

非臨床安全性評価における肝薬物代謝酵素及び
特異体質性の薬物性肝障害に関する研究

博士（薬学）・学位論文

2013 年

岸田 知行

目次

略語一覧	1
要約	2
第一章 Sprague-Dawley 及び Wistar ラットの肝薬物代謝酵素の系統差に関する検討	
1-1. 緒言	4
1-2. 材料及び方法	5
1-3. 結果	8
1-4. 考察	15
1-5. 小括	17
第二章 LPS 処置ラットを用いた特異体質性の薬物性肝毒性の検討	
2. 序論	18
第一節 LPS の肝薬物代謝酵素に及ぼす評価	
2-1-1. 緒言	19
2-1-2. 材料及び方法	20
2-1-3. 結果	22
2-1-4. 考察	31
2-1-5. 小括	32
第二節 LPS 処置ラットにおける DCF の反応性代謝物と肝組織との共有結合の評価	
2-2-1. 緒言	33
2-2-2. 材料及び方法	34
2-2-3. 結果	36
2-2-4. 考察	43
2-2-5. 小括	44
総括	45
謝辞	47
業績目録	48
参考論文の著者名, 題目, 印刷・公表の方法及びその時期	49
引用文献	50

略語一覧

ALT	alanine transaminase
AhR	arylhydrocarbon receptor
AST	aspartate amino transferase
AUC	area under the concentration vs. time curve
CAR	constitutive androstane receptor
Cmax	maximum plasma concentration
CYP	cytochrome P450
DCF	diclofenac
dGSH	dansyl glutathione
Em	emission
Ex	excitation
EROD	ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylase
GSH	glutathione
HO-1	heme oxygenase-1
HPLC	high performance liquid chromatography
ICH	international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
IDT	idiosyncratic drug toxicity
IL	interleukin
iNOS	inducible NO synthase
IS	internal standard
JSCC	Japan society of clinical chemistry
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LPS	lipopolysaccharide
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
ODS	octa decyl silyl
4'-OH-DCF	4'-hydroxydiclofenac
5-OH-DCF	5-hydroxydiclofenac
PBS	phosphate buffered saline
PXR	pregnane X receptor
SD	Sprague-Dawley
T _{1/2}	elimination half-life
T _{max}	time to maximum plasma concentration
TNF- α	tumor necrosis factor- α
UV	ultraviolet
WI	Wistar

要約

Cytochrom P450 (CYP) はステロイドや脂肪酸などの内因性物質のみならず、薬物や農薬などの外来異物の酸化代謝において中心的役割を担っている代謝酵素であり、特に肝臓のミクロゾーム分画に高濃度で存在している。体内に取り込まれたこれらの異物の多くは、CYPによる代謝で解毒化され体外に排泄されるが、逆に活性化され、より毒性の高い代謝物（反応性代謝物）に変化し、様々な障害を誘発する異物も多く存在する。

医薬品開発において、特異体質性薬物毒性 (idiosyncratic drug toxicity, IDT) と総称される副作用の発現は最も懸念される事項の一つである。IDTは、発症頻度が1/1,000~1/100,000と非常に稀にもかかわらず、薬物の薬理作用及び投与量とは無関係に肝毒性、心臓毒性、血液・骨髄毒性あるいはアレルギー反応などの重篤な障害を引き起こし、時として死に至らしめる。IDTの発現機序については、薬物の反応性代謝物及び免疫系の関与が示唆されているが、正常な実験動物ではIDTは再現されず、また適切な動物モデルが確立されていないことから、それらの仮説を裏付ける実験的証拠は不十分であり、詳細は明らかとなっていない。このようなIDTの特性から、非臨床安全性試験では評価が難しく、臨床試験後期又は市販後になってはじめて顕在化し、撤退を余儀なくされることも多い。従って、製薬企業にとってできるだけ開発初期にIDT回避のためのアプローチ及び評価法の確立が急務となっている。

本研究では、薬物の反応性代謝物生成に関与する肝臓中のCYPに着目し、第一章では、非臨床安全性試験で用いられるSprague-Dawley (SD) 及びWistar (WI) ラットにおけるCYP発現量及び肝ミクロゾーム中の酵素活性並びにCYP誘導剤に対する各CYP分子種の反応性を検討した。第二章では、SDラットをlipopolysaccharide (LPS) で前処置した免疫機能改変モデルをIDTモデルとして用い、免疫賦活化条件下における薬物の反応性代謝物の挙動を評価し、IDT回避のための評価法を模索した。

第一章 Sprague-Dawley 及び Wistar ラットの肝薬物代謝酵素の系統差に関する検討

医薬品開発における非臨床安全性試験において、高頻度で使用されるSD及びWIラットについて、肝薬物代謝酵素CYPの発現量及びCYP誘導剤に対する反応性の系統差を検討した。CYP1A1, CYP1A2及びCYP3A2 mRNA発現量はSDよりWIラットで高く、CYP誘導剤であるphenobarbital処置により、その差はより明らかとなった。また、肝ミクロゾーム中のCYP1A酵素活性及び総P450含量の増加並びに小葉中心性肝細胞における滑面小胞体の増加もWIラットで顕著であった。CYP3A誘導剤であるdexamethasoneを用いてSD及びWIラットを処置したとき、CYP3A1及びCYP3A2 mRNA発現量はSDよりもWIラットでより強く誘導されたが、CYP1A誘導剤である β -naphthoflavoneを用いた処置では両系統とも顕著なCYP1Aの誘導が認められたにもかかわらず、誘導後のmRNA発現量に系統差は認められなかった。また、これらの誘導に強く関与する各種核内受容体のmRNA発現量は、phenobarbitalあるいはdexamethasoneを用いた処置でSDよりWIラットで有意に高かった。以上より、WIラットはSDラットよりも肝臓中のCYP1A及びCYP3AのmRNA発現量が有意に高く、その系統差の原因は、それらの分子種の誘導にかかわる核内受容体と関連していると考えられた。CYP1A及びCYP3Aが薬物動態学的及び毒性学的に重要な役割を担っていることを考慮すると、これらの酵素によって特異的に代謝されるような化合物の非臨床試験では、用いられるラット系統によって異なる試験結果が得られる可能性が考えられた。また、

CYP 誘導剤に対する CYP mRNA 発現量の反応性においては、WI 及び SD ラット間で類似の反応性を示したことから、候補化合物の CYP 誘導評価はどちらのラット系統を用いても同様の結果が得られることが示唆された。

第二章 LPS 処置ラットを用いた特異体質性の薬物性肝毒性の検討

LPS はグラム陰性細菌の細胞外膜の主要構成成分であり、生体内に取り込まれると細胞膜に発現する Toll 様受容体 4 を介して、種々の炎症性サイトカインを産生させる。LPS で SD ラットを処置した肝マイクロゾームを用いて、*in vitro* 条件下における diclofenac (DCF) の水酸化活性及び DCF の反応性代謝物生成に及ぼす LPS の影響を検討した。LPS 処置ラットから採取した肝マイクロゾーム中では、総 P450 含量並びに testosterone の 6 β -、16 α -及び 16 β -水酸化活性に顕著な低下が認められた。加えて、DCF の水酸化活性及び DCF の反応性代謝物生成量の減少も認められた。これらの結果は、LPS による CYP のダウンレギュレーションを示唆した。腹腔マクロファージを用いた細胞実験では、LPS の低濃度処理によっても炎症性サイトカインである interleukin-6 (IL-6) 及び tumor necrosis factor- α (TNF- α) の顕著な増加が認められ、ストレス応答蛋白質である inducible NO synthase (iNOS) 及び heme oxygenase-1 (HO-1) の増加も認められた。HO-1 は、炎症反応によって生じるフリーラジカルや iNOS によって生成される NO などの酸化ストレスによって誘導されることから、LPS による CYP のダウンレギュレーションは LPS 刺激で惹起された酸化ストレスが一因であることが示唆された。

DCF が特異体質性肝障害を誘発することはよく知られている。LPS あるいは DCF 単独投与では肝障害を起こさない低用量でラットに LPS/DCF 併用投与したとき、肝逸脱酵素である ALT 及び AST 活性の増加とともに IDT 様の肝障害が病理組織学的に認められた。この肝臓を採取し、組織と反応性代謝物との付加体生成量を測定した結果、DCF 単独投与に比して、(アシルグルクロン酸抱合体由来の) DCF 及び 4'-水酸化代謝物 (4'-OH-DCF) の付加体生成量に変化は認められなかったが、5-水酸化代謝物 (5-OH-DCF) の付加体生成量は有意に増加した。また、反応性代謝物の解毒に重要な役割を担うグルタチオン (GSH) の肝臓中濃度を測定した結果、LPS/DCF の併用投与によって肝臓中の GSH 濃度の有意な低下が認められた。従って、5-OH-DCF の付加体生成量の増加は、肝臓中の GSH 濃度低下に依存した変化と考えられた。なお、*in vivo* 条件下では、LPS による CYP のダウンレギュレーションの影響は明らかではなかった。

薬物と蛋白質との付加体の生成量は IDT 発現におけるリスクファクターであり、また 5-OH-DCF の付加体は免疫反応の抗原になり得ることから、その付加体生成量の増加は IDT 発現に重要な役割を果している可能性が示唆された。また、LPS 刺激によって発生する酸化ストレスや炎症性サイトカインなどは、危険シグナルとしてその免疫反応を惹起し、IDT 発現リスクを増強させるものと推察された。

以上、結論として、本論文では、非臨床安全性試験において高頻度で用いられる SD 及び WI ラットにおける CYP の発現量及び酵素活性並びに CYP 誘導剤に対する反応性の系統差を明らかにした。また、CYP による代謝活性化によって生成される反応性代謝物と組織蛋白質との付加体の増加が IDT 発現において重要な役割を果す可能性を、SD ラットを用いて実験的に示した。

第一章 Sprague-Dawley 及び Wistar ラットの肝薬物代謝酵素の系統差に関する検討

1-1. 緒言

医薬品開発における非臨床安全性試験では、ヒトの集団が遺伝的に均一ではないことを考慮し、ある程度の遺伝的多型性を保持するクローズドコロニー系統の実験動物が一般的に用いられる。クローズドコロニー系統の中でも Sprague-Dawley (SD) 及び Wistar (WI) ラットは、特に使用頻度の高い実験動物である [1]。

1990年4月に ICH (日米 EU 医薬品規制調和国際会議) が発足して以来、新医薬品の承認審査基準における国際的統一化が進められてきた [2]。SD 及び WI ラットもこの動向に合わせて、世界各所にある動物生産コロニー間の遺伝的制御により品質の国際的均一化が進められてきた。しかし、非臨床安全性試験に供されるラットの系統は日米欧間でしばしば異なっており、ICH で求められる試験結果の国際的相互受入れのためには、SD 及び WI の両系統間の差異を理解することは重要な課題であると考えられる。一般的に、SD 及び WI 間の系統差として、体重、生存率及び自然発生腫瘍に関する報告は多くあるが [3, 4]、毒性発現において重要な要因となる薬物代謝酵素 cytochrom P450 (CYP) の差異を検討した報告はほとんどない。

CYP はステロイドや脂肪酸などの内因性物質のみならず、薬物、農薬、食品添加物、環境汚染物質などの異物の酸化代謝において中心的役割を担っている酵素であり、特に肝臓のミクロゾーム分画に高濃度で存在している [5]。体内に取り込まれたこれらの異物の多くは、CYP による代謝で解毒化され体外に排泄されるが、逆に活性化され、より毒性の高い代謝物に変化し、肝障害を誘発する異物も多く存在する [6, 7]。

第一章では、代謝活性化による肝障害に関与する CYP の発現量及び肝ミクロゾーム中 CYP 酵素活性を SD 及び WI ラットを用いて評価した。更に、CYP 誘導剤である phenobarbital, dexamethazon 又は β -naphthoflavone 処置による CYP 各分子種の反応性を両系統間で比較した。

1-2. 材料及び方法

1-2-1. 試薬

Phenobarbital は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。Dexamethazon 及び β -naphthoflavone は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。その他の試薬類はすべて市販特級品を用いた。

1-2-2. 実験動物

実験動物は、7 週齢 (体重 200 – 250 g) の雄性 SD (CrI:CD(SD)) 及び WI (BrlHan:WIST@Jcl(GALAS))ラットを Charles River Laboratories Japan, Inc. (Kanagawa, Japan) 及び CREA Japan, Inc. (Shizuoka, Japan) よりそれぞれ購入したものをを用いた。ラットは恒温恒湿、照明サイクル 12 時間の条件下で CE-2 飼料 (CREA Japan, Inc.) 及び紫外線照射滅菌した水を自由摂取させ、1 週間の検疫・馴化期間を設けた後、実験に供した。CYP の酵素誘導処置として、phenobarbital (60 mg/kg/day), dexamethasone (100 mg/kg/day) 又は β -naphthoflavone (80 mg/kg/day) をラットに 3 日間反復腹腔内投与した。対照として、生理食塩水を同様に腹腔内投与したラットを用いた。投与 3 日目の投与 24 時間後の肝臓を遺伝子発現解析、病理組織学的検索及び *in vitro* 代謝実験に用いた。すべての動物実験はキッセイ薬品工業株式会社安全性研究所の動物実験規程に従って実施した。なお、当施設は財団法人ヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認証センターにより認定されている (認定番号: 09-007)。

1-2-3. Total RNA 及び肝ミクロゾームの調製

肝臓の 3 mm 角細片を速やかに 0.5 mL の RNA 安定化剤 RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) 中に採取し、冷蔵で 24 時間浸透させた後、Total RNA の精製まで -80°C で保存した。Total RNA は、SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA) を用いてマニュアルに従い精製した。

肝ミクロゾームの調製は、肝臓を摘出した後、1.15% 塩化カリウム水溶液で還流させ、Degawa らの方法に従って調製した [8]。肝重量に対して 4 倍量の 1.15% 塩化カリウム水溶液を加え、氷冷下でホモジナイズした後、 $9,000\times g$ で 20 分間の遠心分離を行った。さらに、得られた上清を $105,000\times g$ で 60 分間の遠心分離を行った。得られた上清を捨て、下層を氷冷した 1.15% 塩化カリウムで 3 回洗浄後、得られた肝ミクロゾーム画分を 1.15% 塩化カリウム水溶液で懸濁させた。肝ミクロゾーム懸濁液の蛋白質量は Lowry らの方法 [9] に従って定量した。また、総 P450 含量は Omura 及び Sato らの方法 [10] に従い、450 nm と 490 nm における吸光度の差から分子吸光係数 ($91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いて算出した。

1-2-4. 遺伝子発現解析

肝臓の mRNA 発現量は、Total RNA (25 ng/5 μL) から 1-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 試薬 (Eurogentec, Seraing, Belgium) を用いて TaqMan リアルタイム PCR により定量した。反応は GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用い、内部標準として β -actin を用いた。各測定遺伝子のプライマーペア及び TaqMan プローブは、Applied Biosystems から購入した。なお、各遺伝子の発現量は対照 SD ラットの発現量の相対比で表した。

1-2-5. 病理組織学的検索

肝臓（外側左葉）の細切小片を採取し、カルノフスキー固定液及び1%オスミウム酸水溶液による固定後、脱水し、プロピレンオキサイド置換後、Epoxy樹脂に包埋した。病理組織学的検索は、電子顕微鏡 JEM-1200EX (Japan Electronics, Tokyo, Japan) を用いて実施した。

1-2-6. *in vitro* 代謝実験：Etoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) 活性（CYP1A 酵素活性）

Burk らの方法 [11] に従い、ethoxyresorufin を基質として resorufin の生成量を測定することにより、EROD 活性を求めた。即ち、0.5 mL の反応溶液 [0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4), 0.2 mg/mL 肝ミクロゾーム, 5 μ M ethoxyresorufin, NADPH 生成系 (1.5 mM NADP⁺, 15 mM グルコース 6 リン酸, 15 mM 塩化マグネシウム, 0.1 unit/mL グルコース 6 リン酸脱水素酵素)] を 37 °C で 10 分間インキュベーションした後、250 μ L の氷冷メタノールの添加により反応を停止した。1,200 \times g で 5 分間の遠心分離を行った後、得られた上清の resorufin 濃度を液体クロマトグラフ装置 (HPLC)-alliance HT (Waters, Milford, MA, USA) を用いて蛍光（励起波長：575 nm, 蛍光波長：595 nm）にて検出した。

1-2-7. *in vitro* 代謝実験：Phenacetin *O*-deethylase 活性（CYP1A 酵素活性）

Masubuchi らの方法 [12] に従い、acetaminophen のプロドラッグである phenacetin を基質として acetaminophen の生成量を測定することにより、phenacetin *O*-deethylase 活性を求めた。即ち、1 mL の反応溶液 [0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4), 0.5 mg/mL 肝ミクロゾーム, 10 μ M phenacetin, NADPH 生成系] を 37 °C で 20 分間インキュベーションした後、4 mL の氷冷メタノール（内標準物質として 2.5 μ M antipyrine を含む）の添加により反応を停止した。1,200 \times g で 5 分間の遠心分離を行った後、得られた上清を 60 °C で窒素ガス気流下にて乾固し、0.1 mL の移動相（水・アセトニトリル 9:1, v/v）で再溶解した。得られた溶液中の acetaminophen 濃度を HPLC 法 [13] により UV (254 nm) にて検出した。

1-2-8. *in vitro* 代謝実験：Testosterone 6 β 水酸化活性（CYP3A 酵素活性）

Imaoka らの方法 [14] に従い、testosterone を基質として testosterone の 6 β 水酸化代謝物である 6 β -hydroxytestosterone の生成量を測定することにより、testosterone 6 β 水酸化活性を求めた。即ち、1 mL の反応溶液 [0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4), 0.5 mg/mL 肝ミクロゾーム, 1 mM testosterone, NADPH 生成系] を 37 °C で 10 分間インキュベーションした後、4 mL の酢酸エチル（内標準物質として 2.5 μ M 17 α -methyltestosterone を含む）の添加により反応を停止した。1,200 \times g で 5 分間の遠心分離を行った後、有機層 3 mL を分取し、60 °C で窒素ガス気流下にて乾固し、0.1 mL のメタノールで再溶解した。得られた溶液中の 6 β -hydroxytestosterone 濃度を HPLC 法により UV (254 nm) にて検出した。

1-2-9. *in vitro* 代謝実験 : Diazepam C₃水酸化活性 (CYP3A 酵素活性)

Saito らの方法 [15] に従い, diazepam を基質として diazepam の C₃ 水酸化代謝物である temazepam の生成量を測定することにより, diazepam C₃ 水酸化活性を求めた。即ち, 1 mL の反応溶液 [0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4), 0.5 mg/mL 肝ミクロゾーム, 3 μM diazepam, NADPH 生成系] を 37 °C で 10 分間インキュベーションした後, 4 mL の酢酸エチル (内標準物質として 0.25 μM nitrazepam を含む) の添加により反応を停止した。1,200×g で 5 分間の遠心分離を行った後, 有機層 3 mL を分取し, 60 °C で窒素ガス気流下にて乾固し, 0.1 mL のメタノール・水 (2:1, v/v) で再溶解した。得られた溶液中の temazepam 濃度を HPLC 法により UV (230 nm) にて検出した。

1-2-10. 統計解析

データはすべて対照 SD ラットに対する相対値とし, 平均±標準偏差 (S.D.) で表記した。SD ラット及び Wistar ラットの対照群間又は処理群間で F 検定を行い, 等分散の仮定が成立した場合は Student の *t* 検定を, 等分散の仮定が成立しない場合は Aspin-Welch 法による *t* 検定の近似式により検定した。いずれも有意水準 5%未満をもって有意な差があるとした。

1-3. 結果

1-3-1. 遺伝子発現解析

Figure 1-1 は、CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C6, CYP2D2, CYP3A1, CYP3A2 及び CYP4A1 の SD 及び WI ラットにおける肝臓中 mRNA 発現量を示す。対照 SD 及び WI ラット間での比較では、SD より WI ラットで CYP1A1, CYP1A2 及び CYP3A2 の mRNA 発現量がそれぞれ 8 倍、3 倍及び 2 倍高かった。その他の CYP 分子種については、有意な差は認められなかった。

Phenobarbital 処置により、両系統とも CYP2B1/2, CYP2C6, CYP3A1 及び CYP3A2 mRNA 発現量が誘導され、文献 [16, 17] で報告されているものと一致した。CYP1A1 mRNA は、WI ラットでのみ誘導が認められた。また、両系統間の比較では、CYP1A1 及び CYP3A2 mRNA 発現量はそれぞれ WI ラットで 26 倍及び 4 倍高値を示した。

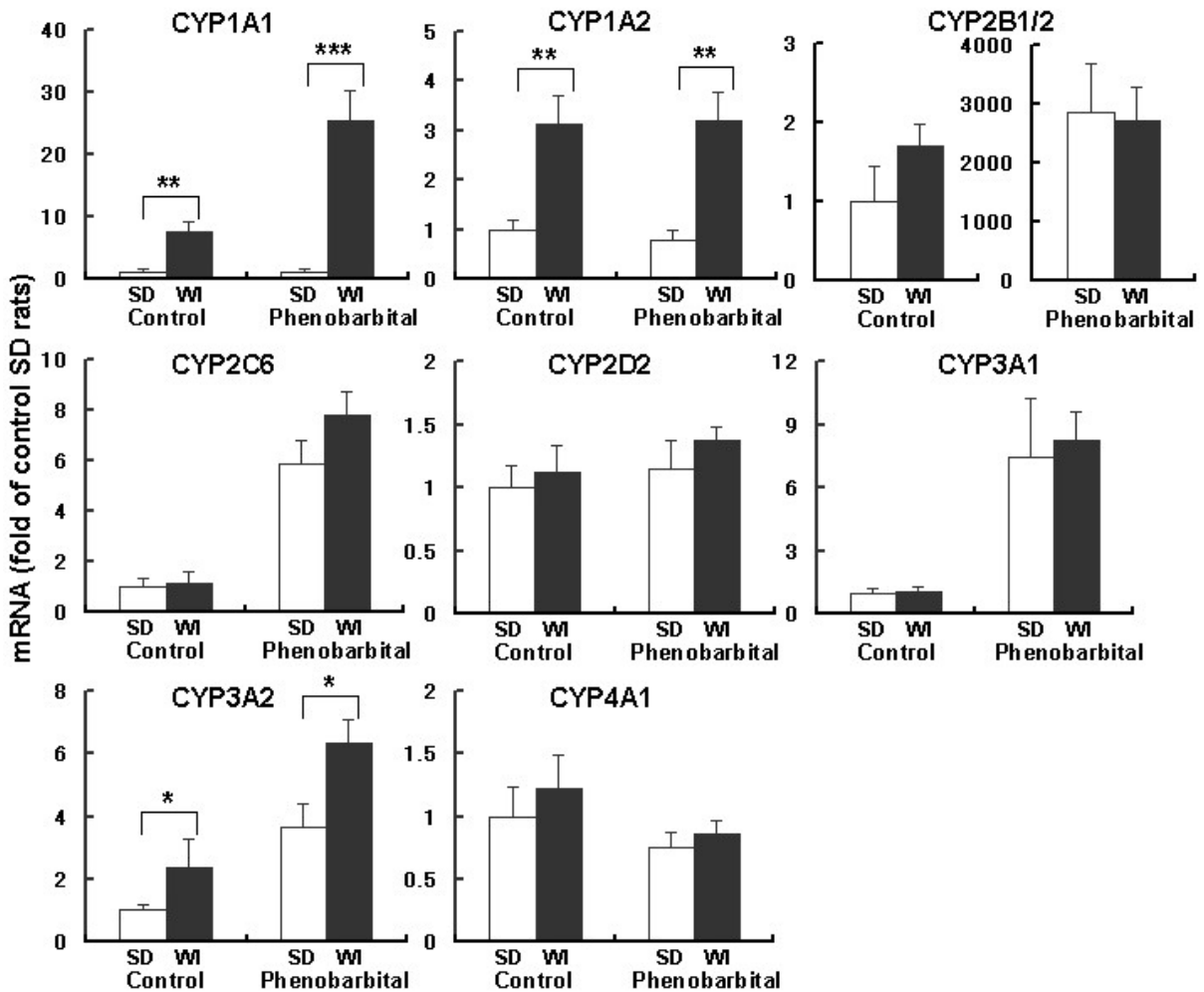


Figure 1-1. Hepatic CYP mRNA expression in saline-treated (control) and phenobarbital-treated Sprague-Dawley (SD) or Wistar (WI) rats.

Data are shown as means \pm S.D. (n=4-7). Asterisks indicate statistically significant difference between SD and WI rats (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001).

1-3-2. 肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 代謝実験

Figure 1-2 の A, B 及び C は, それぞれ肝ミクロゾーム中の総 P450 含量並びに CYP1A 及び CYP3A 酵素活性を示す。CYP1A 活性として EROD 及び phenacetine *O*-deethylase 活性を, CYP3A 活性として testosterone 6 β -hydroxylase 及び diazepam C₃-hydroxylase 活性を測定した。phenobarbital 処置により総 P450 含量, CYP1A 及び CYP3A 酵素活性の増加が認められた。両系統間の比較では, phenobarbital 処置による総 P450 含量において, SD より WI ラットで 1.4 倍高値を示した。CYP1A 酵素活性は対照及び phenobarbital 処置ともに WI ラットでわずかであるが有意な差が認められた。しかし, CYP3A 酵素活性については, 両系統間に有意な差は認められなかった。

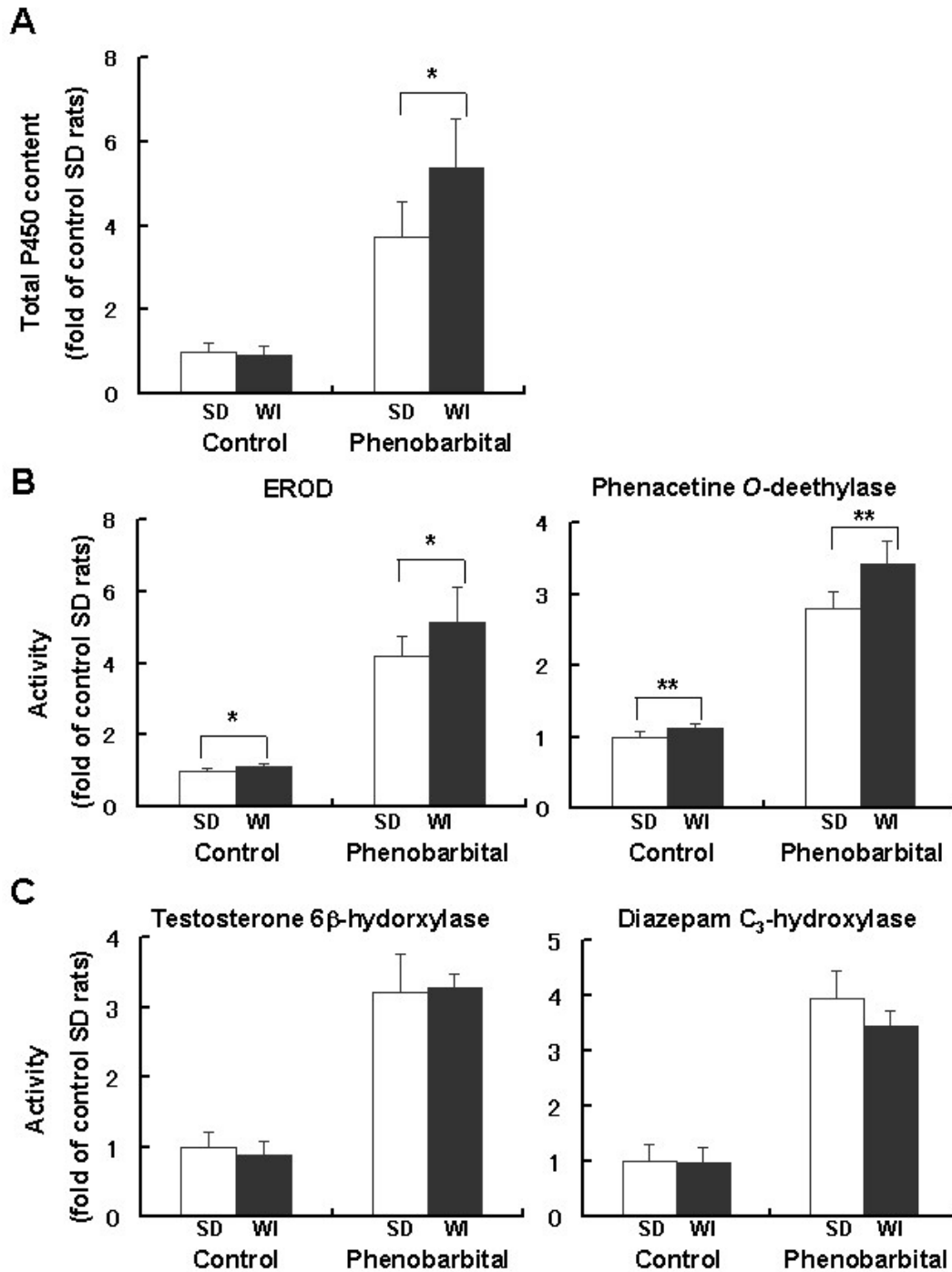


Figure 1-2. Total P450 contents (A), ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) and phenacetine *O*-deethylase activities (B), and testosterone 6 β -hydroxylase and diazepam C₃-hydroxylase activities (C) in hepatic microsomes of saline-treated (control) and phenobarbital-treated Sprague-Dawley (SD) or Wistar (WI) rats.

Data are shown as means \pm S.D. (n=4). Asterisks indicate statistically significant difference between SD and WI rats (* P<0.05, ** P<0.01).

1-3-3. 病理組織学的検索

Figure 1-3 は肝臓の電子顕微鏡写真を示している。写真中の A から D は、対照 SD ラット、対照 WI ラット、phenobarbital 処置の SD ラット、phenobarbital 処置の WI ラットを各々示している。Phenobarbital 処置により、小葉中心性肝細胞における滑面小胞体の増加が両系統で認められた。所見の程度は SD より WI ラットで強かった。

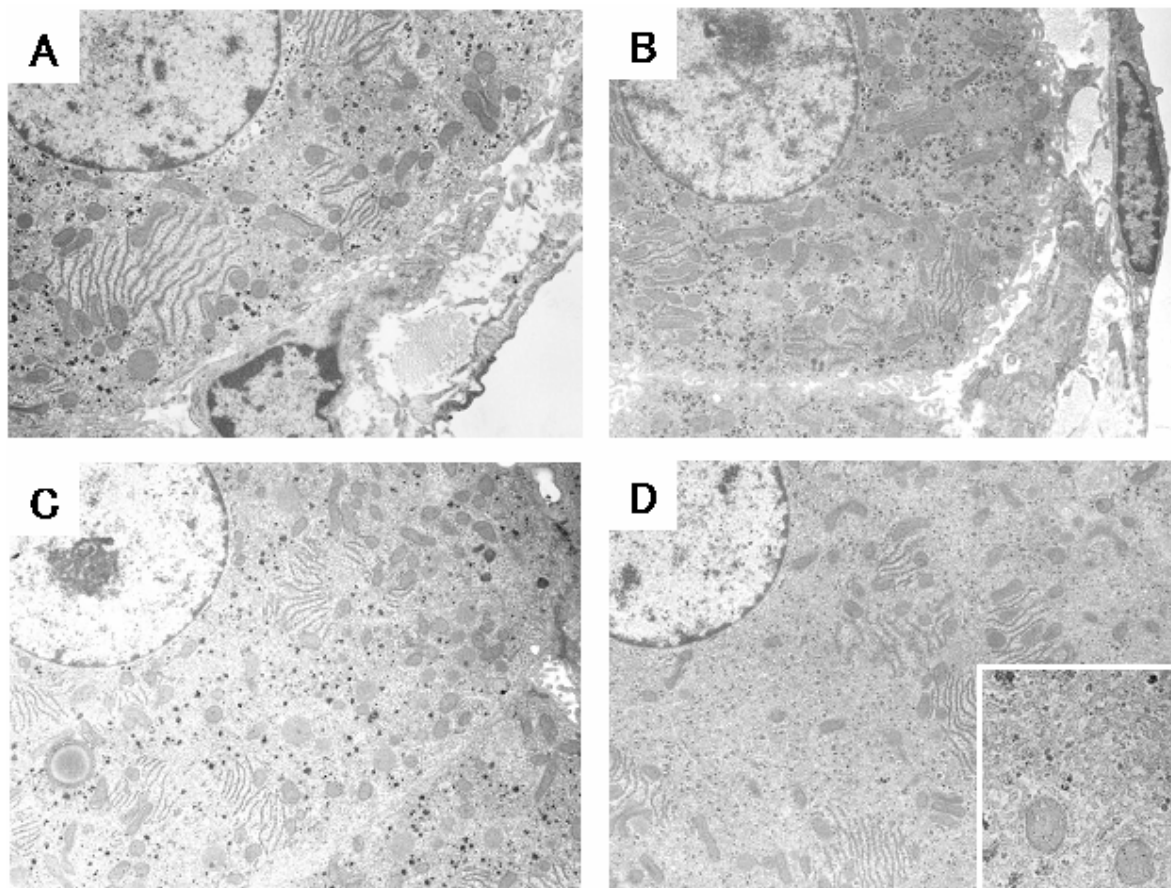


Figure 1-3. Representative centrilobular hepatocyte electron micrographs of a saline-treated Sprague-Dawley (SD) rat (A) and Wistar (WI) rat (B), a phenobarbital-treated SD rat (C) and WI rat (D) (magnification $\times 2000$). Inset in (D) (magnification $\times 20000$).

1-3-4. CYP1A 及び CYP3A 酵素誘導剤処置による遺伝子発現解析

Figure 1-4 の A は, CYP1A 酵素誘導剤である β -naphthoflavone で処置したときの CYP1A1 及び CYP1A2 mRNA 発現量を示し, Figure 1-4 の B は, CYP3A 酵素誘導剤である dexamethasone を処置したときの CYP3A1 及び CYP3A2 mRNA 発現量を示す。 β -naphthoflavone 処置により, CYP1A1 及び CYP1A2 mRNA は両系統とも顕著に誘導されたが, phenobarbital でみられたような系統差は認められなかった。一方, dexamethasone で処置したとき, CYP3A1 及び CYP3A2 mRNA は両系統とも誘導され, CYP3A1 及び CYP3A2 mRNA 発現量は SD ラットより WI ラットで約 2 倍高かった。CYP3A2 mRNA の差は, phenobarbital を処置した場合と一致した (Figure 1-1)。

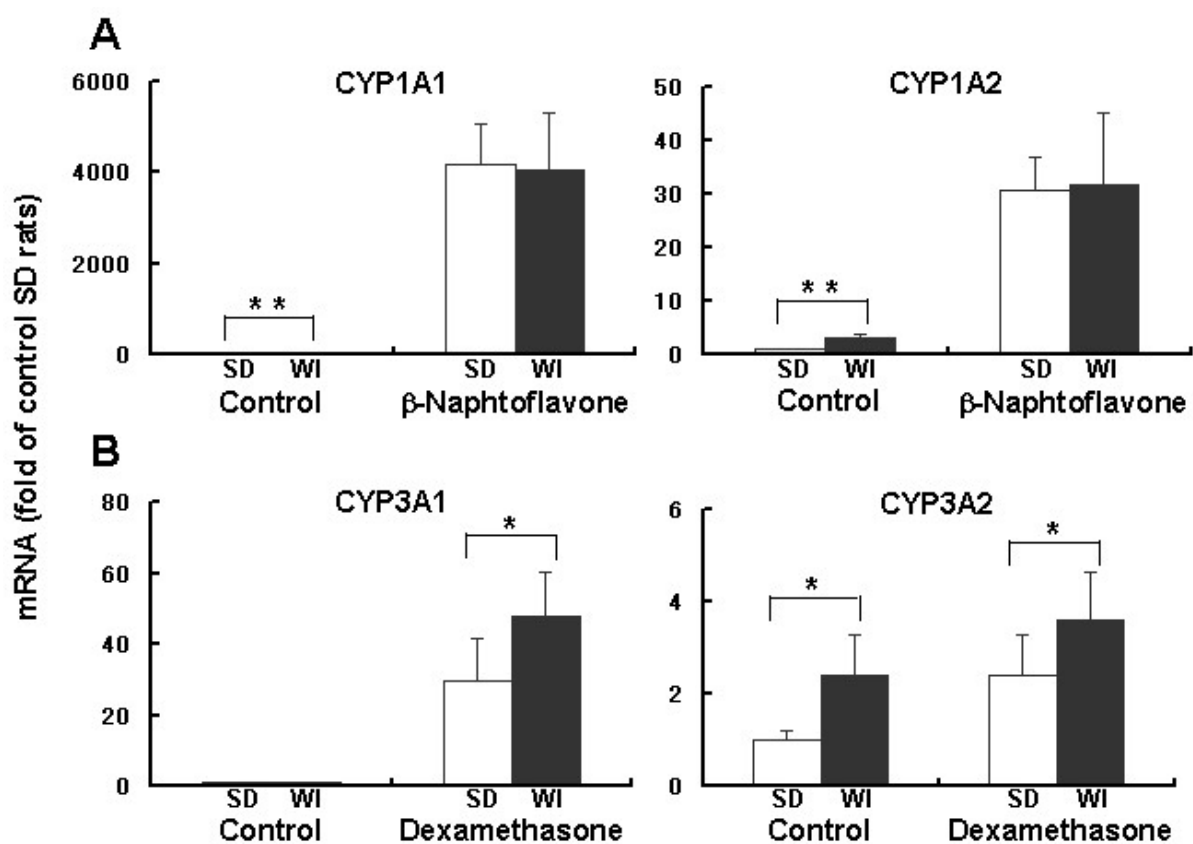


Figure 1-4. A: hepatic CYP1A1 and CYP1A2 mRNA levels in saline- and β -naphthoflavone-treated Sprague-Dawley (SD) or Wistar (WI) rats. B: hepatic CYP3A1 and CYP3A2 mRNA levels in saline- and dexamethasone-treated SD or WI rats. Data are shown as means \pm S.D. (n=4-7).

Data are shown as a fold of saline-treated (control) SD rats and shown in means \pm S.D. Asterisks indicate statistically significant difference between SD and WI rats (* P<0.05, ** P<0.01).

1-3-5. 酵素誘導剤処置による核内受容体の遺伝子発現解析

CYP1A 及び CYP3A の誘導的発現機構は、核内受容体によって制御されている。CYP1A は AhR (arylhydrocarbon receptor), CYP3A は PXR (pregnane X receptor) 及び CAR (constitutive androstane receptor) の核内受容体が主に関与している [18-21]。Figure 1-5 は、酵素誘導剤処置した場合の AhR (A), PXR (B) 及び CAR (C) の mRNA 発現量を示す。Phenobarbital 処置により、AhR, PXR, CAR の mRNA 発現量は、それぞれ 1.6 倍, 2 倍, 1.8 倍 SD より WI ラットで有意に高かった。また、dexamethasone 処置では、PXR 及び CAR mRNA 発現量は、それぞれ 1.4 倍及び 1.7 倍 SD より WI ラットで有意に高かった。一方、 β -naphthoflavone 処置では、核内受容体発現量に差は認められなかった。

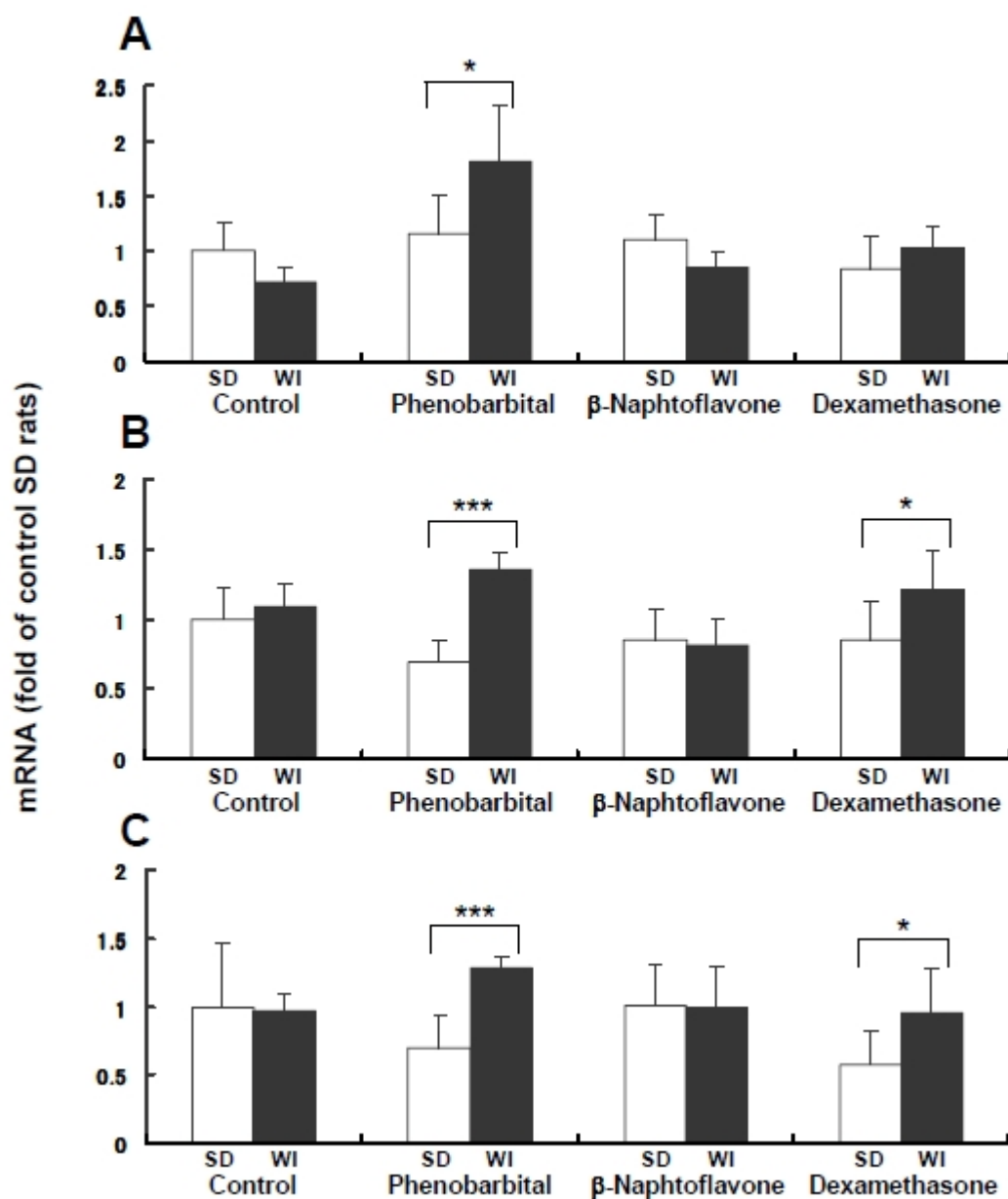


Figure 1-5. Hepatic arylhydrocarbon receptor (AhR) (A), pregnane X receptor (PXR) (B) and constitutive androstane receptor (CAR) (C) mRNA levels in Sprague-Dawley (SD) or Wistar (WI) rats treated with various inducers: phenobarbital, β -naphtoflavone and dexamethasone.

Data are shown as means \pm S.D. (n=4–7). Asterisks indicate statistically significant difference between SD and WI rats (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

1-4. 考察

本章では、医薬品開発における非臨床安全性試験において、高頻度で使用される SD 及び WI ラットについて、肝薬物代謝酵素 CYP の発現量及び CYP 誘導剤に対する反応性の系統差を検討した。

Phenobarbital は最も代表的な CYP 誘導剤であり、CYP の様々な分子種を誘導することが知られている [16, 17]。まず、phenobarbital の酵素誘導に対する反応性は、両系統とも総 P450 含量の増加及び小葉中心性の肝細胞内滑面小胞体の増加が認められ、その程度は SD より WI ラットで強かった。また、肝臓の CYP 遺伝子発現解析では、CYP1A1, CYP1A2 及び CYP3A2 mRNA に系統差 (SD<WI) が認められ、phenobarbital 処置によってその差はより顕著となった。肝ミクロゾーム中の CYP1A 活性も CYP1A mRNA の発現量の結果と一致したことから、両系統間に CYP1A の系統差が本検討で明らかとなった。一方、肝ミクロゾーム中の CYP3A 活性は、phenobarbital 処置によっても両系統間に差異は認められなかった。また、diazepam を静脈内投与した著者らの *in vivo* 予備検討においても、CYP3A の代謝物である temazepam の血漿中濃度に両系統間で差異は認められなかった (データ非掲載)。CYP3A では、酵素活性と mRNA 発現量に相関が認められなかった原因として、本検討で用いた CYP3A 活性の特異性が不十分であり、CYP3A mRNA 発現量の差異が反映されなかった可能性、CYP3A mRNA 発現量の差が蛋白量にまで差を及ぼさなかった可能性、CYP3A 蛋白量に差異があっても CYP3A の塩基配列に一塩基多型 (SNP) が存在し蛋白の構造や機能に相違があり、結果として活性に差異が認められなかった可能性も考えられる。詳細は、より特異性の高い CYP3A 活性測定、蛋白定量及び立体構造解析等により明らかになると考えられる。

次に、CYP3A 誘導剤である dexamethasone あるいは CYP1A 誘導剤である β -naphthoflavone を用いて SD 及び WI ラットを処置し、CYP3A 及び CYP1A の mRNA 発現量を両系統間で比較した。Dexamethasone 処置により、CYP3A1 及び CYP3A2 mRNA 発現量は SD よりも WI ラットでより強く誘導され、その程度は phenobarbital 処置した場合と近似した。一方、 β -naphthoflavone で処置した場合では、phenobarbital 処置に比して CYP1A1 及び CYP1A2 mRNA は劇的に誘導されたものの、誘導後の mRNA 発現量に系統差は認められなかった。これらの結果より、CYP3A の誘導においては phenobarbital と dexamethasone 間に類似性が認められ、CYP1A の誘導では、phenobarbital と β -naphthoflavone 間に明らかな差異が認められた。著者らは、これらの両系統間でみられた反応性の差異の解釈のため、核内受容体の mRNA 発現量を検討した。

CYP 誘導に関する分子機構は長らく不明であったが、CYP1A については AhR が、CYP3A については CAR や PXR といった核内受容体が、それぞれ CYP 遺伝子の転写活性化に重要な役割を果たしていることが報告され [18-21]、その機構の一端が明らかにされてきた。PXR は、CYP3A を誘導する種々の化合物により活性化されることから、CYP3A の転写調節に関与する受容体として同定されている [22-24]。また、CAR は主に CYP2B を誘導するが、PXR による CYP3A の誘導機構と重複する経路があるため、CYP3A も誘導する [20, 21, 25]。本検討では、CYP3A 誘導剤処置によって PXR 及び CAR の mRNA 発現量が、CYP3A mRNA 発現量の系統差と同様の変化が認められた。このことから、CYP3A mRNA 発現量の系統差は、核内受容体を介する典型的な CYP3A 誘導機構に何らかの系統差が存在する可能性が示唆された。一方、CYP1A については、 β -naphthoflavone 処置によっても AhR mRNA 発現量に系統差がみられず、phenobarbital 処置でのみ AhR mRNA 発現量に WI ラットで有意な系統差が認められた。Phenobarbital は AhR に対して親和

性が低いにもかかわらず、CYP1A を誘導することから、 β -naphthoflavone や 3-methylcholanthrene のような芳香族多環炭化水素による CYP1A 誘導機構とは異なる phenobarbital に特異的な CYP1A 誘導機構の存在が示唆されている [26, 27]。従って、本検討で認められた CYP1A の系統差は、この phenobarbital 特異的な CYP1A 誘導機構に系統差が存在する可能性が考えられた。しかし、CYP 誘導機構には核内受容体だけでなく種々の共役活性化因子あるいは共役制御因子が関係していることが知られており [28]、本検討で認められた CYP 系統差の同定には更なる検討が必要と考えられる。

WI ラットで有意であった CYP1A 及び CYP3A はともに、非臨床試験結果の解釈において中心的役割を担っている薬物代謝酵素である。これらの代謝酵素は、通常、薬物を含む外来性異物を酸化、還元又は過酸化代謝によって解毒するが [29]、時には逆に異物を代謝活性化し、フリーラジカルや反応性代謝物を生成する。フリーラジカルは、ラジカル連鎖反応や活性酸素生成の引き金として作用し、脂質をはじめとする各種の生体分子の切断、架橋、分解を引き起こす。反応性代謝物は、蛋白質や DNA と共有結合して付加体を形成し、免疫毒性、肝毒性、遺伝毒性及び特異体質性毒性等の様々な毒性を誘発することが報告されている [30-33]。従って、特に CYP1A あるいは CYP3A によってのみ代謝される薬物の開発においては、非臨床試験で用いられるラット系統によって、試験結果が異なってしまう可能性がある。これをサポートする報告もある。WI ラットの肝臓から調製された S9 を用いた *in vitro* 復帰突然変異試験では、ネズミチフス菌 TA100 及び TA1537 株において、benzo[a]pyrene 及び 2-aminoanthracene の復帰変異コロニー数が SD ラットの S9 よりも明らかに増加すると報告されている [34]。Benzo[a]pyrene 及び 2-aminoanthracene はそれぞれ CYP1A1 及び CYP1A2 によって代謝活性化され、遺伝毒性を誘発する代表的な前発がん性物質である [35]。また、1,4-dichlorobenzene の代謝活性化による共有結合能においては、SD ラットよりも WI ラットで有意に高かったことも報告されている [36]。1,4-dichlorobenzene の代謝活性化は肝ミクロゾーム中の CYP3A が主に関与している [37]。一方で、本検討結果は、各種酵素誘導剤に対する CYP mRNA 発現量の反応性に WI 及び SD ラット間で類似の反応性を示したことから、候補化合物の CYP 誘導評価はどちらのラット系統を用いても同様の結果が得られることを示唆する。

1-5. 小括

WI ラットは SD ラットよりも肝臓中の CYP1A 及び CYP3A の mRNA 発現量が有意に高く、その系統差の原因は、それらの分子種の誘導にかかわる AhR, CAR, PXR といった核内受容体と関連していると考えられた。CYP1A 及び CYP3A が薬物動態学的及び毒性学的に重要な役割を担っていることを考慮すると、これらの酵素によって特異的に代謝されるような化合物の非臨床試験では、用いられるラット系統によって異なる試験結果が得られる可能性が考えられた。また、CYP 誘導剤に対する CYP mRNA 発現量の反応性においては、WI 及び SD ラット間で類似の反応性を示したことから、候補化合物の CYP 誘導評価はどちらのラット系統を用いても同様の結果が得られることが示唆された。

第二章 LPS 処置ラットを用いた特異体質性の薬物性肝毒性の検討

2. 序論

医薬品開発において、臨床試験あるいは市販後に発症する副作用の多くは、薬物の薬理作用から予測が可能であり、用量反応性が見られるため、通常、用量を減量することにより回避が可能である [38, 39]。しかし、非臨床安全性試験及び初期の臨床試験では問題となる毒性発現及び副作用がなかったにもかかわらず、多くの患者に使用されて初めて顕在化する副作用がある。これは特異体質性薬物毒性 (idiosyncratic drug toxicity, IDT) と総称される。

IDT は製薬企業にとって最も懸念すべき事項の一つである。IDT は、発症頻度が 1/1,000～1/100,000 と非常に稀にもかかわらず、薬物の薬理作用とは無関係に肝毒性、心臓毒性、血液・骨髄毒性あるいはアレルギー反応などの重篤な障害を引き起こし、時として死に至ることも報告されている [39, 40]。また、IDT はある患者では高用量投与でも発症しないのに、別の低用量投与の患者で発症するなど、用量反応性が乏しく、加えて IDT の発現まで薬物服用開始後数週間以上もかかるという厄介な特性を併せ持つ [38, 40-42]。このような IDT の特性から、臨床試験後期又は市販後になってはじめて顕在化するため、製薬企業は多大な負担を負って薬剤開発の中止あるいは市場からの撤退を余儀なくされる。従って、製薬企業はできるだけ開発初期に IDT 回避のためのアプローチ及び評価法の確立が急務となっている。

IDT の発現機序については従来からいくつかの仮説が提唱されており、免疫系及び薬物の反応性代謝物の関与が示唆されている [43-45]。しかし、正常な実験動物では IDT は再現されず、また適切な動物モデルが確立されていないことから、それらの仮説を裏付ける実験的証拠は不十分であり、詳細は明らかとなっていない [46, 47]。

近年、IDT 発症機序の解明を目的として、グルタチオン抱合を中心とした解毒能低下モデル [48] や lipopolysaccharide (LPS) などの併用による免疫機能改変モデル [49-53] など、各種動物モデルの有用性が検討されている。第二章では、LPS で SD ラットを前処置した免疫機能改変モデルに注目し、免疫賦活化条件下における薬物の反応性代謝物の挙動を評価し、IDT 回避のための評価法について模索した。

第一節では、LPS が肝薬物代謝酵素 CYP に及ぼす影響を、第二節では diclofenac (DCF) の反応性代謝物と組織との共有結合に及ぼす影響を検討した。

第一節 LPS の肝薬物代謝酵素に及ぼす評価

2-1-1. 緒言

LPS はグラム陰性細菌の細胞外膜の主要構成成分であり、生体内に取り込まれるとヒト及び実験動物ともに強力な自然免疫誘導活性を有することが知られている [54]。LPS は抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージを活性化し、未分化な T 細胞を 1 型ヘルパー T 細胞へと分化誘導する。また、細胞膜に発現する Toll 様受容体 4 を介して、種々の炎症性サイトカインを産生する [55, 56]。本研究では、LPS を用いて腹腔マクロファージを処置し、炎症性サイトカインである interleukin (IL)-6 や tumor necrosis factor (TNF)- α が産生することを確認した。

LPS による免疫系の賦活化を応用した実験動物モデルは、IDT モデルとしての有用性が注目されている。低用量の LPS と既知の IDT 誘発物質を併用投与することにより、実験動物でも IDT 様の障害が発現する [49-53]。Waring らは、単独投与で肝障害を惹起しない低用量の LPS と IDT 誘発物質である抗菌剤の trovafloxacin をラットに併用投与したとき、LPS/trovafloxacin 併用群で明らかかな肝障害が惹起され、IDT が認められない類薬の levofloxacin では LPS と併用投与しても肝障害が認められないことを報告している [50]。また、ヒスタミン H2 受容体拮抗薬の ranitidine 及び famotidine では、IDT 誘発物質である ranitidine にのみ IDT 様の肝障害がみられている [51]。

IDT 発現には免疫系のみならず、薬物の反応性代謝物の関与が強く示唆されている [43-45]。このことから、LPS が IDT 様障害を誘発させる際に反応性代謝物の挙動に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。本節では、LPS が反応性代謝物生成にかかわる肝薬物代謝酵素 CYP に及ぼす影響を検討した。

2-1-2. 材料及び方法

2-1-2-1. 試薬

LPS (*Escherichia coli* 由来), diclofenac (DCF) 及び 4'-hydroxy diclofenac (4'-OH DCF) は Sigma Chemical Co.より入手した。5-hydroxy diclofenac (5-OH DCF) は Toronto Research Chemicals Inc. (Ontario, Canada) より入手した。また、その他の試薬類はすべて市販特級品を用いた。

2-1-2-2. 実験動物

実験動物は 10 週齢 (体重 310–390 g) の雄性 SD (CrI:CD(SD))ラットを Charles River Laboratories Japan, Inc. (Kanagawa, Japan)より購入したものをを用いた。実験動物の飼育に関しては、第一章 1-2-2 に準じて行い、すべての動物実験はキッセイ薬品工業株式会社安全性研究所の動物実験規程に従って実施した。

2-1-2-3. 肝ミクロゾームの調製

ラットにLPSを静脈内投与 (1又は10 µg/2 mL生理食塩水/kg) し、2時間後にDCFを腹腔内投与 (20 mg/4 mL生理食塩水/kg) した。DCF投与24時間後に採取した肝臓 (外側左葉) をミクロゾーム調製に用いた。対照群には生理食塩水を同様に投与した。肝ミクロゾームの調製及び総P450含量の測定は第一章1-2-3と同様の方法で実施した。

2-1-2-4. *in vitro* 代謝実験 : Testosterone 水酸化活性

肝ミクロゾーム中の testosterone 6β-, 16α-及び 16β-水酸化活性は、第一章 1-2-8 に従って測定した。これらの水酸化活性は、それぞれ CYP3A, CYP2C 及び CYP2B 活性の指標となることが知られている [14]。

2-1-2-5. *in vitro* 代謝実験 : DCF 水酸化活性

Masubuchi らの方法 [57] に従い、DCF を基質として 4'-OH DCF 及び 5-OH DCF の生成量を測定することにより、肝ミクロゾーム中の DCF 水酸化活性を求めた。即ち、1 mL の反応溶液 [80 mM リン酸緩衝液 (pH7.4), 2 mg/mL 肝ミクロゾーム, 50 µM DCF, NADPH 生成系 (1.5 mM NADP⁺, 15 mM グルコース 6 リン酸, 15 mM 塩化マグネシウム, 0.1 unit/mL グルコース 6 リン酸脱水素酵素)] を 37 °C で 10 分間インキュベーションした後、1 M リン酸緩衝液 (pH5.0) の添加により反応を停止し、IS (50 µg/mL flurbiprofen) 0.1 mL 及びジエチルエーテル 3 mL を加えて攪拌した。1,200×g で 5 分間の遠心分離を行った後、有機相を 60 °C で窒素ガス気流下にて乾固し、0.1 mL の移動相 [20 mM リン酸緩衝液 (pH7.4, 0.02% トリエタノールアミンを含む)・アセトニトリル (7:3, v/v)] で再溶解した。得られた溶液中の DCF 水酸化代謝物濃度を HPLC 法により UV (282 nm) にて検出した。

2-1-2-6. *in vitro* トラップ実験：DCF 反応性代謝物

Gan らの方法 [58] に従い、肝ミクロゾーム中における DCF の反応性代謝物生成量をダンシル化グルタチオン (dGSH) をトラップ剤として定量的に測定した。即ち、0.2 mL の反応溶液[100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4), 2 mg/mL 肝ミクロゾーム, 100 μ M DCF, NADPH 生成系, 1 mM dGSH (社内合成)] を 37 °C で 30 分間インキュベーションした後、0.4 ml の氷冷 4 mM dithiothreitol/methanol 添加により反応を停止した。1,500 \times g で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を 40 °C で窒素ガス気流下にて乾固し、0.1 mL の移動相 (0.5%ギ酸・アセトニトリル(8:2, v/v)) で再溶解した。得られた溶液中の DCF 反応性代謝物と dGSH の付加体量を HPLC 法にて蛍光 (Ex: 230 nm, Em: 525 nm) で検出した。DCF の付加体は、グラジエント (アセトニトリル: 20 \rightarrow 90%, 0 \rightarrow 48 分) 条件下、流速 1 mL/min で Inertsil ODS-4 カラム (5 μ m, 150 \times 4.6 mm, ジーエルサイエンス株式会社, 東京) を用いて分離した。

2-1-2-7. 腹腔マクロファージの調製

Rocha らの方法 [59] に従い、ラットの腹腔マクロファージを採取した。即ち、ラットに 3%チオグリコール酸培地 (日本製薬株式会社, 東京) を腹腔内投与 (50 mL/kg) した。4 日後に 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, ペニシリン 100 IU/mL 及びストレプトマイシン 100 μ g/mL 含有) を腹腔に注入した後、そのリン酸緩衝液を回収することにより採取した。腹腔より回収した細胞をリン酸緩衝液で 2 回洗浄し、RPMI-1640 培養液 (ATCC, Manassas, VA, USA) 中に分散させ、1 \times 10⁶ 個/well となるように細胞を 24 ウェルプレートに播種した。5%CO₂・37 °C 中にて 2 時間培養した後、培養液を交換し、非付着細胞を除去してから 48 時間後に実験に供した。なお、培養液は 24 時間毎に交換し、付着細胞は May-Giemsa 染色によりマクロファージであることを確認した。

2-1-2-8. TNF- α 及び IL-6 の測定

ラット腹腔マクロファージの培養液を LPS (0.1~100 ng/mL) で処理し、24 時間時間培養した後得られた上清中の TNF- α あるいは IL-6 濃度を測定した。測定には市販のラット ELISA キット (BioSource International Inc., Camarillo, CA, USA) を用いた。

2-1-2-9. 遺伝子発現解析

ラット腹腔マクロファージの培養液を LPS (0.1~100 ng/mL) で処理し、24 時間後の細胞中の Total RNA を RNA 抽出キット QIAamp RNA Blood Mini (QIAGEN GmbH, Valencia, CA, USA) を用いてマニュアルに従い精製した。Total RNA (100 ng/4 μ L) を鋳型として、ExScript RT Reagent Kit (タカラバイオ株式会社, 大津) を用いて逆転写反応により cDNA 合成を行った。調製した cDNA を鋳型として SYBR Green PCR Master mix 試薬 (Applied Biosystems) を用い、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 及び誘導型ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) の定量 PCR を行った。反応は GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用い、内部標準として β -actin を用いた。各測定遺伝子のプライマーはタカラバイオ株式会社より市販品を購入した。各遺伝子の発現量は LPS 無処理の細胞を対照としてその相対比で表した。

2-1-2-10. Westernblot 法

ラット腹腔マクロファージの培養液を LPS (0.1~100 ng/mL) で処理し, 24 時間後の細胞中 iNOS 及び HO-1 蛋白発現量の検出を Westernblot 法により行った。得られた細胞を蛋白抽出液 [50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1%NP-40, protease inhibitor cocktail (ナカライテスク株式会社, 京都), phosphatase inhibitor cocktail (Pierce Biotechnology, IL, USA)] にて溶解した。蛋白定量は, Protein Assay Reagent Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて行われた。20 µg protein のサンプルから sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を用いて蛋白質を分離した。さらにゲル上に分離した蛋白質を polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad Laboratories) に転写し, 1次抗体として anti-NOS2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Heme-Oxygenase-1 (Stressgen Bioreagents, Victoria, BC, Canada) 又は anti-β-actin (GeneTex, San Antonio, Tx, USA) を反応させ, さらに 2 次抗体として biotin-conjugated IgG 抗体 (Pierce Biotechnology) 及び avidin-alkaline phosphatase (Bio-Rad Laboratories) で反応させた。蛋白質の検出には 1-Step NBT/BCIP (Pierce Biotechnology) を用いた。写真現像により得られた画像については Image J free software (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて解析し, 内部標準として β-actin を用いた。各蛋白質発現量は LPS 無処理の細胞を対照としてその相対比で表した。

2-1-2-11. 統計解析

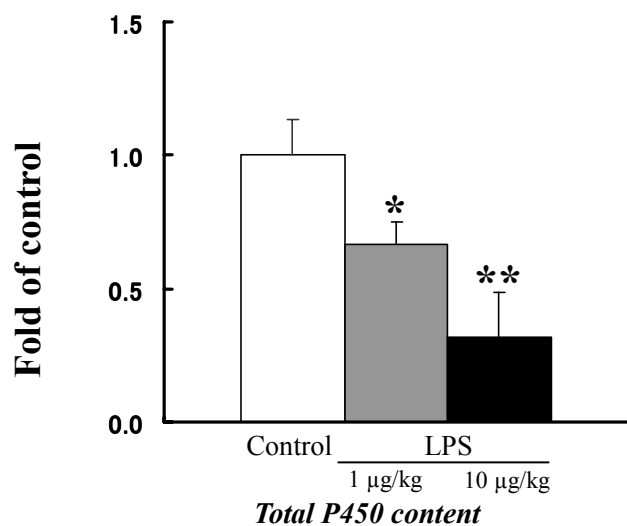
データはすべて平均±標準偏差 (S.D.) で表記した。検定は, 一元分散分析後, Dunnett's test による多重比較を行なった。いずれも有意水準 5%未満をもって有意な差があるとした。

2-1-3. 結果

2-1-3-1. 総 P450 含量及び testosterone を基質とした *in vitro* 代謝実験

LPS のラット肝臓中 CYP 酵素活性に及ぼす影響を Figure 2-1 に示した。LPS (1 又は 10 µg/kg, iv) を用いて処置を施したラット肝臓のミクロゾームでは, LPS の投与量の増加に伴い, 総 P450 含量が対照群に比して有意に減少した (LPS 1 µg/kg: 0.66 倍, LPS 10 µg/kg: 0.32 倍) (Figure 2-1-1 A)。さらに, 各 CYP 分子種への影響を調べるため, 肝ミクロゾーム中での testosterone を基質とした *in vitro* 代謝試験を実施した。CYP3A, CYP2C 及び CYP2B 活性の指標となる testosterone 6β-, 16α- 及び 16β-水酸化活性については, いずれも LPS の投与量の増加に伴った減少 (6β-水酸化活性; LPS 1 µg/kg: 0.47 倍, LPS 10 µg/kg: 0.32 倍, 16α-水酸化活性; LPS 1 µg/kg: 0.66 倍, LPS 10 µg/kg: 0.38 倍, 16β-水酸化活性; LPS 1 µg/kg: 0.65 倍, LPS 10 µg/kg: 0.46 倍) が認められた (Figure 2-1-1 B)。

(A)



(B)

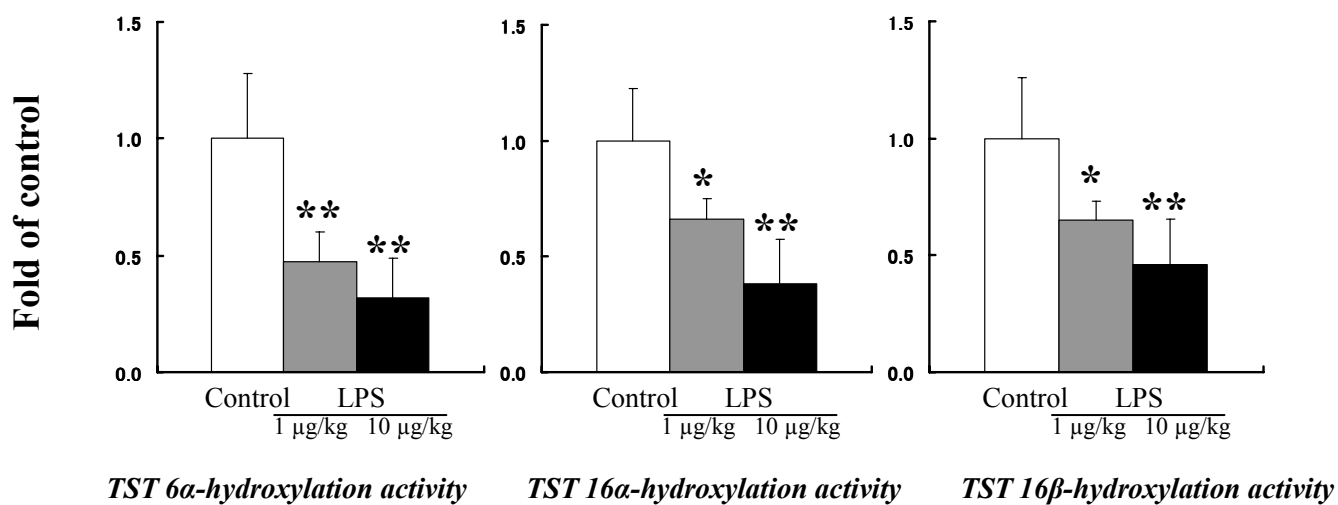
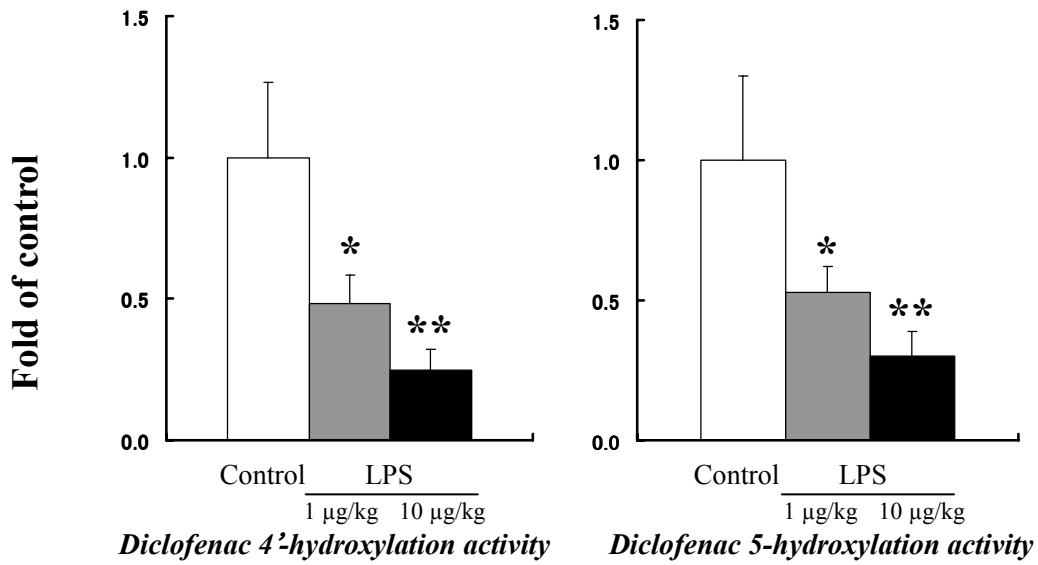


Fig. 2-1-1. Total P450 content (A) and testosterone (TST) hydroxylation activity (B) in hepatic microsomes from saline-treated (control) and lipopolysaccharide (LPS, 1 or 10 µg/kg, iv)-treated rats. Data are shown as fold changes to the control and as means ± S.D. (n=4). Asterisks indicate statistically significant difference (* P<0.05, ** P<0.01, vs control).

2-1-3-2. DCF を基質とした *in vitro* 代謝実験

LPS (1 又は 10 µg/kg, iv) を用いて処置を施したラット肝臓のミクロゾーム中における DCF の 4'-水酸化及び 5-水酸化活性を Figure 2-1-2 に示した。DCF の水酸化活性は、総 P450 含量及び testosterone 水酸化活性の結果と同様に、LPS の投与量の増加に伴い、対照群に比して有意に減少した (4'-水酸化活性; LPS 1 µg/kg: 0.53 倍, LPS 10 µg/kg: 0.30 倍, 5-水酸化活性; LPS 1 µg/kg: 0.48 倍, LPS 10 µg/kg: 0.25 倍) (Figure 2-1-2 A)。また、LPS による DCF の水酸化活性の減少機序を検討するため、対照群の肝ミクロゾーム反応液に DCF と LPS を添加し、LPS と DCF との代謝的競合作用の影響を検討した。LPS を高濃度で添加 (50 µg/mL) しても、DCF の水酸化活性に変化は認められなかった (Figure 2-1-2 B)。従って、LPS は DCF の水酸化代謝において代謝的競合作用はないと考えられた。

(A)



(B)

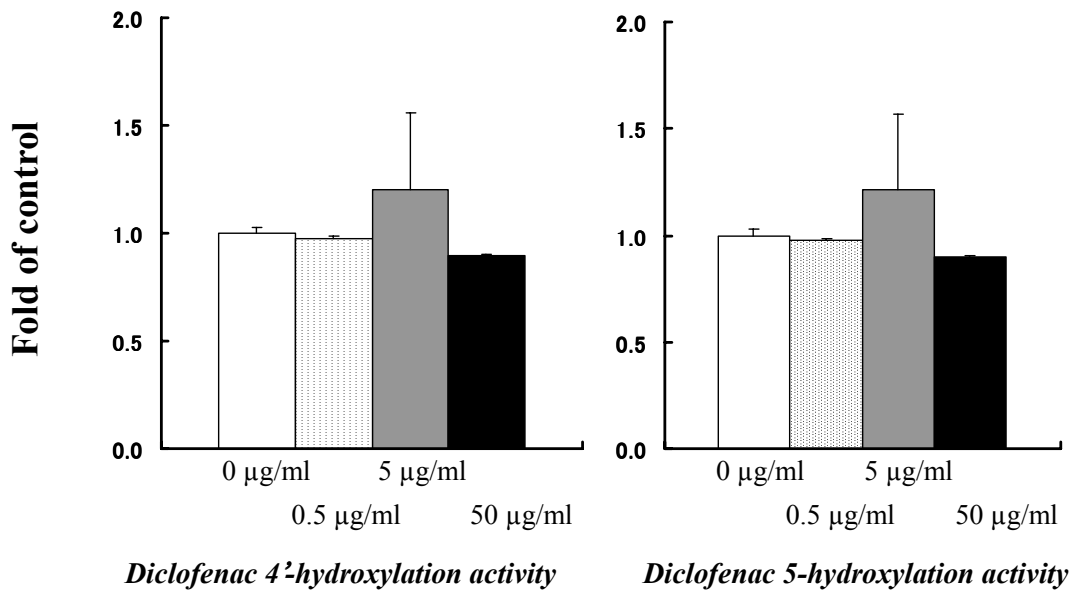
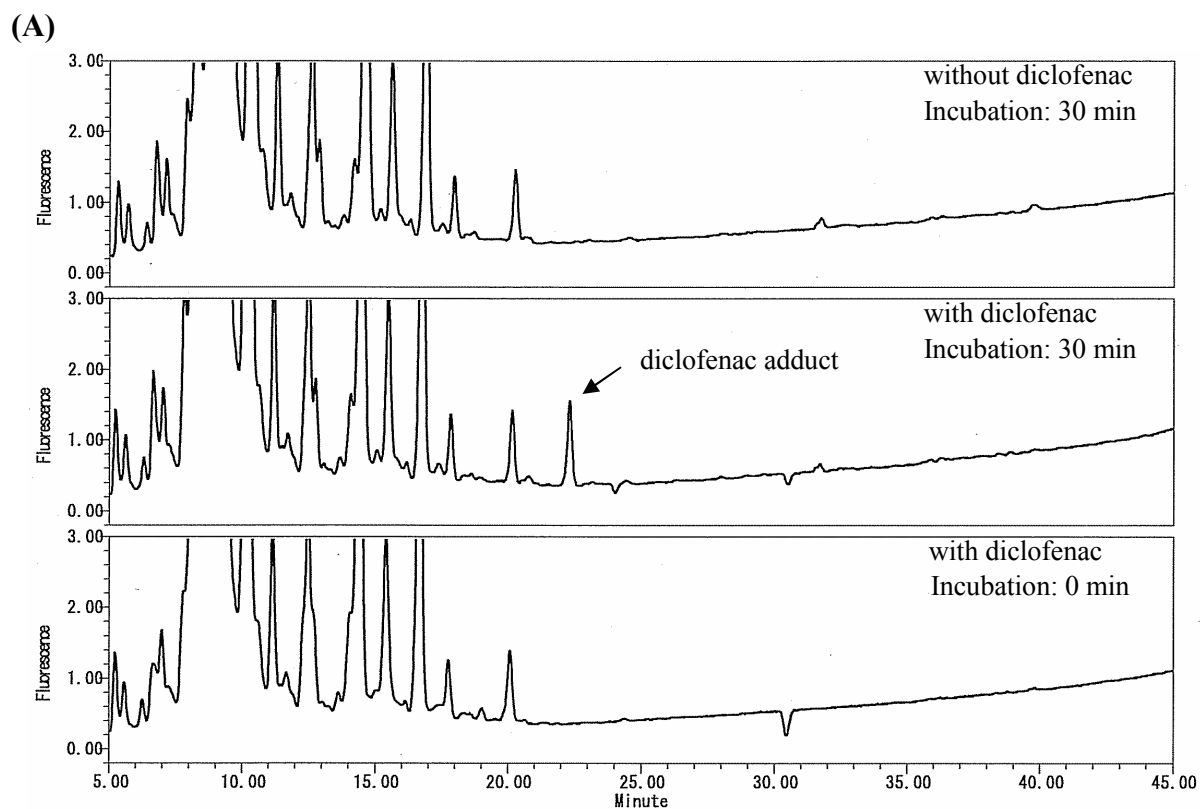


Fig. 2-1-2. Influence of LPS on diclofenac hydroxylation activity in rat hepatic microsomes. (A) Diclofenac hydroxylation activity in hepatic microsomes from saline-treated (control) and lipopolysaccharide (LPS, 1 or 10 µg/kg, i.v.)-treated rats. (B) Diclofenac hydroxylation activity in a reaction mixture including LPS at final concentrations of 0, 0.5, 5 and 50 µg/ml.

Data are shown as fold changes to the control and as means \pm S.D. (n=4). Asterisks indicate statistically significant difference (* P<0.05, ** P<0.01, vs control).

2-1-3-3. *in vitro* トラップ実験

dGSH をトラップ剤として肝ミクロゾーム反応液に添加し, DCF を基質として *in vitro* 代謝実験を実施した。代表的な HPLC チャート図を Figure 2-1-3 A に, DCF 反応性代謝物に及ぼす LPS の影響を Figure 2-1-3 B に示した。DCF の反応性代謝物の生成量は, LPS の投与量の増加に伴い, 対照群に比して有意に減少した (LPS 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.18 倍, LPS 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$: 0.09 倍)。



(B)

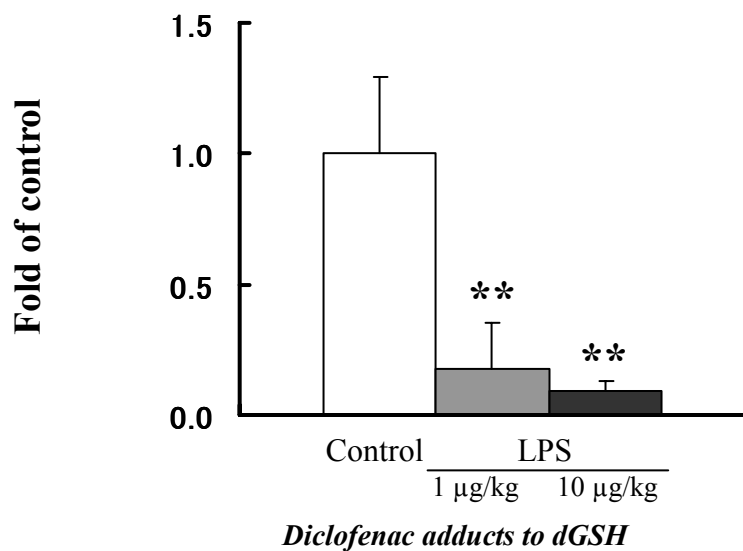


Fig. 2-1-3. Representative chromatograms of diclofenac incubated with rat hepatic microsomes and dansyl glutathione (dGSH) (A), and diclofenac adducts to dGSH in hepatic microsomes from saline-treated (control) and lipopolysaccharide (LPS, 1 or 10 µg/kg, i.v.)-treated rats (B).

Data are shown as fold changes to the control and as means ± S.D. (n=4). Asterisks indicate statistically significant difference (** P<0.01, vs control).

2-1-3-4. ラット腹腔マクロファージに及ぼすLPSの影響 (TNF- α 及び IL-6)

ラット腹腔マクロファージにおけるLPSのTNF- α 及びIL-6産生に及ぼす影響をFigure 2-1-4に示した。細胞を0.1~100 ng/mLのLPSを用いて24時間処理したとき、細胞培養液中のTNF- α 及びIL-6はLPSの濃度の増加に応じて顕著に増加した。

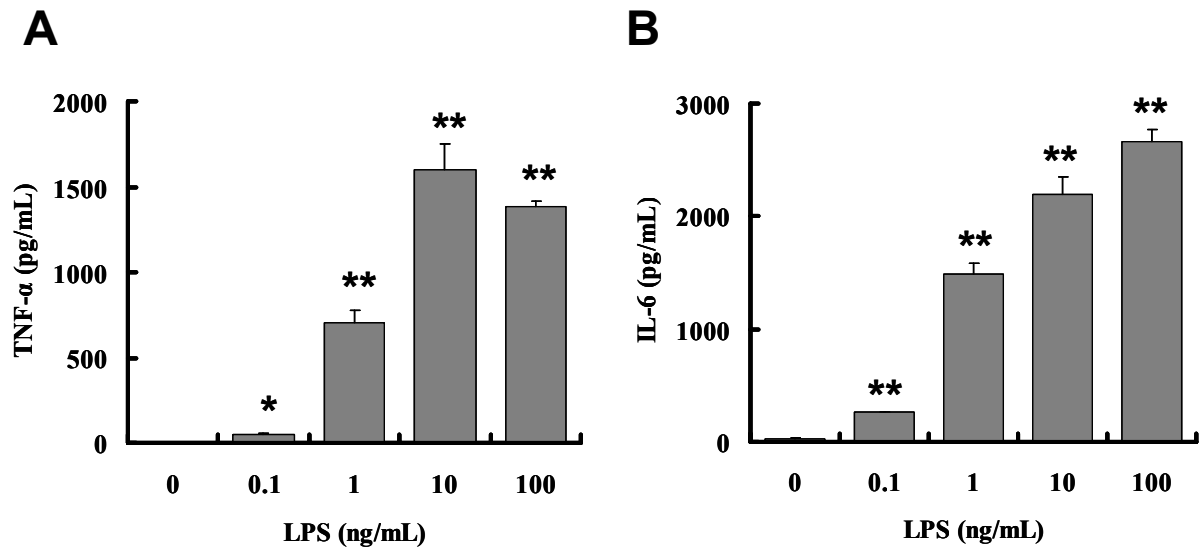


Fig. 2-1-4. Effect of LPS on proinflammatory cytokines, TNF- α and IL-6, in rat peritoneal macrophages. TNF- α (A) and IL-6 (B) released into the medium by LPS stimulation were assayed by ELISA after 24 hour incubation.

Data are shown as means \pm S.D. of four experiments. Asterisks indicate statistically significant difference (* P<0.05, ** P<0.01, vs control).

2-1-3-5. ラット腹腔マクロファージに及ぼすLPSの影響 (iNOS 及び HO-1)

ラット腹腔マクロファージにおけるLPSのiNOS及びHO-1産生に及ぼす影響をについて, Figure 2-1-5 では mRNA 発現量, Figure 2-1-6 では蛋白質量で示した。細胞を 0.1~100 ng/mL の LPS で 24 時間処理したとき, 細胞中の iNOS mRNA 発現量は LPS の 0.1 ng/mL から, 細胞中 HO-1 mRNA 発現量は LPS の 1 ng/mL から, LPS の処理濃度に依存して顕著に増加した。蛋白質量では, iNOS 及び HO-1 とともに LPS の 1 ng/mL 処理以上で増加あるいは増加傾向が認められた。

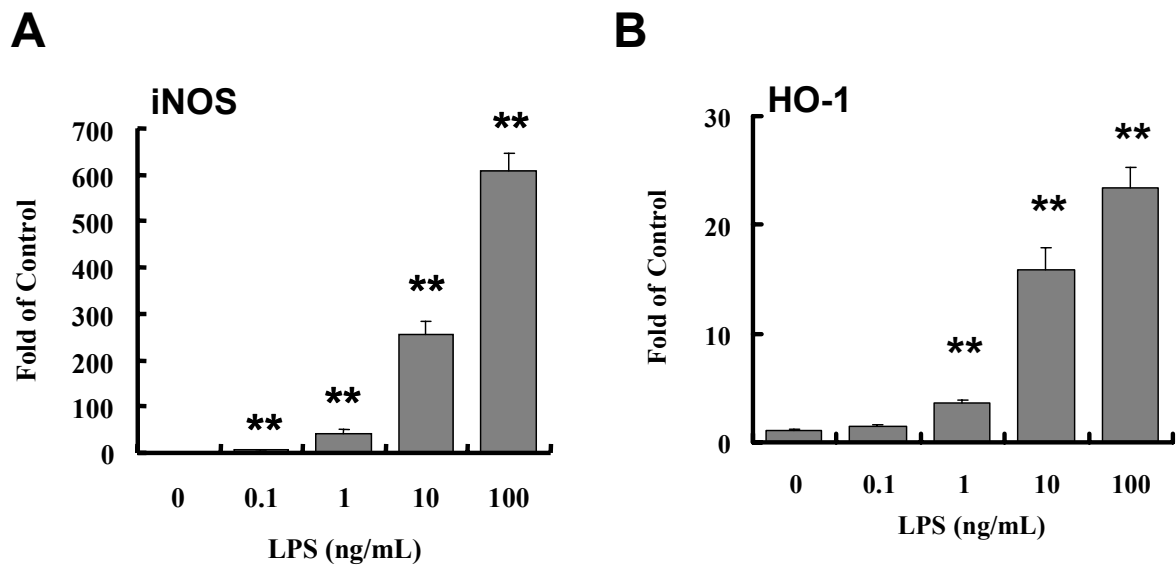


Fig. 2-1-5. Effect of LPS on mRNA expressions of iNOS and HO-1 in rat peritoneal macrophages. iNOS (A) and HO-1 (B) in cells by LPS stimulation (0 to 100 ng/ml) were assayed by qPCR after 24 hour incubation.

Data are shown as means \pm S.D. of four experiments. Asterisks indicate statistically significant difference (** $P < 0.01$, vs control).

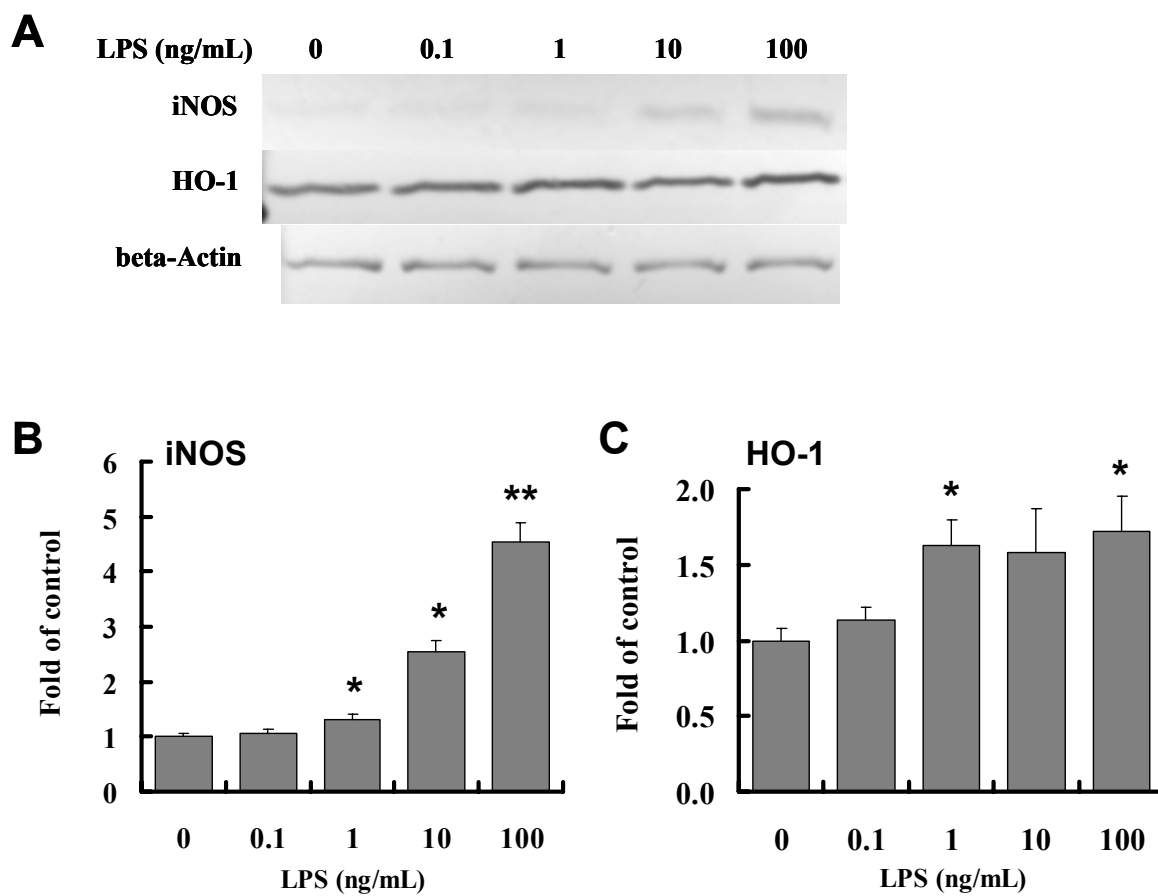


Fig. 2-1-6. Effect of LPS on protein expressions of iNOS and HO-1 in rat peritoneal macrophages. iNOS (A) and HO-1 (B) in cells by LPS stimulation (0 to 100 ng/ml) were assayed by Western blotting after 24 hour incubation.

Data are shown as means \pm S.D. of four experiments. Asterisks indicate statistically significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control).

2-1-4. 考察

肝薬物代謝酵素 CYP は、ラット及びヒトにおいて DCF の反応性代謝物生成に関与する。CYP は DCF を主に 2 種類の水酸化体 (4'-OH-DCF 及び 5-OH-DCF) に酸化し、さらにキノイミン体のような反応性の高い代謝物を生成する。これらの反応には、CYP2B, CYP2C 及び CYP3A が関与する [57, 60]。本節では、LPS を用いてラットを処置して得られた肝ミクロゾームを用いて、DCF 水酸化活性及び DCF 反応性代謝物と dGSH との付加体生成に及ぼす LPS の影響を検討した。

LPS 処置ラットから採取した肝ミクロゾーム中では、P450 含量並びに testosterone の 6 β -、16 α -及び 16 β -水酸化活性に顕著な低下が認められた。また、DCF の水酸化活性及び DCF の反応性代謝物生成量の減少も認められた。Testosterone 6 β -、16 α -及び 16 β -水酸化活性はそれぞれ CYP3A, CYP2C 及び CYP2B 活性を示すため、LPS 処置によってこれらの酵素活性が低下したことを意味する。従って、DCF の水酸化代謝及び DCF の反応性代謝物生成量の低下は、LPS 処置によるこれらの酵素活性の低下に起因するものと考えられた。

本検討では、さらに LPS が直接的あるいは競合的に CYP を阻害するかという点について検証するため、LPS 無処置ラットから調製した肝ミクロゾームの反応液に、LPS を高濃度で添加し、DCF の水酸化活性に及ぼす影響を検討した。しかし、LPS の高濃度での添加によっても DCF の水酸化活性には何ら影響しなかったことから、LPS 処置による CYP 活性の低下は、LPS の二次的作用であることが示唆された。これをサポートする知見もある。LPS が CYP の転写活性を抑制し [61]、抗酸化物質である curcumin や *N*-acetylcystein の併用でその作用が減弱あるいは阻害される [62, 63]。つまり、LPS による CYP のダウンレギュレーションには、LPS 処置によって生成する酸化ストレスの関与が示唆される。

腹腔マクロファージを用いた細胞実験では、LPS の低濃度処理から炎症性サイトカインである IL-6 及び TNF- α の顕著な増加が認められ、ストレス応答蛋白質である iNOS 及び HO-1 の増加も認められた。iNOS 発現誘導に最も重要な役割を果たすものが TNF- α と考えられている [64]。また、HO-1 は、炎症反応によって生じるフリーラジカルや iNOS によって生成される NO などの酸化ストレスによって誘導される [65]。従って、LPS による CYP のダウンレギュレーションは、LPS 刺激で惹起された炎症性サイトカインとそのストレス応答蛋白質の誘導によって生成される酸化ストレスが一因であると考えられた。

本節では、LPS 処置後の肝ミクロゾーム中では、DCF の反応性代謝物の付加体生成量は低下し、反応性代謝物と IDT 発現との間に明らかな関連性は見い出せなかったが、LPS 刺激が炎症性サイトカインを誘導し、フリーラジカルや NO などの酸化ストレスによって、CYP をはじめ生体に対して様々な影響を及ぼしている可能性を示した。

2-1-5. 小括

LPS 処置ラットから採取した肝ミクロゾーム中では、総 P450 含量並びに testosterone の 6 β -, 16 α -及び 16 β -水酸化活性に顕著な低下が認められた。加えて、DCF の水酸化活性及び DCF の反応性代謝物生成量の減少も認められた。これらの結果は、LPS による CYP のダウンレギュレーションを示唆した。腹腔マクロファージを用いた細胞実験では、LPS の低濃度処理によっても炎症性サイトカインである IL-6 及び TNF- α の顕著な増加が認められ、iNOS 及び HO-1 の増加も認められた。HO-1 は、酸化ストレスによって誘導されることから、LPS による CYP のダウンレギュレーションは LPS 刺激で惹起された酸化ストレスが一因と考えられた。本節では、LPS 刺激が炎症性サイトカイン及びフリーラジカルや NO などの酸化ストレスを生成することにより、CYP のダウンレギュレーションをはじめ、生体に様々な影響を与える可能性が示された。

第二節 LPS 処置ラットにおける DCF の反応性代謝物と肝組織との共有結合の評価

2-2-1. 緒言

DCF は世界中で広く使用されている非ステロイド性抗炎症薬であるが、IDT を誘発することが知られている [66, 67]。DCF の IDT 発症率は、100 万人の患者あたり 1 人あるいは 2 人程度と極めて低い率であるが、重篤な肝障害を誘発することが報告されている。ある報告では、薬剤性肝障害で肝臓移植を施された患者のうち DCF の IDT が過半数を占める [68]。

IDT の発現には、薬物の反応性代謝物と組織との共有結合体の関与が示唆されているが、内因性又は外因性物質によって惹起される炎症性ストレスの関与も示唆されている [69, 70]。DCF の場合では、患者の多くは DCF の抗炎症性作用から関節リウマチや変形性関節炎を含む炎症性疾患を患っており [71]、実際、変形性関節炎を患っている患者群では DCF 誘発性の特異体質性肝障害の発現率が高い [71]。LPS が炎症性ストレスを惹起することを考慮すると、LPS 処置ラットは IDT 発症患者の臨床環境を反映するモデルになり得る可能性がある。Deng らはラットに DCF と LPS を併用投与することにより、IDT 様の肝障害が誘発されることを報告し、ラット LPS モデルは IDT モデルとして有用であると考察している [52]。

一方、DCF の代謝過程には、前節で論述されたキノニンミン体をはじめ数種の反応性代謝物の存在が示唆されており、IDT 発現への関与が疑われている。例えば、4'-及び 5-OH-DCF の前駆中間体としてアレンオキシドが存在し、ラット肝臓中の CYP2C11 と共有結合して不可逆的阻害を引き起こす [60]。また、DCF のアシルグルクロン酸抱合体は、分子内転移によって蛋白質と共有結合が可能な反応性中間体を生成する [72]。

第二節では、LPS 処置ラットを用いて、DCF の反応性代謝物と肝組織との共有結合に及ぼす LPS の影響を *in vivo* 条件下にて検討した。

2-2-2. 材料及び方法

2-2-2-1. 試薬

LPS (*Escherichia coli* 由来), DCF 及び 4'-OH DCF は Sigma Chemical Co.より入手した。5-OH DCF は Toronto Research Chemicals Inc.より入手した。また, その他の試薬類はすべて市販特級品を用いた。

2-2-2-2. 実験動物

実験動物は 10 週齢 (体重 310–390 g) の雄性 SD (CrI:CD(SD))ラットを Charles River Laboratories Japan, Inc. (Kanagawa, Japan)より購入したものをを用いた。実験動物の飼育に関しては, 第一章 1-2-2 に準じて行った。

2-2-2-3. 動物実験

Deng らの方法に従い, ラットに LPS を静脈内投与 (1 又は 10 $\mu\text{g}/2 \text{ mL}$ 生理食塩水/kg) し, 2 時間後に DCF を腹腔内投与 (20 mg/4 mL 生理食塩水/kg) した [52]。DCF 投与 24 時間後に全血を採取し, さらに肝臓を採取した。対照群には生理食塩水を同様に投与した。採取された血液は, 血漿中のアラニントランスアミナーゼ (ALT) 及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性測定に使用した。また, 肝臓は病理組織学的検索, 反応性代謝物の付加体生成量測定及び GSH 測定に使用した。別途, トキシコキネティクス (TK) 評価のためにサテライト群を設け, LPS 前処置後, DCF の腹腔内投与 0.5, 1, 2, 4, 6, 20 及び 24 時間後に TK 試験用の採血を実施した。

LPS 及び DCF の用量設定のため, 予備的に単独投与による検討を実施した (データ非掲載)。LPS では 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, DCF では 40 mg/kg まで ALT 及び AST 活性の上昇は認められなかった。DCF の 100 mg/kg 投与群では, 肝障害は認められなかったが重篤な消化器障害が認められた。

すべての動物実験はキッセイ薬品工業株式会社安全性研究所の動物実験規程に従って実施した。

2-2-2-4. 血漿中 ALT 及び AST 活性

血漿中 ALT 及び AST 活性は, JSCC (Japan Society of Clinical Chemistry) 標準化対応法にて日立生化学自動分析装置 7180 (株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京) を用いて測定した。

2-2-2-5. 病理組織学的検索

肝臓 (外側左葉及び内側左右葉) を 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した後, 常法に従って 3 μm 厚のパラフィン包埋薄切切片を作製した。鏡検はヘマトキシリン・エオジン染色を施して実施した。

2-2-2-6. トキシコキネティクス

50 μl の血漿試料から固層抽出を行った後, 血漿中の DCF, 4'-OH-DCF 及び 5-OH-DCF 濃度を LC-MS/MS 装置 (LC: Prominence UFLC, Shimadzu Corporation, Kyoto, MS/MS: API3200, Applied Biosystems, Ontario, Canada) を用いて測定した。即ち, 200 μL のメタノール及び水でプレコンデショニングした固層抽出カラム (OASIS[®] HLB $\mu\text{Elution Plate}$, Waters, Milford, MA, USA) に血漿及び内標準溶液 (内標準物質として tolmetin) を添加し, 200 μL の水で洗浄した後, 25 μL のアセト

ニトリル/ギ酸 (95:5, v/v) で測定対象物質を溶出した。溶出液に 25 μ L の 10 mM 重炭酸アンモニウムを添加し、その中の 10 μ L を LC-MS/MS 装置に注入した。分析対象物質は、10 mM 重炭酸アンモニウム/アセトニトリル (27:8) の移動相 (流速 0.35 mL/min) を通じて L-column2 ODS カラム (3 μ m, 2.1 \times 100 mm, 一般財団法人化学物質評価機構, 東京) にて分離した。モニターイオン (m/z) は、296>214 (DCF), 312>230 (4'-OH-DCF:保持時間 3.1 分, 5-OH-DCF: 保持時間 4.6 分) 及び 258>119 (tolmetin, 内標準物質) の正イオン検出モードにて検出した。

投与後 0~24 時間までの血漿中薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24hr}), 最高血中濃度到達時間 (T_{max}), 最高血漿中濃度 (C_{max}), 血漿中消失半減期 ($T_{1/2}$)は, トキシコキネティクスパラメータとして, 薬物動態解析ソフト PhoenixTM WinNonlin[®] Ver.6.1 (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA) を用いてノンコンパートメント解析により算出した。

2-2-2-7. 反応性代謝物の付加体生成量

肝臓組織と DCF, 4'-OH-DCF 及び 5-OH-DCF の付加体生成量を LC-MS/MS 装置を用いて測定した。即ち, 約 0.5 g の肝臓 (外側左葉) を 0.5 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で細片し, 2 ml のメタノール/ジエチルエーテル (3:1, v/v) 混液で 5 回洗浄した後, 残渣のペレットを 1N の水酸化カリウム液でアルカリ処理 (80°C, 3 時間) を施した。アルカリ処理後, トリフルオロ酢酸/アセトニトリル (5:95, v/v) 及び内標準溶液 (内標準物質として tolmetin) を添加し, 1,500 g で 5 分間遠心分離した後, 得られた上清を 60°C 窒素ガス気流下で乾固し, 移動相 100 μ L で再溶解した。測定試料はフィルター濾過を行った後, 10 μ L を LC-MS/MS 装置に注入し, アルカリ処理によって遊離した DCF, 4'-OH-DCF 及び 5-OH-DCF を測定した。測定は 2-2-2-6 の条件に従って実施した。なお, アルカリ処理施行前の洗浄後の残渣から抽出した測定試料中には測定対象物質は検出されなかった。

2-2-2-8. GSH 測定

約 0.1 g の肝臓 (外側左葉) を 0.5 mL の 5% 5-sulfosalicylic acid 中でホモジナイズした。8,000 g で 10 分間遠心した後, 上清の GSH 濃度を市販の Total Glutathione Quantification Kit (株式会社同仁化学研究所, 熊本) を用いて測定した。

2-2-2-9. 統計解析

データはすべて平均 \pm 標準偏差 (S.D.) で表記した。媒体対照群あるいは DCF 単独投与群を対照とした 2 群間での検定には, F 検定を行い, 等分散の仮定が成立した場合には Student の t 検定を, 等分散の仮定が成立しない場合には Aspin-Welch 法による t 検定の近似式により検定を行った。付加体生成量の検定は, 一元分散分析後, Dunnett's test による多重比較を行なった。いずれも有意水準 5%未満をもって有意な差があるとした。

2-2-3. 結果

2-2-3-1. 血漿中 ALT 及び AST 活性

ラットに LPS (1 又は 10 µg/kg, i.v.) 及び DCF (20 mg/kg, i.p.) を用いて処置した時の血漿中 ALT 及び AST 活性を Figure 2-2-1 に示した。LPS 及び DCF とともに単独投与群においては、ALT 及び AST 活性に変化は認められなかった。しかし、LPS と DCF を併用投与した場合には LPS の投与量に応じて ALT 及び AST 活性の有意な増加が認められた。LPS (10 µg/kg) 及び DCF (20 mg/kg) 併用群では、数例で 10 倍以上の高値を示すものが認められた。

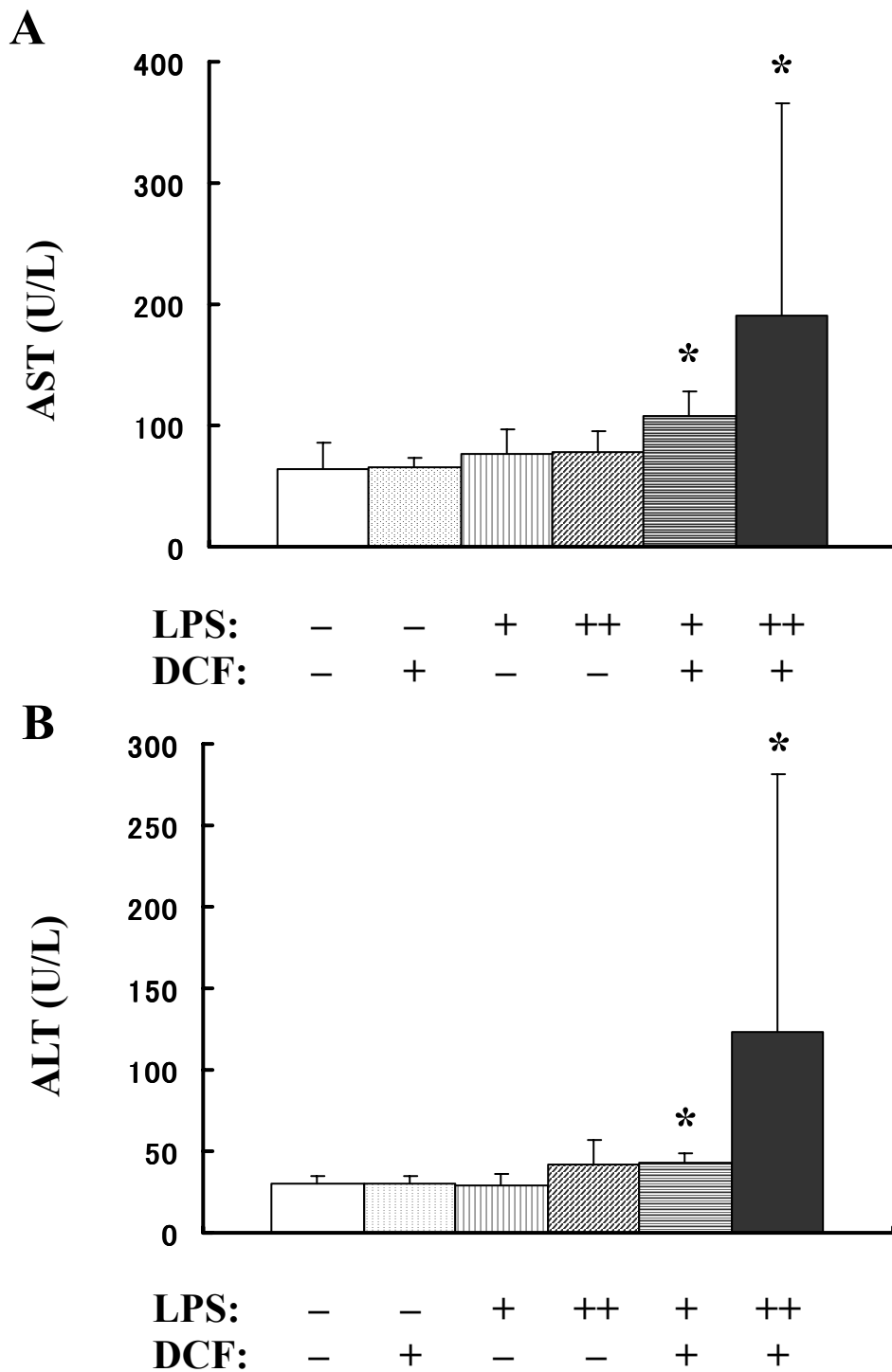


Fig. 2-2-1. Influence of co-treatment with lipopolysaccharide (LPS) and diclofenac (DCF) on plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities. For LPS-treated groups, “-”, “+” and “++” represent intravenous treatment with saline, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of LPS, and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of LPS, respectively and for DCF-treated groups, “-” and “+” represent intraperitoneal treatment with saline and 20 mg/kg of DCF, respectively. Saline-treated group served as a control group.

Data are shown as means \pm S.D. (n=4-7). Asterisks indicate statistically significant difference (* $P < 0.05$, vs control).

2-2-3-2. 病理組織学的検索

LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) 及び DCF (20 mg/kg , i.p.) を投与したときの肝臓の病理組織像を Figure 2-2-2 に示した。対照群 (Fig. 2-2-2 A) 及び DCF 単独投与群 (Fig. 2-2-2 B) の病理組織像に著変は認められなかった。LPS 単独投与群 (Fig. 2-2-2 A) では、グリソン鞘中に主に好中球及び単球で構成された炎症性細胞の軽微な浸潤が認められた (Fig. 2-2-2 C)。一方、LPS 及び DCF の併用投与群では、数例で多発性の肝細胞壊死巣形成を特徴とする所見が認められた。また、LPS 単独投与群でみられた炎症性細胞の浸潤も認められたが、その程度は LPS 単独群とほぼ同程度であった (Fig. 2-2-2 D)。

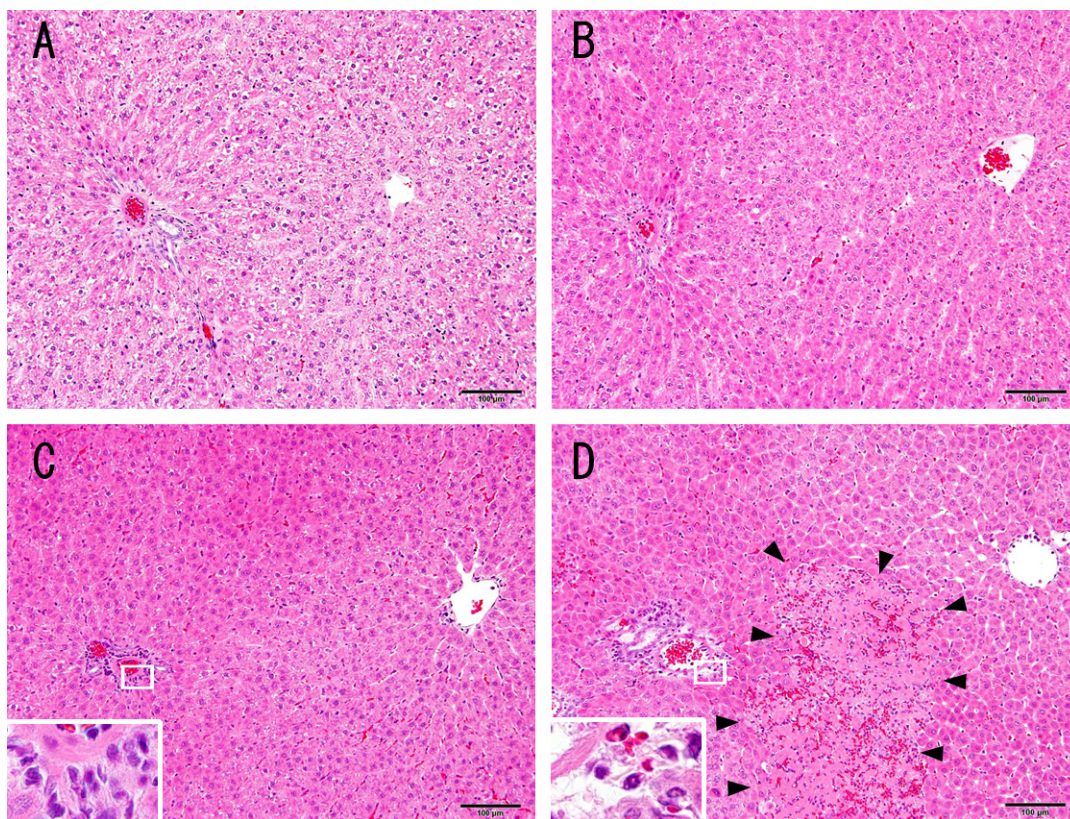


Fig. 2-2-2. Representative microphotographs of livers isolated from rats. Saline-treated (control) (A) and diclofenac (DCF, 20 mg/kg , i.p.)-treated (B) rats had no or minimal histopathological changes. Treatment with lipopolysaccharide (LPS, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) alone caused slight-to-moderate infiltration of inflammatory cells into Glisson's sheath that consisted mainly of neutrophils and mononuclear cells (C). Co-treatment with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) and DCF (20 mg/kg , i.p.) caused multifocal midzonal necrosis of hepatocytes (region enclosed by arrowheads) (D). HE staining, Bars=100 μm .

2-2-3-3. トキシコキネティクス

LPS/DCF 併用投与した時の DCF 及びその水酸化代謝物 (4'-OH-DCF 及び 5-OH-DCF) のトキシコキネティクスパラメータを Table 2-1 に示した。LPS 前処置により, 5-OH-DCF にのみ $T_{1/2}$ の延長が認められた。DCF 及び 4'-OH-DCF のトキシコキネティクスパラメータに LPS 前処置の影響は認められなかった。5-OH-DCF の血漿中濃度は, DCF の投与 4 時間後以降で LPS/DCF 投与群において高値を示した (Figure 2-2-3)。

Table 2-1. Toxicokinetic parameters of diclofenac (DCF), 4'-hydroxydiclofenac and 5-hydroxydiclofenac with or without lipopolysaccharide (LPS) treatment.

Analyte	Treatment	AUC _{0-24hr} (ng·hr/ml)	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	T _{1/2} (hr)
Diclofenac	DCF alone	115000 ± 30500	0.5 ± 0.0	110000 ± 38200	2.57 ± 0.20
	LPS + DCF	106000 ± 14300	0.5 ± 0.0	118000 ± 20200	2.76 ± 0.34
4'-Hydroxydiclofenac	DCF alone	2900 ± 408	0.5 ± 0.0	1440 ± 223	4.23 ± 0.56
	LPS + DCF	2980 ± 990	0.5 ± 0.0	1450 ± 156	4.30 ± 0.65
5-Hydroxydiclofenac	DCF alone	16800 ± 3960	0.6 ± 0.2	8900 ± 2120	4.13 ± 0.74
	LPS + DCF	19400 ± 2460	0.5 ± 0.0	8010 ± 985	5.10 ± 0.61*

Data are expressed as the mean ± S.D.(n=5).

*: Significantly different from the treatment with DCF alone for each analyte (p<0.05)

LPS: lipopolysaccharide

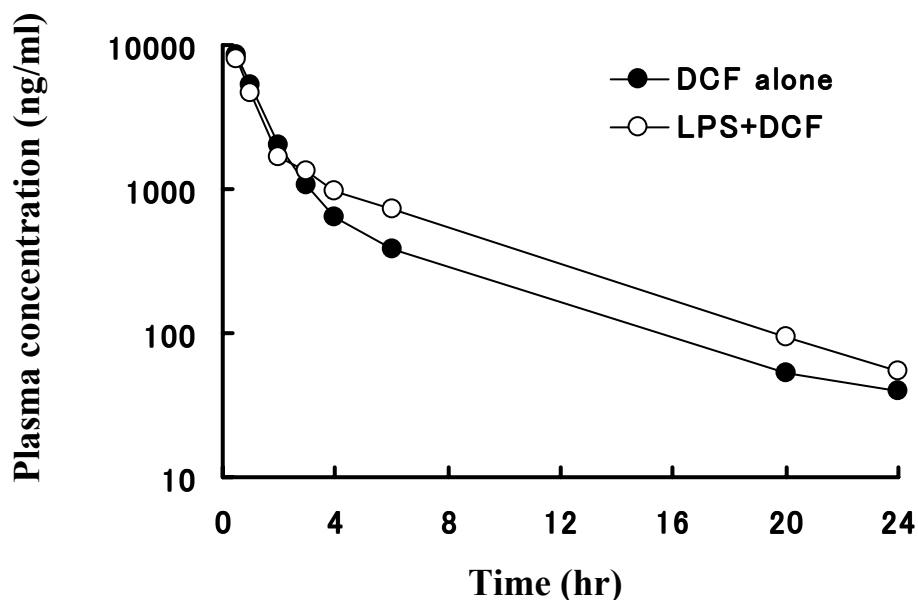


Fig. 2-2-3. Plasma concentration-time profiles of 5-hydroxydiclofenac after dosing of diclofenac (DCF, 20 mg/kg, i.p.) with or without pre-treatment with lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/kg, i.v.).

2-2-3-4. 反応性代謝物の付加体生成量

in vivo 条件下における DCF の付加体生成に及ぼす LPS の影響を検討するため、LPS 及び DCF 処置後の肝臓中付加体生成量を Figure 2-2-4 に示した。DCF の付加体生成量については Figure 2-2-4 A, 4'-OH-DCF については Figure 2-2-4 B, そして 5-OH-DCF については Figure 2-2-4 C に各々示した。DCF 及び 4'-OH-DCF の付加体生成量に LPS 前処置の影響は認められなかったが、5-OH-DCF の付加体生成量は DCF 単独投与群に比して、LPS の投与量の増加に伴い有意な増加 (LPS 1 µg/kg: 2.2 倍, LPS 10 µg/kg: 3.4 倍) が認められた。

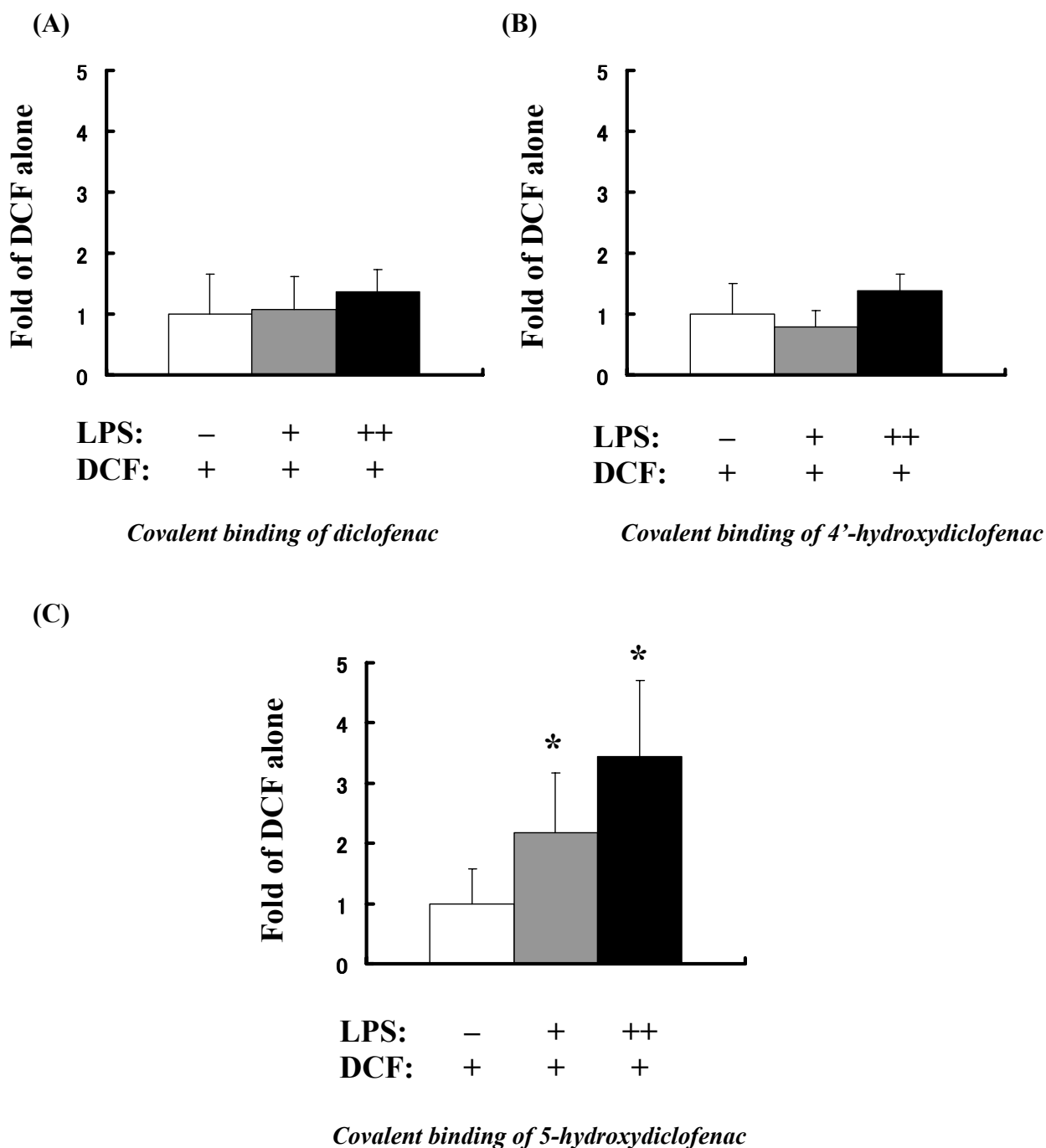


Fig. 2-2-4. In vivo covalent binding of diclofenac (DCF) (A), 4'-hydroxydiclofenac (B) and 5-hydroxydiclofenac (C) in livers isolated from rats treated with lipopolysaccharide (LPS), DCF or LPS/DCF. For LPS-treated groups, “-”, “+” and “++” represent intravenous treatment with saline, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of LPS, and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of LPS, respectively and for DCF-treated groups, “+” represents intraperitoneal treatment with 20 mg/kg of DCF.

Data are shown as fold changes to treatment with DCF alone and as means \pm S.D. (n=4). Asterisks indicate statistically significant difference (* $P < 0.05$, vs treatment with DCF alone).

2-2-3-5. GSH 測定

LPS 前処置による 5-OH-DCF の付加体生成量の増加の機序を検討するため、LPS/DCF 処置した肝臓中の GSH 濃度を測定した (Figure 2-2-5)。媒体対照群に比して LPS/DCF 併用投与群にのみ GSH 濃度の有意な減少 (0.49 倍) が認められた。

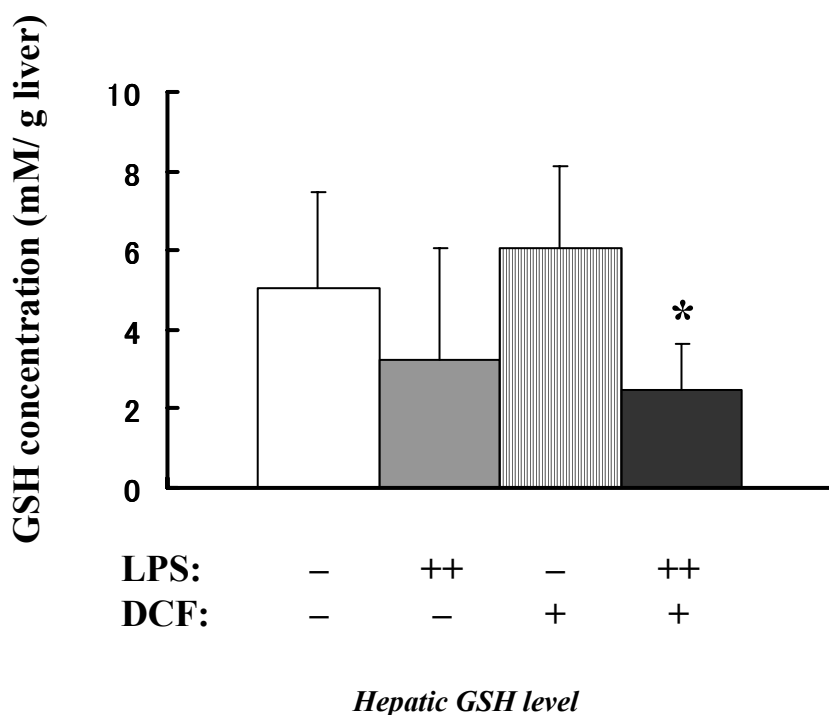


Fig. 2-2-5. Glutathione (GSH) concentrations in livers isolated from rats treated with lipopolysaccharide (LPS), diclofenac (DCF) or LPS/DCF. For LPS-treated groups, “-” and “++” represent intravenous treatment with saline and 10 μ g/kg of LPS, respectively and for DCF-treated groups, “-” and “+” represent intraperitoneal treatment with saline and 20 mg/kg of DCF, respectively. The saline-treated group served as a control group.

Data are shown as means \pm S.D. (n=4-6). Asterisks indicate statistically significant difference (* $P < 0.05$, vs control).

2-2-4. 考察

DCF が特異体質性肝障害を誘発することはよく知られているが、その発症機序については諸説あるものの不明な点が多い。その原因の一つとして、通常用いられる健康的な実験動物では、たとえ高用量の DCF を投与しても IDT 様の肝障害を再現することが難しく、適切なモデル動物を用いての検証が困難なためである。近年、Deng らは LPS 処置によるラット免疫改変モデルが DCF の特異体質性肝障害モデルとして有用である可能性を報告している [52]。第二節では、この LPS モデル、即ち単独投与では肝障害を発現しない低用量の LPS 及び DCF を併用投与したラットモデルを用いて、肝逸脱酵素である ALT 及び AST 活性上昇及び病理組織学的所見から IDT 様肝障害の発現を確認した。さらに、ラット LPS モデルでは、5-OH-DCF を介した反応性代謝物と肝組織との付加体生成量が *in vivo* 条件下で増加することを明らかにし、5-OH-DCF の反応性代謝物が IDT 発現機序に重要な役割を担っている可能性を示唆した。

IDT 発現機序については、ハプテン仮説が広く知られている [44]。低分子の薬物そのものには一般的に免疫原性はないが、反応性代謝物を介して生体成分と共有結合することにより免疫原性を獲得するという仮説である。しかし、反応性代謝物を生成する薬物がすべて高率に IDT を発現するわけではなく、IDT 発現には更なる要因が関与すると考えられている [45]。免疫系はほとんどの抗原に対して寛容性をもっているため、反応性代謝物との付加体に対して免疫反応が生じるためには何らかの危険シグナルを伴った抗原提示が必要と考えられている。危険シグナルには、LPS 刺激で誘導される炎症性サイトカインも含まれる [33, 38, 73, 74]。本研究では、LPS/DCF 併用投与群においてのみ肝障害が認められ、LPS の用量増加により、個体間変動を伴いながらその程度は顕著になった。IDT は極小数例でしか発現しないことを考慮すると、その個体間変動で特に肝障害の程度が大きかったラットをより詳細に解析することで、その発現機作を明らかにすることができるかもしれない。LPS に対する生体反応に個体差があることはよく知られており、その個体間変動は Toll 様受容体の発現量に依存することが示唆されている [75]。従って、ラット LPS モデルでは、LPS が Toll 様受容体を活性化し誘導される炎症性サイトカインなどが危険シグナルとして作用し、反応性代謝物と生体成分との付加体に対して免疫反応が惹起された可能性が考えられる。

前節の結果では、LPS 処置により CYP のダウンレギュレーションが生じ、*in vitro* 代謝条件下における DCF の反応性代謝物は CYP のダウンレギュレーションの程度に応じて生成量が減少した。しかし、興味深いことに、*in vivo* 条件下では（アシルグルクロン酸抱合体由来の）DCF 及び 4'-OH-DCF の反応性代謝物のいずれにおいても LPS 処置による肝臓中付加体生成量の減少は認められなかった。むしろ 5-OH-DCF の付加体生成量及び血漿中濃度に有意な増加が認められた。CYP レベルにダウンレギュレーションの影響がみられなかった原因として、その発現までのタイムラグが一因と考えられる。CYP のダウンレギュレーションの経時的な変化を確認することが必要であると考えられる。また、5-OH-DCF の消失遅延がみられたことから、LPS による血流の低下 [76] あるいは薬物排泄トランスポーターや第二相代謝酵素のダウンレギュレーションの影響も関与している可能性も考えられる。LPS はグルクロン酸抱合体やグルタチオン抱合体を含む種々の両親媒性有機アニオンの胆汁分泌にかかわる MRP2 トランスポーターをダウンレギュレーションする [77]。CYP のダウンレギュレーションの *in vivo* への影響については更なる検討が必要であるが、ここで重要なポイントは、*in vivo* 条件下では、LPS が DCF から 5-OH-DCF 経由の消失経路に明らかに何

らかの影響を及ぼし、5-OH-DCF の付加体を増加させることである。

GSH は細胞内に 0.5 から 10 mM という比較的高濃度で存在し、フリーラジカルや過酸化物といった酸化ストレスから細胞を保護する重要な役割を担っている。また、GSH のチオールが求核性を有するため、種々の反応性代謝物と結合し、ともに細胞外へ排泄されることで細胞を解毒する役割も持つ。本研究では、反応性代謝物の解毒にかかわる肝組織中の GSH レベルに及ぼす LPS の影響を検討し、LPS/DCF の併用投与によって肝臓中の GSH 濃度が低下することを明らかにした。LPS による GSH レベルの低下は、近年の報告 [53, 78] とも一致しており、前節で示した LPS 刺激による酸化ストレスが一因と考えられている。また、Shen らは 5-OH-DCF の反応性代謝物とヒト肝ミクロゾーム蛋白質との共有結合を GSH が阻害することを報告している [79]。従って、LPS 投与による GSH レベルの低下は、反応性代謝物に対する解毒反応を減弱させ、結果として 5-OH-DCF の反応性代謝物と肝組織との付加体が増加したと考えられる。しかし、なぜ 5-OH-DCF のみが LPS 処置により血漿中濃度及び付加体生成に増加がみられたのかは不明である。一つの理由として、5-OH-DCF の反応性代謝物は DCF や 4'-OH-DCF よりも、チオールとの反応速度が速い可能性が考えられ、GSH の解毒機能低下に対してより鋭敏に影響を受けたと考察される。また、5-OH-DCF のみが、前述の MRP2 などの排泄トランスポータのダウンレギュレーションの影響を受け、組織から排泄され難くなった可能性も推察される。従って、*in vivo* 条件下では、CYP による第一相反応だけでなく、第二相（抱合）及び第三相（排泄）反応に関しても更なる検討が必要である。

DCF は初代肝細胞のように代謝機能を有する細胞の方が、代謝能を持たない細胞 (HepG2, FaO) よりも細胞毒性が強く現れ、その細胞毒性と 5-OH-DCF 及びその代謝物で ATP 合成阻害能を有する N,5-dihydroxydiclofenac の増加とがよく相関する [80]。さらに、5-OH-DCF が毒性に関与することを示唆する知見として、4'-OH-DCF 及びアシルグルクロン酸抱合体由来の付加体よりも、5-OH-DCF の付加体に抗原性を有する可能性が示唆されている [81]。製薬企業では薬物の付加体に対する IDT のリスク評価として、付加体生成量は 50 pmol/mg protein 未満という基準がよく知られている [82]。つまり、薬物と蛋白質との付加体生成量が多いことは IDT のリスクファクターである。従って、以上の知見から、5-OH-DCF の付加体は免疫反応の抗原として作用し、その生成量の増加は IDT の発症リスクを増加させている可能性が示唆された。また、DCF の臨床適用である炎症性疾患は、炎症性サイトカインや酸化ストレスなどの危険シグナルを増幅させるため、IDT の発症リスクを増強させているものと考えられる。

2-2-5. 小括

LPS あるいは DCF 単独投与では肝障害を起こさない低用量でラットに LPS/DCF 併用投与したとき、血漿中 ALT 及び AST 活性の増加とともに IDT 様の肝障害が認められた。このとき、肝臓中 GSH 濃度の低下並びに 5-OH-DCF と肝組織との付加体生成量の増加が認められた。5-OH-DCF と蛋白質との付加体は免疫反応の抗原になり得ること、そして付加体の増加は IDT の発現リスクを高めるという知見を考慮すると、5-OH-DCF と肝組織との付加体生成量の増加は、DCF の特異体質性肝障害の発現に重要な役割を担っていると考えられた。また、LPS 刺激によって発生する炎症性サイトカインや酸化ストレスなどは、危険シグナルとしてその免疫反応を惹起し、IDT 発現リスクを増強させるものと推察された。

総括

医薬品開発における非臨床安全性評価の向上を目的とした肝薬物代謝酵素のラット系統差評価及びIDTの発現機序に関する基礎的研究を第一章から第二章に渡って論述し、以下の結論を得た。

第一章 Sprague-Dawley 及び Wistar ラットの肝薬物代謝酵素の系統差に関する検討

医薬品開発における非臨床安全性試験において、高頻度で使用される SD 及び WI ラットについて、肝薬物代謝酵素 CYP の系統差を検討した結果、WI ラットは SD ラットよりも肝臓中の CYP1A 及び CYP3A の mRNA 発現量が有意に高く、その系統差の原因は、それらの分子種の誘導にかかわる AhR, CAR, PXR といった核内受容体と関連していると考えられた。CYP1A 及び CYP3A が薬物動態学的及び毒性学的に重要な役割を担っていることを考慮すると、これらの酵素によって特異的に代謝されるような化合物の非臨床試験では、用いられるラット系統によって異なる試験結果が得られる可能性が考えられた。また、CYP 誘導剤に対する CYP mRNA 発現量の反応性においては、WI 及び SD ラット間で類似の反応性を示したことから、候補化合物の CYP 誘導評価はどちらのラット系統を用いても同様の結果が得られることが示唆された。

第二章 LPS 処置ラットを用いた特異体質性の薬物性肝毒性の検討

LPS 処置ラットから採取した肝ミクロゾーム中では、総 P450 含量並びに testosterone の 6 β -, 16 α - 及び 16 β -水酸化活性に顕著な低下が認められた。加えて、DCF の水酸化活性及び DCF の反応性代謝物生成量の減少も認められた。これらの結果は、LPS による CYP のダウンレギュレーションを示唆した。腹腔マクロファージを用いた細胞実験では、LPS の低濃度処理によっても炎症性サイトカインである IL-6 及び TNF- α の顕著な増加が認められ、iNOS 及び HO-1 の増加も認められた。HO-1 は、酸化ストレスによって誘導されることから、LPS による CYP のダウンレギュレーションは LPS 刺激で惹起された酸化ストレスが一因と考えられた。

LPS あるいは DCF 単独投与では肝障害を起こさない低用量でラットに LPS/DCF 併用投与した時、IDT 様の肝障害が病理組織学的に認められた。LPS/DCF 併用投与では、DCF 単独投与に比して、5-OH-DCF の付加体生成量にのみ有意に増加が認められた。また、LPS/DCF の併用投与によって肝臓中の GSH 濃度の有意な低下が認められた。従って、5-OH-DCF の付加体生成量の増加は、肝臓中の GSH 濃度の低下に依存した変化と考えられた。なお、*in vivo* 条件下では、LPS による CYP のダウンレギュレーションの影響は明らかではなかった。

薬物と蛋白質との付加体の生成量は IDT のリスクファクターであり、また 5-OH-DCF の付加体は免疫反応の抗原になり得ることから、その付加体生成量の増加は IDT 発現に重要な役割を果している可能性が示唆された。また、LPS 刺激によって発生する酸化ストレスや炎症性サイトカインなどは、危険シグナルとしてその免疫反応を惹起し、IDT 発現リスクを増強させるものと推察された。

本論文では、非臨床安全性試験において高頻度で用いられる SD 及び WI ラットにおける CYP の発現量及び酵素活性並びに CYP 誘導剤に対する反応性の系統差を明らかにした。また、CYP による代謝活性化によって生成される反応性代謝物と組織蛋白質との付加体が IDT 発現において重要な役割を担う可能性を、SD ラットを用いて実験的に示した。これらの結果は、医薬品開発における非臨床安全性評価の向上につながる基礎的情報源になると期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学薬物動態学分野教授 高田 寛治 先生に衷心より感謝の意を表します。

本学位論文を御高閲いただきました京都薬科大学代謝分析学分野教授 安井 裕之 先生、臨床薬学分野教授 西口 工司 先生に心より感謝の意を表します。

本研究に際し、多大な御支援と発表の機会を与えてくださいましたキッセイ薬品工業株式会社 神澤 陸雄 代表取締役社長に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、多大な御支援と御助言を頂きましたキッセイ薬品工業株式会社 常務取締役研究本部長 柴田 信男 博士、開発研究部長 草間 寛 博士、安全性情報部担当部長 黒田 淳二 博士、安全性研究所長 田村 啓 博士、薬物動態研究所長 村上 真 博士に深く感謝致します。

また、本研究にご指導とご協力を頂きましたトキシコキネティクス研究室長 田中 智 博士、毒性研究室長 相馬 晋司 博士、病理研究室長 林 守道 博士、毒性研究室主任研究員 武藤 信一 博士、薬物動態研究所主任研究員 筒井 将 博士、トキシコキネティクス研究室主任研究員 金沢 徹 氏、創薬第二研究所専任研究員 中野 茂 博士、薬物動態研究所専任研究員 原田 浩史 氏に深く感謝いたします。さらに、実験にご協力下さいました高橋 哲明 氏、西山 千鶴 氏、小野里 知哉 氏、村山 文樹 氏に心より感謝の意を表します。

また、本学位論文の作成に際し、貴重な御助言を頂きました京都薬科大学薬物動態学分野講師 伊藤 由佳子 博士、神戸学院大学臨床薬物動態学講師 福島 恵造 博士に深謝いたします。

最後に、本研究に際し、陰で支えてくれた妻 友希ならびに息子 大志朗、理志、理朗人に感謝します。

業績目録

本研究の主要部分は、以下の学術雑誌に公表した。

第一章 Sprague-Dawley 及び Wistar ラットの肝薬物代謝酵素の系統差に関する検討

Tomoyuki Kishida, Shin-ichi Muto, Morimichi Hayashi, Masaru Tsutsui, Satoru Tanaka, Makoto Murakami, and Junji Kuroda: Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 447-457 (2008).

第二章 LPS 処置ラットを用いた特異体質性の薬物性肝毒性の検討

第一節 LPS の肝薬物代謝酵素に及ぼす評価

Satoru Tanaka, Masaru Tsutsui, Tomoyuki Kishida, Shinji Souma, Junji Kuroda, and Takemi Yoshida: Salbutamol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in rat peritoneal macrophages. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 327-334 (2010).

Tomoyuki Kishida, Tomoya Onozato, Toru Kanazawa, Satoru Tanaka, and Junji Kuroda: Increase in covalent binding of 5-hydroxydiclofenac to hepatic tissues in rats co-treated with lipopolysaccharide and diclofenac: Involvement in the onset of diclofenac-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 1143-1156 (2012).

第二節 LPS 処置ラットにおける DCF の反応性代謝物と肝組織との共有結合の評価

Tomoyuki Kishida, Tomoya Onozato, Toru Kanazawa, Satoru Tanaka, and Junji Kuroda: Increase in covalent binding of 5-hydroxydiclofenac to hepatic tissues in rats co-treated with lipopolysaccharide and diclofenac: Involvement in the onset of diclofenac-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 1143-1156 (2012).

参考論文の著者名, 題目, 印刷・公表の方法及びその時期

- (1) Weihua Gao, Tomoyuki Kishida, Keisuke Kimura, Michiharu Kageyama, Masaki Sumi, Yukako Yoshikawa, Nobuhito Shibata, and Kanji Takada: Sensitive and simultaneous determination of HIV protease inhibitors in rat biological samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **16**, 267-273 (2002).
- (2) Weihua Gao, Tomoyuki Kishida, Michiharu Kageyama, Keisuke Kimura, Yukako Yoshikawa, Nobuhito Shibata, and Kanji Takada: Hepatic and intestinal contributions to pharmacokinetic interaction of indinavir with amprenavir, nelfinavir and saquinavir in rats. *Antivir. Chem. Chemother.*, **13**, 17-26 (2002).
- (3) Nobuhito Shibata, Weihua Gao, Hiroyuki Okamoto, Tomoyuki Kishida, Koji Iwasaki, Yukako Yoshikawa, and Kanji Takada: Drug interactions between HIV protease inhibitors based on physiologically-based pharmacokinetic model. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 680-689 (2002).
- (4) Nobuhito Shibata, Weihua Gao, Hiroyuki Okamoto, Tomoyuki Kishida, Yukako Yoshikawa, and Kanji Takada: In-vitro and in-vivo pharmacokinetic interactions of amprenavir, an HIV protease inhibitor, with other current HIV protease inhibitors in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 221-229 (2002).
- (5) Nobuhito Shibata, Michiharu Kageyama, Tomoyuki Kishida, Keisuke Kimura, Yukako Yoshikawa, Takeshi Kuwahara, Jyunichiro Toh, Takuma Shirasaka, and Kanji Takada: Pharmacokinetic characterization of a human immunodeficiency virus protease inhibitor, saquinavir, during ethanol intake in rats. *Biopharm. Drug Dispos.*, **24**, 335-344 (2003).
- (6) Satoru Tanaka, Yasunori Momose, Masaru Tsutsui, Tomoyuki Kishida, Junji Kuroda, Nobuo Shibata, Takemi Yoshida, and Ryoich Yamagishi: Quantitative estimation of myocardial fibrosis based on recaptor occupancy for β_2 -adrenergic recaptor agonists in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **29**, 179-186 (2004).
- (7) Satoru Tanaka, Ryoich Yamagishi, Masaru Tsutsui, Tomoyuki Kishida, Makoto Murakami, Junji Kuroda, and Takemi Yoshida: Tissue- and dose-dependent alteration of stress-inducible proteins by β_2 -adrenoceptor agonist, salbutamol, in rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30**, 305-314 (2005).
- (8) Masaru Tsutui, Shinichiro Ogawa, Yoich Inada, Eisuke Tomioka, Akiko Kamiyoshi, Satoru Tanaka, Tomoyuki Kishida, Masahiko Nishiyama, Makoto Murakami, Junji Kuroda, Yasuhiko Hashikura, Shinich Miyagawa, Fumiyasu Satoh, Nobuo Shibata, and Yoh-ich Tagawa: Characterization of cytochrome P450 expression in murine embryonic stem cell-derived hepatic tissue system. *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 696-701 (2006).

引用文献

- 1) Aoyama H., Kikuta M., Shirasaka N., Hojo H., Takahashi K.L., Shimizu N., Harigae M., Taguchi F., Teramoto S.: Historical control data on reproductive abilities and incidences of spontaneous fetal malformations in Wistar Hannover GALAS rats. *Congenital Anomalies*, **42**, 194-201 (2002)
- 2) Martinez N., McGilveray I.: AAPS/RAPS/CAPRA collaborative program: exploring the challenges of drug regulation in a global environment: clinical concerns. *AAPS Pharm. Sci.* **5**, 1-22 (2003)
- 3) Pettersen J.C., Morrissey R.L., Saunders D.R., Pavkov K.L., 3rd Luempert L.G., Turnier J.C., Matheson D.W., Schwartz D.R.: A 2-year comparison study of Crl:CD BR and Hsd:Sprague-Dawley SD rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **33**, 196-211 (1996)
- 4) Eiben R, Bomhard E.M.: Trends in mortality, body weights and tumor incidences of Wistar rats over 20 years. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **51**, 523-536 (1999)
- 5) 佐藤 了, 大村恒雄編: 薬物代謝の酵素系, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1988)
- 6) 加藤隆一, 鎌滝哲也編: 薬物代謝の比較生化学, 清至書院, 東京 (1983)
- 7) 三浦敏明, 鎌滝哲也: 薬物代謝活性化と肝障害, *医学のあゆみ*, **136**, 1097-1162 (1986)
- 8) Degawa M., Tanimura S., Agatsuma T., Hashimoto Y.: Hepatocarcinogenic heterocyclic aromatic amines that induce cytochrome P-448 isozymes, mainly cytochrome P-448H (P-450IA2), responsible for mutagenic activation of the carcinogens. *Carcinogenesis*, **10**, 1119-1122 (1989)
- 9) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 10) Omura T., Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378 (1964)
- 11) Burke M.D., Thompson S., Weaver R.J., Wolf C.R, Mayer R.T.: Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochim. Pharmacol.*, **45**, 923-936 (1994)
- 12) Masubuchi Y., Hosokawa S., Horie T., Suzuki T., Ohmori S., Kitada M., Narimatsu S.: Cytochrome P450 isozymes involved in propranolol metabolism in human liver microsomes: the role of CYP2D6 as ring-hydroxylase and CYP1A2 as N-desisopropylase. *Drug Metab. Dispos.*, **22**, 909-915 (1994)
- 13) Studenberg S.D., Brouwer K.L.R.: Phenacetin and acetaminophen metabolism in the isolated perfused rat liver: precursor concentration influences the selection of kinetic parameters to assess hypoxic impairment. *Drug Metab. Dispos.*, **19**, 423-429 (1991)
- 14) Imaoka S., Terano Y., Funae Y.: Expression of four phenobarbital-inducible cytochrome P-450s in liver, kidney, and lung of rats. *J. Biochem.*, **105**, 939-945 (1989)
- 15) Saito K., Sakai N., Kim H. S., Ishizuka M., Kazusaka A., Fujita S.: Strain differences in diazepam metabolism at its three metabolic sites in Sprague-Dawley, brown Norway, dark agouti, and Wistar strain rats. *Drug Metab. Dispos.*, 2004, **32**, 959-965 (2004)
- 16) Ganem L.G., Jefcoate C.R.: Endocrine factors modulate the phenobarbital-mediated induction of cytochromes P450 and phase II enzymes in a similar strain-dependent manner. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **150**, 68-75 (1998)

- 17) Waxman D.J., Azaroff L.: Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.*, **281**, 577-592 (1992)
- 18) Okey A.B., Riddick D.S., Harper P.A.: The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol. Lett.*, **70**, 1-22 (1994)
- 19) Lin J.H.: CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. *Pharm. Res.*, **23**, 1089-1116 (2006)
- 20) Cui X., Thomas A., Montgomery D., Gu C., Morrison R.A., White R.E., Cheng K.C.: Rat PXR reporter-gene activity correlates with the induction of CYP3A in rat precision-cut liver slices. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **8**, 341-346 (2005)
- 21) Xie W., Barwick J.L., Simon C.M., Pierce A.M., Safe S., Blumberg B., Guzelian P.S., Evans R.M.: Reciprocal activation of Xenobiotics response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Gene Dev.*, **14**, 3014-3023 (2000)
- 22) Bertilsson G., Heidrich J., Svensson K., Asman M., Jendeberg L., Sydow-Backman M., Ohlsson R., Postlind H., Blomquist P., Berkenstam A.: Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12208-12213 (1998)
- 23) Blumberg B., Jr. Sabbagh W., Juguilon H., Jr. Bolado J., van Meter C.M., Ong E.S., Evans R.M.: SXR, a novel steroid and xenobiotics-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.*, **12**, 3195-3205 (1998)
- 24) Lehmann J. M., McKee D.D., Watson M.A., Willson T.M., Moore J.T., Kliewer S.A.: The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Investig.*, **102**, 1016-1023 (1998)
- 25) Vyhldal C.A., Gaedigk R., Leeder J.S.: Nuclear receptor expression in fetal and pediatric liver: Correlation with CYP3A expression. *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 131-137 (2005)
- 26) Poland A., Glover E., Kende A.S.: Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol: evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4936-4946 (1976)
- 27) Sakuma T., Ohtake M., Katsurayama Y., Jarukamjorn K., Nemoto N.: Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 379-384 (1999)
- 28) Honkakoski P., Negishi M.: Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.*, **347**, 321-327 (2000)
- 29) Nelson D.R., Koyamans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W.: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, **6**, 1-42 (1996)
- 30) Guengerich F.P.: Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.*, **48**, 2946-2954 (1988)
- 31) Grasso P., Hinton R.H.: Evidence for and possible mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis in rodent liver. *Mutat. Res.*, **248**, 271-290 (1991)
- 32) Meredith C., Scott M.P., Renwick A.B., Price R.J., Lake B.G.: Studies on the induction of rat

- hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, **5**, 511-527 (2003)
- 33) Uetrecht J.P.: Screening for the potential of a drug candidate to cause idiosyncratic drug reactions. *Drug Discov. Today*, **8**, 832-837 (2003)
 - 34) Yoshikawa K., Nohmi T., Miyata R., Ishidate Jr M.: Differences in liver homogenates from Donryu, Fischer, Sprague-Dawley and Wistar strains of rat in the drug-metabolizing enzyme assay and the Salmonella/hepatic S9 activation test. *Mutat. Res.*, **96**, 167-186 (1982)
 - 35) Hakura A., Suzuki S., Satoh T.: Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutat. Res.*, **438**, 29-36 (1999)
 - 36) Hissink A.M., Oudshoorn M.J., Van Ommen B., Van Bladeren P.J.: Species and strain differences in the hepatic cytochrome P450-mediated biotransformation of 1,4-Dichlorobenzene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **145**, 1-9 (1997)
 - 37) Nedelcheve V., Gut I., Soucek P., Frantik E.: Cytochrome P450 catalyzed oxidation of monochlorobenzene, 1,2- and 1,4-dichlorobenzene in rat, mouse and human liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.*, **115**, 53-70 (1998)
 - 38) Park B.K., Kitteringham N.R., Powell H., Pirmohamed M.: Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology*, **153**, 39-60 (2000)
 - 39) Knowles S.R., Uetrecht J., Shear N.H.: Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet*, **356**, 1587-1591 (2000)
 - 40) Williams D.P., Kitteringham N.R., Naisbitt D.J., Pirmohamed M., Smith D.A., Park B.K.: Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? *Curr. Drug Met.*, **3**, 351-366 (2002)
 - 41) Roth R.A., Luyendyk J.P., Maddox J.F. and Ganey P.E.: Inflammation and drug idiosyncrasy-is there a connection? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 1-8 (2003)
 - 42) Waring J.F., Anderson M.G.: Idiosyncratic toxicity: mechanistic insights gained from analysis of prior compounds. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.*, **8**, 59-65 (2005)
 - 43) Walgren J.L., Mitchell M.D., Thompson D.C.: Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, **35**, 325-361 (2005)
 - 44) Uetrecht J.: Idiosyncratic drug reactions: Past, present, and future. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 84-92 (2008)
 - 45) Pirmohamed M., Naisbitt D.J., Gordon F., Park B.K.: The danger hypothesis-potential role in idiosyncratic drug reactions. *Toxicology*, **181-182**, 55-63 (2002)
 - 46) Kaplowitz N.: Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 489-499 (2005)
 - 47) Baillie T.A.: Future of toxicology-metabolic activation and drug design: challenges and opportunities in chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 889-893 (2006)
 - 48) Fujimoto K, Kishino H, Yamoto T, Manabe S, Sanbuissho A.: In vitro cytotoxicity assay to evaluate the toxicity of an electrophilic reactive metabolite using glutathione-depleted rat primary cultured hepatocytes. *Chem Biol Interact.*, **188**, 404-411 (2010)
 - 49) Buchweitz J.P., Ganey P.E., Bursian S.J., Roth R.A.: Underlying endotoxemia augments toxic

- responses to chlorpromazine: is there a relationship to drug idiosyncrasy? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 460–467 (2002)
- 50) Waring J.F., Liguori M.J., Luyendyk J.P., Maddox J.F., Ganey P.E., Stachlewitz R.F., North C., Blomme E.A.G., Roth R.A.: Microarray analysis of lipopolysaccharide potentiation of trovafloxacin-induced liver injury in rats suggests a role for proinflammatory chemokines and neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 1080-1087 (2006)
- 51) Luyendyk J.P., Lehman-McKeeman L.D., Nelson D.M., Bhaskaran V.M., Reilly T.P., Car B.D., Cantor G.H., Deng X., Maddox J.F., Ganey P.E., Roth R.A.: Coagulation-dependent gene expression and liver injury in rats given lipopolysaccharide with ranitidine but not with famotidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 635-643 (2006)
- 52) Deng X., Stachlewitz R.F., Liguori, M.J., Blomme E.A.G., Waring J.F., Luyendyk J.P., Maddox J.F., Ganey P.E., Roth R.A.: Modest inflammation enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: role of neutrophils and bacterial translocation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**, 1191-1199 (2006)
- 53) Zou Z., Roth R.A., Younis H.S., Burgoon H.S., Ganey P.E.: Oxidative stress is important in the pathogenesis of liver injury induced by sulindac and lipopolysaccharide cotreatment. *Toxicology*, **272**, 32-38 (2010)
- 54) Ulmer A.J., Rietschel E.T., Zahringer U., Hein H.: Lipopolysaccharide: structure, bioactivity, receptors, and signal transduction. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **14**, 53-68 (2002)
- 55) 杉山孝弘, 改正恒康: TLR と自己免疫. *医学のあゆみ*, **213**, 29-33 (2005)
- 56) 石田博, 柳田英寿: サイトカイン産生異常. *Molecular Medicine*, **35**, 臨時増刊号, 473-475 (1998)
- 57) Masubuchi Y., Ose A. and Horie T.: Diclofenac-induced inactivation of CYP3A4 and its stimulation by quinidine. *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 1143-1148 (2002)
- 58) Gan J., Harper T.W., Hsueh M-M., Qu Q., Humphreys W.G.: Dansyl glutathione as a trapping agent for the quantitative estimation and identification of reactive metabolites. *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 896-903 (2005)
- 59) Rocha MF, Maia ME, Bezerra LR, Lyerly DM, Guerrant RL, Ribeiro RA, Lima AA.: Clostridium difficile toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1beta, tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. *Infect Immun.*, **65**, 2740–2746 (1997)
- 60) Masubuchi Y., Ose A., Horie T.: Mechanism-based inactivation of CYP2C11 by diclofenac. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1190-1195 (2001)
- 61) Morgan E.T.: Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **85**, 434-438 (2009)
- 62) Sompamit K., Kukongviriyapan U., Nakmareong S., Kukongviriyapan V.: Curcumin improves vascular function and alleviates oxidative stress in non-lethal lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **616**, 192-199 (2009)
- 63) Chen Y.H., Wang J.P., Wang H., Sun M.F., Wei L.Z., Wei W., Xu D.X.: Lipopolysaccharide

- treatment downregulates the expression of the pregnane X receptor, *cyp3a11* and *mdr1a* genes. *Toxicology*, **211**, 242-252 (2005)
- 64) 吉川敏一, 内藤祐二: 炎症と活性酸素 (NO), 一酸化炭素 (CO)–炎症性腸疾患を中心に－. *Inflammation and Regeneration*, **24**, 545-552 (2004).
- 65) 桐野洋平, 岳野光洋, 小林秀郎, 石ヶ坪良明: 炎症疾患における Hemo oxygenase-1 (HO-1) の発現. *Inflammation and Regeneration*, **25**, 431-435 (2005).
- 66) Boelsterli U.A.: Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol. Applied. Pharmacol.*, **192**, 307-322 (2003)
- 67) Walker A.M.: Quantitative studies of the risk of serious hepatic injury in persons using nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum.*, **40**, 201-208 (1997)
- 68) Lewis J.H.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Pathology and clinical presentation of hepatotoxicity. In *Drug-Induced Liver Disease* (Kaplowitz, N., Deleve, L.D. ed.), Marcel Dekker, New York, 377-404 (2003)
- 69) Deng X., Luyendyk J.P., Ganey P.E., Roth R.A.: Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: Hints from animal models. *Pharmacol. Rev.*, **61**, 262-282 (2009)
- 70) Shaw P.J., Ganey P.E., Roth R.A.: Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.*, **118**, 7-18 (2010)
- 71) Banks A.T., Zimmerman H.J., Ishak K.G., Harter J.G.: Diclofenac-associated hepatotoxicity: Analysis of 180 cases reported to the food and drug administration as adverse reactions. *Hepatology*, **22**, 820-827 (1995)
- 72) Grillo M.P., Knutson C.G., Sanders P.E., Waldon D.J., Hua F., Ware J.A.: Studies on the chemical reactivity of diclofenac acyl glucuronide with glutathione: Identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in rat bile. *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1327-1336 (2003)
- 73) Matzinger P.: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.*, **12**, 991-1045 (1994)
- 74) Uetrecht J.P.: New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the “danger hypothesis” and innate immune system. *Chem Res Toxicol.*, **12**, 387–395 (1999)
- 75) Jaekal J., Abraham E., Azam T., Netea M.G., Dinarello C.A., Lim J., Yang Y., Yoon D., Kim S.: Individual LPS responsiveness depends on the variation of Toll-like receptor (TLR) expression level. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 1862-1867 (2007)
- 76) Kim D.H., Jung Y.J., Lee A.S., Lee S., Kang K.P., Lee T.H., Lee S.Y., Jang K.Y., Moon W.S., Choi K., Yoon K., Sung M.J., Park S.K., Kim W.: COMP-Angiopoietin-1 decreases lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Kidney Int.*, **76**, 1180-1191 (2009)
- 77) Yano K., Sekine S., Nemoto K., Fuwa T., Horie T.: The effect of dimeric acid on LPS-induced downregulation of Mrp2 in the rat. *Biochem. Pharm.*, **80**, 533-539 (2010)
- 78) Mohamadin A.M., Elberry A.A., Elkablawy M.A., Abdel Gawad H.S., Al-Abbasi F.A.: Montelukast, a leukotriene receptor antagonist abrogates lipopolysaccharide-induced toxicity and oxidative stress in rat liver. *Pathophysiology*, **18**, 235-242 (2011)

- 79) Shen S., Marchick M.R., Davis M.R., Doss G.A., Pohl L.R.: Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450: Role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 214-222 (1999)
- 80) Bort R., Ponsoda X., Jover R., Gomez-Lechon M.J., Castell J.V.: Diclofenac toxicity to hepatocytes: A role for drug metabolism in cell toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 65–72 (1999)
- 81) Naisbitt D.J., Sanderson L.S., Meng X., Stachulski A.V., Clarke S.E., Park B.K.: Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenac metabolites. *Toxicol. Lett.*, **168**, 45-50 (2007)
- 82) Evans D.C., Watt A.P., Nicoll-Griffith D.A., Baillie T.A.: Drug-protein adducts: An industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 3-16 (2004)