することで、ラットにおいて肝障害を惹起させることが可能か検討するために、CBZ 単回投与の検討および反復投与時の最終投与量の検討を F344 ラットを用いて行い、最終投与 24 時間後の ALT 値を測定した (Figs. 2A and 2B)。投与条件は Higuchi ら

(2012) がマウスで CBZ 誘導性肝障害を惹起させる際に用いた条件を参考にした。単回投与の検討では、BSO 非併用投与群および併用投与群において、CBZ 400 mg/kg および 600 mg/kg のいずれの投与量においても ALT 値の有意な上昇は認められなかった (Fig. 2A)。また、反復投与の検討においても、5 日目の CBZ 投与量が 400 mg/kg の群では ALT 値の上昇は認められなかった。しかし、5 日目の CBZ 投与量が 600 または 800 mg/kg 群では ALT 値の顕著な上昇が認められた (600 mg/kg 投与群: ALT = 9,986 ± 5,627 U/l (n = 6), 800 mg/kg 投与群: ALT = 20,700 ± 4,798 U/l (n = 3)) (Fig. 2B)。以上の結果から、CBZ を 400 mg/kg で 4 日間反復投与後に、CBZ を 600 または 800 mg/kg で投与かつ BSO を併用投与する条件により CBZ 誘導性肝障害モデルラットが作製可能であることが示された。しかし、CBZ 最終投与 24 時間後までに死亡する個体が存在し、CBZ 最終投与量 600 mg/kg 群と 800 mg/kg 群における死亡個体数はそれぞれ 7 匹中 1 匹と 8 匹中 5 匹であった。このように、CBZ 最終投与量 800 mg/kg 群では死亡率が高かったため、以降の検討では CBZ の最終投与量を 600 mg/kg で行うこととした。また、CBZ の最終投与量 600 mg/kg 群においても肝障害の程度に大き

な個体差が認められ、CBZ 最終投与 24 時間後に ALT 値が顕著に上昇する個体 (high responder) (ALT > 2,000 U/l) とほとんど変動しない個体 (low responder) に分類された (Fig. 2C)。

C-2. 肝組織染色

CBZ 投与による肝組織損傷を評価するために、CBZ を 4 日間 400 mg/kg で反復投与し、5 日目に BSO 700 mg/kg と CBZ 600 mg/kg を投与したラットより採取した肝組織を用いて H&E 染色を行った。BSO 非併用投与 (ALT = 105 U/l) および low responder (ALT = 176 U/l) ではネクロシスは認められなかったが、high responder (ALT = 21,800 U/l) において中心静脈周辺に広範なネクロシスが認められた (Fig. 3A)。CBZ 誘導性肝障害を発症した予後良好な患者において好酸球増多が認められることが知られているため (Björnsson, 2008)、Congo red 染色により好酸球の染色を行ったが、好酸球はどの群においても認められなかった (Fig. 3B)。以上の結果により、high responder において肝障害が生じていることが病理学的視点から支持された。

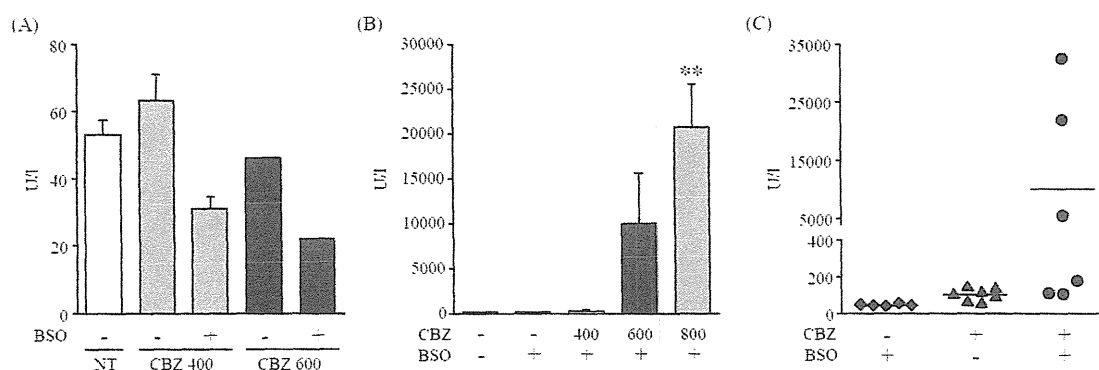


Fig. 2. Plasma ALT levels after the single or repetitive administration of CBZ with BSO. (A) Rats were administered CBZ at a dose of 400 or 600 mg/kg, and BSO was administered at a dose of 700 mg/kg 2 hr before the CBZ administration. Rats were sacrificed at 24 hr after the CBZ administration. (B) Rats were administered CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and at a dose of 400, 600 or 800 mg/kg in the 5th day, and BSO was administered at a dose of 700 mg/kg 2 hr before the last CBZ administration. Rats were sacrificed at 24 hr after the last CBZ administration. (C) Rats were administered CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and at a dose of 600 mg/kg in the 5th day, and BSO was administered at a dose of 700 mg/kg 2 hr before the last CBZ administration. Rats were sacrificed at 24 hr after the last CBZ administration. Data are mean \pm SEM ((A) $n = 1$ to 4, (B) $n = 3$ to 8, (C) $n = 5$ to 7). ** $P < 0.01$ compared with control group.

C-3. CBZ または OXC 投与ラットにおける ALT および AST 値の時間推移

CBZ 最終投与後の ALT および AST 値の推移を検討するために CBZ と BSO を投与し、CBZ 最終投与 0、6、12、24、48 および 72 時間後の ALT および AST 値を同一個体から採取した血漿を用いて測定した。また、ネガティブコントロールとして構造類似体で同効薬である OXC を CBZ の代わりに投与した (Fig. 4)。High

responder 群において CBZ 最終投与 24 時間後に ALT および AST 値の有意な上昇が認められ、その後、時間依存的に減少した。Low responder 群および BSO 非併用投与群ではいずれの時間においても ALT および AST 値の変化は認められなかった。また、OXC 投与群ではいずれの時間においても ALT および AST 値に変化は認められなかった。

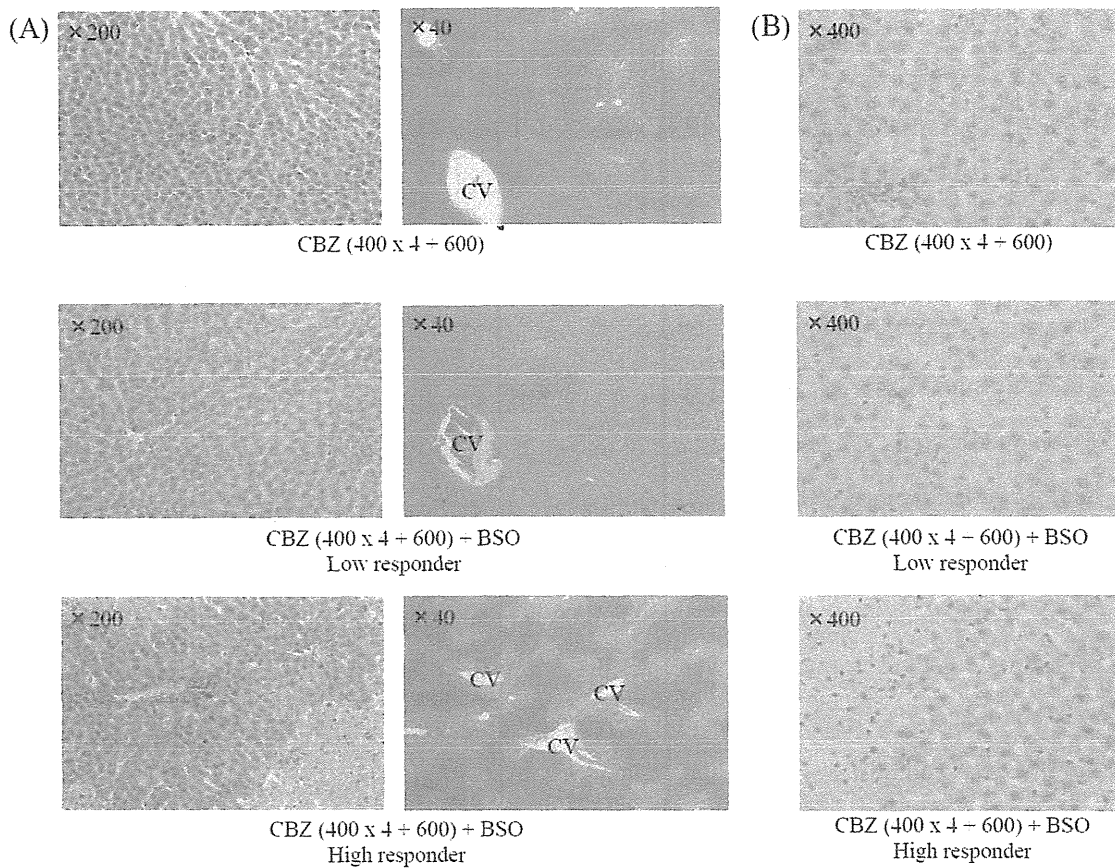


Fig. 3. Histopathological analyses of the livers. Livers were collected 24 hr after the last CBZ administration and the liver sections were stained with (A) hematoxylin and eosin (H&E) or (B) congo red.

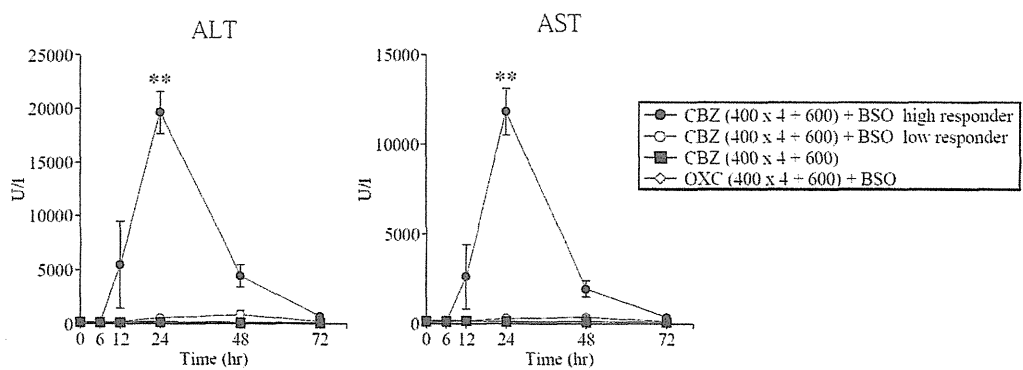


Fig. 4. Time-dependent changes of plasma ALT and AST levels in CBZ- or OXC-administered rats. Rats were administered CBZ or OXC at a dose of 400 mg/kg for 4 days and at a dose of 600 mg/kg in the 5th day, and BSO was administered at a dose of 700 mg/kg 2 hr before the CBZ

administration. Plasma samples were collected at 0, 6, 12, 24, 48 and 72 hr after the last CBZ administration. Data are mean \pm SEM (n = 3 to 6). ** $P < 0.01$ compared with 0 hr group.

C-4. CBZ およびその代謝物の血漿中濃度推移

CBZ およびその代謝物の血漿中濃度の時間推移と、high responder と low responder 間における血漿中濃度の差異を検討するために、CBZ 最終投与 0、1、3、6、12 および 24 時間後の CBZ とその代謝物の血漿中濃度を測定した (Fig. 5)。今回測定に用いた個体の CBZ 最終投与 24 時間後の ALT 値はそれぞれ以下の通りである (high responder: ALT = 16,300 U/l, low responder 1: ALT = 325 U/l, low responder 2: ALT = 362 U/l)。いずれのラットにおいても、CBZ および 2-hydroxy CBZ は CBZ 最終投与 1 - 3 時間後に最も高い値を示した。また、CBZ-10, 11-epoxide は CBZ 最終投与 3 時間後に最も高い値を示した。Trans-10, 11-dihydroxy CBZ は CBZ 最終投与 1 - 6 時間後に最も高い値を示した。このように、CBZ および上記の代謝物は

ALT および AST 値が最大を示す CBZ 最終投与 24 時間後よりも早く血漿中濃度が最大を示した。3-Hydroxy CBZ は low responder 1 において CBZ 最終投与 1 時間後に最も高い値を示したが、high responder および low responder 2 においては血漿中濃度が最も高い値を示す時間を判断することは不可能であった。high responder と low responder 群間で血漿中濃度を比較すると、CBZ、trans-10, 11-dihydroxy CBZ および 2-hydroxy CBZ ではほとんど差は認められなかった。CBZ-10, 11-epoxide は high responder と比較して low responder 群でやや高い血漿中濃度を示す傾向が認められた。3-Hydroxy CBZ では low responder 群では血漿中濃度が検出可能であったのに対し、high responder ではいずれの時間においても検出限界以下であった。

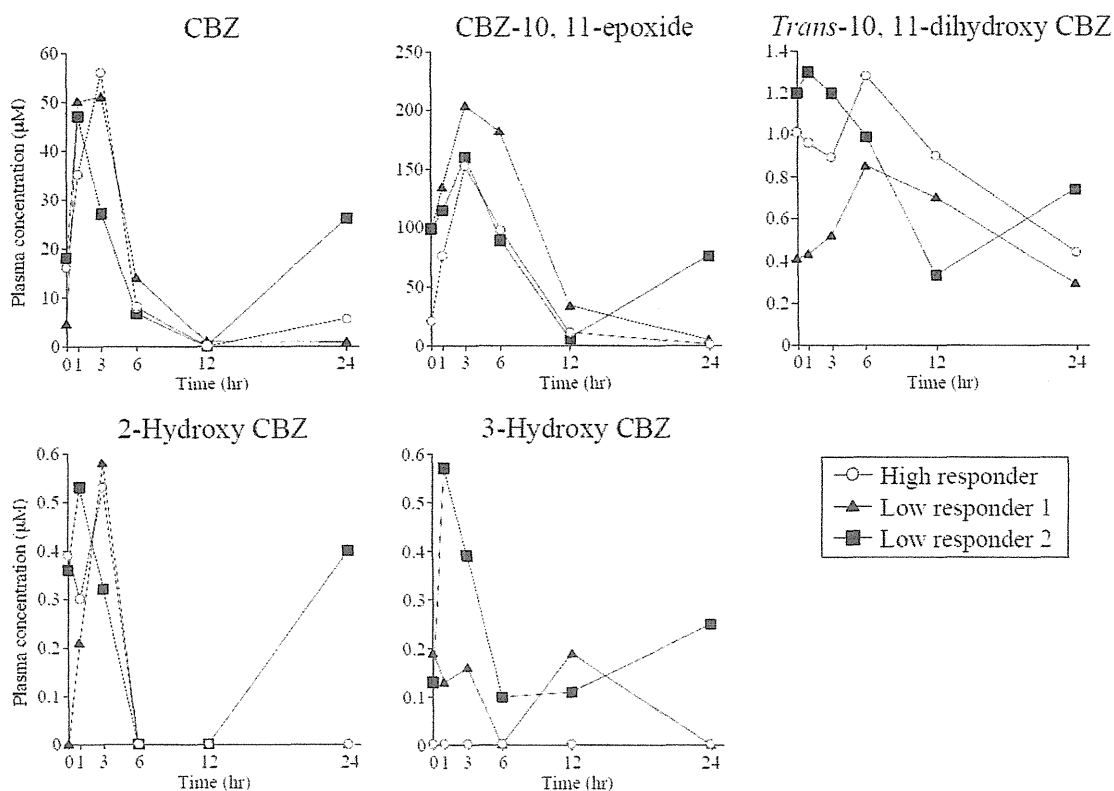


Fig. 5. Time-dependent changes of the plasma concentration of CBZ and its metabolites after CBZ administration. Rats were administered CBZ at a dose of 400 mg/kg for 4 days and at a dose of 600 mg/kg in the 5th day, and BSO was administered at a dose of 700 mg/kg 2 hr before the last CBZ administration. Plasma samples were collected at 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hr after the last CBZ administration.

C-5. CYP3A2 タンパク質量と CYP3A 酵素活性の測定

CBZ はヒトおよびラットにおいて CYP3A を誘導することが報告されている (Luo et al, 2002; Tateishi et al., 1999)。今回作製したモデルにおいても CYP3A 酵素誘導が起きているか確認するために、CBZ または OXC を 4 日間 400 mg/kg の投与量で反復投与したラットの肝臓から調製したミクロソームを用いて CYP3A2 タ

ンパク質量の測定を行った (Fig. 6A)。また、同一のサンプルを用いて CYP3A の酵素活性を MDZ 1'位および 4 位水酸化酵素活性を測定することにより評価した (Fig. 6B)。CYP3A2 タンパク質発現量は、CTL 群と比較して CBZ 投与群で 1.82 倍、OXC 投与群で 1.93 倍の増加が認められた。同様に、CBZ および OXC 投与群で MDZ 1'位水酸化酵素活性の有意な上昇 (CTL: 136 ± 30 pmol/min/mg protein, CBZ: $273 \pm$

18 pmol/min/mg protein, OXC: 273 ± 42 pmol/min/mg protein) および 4 位水酸化活性の上昇傾向が認められた (CTL: 778 ± 156 pmol/min/mg protein, CBZ: 1130 ± 77

pmol/min/mg protein, OXC: 1201 ± 182 pmol/min/mg protein)。以上の結果により、CBZ および OXC の反復投与により CYP3A が誘導されることが示された。

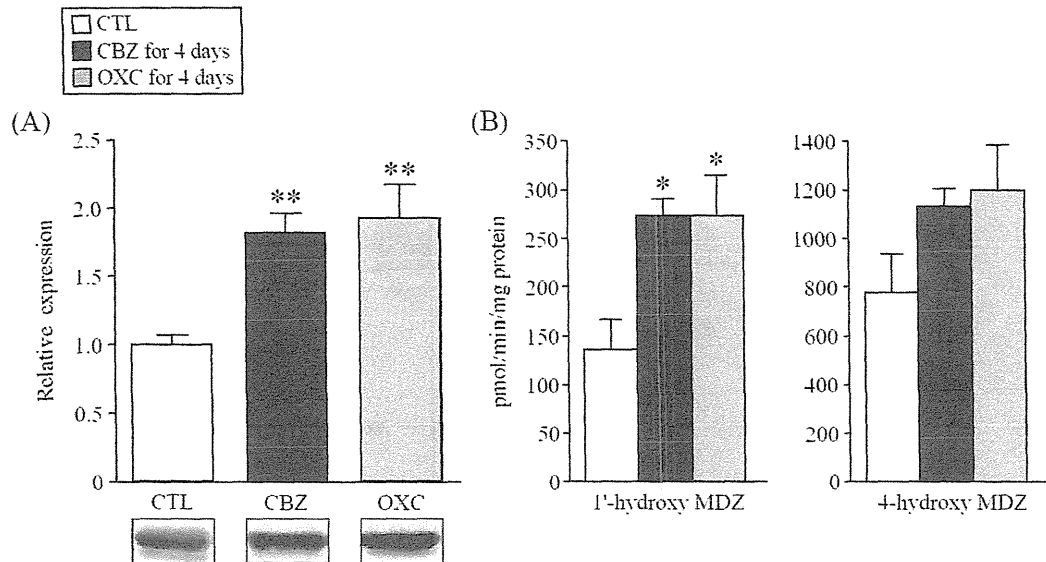


Fig. 6. Effects of CBZ or OXC administration on (A) expression level of CYP3A2 protein and (B) midazolam hydroxylase activity. Rats were administered CBZ or OXC at a dose of 400 mg/kg for 4 days and sacrificed at 24 hr after the last drug administration to collect the livers. Data are mean ± SEM (n = 5). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with control group.

C-6. CBZ 誘導性肝障害に対する CYP3A 阻害薬の影響

ヒトおよびマウス肝ミクロソームを用いた検討において、CYP3A の阻害薬である KTZ を添加すると CBZ のタンパク質への共有結合率や細胞障害性が減少することから、CBZ 誘導性肝障害に CYP3A が関与することが示唆されている (Pirmohamed et al., 1992)。ラットにおいて

CBZ 誘導性肝障害に対する CYP3A の影響を検討するために、TAO または KTZ を CBZ 最終投与 1.5 時間前に併用投与し、CBZ 最終投与 24 時間後に ALT 値を測定した (Fig. 7)。CYP3A 阻害薬非併用投与群では 4 匹中 2 匹で ALT 値の上昇が認められた。これに対して TAO 併用投与群の 5 匹、KTZ 併用投与群の 3 匹全てにおいて ALT 値の上昇は認められなかった。こ

れより、CYP3A が肝障害発症に関与して いる可能性が示された。

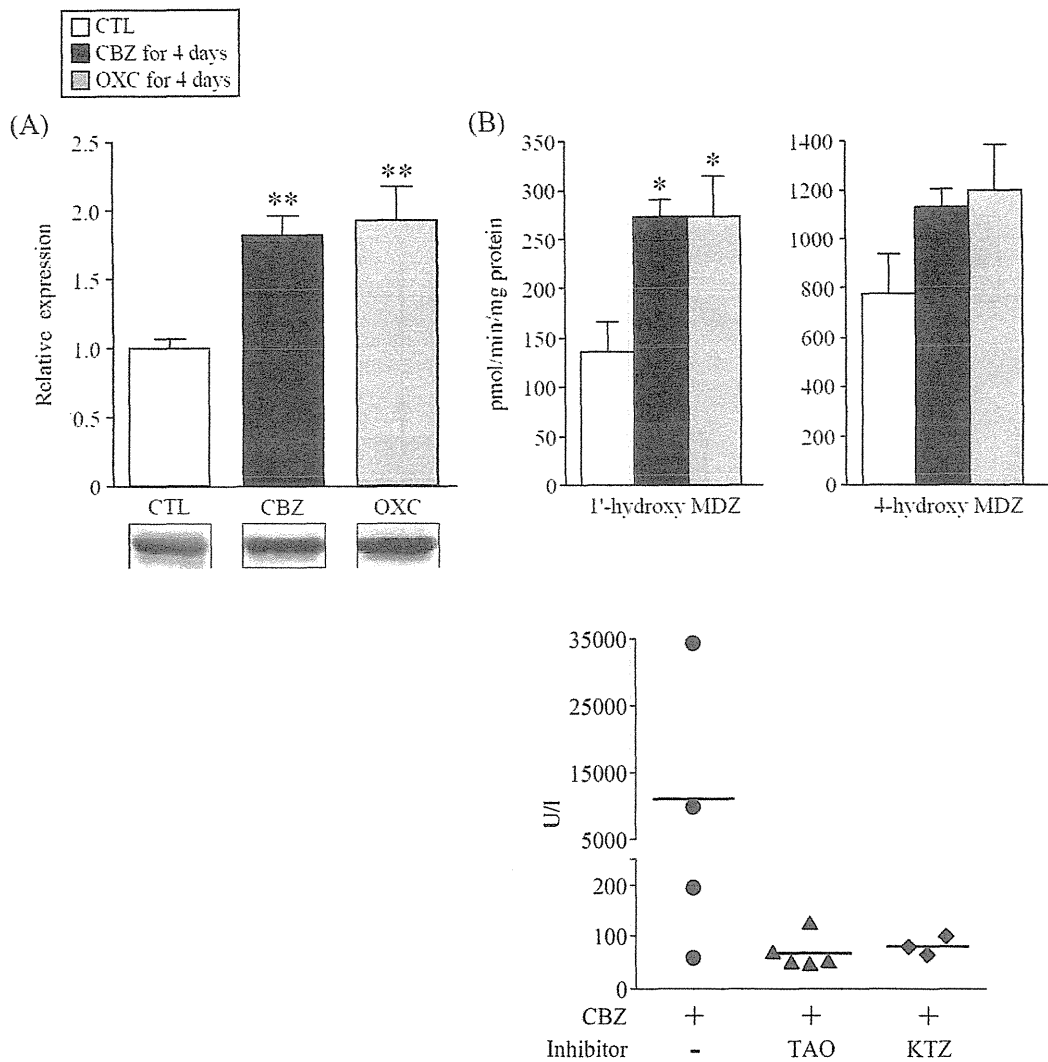


Fig. 7. Effects of CYP3A inhibitors on CBZ-induced liver injury. Rats were administered TAO or KTZ at 1.5 hr before the last CBZ administration in rat model of CBZ-induced liver injury. Plasma ALT was measured 24 hr after the last CBZ administration. (n = 3 to 5).

C-7. CBZ 単回投与における DEX 反復投与の影響

C-6 の検討より CYP3A を阻害すると肝障害発症が抑制される可能性が示されたため、CYP3A 誘導薬の併用投与により肝

障害が増悪される可能性が考えられた。

しかし、3-5 の検討より、CBZ 反復投与によって CYP3A が誘導されることが示されたため、CYP3A の誘導薬を併用投与しても誘導効果が認められない可能性が考

えられた。そこでCBZ単回投与では肝障害が発症しない (Fig. 2A) ことに着目し、CYP3A誘導薬であるDEXを3日間連投し、4日目にCBZ 400 mg/kgとBSOを投与し、肝障害が発症するか検討を行った (Fig. 8)。DEXの代わりに溶媒として用いたcorn oilを反復投与した群ではALT値の上昇は認められなかった。また、DEX反復投与のみによりALT値の上昇が認められたが、時間依存的なALT値の上昇は認められなかった。一方、CBZ投与前にDEXを反復投与した群ではCBZ投与前と比較して、CBZ投与3時間後からALT値の有意な上昇が認められ、12時間後まで上昇し続けた。また、今までの検討で用いてきたCBZ誘導性肝障害を惹起させ

る投与条件では肝障害発症の程度に大きな個体差が存在したが、今回の検討で用いた投与条件では、CBZ投与前にDEXを反復投与した群では4匹中4匹のラットでALT値の上昇が認められ、個体差は今までの検討よりも小さかった (CBZ投与0 hr後: ALT = 402 ± 58 U/l, 3 hr後: ALT = 1737 ± 347 U/l, 6 hr後: ALT = 2487 ± 429 U/l, 12 hr後: ALT = 3125 ± 295 U/l)。死亡率に関しては、CBZ投与前にDEXを反復投与した群では6匹中2匹が死亡したのに対し、その他の群では死亡する個体は存在しなかった。以上の結果より、CBZ誘導性肝障害発症はCYP3Aの誘導により惹起されることが示唆された。

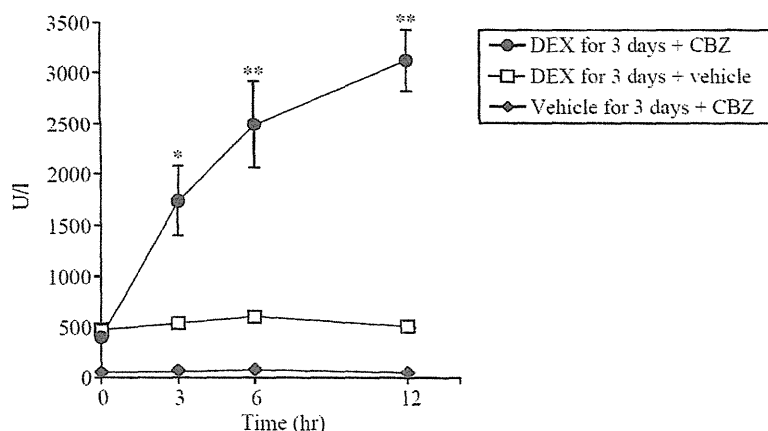


Fig. 8. Effects of CYP3A inducer on plasma ALT in rats treated with CBZ. Rats were administered DEX at a dose of 80

mg/kg for 3 days and CBZ at a dose of 400 mg/kg in the 4th day. Two hr before the CBZ administration, BSO was administered at a dose of 700 mg/kg. Plasma samples were collected at 0, 3, 6 and 12 hr after the CBZ