

学位論文

「Hepatic Adaptation to Therapeutic Doses of Acetaminophen:

An Exploratory Study in Healthy Individuals

(治療用量アセトアミノフェン投与時にみられる肝アダプテーション:

健康成人を対象とした探索的研究)」

DM15030 前田 実花

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
医療人間科学群 臨床研究企画開発学  
指導教授 熊谷 雄治

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

Mika Maeda, Rieko Tanaka, Masako Aso, Yasutoshi Sakamoto, Ildae Song,  
Michiru Ochiai, Yoshiro Saito, Keiko Maekawa, Noriaki Arakawa, Yasuo Ohno and  
Yuji Kumagai  
Hepatic Adaptation to Therapeutic Doses of Acetaminophen: An Exploratory Study in  
Healthy Individuals. Clin Ther, 42(7):1276-91 e1, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.05.003>

本論文の基礎となる研究は、熊谷 雄治 教授の指導の下に北里大学大学院  
医療系研究科にて行われた。

## 要 旨

### 【背景・目的】

アセトアミノフェン (acetaminophen, paracetamol, N-acetyl-p-aminophenol; APAP) は、解熱鎮痛を目的に広く使用されている。APAP は中毒性（用量依存性）薬物誘発性肝障害を引き起こす薬剤としてよく知られている。急性肝障害の原因は、英国では 57%、米国では 39% が APAP によるとされており、APAP 誘発性肝障害の発症の予測とコントロールは重要な課題となっている。

最近の研究により、治療用量の APAP を繰り返し投与したとき、無症候性かつ self-limiting な ALT 値の一過性の上昇をみる例があることが報告されている。このような ALT 値の変動は、特異体質性薬物性肝障害を引き起こすイソニアジド、タクリン、スタチン類などで起こることが知られており、いわゆる肝アダプテーション (hepatic adaptation) として知られている。しかし、このような ALT 値変動の要因や臨床的意義は明らかにされていない。

本研究は、ヒトに治療用量 APAP を繰り返し投与したときにみられる肝アダプテーションに注目したものである。肝機能検査値に異常がない健康成人を対象に、APAP 1 日 3g を 28 日間繰り返し投与したときにみられる肝アダプテーションの発生と特性を検討することを目的として行った。

### 【方法】

日本人健康成人男女を対象としたランダム化、単盲検、プラセボ対照、並行群間、単一施設、反復投与試験とした。スクリーニング検査時の診察所見、12 誘導心電図、臨床検査により本研究の被験者として適格と判断された被験者を対象とした。被験者は、APAP 投与群、プラセボ投与群に 5 : 1 の比率で割付けられ、試験薬として APAP 1 日 3g またはプラセボの 28 日間の投与を受けた。被験者は試験薬投与の前日から投与 7 日目までの 8 日間（7 泊 8 日）は北里大学病院 臨床試験センターの臨床薬理ユニットにて入院にて管理された。退院後は、試験薬投与開始日から 14、21、28、35 日目（事後検査）に外来通院により検査・観察を受けた。被験者の安全性を考慮し、試験期間中に ALT 値、AST 値、ALP 値のいずれかが ULN 上限の 2 倍以上の値をみた被験者は、プロトコルの規定により試験を中止した。試験期間中に有害事象をみとめた場合には、追加観察、追跡調査を行った。

全被験者に対し、APAP 代謝にかかわる代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 2E1 および uridine 5'-diphospho-glucuronosyl transferases (UGT) 1A1 の遺伝的多型の解析、血漿中 APAP 未変化体濃度および尿中 APAP 代謝物（グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、システイン、メルカプツレート）の測定、ALT 値、microRNA (miR) 122、High mobility group box-1 (HMGB1)を含む肝機能モニタリングを行った。

試験期間中の ALT 値が ULN (40 単位/L) 未満であった被験者を tolerant 群、ULN を超える上昇をみた被験者を susceptible 群に分類した。更に susceptible 群のうち試験薬の投与期間中に自然経過にて ALT 値の ULN 方向への低下をみた例を adaptation 群に分類した。

本研究は北里大学相模原治験審査委員会による審査を受け承認を得た上で、ヘルシンキ宣言における倫理的原則および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守して実施された (IRB

No. 2015202)。全ての研究参加者より研究参加に先立ち自由意思による研究参加の同意を文書にて得た。本研究は、UMIN Clinical Trial Repository(UMIN-CTR)に登録した (UMIN000019607)。

### 【結果】

435 例にスクリーニング検査が行われ、242 例が登録された。APAP 投与群に 202 例 (男性 135 例, 女性 67 例)、プラセボ投与群に 40 例 (男性 26 例, 女性 14 例) が割付けられた。ALT 値の上昇以外の理由で試験中止となった APAP 群 8 例、プラセボ群 3 例を除く APAP 群 194 例、プラセボ群 37 例を ALT 値変動の解析対象とした。両群間の背景には臨床的に意味のある差はみとめられなかった。

APAP 群では、129 例 (66%) が tolerant 群、65 例 (34%) が susceptible 群に分類された。susceptible 群 65 例のうち、12 例 (18%) は ULN の 2 倍を超える ALT 値上昇をみたためプロトコル規定により APAP の投与を中止した。残りの 53 例 (82%) は 28 日間の APAP 投与を完了した。susceptible 群 65 例のうち 30 例 (46%) は試験薬の投与を継続しながらも自然経過にて ALT 値が ULN 方向に低下した (adaptation)。また 23 例 (35%) は 28 日間の APAP 投与終了時以降に UNL を超える ALT 値をみた。プラセボ群では ALT 値上昇により試験を中止した例はなく、33 例 (89%) が tolerant 群に 4 例 (11%) が susceptible 群に分類された。APAP 群、プラセボ群共にいずれの被験者にも肝酵素上昇以外の肝障害の所見は認められなかった。

APAP 投与後の ALT 値と miR-122 の間には統計学的に有意な相関がみられたが、HMGB1 との間には相関はみられなかった。

血漿中 APAP 未変化体濃度は、susceptible 群と tolerant 群の間で差はみられなかった。

APAP 単回投与後の susceptible 群の尿中 APAP-メルカプツレート尿中排泄率は tolerant 群に比し統計学的に有意に高値であった ( $P=0.018$ , Wilcoxon/Kruskal-Wallis 検定)。

UGT1A1\*28 と UGT1A1\*6 のホモ接合体と複合ヘテロ接合体 (\*28/\*28,\*6/\*6,\*6/\*28) が、tolerant 群に比し susceptible 群で統計学的に有意に高頻度にみられた (13.9% vs 3.9%;  $P=0.011$ , カイ二乗検定)。

### 【考察】

日本人健康成人に APAP 1 日 3 g を 28 日間繰返し投与した結果、194 例中 65 例 (34%) に ULN を超える ALT 値上昇がみられたが、いずれの例も肝酵素上昇以外の肝障害の所見は認められなかった。また APAP の投与を継続しながらも自然経過にて ALT 値の ULN 方向への低下をみる例が 65 例中 30 例 (46%) にみられ、本研究において治療用量 APAP 投与時の肝アダプテーションが観察されたと考えられる。本研究では、APAP 投与例のうち 23 例は 28 日間の投与終了後に ULN を超える ALT 値の最高値がみられており、また 12 例は被験者の安全性の観点から APAP 投与が中止されている。これらの例に APAP を継続投与したとき肝アダプテーションが観察された可能性があるが、本研究では確認することができなかった。これは本研究のリミテーションである。

この研究では、APAP 誘発性の肝障害をより早期に検出する新規バイオマーカーとして期待されている miR-122、HMGB1 を評価した。APAP 1 日 3g を繰返し投与した時の ALT 値は miR-122



と関連したが、HMGB1とは関連しなかった。HMGB1はAPAPによる肝障害の予後因子としてALT値よりも期待されているが、肝細胞壊死等の重篤な肝障害を反映するバイオマーカーであり、肝細胞障害の早期段階では変化しないことを反映したものと考えられる。本研究の結果から、APAP 1日3gの投与により、急性の軽度な肝細胞障害が起こりはするものの、その障害の程度は肝細胞の壊死を反映するHMGB1の変化をみるほどのものではないことを示すものと思われる。

血漿中APAP未変化体濃度の推移は、susceptible群とtolerant群の間で差はみられなかったことから、治療用量APAP投与時のAPAPの曝露量はALT値上昇には関与しないものと考えられた。

APAPの肝障害は、主としてCYP2E1を介した酸化代謝により生成する中間体代謝物N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)によるものであることが知られている。NAPQIはグルタチオン抱合を受けチオール代謝物（メルカプツレート、システインなど）として尿中に排泄される。本研究では、tolerant群に比しsusceptible群で尿中APAP-メルカプツレートの排泄率が高いことが確認された。この所見は、主としてCYP2E1により仲介される酸化代謝の関与がtolerant群に比しsusceptible群で高く、NAPQIの肝臓での生産増加が肝細胞に影響し、結果としてALT値上昇を示した可能性を示唆している。またUGT1A1\*28とUGT1A1\*6のホモ接合体と複合ヘテロ接合体(\*28/\*28,\*6/\*6,\*6/\*28)の頻度がtolerant群に比しsusceptible群で有意に高いことが示された。更なる研究が必要とされるが、治療用量APAPの繰返し投与中に観察されるALT値の上昇には、APAP代謝物の個体毎のパターン分布及び遺伝的要因が関係している可能性がある。

#### 【結論】

健康成人にAPAP 1日3gを繰返し投与したとき、無症候性の肝細胞性損傷を反映していると思われるALT値の上昇をみるが、この上昇は忍容性がありself-limitingなものであると考えられた。ALT値の上昇には、APAP代謝の個体ごとのパターンおよび遺伝的要因が関連している可能性が示唆された。

## 目 次

	頁
1. 序論.....	1
2. 方法.....	3
2.1. 対象者 .....	3
2.2. 研究デザイン.....	4
2.3. 肝毒性の評価.....	4
2.4. 薬物動態の評価 .....	5
2.5. 忍容性の評価.....	5
2.6. 薬物動態の解析 .....	5
2.7. 遺伝子型の決定 .....	6
2.8. 被験者の分類.....	7
2.9. 統計解析.....	7
3. 結果.....	8
3.1. 被験者の内訳及び人口統計学的特性 .....	8
3.2. 試験薬投与後の血清 ALT 値の上昇.....	8
3.3. 血清 ALT 値上昇に関連する背景因子の探索.....	9
3.4. 血清 ALT 値と肝細胞障害に関連するバイオマーカーの関連 .....	9
3.5. 血清 ALT 値上昇と血漿中 APAP 未変化体濃度との関係 .....	9
3.6. 血清 ALT 値上昇と尿中 APAP 代謝物との関係 .....	9
3.7. 血清 ALT 値上昇と遺伝子型の関係.....	9
4. 考察.....	11
5. 結論.....	14
6. 今後の課題.....	15
7. 資金源.....	16
8. 謝辞.....	17

9. 参考文献.....	18
10. 图表.....	22

## 1. 序論

アセトアミノフェン (acetaminophen, paracetamol, N-acetyl-p-aminophenol; APAP) は、解熱鎮痛を目的に広く使用されている。APAP は中毒性 (用量依存性) 薬物誘発性肝障害を引き起こす薬剤としてよく知られている(1)。急性肝障害の原因は、英国では 57%、米国では 39%が APAP によるとされており(2)、APAP 誘発性肝障害の発症の予測とコントロールは重要な課題となっている。

APAP は、広範な文献レビューにより治療用量範囲内で使用する場合においてはアルコール依存症のような感受性が高いとされる例を含め比較的安全に使用できることが示されている(3)。しかし、近年行われた健康成人 145 人を対象としたランダム化比較試験において、プラセボ投与した例に比し、APAP の治療用量である 1 日 4 g を連日投与した例では肝障害のサロゲートマーカーである血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase : ALT) 値の上昇を有意に高頻度みること、ALT 値上昇の程度は多くは軽度であるものの検査基準値上限 (ULN) の 8 倍を超える ALT 値をみる例もみられることが報告されている(4)。このような APAP 誘発性の ALT 値上昇に対する個人の感受性の差の要因と臨床的意義は現在のところ明らかにされていない。

APAP 誘発性肝毒性発生のメカニズムに関する研究は、APAP 高用量投与による急性期肝毒性のメカニズムに焦点を当てたものがヒトおよび動物モデルで広く行われてきた。APAP から cytochrome P450 (CYP) enzymes、主として CYP2E1 を介した第 1 相酸化反応により生成した求電子化合物である中間体代謝物 *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) が肝細胞構成蛋白と共有結合し肝細胞障害をきたし、結果肝障害を発症するとされている (5, 6)。最近の研究では、後期フェーズの肝毒性発生メカニズムが注目されている。現在のところ、特に NAPQI とミトコンドリア蛋白との結合が酸化ストレスとミトコンドリア損傷を引き起こし、肝細胞死に至るのではないかと考えられている(6, 7)。

APAP は、複数の代謝経路を有しており、NAPQI 生成過剰となり肝細胞障害が発症するメカニズムには複数の因子が関与する。ヒトでの治療用量における APAP の未変化体尿中排泄率は 10% 未満と小さく、主として肝で代謝を受ける(8, 9)。APAP 治療用量投与では、約 50-70%は UDP-glucuronosyl transferases (UGT) 1A1、1A6などを介したグルクロン酸抱合により、約 25-35%は sulfotransferases (SULT) 1A1、SULT1A3/4などを介した硫酸抱合により速やかに主として尿中に排泄される(6)。CYP2E1 を介した第 1 相酸化反応による代謝の寄与は小さいがこれにより NAPQI が生成され、さらに第 2 相グルタチオン抱合を受け、約 5-15%が thiol metabolites (mercapturate, cysteine metabolites など) として排泄される(6)。しかし、過剰に NAPQI が形成されたとき肝臓内のグルタチオン (Glutathione: GSH) は枯渇し、第 2 相グルタチオン抱合反応が低下、NAPQI は細胞及びミトコンドリア蛋白質に結合して APAP 蛋白質付加物 (APAP-protein adducts) を形成し、酸化ストレス及びミトコンドリア機能障害を引き起こす。このため thiol metabolites の尿中排泄率は生体内での NAPQI の過剰生産を反映していると考えられる。APAP 誘発性の肝毒性は、1) APAP の投与量、2) グルクロン酸抱合および硫酸抱合の飽和、CYP 2E1 を介した第 1 相酸化反応の寄与の増加を含む代謝酵素活性の変化、3) 肝細胞内のミトコンドリアの GSH の減少による第 2 相グルタチオン抱合反応の低下により変化する(6, 10)。



APAP の代謝に関与するいくつかの酵素で遺伝子多型が存在することが知られている。代謝酵素の遺伝子多型は、APAP の肝毒性リスクの個人差や APAP 代謝の個人間変動を説明する可能性があることから多くの検討がなされているが、現在のところ APAP 誘発性肝障害と APAP 代謝酵素の遺伝子多型との間に臨床的に意味のあるとする情報は少ない(6, 11)。APAP をより安全に臨床使用するための情報として、中でも NAPQI 生成に寄与する CYP2E1(12, 13)、また薬物を介した有害事象発現に関連することが知られている UGT1A1 の遺伝子形(14-17)と APAP 誘発性肝障害の関連に関する情報が必要とされている。

近年、特異体質性薬物誘発肝障害 (idiosyncratic drug induced liver injury: IDILI)発症の個体差を説明する仮説とし adaptation hypothesis が提唱されている(18)。IDILI を引き起こすイソニアジド、タクリン、スタチン類などの薬剤が、無症候性かつ self-limiting な肝機能検査値の臨床経過をみることに注目したもので、このような肝機能検査値の変動はいわゆる肝アダプテーション (hepatic adaptation) として知られている(18-23)。この仮説は、薬剤性肝障害の発症には、薬剤が投与された後、体内で産生されたある種の代謝物と生体内高分子と結合して生じるハプテンまたは抗原性ペプチドに対する human leukocyte antigen (HLA) haplotypes への感受性と引き続きおこる免疫寛容が関連しており、一時的に軽度な肝細胞障害をみたのち免疫寛容 (adaptation) により自然経過で回復する例がある一方、adaptation が生じない例では重篤な肝障害に発展するのではないかというものである(18)。APAP についても、最近のいくつかの研究により APAP 治療用量を繰り返し投与したとき、無症候性かつ self-limiting な ALT 値の一過性の上昇をみる例があることが報告されている(24, 25)。しかし、APAP 投与時にみられるこのような ALT 値変動の要因や臨床的意義は明らかにされていない。

本研究は、ヒトに治療用量 APAP を繰り返し投与したときにみられる肝アダプテーションに注目したものである。肝機能検査値に異常がない健康成人を対象に、APAP 1 日 3g を 28 日間繰り返し投与したときにみられる肝アダプテーションの発生と特性を検討することを目的に行った。ALT 上昇に影響を与える要因については、APAP 代謝と ALT 値の関係、APAP の代謝に寄与する UGT1A1 と CYP2E1 の遺伝子型の影響を評価した。近年、薬剤性肝障害の発症をより鋭敏かつ早期に検出する ALT 値にかわるバイオマーカーの探索がさかんに行われており、APAP 誘発性の肝障害を早期に検出するバイオマーカーとして microRNA (miR) 122、High mobility group box-1 (HMGB1)、GLDH などが期待されている(26-28)。この研究では、肝障害バイオマーカーとして、通常臨床で肝機能の評価に用いられている ALT、aspartate aminotransferase (AST)、alkaline Phosphatase (ALP)、lactate dehydrogenase (LDH)、 $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGTP)、total bilirubin (T-Bil)、direct bilirubin (D-Bil) に加え臨床応用が期待される miR-122 と HMGB1 を用いた。

## 2. 方法

### 2.1. 対象者

本研究では、スクリーニング検査に確認された病歴、身体検査、12誘導心電図、臨床検査において臨床的に問題となる所見がみとめられなかった見かけ上健康な日本人男女を対象とした。

以下の選択基準を満たす被験者を対象とした。

#### 選択基準

- 1) 本試験への参加を志願する文書同意能力のある者
- 2) 同意取得時の年齢が 20 歳以上 45 歳以下である者
- 3) 体重が男性 50 kg 以上 100 kg 未満、女性 50kg 以上 80kg 未満、体格指数 (BMI) が  $18 \text{ kg/m}^2$  以上  $27 \text{ kg/m}^2$  未満の者
- 4) スクリーニング検査時の AST 値および ALT 値が ULN 以下の者

また、以下の除外基準に該当する被験者は対象から除外した。

#### 除外基準

- 1) APAP に対し過敏症の既往歴のある者
- 2) 消化性潰瘍のある者
- 3) 治療を必要とする血液の異常、肝障害、腎障害、心機能不全のある者
- 4) アスピリン喘息又はその既往歴のある者
- 5) アルコールを常用的に多量摂取している者（過去 12 週間で、1 日平均して 30g 以上のエタノールを摂取している者）
- 6) 医薬品、栄養ドリンクまたはセントジョーンズワートを含む健康食品を試験薬の投与前 14 日以内に服用した者
- 7) 過去 12 週以内に他の治験及び臨床試験に参加した者
- 8) 男性は過去 4 週以内に 200 mL 以上、過去 12 週以内に 400 mL 以上、女性は過去 4 週以内に 200 mL 以上、過去 16 週以内に 400 mL 以上の献血をした者、
- 9) 梅毒血清反応、HIV 抗原・抗体、HBs 抗原、HCV 抗体が陽性である者
- 10) 薬物及び食物にアレルギーを有する者
- 11) 薬物依存、アルコール依存の者
- 12) 妊娠中、授乳中および妊娠している可能性のある者
- 13) 妊娠可能な女性被験者において、試験薬服用開始時から事後検査までの期間、適切な避妊の実施ができない者
- 14) その他、試験担当医師が本試験の対象として不適当と判断した者

全ての被験者に研究開始に先立ち治験審査委員会より承認を得た説明文書を用いて説明を行い、試験の参加について自由な意思により書面によるインフォームド・コンセントを受けた。

被験者は、初回の試験薬投与の 14 日前から試験薬投与終了までの間、市販薬、処方薬、漢方、全身作用のある貼付薬などの薬物、栄養ドリンク及びセントジョーンズワートを含む健康食品の使用を禁止された。また、初回投与の前日から試験薬投与終了までの間、飲酒及び過度の運動を禁止された。

## 2.2. 研究デザイン

本研究は、ランダム化、単盲検、プラセボ対照、並行群間、反復投与、単施設試験として行われた。本研究は、北里大学病院 臨床試験センターにて実施した。

研究計画書および研究の説明に用いる説明文書は、北里大学相模原治験審査委員会及び国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会による審査を受け、研究の実施について承認を受けた（承認番号：北里大学病院 IRB No. 2015202、国立医薬品食品衛生研究所 No.265、木原財団 No. 266）。本研究は、ヘルシンキ宣言における倫理的原則（2013 年フォルタレザ（ブラジル）改訂）および人を対象とした医学系研究に関する倫理指針（2014 年 12 月 22 日）を遵守して実施された。本研究は、UMIN Clinical Trial Repository (UMIN-CTR) に登録を行った (UMIN000019607)。

被験者は、単純無作為化割付により、APAP 投与群またはプラセボ投与群に割り付けられた (APAP 投与群：プラセボ投与群 = 5 : 1)。被験者は、APAP またはプラセボを 28 日間連続投与された。投与 1 日目は、APAP (500 mg×2 錠) あるいはプラセボを 1 日 1 回、絶食下にて経口投与した。投与 2 日目から 28 日目までは、APAP (500 mg×2 錠) あるいはプラセボを 1 日 3 回、食後に経口投与した。

本研究における APAP の投与量の設定は、本研究に先行して行われていた日本における高用量 APAP の使用に関する市販後調査の成績を参考とした(29)。本調査では、患者の 83%が 1 日 2.4～3.0g の用量範囲で APAP を使用しており、1 日 3.0g 以上を使用する患者は 17%であったことから本研究における APAP 投与量は 1 日 3.0g とした。

被験者は試験薬投与の前日から投与 7 日目までの 8 日間（7 泊 8 日）、北里大学病院 臨床試験センターの臨床薬理ユニットに入院の管理下に置かれた。退院後は、試験薬投与開始日から 14、21、28、35 日目（事後検査）に被験者を外来通院させ、被験者の観察を行った。試験期間中に有害事象をみとめた場合には、追加観察、追跡調査を行った。

## 2.3. 肝毒性の評価

ALT、AST、ALP、LDH、GGTP、T-Bil、D-Bil は、肝機能の評価を行う臨床検査として実施した。同時に miR-122、HMGB1 を測定した。バイオマーカー検討用の血液サンプルは Day1（ベースライン）、2、4、7、14、21、28、35 に採取した。

miR-122 および HMGB1 測定用にそれぞれ 5mL の血液を採取した。



miR-122 の定量的 PCR 解析は、血清中の miRNA を標準法で抽出した後、miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR System を用いて、Exiqon A/S (Vedbaek, Denmark)により行った。miR-122 レベルは、miR-222-3p をレファレンス遺伝子として  $2^{-\Delta CT}$  法により評価した。

血清 HMGB1 は、HMGB1 ELISA KIT II (Shino-Test, Tokyo, Japan) (30)を用い株式会社エスアールエル (SRL, Inc., Tokyo, Japan) で測定した。

## 2.4. 薬物動態の評価

血漿中未変化体 APAP 濃度測定用の血液サンプルは、試験薬投与 1 日目の投与開始前、投与後 0.5、1、2、4、6、8、12、48、122、126、132、144、312 (day14)、480 (day21)、648 (day28) 時間にヘパリンを添加した採血管に各時点 2mL を採取した。血液採取後、速やかに遠心分離 (3,000rpm (1560g), 4℃, 10 分間) し血漿を分離した。得られた血漿は、ポリプロピレンチューブに分注後、測定まで-70℃以下にて凍結保存した。

尿中 APAP 代謝物 (APAP-glucuronide、APAP-sulfate、APAP-cysteine、APAP-mercapturate) 濃度測定用の尿サンプルは、試験薬投与後 0-6、6-12、12-24、120-124、124-130、130-144 時間は蓄尿により、試験薬投与直前、312 (day14)、480 (day21)、648 (day28) 時間はスポット尿にて採取した。蓄尿は、アスコルビン酸を加えた蓄尿容器に行い、検体採取までの間は冷暗所にて保管した。蓄尿期間終了後、蓄尿容器内の尿を十分に攪拌し全尿量を測定した後、一部を尿中 APAP 代謝物濃度測定用検体として採取した。全て検体は分析時まで-70℃以下にて凍結保存した。

尿中 APAP 代謝物の尿中排泄率 (%) を、APAP 単回投与後 24 時間までの尿中濃度および APAP 投与量から算出した。また、各測定時点の APAP-glucuronide 濃度に対する APAP-sulfate、APAP-cysteine、APAP-mercapturate 濃度の比率を算出した。

## 2.5. 忍容性の評価

自覚所見・他覚所見、バイタルサイン、12 誘導心電図、臨床検査 (血液学的検査、血液生化学検査、尿検査) により忍容性を評価した。

肝障害の評価は、重度の薬剤性肝障害の可能性を評価する際に用いる予後指標として FDA が公表している、Hy's law の基準を肝障害発症の評価基準(31)として用いた。なお、被験者の安全性を考慮し、試験期間中に ALT 値、AST 値、ALP 値のいずれかが ULN 上限の 2 倍 (ALT  $\geq 80$  U/L、AST  $\geq 80$  U/L、ALP  $\geq 718$  U/L)を超えた被験者は、研究計画書の規定により試験を中止した。

## 2.6. 薬物動態の解析

血漿中 APAP 未変化体濃度および尿中 APAP 代謝物 (APAP-glucuronide、APAP-sulfate、APAP-cysteine、APAP-mercapturate) は、Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)



法により新日本科学 薬物代謝分析センター（和歌山、日本）にて測定された。標準物質には Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Ontario, Canada) の試薬を用いた。

血漿試料はメタノールによる除タンパクによって前処理し、尿試料は超純水で希釈した。

LC-MS/MS システムは Shimazu Separations Module (株式会社島津製作所、京都、日本) と API4000 triple-quadrupole mass spectrometer (AB Sciex Pte. Ltd., MA, USA) を用いた。

HPLC 分析カラムは CAPCELL PAK MGII (2.0 mm i.d. × 100 mm、5 μm、株式会社資生堂、東京、日本) を用い、カラム恒温槽を 40℃に保ち、移動相に 0.1%酢酸溶液/メタノール混液を用いた。質量分析におけるイオン化法はエレクトロスプレーイオン化 (Electrospray Ionization; ESI) 法を用いた。多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM) におけるモニターイオンは、APAP m/z 152→110、APAP 内標準物質 m/z 155→113、APAP-glucuronide m/z 328→152、APAP-glucuronide 内標準物質 m/z 331→155、APAP-sulfate m/z 232→152、APAP-sulfate 内標準物質 m/z 235→155、APAP-cysteine m/z 271→140、APAP-cysteine 内標準物質 m/z 276→143、APAP-mercapturate m/z 313→208、APAP-mercapturate 内標準物質 m/z 318→212 とした。装置・機器制御とデータ解析には Analyst ソフトウェア (AB Sciex Pte. Ltd., MA, USA) を用いた。試料分析時には品質管理試料 (3 濃度 ; 検量線範囲の低、中、高、各濃度 2 試料、計 6 試料) を分析し、測定系の精度管理を行った。真度 (%) の判定基準は、6 試料中少なくとも 4 試料が 100.0%±15.0% 以内、かつ同一濃度のうち 1 試料が 100.0%±15.0%以内とした。検量線範囲は、血漿中 APAP 未変化体濃度は 0.05 μg/mL-50 μg/mL、尿中 APAP 代謝物はそれぞれ 10 μg/mL-5000 μg/mL であった。

## 2.7. 遺伝子型の決定

### 2.7.1. *UGT1A1* genotyping assay

*UGT1A1* 遺伝子解析用に EDTA-2Na 採血管に血液 2mL を採取した。得られた血液検体からゲノム DNA を抽出し、UDP グルクロン酸転移酵素 (*UGT1A1*) の遺伝子多型 *UGT1A1*\*6 および *UGT1A1*\*28 をインベーター法 (インベーター®*UGT1A1* アッセイ, SEKISUI MEDICAL CO., LTD., Tokyo, Japan) にて分析を行った。*UGT1A1* 遺伝子型は(1) wild-type (\*1/\*1)、(2) homozygote or compound heterozygote (\*28/\*28,\*6/\*6,\*28/\*6)、(3) heterozygote (\*1/\*28, \*1/\*6)の 3 つのグループに分類した。

### 2.7.2. *CYP2E1* genotyping assay

*CYP2E1* 遺伝子解析用に EDTA-2Na 採血管に血液 2mL を採取した。得られた血液検体からゲノム DNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法により *CYP2E1* の *CYP2E1*\*1、*CYP2E1*\*2、*CYP2E1*\*5A、*CYP2E1*\*5B、*CYP2E1*\*6 (Pharmacogene Variation Consortium (32)の定義) に対する遺伝子多型を解析し、被験者の遺伝子型を推定した。

## 2.8. 被験者の分類

ALT 値上昇のカットオフ値は、本研究を行った北里大学病院の検査基準値により決定した。ALT 値の ULN は 40 U/L であった。

試験期間中に観察された ALT 値の変動により被験者を以下の 2 群に分類した。

- A. Tolerant 群：試験期間中、ALT 値が ULN 上限 (40U/L) 未満で維持された例（ベースライン値が ULN を超えて例についてはベースライン値を超えなかった例）
- B. Susceptible 群：試験期間中に ULN 上限 (40U/L) を超える ALT 値の上昇をみた例（ベースライン値が ULN を超えていた例についてはベースライン値を超える上昇をみた例）

更に、試験期間中の ALT 上昇の変動パターンにより Susceptible 群をさらに以下の 3 群に亜分類した。

- B-1. Adaptation：28 日間の試験薬投与期間中に自然経過にて ALT 値が ULN 方向への低下をみた例
- B-2. Continued mild susceptibility：28 日間の試験薬投与終了後に ULN 上限を超える ALT 値のピークを示した例
- B-3. High susceptibility-withdrawn：試験薬投与開始後、ULN 上限の 2 倍 (80 U/L) を超える ALT 値の上昇をみとめ、安全性の観点から試験薬の投与を中止した例

## 2.9. 統計解析

被験者の背景情報のうち連続変数は中央値及び四分位範囲で示し、カテゴリカル変数は百分率で示した。APAP 単回投与時及び反復投与時の肝機能バイオマーカー、血漿中 APAP 未変化体濃度及び APAP 尿中代謝物の比の時間推移図を作成した。2 つの連続変数の相関は線形回帰分析を用いて評価した。APAP 群とプラセボ群の群間比較、試験薬投与後の ALT 値の推移パターンによるグループ間の薬物動態パラメータの比較にはノンパラメトリック検定 (Wilcoxon/ Kruskal - Wallis test) を用いた。*CYP2E1* および *UGT1A1* の遺伝子型の発現頻度の検討にはカイ二乗検定を用いた。有意水準は  $P < 0.05$  とした。全ての統計解析は JMP13.2.1 (SAS institute Inc.) を用いて行った。

### 3. 結果

#### 3.1. 被験者の内訳及び人口統計学的特性

本研究の被験者の要約図を Figure 1 に示した。

スクリーニング検査を受けた 435 例のうち、242 例が被験者として適格と判断され、無作為化された。そのうち 202 名（男性 135 例）が APAP 群に、40 名（男性 26 例）がプラセボ群に割り当てられた。

APAP 群では、被験者よりインフォームド・コンセントが撤回された例 1 例、医師の判断により試験の中止が決定された 7 例を除く 194 例（男性 130 例）を本研究の解析対象とした。APAP 群では、APAP 投与期間中に ALT 値が ULN の 2 倍を超える値をみとめ、プロトコルの規定に従い試験を中止した例が 12 例にみられた（high susceptibility-withdrawn）。

プラセボ群では、医師の判断により試験を中止した 3 例を除く 37 例（男性 24 例）を本研究の解析対象とした。プラセボ群（37 例）と APAP 群（194 例）の被験者の背景に臨床的に意味のある差は認められなかった（Table 1）。

#### 3.2. 試験薬投与後の血清 ALT 値の上昇

APAP 群では、194 例中 129 例（66%）が tolerant 群に、65 例（34%）が susceptible 群に分類された（Figure 2）。APAP 群の中止例のうち 1 例（Subject No. M130）にみられた AST 値/ALT 値の上昇は、運動後の creatine phosphokinase (CPK) 値の上昇（10,300U/L）を伴っていた。本症例は、ALT 値変動に関する解析対象から除外した（プロトコル違反）。

APAP 群において susceptible 群に分類された 65 例のうち、12 例（18%）が ULN の 2 倍を超える ALT 値の上昇（80 単位/L）がみとめられ、プロトコルの規程に従い APAP の投与を中止した（high susceptibility-withdrawn、Figure 2 B3）。残りの 53 例（82%）は、プロトコルで規定された 1 日 3 g、28 日間の APAP の継続投与を完了した。

APAP 群 susceptible 群 65 例のうち 30 例（46%）において、APAP の投与を継続しながらも自然経過により一度上昇をみた ALT 値の ULN 方向への低下がみられた（adaptation、Figure 2 B1）。23 例（35%）は、28 日間の APAP 投与終了後に ULN 上限を超える ALT 値のピークを示した（continued mild susceptibility、Figure 2 B2）。いずれの例にも肝障害に関する所見はみとめられなかった。

APAP 群において adaptation に分類された 30 例の血清 ALT 値は、APAP 投与開始後 21 日目にピークをみる例が最も多く 18 例（60%）、続いて 14 日目にピークをみる例が 7 例（23%）、7 日以内（入院期間中）にピークをみる例が 5 例（17%）であった（Figure 2 B1）。APAP 群 susceptible 群の一部において、一度低下傾向をみた ALT 値が APAP の投与中又は投与中止後に再び上昇する例がみられた。

プラセボ群では、ALT 値上昇による中止例はみとめられなかった。37 例中 33 例（89%）が tolerant 群に、4 例（11%）が susceptible 群に分類された（データ未記載）。



### 3.3. 血清 ALT 値上昇に関連する背景因子の探索

Susceptible 群と tolerant 群の間で、年齢、体重、BMI、臨床検査値のベースライン値（血液学的検査、血液生化学検査、免疫関連検査）に明らかな違いはみられなかった（データ未記載）。

### 3.4. 血清 ALT 値と肝細胞障害に関連するバイオマーカーの関連

APAP 投与例における血清 ALT 値は、miR-122 の値との間に統計学的に有意な相関がみられたが、HMGB1 の値との間には相関はみられなかった（Figure 3）。

AST 値、GGTP 値、ALP 値、LDH 値は、ALT 値との間に相関がみられたが、APAP 投与後の検査値の変動は AST 値以外は ULN を超えない小さいものであった。T-Bil 値および D-Bil 値では、値の変動はみとめられなかった（データ未掲載）。

### 3.5. 血清 ALT 値上昇と血漿中 APAP 未変化体濃度との関係

APAP 投与群の susceptible 群と tolerant 群の間で、APAP 単回投与後の血漿中 APAP 未変化体濃度の推移に違いはみとめられず、また APAP を 1 日 3g 繰返し投与した時の血漿中 APAP 未変化体濃度についても違いはみられなかった。血漿中 APAP 未変化体濃度は血清 ALT 値上昇に関連しないことが示された（Figure 4）。

### 3.6. 血清 ALT 値上昇と尿中 APAP 代謝物との関係

APAP 単回投与後の susceptible 群の APAP-mercaptopurine の尿中排泄率は tolerant 群に比し統計学的に有意に高値であった（Wilcoxon/ Kruskal-Wallis 検定、 $P=0.0182$ ）（Figure 5）。

APAP 繰返し投与時の APAP-glucuronide に対する APAP-mercaptopurine の比は、susceptible 群の値は tolerant 群に比し高値で推移し、APAP 投与後 480 時間の時点では統計学的な有意差がみられた（ $P=0.017$ , Wilcoxon/ Kruskal-Wallis 検定）（Supplementary Figure S1）。

### 3.7. 血清 ALT 値上昇と遺伝子型との関係

#### UGT1A1 遺伝子型解析

APAP-glucuronide の尿中排泄率は、wild-type (\*1/\*1)、homozygote or compound heterozygote (\*28/\*28, \*6/\*6, \*6/\*28) 及び heterozygote (\*1/\*28, \*1/\*6) の間で差は認められなかった（データ未掲載）。

APAP 群では、homozygote or compound heterozygote (\*28/\*28, \*6/\*6, \*6/\*28) が tolerant 群に比し



susceptible 群において統計学的に有意に高頻度でみられた (P=0.011、カイ二乗検定) (Table 2)。

### **CYP2E1 遺伝子型解析**

CYP2E1 の遺伝子型により APAP-cysteine および APAP-mercapturate の尿中排泄率に差はみとめられなかった。

APAP 群の high susceptibility-withdrawn の例では、他の例に比し CYP2E1 \*1/\*5A の遺伝子型が高頻度にみられた (8 例/12 例、67%) (Table 3)。

#### 4. 考察

健康成人に APAP の治療用量である 3g/日を 28 日間繰返し投与したとき、194 例中 129 例 (66%) は ULN またはベースライン値を超える ALT 値上昇をみることなく試験を完了した。65 例 (34%) は、APAP 投与期間中に ULN を超える ALT 値の上昇をみとめ susceptible 群に分類されたが、いずれの例も肝障害の所見はみられなかった。

APAP 群の susceptible 群 65 例のうち、12 例 (18%) に ULN の 2 倍を超える ALT 値の上昇がみとめられ安全性の観点からプロトコル規程に従い APAP の投与を中止した。プラセボ群ではこのような例はみられなかった。

APAP 群 susceptible 群 65 例のうち 53 例 (82%) は、プロトコルで規定された APAP 3 g/日、28 日間の投与を完了することができた。このうち 30 例 (46%) では APAP 投与継続中に上昇した ALT 値が自然経過にて ULN 方向に低下した。本研究において治療用量 APAP 投与時における肝アダプテーション (hepatic adaptation) が確認されたと考えている。

先行研究である米国で行われた健康成人を対象とした無作為化比較試験では、APAP 4 g/日を投与された被験者 205 例のうち 157 例 (77%) が ALT 値の上昇をみとめないまたは APAP の投与開始から 16 日目までに自然回復する忍容性のある ALT 値の上昇を示したことが報告されている。また ALT 値の上昇をみた 48 例のうち、47 例 (23%) は APAP 投与後 40 日までに ALT 値が回復、APAP を中止した後も ALT 上昇が持続した例は 1 例のみであったと報告されている(25)。本研究では、APAP 投与例 194 例中 23 例 (12%) が 28 日間の APAP 投与完了後に ULN を超える ALT 値のピークを示し、12 例 (6%) は ULN の 2 倍を超える ALT 値の上昇をみたためプロトコル規程により APAP の投与を中止した。これらの例では、APAP 投与を引き続き継続したとき ALT 値の自然回復をみた可能性がある。しかし、本研究のプロトコルでは、これらの例における肝アダプテーションを調査することはできなかった。これは本研究のリミテーションである。

APAP 群の susceptible 群の一部で、一度低下をみた ALT 値が APAP の投与中または中止後に値の再上昇する例がみられた。同様の ALT 値の推移は、先行研究においても確認されている(25)。しかし、今回の研究ではこのような ALT 値の推移を示す原因や特徴を見出すことはできなかった。

本研究では、APAP 誘発性の肝障害バイオマーカーとして期待されている miR-122 と HMGB1 を評価した(26-28)。APAP 投与中の ALT 値は、miR-122 の値と相関したが、HMGB1 の値とは相関はみられなかった。miR-122 は、ALT 値に比しより肝特異性が高い早期マーカーとして期待されている(26, 28, 33-36)。一方、HMGB1 は、APAP 誘発性肝障害の予後予測因子として ALT 値より有望とされているが、肝細胞の壊死という強い肝障害を反映するバイオマーカーであることから肝細胞障害の早期段階では変動をみないことが示されている(28, 37)。今回の研究でみられた ALT 値、miR-122 および HMGB1 の値の推移は、治療用量の APAP 投与により急性の軽度な肝細胞の障害が起こりはするものの、その障害の程度は肝細胞の壊死を反映する HMGB1 の変化をみるほどのものではない忍容性のあるものと考察することができる。ALT 値と miR-122 の値はよく連動しており、APAP 投与を継続しながらも自然経過により回復するといった一過性で self-limiting

な値の変動が多く例にみられた。本研究は少数の健康成人による探索的な検討であることから多様な背景を有する症例を対象とした更なる検討が必要とされるが、治療量の APAP 投与により誘発された肝細胞の障害は、正常な肝機能を有する例であれば、自己の生体内反応としてある程度制御することができる可能性がある。このような例では、ALT 値の上昇をみた場合でもすぐに APAP の投与を中止するのではなく、引き続き肝機能マーカーをモニターすることで、必要とされる APAP による治療を継続することができる可能性がある。

APAP 投与群の susceptible 群と tolerant 群の血漿中 APAP 未変化体濃度の推移には差がみられなかったことから、APAP 未変化体の暴露量が ALT 値上昇に寄与するのではないと考えられた。APAP 代謝物の尿中排泄率をみると、APAP- mercaptulate の排泄率は、tolerant 群に比し susceptible 群で高かった。このことは、主として CYP2E1 を介した酸化代謝の寄与が、susceptible 群の例では tolerant 群の例より高く、APAP 投与後に肝で生成された NAPQI が肝細胞に影響し、結果として血清中 ALT 値の上昇をみる可能性が考えられる。しかし、susceptible 群全体では APAP- mercaptulate の尿中排泄率に違いが観察されたが、より感受性が高いと思われる high susceptibility-withdrawn の例と tolerant 群の例との間には差がみとめられなかった（データ未記載）。このことは、APAP 代謝物の尿中排泄率を臨床における APAP 誘発性肝障害の予測因子に用いることは難しいことを示しているのかもしれない。

APAP の代謝に関与するいくつかの UGT アイソフォームが同定されている(38-40)。ヒトにおける APAP グルクロン酸抱合では *UGT1A1*、*UGT1A9*、*UGT1A6* 及び *UGT2B15* が重要であるとされている(11, 39)。ジルベール症候群の患者では *UGT1A1* 活性が低下すること(41)、またイリノテカンの毒性リスクが上昇すること(42)が報告されている。また、*UGT1A1*\*28 及び *UGT1A1*\*6 の遺伝子多型は、イリノテカンにおける重度の血液毒性の発現に関連していることが知られている(15-17)。しかし、現在のところ、APAP 誘発性肝障害と UGT 遺伝子型との関連を示す情報は不十分である(43)。小規模な研究ではあるが、成人の Gilbert 症候群では APAP 投与後 2 時間までのグルクロン酸抱合体代謝能(グルクロン酸抱合体 AUC/未変化体 AUC の比)が、健康成人に比し 31% 低く、生体内活性化は 1.7 倍高いことが報告されている(38)。

本研究における APAP 投与後の ALT 値上昇と *UGT1A1* 遺伝子型との関連の検討により、*UGT1A1*\*28 と *UGT1A1*\*6 の homozygote と compound heterozygote (\*28/\*28, \*6/\*6, \*6/\*28) の頻度が tolerant 群に比し susceptible 群で有意に高いことが示された。本研究の結果は、APAP 代謝と *UGT1A1* 遺伝子型との決定的な関係を示すものではないが、*UGT1A1*\*28 と *UGT1A1*\*6 の homozygote と compound heterozygote (\*28/\*28, \*6/\*6, \*6/\*28) では、APAP 代謝におけるグルクロン酸抱合能の低下が CYP2E1 を介する代謝経路の寄与を増大し、その結果として NAPQI 形成が亢進し、ALT 値上昇につながる可能性が示唆される。

本研究における APAP 投与後の ALT 値上昇と *CYP2E1* 遺伝子型との関連の検討では、統計的に有意ではないものの high susceptibility-withdrawn の例において他の例に比し *CYP2E1*\*1/\*5A 遺伝子



型が高頻度にみられた。*CYP2E1*\*5 の機能変化の詳細や、他の *CYP2E1* 遺伝子型と APAP の代謝活性との関係などは現時点では明らかにされていない。しかし、本研究で示された high susceptibility-withdrawn の例における NAPQI 形成の亢進を支持する情報として、複数の研究で *CYP2E1*\*5 遺伝子型が wild type の *CYP2E1* 遺伝子型に比べ遺伝子発現と酵素活性の亢進に関連している可能性があるとする成績が示されている(44, 45)。今後、より多くの症例を対象とした研究が必要とされる。

APAP 投与時にみられる肝アダプテーションのメカニズムを明らかにすることは、APAP 誘発性肝障害の個々の感受性の違いを説明できる可能性がある。APAP 投与時にみられる肝アダプテーションのメカニズムとして、次のことが考えられている。APAP 投与により一過性に GSH が枯渇した後、NAPQI 濃度の上昇に伴う酸化ストレス応答により GSH 産生が亢進するというものである(46)。一方、肝アダプテーションの能力をもたない例、または肝アダプテーションの能力が小さい例では、自己による制御能力を超えたとき、つまり肝アダプテーションができない場合に肝細胞の障害を制御することができず、APAP 誘発性の重篤な肝障害や急性肝不全に進展するのかもしれない(18)。本研究では被験者の安全を考慮し、ALT 値が ULN の 2 倍を超えたとき APAP 投与を中止し、重篤な肝障害発症を防止した。そのため APAP による肝障害発症のリスク因子を考察することはできないが、治療用量 APAP 投与により ALT 値が上昇し続けた例がみられたことからこのような例では肝アダプテーションの能力がないまたは小さい可能性がある。

動物実験では APAP 投与後、肝の全タンパク発現が 30%増加、*CYP2E1* の局在に変化があったとの報告があり(47)、*CYP2E1* の発現と APAP 誘発性肝障害に関連がある可能性がある。近年、APAP 誘発性肝障害の高感受性因子として非アルコール性脂肪肝や糖尿病などが示されつつあるが、NAFLD は NAPQI の生成に関わる *CYP2E1* の活性を増加するとの報告が複数されている(48)。最近では炎症が脂肪化と同時、あるいは先行する機序 (multiple parallel hit) も提唱され(49)、酸化ストレスや小胞体ストレス、ミトコンドリア機能異常、オートファジー、腸内細菌叢の変化に伴う自然免疫系賦活などが NASH の病態に関与しているとされている(50)。今回は、健康成人を対象としたことから、その背景因子は概ね均一で、肝アダプテーションをみた例とみななかった例の背景因子に違いを見出すことができなかったが、NASH の病態にみられるような自然免疫反応が関与しているのかもしれない。

更なる研究が必要とされるが、治療用量 APAP の繰返し投与中に観察される ALT 値の上昇には、APAP 代謝物の個体毎のパターン分布及び遺伝的要因が関係している可能性がある。



## 5. 結論

健康成人に APAP 1 日 3g を繰返し投与したとき、無症候性の肝細胞性損傷を反映していると思われる ALT 値の上昇をみるが、この上昇は忍容性があり self-limiting なものであると考えられた。ALT 値の上昇には、APAP 代謝の個体ごとのパターンおよび遺伝的要因が関連している可能性が示唆された。

## 6. 今後の課題

本研究における APAP の投与量、投与期間は、先行研究をもとに 3g/日（1 回 1g、1 日 3 回）、28 日間とした。また、安全性の観点から ULN の 2 倍超える ALT 値の上昇をみた例はプロトコル規程により APAP の投与を中止した。欧米では、APAP 4g/ 日を中心とした検討が行われており、またより高値の ALT 値をみた場合でも臨床的な問題をみとめることなく投与継続がされている研究がみられる。今後、APAP 投与時にみられる肝アダプテーションの特徴や臨床的意義を明らかにするためには、被験者の安全性の観察を十分に行う適切な研究計画により ALT 値による中止基準をより高値に設定した、長期投与の検討が必要とされる。

本研究により、治療用量 APAP 投与時にみられる ALT 値の上昇は、忍容性があり self-limiting なものであると考えられた。本研究は少数の健康成人による探索的な検討であることから、この後、多様な背景を有する症例に対象を広げ、ALT 値上昇をみる要因や肝アダプテーションの臨床的意義に関する更なる検討が必要とされる。

## 7. 資金源

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED: Japan Agency for Medical Research and Development）「医薬品等規制調和・評価研究事業」（No. 15mk0101065h0101、15mk0101065h0201、15mk0101065h0301）の助成を受けて実施された。

## 8. 謝辞

研究の遂行にあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました北里大学医学部附属臨床研究センター 教授 熊谷 雄治 先生に心より感謝申し上げます。

北里大学医学部附属臨床研究センター 田中 理英子 先生、宋 一大 先生、国立がん研究センター東病院 トランスレーショナルリサーチ支援室（前 北里大学医学部附属臨床研究センター）坂本 泰理 先生、重症児・者福祉医療施設 ソレイユ川崎（前 北里大学病院 臨床試験センター）麻生 雅子 先生、北里大学大学院医療系研究科 落合 理路 先生、国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長 斎藤 嘉朗 先生、国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部/同志社女子大学薬学部医療薬学科 医薬品分析学研究室 教授 前川 京子 先生、国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 荒川 憲昭 先生、木原記念横浜生命科学振興財団 理事長 大野 泰雄 先生には本研究の共同研究者として研究立案、実施、成績の取り纏め、解析、結果の解釈等、細部にわたる丁寧なご助言とご指導を賜りました。ここに、心からの感謝の意を表します。

本研究の実施を支えてくださいました北里大学病院 臨床試験センターのスタッフの皆様へ感謝いたします。あわせて本研究の趣旨を理解し協力してくださった被験者の皆様へ感謝いたします。

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程における社会人大学院生としての研究活動の機会をくださり、お許しくださいました北里大学東病院 前病院長 菊池 史郎 先生、北里大学東病院 前薬剤部長 黒山 政一 先生、北里大学病院 前病院長 海野 信也 先生、北里大学病院 病院長 岩村 正嗣 先生、北里大学病院 薬剤部長 厚田 幸一郎 先生をはじめとする北里大学東病院、北里大学病院の皆様へ深く感謝申し上げます。

最後に、研究の日々を常に温かく見守ってくれた家族に心からの感謝の意を表します。



## 9. 参考文献

1. Mosedale M, Watkins PB. Drug-induced liver injury: Advances in mechanistic understanding that will inform risk management. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(4):469-80.
2. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N Engl J Med.* 2013;369(26):2525-34.
3. Dart RC, Bailey E. Does therapeutic use of acetaminophen cause acute liver failure? *Pharmacotherapy.* 2007;27(9):1219-30.
4. Watkins PB, Kaplowitz N, Slattery JT, Colonese CR, Colucci SV, Stewart PW, et al. Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006;296(1):87-93.
5. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(5):1327-31.
6. McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res.* 2013;30(9):2174-87.
7. Jaeschke H, Xie Y, McGill MR. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *J Clin Transl Hepatol.* 2014;2(3):153-61.
8. Miners JO, Osborne NJ, Tonkin AL, Birkett DJ. Perturbation of paracetamol urinary metabolic ratios by urine flow rate. *Br J Clin Pharmacol.* 1992;34(4):359-62.
9. Gelotte CK, Auiler JF, Lynch JM, Temple AR, Slattery JT. Disposition of acetaminophen at 4, 6, and 8 g/day for 3 days in healthy young adults. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(6):840-8.
10. Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010(196):369-405.
11. Caparrotta TM, Antoine DJ, Dear JW. Are some people at increased risk of paracetamol-induced liver injury? A critical review of the literature. *Eur J Clin Pharmacol.* 2018;74(2):147-60.
12. Garte S, Gaspari L, Alexandrie A-K, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2001;10(12):1239-48.
13. Court MH, Zhu Z, Masse G, Duan SX, James LP, Harmatz JS, et al. Race, Gender, and Genetic Polymorphism Contribute to Variability in Acetaminophen Pharmacokinetics, Metabolism, and Protein-Adduct Concentrations in Healthy African-American and European-American Volunteers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;362(3):431-40.
14. Burchell B, Soars M, Monaghan G, Cassidy A, Smith D, Ethell B. Drug-mediated toxicity caused by genetic deficiency of UDP-glucuronosyltransferases. *Toxicol Lett.* 2000;112-113:333-40.
15. Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res.* 2000;60(24):6921-6.

16. Minami H, Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Suzuki K, et al. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of UGT1A1\*6 and \*28. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(7):497-504.
17. Yamamoto N, Takahashi T, Kunikane H, Masuda N, Eguchi K, Shibuya M, et al. Phase I/II pharmacokinetic and pharmacogenomic study of UGT1A1 polymorphism in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer treated with irinotecan. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;85(2):149-54.
18. Dara L, Liu ZX, Kaplowitz N. Mechanisms of adaptation and progression in idiosyncratic drug induced liver injury, clinical implications. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2016;36(2):158-65.
19. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*. 1994;271(13):992-8.
20. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 2006;354(7):731-9.
21. Lewis JH, Mortensen ME, Zweig S, Fusco MJ, Medoff JR, Belder R. Efficacy and safety of high-dose pravastatin in hypercholesterolemic patients with well-compensated chronic liver disease: Results of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Hepatology*. 2007;46(5):1453-63.
22. Watkins PB, Seligman PJ, Pears JS, Avigan MI, Senior JR. Using controlled clinical trials to learn more about acute drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2008;48(5):1680-9.
23. Watkins PB. Biomarkers for the diagnosis and management of drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis*. 2009;29(4):393-9.
24. Parra D, Beckey NP, Stevens GR. The effect of acetaminophen on the international normalized ratio in patients stabilized on warfarin therapy. *Pharmacotherapy*. 2007;27(5):675-83.
25. Heard K, Green JL, Anderson V, Bucher-Bartelson B, Dart RC. A randomized, placebo-controlled trial to determine the course of aminotransferase elevation during prolonged acetaminophen administration. *BMC pharmacology & toxicology*. 2014;15:39.
26. Antoine DJ, Dear JW, Lewis PS, Platt V, Coyle J, Masson M, et al. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*. 2013;58(2):777-87.
27. McGill MR, Jaeschke H. Mechanistic biomarkers in acetaminophen-induced hepatotoxicity and acute liver failure: from preclinical models to patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(7):1005-17.
28. Kullak-Ublick GA, Andrade RJ, Merz M, End P, Benesic A, Gerbes AL, et al. Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment. *Gut*. 2017;66(6):1154-64.
29. Kumagai Y, Tanaka R, Song I, Sakamoto Y. Analysis of data from special drug use surveillance on elevation of liver function tests in Japanese patients administered high dose acetaminophen. *Jpn Clin Pharmacol Ther*. 2016;47(2):31-7 (in Japanese).
30. Yamada S, Yakabe K, Ishii J, Imaizumi H, Maruyama I. New high mobility group box 1 assay system. *Clin Chim Acta*. 2006;372(1-2):173-8.

31. FDA. Guidance for industry drug-induced liver injury: premarketing clinical evaluation. 2009.
32. The Pharmacogene Variation Consortium. [Accessed June 14, 2020] Available from: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2E1>.
33. Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DG, Antoine DJ, et al. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology*. 2011;54(5):1767-76.
34. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4402-7.
35. Thulin P, Nordahl G, Gry M, Yimer G, Aklillu E, Makonnen E, et al. Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34(3):367-78.
36. Singhal R, Harrill AH, Menguy-Vacheron F, Jayyosi Z, Benzerdjeb H, Watkins PB. Benign elevations in serum aminotransferases and biomarkers of hepatotoxicity in healthy volunteers treated with cholestyramine. *BMC pharmacology & toxicology*. 2014;15:42.
37. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP, McGill MR, Sharpe MR, et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *J Hepatol*. 2012;56(5):1070-9.
38. de Moraes SM, Uetrecht JP, Wells PG. Decreased glucuronidation and increased bioactivation of acetaminophen in Gilbert's syndrome. *Gastroenterology*. 1992;102(2):577-86.
39. Court MH, Duan SX, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Patten CJ, Miners JO, et al. Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(3):998-1006.
40. Navarro SL, Chen Y, Li L, Li SS, Chang JL, Schwarz Y, et al. UGT1A6 and UGT2B15 polymorphisms and acetaminophen conjugation in response to a randomized, controlled diet of select fruits and vegetables. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(9):1650-7.
41. Wagner KH, Shiels RG, Lang CA, Seyed Khoei N, Bulmer AC. Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(2):129-39.
42. Lankisch TO, Schulz C, Zwingers T, Erichsen TJ, Manns MP, Heinemann V, et al. Gilbert's Syndrome and irinotecan toxicity: combination with UDP-glucuronosyltransferase 1A7 variants increases risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(3):695-701.
43. Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr*. 2012;171(1):11-5.
44. Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem*. 1991;110(4):559-65.
45. Varela NM, Quinones LA, Orellana M, Poniachik J, Csendes A, Smok G, et al. Study of cytochrome P450 2E1 and its allele variants in liver injury of nondiabetic, nonalcoholic steatohepatitis obese women. *Biol Res*. 2008;41(1):81-92.



46. Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, et al. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem*. 2006;281(24):16768-76.
47. Eakins R, Walsh J, Randle L, Jenkins RE, Schuppe-Koistinen I, Rowe C, et al. Adaptation to acetaminophen exposure elicits major changes in expression and distribution of the hepatic proteome. *Sci Rep*. 2015;5:16423.
48. Michaut A, Moreau C, Robin MA, Fromenty B. Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34(7):e171-9.
49. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.
50. Amir M, Czaja MJ. Autophagy in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5(2):159-66.

## 10. 図表

Table 1. 被験者背景<sup>a</sup>

		Acetaminophen (n = 194)		Placebo (n = 37)		P <sup>b</sup>
Male		130 ( 67.0% )		24 ( 64.9% )		NA
Female		64 ( 33.0% )		13 ( 35.1% )		NA
Age	years	31 ( 25.0 - 41.0 )		29 ( 24.5 - 38.0 )		0.386
Weight	kg	61.2 ( 56.5 - 67.1 )		61.9 ( 56.4 - 69.0 )		0.443
Body mass index	kg/m2	21.7 ( 20.4 - 23.4 )		21.6 ( 20.7 - 23.3 )		0.879
Self-reported alcohol consumption	g/day	1.0 ( 0.0 - 4.0 )		1.0 ( 0.0 - 4.0 )		0.492
Total bilirubin, T-Bil (serum)	mg/dL	0.8 ( 0.7 - 1.1 )		0.9 ( 0.7 - 1.2 )		0.240
Direct bilirubin, D-Bil (serum)	mg/dL	0.2 ( 0.2 - 0.3 )		0.3 ( 0.2 - 0.3 )		0.546
Alanine transaminase, ALT (serum)	U/L	14.5 ( 11.0 - 22.0 )		13.0 ( 10.0 - 18.5 )		0.170
Aspartate transaminase, AST (serum)	U/L	17.0 ( 15.0 - 21.0 )		15.0 ( 14.0 - 19.0 )		0.118
Alkaline phosphatase, ALP (serum)	U/L	181 ( 153 - 222 )		173 ( 146 - 205 )		0.209
Lactate dehydrogenase, LDH (serum)	U/L	137 ( 127 - 151 )		128 ( 121 - 140 )		0.004
γ-glutamyl transpeptidase, GGTP (serum)	U/L	17.0 ( 13.0 - 25.0 )		17.0 ( 13.0 - 21.5 )		0.383
Leucine aminopeptidase, LAP (serum)	U/L	52.0 ( 47.0 - 55.0 )		50.0 ( 45.5 - 55.5 )		0.368
IL-1beta	pg/mL	15.0 ( 13.0 - 18.0 )		14.5 ( 13.3 - 16.8 )		0.850
IL-6	pg/mL	0.8 ( 0.6 - 1.1 )		0.8 ( 0.6 - 0.9 )		0.482
INF-gamma	pg/mL	0.2 ( 0.2 - 0.2 )		0.2 ( 0.2 - 0.2 )		0.274
TNF-alpha	pg/mL	0.8 ( 0.7 - 1.0 )		0.8 ( 0.7 - 1.0 )		0.728
C-reactive protein, CRP	mg/dL	0.04 ( 0.03 - 0.10 )		0.05 ( 0.04 - 0.08 )		0.499

IL = interleukin; INF-gamma = interferon gamma; TNF-alpha = tumor necrosis factor alpha; NA = not applicable;

<sup>a</sup> Data are number (%) or median (interquartile range: IQR ).

<sup>b</sup> Wilcoxon/ Kruskal-Wallis test

Table 2. Uridine-5'-diphospho-glucuronosyl transferase 1A1 遺伝子型の頻度

Genotype		All (n=231)		On acetaminophen ( n = 194)								<i>P</i> <sup>b</sup>	
				Susceptible group (n = 65)		Tolerant group (n = 129)		Odds ratio	95% CI		<i>P</i> <sup>a</sup>		
													n
wild-type	*1/*1	123	53.3%	30	46.2%	74	57.4%	0.64	0.35	-	1.16	0.139	0.030
heterozygote	*1/*28	28	39.4%	6	40.0%	16	38.8%	1.05	0.57	-	1.94	0.867	
	*1/*6	63		20		34							
homozygote or compound heterozygote	*28/*28	2		2		0							
	*6/*28	7	7.4%	2	13.9%	2	3.9%	3.99	1.23	-	12.44	0.011	
	*6/*6	8		5		3							

CI = Confidence interval

<sup>a</sup>Susceptible group vs. Tolerant group for wild-type or heterozygous or homozygous, tested by chi-squared test

<sup>b</sup>Susceptible group vs. Tolerant group among wild-type, heterozygous and homozygous, tested by chi-squared test



Table 3. Cytochrome P450 2E1 遺伝子型の頻度

genotype	All (n = 230) <sup>a</sup>		On acetaminophen (n = 193) <sup>a</sup>							
			Susceptible group						Tolerant group <sup>a</sup> (n = 128)	
			Adaptation (n = 30)		Continued mild susceptibility (n = 23)		High susceptibility- withdrawn (n = 12)			
	n	frequency	n	frequency	n	frequency	n	frequency	n	frequency
*1/*1	111	48.1%	16	53.3%	12	52.2%	4	33.3%	57	44.5%
*1/*5A	73	31.6%	10	33.3%	6	26.1%	8	66.7%	42	32.8%
*1/*5B	3	1.3%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	3	2.3%
*1/*6	26	11.3%	3	10.0%	4	17.4%	0	0.0%	16	12.5%
*5A/*5A	6	2.6%	0	0.0%	1	4.4%	0	0.0%	3	2.3%
*5A/*6	9	3.9%	1	3.3%	0	0.0%	0	0.0%	6	4.7%
*6/*6	2	0.9%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	1	0.8%

<sup>a</sup>The genotype of one subject in Tolerant group could not be determined

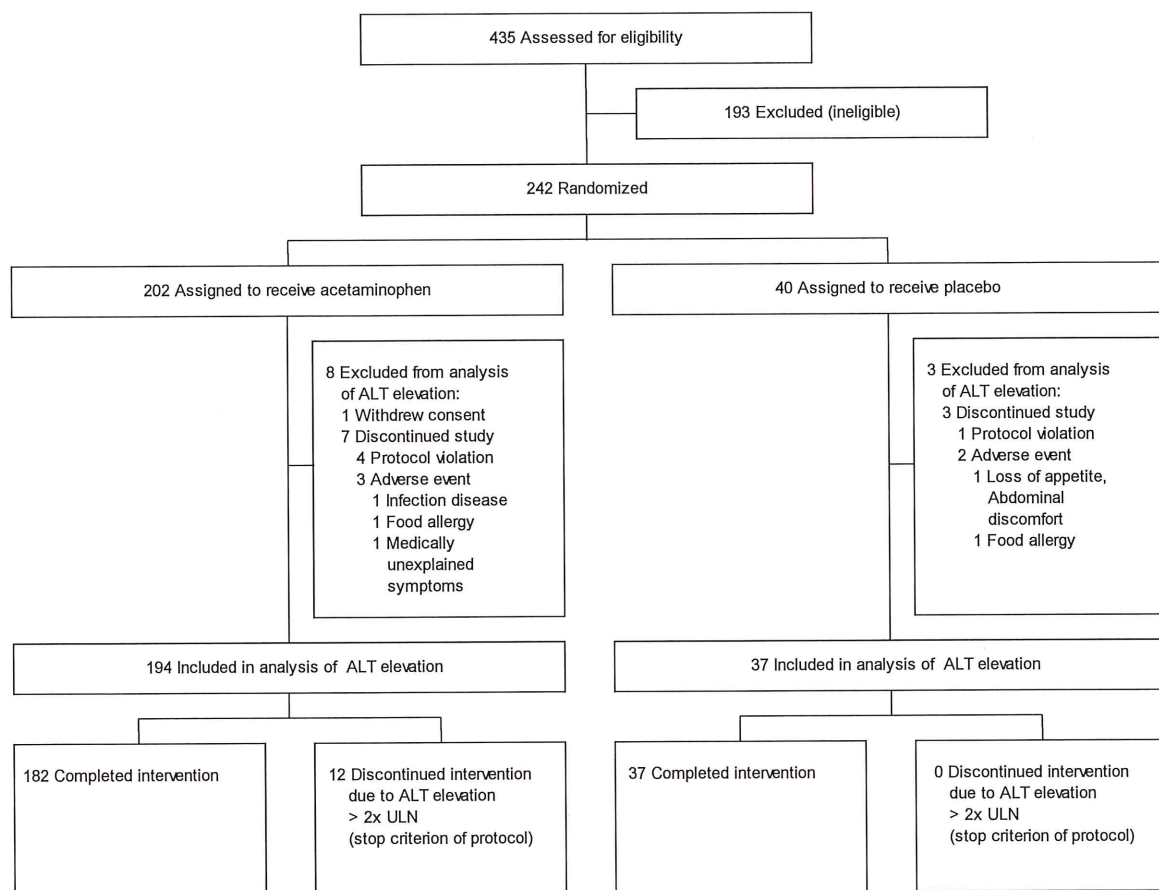
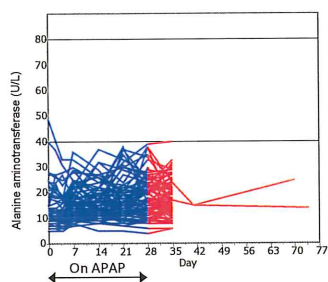


Figure 1. 被験者のフローチャート

ALT = alanine aminotransferase、ULN = upper limit of normal

### A. Tolerant group (n = 129)

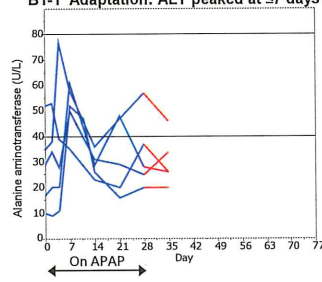


— During APAP administration  
— After APAP administration stopped

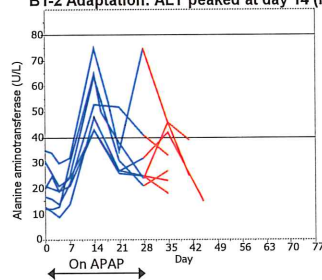
### B. Susceptible group (n = 65)

#### B1 Adaptation (n = 30)

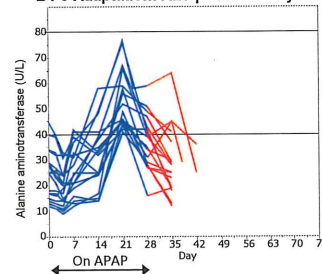
##### B1-1 Adaptation: ALT peaked at ≤7 days (n = 5)



##### B1-2 Adaptation: ALT peaked at day 14 (n = 7)

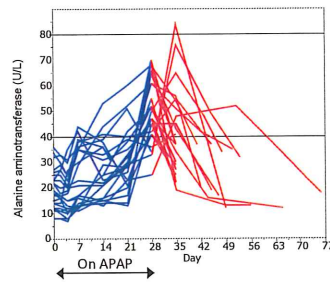


##### B1-3 Adaptation: ALT peaked at day 21 (n = 18)



#### B2 Continued mild susceptibility

##### : ALT peaked at ≥ 28 days (n = 23)



#### B3 High susceptibility-withdrawn (n = 12)

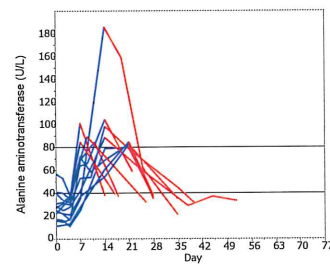


Figure 2. アセトアミノフェン(APAP) 投与群における試験期間中の血清 alanine aminotransferase (ALT) 値の推移

APAP 投与期間：1 日目～28 日目 (high susceptibility-withdrawn 症例を除く)



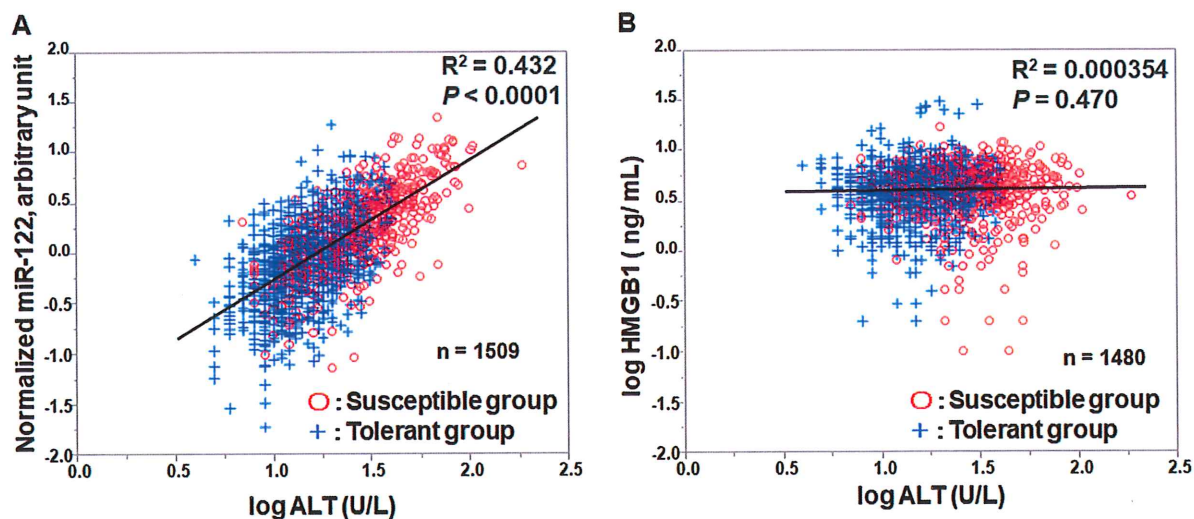


Figure 3. アセトアミノフェン投与例における血清 alanine aminotransferase (ALT) 値と他のバイオマーカーとの関連

A : 血清 ALT 値と microRNA-122 (miR-122) の関連

B : 血清 ALT 値と High Mobility Group Box1 (HMGB1) との関連

+ : tolerant group、○ : susceptible group

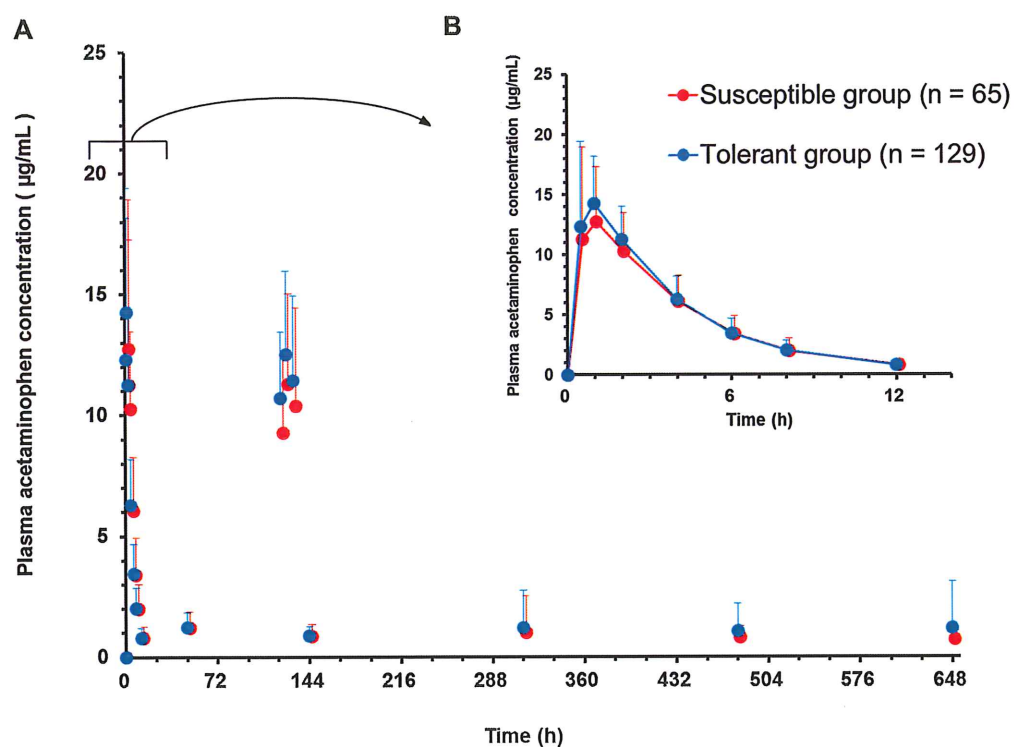
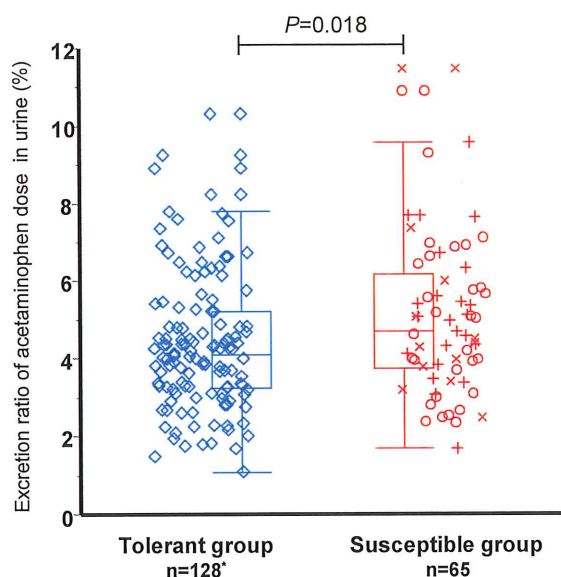


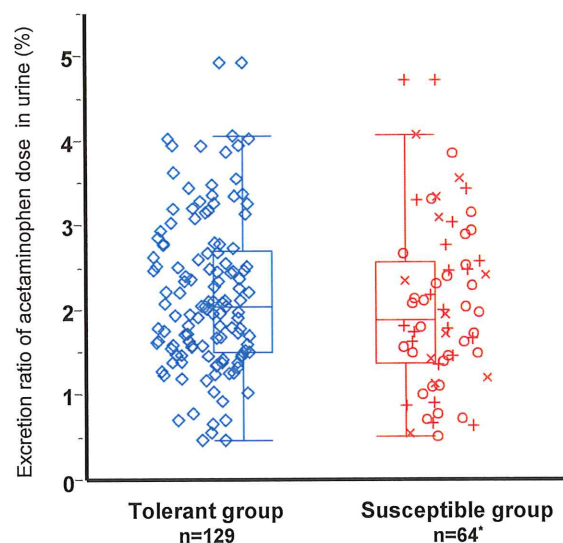
Figure 4. アセトアミノフェン投与例における血漿中アセトアミノフェン濃度の推移 (mean + SD)

A : 全試験期間の血漿中アセトアミノフェン濃度プロファイル (1日目 : アセトアミノフェン 1g 単回投与、2～28日目 : アセトアミノフェン 1回 1g、1日3回 反復投与  
 B : アセトアミノフェン 1g 単回経口投与した後の血漿中アセトアミノフェン未変化体濃度の推移 (0～12 時間)

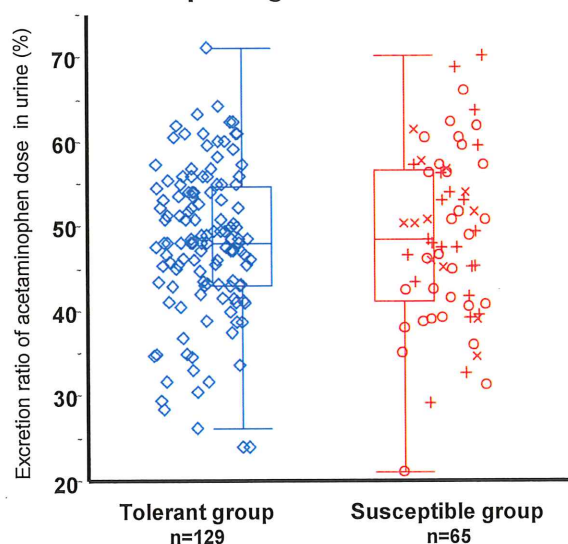
### A. Acetaminophen-mercapturate



### B. Acetaminophen-cysteine



### C. Acetaminophen-glucuronide



### D. Acetaminophen-sulfate

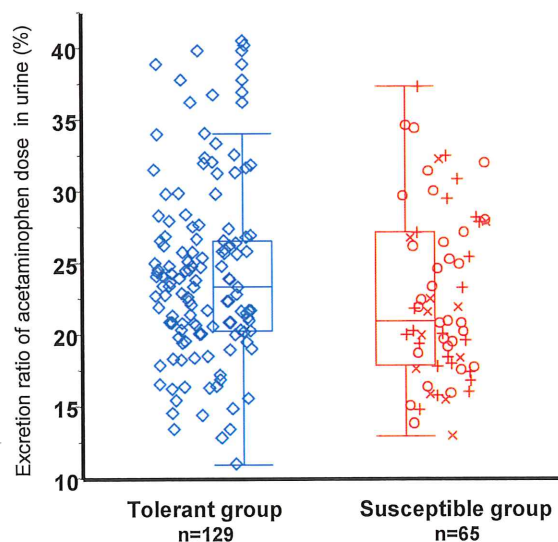
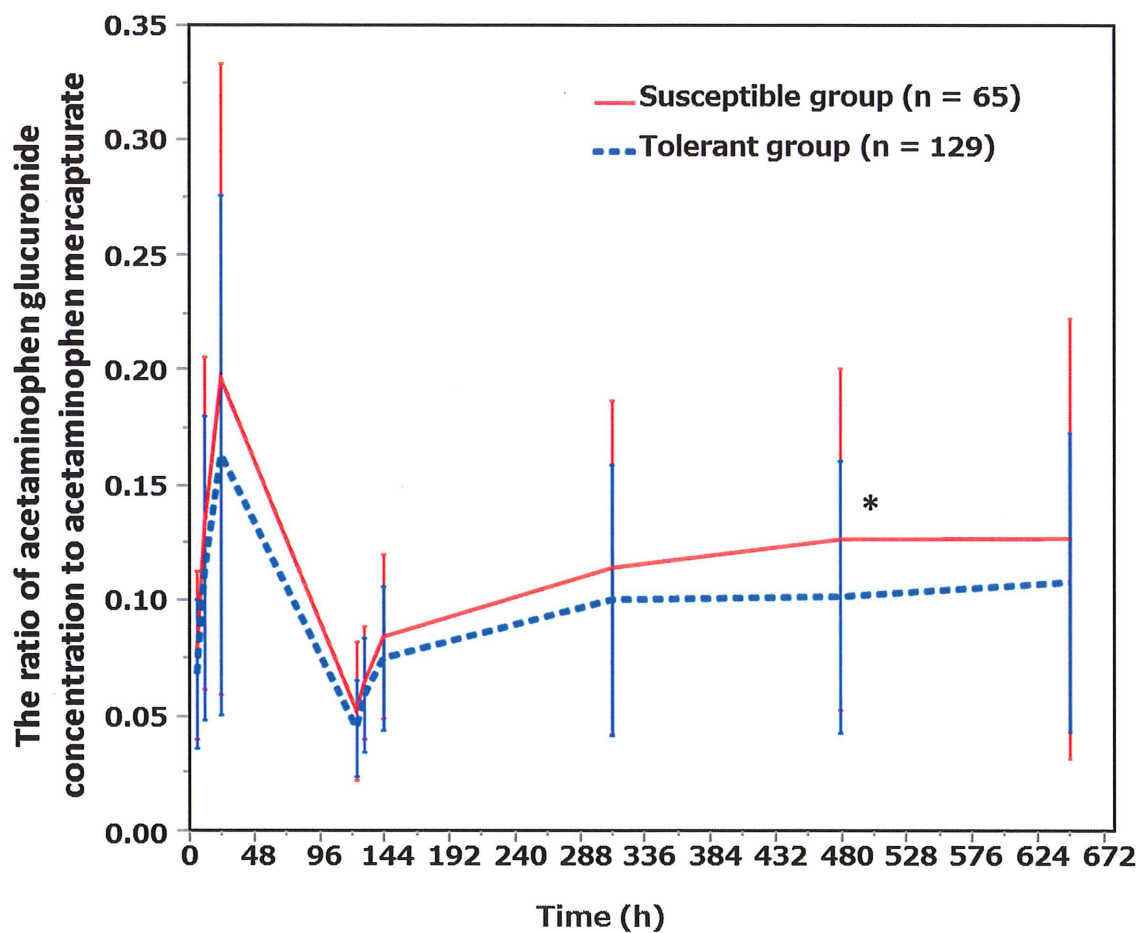


Figure 5. アセトアミノフェン 1g を単回経口投与した後のアセトアミノフェン代謝物の尿中排泄率

個別データ [ ◇: Tolerant, ×: high susceptibility-withdrawn, +: continued mild susceptibility, ○: adaptation ]

箱ひげ図 [ 箱下側: 第1四分位点 (25%)、箱上側: 第3四分位点 (75%)、箱中央の線: 中央値、箱下側のひげ: 第1四分位点 - 1.5 × 四分位範囲、箱上側のひげ: 第3四分位点 + 1.5 × 四分位範囲 ]

\*: 全測定点の値が定量下限値 ( $<10 \mu\text{g/mL}$ ) 以下であった 1 例については尿中排泄率を算出できなかった。



Supplementary Figure S1. アセトアミノフェン反復投与時の acetaminophen-gluclonide に対する acetaminophen -mercapturate の比 (mean±SD)

1 日目：アセトアミノフェン 1g 単回投与、2～28 日目：アセトアミノフェン 1g/回、1 日 3 回投与)。で示す。点線：tolerant group、実線：susceptible group

\*  $P=0.017$  ( tolerant group vs susceptible group、Wilcoxon/Kruskal-Wallis 検定)