

# 毒性発現における抱合反応の役割

—E2011 による肝毒性発現機序の解明—

2001 年

佐藤 玄





## 略号表

本論文で使用した主な略号について、以下に示した。

| 略号                    | 英名  | 和名                                  |
|-----------------------|---|-------------------------------------|
| 2-AA                  | 2-aminoanthracene                                   | 2-アミノアントラセン                         |
| 2-AAF                 | 2-acetylaminofluorene                               | 2-アセチルアミノフルオレン                      |
| 6-ABT                 | 6-aminobenzothiazole                                | 6-アミノベンゾチアゾール                       |
| Acetyl CoA            | acetyl coenzyme A                                   | アセチルコエンザイム A                        |
| APAP                  | acetaminophen                                       | アセトアミノフェン                           |
| APAP-Gluc             | acetaminophen glucuronide                           | アセトアミノフェングルクロン酸抱合体                  |
| APAP-Sulf             | acetaminophen sulfate                               | アセトアミノフェン硫酸抱合体                      |
| AS                    | arylsulfatase                                       | アリルスルファターゼ                          |
| AT                    | acetyltransferase                                   | アセチル転移酵素                            |
| CYP                   | cytochrome(s) P-450                                 | チトクロム P-450                         |
| DCNP                  | 2,6-dichloro-4-nitrophenol                          | 2,6-ジクロロ-4-ニトロフェノール                 |
| DTT                   | dithiothreitol                                      | ジチオスレイトール                           |
| ELISA                 | enzyme-linked immunosorbent assay                   | 酵素免疫測定法                             |
| FMO                   | flavin-containing monooxygenase                     | フラビン含有モノオキシゲナーゼ                     |
| $\beta$ -G            | $\beta$ -glucuronidase                              | $\beta$ -グルクロニダーゼ                   |
| GH                    | growth hormone                                      | 成長ホルモン                              |
| Glu-P-1               | 2-amino-6-methyl-dipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole   | 2-アミノ-6-メチルピリド[1,2-a:3',2'-d]イミダゾール |
| GSH                   | reduced glutathione                                 | 還元型グルタチオン                           |
| GST                   | glutathione S-transferase                           | グルタチオン転移酵素                          |
| GST-P                 | glutathione S-transferase placental form            | 胎盤型グルタチオン転移酵素                       |
| 9-HMA                 | 9-hydroxymethylanthracene                           | 9-ヒドロキシメチルアントラセン                    |
| IL                    | interleukin   | インターロイキン                            |
| MAO                   | monoamine oxidase                                   | モノアミン酸化酵素                           |
| MAO-A                 | monoamine oxidase type-A                            | モノアミン酸化酵素タイプ A                      |
| MC                    | methyl cellulose                                    | メチルセルロース                            |
| MEL                   | melatonin   | メラトニン                               |
| Ms                    | microsomes  | ミクロゾーム画分                            |
| MTN                   | N-acetyl-DL-methionine                              | N-アセチル-DL-メチオニン                     |
| MTZ                   | methimazole   | メチマゾール                              |
| NADPH                 | reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate | 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド               |
| $\alpha$ -NF          | $\alpha$ -naphthoflavone (7,8-benzoflavone)         | $\alpha$ -ナフトフラボン (7,8-ベンゾフラボン)     |
| PAPS                  | adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate            | アデノシン 3'-フォスフェート 5'-フォスフォサルフェート     |
| PCP                   | pentachlorophenol                                   | ペンタクロロフェノール                         |
| PMSF                  | phenylmethylsulfonyl fluoride                       | フェニルメチルスルフォニルフルオリド                  |
| S9                    | 9,000 g supernatant fraction                        | 9,000 g 上清画分                        |
| SDS                   | sodium dodecylsulfate                               | ドデシル硫酸ナトリウム                         |
| <i>S. typhimurium</i> | <i>Salmonella typhimurium</i>                       | ネズミチフス菌                             |
| ST                    | sulfotransferase                                    | 硫酸転移酵素                              |
| Trp-P-2               | 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole             | 3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド[4,3-b]インドール      |
| UDP-GT                | UDP-glucuronosyltransferase                         | UDP-グルクロン酸転移酵素                      |
| UDS                   | unscheduled DNA synthesis                           | 不定期 DNA 合成                          |

## 緒言

生体における化学物質の代謝反応の主なものには、第 I 相酵素による極性基の導入と、それに引き続き、第 II 相抱合酵素により代謝物の水溶性を高めて排泄しやすい形にする反応とがある。このうち前者の反応には、CYP による酸化・還元反応や、カルボキシルエステラーゼによる加水分解反応が含まれる。また後者の抱合反応として、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、アセチル抱合、グルタチオン抱合などがよく知られているが、そのほかにもアミノ酸抱合 (グリシン, タウリン, グルタミン酸などがカルボン酸と酸-アミドを形成する), リン酸抱合, S-メチル化反応などがある。

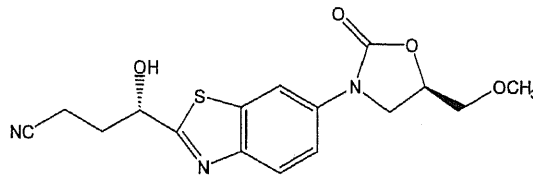
一般に代謝反応は解毒方向に作用するが、代謝反応による毒性の増強、すなわち代謝活性化 (metabolic activation; bioactivation) される事例がしばしば認められる。代謝活性化の例として、ベンツ[a]ピレンに代表される多環炭化水素の CYP によるジオールエポキシドへの活性化反応がよく知られている。この反応により、ベンツ[a]ピレンはがん原性を示す代謝物へと変換される (1)。毒性を示す代謝物は反応性に富んでおり、一般に反応性中間体 (reactive intermediate) と呼ばれている (2)。

第 I 相酵素のみならず、第 II 相酵素による代謝活性化の事例も古くから知られており、1960 年代後半から、2-AAF に代表される発がん性芳香族アミンの代謝活性化経路が報告されている (3,4)。その後、薬物代謝酵素の多様性が明らかにされるとともに、代謝活性化に関与する分子種に関する様々な知見が得られ、加熱食品やタバコ煙中に存在する発がん性化合物など、多くの化合物の代謝活性化に関与する分子種の同定が行われてきた (5)。

薬物代謝酵素の多様性に関する研究が進む一方で、動物実験等で得られた知見のヒトへの外挿や、ヒトにおけるリスク評価系の確立も試みられている (6-9)。薬物代謝酵素における性差や種差の存在は古くから知られており (10)、例えば、最もヒトに近い動物種と考えられるサルにおいても、CYP の関与する反応を含めてヒトと大きく開きがあり、酵素によっては 200 倍近く活性が異なる (11)。Trp-P-2 などある種のがん原性物質の代謝活性化を触媒する反応にも、著しく種差の存在することが認められている (12,13)。種差の存在は、化合物の安全性を評価する上でしばしば大きな問題となり、分子種レベルでの解釈が必要となる。すなわち、代謝活性化によりある動物種特異的に毒性が発現するようなケースでは、関与する薬物代謝酵素の種差の検討がヒトへの外挿において重要なポイントとなる。

ところで、エーザイ株式会社で近年開発された MAO 阻害剤である (5*R*)-3-[2-((1*S*)-3-cyano-1-hydroxypropyl)benzothiazol-6-yl]-5-methoxymethyl-2-oxazolidinone (E2011) は、次に示す構造の化合物であり、MAO-A に対して選択性が高く、より副作用の少ない抗うつ薬を目指して開発された (14)。MAO-A の選択的かつ可逆的な阻害剤では、初期の MAO 阻害薬で問題となった肝毒性や、三環系抗うつ薬で見られるような抗コリン作用をほとんど示さないことが想定される。実際、こうした懸念される副作用に関する検討の結果、E2011 は非

可逆的な MAO 阻害剤とは異なり，動物への連続投与によってもチラミン誘発の昇圧作用の危険性が増加することはなかった (15)。

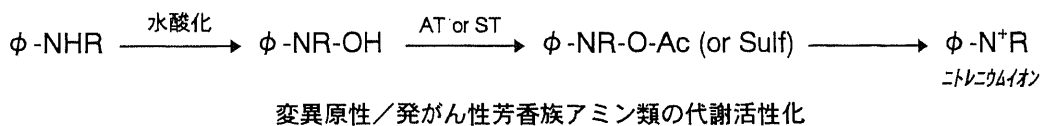


E2011 の化学構造

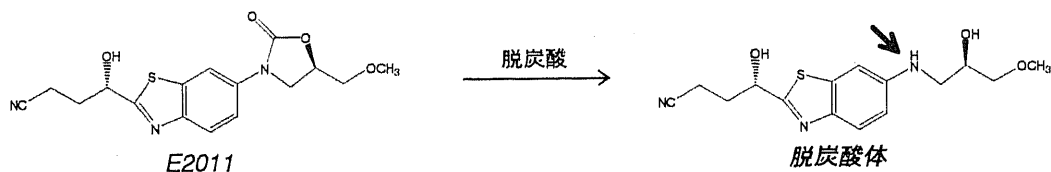
このように，E2011 は選択的 MAO-A 阻害作用による抗うつ作用が期待できる有用な薬剤と考えられ，1990 年代初めから臨床試験導入に向けて一連の非臨床試験が行われた。その開発段階において，ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験を実施したところ，100 mg/kg 投与群の肝に，GST-P 陽性小増殖巣 (変異細胞巣) の増加が認められた。小増殖巣は，形態学的特徴から規定される変異肝細胞の集塊であり，周囲組織への圧排性の増殖はないが，組織学的所見および組織化学的な染色性により，周囲の細胞とは明瞭に区別される。増殖した細胞は，正常の肝細胞と比較して大型のものも小型のものもあり，多形性を示す。一般的にこれらの小増殖巣は前がん病変と位置づけられており (16)，多くは可逆的と考えられているが，一部は肝細胞腺腫や肝細胞がんといった腫瘍性病変へと移行する。

一方，これまでに実施した一連の変異原性試験では，マウス白血病細胞由来の細胞株 (マウスリンフォーマ L5178Y 細胞) を用いた遺伝子突然変異試験の高用量で陽性を示すなど，一部疑わしい結果は認められたものの，ラット肝の UDS 試験で陰性であったことから，総合的に E2011 が生体においてイニシエーション活性を示す可能性はほとんどないものと判断した。しかしながら，ラットで認められた変異細胞巣は前がん性の病変であることから，この病変の解釈がヒトへの外挿およびリスク評価において重要であると考えられた。

ところで，変異原性あるいは発がん性を持つ芳香族アミン類は，通常 CYP あるいは FMO により *N*-水酸化体に代謝され，引き続き AT あるいは ST によりエステル化されて反応性に富むニトロニウムイオンが生成することが知られている (17-19)。



そこで，E2011 の化学構造に着目して，E2011 代謝物の一つである脱炭酸体 (芳香族アミン体) (20) が同様の機序で代謝活性化を受けて前述の肝毒性を引き起こされたという仮説を立て，実験的に証明を試みることにした。



E2011 の脱炭酸による芳香族アミン体の生成

本論文は、以下の 6 章から構成される。

まず第 1 章では、本研究を行うきっかけとなった、E2011 のラットにおける 13 週間反復投与による毒性について記載した。ここでは、E2011 の 30 および 100 mg/kg を雌雄ラットに投与した際にみられた一連の変化、特に肝の変異細胞巣について詳細に記述した。

第 2 章では、抱合酵素の関与する代謝経路を継続的に修飾 (阻害) した動物モデルの確立を試みた。最初に、硫酸抱合およびグルクロン酸抱合を受ける化合物の代表として、APAP をモデル化合物として選択し、APAP、APAP-Sulf および APAP-Gluc の HPLC を用いた分析条件を検討した。次に、ラットに抱合酵素阻害剤の併用下で APAP を 2 週間反復投与した場合の、APAP 代謝様式の変化について明らかにした。

次に第 3 章では、第 2 章で確立した動物モデルを利用して、抱合酵素の *in vivo* での阻害が E2011 の毒性発現に与える影響を検討した。その結果、E2011 による肝の変異細胞巣発現に AT が大きく関与している可能性が示唆された。

第 4 章では、第 3 章の結果を受けて、さらに *in vitro* で AT による E2011 の代謝活性化について詳細に検討した。本章では変異原性を指標として、E2011 による肝毒性への関与が示唆された脱炭酸体や、E2011 の母核構造である 6-ABT などの化合物について、*S. typhimurium* TA100 株とその AT 高発現株である YG1029 株を用いた Ames 試験を行い、構造と変異原性との関連性を探った。また、E2011 代謝物の性質を代表する化合物として、最もシンプルな構造を持つ 6-ABT を選択し、代謝活性化の各段階に対する特異的阻害剤を用いて代謝経路の検証を行った。

さらに第 5 章では、E2011 をラットに長期反復投与した際の肝臓の変化について記載した。第 1 章で記述した肝の変異細胞巣は、13 週から 52 週へと投与期間の延長に伴って大型化した。また、肝における血管肉腫の発現が認められたことから、E2011 は発がん作用を持つことが示された。

最後に第 6 章では、E2011 投与によって認められた CYP 発現調節作用について記載した。ここでは、E2011 の薬理作用 (MAO-A 阻害) に基づく現象と考えられる血中 MEL レベルの変動と、CYP 発現レベルの変動との関係について考察した。

## 第1章 E2011 をラットに 13 週間反復投与した際の毒性学的変化

E2011 は、うつ病の病態に関連が深いと考えられる MAO-A に対して選択性が高く、より副作用の少ない第三世代の選択的・可逆的 MAO 阻害薬を目指して作られた化合物であり、*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* のいずれにおいても強力な MAO-A 阻害活性を示す (15)。

本章では、E2011 のラットにおける毒性学的プロファイルを把握する目的で、雌雄ラットに E2011 の 30 あるいは 100 mg/kg を 13 週間にわたって経口反復投与した結果について記述した。

### 第1節 E2011 のラットにおける 13 週間反復投与毒性試験

#### 実験方法

##### 化合物

E2011 はエーザイ化学株式会社（現、エーザイ株式会社、鹿島事業所）にて合成した。HPLC 法における純度は 99.4 %であった。

##### 動物

4 週齢の雌雄 SD ラットを日本エスエルシー株式会社より導入し、2 週間の檢疫期間および 1 週間の馴化期間の後、体重による層別化法で群分けを行い、7 週齢で実験に使用した。

動物は、ステンレス製ケージ (W305×D425×H200 mm) に 1 ケージ当たり最大 5 匹収容して、温度 22±2℃、湿度 55±5%、照明時間 7:00~19:00、換気回数 1 時間当たり 10 回以上に設定した動物室で飼育した。飼料はオリエンタル酵母工業株式会社製固型飼料 MF<sup>TM</sup> を、飲水は、井水を次亜塩素酸ソーダで殺菌後、紫外線照射し自動給水装置にて、いずれも自由に摂取させた。

##### 試験デザイン

雌雄いずれも 36 匹のラットを 12 匹ずつ 3 群に分け、対照群と E2011 投与群を 2 群、30 および 100 mg/kg 群を設定した。E2011 は 0.5% MC 水溶液を用いて、5 mL/kg の投与容量となるように、0.6 および 2%懸濁液を調製した。この投与検体を、動物に 1 日 1 回、13 週間にわたり毎日、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群には、媒体である 0.5% MC 水溶液のみを投与した。

##### 観察、測定および検査

投与開始日を 1 日目と起算し、以下の観察、測定および検査を実施した。



### (1) 一般観察

動物の一般状態について、投与期間を通じて毎日観察した。体重は、投与開始 6 日前と 1, 2, 4 日目、およびその後週 1 回測定した。摂餌量は、1, 2, 4 日目およびその後週 1 回、ケージ単位で摂餌量を測定し、一匹当たりの値を算出した。

### (2) 臨床検査

投与期間終了後、動物を一昼夜絶食した後、ペントバルビタール麻酔下で採血して血液学的検査および血液生化学的検査を行った。血液学的検査では、抗凝固剤として EDTA を使用して得られた血液について、多項目自動血球計数装置 Sysmex E-3000 (東亜医用電子(株))を用いて、白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン濃度 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、網赤血球数 (reticulocyte) および血小板数 (PLT) を測定した。血液生化学的検査では、抗凝固剤としてヘパリンを処理して冷却遠心により分離して得られた血漿について、自動分析装置 736-40 形 (株日立製作所) を用いて、アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT; GPT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST; GOT)、クレアチニンキナーゼ (CK)、総タンパク (TP)、尿素窒素 (UN)、クレアチニン (CRNN)、グルコース (GLU)、総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL)、トリグリセリド (TG)、無機リン (IP)、Ca、Na、K および Cl を測定した。

また、最終投与後、動物を個別に代謝ケージに収容して 22 時間採尿を行い、尿量、浸透圧、CRNN、Na、K、Cl を測定した。

### (3) 剖検および病理組織学的観察

最終投与後、動物を一昼夜絶食した後、剖検を行い、諸臓器組織を肉眼的に観察した。

肝、腎、脾、心、肺、脳、下垂体、甲状腺 (上皮小体を含む)、副腎、胸腺、顎下腺 (舌下腺を含む)、精巣、卵巣について、重量を測定した。

上述の臓器およびハーダー腺については、肉眼観察後、10%中性緩衝ホルマリン液中で固定して、常法に従ってパラフィン包埋した後、光顕観察用のヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を施した組織標本を作成して、病理組織学的検査を行った。さらに肝について、透過型電子顕微鏡による観察も併せて行った。

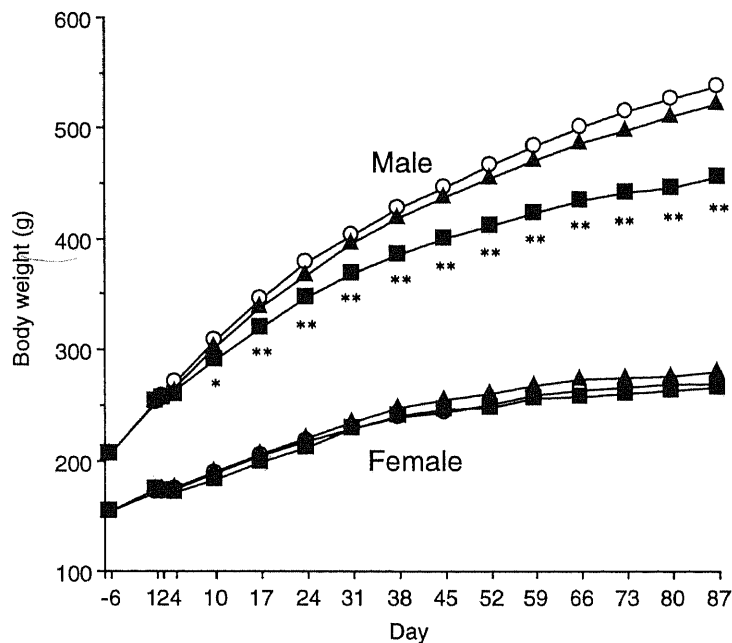
光顕による観察の結果 (後述)、肝に前腫瘍病変を示唆する所見が認められたことから、ウサギ抗ラット GST-P 抗体を用いてアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法による免疫染色を実施した。3 個以上の細胞からなる GST-P 免疫染色陽性の細胞を GST-P 陽性小増殖巣と定義し、それらの数および面積を多目的画像解析装置 (SPICCA, Nippon Avionics 社) を用いて測定した。

## 結果

## 一般観察

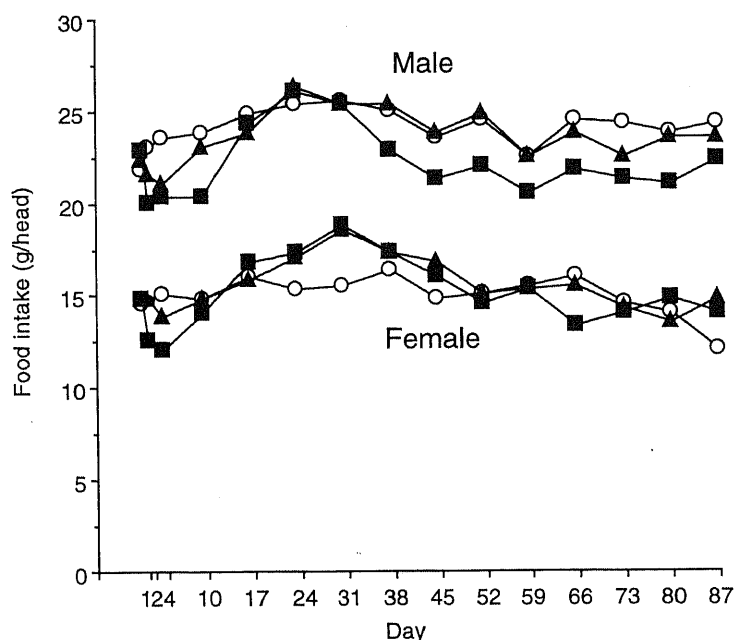
投与期間を通じて、死亡は認められなかった。E2011 の 30 および 100 mg/kg の投与により、雌雄いずれも数例で流産が認められた。投与前にも流産を示す個体が認められたことから、検体の苦味に対する条件反射的なものと考えられ、毒性ではないと判断した。

Fig. 1-1 に示すように、雄の 100 mg/kg 投与群では 10 日目以降に有意な体重増加抑制が認められた。雄の 30 mg/kg 群および雌では、E2011 投与による体重への影響は認められなかった。



**Fig. 1-1.** Body weight of male and female rats treated with E2011 at doses of 30 (▲) and 100 (■) mg/kg once a day for 13 weeks (87 days). Control animals (○) received vehicle. The statistical significance of difference in mean values between control and treated groups was shown by \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ), respectively (Dunnett's test).

摂餌量の推移について、Fig. 1-2 に示した。雄の 100 mg/kg 群では、投与開始の初期と 38 日目以降に 20% 以下の摂餌量の低下が認められた。雄の 30 mg/kg 群および雌の 100 mg/kg 群では一過性の軽度な摂餌量の低下が認められたのみであった。



**Fig. 1-2.** Daily food intake of male and female rats treated with E2011 at doses of 30 (▲) and 100 (■) mg/kg once a day for 13 weeks (87 days). Control animals (○) received vehicle.

### 臨床検査

血液学的検査の結果を、Table 1-1 にまとめた。E2011 投与に起因すると考えられる変化として、100 mg/kg 群の雄で RBC, HB および Ht の減少と PLT の増加が、雌で WBC および reticulocyte の増加が認められた。これらの変化の生じた機序は不明であったが、いずれも比較的軽度な変化であると考えられた。

**Table 1-1.** Hematology of rats at the end of 13-week repeated dose of E2011.

| Groups (Dose)<br>No. of animals | Male           |                             |                               | Female        |                |                             |
|---------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|-----------------------------|
|                                 | Control<br>12  | 30 mg/kg<br>12              | 100 mg/kg<br>12               | Control<br>12 | 30 mg/kg<br>12 | 100 mg/kg<br>12             |
| WBC $10^2/\mu\text{L}$          | 51.5 ± 10.4    | 57.7 ± 12.4                 | 60.3 ± 13.3                   | 33.1 ± 6.9    | 47.4 ± 43.1    | 50.6 ± 13.7** <sup>b</sup>  |
| RBC $10^4/\mu\text{L}$          | 931.8 ± 47.2   | 931.1 ± 51.2                | 887.1 ± 41.0** <sup>a</sup>   | 818.8 ± 29.6  | 823.3 ± 40.7   | 805.3 ± 30.8                |
| Hb g/dL                         | 15.43 ± 0.54   | 15.80 ± 0.43                | 14.68 ± 0.61** <sup>a</sup>   | 14.82 ± 0.59  | 14.98 ± 0.46   | 14.48 ± 0.50                |
| Ht %                            | 46.73 ± 1.44   | 47.23 ± 1.41                | 44.36 ± 1.75** <sup>a</sup>   | 44.13 ± 1.44  | 44.14 ± 1.13   | 42.89 ± 1.29** <sup>a</sup> |
| MCH pg                          | 16.60 ± 0.69   | 17.00 ± 0.63                | 16.56 ± 0.50                  | 18.08 ± 0.61  | 18.22 ± 0.57   | 17.99 ± 0.38                |
| MCV fL                          | 50.22 ± 1.75   | 50.81 ± 1.76                | 50.03 ± 1.14                  | 53.91 ± 1.21  | 53.68 ± 1.64   | 53.28 ± 0.98                |
| MCHC %                          | 33.01 ± 0.33   | 33.47 ± 0.32** <sup>a</sup> | 33.08 ± 0.45                  | 33.58 ± 0.58  | 33.95 ± 0.58   | 33.77 ± 0.40                |
| Reticulocyte %                  | 1.53 ± 0.60    | 1.41 ± 0.38                 | 1.64 ± 0.62                   | 1.08 ± 0.26   | 1.18 ± 0.28    | 1.46 ± 0.49** <sup>a</sup>  |
| PLT $10^4/\mu\text{L}$          | 100.42 ± 11.66 | 107.18 ± 9.59               | 125.58 ± 13.93** <sup>a</sup> | 95.82 ± 10.86 | 103.62 ± 19.91 | 106.16 ± 15.21              |

Data are mean ± S.D. values. Significantly different from Control \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ) by Dunnett (a) and Dunnett-Ranking (b).

次に、血液生化学的検査の結果を Table 1-2 に示した。雌の 100 mg/kg で ALP の増加が認められた。肝毒性に関連して、E2011 投与により ALT や AST の増加は認められなかったが、一方、これらのパラメータの減少が認められた。その他、雄の 100 mg/kg 群で TP および GLU の軽度の減少が、雄の 30, 100 mg/kg および雌の 100 mg/kg 群で T-Cho, PL および TG の減少が認められた。また、雌雄の 100 mg/kg 群で Na, Cl は変動しなかったが、K の増加が認められた。

**Table 1-2.** Blood chemistry of rats at the end of 13-week repeated dose of E2011.

| Groups (Dose)<br>No. of animals | Male          |                           |                             | Female        |                           |                             |
|---------------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------|
|                                 | Control<br>12 | 30 mg/kg<br>12            | 100 mg/kg<br>12             | Control<br>12 | 30 mg/kg<br>12            | 100 mg/kg<br>12             |
| ALP mU/mL                       | 205.3 ± 35.4  | 170.7 ± 32.6              | 221.3 ± 72.0                | 117.3 ± 28.0  | 100.4 ± 37.6              | 210.9 ± 73.0** <sup>b</sup> |
| ALT mU/mL                       | 37.4 ± 14.3   | 25.0 ± 4.9** <sup>b</sup> | 21.7 ± 3.5** <sup>b</sup>   | 27.6 ± 7.4    | 20.1 ± 5.8** <sup>b</sup> | 19.9 ± 1.7** <sup>b</sup>   |
| AST mU/mL                       | 66.5 ± 13.5   | 57.4 ± 6.4* <sup>b</sup>  | 56.1 ± 4.7** <sup>b</sup>   | 56.2 ± 7.3    | 52.4 ± 11.8               | 54.3 ± 5.5                  |
| CK mU/mL                        | 163.6 ± 65.4  | 127.7 ± 58.0              | 101.7 ± 21.2** <sup>b</sup> | 86.3 ± 22.6   | 90.2 ± 35.8               | 100.7 ± 35.8                |
| TP g/dL                         | 6.54 ± 0.18   | 6.38 ± 0.25               | 6.23 ± 0.27** <sup>a</sup>  | 6.58 ± 0.40   | 6.28 ± 1.16               | 6.33 ± 0.26                 |
| UN mg/dL                        | 14.83 ± 1.77  | 14.93 ± 1.72              | 15.78 ± 2.43                | 16.98 ± 1.63  | 17.44 ± 1.71              | 17.43 ± 2.37                |
| CRNN mg/dL                      | 0.328 ± 0.028 | 0.332 ± 0.041             | 0.330 ± 0.074               | 0.378 ± 0.058 | 0.352 ± 0.039             | 0.361 ± 0.078               |
| GLU mg/dL                       | 149.3 ± 9.7   | 143.3 ± 10.8              | 135.3 ± 17.3** <sup>a</sup> | 139.0 ± 13.5  | 146.8 ± 18.0              | 138.9 ± 9.5                 |
| T-Cho mg/dL                     | 50.3 ± 6.9    | 39.5 ± 8.2** <sup>b</sup> | 33.5 ± 3.7** <sup>b</sup>   | 67.3 ± 12.5   | 59.5 ± 12.2               | 52.7 ± 6.5** <sup>a</sup>   |
| PL mg/dL                        | 94.3 ± 6.4    | 79.3 ± 7.8** <sup>a</sup> | 75.3 ± 5.9** <sup>a</sup>   | 131.1 ± 21.7  | 116.2 ± 20.8              | 101.0 ± 11.2** <sup>a</sup> |
| TG mg/dL                        | 64.6 ± 13.7   | 45.5 ± 15.0* <sup>b</sup> | 19.7 ± 6.8** <sup>b</sup>   | 21.3 ± 8.8    | 32.8 ± 50.9               | 12.5 ± 3.6** <sup>b</sup>   |
| IP mg/dL                        | 5.40 ± 0.59   | 5.33 ± 0.43               | 5.74 ± 0.64                 | 4.93 ± 0.91   | 4.76 ± 1.11               | 5.62 ± 0.71                 |
| Ca mg/dL                        | 10.20 ± 0.24  | 10.10 ± 0.26              | 10.11 ± 0.23                | 9.98 ± 0.31   | 9.92 ± 0.55               | 10.02 ± 0.19                |
| Na mEq/L                        | 143.0 ± 1.0   | 142.2 ± 1.5               | 141.7 ± 1.3                 | 141.9 ± 1.7   | 140.9 ± 1.5               | 140.6 ± 1.4                 |
| K mEq/L                         | 3.73 ± 0.29   | 3.87 ± 0.24               | 4.03 ± 0.21** <sup>a</sup>  | 3.92 ± 0.29   | 3.87 ± 0.33               | 4.28 ± 0.45** <sup>a</sup>  |
| Cl mEq/L                        | 107.2 ± 0.8   | 107.0 ± 1.5               | 108.6 ± 1.6** <sup>a</sup>  | 108.7 ± 2.2   | 108.2 ± 1.9               | 109.3 ± 1.7                 |

Data are mean ± S.D. values. Significantly different from Control \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ) by Dunnett (a) and Dunnett-Ranking (b).

尿検査では、尿量、浸透圧、CRNN、Na、K、Cl を測定したが、いずれの項目においても E2011 投与による変動は認められなかった。

#### 剖検時肉眼所見および臓器重量

剖検時の肉眼所見では、雌の 100 mg/kg 群の 1 例でハーダー腺の萎縮が認められた以外には、何ら異常は認められなかった。

臓器重量を Table 1-3 に示した。肝および腎重量の増加が雌の 100 mg/kg 群で顕著に認められた。雄の 100 mg/kg 群においても、相対重量で比較した場合これらの臓器重量の増加が認められた。また、甲状腺の絶対および相対重量の低下が雄の 30 および 100 mg/kg 群で、副腎の絶対および相対重量の低下が雌の 100 mg/kg 群で認められた。その他、脾、心、肺、下垂体、副腎、顎下腺および精巣の絶対重量が雄の 30 ないしは 100 mg/kg で変化したが、いずれも体重の変化を反映した二次的な変動であると考えられた。

Table 1-3. Absolute and relative organ weights of rats at the end of 13-week repeated dose of E2011.

| Groups (Dose)<br>No. of animals |                   | Male          |                             |                             | Female        |                |                            |
|---------------------------------|-------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|----------------|----------------------------|
|                                 |                   | Control<br>12 | 30 mg/kg<br>12              | 100 mg/kg<br>12             | Control<br>12 | 30 mg/kg<br>12 | 100 mg/kg<br>12            |
| Body weight                     | g                 | 515.7 ± 43.4  | 497.6 ± 35.3                | 429.5 ± 30.4** <sup>a</sup> | 255.8 ± 15.0  | 262.8 ± 28.4   | 246.5 ± 13.5               |
| Liver                           | g                 | 13.47 ± 1.59  | 12.76 ± 1.30                | 12.84 ± 1.07                | 6.15 ± 0.64   | 6.69 ± 1.12    | 7.93 ± 0.63** <sup>a</sup> |
|                                 | g/100 g body wt.  | 2.61 ± 0.13   | 2.56 ± 0.12                 | 2.99 ± 0.21** <sup>a</sup>  | 2.40 ± 0.17   | 2.54 ± 0.27    | 3.22 ± 0.21** <sup>a</sup> |
| Kidneys                         | g                 | 2.87 ± 0.32   | 2.75 ± 0.31                 | 2.59 ± 0.26                 | 1.48 ± 0.10   | 1.48 ± 0.15    | 1.59 ± 0.09 <sup>a</sup>   |
|                                 | g/100 g body wt.  | 0.56 ± 0.03   | 0.55 ± 0.04                 | 0.60 ± 0.05** <sup>a</sup>  | 0.58 ± 0.03   | 0.56 ± 0.05    | 0.65 ± 0.03** <sup>a</sup> |
| Spleen                          | mg                | 922.4 ± 133.5 | 832.7 ± 95.6** <sup>a</sup> | 753.4 ± 81.1** <sup>a</sup> | 508.1 ± 60.6  | 512.9 ± 59.6   | 488.9 ± 57.9               |
|                                 | mg/100 g body wt. | 178.3 ± 14.0  | 167.2 ± 13.1                | 175.9 ± 19.6                | 198.4 ± 18.4  | 195.4 ± 16.6   | 198.5 ± 22.1               |
| Heart                           | g                 | 1.43 ± 0.11   | 1.34 ± 0.08** <sup>a</sup>  | 1.26 ± 0.06** <sup>a</sup>  | 0.82 ± 0.07   | 0.82 ± 0.09    | 0.78 ± 0.05                |
|                                 | g/100 g body wt.  | 0.28 ± 0.02   | 0.27 ± 0.02                 | 0.29 ± 0.01 <sup>a</sup>    | 0.32 ± 0.02   | 0.31 ± 0.03    | 0.32 ± 0.02                |
| Lung                            | g                 | 1.54 ± 0.12   | 1.47 ± 0.10                 | 1.43 ± 0.07** <sup>a</sup>  | 1.05 ± 0.09   | 1.06 ± 0.08    | 1.05 ± 0.06                |
|                                 | g/100 g body wt.  | 0.30 ± 0.02   | 0.30 ± 0.02                 | 0.33 ± 0.02** <sup>a</sup>  | 0.41 ± 0.02   | 0.41 ± 0.03    | 0.43 ± 0.01 <sup>ab</sup>  |
| Brain                           | g                 | 2.19 ± 0.06   | 2.17 ± 0.07                 | 2.13 ± 0.06                 | 1.98 ± 0.06   | 2.02 ± 0.06    | 1.96 ± 0.07                |
|                                 | g/100 g body wt.  | 0.43 ± 0.03   | 0.44 ± 0.03                 | 0.50 ± 0.03** <sup>a</sup>  | 0.78 ± 0.05   | 0.78 ± 0.07    | 0.80 ± 0.05                |
| Pituitary                       | mg                | 10.2 ± 1.3    | 7.9 ± 1.8** <sup>a</sup>    | 7.8 ± 1.9** <sup>a</sup>    | 13.3 ± 3.9    | 11.7 ± 1.7     | 10.7 ± 2.8                 |
|                                 | mg/100 g body wt. | 2.0 ± 0.0     | 1.6 ± 0.5 <sup>ab</sup>     | 1.7 ± 0.5                   | 5.2 ± 1.5     | 4.6 ± 1.0      | 4.3 ± 1.1                  |
| Thyroids                        | mg                | 22.4 ± 4.9    | 15.7 ± 3.3** <sup>a</sup>   | 14.4 ± 4.1** <sup>a</sup>   | 12.0 ± 2.1    | 13.4 ± 2.6     | 12.8 ± 4.1                 |
|                                 | mg/100 g body wt. | 4.3 ± 1.0     | 3.1 ± 0.7** <sup>a</sup>    | 3.4 ± 1.2 <sup>a</sup>      | 4.7 ± 0.7     | 5.0 ± 1.0      | 5.2 ± 1.5                  |
| Adrenals                        | mg                | 62.3 ± 8.7    | 55.6 ± 7.6 <sup>a</sup>     | 52.3 ± 7.7** <sup>a</sup>   | 67.3 ± 12.5   | 60.5 ± 8.4     | 49.9 ± 11.5** <sup>a</sup> |
|                                 | mg/100 g body wt. | 12.1 ± 1.6    | 11.2 ± 1.1                  | 12.2 ± 1.8                  | 26.3 ± 4.7    | 23.3 ± 3.9     | 20.1 ± 4.2** <sup>a</sup>  |
| Thymus                          | mg                | 344.7 ± 60.1  | 321.0 ± 90.2                | 302.1 ± 31.0                | 250.8 ± 37.4  | 258.7 ± 49.9   | 265.3 ± 52.8               |
|                                 | mg/100 g body wt. | 66.8 ± 9.4    | 64.4 ± 17.4                 | 70.6 ± 8.6                  | 98.0 ± 12.6   | 98.2 ± 13.0    | 107.3 ± 18.8               |
| Submaxillary gland              | mg                | 708.3 ± 73.1  | 750.7 ± 65.7                | 618.5 ± 54.8** <sup>a</sup> | 458.6 ± 54.2  | 440.0 ± 51.6   | 416.8 ± 49.6               |
|                                 | mg/100 g body wt. | 137.5 ± 11.1  | 151.1 ± 10.4** <sup>a</sup> | 144.1 ± 8.0                 | 179.0 ± 15.6  | 168.0 ± 17.3   | 169.1 ± 17.4               |
| Testes                          | g                 | 3.52 ± 0.20   | 3.50 ± 0.16                 | 3.34 ± 0.18 <sup>a</sup>    |               |                |                            |
|                                 | g/100 g body wt.  | 0.69 ± 0.06   | 0.71 ± 0.05                 | 0.78 ± 0.07** <sup>a</sup>  |               |                |                            |
| Ovaries                         | mg                |               |                             |                             | 70 ± 12       | 80 ± 13        | 69 ± 15                    |
|                                 | mg/100 g body wt. |               |                             |                             | 27.5 ± 4.6    | 30.8 ± 6.4     | 27.8 ± 5.5                 |

Data are mean ± S.D. values. Significantly different from Control \*(p<0.05), \*\*(p<0.01) by Dunnett (a) and Dunnett-Ranking (b).

### 病理組織学的所見

病理組織学的検査の結果を、Table 1-4 に示した。E2011 投与に起因した変化は、肝およびハーダー腺に認められた。肝では、光顕的に、100 mg/kg 群の雌雄でび漫性に細胞の核肥大が観察された (Photo 1-1A および 1-1B)。これらの核肥大の認められた細胞では、大小不同とともに細胞核および核小体の大型化が特徴的であった。また、100 mg/kg 群では細胞内にコレステリン様針状結晶も認められた。電顕による観察の結果 (Photo 1-2)、これらの肥大した核では辺縁部のヘテロクロマチンは減少とユークロマチンの増加が特徴的であり、明瞭な核小体を伴い著明な肥大が認められた。また、ほとんどの肝細胞核において核小体辺縁化 (nucleolar margination) が認められるなど、超微形態学的に増殖活性の亢進あるいはタンパク合成能の亢進を示唆する変化が確認された。

**Table 1-4.** Summary of histopathology of rats at the end of 13-week repeated dose of E2011.

| Organs<br>Findings              | Groups (Dose)<br>Grade | Male    |   |          |   |           |    | Female  |   |          |   |           |   |
|---------------------------------|------------------------|---------|---|----------|---|-----------|----|---------|---|----------|---|-----------|---|
|                                 |                        | Control |   | 30 mg/kg |   | 100 mg/kg |    | Control |   | 30 mg/kg |   | 100 mg/kg |   |
|                                 |                        | -       | + | -        | + | -         | +  | -       | + | -        | + | -         | + |
| <b>Liver</b>                    |                        |         |   |          |   |           |    |         |   |          |   |           |   |
| Crystalline rods in hepatocytes |                        | 12      | 0 | 12       | 0 | 9         | 3  | 12      | 0 | 12       | 0 | 11        | 1 |
| Cell aggregation <sup>a</sup>   |                        | 12      | 0 | 12       | 0 | 10        | 2  | 12      | 0 | 12       | 0 | 12        | 0 |
| Enlarged nucleus of hepatocytes |                        | 12      | 0 | 12       | 0 | 2         | 10 | 12      | 0 | 12       | 0 | 3         | 9 |
| Altered cell foci               |                        | 12      | 0 | 12       | 0 | 12        | 0  | 11      | 1 | 12       | 0 | 10        | 2 |
| <b>Harderian glands</b>         |                        |         |   |          |   |           |    |         |   |          |   |           |   |
| Acinar atrophy                  |                        | 12      | 0 | 12       | 0 | 0         | 12 | 12      | 0 | 12       | 0 | 6         | 6 |

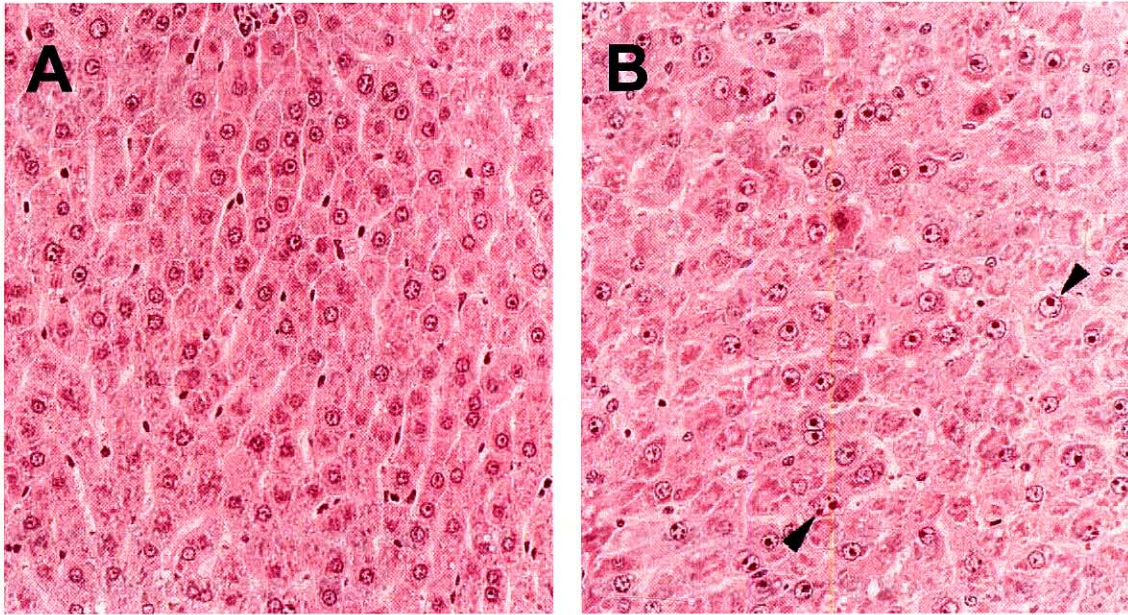
Note: -, negative, +; positive.

a: with crystalline rods, sinusoidal.

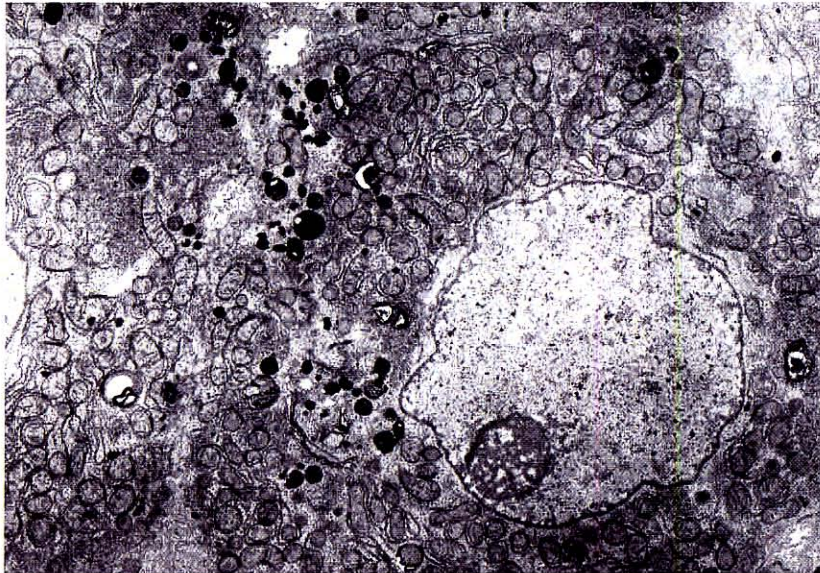
その他、100 mg/kg の雄 2 例と対照群の雄 1 例では小増殖巣が認められた。この小増殖巣は H&E 染色による観察の結果、いずれも好酸性であった。肝に認められた小増殖巣は前がん病変と位置づけられており、また一般に本週齢における増殖巣の発現頻度はきわめて低いことから、抗 GST-P 抗体を用いた免疫染色を行った。Photo 1-1A および 1-1B (連続切片) に示されるように、H&E 染色で認められた肝小増殖巣はすべて GST-P 陽性であったが、H&E 染色では明らかでなかった GST-P 陽性巣も多数認められた。GST-P 陽性小増殖巣の個別データおよび群平均を Fig. 1-3 に示した。この変異細胞巣は、雄では E2011 投与群と対照群に差はなかったが、雌の 100 mg/kg 群で対照群に比べて数および面積のいずれにおいても増加していた。

ハーダー腺では、100 mg/kg 群の雌雄で腺房の萎縮が認められた (Photo 1-4A~1-4C)。この病変は、腺房細胞の細胞質の空胞の減少、上皮細胞の扁平化、腺房上皮の剥離および単細胞壊死の増加などによって特徴づけられるものであった。



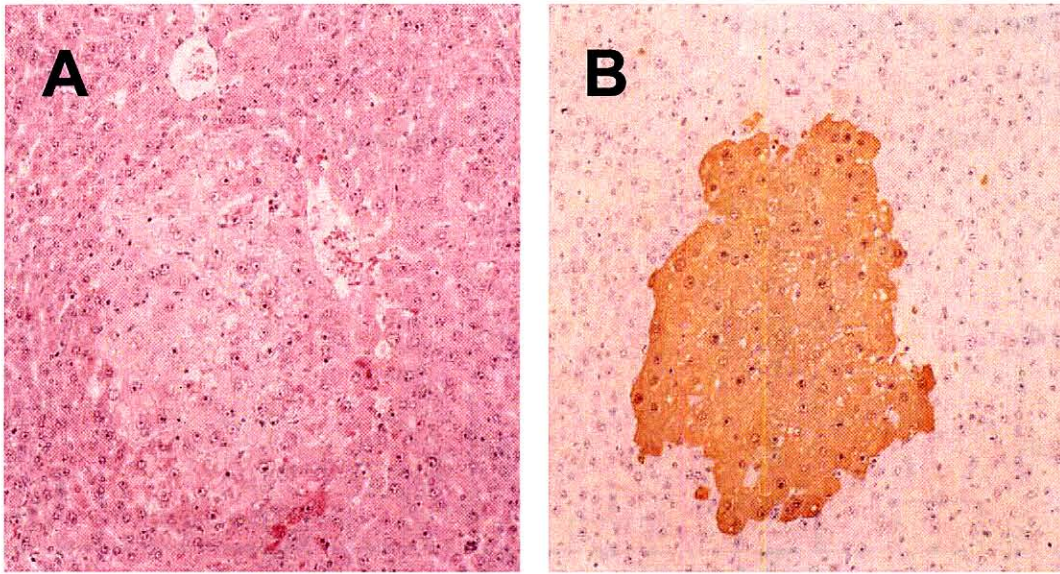


**Photo 1-1.** Histopathological appearance of the liver. H-E,  $\times 250$ : (A) Normal liver of a female control rat. (B) Liver from a female rat treated with E2011 100 mg/kg. Hepatocytes with enlarged nuclei (arrows) and prominent nucleoli are distributed scatteredly in the liver lobule.

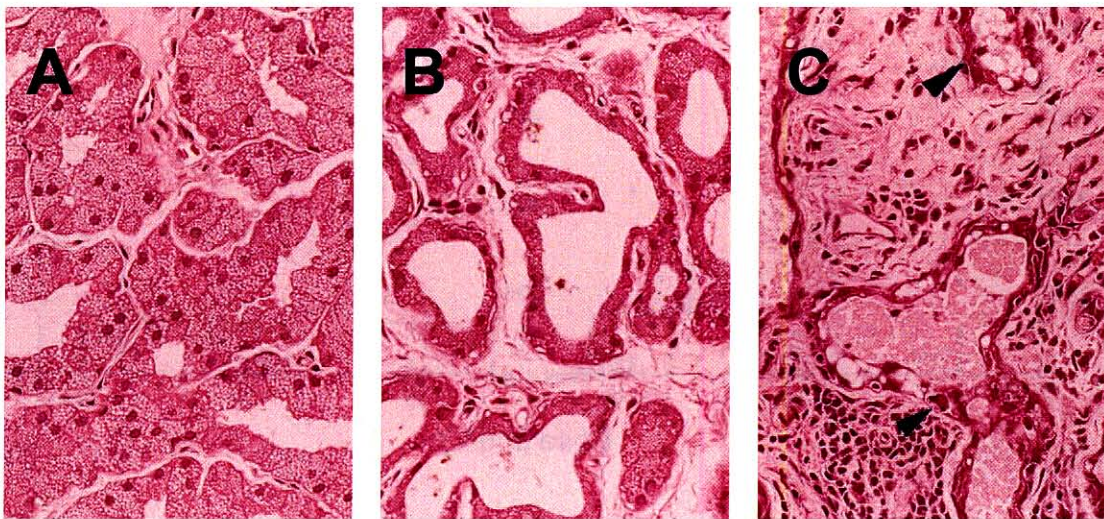


**Photo 1-2.** Ultrastructural appearance of the hepatocyte from a female rat treated with E2011 100 mg/kg. Note the irregularly shaped nucleus with prominent nucleolus.  $\times 5200$ .





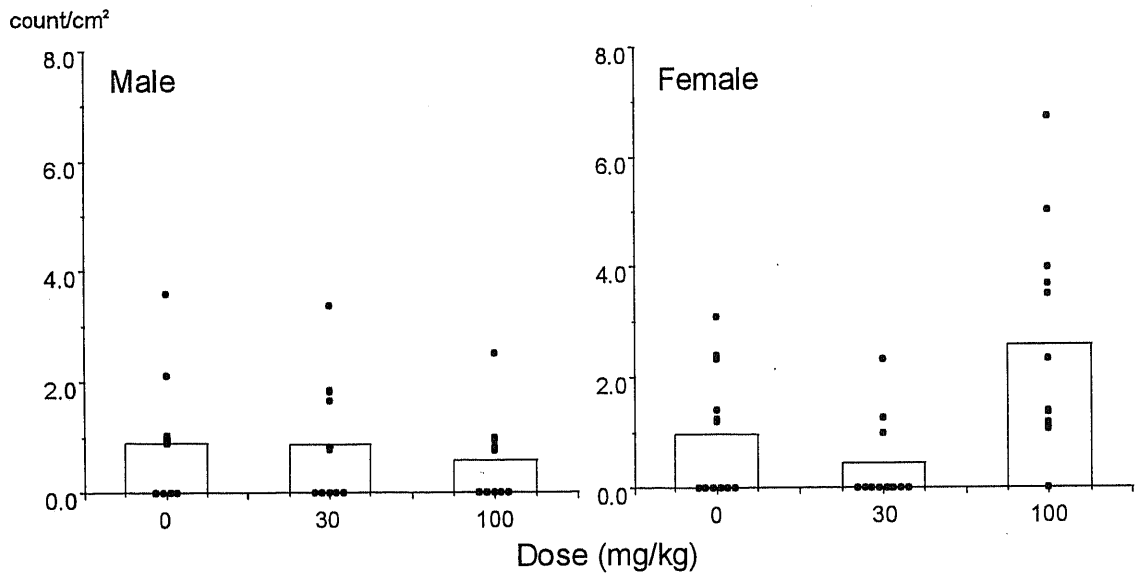
**Photo 1-3.** (A) Altered cell focus found in a female rat treated with E2011 100 mg/kg. H-E,  $\times 125$ . (B) Serial section of the same focus as A. The altered cell focus is positive for GST-P.  $\times 125$ .



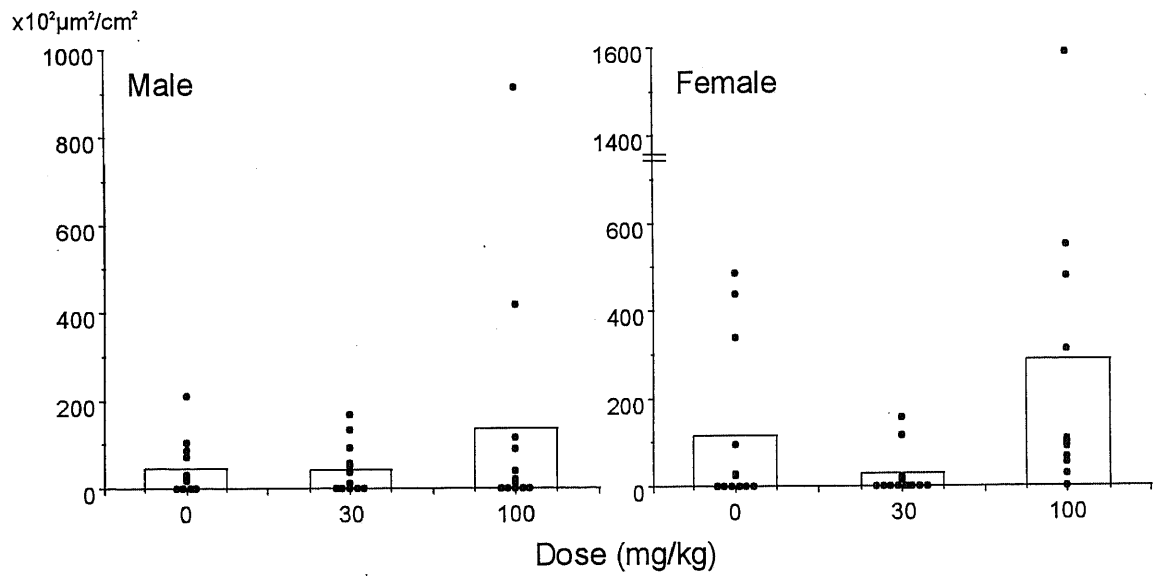
**Photo 1-4.** (A) Normal Harderian gland of a female control rat. H-E,  $\times 250$ . (B) Harderian gland from a female rat treated with E2011 100 mg/kg. Acinar atrophy in Harderian gland. Acinar epithelium is flattened with decreased cytoplasmic small vacuoles. (C) Severely affected gland. Note prominent interstitial fibrosis with mononuclear cell infiltration. Necrotic epithelium and large vacuoles (arrows) are also seen in the acinus. H-E,  $\times 250$ .



### Number of GST-P<sup>+</sup> foci



### Area of GST-P<sup>+</sup> foci



**Fig. 1-3.** Number and area of GST-P positive foci in the liver at the end of 13-week repeated dose of E2011. Individual data are dotted and the group means are shown by columns.

## 第2節 考察

E2011の毒性学的プロファイルを把握する目的で、13週間にわたりラットにE2011の30および100 mg/kgを経口投与した。その結果、投与に起因した死亡は認められなかった。一般観察では流涎が認められたが、毒性学的にあまり意味を持たないと考えられた。また、雄の100 mg/kg群では、体重増加抑制と摂餌量の減少が認められた。さらに、雌の100 mg/kg群では臨床検査でALPの増加が、雌の100 mg/kg群では剖検時の臓器重量測定で肝重量の増加が、それぞれ認められた。

この実験で最も特筆すべき所見は、肝の病理組織学的変化であった。雌雄いずれの肝細胞においても、核小体の明瞭化と、核不同形および核肥大、雌ではGST-P陽性小増殖巣(変異細胞巣)の顕著な増加が認められた。さらに超微形態学的観察において肝細胞の増殖活性の亢進あるいはタンパク合成能の亢進を示唆する所見が認められたことから、核肥大は変異細胞巣の増加と何らかの関係があるものと考えられた。

肝発がん物質として知られているチオアセトアミドのラットへの投与により、ALTやASTの増加などの肝毒性(21)や、肝細胞の核肥大が引き起こされること(22)が報告されている。チオアセトアミドによる肝毒性では、肝細胞の核肥大とDNAの二倍体から四倍体へのシフトやDNA量の増加との関連性が認められていることから(21)、E2011の場合もこうしたDNAレベルでの変動が引き起こされた結果、前がん病変が引き起こされた可能性が考えられた。

今回、GST-P陽性小増殖巣は雌でより顕著に認められたが、この要因の一つとしてE2011の代謝における性差が考えられる。すなわち、E2011の脱炭酸またはそれに引き続く代謝過程において、CYP2C11/12など性特異的な薬物代謝酵素(23,24)が関与し、それがE2011による肝毒性の性差の原因となった可能性が考えられた。

なお、本試験で認められたもう一つの興味深い所見は、肉眼所見および病理組織学的検査で認められたハーダー腺腺房の萎縮であった。これまで化学物質の投与によりげっ歯類のハーダー腺に毒性を引き起こした事例はほとんど報告されていない(25,26)。Rodriguez-Colungaらは、松果体ホルモンとして知られるMELのハムスターへの投与により、ハーダー腺の病理組織学的な変化を引き起こすことを報告しており(27)、また、ある種のMAO阻害剤の処置することにより、ラットやヒトでも松果体あるいは血中のMEL濃度が上昇することが報告されている(28-30)。E2011のラットへの投与によっても血中MEL濃度が上昇することから(第6章、第2節参照)、ハーダー腺腺房の萎縮はE2011の薬理作用であるMAO阻害作用に基づき、血中MELが上昇した結果、二次的に引き起こされた変化であると考えられた。

### 第3節 小括

E2011の毒性学的プロファイルを評価する目的で、13週間にわたりラットにE2011の30および100 mg/kgを強制経口投与した。

病理組織学的検査では、肝細胞において核小体の顕在化を伴う核肥大が認められ、雌ではさらに肝における変異細胞巣（前がん病変）の顕著な増加が認められた。こうした一連の肝病変から、E2011が発がん性を有する可能性が危惧された。

## 第2章 APAPの代謝様式を指標とした抱合酵素阻害動物モデルの確立

薬物の代謝経路が動物種によって異なることはよく知られており、とくに種々の抱合体の生成には著しい種差が存在する。例えば、ブタでは硫酸抱合、イヌではアセチル抱合がそれぞれ欠損している(31)。また、グルクロン酸抱合能はネコや Gunn ラットで低く、これらの動物種ではフェノール等の毒性が強くなりやすい(31)といったように、種特異的な代謝物に起因して毒性が生じるケースもある。このような場合、当該代謝物の生成を抑制することにより、毒性の発現機序解明への大きな手がかりが得られると考えられる。

こうしたことから、E2011の毒性解明への応用を念頭におき、硫酸抱合とグルクロン酸抱合を主たる代謝経路とするAPAPの代謝様式を指標として、代謝阻害動物モデルの作成を行った。最初に、HPLCを用いてAPAPおよび2種のAPAP抱合体(APAP-SulfおよびAPAP-Gluc)の測定方法を確立した後、ラットにおけるAPAP代謝物の血中動態を検討し、さらにこれら2種の抱合酵素に対する阻害剤を2週間反復投与して、目的とする抱合反応が継続的に抑制されるかどうかを確認した。

### 第1節 ラットにおける血漿中APAP代謝物のHPLCを用いた測定方法の検討

#### 実験方法

##### 化合物

APAPはSigma Chemical Co. (St. Louis, USA)より、 $\beta$ -Gおよび $\beta$ -G/ASはBoehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany)より、それぞれ購入した。

##### 動物

日本エスエルシー株式会社より導入したSDラットを、雌雄各2匹ずつ12週齢で用いた。動物の飼育方法は、第1章、第1節に記載した。

##### 試験デザイン

雌雄1匹ずつにAPAPの50または200 mg/kgを経口投与した。APAPは、20 mL/kgの投与量となるように、0.5% MC水溶液を用いて0.25および1%の懸濁液とした。APAP投与1時間後に、ペントバルビタール麻酔下で腹大動脈より採血し、遠心により血漿画分を得た。血漿は200  $\mu$ Lずつ3本に分注して、測定時まで-30℃にて凍結保存した。

##### HPLC条件

HPLCによる分析は、Nakamuraらの方法(32)に準じて、以下の機器を用いて行った。

###### (1) HPLC instrument

|             |         |          |
|-------------|---------|----------|
| システムコントローラー | SCL-10A | Shimadzu |
| ポンプ         | LC-10AD | Shimadzu |
| オートサンプラー    | 717     | Waters   |
| UV 検出器      | SPD-10A | Shimadzu |
| 恒温槽         | CTO-10A | Shimadzu |
| (2) データ処理機  |         |          |
| Chromatopac | CR-7A   | Shimadzu |

### (3) HPLC condition

カラム：ODS カラム (Wakosil 5C18, 250×4.6 mm i.d)

移動層：acetonitrile：0.05 M 硫酸ナトリウム (pH 2.7, リン酸で調整) =80：920

流速：1.0 mL/min

検出：UV 254 nm

温度：30°C

注入量：100  $\mu$ L

### サンプル処理

血漿サンプルの酵素処理および除タンパクは、以下に示す方法に従って行った。なお、本節では特に明記しない限り、緩衝液として 75 mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.0) を用いた。

200  $\mu$ L ずつ小分けした血漿を動物ごとに 3 本用意し、それぞれ  $\beta$ -G 処理用、 $\beta$ -G/AS 処理用、および酵素未処理用に割り当てた。すべての血漿に 800  $\mu$ L の緩衝液を加えた後、さらに  $\beta$ -G 処理用には 20  $\mu$ L の  $\beta$ -G (緩衝液を用いて原液を 100 倍に希釈したもの)、 $\beta$ -G/AS 処理用には  $\beta$ -G/AS (同様に 5 倍希釈)、そして酵素未処理サンプルに緩衝液を 20  $\mu$ L 加えて、よく混ぜた。この反応混合物を、軽く浸透しながら 37°C、2 時間インキュベートした。その後、各混合物 200  $\mu$ L と 400  $\mu$ L の 10% 過塩素酸 (内部標準物質 (I.S.) として、theophylline を 2 mg/L 含む) を混ぜた。これを 11,000×g で 5 分間遠心した後、上清を HPLC に供した。

なお、 $\beta$ -G および  $\beta$ -G/AS は、 $\beta$ -G 活性として 1 U/mL (*p*-ニトロフェノール- $\beta$ -D-グルクロニドを基質とした場合) を含むように希釈した。

### データ処理

検量線の作成は、以下の手順で行った。

302  $\mu$ g/mL (2 mM) の APAP 水溶液を調製し、これをもとに 75.5, 30.2, 7.55, 3.02 および 0.755  $\mu$ g/mL の各標準溶液を作成した。次に、各標準溶液 100  $\mu$ L と緩衝液 700  $\mu$ L、コントロール血漿 200  $\mu$ L を混合し、前述の酵素未処理サンプル同様の過程で処理し、HPLC にて分析を行った。APAP のピーク高さを I.S. のピーク高さで割り、非線形最小二乗法 (プログラム名：MULTI) により回帰直線を求めた。

APAP, APAP-Gluc および APAP-Sulf の各血漿中濃度は、すべて APAP ( $\mu\text{g/mL}$ ) に換算して算出した。酵素未処理サンプルの APAP 濃度を、血漿中 APAP 未変化体濃度とした。また、 $\beta$ -G 処理したサンプルの APAP 濃度から、未処理のサンプルの APAP 濃度を引いたものを APAP-Gluc 濃度とした。さらに、 $\beta$ -G/AS 処理したサンプルの APAP 濃度から、 $\beta$ -G 処理したサンプルの APAP 濃度を引いたものを APAP-Sulf 濃度とした。

## 結果

### 分析条件の設定

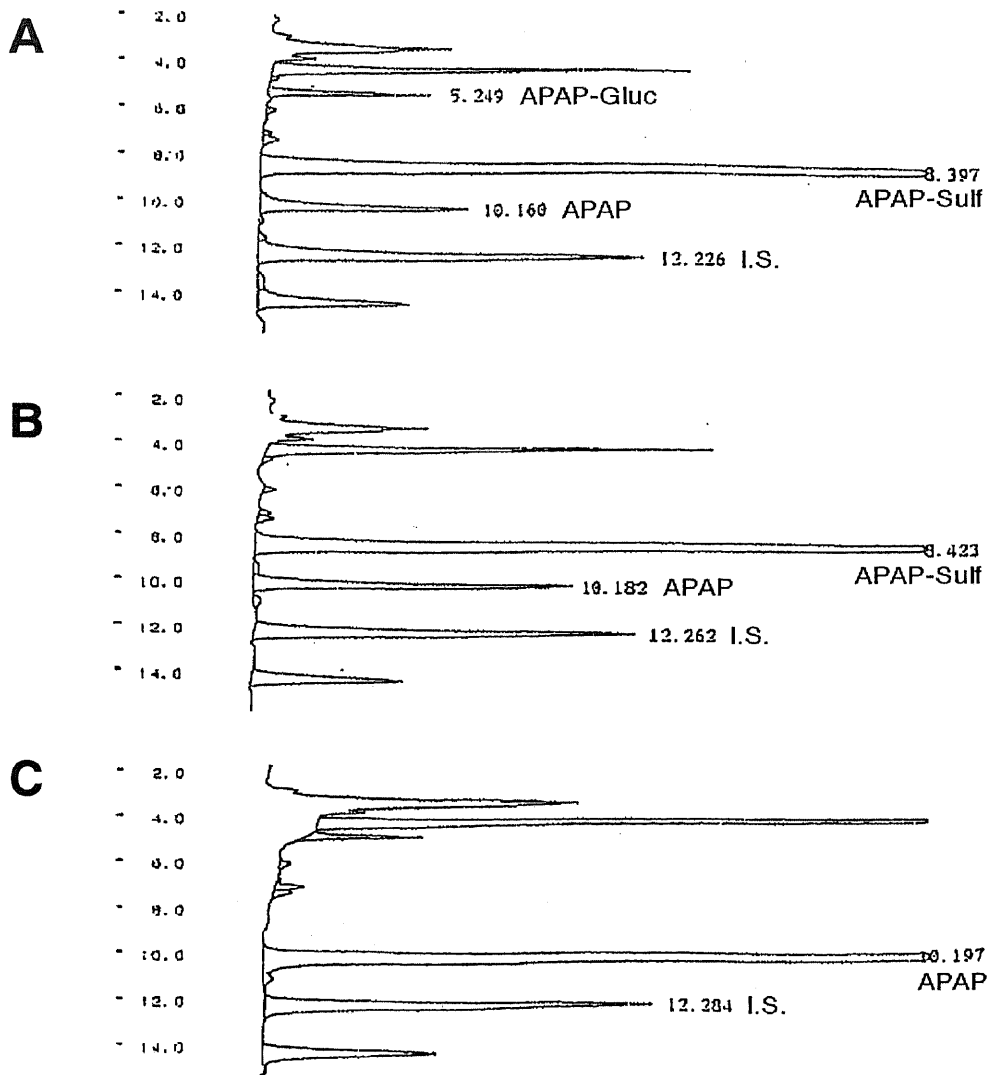
今回の HPLC 条件で APAP, APAP-Gluc, APAP-Sulf および I.S. の溶出について確認した。その結果、溶出時間の早い順に APAP-Gluc, APAP-Sulf, APAP そして I.S. であった。また、移動相の 0.05 M 硫酸ナトリウム (pH 2.7) の比率を増すことにより、溶出時間の遅延が認められたため、コントロール血漿中の不純物ピークと APAP, APAP-Gluc, APAP-Sulf あるいは I.S. のピークが一致しない条件を検討し、移動相の比率を最終的に acetonitrile : 0.05 M 硫酸ナトリウム (pH 2.7) = 80 : 920 とした。

### 酵素処理による抱合体から未変化体への変換

APAP-Gluc および APAP-Sulf の両代謝物ピークが、 $\beta$ -G および AS 処理することによって未変化体ピークに確実に移行し、また  $\beta$ -G 処理によって APAP-Sulf が影響を受けないことを確認した。APAP を 50 mg/kg 投与した個体の例を、Fig. 2-1 に示した。酵素未処理サンプルでは、Fig. 2-1A に示すように 5.2 分に APAP-Gluc, 8.4 分に APAP-Sulf, 10.2 分に APAP, そして 12.2 分に I.S. の各ピークが溶出した。次にサンプルを  $\beta$ -G 処理した場合は、Fig. 2-2B に示すように、APAP-Gluc のピークが消失し、APAP-Sulf および I.S. のピークには影響せず、APAP のピークが増大した。また、このサンプルを  $\beta$ -G/AS 処理した場合、Fig. 2-2C に示すように、APAP-Gluc と APAP-Sulf のピークが消失し、I.S. のピークには影響せず、APAP のピークが増大した。APAP 50 mg/kg を投与した個体と同様の結果 (酵素処理による抱合体から未変化体へのピークの移行) は、APAP 200 mg/kg 投与した個体についても確認することができた。

### データ処理

APAP 標準溶液の HPLC 分析を行った結果をもとに検量線を作成して各標準溶液の分析を行ったところ、すべてバラツキは 1% 以内であり、さらに標準溶液の一部を quality control サンプルとして分析したところ、バラツキは 5% 以内であり測定法は問題ないと判断した。



**Fig. 2-1.** (A) Chromatogram of acetaminophen glucuronide (APAP-Gluc), acetaminophen sulfate (APAP-Sulf), unchanged acetaminophen (APAP) and internal standard (I.S., theophylline) in non-enzymatically-treated rat plasma collected 30 min after oral administration of APAP 50 mg/kg. (B) After  $\beta$ -glucuronidase-treatment of (A) for 2 hr. APAP-Gluc was converted to APAP and the peak of APAP-Gluc disappeared while the peak of APAP was increased. (C) After  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase-treatment of (A) for 2 hr. Both APAP-Gluc and APAP-Sulf were converted to APAP and the peak of APAP-Gluc and APAP-Sulf disappeared while the peak of APAP was increased.

この検量線を用いて、ラットに APAP 50 または 200 mg/kg を経口投与した 1 時間後の血漿中各代謝物の濃度を計算し、Table 2-1 に示した。

**Table 2-1.** Plasma concentration of APAP and its conjugates.

| Sex    | Dose (mg/kg) | APAP  | APAP-Gluc | APAP-Sulf | Total  |
|--------|--------------|-------|-----------|-----------|--------|
| Male   | 50           | 4.02  | 2.23      | 29.28     | 35.53  |
|        | 200          | 60.45 | 10.24     | 34.85     | 105.53 |
| Female | 50           | 9.58  | 3.30      | 20.93     | 33.81  |
|        | 200          | 74.84 | 22.94     | 23.74     | 121.52 |

Values are expressed as APAP unchanged form ( $\mu\text{g/mL}$ ).



## 第2節 ラットにおける血漿中 APAP の薬物動態

### 実験方法

#### 化合物

本章，第1節に記載した。

#### 動物

日本エスエルシー株式会社より導入した SD ラットを，雌雄各 7 匹ずつ 14 週齢で用いた。動物の飼育方法は，第1章，第1節に記載した。

#### 試験デザイン

雌雄ラット各 2 匹ずつに，APAP 10, 50 または 200 mg/kg を経口投与した。また，雌雄各 1 匹ずつを対照群として設定し，APAP の代わりに媒体を経口投与した。APAP は，10 mL/kg の投与量となるように，0.5% MC 水溶液を用いて 0.1, 0.5 および 2% の懸濁液を調製した。

APAP 単回経口投与の 0.5, 1, 1.5, 2 および 4 時間後に，無麻酔下で頸動脈より 700  $\mu$ L 採血し，さらに 24 時間後にはペントバルビタール麻酔下で腹大動脈より全採血した。遠心により得られた血漿画分を 100  $\mu$ L ずつ 3 本に分注して，APAP および各代謝物の濃度測定に供した (測定時まで， $-30^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した)。投与 24 時間後の血漿の一部は，肝毒性検索のため AST および ALT 活性測定にも用いた。

#### HPLC 条件

本章，第1節に記載した。

#### サンプル処理

酵素処理の際のスケールをそれぞれ半量ずつにした以外は，本章，第1節に記載した方法に従った。

#### データ処理

検量線用の APAP 標準液濃度を変更した ( $0.755\sim 75.5\ \mu\text{g/mL} \rightarrow 0.4\sim 40\ \mu\text{g/mL}$ ) 以外は，本章，第1節に記載した方法に従った。

#### 血漿中 AST, ALT 活性

第1章，第1節に記載した方法により，血漿中の ALP および ALT 活性を測定した。

#### ファーマコキネティクス・パラメータの算出法

APAP および各代謝物について，最高血漿中濃度を  $C_{\text{max}}$ ，その際の時間を  $T_{\text{max}}$  とした。

また、血漿中濃度の  $AUC_{0-24h}$  は、24 時間までの血漿中濃度を用いて台形法により小数点以下一桁まで算出した。測定値が検出限界以下の場合には、ゼロを代入した。

## 結果

### 血漿中薬物濃度

APAP, APAP-Gluc および APAP-Sulf の経時的に血漿中濃度推移を Fig. 2-2 (雄) および 2-3 (雌) に、またファーマコキネティクス・パラメータを Table 2-2 に示した。

APAP トータルとしての血漿中濃度は、雌雄ともほぼ用量依存的に増えた。未変化体の AUC は、APAP を 10, 50 および 200 mg/kg 投与した場合、雄で 1.8, 22.2 および 369.3  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 、雌で 3.4, 53.0 および 245.4  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  を示し、雌雄いずれも投与量の公比以上に AUC が増加した。APAP-Sulf の AUC は、雄で 22.6, 92.9 および 265.5  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 、雌で 15.1, 119.0 および 253.1  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  を示し、雌雄いずれも 50 mg/kg 以上で頭打ちとなった。さらに APAP-Gluc の AUC は、APAP を 10, 50 および 200 mg/kg 投与した場合、雄で 1.0, 8.7 および 77.4  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 、雌で 1.4, 25.0 および 140.1  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  を示し、雌雄いずれも投与量の公比以上に AUC が増加していることが示された。

このことから、APAP 50mg/kg 以上の投与では、硫酸抱合が代謝酵素あるいは硫酸供与基のいずれかのレベルで飽和した結果、未変化体あるいはグルクロン酸抱合体の割合が上昇したものと推察された。APAP-Gluc の AUC を雌雄で比較した場合、いずれの投与量においても明らかに雌の方が高かった。

### 血漿中 AST, ALT 活性

投与 24 時間後の血漿中 AST および ALT 活性を測定した結果を、Table 2-3 に示した。200 mg/kg の雄 1 例で、ALT がやや高い値を示した。他の 200 mg/kg の 3 例では ALT の顕著な上昇は認められなかったものの、この投与量では軽度の肝障害を起こしうる可能性があることが示唆された。

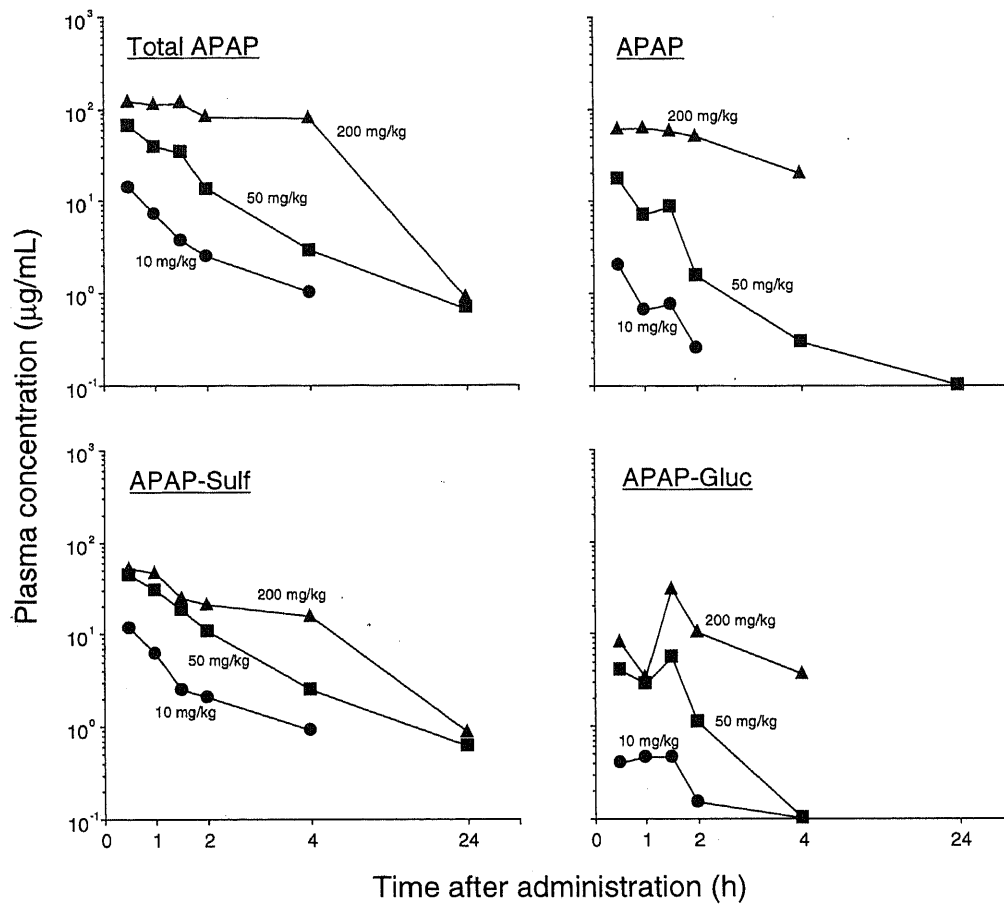
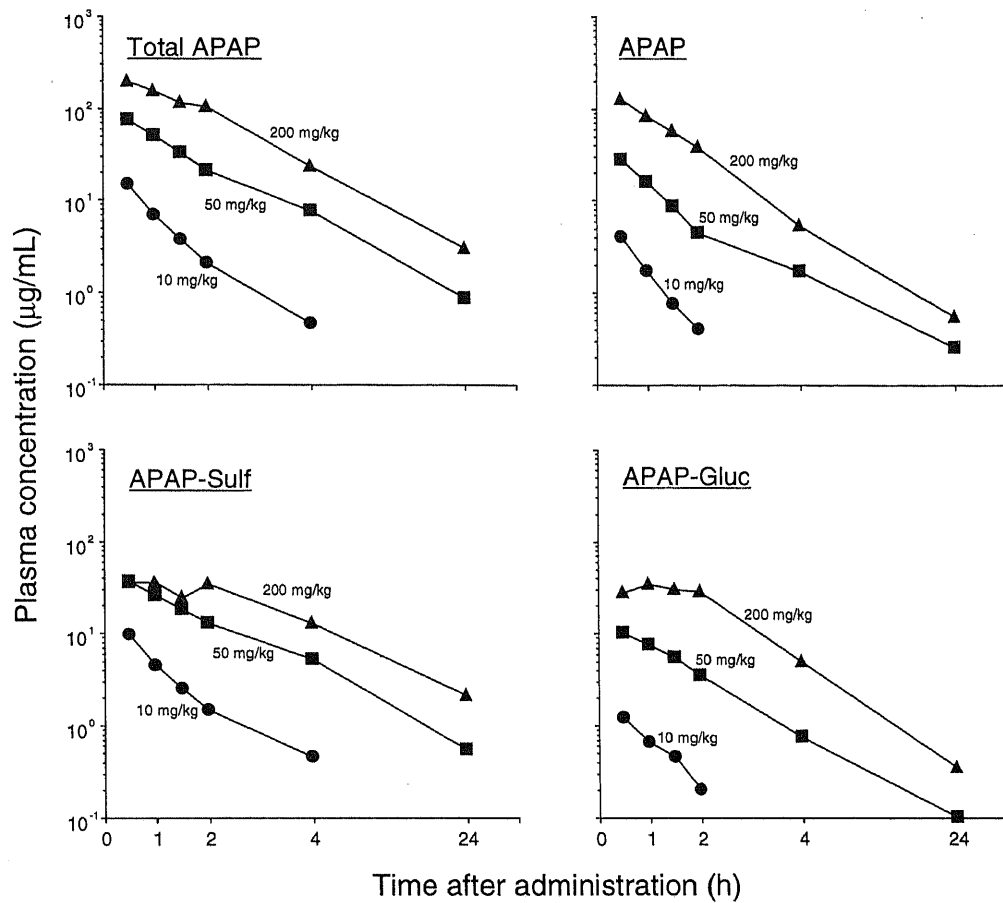


Fig. 2-2. Time-course of total APAP, APAP (unchanged form), APAP-Sulf and APAP-Gluc in the plasma from male rats after a single oral administration of APAP at 10, 50 or 200 mg/kg. Results are expressed as mean value (n=2).



**Fig. 2-3.** Time-course of total APAP, APAP (unchanged form), APAP-Sulf and APAP-Gluc in the plasma from female rats after a single oral administration of APAP at 10, 50 or 200 mg/kg. Results are expressed as mean value (n=2).

**Table 2-2.** Pharmacokinetics parameters after single oral administration of APAP (10, 50 or 200 mg/kg) to male and female rats.

**A) Total APAP**

| Dose (mg/kg) | Sex    | C <sub>max</sub> (µg/mL) | T <sub>max</sub> (h) | AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL) |
|--------------|--------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 10           | Male   | 14.1                     | 0.5                  | 26.5                           |
|              | Female | 14.8                     | 0.5                  | 22.3                           |
| 50           | Male   | 65.4                     | 0.5                  | 123.8                          |
|              | Female | 74.5                     | 0.5                  | 196.8                          |
| 200          | Male   | 127.0                    | 1.0                  | 707.1                          |
|              | Female | 190.6                    | 0.5                  | 638.4                          |

**B) APAP**

| Dose (mg/kg) | Sex    | C <sub>max</sub> (µg/mL) | T <sub>max</sub> (h) | AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL) |
|--------------|--------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 10           | Male   | 2.0                      | 0.5                  | 1.8                            |
|              | Female | 4.0                      | 0.5                  | 3.4                            |
| 50           | Male   | 17.4                     | 0.5                  | 22.2                           |
|              | Female | 27.8                     | 0.5                  | 53.0                           |
| 200          | Male   | 73.7                     | 1.0                  | 369.3                          |
|              | Female | 122.8                    | 0.5                  | 245.4                          |

**C) APAP-Sulf**

| Dose (mg/kg) | Sex    | C <sub>max</sub> (µg/mL) | T <sub>max</sub> (h) | AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL) |
|--------------|--------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 10           | Male   | 11.7                     | 0.5                  | 22.6                           |
|              | Female | 9.6                      | 0.5                  | 15.1                           |
| 50           | Male   | 44.1                     | 0.5                  | 92.9                           |
|              | Female | 36.6                     | 0.5                  | 119.0                          |
| 200          | Male   | 50.9                     | 0.5                  | 265.5                          |
|              | Female | 40.3                     | 1.5                  | 253.1                          |

**D) APAP-Gluc**

| Dose (mg/kg) | Sex    | C <sub>max</sub> (µg/mL) | T <sub>max</sub> (h) | AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL) |
|--------------|--------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 10           | Male   | 0.7                      | 0.75                 | 1.0                            |
|              | Female | 1.2                      | 0.5                  | 1.4                            |
| 50           | Male   | 5.5                      | 1.5                  | 8.7                            |
|              | Female | 10.2                     | 0.5                  | 25.0                           |
| 200          | Male   | 30.3                     | 1.5                  | 77.4                           |
|              | Female | 34.8                     | 1.0                  | 140.1                          |

**Table 2-3.** AST and ALT values after single oral administration of APAP (10, 50 or 200 mg/kg) to male and female rats.

| Dose<br>(mg/kg) | Sex  | AST<br>(mU/mL) | ALT<br>(mU/mL) | Sex    | AST<br>(mU/mL) | ALT<br>(mU/mL) |
|-----------------|------|----------------|----------------|--------|----------------|----------------|
| Control         |      | 156            | 39             |        | 125            | 35             |
| 10              | Male | 135            | 35             | Female | 84             | 29             |
|                 |      | 104            | 38             |        | 93             | 30             |
| 50              | Male | 95             | 35             | Female | 141            | 37             |
|                 |      | 135            | 46             |        | 153            | 35             |
| 200             | Male | 110            | 34             | Female | 124            | 35             |
|                 |      | 154            | 70             |        | 90             | 31             |

### 第3節 ラットにおける抱合酵素阻害剤反復処置のAPAP代謝様式に与える影響

#### 実験方法

##### 化合物

本章、第1節に記載した化合物のほか、ST阻害剤としてDCNP (Fluka Chemie AG; Buchs, Switzerland) およびPCP (片山化学工業(株); 大阪), UDP-GT阻害剤としてラニチジン (Sigma Chemical Co.; St. Louis, USA) を使用した。

##### 動物

日本エスエルシー株式会社より導入した雄性SDラットを21匹、8週齢で用いた。動物の飼育方法は、第1章、第1節に記載した。

##### 試験デザイン

21匹の雄性ラットを3匹ずつ7群に分け、対照群1群と抱合酵素阻害剤の前処置群を6群、すなわちDCNP (5あるいは10 mg/kg, 腹腔内投与), PCP (2.5あるいは5 mg/kg, 腹腔内投与) およびラニチジン (50あるいは100 mg/kg, 経口投与) を設定した。毎日、動物に阻害剤を前処置した後、その45分後にAPAP 50 mg/kgを経口投与した。阻害剤とAPAPはいずれも1日1回ずつ、14日間にわたり投与した。対照群には阻害剤の代わりに腹腔内投与の媒体を前処置し、その45分後にAPAPを経口投与した。

DCNP およびPCPは、少量のエタノールで溶解後、プロピレングリコールで希釈して、それぞれ1.0あるいは2.0% (DCNP), 2.5あるいは5.0% (PCP) 溶液とした。ラニチジンは、0.5% MC水溶液を用いて、2.5あるいは5.0%懸濁液とした。さらにAPAPは、0.5% MC水溶液を用いて、5 mL/kgの投与容量となるように、0.5%懸濁液とした。

なお、APAPの投与量は本章、第2節の結果より、肝毒性の出ないことが予想される50 mg/kgを設定した。また抱合酵素阻害剤の投与量は、文献的に報告されている用量 (33-36) を参考に設定した。

投与初日および14日目に、APAPの投与30分後に無麻酔下で頸動脈より800  $\mu$ L採血し、遠心により得た血漿画分をサンプルとした。サンプルは100  $\mu$ Lずつ3本に分注して、APAPおよび各代謝物の濃度測定に供した (測定時まで、-30 $^{\circ}$ Cにて凍結保存した)。最終投与の24時間後に得られた血漿の一部は、血液生化学的検査にも用いた。

##### HPLC条件

本章、第1節に記載した。

##### サンプル処理条件

本章、第2節に記載した。

## データ処理

本章，第2節に記載した。

## 血液生化学的検査

第1章，第1節に記載した方法により，血漿中の ALP, AST, ALT, CK, UN および CRNN を測定した。各群ともに3例の測定値の平均値を算出して表示した。

## **結果**

### 血漿中薬物濃度

Table 2-4 に示すように，投与初日，APAP-Sulf 生成に対する最も強い阻害は DCNP (10 mg/kg) 処置により認められ，以下，PCP (5 mg/kg)，DCNP (5 mg/kg)，PCP (2.5 mg/kg) の順に阻害率が小さくなった。APAP-Sulf の生成は，DCNP (10 mg/kg) の前処置によって対照群の 42 %にまで低下した。一方，UDP-GT 阻害剤であるラニチジン (100 mg/kg) の前処置により，APAP-Gluc の生成は対照群の 65 %に低下した。APAP-Sulf および APAP-Gluc に対する生成阻害作用は 14 日目にも同様に観察されたことから，2 週間にわたって毎日阻害剤を前処置した場合でも，目的とする抱合反応が継続的に阻害されていることが確認された。

DCNP あるいは PCP の前処置により APAP-Sulf の生成が減少した分，APAP-Gluc の生成は約 1.5 倍に，未変化体は 2~3 倍に上昇した。しかし，ラニチジンの前処置により APAP-Gluc の生成が減少しても，ラットでは血漿中 APAP-Gluc の占める割合がもともと少ないことから，APAP-Sulf や APAP の割合はほとんど影響を受けなかった。

### 血液生化学的検査

Table 2-5 に示すように，剖検時の血液生化学的検査の結果，DCNP (10 mg/kg) を投与した群で，AST が若干高い値を示したが，その他の項目で異常はなかった。また，他の群では肝および腎毒性を示唆する変化は認められなかった。



**Table 2-4.** Effects of various conjugating enzyme inhibitors on the ratio of APAP and its metabolites in plasma after repeated administration of APAP at a dose of 50 mg/kg to rats.

**Day 1**

| Inhibitors | Dose (mg/kg) | Inhibition      | Ratio in plasma (%), (% of control) |            |           |
|------------|--------------|-----------------|-------------------------------------|------------|-----------|
|            |              |                 | APAP                                | APAP-Sulf  | APAP-Gluc |
| Control    | —            | —               | 17.5 (100)                          | 78.2 (100) | 4.3 (100) |
| DCNP       | 5            | Sulfation       | 45.0 (257)                          | 47.9 (61)  | 7.1 (165) |
|            | 10           |                 | 59.8 (342)                          | 32.5 (42)  | 7.7 (179) |
| PCP        | 2.5          | Sulfation       | 37.9 (217)                          | 55.7 (71)  | 6.4 (149) |
|            | 5            |                 | 50.7 (290)                          | 42.5 (54)  | 6.8 (158) |
| Ranitidine | 50           | Glucuronidation | 23.2 (133)                          | 73.5 (94)  | 3.3 (77)  |
|            | 100          |                 | 20.7 (118)                          | 76.5 (98)  | 2.8 (65)  |

**Day 14**

| Inhibitors | Dose (mg/kg) | Inhibition      | Ratio in plasma (%), (% of control) |            |           |
|------------|--------------|-----------------|-------------------------------------|------------|-----------|
|            |              |                 | APAP                                | APAP-Sulf  | APAP-Gluc |
| Control    | —            | —               | 20.0 (100)                          | 74.3 (100) | 5.7 (100) |
| DCNP       | 5            | Sulfation       | 48.8 (244)                          | 43.1 (58)  | 8.1 (142) |
|            | 10           |                 | 60.4 (302)                          | 30.8 (41)  | 8.7 (153) |
| PCP        | 2.5          | Sulfation       | 36.4 (182)                          | 57.0 (77)  | 6.6 (116) |
|            | 5            |                 | 48.6 (243)                          | 43.3 (58)  | 8.1 (142) |
| Ranitidine | 50           | Glucuronidation | 22.7 (114)                          | 73.3 (99)  | 4.0 (70)  |
|            | 100          |                 | 20.5 (103)                          | 75.2 (101) | 4.3 (75)  |

Values represent the mean value of three animals for each group.

**Table 2-5.** Blood clinical chemistry of rats after 2-week administration of APAP (50 mg/kg, p.o) in combination with various conjugating enzyme inhibitors.

| Inhibitors | Dose (mg/kg) | ALP (mU/mL) | ALT (mU/mL) | AST (mU/mL) | CK (mU/mL) | CRNN (mU/mL) | LDH (mU/mL) | UN (mU/mL) |
|------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|-------------|------------|
| (Control)  | —            | 439         | 23          | 70          | 193        | 0.28         | 131         | 13.6       |
| DCNP       | 5            | 303         | 27          | 78          | 313        | 0.29         | 114         | 13.2       |
|            | 10           | 258         | 31          | 104         | 116        | 0.30         | 93          | 13.6       |
| PCP        | 2.5          | 398         | 27          | 74          | 100        | 0.27         | 86          | 12.6       |
|            | 5            | 309         | 27          | 78          | 126        | 0.27         | 87          | 12.8       |
| Ranitidine | 50           | 485         | 27          | 66          | 99         | 0.25         | 72          | 13.0       |
|            | 100          | 401         | 24          | 61          | 104        | 0.25         | 82          | 12.6       |

Values represent the mean value of three animals for each group.

#### 第4節 考察

APAP は、解熱鎮痛薬として幅広く用いられている薬物である。APAP のラットにおける主代謝物は硫酸抱合、ヒトにおける主代謝物はグルクロン酸抱合体であることが知られている (37)。これらの抱合体と未変化体の HPLC を用いた測定は、多くの研究者によって試みられているが (32,38-44)、中でも代謝物標品を用いない簡便な方法として、抱合体を酵素処理する ( $\beta$ -G あるいは AS とともにインキュベートを行う) ことで未変化体に変換し、HPLC 上で定量する方法が報告されている (32,39)。本章では、これらの報告を参考にして、モデル化合物として選択した APAP の未変化体と 2 種の抱合体 (APAP-Sulf, APAP-Gluc) を HPLC 上で検出する系を確立するとともに、AST と ALT を指標とした肝毒性の認められない用量を選択した。そして、ラットに各抱合反応に特異的な阻害剤 (ST: DCNP および PCP, UDP-GT: ラニチジン) の併用下で APAP を 2 週間反復投与して、目的とする抱合反応が抑制されるかどうかを確認した。その結果、APAP の硫酸抱合およびグルクロン酸抱合は、ST 阻害剤である DCNP および PCP, UDP-GT 阻害剤であるラニチジンによって、それぞれ効果的に抑制された。また、この作用は 14 日目にも認められたことから、2 週間にわたり阻害効果が継続していることが示された。

これまでいくつかの研究グループにより、代謝的に毒性を示す化合物と、その活性化に関与する代謝酵素の阻害剤を併用した結果、毒性代謝物の生成量が変化して毒性作用が修飾を受けることが報告されている。毒性軽減の例として、PCP の併用により、マウスにおける 4-アミノアゾベンゼンによる DNA 付加体量の減少や肝発がん作用の抑制が認められた事例や (45)、マウスおよびラットにおけるサフロールによる発がん作用の抑制が認められた事例が報告されている (46,47)。逆に毒性増強の例として、フェノール性の化合物であるハルモールのラットにおける毒性 (胆汁うっ滞) は、ST 阻害剤である DCNP によって増強されるが、この現象は、ハルモールの代謝経路のうち解毒方向へ働く硫酸抱合体の生成を抑制した結果、毒性本体であるグルクロン酸抱合体の生成が優位になったためと説明される (48)。

しかしながら、このような薬物代謝酵素阻害剤処置による毒性修飾の実験は、代謝経路 (代謝物) の変化を証明せずに、現象のみ論じていることが多い。この理由の一つとして、*in vivo* で生成した毒性代謝物は不安定な場合が多く、定量的な証明が困難であるためと考えられる。本章では、文献的に種々の毒性への修飾効果が報告されている抱合酵素阻害剤である DCNP, PCP あるいはラニチジンを動物に前処置することにより、モデル化合物 (APAP) の代謝経路が確実に変化することを定量的に証明した。このことから、硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体が毒性本体 (あるいは、逆に主たる解毒代謝物) であるようなケースでは、本章で確立した動物モデルを利用することによって、毒性発現機序解明に大きな手がかりが得られると考えられた。

## 第5節 小括

APAP の代謝様式を指標として，抱合酵素の阻害動物モデルの作成を行った。

DCNP, PCP あるいはラニチジンの反復投与により，ST あるいは UDP-GT を 2 週間継続的に阻害する動物モデルを確立することに成功した。またこの時に，AST, ALT あるいは UN 等の血液生化学的パラメーターを指標とした肝毒性および腎毒性は伴わないことが示された。したがって，抱合酵素が毒性発現に大きく関与するケースでは，本章で確立した動物モデルを利用することによって，毒性発現機序解明に大きな手がかりが得られると考えられた。

### 第3章 E2011のラット肝毒性に対する抱合酵素阻害剤の修飾作用

ラットにおけるE2011の主たる代謝経路は、オキサゾリン環の水酸化およびO-脱メチル化である(15,20)。その他の代謝経路として脱炭酸があり、投与されたE2011の約15%が脱炭酸体(芳香族アミン体)へと変換される(20)。変異原性あるいは発がん性を持つ芳香族アミン類は、通常CYPあるいはFMOによりN-水酸化体に代謝され、引き続きATあるいはSTによりエステル化されて反応性に富むニトロニウムイオンが生成することが知られている(17-19)。

そこで本章では、E2011脱炭酸体(芳香族アミン体)が変異原性/発がん性芳香族アミンと同様の代謝活性化を受けた可能性を考えて、前章で確立した動物モデルを利用して、各種抱合酵素阻害剤の前処置がE2011による肝毒性発現にどのような影響を与えるかを検討した。

#### 第1節 E2011のラットにおける2週間投与による肝毒性と抱合酵素阻害剤による修飾

##### 実験方法

###### 化合物

E2011(第1章,第1節),DCNP,PCPおよびラニチジン(第2章,第3節)を使用した。

###### 動物

日本エスエルシー株式会社より導入した雌性SDラットを20匹,8週齢で用いた。動物の飼育方法は,第1章,第1節に記載した。なお,第1章,第1節でE2011による肝の変異細胞巣が雌で顕著に認められたことから,本節では雌動物を用いて実験を行った。

###### 試験デザイン

20匹の雌性ラットを4匹ずつ5群に分け,対照群とE2011投与群を各1群ずつと,抱合酵素阻害剤の前処置+E2011投与群を3群設定した。第2章の結果より,抱合酵素阻害剤としてDCNP(10 mg/kg,腹腔内投与),PCP(5 mg/kg,腹腔内投与)およびラニチジン(100 mg/kg,経口投与)を用いた。動物にいずれかの阻害剤を処置した後,45分後にE2011の150 mg/kgを経口投与した。阻害剤およびE2011はいずれも1日1回,14日間にわたり投与した。対照群およびE2011投与群には阻害剤の代わりに腹腔内投与の媒体を処置し,その45分後にE2011(もしくはE2011の媒体)を経口投与した。投与検体の調製法は,E2011を第1章,第1節に,薬物代謝酵素阻害剤を第2章,第3節に,それぞれ記載した。

## 観察、測定および検査

投与日を1日目と起算し、以下の観察、測定および検査を実施した。

### (1) 一般観察

動物の一般状態について、投与期間を通じて毎日観察した。体重および摂餌量は、1, 3, 8 および 14 日目に測定した。

### (2) 血液生化学的検査

第1章、第1節に記載した条件で、血漿中 ALP, ALT, AST および TP を測定した。

### (3) 剖検および病理組織学的観察

最終投与後、動物を一昼夜絶食した後、剖検を行い、諸臓器組織を肉眼的に観察した。さらに、肝について顕微鏡観察用の H&E 染色を施した組織標本を作製して、病理組織学的検査を行った。

## **結果**

### (1) 一般観察

投与期間を通じて、死亡および一般状態の異常は認められなかった。

体重および摂餌量の変化を、Table 3-1 および 3-2 にまとめた。8日目より、DCNP+E2011 群で有意な体重の低下が観察された。8 および 14 日目における E2011 単独投与あるいはラニチジン+E2011 群における動物の体重は、対照群に比べて 10%程度減少したが、PCP+E2011 群の体重の推移は対照群と同等であった。また、DCNP+E2011 群における摂餌量は、3 および 8 日目は対照群の半量程度、14 日目には約 3 分の 1 であったが、E2011 投与群、DCNP+E2011 群およびラニチジン+E2011 群における摂餌量は、3 および 8 日目は対照群の 8 割程度、そして 14 日目には対照群と同程度であり、摂餌量における変動が体重の変動にほぼ反映されていると考えられた。

### (2) 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を、Table 3-3 に示した。E2011 群、PCP+E2011 群あるいはラニチジン+E2011 群では投与に起因した変化は認められなかったが、DCNP+E2011 群で ALT および AST の上昇と、TP の減少が認められた。

### (3) 剖検および病理組織学的観察

剖検時の肉眼所見では、DCNP+E2011 群および PCP+E2011 群の数例で、肝の各葉の相互癒着や、肝臓と腸管の癒着が認められた。この所見は E2011 投与群 (抱合酵素阻害剤は処置せず、媒体の腹腔内投与のみ) の数例でも認められたことから、腹腔内投与の物理的刺激に基づくものであると判断した。

病理組織学的検査の結果を、Table 3-4 に示した。対照群 (媒体のみ投与) の肝では、何ら異常所見は認められなかった (Photo 3-1A)。E2011 の単独投与により、核小体の著明な肥大を伴う肝細胞核や、細胞質の染色性の変化が認められた (Photo 3-1B)。これらの肝細胞の形態学的変化は、E2011 を 13 週間投与した場合とほぼ同様であった。これに対して DCNP 併用群では、肝細胞の核肥大は E2011 単独投与に比べてより著明であり、さらに単細胞壊死も認められた (Photo 3-1C)。一方、PCP 併用群では E2011 投与による病理変化は認められなかった (Photo 3-1D)。ラニチジン+E2011 群では、E2011 単独投与群と所見の程度に差は認められなかった。したがって、E2011 による肝毒性は DCNP の前処置によって明らかに増悪されるのに対し、PCP の前処置により抑制されることが明らかとなった。なお、ラニチジンの E2011 による肝臓の病変に対する修飾作用は認められなかった。

**Table 3-1.** Body weight (g) determined on Days 1, 3, 8 and 14 (Mean ± SD).

| Group            | Day   |        |       |        |       |         |       |          |
|------------------|-------|--------|-------|--------|-------|---------|-------|----------|
|                  | 1     |        | 3     |        | 8     |         | 14    |          |
| Control          | 193.5 | ± 11.1 | 198.8 | ± 8.7  | 203.5 | ± 7.2   | 218.5 | ± 12.8   |
| E2011            | 193.5 | ± 6.9  | 188.8 | ± 4.6  | 189.3 | ± 7.1   | 201.5 | ± 3.1    |
| DCNP+E2011       | 203.8 | ± 20.3 | 190.3 | ± 20.5 | 177.0 | ± 20.3* | 184.3 | ± 18.9** |
| PCP+E2011        | 197.3 | ± 13.1 | 195.5 | ± 6.4  | 204.5 | ± 4.8   | 219.3 | ± 8.3    |
| Ranitidine+E2011 | 196.0 | ± 14.2 | 191.8 | ± 13.0 | 188.8 | ± 12.4  | 203.3 | ± 11.8   |

The rats were treated with E2011 (150 mg/kg, p.o.) alone or with pretreatment with a metabolizing enzyme inhibitor; 2,6-dichloro-4-nitrophenol (DCNP, 5 mg/kg/day, i.p.), pentachlorophenol (PCP, 10 mg/kg/day, i.p.) or ranitidine (100 mg/kg/day, p.o.).

Significantly different from control, \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.01$ , respectively (Student's  $t$  test).

**Table 3-2.** Food intake (g/animal/day) determined on Days 1, 3, 8 and 14.

| Group            | Day  |      |      |      |
|------------------|------|------|------|------|
|                  | 1    | 3    | 8    | 14   |
| Control          | 15.8 | 14.3 | 13.8 | 16.3 |
| E2011            | 14.3 | 11.0 | 13.0 | 14.8 |
| DCNP+E2011       | 16.3 | 6.5  | 7.8  | 9.8  |
| PCP+E2011        | 15.0 | 11.5 | 12.3 | 18.0 |
| Ranitidine+E2011 | 13.5 | 11.8 | 11.5 | 15.8 |

**Table 3-3.** Results of blood chemistry at the end of the 2-week treatment period (Mean ± SD).

| Group            | ALP<br>(mU/mL) |         | ALT<br>(mU/mL) |         | AST<br>(mU/mL) |        | TP<br>(g/dL) |          |
|------------------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|--------|--------------|----------|
|                  | Control        | 343.8   | ± 22.1         | 17.5    | ± 2.1          | 50.5   | ± 4.1        | 5.90     |
| E2011            | 366.3          | ± 3.4   | 24.3           | ± 5.4   | 56.5           | ± 3.7  | 5.88         | ± 0.05   |
| DCNP+E2011       | 309.3          | ± 122.1 | 40.8           | ± 14.7* | 68.8           | ± 14.9 | 4.78         | ± 0.36** |
| PCP+E2011        | 243.8          | ± 56.4* | 18.8           | ± 2.8   | 59.8           | ± 10.9 | 5.73         | ± 0.22   |
| Ranitidine+E2011 | 393.0          | ± 55.1  | 24.8           | ± 3.4*  | 57.5           | ± 6.0  | 6.20         | ± 0.29   |

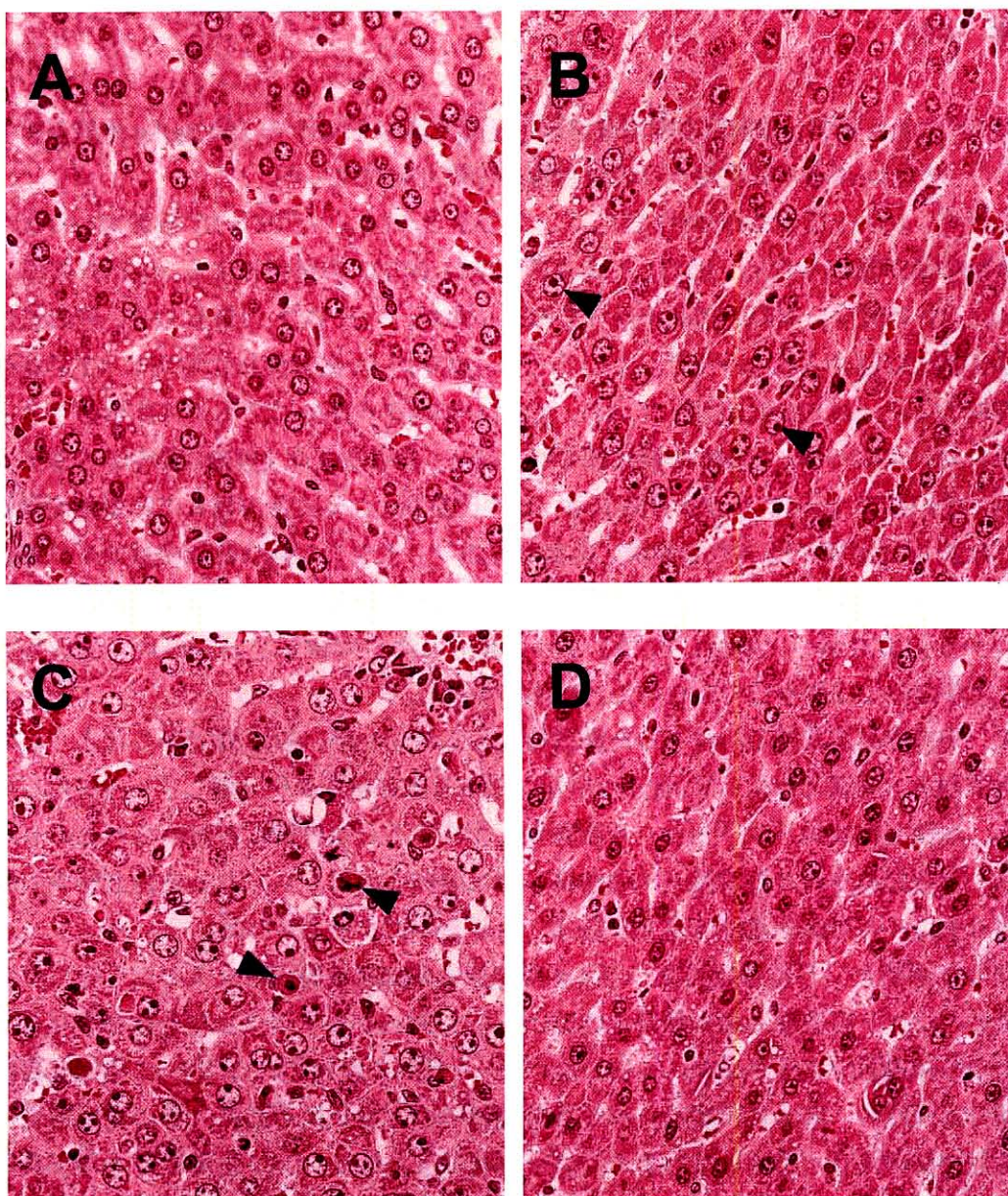
\*, \*\*: Significantly different from control,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Student's  $t$  test).

**Table 3-4.** Histopathological findings of rats after 2-week administration of E2011 in combination with various inhibitors for conjugating enzymes.

| Findings                            | Group | Control |   |   |   | E2011 |   |   |   | DCNP<br>+E2011 |   |   |   | PCP<br>+E2011 |   |   |   | Ranitidine<br>+E2011 |   |   |   |
|-------------------------------------|-------|---------|---|---|---|-------|---|---|---|----------------|---|---|---|---------------|---|---|---|----------------------|---|---|---|
|                                     |       | Score   |   |   |   | Score |   |   |   | Score          |   |   |   | Score         |   |   |   | Score                |   |   |   |
|                                     |       | 0       | 1 | 2 | 3 | 0     | 1 | 2 | 3 | 0              | 1 | 2 | 3 | 0             | 1 | 2 | 3 | 0                    | 1 | 2 | 3 |
| <b>Liver</b>                        |       |         |   |   |   |       |   |   |   |                |   |   |   |               |   |   |   |                      |   |   |   |
| Nuclear enlargement of hepatocytes  | 4     | 0       | 0 | 0 | 0 | 0     | 2 | 2 | 0 | 0              | 0 | 4 | 2 | 2             | 0 | 0 | 0 | 0                    | 1 | 3 |   |
| Single cell necrosis of hepatocytes | 4     | 0       | 0 | 0 | 4 | 0     | 0 | 0 | 1 | 2              | 1 | 0 | 4 | 0             | 0 | 0 | 4 | 0                    | 0 | 0 |   |

Scores in this table are: 0, negative; 1, slight; 2, moderate; 3, marked.





**Photo 3-1.** Histopathological hepatic changes in female rats treated with E2011 for 2 weeks. HE staining,  $\times 275$ : (A) From a control rat, no pathological changes. (B) From a rat treated with E2011 (150 mg/kg) alone. Note, variation in nuclear size, enlargement of the nuclei and nucleoli (arrows), and tinctorial variability of hepatocellular cytoplasm. (C) From a rat treated with E2011 and 2,6-dichloro-4-nitrophenol (5 mg/kg, i.p.); severe pathological changes associated with single cells necrosis (arrows). (D) From a rat treated with E2011 and pentachlorophenol (10 mg/kg, i.p.); indicating clearly diminished hepatocellular changes by E2011.



## 第2節 考察

2週間にわたり毎日、各種抱合酵素阻害剤の前処置後に E2011 の 150 mg/kg を投与することにより、E2011 による肝毒性への各抱合酵素の関与を検討した。

その結果、E2011 による肝毒性に対して、DCNP と PCP (いずれも ST 阻害剤) で全く異なる修飾作用が認められた。E2011 による肝毒性は DCNP の併用により ALT および AST の上昇と TP の減少、単細胞壊死を伴って増悪したが、一方 PCP の併用では、肝細胞核の肥大等の変化は認められなかった。このことは、PCP が ST 阻害作用に加えて AT 阻害作用を併せ持つこと (49,50) に起因しており、E2011 の毒性代謝物はアセチル抱合体であると考えられた。すなわち、DCNP の前処置では、E2011 硫酸抱合体 (解毒代謝物) の生成が抑制され、その結果 E2011 アセチル抱合体 (毒性代謝物) の生成量が増えて肝毒性が増悪したが、PCP の前処置では AT も同時に阻害するので、アセチル抱合体は生成せず、毒性が減弱したものと考えられた。また、ラニチジン+E2011 群では E2011 単独投与群と毒性に差はなかったことから、E2011 のグルクロン酸抱合体が生成していないか、生成しても E2011 の肝毒性には寄与していないことが推察された。

なお、抱合酵素阻害剤のみ投与した群は設定していないが、第2章で示したようにいずれの阻害剤を2週間にわたって APAP (用量が増えると肝毒性を引き起こす) と併用した場合にも、血液生化学的パラメーターを指標とした肝あるいは腎毒性が認められなかったことから、今回認められた肝毒性への増強あるいは減弱作用は、いずれも各抱合酵素の阻害に基づき E2011 の代謝経路が変化した結果、生じたものと考えられた。

今回の2週間という投与期間は、GST-P 陽性肝小増殖巣を発現させるには十分ではなかったため、GST-P 陽性肝小増殖巣発生の原因として E2011 のアセチル抱合体が関与しているかどうかは確認できなかった。しかしながら、2週間の投与によっても13週間反復投与した場合と同様に、核小体の肥大を伴う肝細胞核の変化等が認められ、その発現過程にアセチル抱合体が大きく関与していることが示されたことから、GST-P 陽性肝小増殖巣の発現過程においても、同様にアセチル抱合体が関与している可能性が推察された。

### 第3節 小括

E2011 代謝物の一つである脱炭酸体 (芳香族アミン) が生成した後、抱合酵素により代謝活性化を受けるとする仮説に基づき、各種抱合酵素阻害剤が E2011 の肝毒性に与える影響を検討した。

その結果、E2011 の 150 mg/kg を 2 週間投与した際に認められた細胞核肥大に代表される肝毒性は、DCNP 併用により単細胞壊死を伴って増悪することが示されたが、一方、PCP 併用群では肝細胞核の肥大等の変化は消失した。このことから、E2011 による肝毒性はアセチル抱合体の生成に起因することが示唆された。

## 第4章 変異原性を指標とした E2011 の代謝活性化経路の推定

前章では酵素阻害動物モデルを用いた *in vivo* の検討を行ったが、代謝活性化に關与する酵素系を *in vitro* で再構築することで、より単純化した環境で毒性発現機序を検討することが可能である。中でも、Ames 試験に代表される細菌を用いた変異原性試験は、単に変異原や発がん性物質の検出系としての使用目的にとどまらず、その簡便性から発がん過程における代謝活性化の機序解明にも応用されている (51,52)。また、近年では、ヒト肝調製物との組み合わせや (51,53,54)、ヒトを含む様々な動物種の薬物代謝酵素の遺伝子を導入した試験菌株の樹立により (55-62)、細菌を用いた変異原性試験の有用性はさらに高まっている。

本章では、E2011 およびその関連化合物について Ames 試験を行った。前章で E2011 の毒性発現過程で AT が大きく關与していることが示されたことから、最初に Ames 試験の実施条件として、AT を含む抱合酵素の添加方法について検討を行った。その結果、AT の菌体外での添加は無効であり、菌体内で発現させる必要が示唆されたことから、*S. typhimurium* TA100 と、TA100 に AT 遺伝子を持つマルチコピープラスミドを導入し、約 100 倍高い AT 活性を持つ菌株である YG1029 (63,64) を用いて、E2011 およびその関連化合物の変異原性を比較検討し、E2011 の代謝活性化経路の推察を行った。さらに、E2011 脱炭酸体 (芳香族アミン体) と同様の機序で代謝活性化される、最もシンプルな構造の化合物として 6-ABT を選択し、代謝活性化の各段階に対する特異的阻害剤を用いた代謝経路の検証を行った。

### 第1節 硫酸抱合あるいはアセチル抱合補酵素添加による Ames 試験

#### 実験方法

##### 化合物

AT により代謝活性化される化合物として、Trp-P-2 (65) を和光純薬工業株式会社 (大阪) より、また、ST により代謝活性化される化合物として、9-HMA (53) を Lancaster Synthesis (Lancashire, UK) より、それぞれ購入した。ST 補酵素として PAPS、AT 補酵素として acetyl CoA を、いずれも Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) より購入した。また、Ames 試験で陽性対照化合物としてよく用いられている 2-AA を、和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。さらに、最小栄養培地 (クリメディア AM-N 培地) とフェノバルビタールおよび  $\beta$ -ナフトフラボン処置した雄ラット肝 S9 (誘導 S9) と、Ames 試験用 cofactor I をオリエンタル酵母工業株式会社より購入した。

その他、日本エスエルシー株式会社より購入した雌性 SD ラット 3 匹より、試験当日にラット肝 S9 を調製して (3 匹分をプール)、非誘導 S9 として用いた。

## 使用菌株

米国カリフォルニア大学バークレー校 Bruce N. Ames 博士よりご供与いただいた, *S. typhimurium* TA100 株 (2-AA) と TA98 株 (9-HMA および Trp-P-2) を使用した。各化合物について、検出感度が高いと考えられるいずれか一方の菌株を選択した。

## 試験デザイン

Ames らの方法 (66) を修飾した Hakura らのプレインキュベーション法 (37°C, 20 分) (67) により、酵素誘導の影響と、添加 S9 中に含まれる ST あるいは AT の影響を検討した。AT あるいは ST によって代謝活性化されることが知られている典型的な化合物について、誘導 S9, 非誘導 S9, 非誘導 S9+ST 補酵素, あるいは非誘導 S9+AT 補酵素存在下で、Ames 試験を行った (S9 中の ST および AT が機能するには、それぞれ補酵素が必要)。なお、いずれの系にも CYP 系の補酵素を添加した。

小試験管にリン酸 buffer あるいは S9+CYP 系の補酵素 (S9 mix) を 0.5 mL, 希釈済検体溶液 0.1 mL, 菌液 0.1 mL 加えて攪拌し, 37°C, 20 分間プレインキュベーションを行った。プレインキュベーション後, ソフトアガーを 2 mL 加え, 攪拌してクリメディア AM-N 培地にまいた。ソフトアガーが固まった後, インキュベーターへ入れ, 37°C, 48 時間培養し, 現れた復帰変異コロニーを計数した。

S9 のタンパク濃度は, プレインキュベーション時に 2 mg/mL となるように調整した。また CYP 系の補酵素として, オリエンタル酵母工業株式会社 (東京) より購入した cofactor I を用いた (S9 mix 中濃度として, 100 mM リン酸バッファー (pH 7.4), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 4 mM NADPH, 4 mM NADH, 5 mM G-6-P を含む)。さらに必要に応じて, ST の補酵素として 0.6 mM PAPS, AT の補酵素として 1 mM Acetyl CoA および 1 mM DTT (酵素の安定化剤) を, それぞれ加えた (いずれもプレインキュベーション時の濃度として表示した)。

## 結果

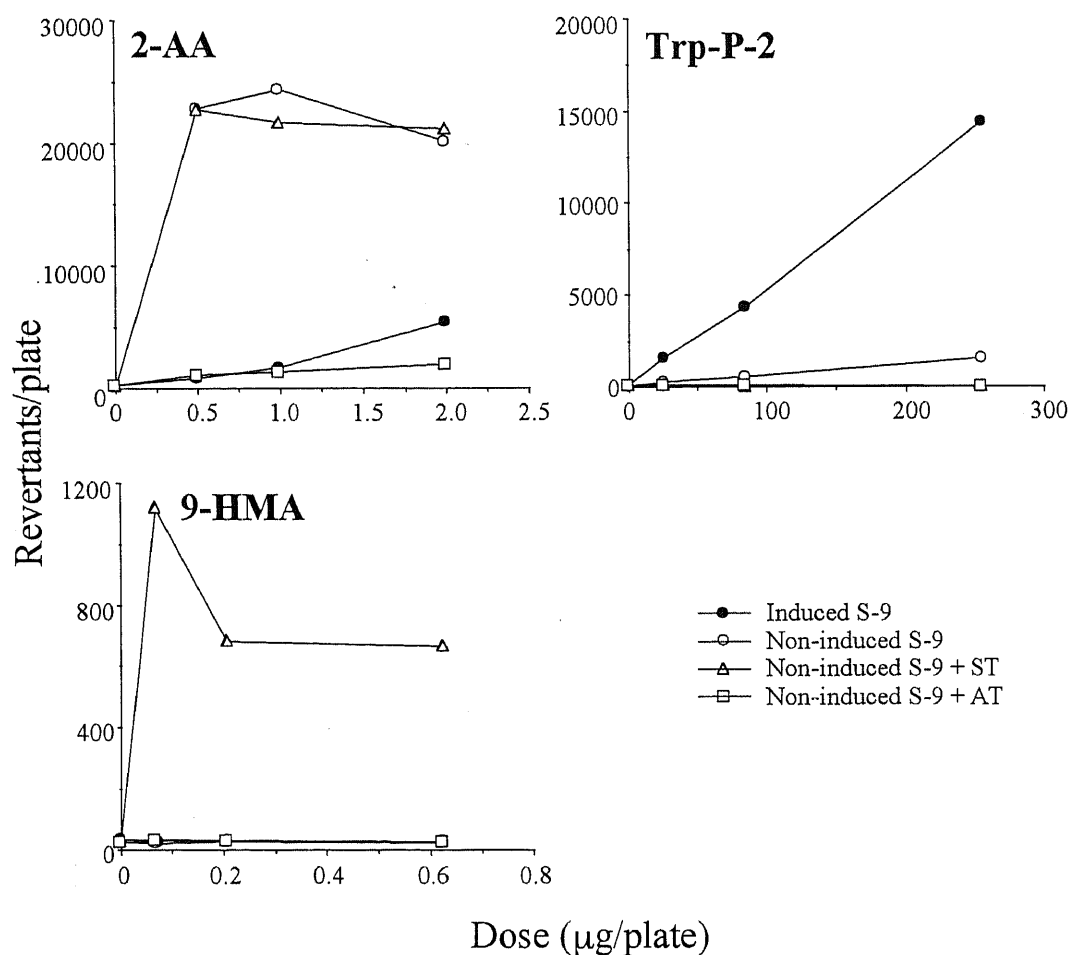
Fig. 4-1 に結果を示した。AT により代謝活性化される化合物として, Trp-P-2 は誘導 S9 および非誘導 S9 を用いた場合いずれも変異原性を示したが, その活性は誘導 S9 を用いた方が約 10 倍高かった。一方, 非誘導 S9 に ST 補酵素あるいは AT 補酵素を添加した場合, ST 補酵素の添加による影響はなかったが, AT 補酵素の添加によって非誘導 S9 単独に比べて活性が約 1/5 に低下した。

2-AA は誘導 S9 および非誘導 S9 を用いた場合のいずれも変異原性を示したが, 変異原性は非誘導 S9 を用いた方が約 40 倍高かった。また Trp-P-2 と同様に, 非誘導 S9 への ST 補酵素の添加による影響はなかったが, AT 補酵素の添加により非誘導 S9 単独に比べて変異原性が約 1/30 に低下した。

一方, ST により代謝活性化されることが知られている化合物として, 9-HMA は誘導 S9 および非誘導 S9 いずれでも変異原性を示さなかった。9-HMA は非誘導 S9 に ST 補酵素を

添加した場合に変異活性が検出されたが、AT 補酵素の添加によっては変異原性を示さなかった。

以上の結果より、AT により代謝活性化される化合物は、AT 補酵素を菌体外に添加することで、むしろ変異原性が低下してしまうことが示されたことから、AT を菌体内で作用させる必要性が示唆された。その一方で、ST により代謝活性化される化合物は、ST 補酵素を菌体外から添加することにより、効率よく変異原性を検出できることが示された。



**Fig. 4-1.** Mutagenicity results of 2-AA, Trp-P-2 and 9-HMA in various metabolic activation systems employed in the Ames test.

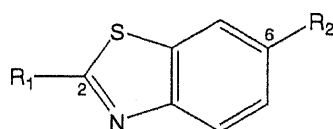
## 第2節 E2011 およびその関連化合物の *S. typhimurium* を用いた Ames 試験

### 実験方法

#### 化合物

E2011 (第1章, 第1節) と, エーザイ株式会社 創薬技術研究所にて合成した E2011 関連化合物 (ER-174238-00, ER-174237-00, ER-120923-00 および ER-120921-00), そして Lancaster 社より購入した 6-ABT (E2011 母核構造) を用いた。それぞれの化学構造および純度を Table 4-1 に示した。

Table 4-1. Chemicals tested in this study.



| Chemical     | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>   | Purity (%) |
|--------------|----------------|------------------|------------|
| E2011        |                |                  | 99.4       |
| ER-174238-00 |                |                  | 100        |
| ER-174237-00 |                | -NH <sub>2</sub> | 100        |
| ER-120923-00 | H              |                  | 98.3       |
| ER-120921-00 | H              |                  | 97.6       |
| 6-ABT        | H              | -NH <sub>2</sub> | > 98       |

#### 使用菌株

*S. typhimurium* TA100 株 (本章, 第1節), および国立衛生試験所変異遺伝部 能美健彦博士よりご供与いただいた *S. typhimurium* YG1029 株を用いた。なお YG1029 は, AT 遺伝子を持つマルチコピープラスミドを TA100 に導入した菌株であり, 元株より約 100 倍高い AT 活性を示すことが知られている (63,64)。

#### 試験デザイン

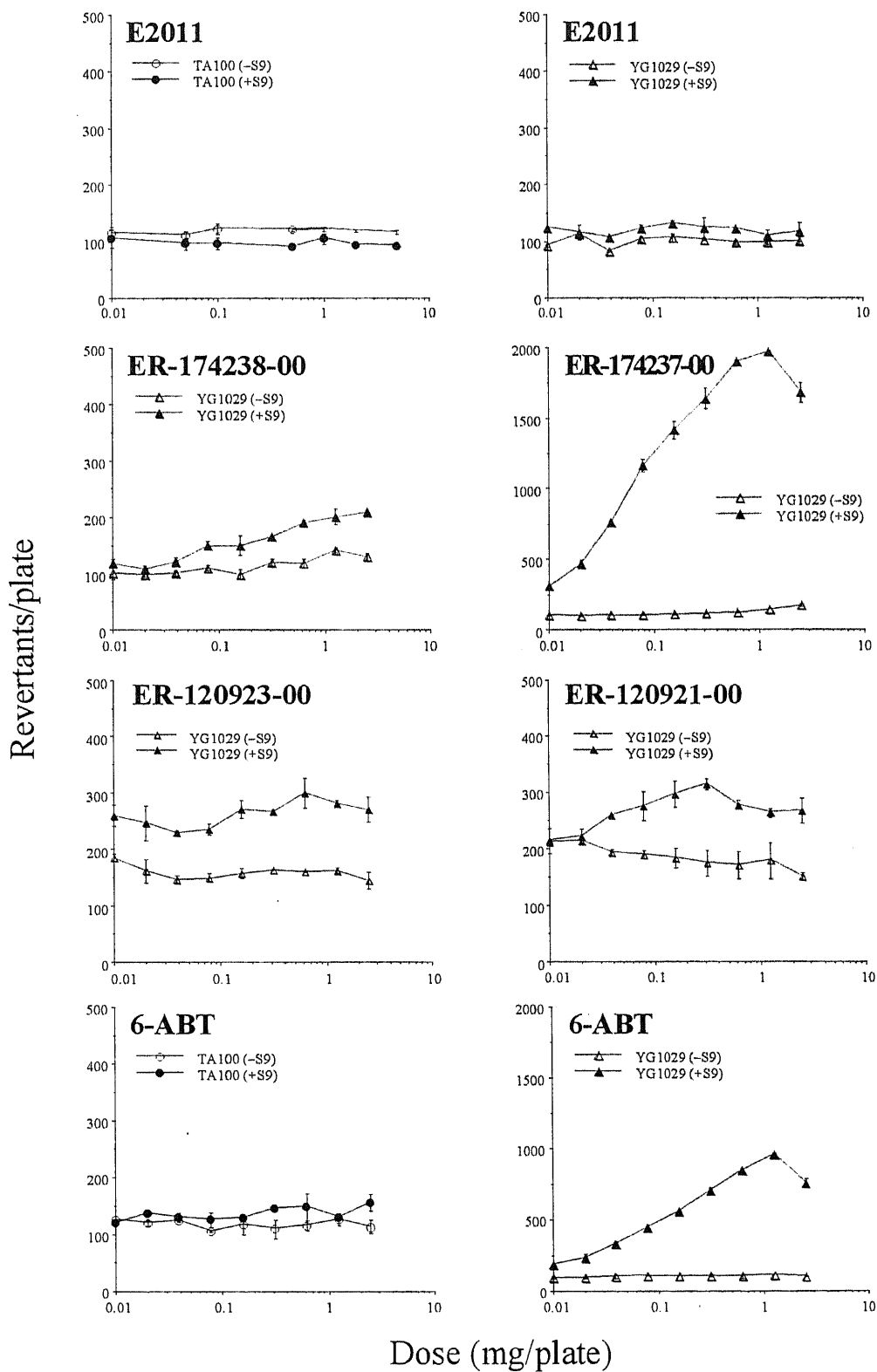
プレインキュベーション法で, S9 mix の存在下および非存在下にて試験を行った。実験方法は, 第4章, 第1節に従った。

## 結果

Fig. 4-2に、E2011, ER-120923-00, ER-120921-00, ER-174238-00, ER-174237-00および6-ABTの *S. typhimurium* TA100 あるいは YG1029 における変異原性を検討した結果を示した。3級アミンである E2011 は、TA100 および YG1029 いずれの試験菌株においても S9 mix の有無に関わらず変異原性を示さなかった。また、2級アミンである ER-174238-00 (E2011 脱炭酸体) は、YG1029 において S9 mix 存在下で弱いながら変異原性を示した。さらに、ER-174238-00 が *N*-脱アルキルした構造を持つ、1級アミンの ER-174237-00 は、YG1029 において S9 mix 依存的に強力な変異原性を示した。

一方、E2011 の R<sub>1</sub> 部分を水素原子に置換した構造を持つ ER-120923-00 は、YG1029 株で S9 mix の有無に関わらず陰性であったが、ER-120923-00 の脱炭酸体である ER-120921-00 は、YG1029 株で S9 mix 依存的に弱いながら変異原性が認められた。さらに、6-ABT (E2011 の母核構造) は、TA100 株では陰性であったが、YG1029 で S9 mix 存在下、変異原性が認められた。6-ABT と前述の ER-174237-00 はいずれも強力な変異原であるが、ER-174237-00 の方が約 2 倍高い変異原性を示したことから、E2011 の R<sub>1</sub> 部分のアルキル側鎖は変異原性の強さを修飾する効果を有していることが示された。

以上の結果より、E2011 は脱炭酸により変異原性を発現し、さらに *N*-脱アルキルされることで、より強力な変異原へと変換されることが示された。また、E2011 脱炭酸体 (芳香族アミン体) の変異原性は、S9 mix および AT 依存的な変異原性の結果から、最もシンプルな構造である 1級アミン (6-ABT) によって代表されることが考えられた。



**Fig. 4-2.** Mutagenicity results of the benzothiazole derivatives in the tester strains TA100 and YG1029. Data are represented as mean  $\pm$  standard error.



### 第3節 YG1029株で検出された6-ABTの変異原性に関する要因の検討

#### 実験方法

##### 化合物

6-ABT (第4章, 第2節) および ST および AT 阻害剤としての PCP (第2章, 第2節) に加えて, CYP の非特異的阻害剤として SKF-525A, CYP1A 阻害剤として  $\alpha$ -NF, FMO 阻害剤として MTZ, そしてラジカルスカベンジャーとして MEL, MTZ および GSH をいずれも Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) より, 阻害試験用 anti-rat CYP1A2 抗体 (抗血清) を第一化学薬品株式会社 (東京) より, それぞれ購入した。

##### 使用菌株

*S. typhimurium* YG1029 株 (第4章, 第2節) を用いた。

##### 試験デザイン

プレインキュベーション法で, S9 mix 存在下, 6-ABT の変異原性が確実に把握できる条件下 (0.1 mg/plate) で, 種々の阻害剤の影響を検討した。

小試験管に S9-mix を 0.5 mL, 各阻害剤 (抗血清およびコントロール用正常血清を除く) の DMSO 溶液を 0.05 mL, 希釈済検体溶液 0.05 mL, 菌液 0.1 mL 加えて攪拌し, 37°C, 20 分間プレインキュベーションを行った。その後の操作は, 第4章, 第1節に記載した方法に従った。

抗血清および正常血清については, S9 0.05 mL と抗血清あるいは正常血清 0.05 mL を室温で 30 分間反応させ, cofactor を 0.45 mL 加えた後, 希釈済検体溶液 0.05 mL, 菌液 0.1 mL 加えて攪拌し, 37°C, 20 分間プレインキュベーションを行った。

対照群, 各阻害剤添加群それぞれについて, 6-ABT を添加した値から添加しない値を差し引いた後, 各阻害剤添加群の値を対照群の値で割って, 阻害率を算出した。

#### 結果

今回用いた阻害剤自身の変異原性について検討した結果を, Table 4-2 にまとめた。 $\alpha$ -NF の 10  $\mu$ M および 1 mM は, Control に対してそれぞれ 1.4 倍および 1.7 倍 (疑陽性) であった。また PCP の 1 mM では, 化合物の細胞毒性により測定不能であった。その他の化合物には, 変異原性は認められなかった。

6-ABT の変異原性に対するこれらの阻害剤の影響を, Table 4-3 にまとめた。6-ABT の変異原性は, 非特異的 CYP 阻害剤である SKF-525A, CYP1A の特異的阻害剤である  $\alpha$ -NF および CYP1A2 抗体, ST および AT の阻害剤である PCP, ラジカルスカベンジャーである MEL により抑制されたが, 一方 FMO 阻害剤である MTZ や, 別のラジカルスカベンジャーである MTN および GSH は 6-ABT の変異原性を抑制しなかった。

なお、前述のように  $\alpha$ -NF の変異原性は疑陽性であったが、E2011/A の変異原性に対してむしろ抑制的な効果を発揮したことから、目的通り CYP1A の阻害剤として機能したと判断した。

Table 4-2. Mutagenicity of inhibitors tested in this study in *S. typhimurium* YG1029.

| Inhibitor       | Concentration     | Revertants per plate | % of control |
|-----------------|-------------------|----------------------|--------------|
| Control         | ---               | 117                  | ---          |
| SKF-525A        | 10 $\mu$ M        | 137                  | 117.1        |
|                 | 1 mM              | 78                   | 66.7         |
| $\alpha$ -NF    | 10 $\mu$ M        | 164                  | <b>140.2</b> |
|                 | 1 mM              | 200                  | <b>170.9</b> |
| CYP1A2 antibody | --- <sup>a)</sup> | 155                  | 132.5        |
| MTZ             | 10 $\mu$ M        | 100                  | 85.5         |
|                 | 1 mM              | 124                  | 106.0        |
| PCP             | 10 $\mu$ M        | 143                  | 122.2        |
|                 | 1 mM              | — <sup>b)</sup>      | —            |
| MEL             | 10 $\mu$ M        | 99                   | 84.6         |
|                 | 1 mM              | 129                  | 110.3        |
| MTN             | 10 $\mu$ M        | 124                  | 106.0        |
|                 | 1 mM              | 138                  | 117.9        |
| GSH             | 10 $\mu$ M        | 140                  | 119.7        |
|                 | 1 mM              | 134                  | 114.5        |

a) S9 protein suspension (22.3 mg/mL) was incubated with the antiserum at the ratio of 1:4 (at room temperature). b) Cytotoxic.

Table 4-3. Effects of various inhibitors towards 6-ABT mutagenicity in YG1029.

| Inhibitors      | Concentration     | Revertants per plate | Inhibitory rate (%) |
|-----------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| Control         | ---               | 988                  | —                   |
| SKF-525A        | 10 $\mu$ M        | 910                  | 88.7                |
|                 | 1 mM              | 145                  | <b>7.7</b>          |
| $\alpha$ -NF    | 10 $\mu$ M        | 373                  | <b>24.0</b>         |
|                 | 1 mM              | 238                  | <b>4.4</b>          |
| CYP1A2 antibody | --- <sup>a)</sup> | 259                  | <b>11.9</b>         |
| MTZ             | 10 $\mu$ M        | 903                  | 92.2                |
|                 | 1 mM              | 813                  | 79.1                |
| PCP             | 10 $\mu$ M        | 686                  | <b>62.3</b>         |
|                 | 1 mM              | — <sup>b)</sup>      | —                   |
| MEL             | 10 $\mu$ M        | 911                  | 93.2                |
|                 | 1 mM              | 541                  | <b>47.3</b>         |
| MTN             | 10 $\mu$ M        | 869                  | 85.5                |
|                 | 1 mM              | 1118                 | 112.5               |
| GSH             | 10 $\mu$ M        | 1018                 | 100.8               |
|                 | 1 mM              | 908                  | 88.9                |

a) S9 protein suspension (22.3 mg/mL) was incubated with the antiserum at the ratio of 1:4 (at room temperature). b) Cytotoxic.

#### 第4節 考察

Ames 試験への抱合酵素添加方法の検討では、AT により代謝活性化される化合物である Trp-P-2 の変異原性は、誘導 S9 および非誘導 S9 いずれにおいても検出されたが (誘導>非誘導)、AT 補酵素の菌体外への添加により活性の低下が認められた。2-AA の変異原性も Trp-P-2 同様、誘導 S9 および非誘導 S9 いずれの存在下でも検出され (誘導<非誘導)、AT 補酵素の菌体外添加により活性が低下した。一方で、ST により代謝活性化される化合物である 9-HMA の変異原性は、誘導 S9 および非誘導 S9 いずれにおいても検出されなかったが、ST 補酵素を菌体外添加することにより検出された。

これらの結果は、Saito らの *N*-OH-Glu-P-1 を用いた実験結果 (68) と一致しており、S9 画分に含まれる AT と外部添加した補酵素により生成した代謝物 (アセチル抱合体) が不安定であり、菌体外で S9 中に含まれるタンパク等と速やかに反応してしまったため、菌体内の遺伝子 DNA 近傍に到達せず、傷害を与えることができなかったと推察された (21,69,70)。その一方で、菌体外で ST と外部添加した補酵素により生成した代謝物 (硫酸抱合体) は比較的安定であり、菌体内へ移行して遺伝子 DNA に傷害を与える時間的な余裕があったと考えられた。したがって、AT の関与する代謝活性化の場合は、菌体内でアセチル抱合反応が起こるような環境、すなわち菌体内で AT を高いレベルで発現させる必要が考えられたが、ST の関与する代謝活性化の場合は、Glatt らが報告しているように (53,71,72)、S9 としての ST の供給と菌体外への補酵素の添加により、目的の反応が行われることが示された。

なお、誘導 S9 と非誘導 S9 による変異活性の強弱が Trp-P-2 と 2-AA で異なっていたが、これは誘導剤として用いたフェノバルビタールと  $\beta$ -ナフトフラボンによって誘導された薬物代謝酵素が各変異原の活性化に関与する分子種であるか、あるいは解毒方向に働くものであるかによると考えられた。

次に、E2011 関連化合物について *S. typhimurium* TA100 株とその AT 高発現株である YG1029 株を用いて変異原性の比較検討 (構造活性相関) を行い、E2011 の代謝活性化経路の推察を行った。その結果、3 級アミンである E2011 はいずれの菌株においても陰性であったが、2 級アミンの ER-174238-00 (E2011 脱炭酸体) は YG1029 において S9 mix 存在下で弱いながら変異原性を示し、1 級アミンの ER-174237-00 は YG1029 において S9 mix 依存的に強力な変異原性を示した。さらに E2011 の R<sub>1</sub> 部分を水素原子に置換した構造を持つ化合物の YG1029 株における結果から、E2011 の R<sub>1</sub> 部分のアルキル側鎖は変異原性の強さを増強する効果を有していることが示された。したがって、E2011 は脱炭酸により通常の Ames 試験で検出できない潜在的なイニシエーション活性を発現し、さらに *N*-脱アルキルされることで、より強力な変異原へと変換されることが示された。その際、S9 中に含まれる CYP と、YG1029 菌株で発現した AT が代謝活性化に関与することが示された。また、E2011 脱炭酸体 (芳香族アミン体) の変異原性は、S9 mix および AT 依存的な変異原性の結果から、最もシンプルな構造である 1 級アミン (6-ABT) によって代表されると考えられた。

さらに、この 6-ABT を用いて、代謝活性化の各段階に対する特異的阻害剤を用いた 6-ABT 代謝経路の検証を行った結果、6-ABT の変異原性は、非特異的 CYP 阻害剤である SKF-525A、CYP1A の特異的阻害剤である  $\alpha$ -NF および CYP1A2 抗体、ST および AT の阻害剤である PCP、ラジカルスカベンジャーである MEL により抑制されたが、一方 FMO 阻害剤である MTZ、別のラジカルスカベンジャーである MTN および GSH は 6-ABT の変異原性を抑制しなかった。PCP の抑制効果は ST ないしは AT の関与の関与を示唆するものであったが、本章、第 1 節の結果より、9-HMA のように ST を介して変異原性を発現する化合物を Ames 試験で検出する場合、試験系に菌体外から補酵素を添加する必要があることから、ST の関与はなく、AT の関与のみであると判断した。したがって、6-ABT の代謝活性化経路は一般的な芳香族アミンと同様、CYP (特に 1A アイソザイム) による水酸化、AT による水酸基のアセチル化、そして脱アセチル後のニトレンウムイオン発生の 3 段階を含むことが示唆された。

なお、今回用いた阻害剤のうち、MTZ による明らかな変異原性の抑制効果が認められなかったことから、6-ABT の変異原性発現には FMO が関与していないことが考えられた。この結果は、FMO が主として芳香族 2 級アミンの代謝活性化に関与するという報告 (73) と一致すると考えられた。また、ラジカルスカベンジャーのうち MTN および GSH による変異原性抑制効果は認められなかったが、一方で MEL による抑制効果は認められていることから、MTN および GSH が *S. typhimurium* の菌体内 (DNA 近傍) に効果的に移行しなかったか、あるいはそれぞれのラジカルスカベンジャーが効果的に反応する反応中間体が異なっており (74)、E2011 の代謝活性化体に対して MEL のみ有効であったと推察された。

以上の結果は、第 3 章で認められた *in vivo* の AT 阻害作用に基づく肝毒性の抑制効果と一致し、E2011 代謝活性化の仮説を支持するものと考えられた。すなわち、*in vitro* の細菌を用いた実験により、E2011 は脱炭酸の後、CYP1A、AT の関与およびニトレンウムイオンの発生により変異原性を発現することが示唆され、このことが肝細胞の核肥大や GST-P 陽性小増殖巣といった発がんに関連する肝毒性発現に結びついた可能性が考えられた。

## 第5節 小括

E2011 およびその関連化合物について、抱合反応を考慮した変異原性試験を行い、E2011の代謝活性化について検討を行った。

E2011 は脱炭酸により潜在的なイニシエーション活性を発現し、さらに *N*-脱アルキルされることで、より強力な変異原へと変換されることが示された。その際、CYP および AT が代謝活性化に関与することが示された。また、E2011 脱炭酸体 (芳香族アミン体) と同様の性質を持つと考えられる1級アミン (6-ABT) の変異原性発現には CYP1A, AT およびニトレンウムイオン発生が関与することが示された。

この結果は、第3章で認められた *in vivo* の AT 阻害作用に基づく肝毒性の抑制効果と一致し、E2011 代謝活性化の仮説を支持すると考えられた。すなわち、*in vitro* の細菌を用いた変異原性試験により、E2011 は潜在的に変異原性を有していることが示唆されたが、このことが肝細胞の核肥大や GST-P 陽性小増殖巣といった発がんに関連する肝毒性発現に結びついた可能性が考えられた。

## 第5章 E2011をラットに長期反復投与した際の肝臓の変化

E2011のラットにおける13週間反復投与試験では、病理組織学的検査で肝細胞において核小体の顕在化を伴う核肥大が認められ、雌ではさらに変異細胞巢の顕著な増加が認められた。この結果より、E2011が発がん性を有する可能性が危惧されたことから、E2011をさらに長期間投与した際に、前がん病変である変異細胞巢が腫瘍化するかどうかを探った。

本章では、雌雄ラットにE2011の3、10、30あるいは100 mg/kgを52週間にわたって経口反復投与した結果について記述した。また、26週間反復投与の時点と、26週間反復投与後に13週間休薬を行った時点で剖検を行い、変異細胞巢の経時的な変化についても詳細な検討を行った。

### 第1節 E2011のラットにおける52週間反復投与による肝毒性

#### 実験方法

##### 化合物

E2011(第1章, 第1節)を用いた。

##### 動物

4週齢の雌雄SDラットを日本エスエルシー株式会社より導入し、2週間の検疫期間および2日間の馴化期間を実施した後、体重による層別化法で群分けを行い、7週齢で実験に使用した。動物の飼育方法は、第1章, 第1節に記載した。

##### 試験デザイン

52週間反復投与試験では、雌雄各60匹の動物を12匹ずつ5群に分け、対照群とE2011投与群を4群、すなわち3、10、30および100 mg/kg群を設定した。26週間反復投与試験では、雌雄各72匹の動物を18匹ずつ4群に分け、対照群とE2011投与群を3群、すなわち10、30、100 mg/kg群を設定した。26週反復投与試験に用いた動物のうち、各群の6匹については、13週間の休薬期間を設けた。E2011の調製法は、第1章, 第1節に記載した(ただし、2 mL/kgの投与容量となるように各懸濁液を調製した)。

##### 観察, 測定および検査

投与開始日を1日目と起算し、以下の観察, 測定および検査を実施した。

###### (1) 一般観察

動物の一般状態について、投与期間を通じて毎日観察した。体重は、1, 2, 4日目およびそ

の後週 1 回測定した。摂餌量は、1, 2, 4 日目およびその後週 1 回、ケージ単位で前日セットした量から残餌量を差し引いて計算し、一匹当たりの摂餌量を算出した。

## (2) 剖検および病理組織学的観察

各投与期間および休薬期間終了後、動物を一昼夜絶食させて、ペントバルビタール麻酔下で採血して致死させた後、剖検を行った。死亡例については、発見の都度剖検した。

肝について、H&E 染色と、ウサギ抗ラット GST-P 抗体を用いた ABC 法による免疫染色を施した組織標本を作製して、病理組織学的検査を行った。GST-P 陽性小増殖巣の測定法は、第 1 章、第 1 節に記載した。

なお、100 mg/kg 群の数例で血管内皮細胞由来と考えられる腫瘍が認められたため、確定診断を得るためマウス抗ブタビメンチン抗体を用い、ABC 法による免疫染色を実施した。

## 結果

### 一般観察

100 mg/kg 群では、実験期間中 (45 および 51 週目) に 2 例の雄が途中死亡した。剖検の結果、いずれの個体においても腹腔内出血が認められたことから、肝臓に形成された血腫の破綻による失血死と考えられた。その他、100 mg/kg の雌雄で軽度な体重増加抑制作用が認められたが、一般状態および摂餌量の変動は認められなかった。

対照群の雌 2 例 (23 および 30 週目)、30 mg/kg 群の雄 1 例 (16 週目) でも途中死亡あるいは切迫屠殺例があったが、いずれも自然発生的な腫瘍に起因するものと考えられた。

### 剖検時肉眼所見

26 週間反復投与後の剖検では、100 mg/kg 群の雌で肝の白色点あるいは白色斑が認められた。これらの病変は、13 週間の休薬により消失する傾向を示した。52 週間反復投与後の剖検では、白色点や白色斑は 26 週間投与時に比較して増加する傾向がみられ、特に 100 mg/kg 群の雌雄では多発性に認められた。

### 病理組織学的観察 (非腫瘍性病変)

26 週間投与群、26 週間投与+13 週間休薬群、および 52 週間投与群の病理組織学的検査の結果を、それぞれ Table 5-1~5-3 に示した (途中死亡および切迫屠殺例は除外した)。26 および 52 週間反復投与した 30 mg/kg 以上の雌雄で、13 週間反復投与した際と同様に、肝細胞核の肥大や、肝細胞内およびクッパー細胞内のコレステリン様針状結晶が認められた。また、100 mg/kg の雌雄の肝臓では、肉眼的な白色点あるいは白色斑に一致して変異細胞巣が認められた。変異細胞巣は、26 週間反復投与の雌の 100 mg/kg 群、52 週間反復投与の雌の 100 mg/kg 群と雄の 30 および 100 mg/kg 群で、対照群よりも高い頻度で発現していた。一方、26 週間反復投与+13 週間休薬では、雌の 100 mg/kg 群で対照群よりも高い頻度で変

異細胞巣が発現しており、前述の26週間の結果と合わせて考えると、変異細胞巣は回復性がないものと考えられた。

**Table 5-1.** Summary of histopathology findings of rats at the end of 26-week repeated dose of E2011.

| Organs Findings                 | Group (mg/kg) Grade | Male    |   |    |   |    |   |     |    | Female  |   |    |   |    |   |     |    |
|---------------------------------|---------------------|---------|---|----|---|----|---|-----|----|---------|---|----|---|----|---|-----|----|
|                                 |                     | Control |   | 10 |   | 30 |   | 100 |    | Control |   | 10 |   | 30 |   | 100 |    |
|                                 |                     | -       | + | -  | + | -  | + | -   | +  | -       | + | -  | + | -  | + | -   | +  |
|                                 | <i>No. examined</i> | 12      |   | 12 |   | 12 |   | 12  |    | 12      |   | 12 |   | 12 |   | 12  |    |
| Liver                           |                     |         |   |    |   |    |   |     |    |         |   |    |   |    |   |     |    |
| Crystalline rods in hepatocytes |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 9   | 3  | 12      | 0 | 12 | 0 | 9  | 3 | 5   | 7  |
| Cell aggregation <sup>a</sup>   |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 11  | 1  | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 8   | 4  |
| Enlarged nucleus of hepatocytes |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 9  | 3 | 0   | 12 | 12      | 0 | 12 | 0 | 7  | 5 | 0   | 12 |
| Altered cell foci               |                     | 10      | 2 | 9  | 3 | 8  | 4 | 10  | 2  | 11      | 1 | 12 | 0 | 10 | 2 | 1   | 11 |
| Focal necrosis                  |                     | 12      | 0 | 11 | 1 | 10 | 2 | 12  | 0  | 11      | 1 | 12 | 0 | 12 | 0 | 12  | 0  |
| Granuloma                       |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 11 | 1 | 12  | 0  | 11      | 1 | 10 | 2 | 10 | 2 | 11  | 1  |

**Table 5-2.** Summary of histopathology findings of rats at the end of 26-week repeated dose of E2011 with 13 weeks of maintenance.

| Organs Findings                 | Group (mg/kg) Grade | Male    |   |    |   |    |   |     |   | Female  |   |    |   |    |   |     |   |
|---------------------------------|---------------------|---------|---|----|---|----|---|-----|---|---------|---|----|---|----|---|-----|---|
|                                 |                     | Control |   | 10 |   | 30 |   | 100 |   | Control |   | 10 |   | 30 |   | 100 |   |
|                                 |                     | -       | + | -  | + | -  | + | -   | + | -       | + | -  | + | -  | + | -   | + |
|                                 | <i>No. examined</i> | 6       |   | 6  |   | 6  |   | 6   |   | 6       |   | 6  |   | 6  |   | 6   |   |
| Liver                           |                     |         |   |    |   |    |   |     |   |         |   |    |   |    |   |     |   |
| Cell aggregation <sup>a</sup>   |                     | 6       | 0 | 6  | 0 | 6  | 0 | 6   | 0 | 6       | 0 | 6  | 0 | 6  | 0 | 4   | 2 |
| Enlarged nucleus of hepatocytes |                     | 6       | 0 | 6  | 0 | 6  | 0 | 5   | 1 | 6       | 0 | 6  | 0 | 6  | 0 | 0   | 6 |
| Altered cell foci               |                     | 4       | 2 | 5  | 1 | 4  | 2 | 5   | 1 | 6       | 0 | 6  | 0 | 6  | 0 | 3   | 3 |
| Focal necrosis                  |                     | 6       | 0 | 6  | 0 | 5  | 1 | 6   | 0 | 6       | 0 | 6  | 0 | 6  | 0 | 6   | 0 |
| Granuloma                       |                     | 2       | 4 | 2  | 4 | 2  | 4 | 0   | 6 | 6       | 0 | 3  | 3 | 4  | 2 | 2   | 4 |

**Table 5-3.** Summary of histopathology findings of rats at the end of 52-week repeated dose of E2011.

| Organs Findings                    | Group (mg/kg) Grade | Male    |   |    |   |    |   |    |    |     |    | Female  |   |    |   |    |   |    |   |     |    |
|------------------------------------|---------------------|---------|---|----|---|----|---|----|----|-----|----|---------|---|----|---|----|---|----|---|-----|----|
|                                    |                     | Control |   | 3  |   | 10 |   | 30 |    | 100 |    | Control |   | 3  |   | 10 |   | 30 |   | 100 |    |
|                                    |                     | -       | + | -  | + | -  | + | -  | +  | -   | +  | -       | + | -  | + | -  | + | -  | + | -   | +  |
|                                    | <i>No. examined</i> | 12      |   | 12 |   | 12 |   | 11 |    | 10  |    | 11      |   | 12 |   | 12 |   | 12 |   | 12  |    |
| Liver                              |                     |         |   |    |   |    |   |    |    |     |    |         |   |    |   |    |   |    |   |     |    |
| Crystalline rods in hepatocytes    |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 11 | 0  | 9   | 1  | 11      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 7   | 5  |
| Crystalline rods in Kupffer's cell |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 9  | 2  | 8   | 2  | 11      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 9  | 3 | 5   | 7  |
| Enlarged nucleus of hepatocytes    |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 9  | 2  | 0   | 10 | 11      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 6  | 6 | 0   | 12 |
| Altered cell foci                  |                     | 9       | 3 | 9  | 3 | 7  | 5 | 2  | 9  | 0   | 10 | 7       | 4 | 9  | 3 | 7  | 5 | 7  | 5 | 0   | 12 |
| Single cell necrosis               |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 11 | 0  | 9   | 1  | 11      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 11  | 1  |
| Focal necrosis                     |                     | 12      | 0 | 11 | 1 | 12 | 0 | 9  | 2  | 10  | 0  | 11      | 0 | 11 | 1 | 11 | 1 | 12 | 0 | 12  | 0  |
| Granuloma                          |                     | 4       | 8 | 4  | 8 | 5  | 7 | 0  | 11 | 7   | 3  | 3       | 8 | 4  | 8 | 4  | 8 | 6  | 6 | 1   | 11 |
| Hemangiosarcoma                    |                     | 12      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 11 | 0  | 9   | 1  | 11      | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 11  | 1  |

Note: -, negative, +; positive.

a: with crystalline rods, sinusoidal.

#### 病理組織学的観察（GST-P 陽性細胞巣の推移）

Fig. 5-1~5-3 に、単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巣の数および面積、GST-P 陽性細胞巣 1 個当たりの面積の推移を示した。Fig. 5-1 に示すように、単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巣の数は、雄では 26 週間反復投与後、26 週間反復投与後に 13 週間休薬を設けた場合、そして 52 週間反復投与後いずれにおいても 30 mg/kg で最も多く、それぞれ 1 cm<sup>2</sup> 当たり 5.57、

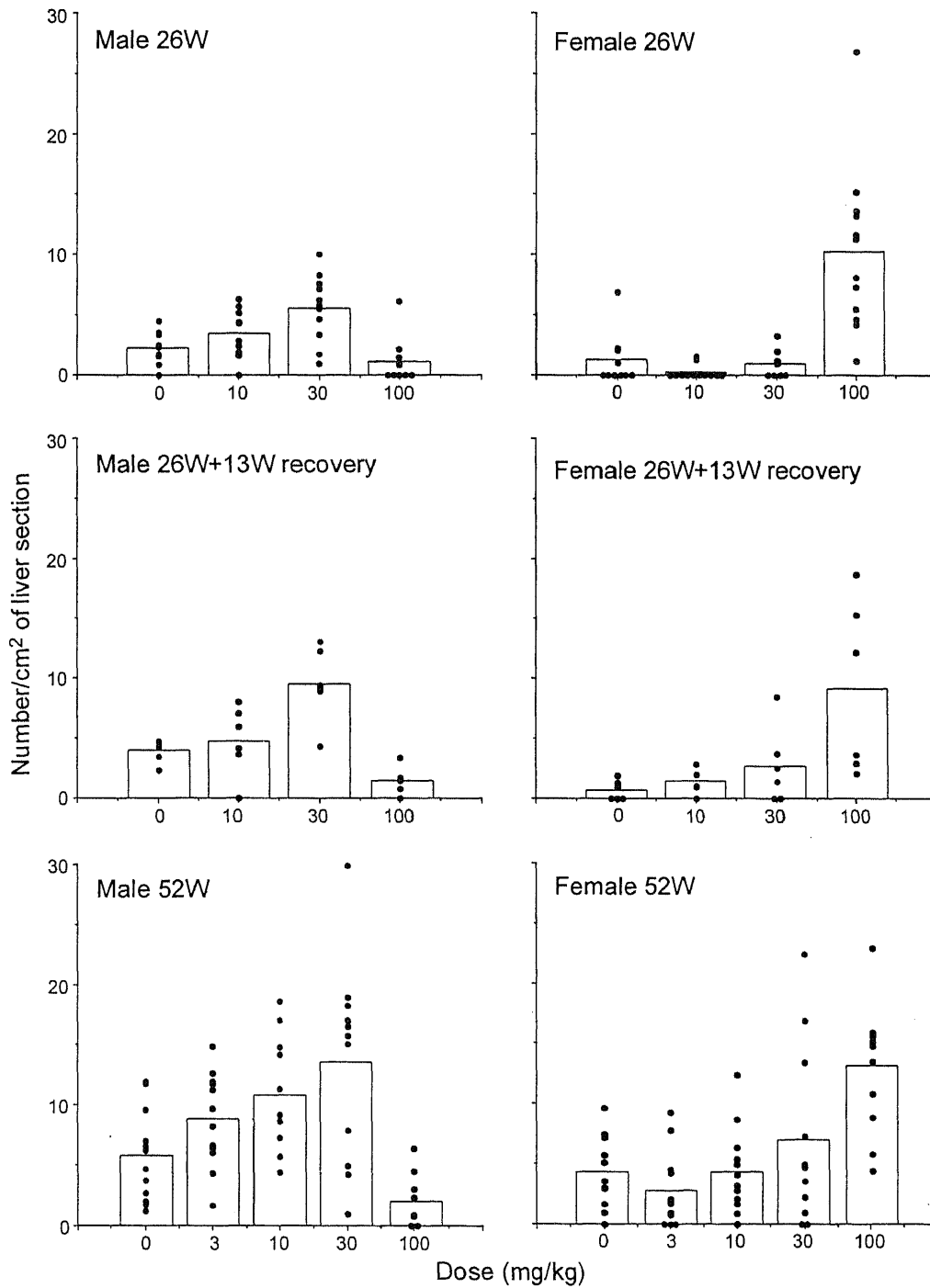


9.52, 13.58 個であり、いずれにおいても 100 mg/kg 群は対照群より少なかった。これに対して雌では、いずれの投与期間においても、100 mg/kg 群で最も GST-P 陽性細胞巣が多く、26 週間反復投与後、26 週間反復投与後に 13 週間休薬を設けた場合、そして 52 週間反復投与後でそれぞれ 10.26, 9.14, 13.18 個であった。雌雄いずれも、対照群も含めて、26 週間から 52 週間への投与期間が長くなるにつれ GST-P 陽性細胞巣が増加したが、休薬による減少は認められなかった。単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巣は雌雄で差はなかった。

また、Fig. 5-2 に示すように、単位面積当たりの GST-P 陽性細胞巣の面積は、雌の 100 mg/kg 群で際だって高い値を示した。雌の 100 mg/kg 群では、GST-P 陽性細胞巣は 26 週間反復投与後  $6,373 \times 10^2 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$  であったが、52 週間への投与期間の延長に伴い  $57,123 \times 10^2 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$  となり、10 倍近く面積が拡大した。また 100 mg/kg 群の雌では、26 週間反復投与後、13 週間の休薬により、GST-P 陽性細胞巣の面積は約半分に減少した。雄では、26 週間反復投与後、あるいは 26 週間反復投与後に 13 週間回復期間を設けた場合、対照群を含めいずれの群においても GST-P 陽性細胞巣の面積は  $1,000 \times 10^2 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$  以下であり、52 週間反復投与後に 100 mg/kg 群で  $5,286 \times 10^2 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$  となったが、この数値も雌の 26 週間反復投与での 100 mg/kg 群より低い値であった。

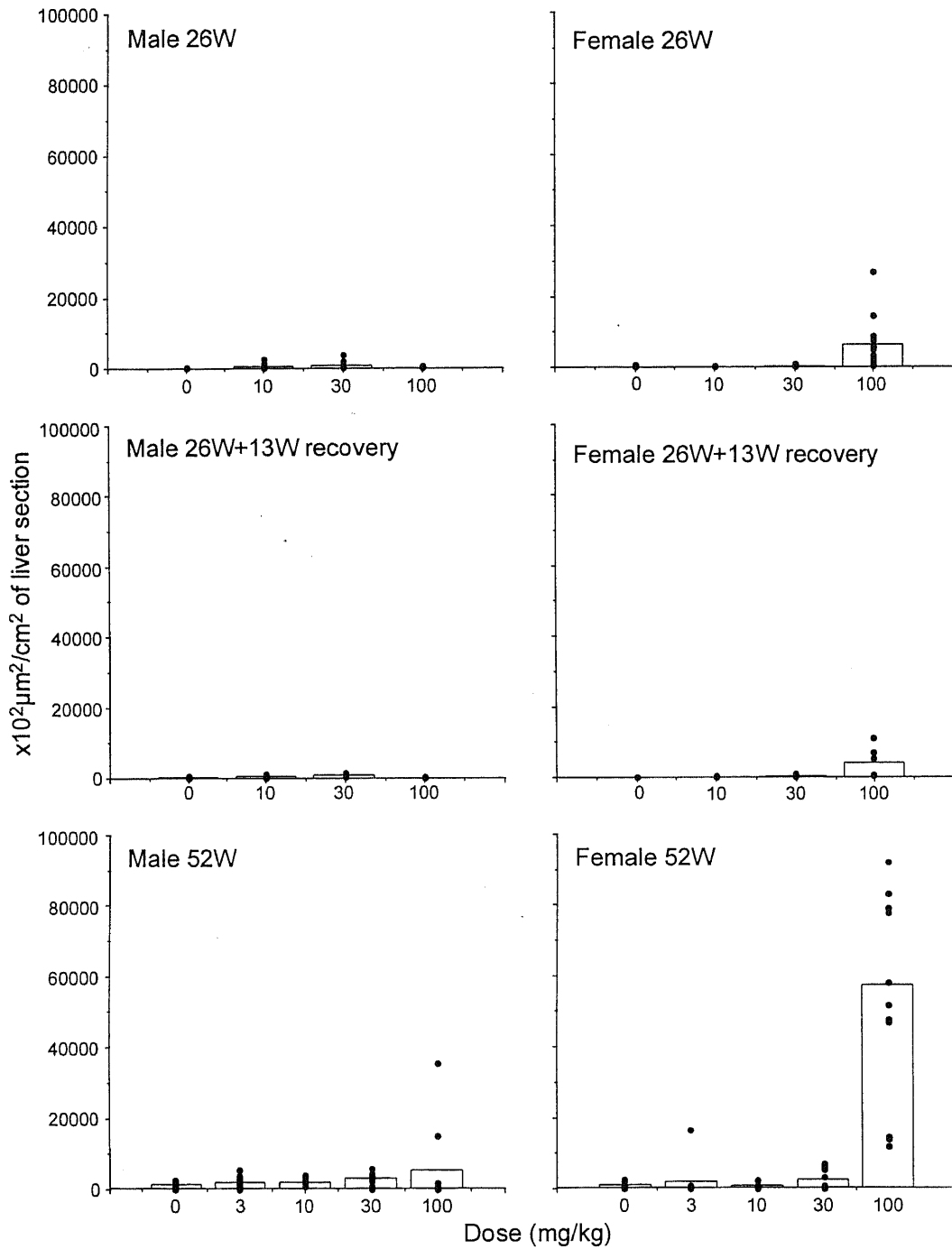
GST-P 陽性細胞巣 1 個当たりの面積は、Fig. 5-3 に示すように、雄では 100 mg/kg を 52 週間反復投与して明らかに他の群より高くなるのに対して、雌では 100 mg/kg を 26 週間反復投与することにより、明らかに他の群よりも高い値を示した。雌の 100 mg/kg 群では、26 週間から 52 週間への投与期間延長に伴い、GST-P 陽性細胞巣 1 個当たりの面積は  $490 \times 10^2 \mu\text{m}^2$  から  $4,425 \times 10^2 \mu\text{m}^2$  へと約 10 倍に増大した。また、13 週間の休薬により、 $330 \times 10^2 \mu\text{m}^2$  へとわずかながら減少した。

## Number of GST-P<sup>+</sup> foci



**Fig. 5-1.** Number of GST-P positive foci in the liver section. Individual data are presented as dots and the group means are shown by columns.

## Occupied area of GST-P<sup>+</sup> foci



**Fig. 5-2.** Occupied area of GST-P positive foci in the liver section. Individual data are presented as dots and the group means are shown by columns.

### Mean area of individual GST-P+ focus

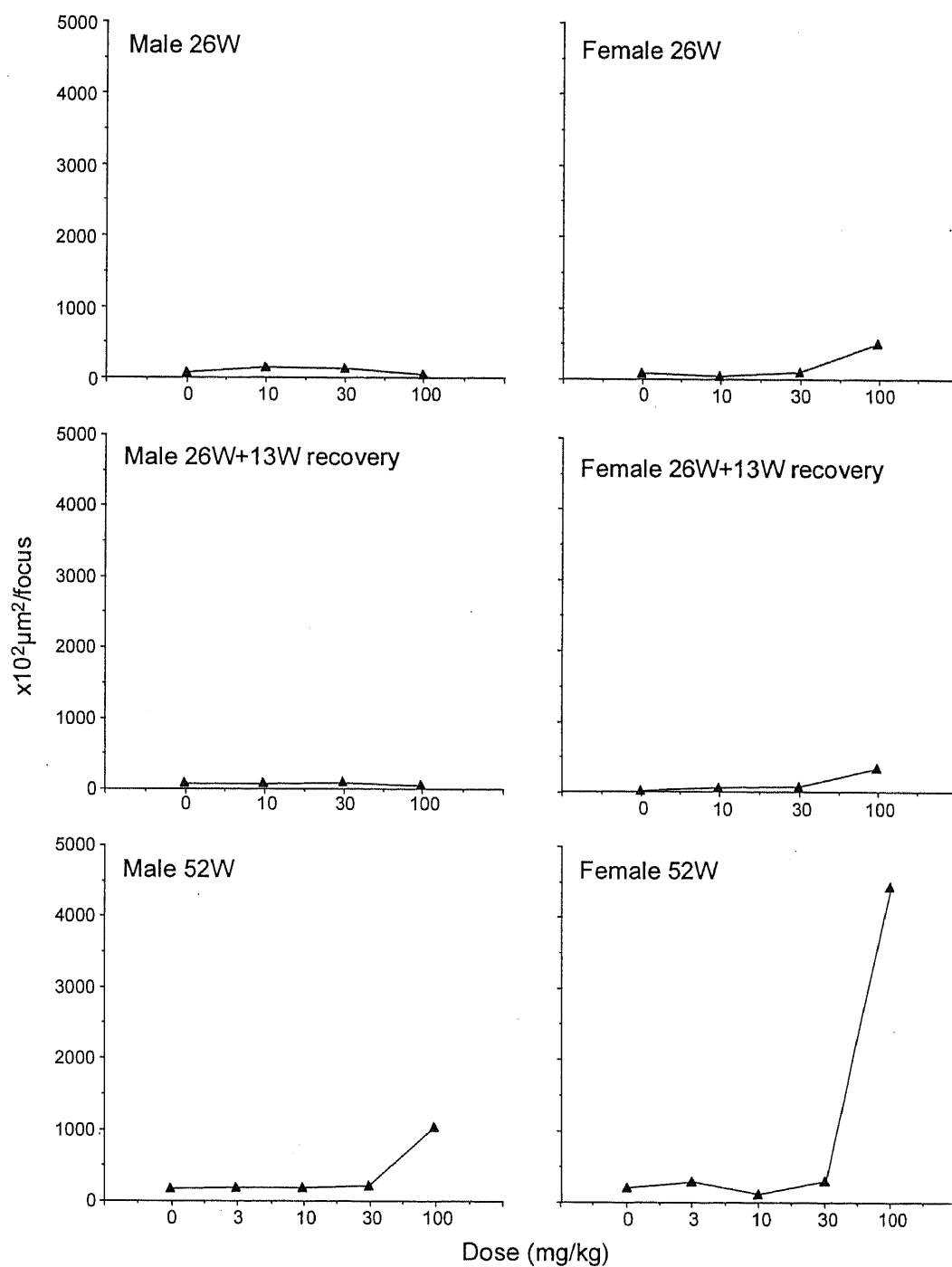


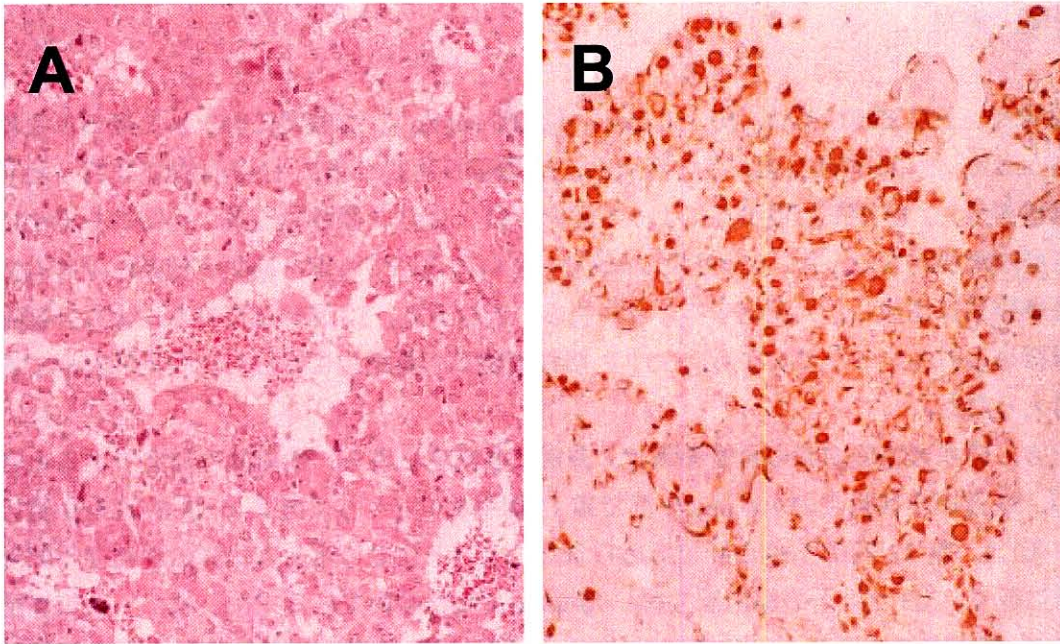
Fig. 5-3. Mean area of individual GST-P positive focus in the liver.

#### 病理組織学的観察（腫瘍性病変）

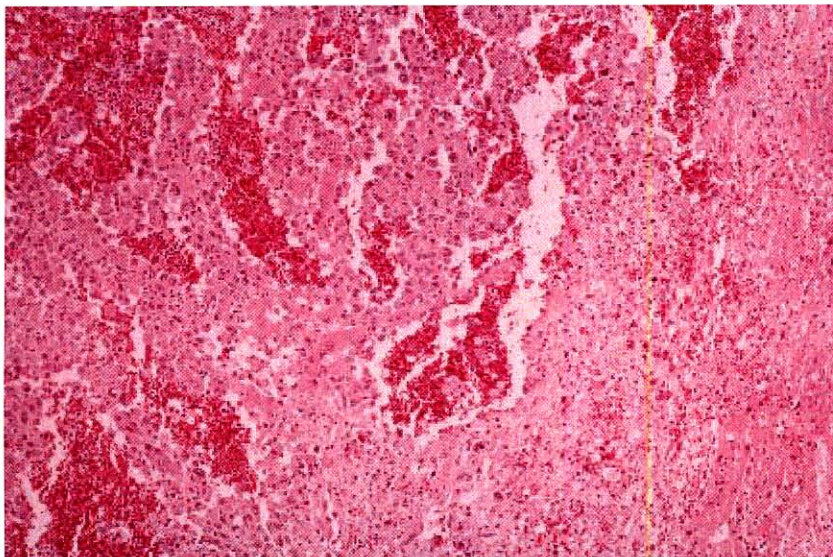
E2011 の 52 週間反復投与により、肝細胞由来の腫瘍性病変の発生は認められなかった。しかしながら、100 mg/kg 群の雄 3 例と雌 1 例において、肝の非実質細胞由来の悪性腫瘍である血管肉腫が認められた (Table 5-4)。病理組織学的に腫瘍組織は血液に富み、類円形核を有する比較的大型の紡錘形～多形性異型細胞から構成され、いずれの腫瘍においても細胞質内に豊富なビメンチンを有することが免疫組織学的に明らかであったことから、血管内皮細胞に由来するものと考えられた。また、細胞分裂像が豊富で周囲肝実質組織への浸潤性増殖が著明であることから、血管肉腫と診断された (Photo 5-1 および 2)。病理組織学的検査ではじめて確認された比較初期と考えられる血管肉腫では、異型性を有する腫瘍細胞が類洞壁に沿って単層ないし重層性に増殖する傾向を示したが (Photo 5-1A)、肉眼的に血腫として捉えられた明らかな腫瘍塊を形成する血管肉腫では、繊細な繊維性結合織を伴いながら乳頭状の発育を示した (Photo 5-2)。

**Table 5-4.** Incidence of hemangiosarcoma in the liver.

|        | Dose (mg/kg) | 26W  | 26W+13W R | 52W  |
|--------|--------------|------|-----------|------|
| Male   | 0            | 0/12 | 0/6       | 0/12 |
|        | 3            | —    | —         | 0/12 |
|        | 10           | 0/12 | 0/6       | 0/12 |
|        | 30           | 0/12 | 0/6       | 0/12 |
|        | 100          | 0/12 | 0/6       | 3/12 |
| Female | 0            | 0/12 | 0/6       | 0/12 |
|        | 3            | —    | —         | 0/12 |
|        | 10           | 0/12 | 0/6       | 0/12 |
|        | 30           | 0/12 | 0/6       | 0/12 |
|        | 100          | 0/12 | 0/6       | 1/12 |



**Photo 5-1.** Portions of early stage of hemangiosarcoma. (A) The dilated sinusoids are lined by single- or multi-layered atypical pleomorphic endothelial cells. The tumor cells have invaded adjacent parenchymal tissue. H-E stain  $\times 50$ . (B) Immunohistochemical demonstration of vimentin. Abundant vimentin filaments can be found in the tumor cells.  $\times 50$ .



**Photo 5-2.** Advanced development of hemangiosarcoma found in dead animal with hemoperitoneum. The tumor is characterized by papillary growth with thin fibrous connective tissue.  $\times 25$ .

## 第2節 考察

雌雄ラットにE2011の3, 10, 30あるいは100 mg/kgを52週間にわたって経口反復投与するとともに、26週間反復投与の時点と、26週間反復投与後に13週間休薬を行った時点で剖検を行い、13週間反復投与によって認められたGST-P陽性細胞巢の経時的な変化について詳細な検討を行った。その結果、雌雄でいずれにおいても投与期間の延長によりGST-P陽性細胞巢は増加し、大型化することが明らかとなった。52週間反復投与により肝細胞腫瘍は認められなかったことから、GST-P陽性細胞巢の腫瘍化にはさらに長期間必要であると考えられた。

一方、肝血管細胞由来の悪性腫瘍で、非常に浸潤性に富み、致死的な腫瘍である血管肉腫が、52週間反復投与の100 mg/kg群で雄12例中3例(うち2例は45週および51週目に途中死亡)、雌12例中1例の肝で認められた。ラットにおける血管肉腫の自然発生頻度は非常に低く、SDラットの場合雄1.1%、雌0.6%と報告されている(75)。また、血管肉腫は生後1年以内にはほとんど発症せず(76)、今回の試験における血管肉腫の発生率が雄で25%、雌で8.3%であることから、明らかにE2011投与により発生したものと考えられた。

これまでに血管肉腫を引き起こすことが知られている化学物質としては、塩化ビニルや砒素などが知られている(76)。このうち特に塩化ビニルは実験動物のみならず、ヒトにおいても血管肉腫を引き起こすことが報告されている(77-79)。Fromentらは、塩化ビニルによる発がんには、*N-ras* A遺伝子の変異(コドン13:GGC→GACと、コドン36:ATA→CTA)を伴うことを報告している(80)。また、Barbinらも同様に、塩化ビニルによるラット肝血管肉腫で、*p53*遺伝子の変異を確認している(81)。E2011の場合、第4章で示したようなイニシエーション活性を有する活性代謝物が肝実質細胞のみならず血管内皮細胞でも生成して、こうしたがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変化を介して、血管肉腫を引き起こす原因となった可能性が高いものと推察された。

### 第3節 小括

E2011のラットへの13週間反復投与試験の病理組織学的検査で認められた変異細胞巢について、さらに長期間投与した場合に腫瘍化するかどうか探る目的で、雌雄ラットにE2011を52週間にわたって経口反復投与した。

その結果、肝細胞腫瘍の発生は認められなかったものの、雌雄いずれもGST-P陽性細胞巢は投与期間が長くなるにつれて数・面積ともに増加し、特に雌で著明であった。一方、肝血管細胞由来の悪性腫瘍である血管肉腫が、雄12例中3例、雌12例中1例の肝で認められたことから、E2011は発がん性を有することが示された。



## 第6章 E2011によるCYPダウンレギュレーション

化合物による毒性は、大きく化学構造に由来するものと、薬効に起因するものに分けられる。本論文では、これまで E2011 およびその代謝物 (脱炭酸体) の化学構造に着目して肝毒性の機序を記述したが、E2011 の作用を総合的に考える上では、E2011 の薬理作用である MAO 阻害作用に基づく影響も考慮する必要がある。

本章では、E2011 投与によって認められた CYP 発現調節作用について記載し、原因と考えられるいくつかのパラメータを探った。中でも、特に MAO-A 阻害に基づく血中 MEL レベルの上昇と CYP 変動との関係が疑われたことから、E2011 単回投与による血中 MEL レベルの経時的変動について詳細に検討した。

### 第1節 E2011 投与に伴う CYP 変動とその要因と考えられるパラメータの変動

#### 実験方法

##### 化合物および試薬

E2011 (第1章, 第1節) を用いた。また、プロテアーゼ阻害剤として、PMSF, antipain, leupeptin および pepstatin を Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) より購入した。

##### 動物

7週齢の雌雄 SD (IGS) ラットを日本チャールズリバー (株) より導入し、1週間の検疫期間および馴化期間を実施した後、雌雄別々に体重による層別化法で群分けを行い、8週齢で実験に使用した。動物の飼育方法は、第1章, 第1節に記載した。

##### 試験デザイン

雌雄いずれも 10 匹のラットを 5 匹ずつ 2 群に分け、対照群と E2011 150 mg/kg 投与群を設定した。E2011 は 0.5% MC 水溶液を用いて、5 mL/kg の投与容量となるように、3%懸濁液を調製した。この投与検体を、動物に 1 日 1 回、2 週間にわたり毎日、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群には、媒体のみを投与した。

最終投与の 6 時間後、ペントバルビタール麻酔下で腹大動脈より全採血を行い、動物を致死させた。採血には抗凝固剤としてヘパリン・ナトリウムを用い、遠心分離によって得られた血漿を分注して、サイトカイン濃度およびホルモン濃度測定に用いた (測定時まで、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した)。動物の致死後剖検を行い、直ちに肝臓を摘出し、その一部をウエスタンブロットによる CYP 含量解析用に、別の一部は肝中サイトカイン量測定用に、さらに別の一部を CYP 遺伝子発現解析に用いた。

## 観察, 測定および検査

投与開始日を1日目と起算し, 以下の観察, 測定および検査を実施した。

### (1) 一般観察

動物の一般状態について, 投与期間を通じて毎日観察した。体重は1, 2, 3, 7, 10 および14日目に測定して, 動物への検体投与容量の算出に用いた。

### (2) 肝中 CYP タンパク発現量測定

剖検時に得られた肝臓より常法に従って Ms およびホモジナイズを調製した後, 1 well 当たり Ms タンパクとして 1  $\mu$ g (CYP 各分子種) のタンパクをアプライして, 還元条件下で電気泳動を行った。泳動終了後, Schleicher & Schnell 社 (Keene, NH) より購入したニトロセルロース膜 (0.45  $\mu$ m Nucleic acid and protein transfer media) にトランスファーしてウエスタンブロット解析を行った。一次抗体として, 第一化学薬品株式会社 (東京) より購入したイムノブロッティング用ラット P450 分子種抗体 (anti-rat CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11, CYP2E1 および CYP3A2) を用いた。一次抗体の希釈倍率は, いずれも 500 倍とした。発色は, Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) より購入したベクタステイン ABC-PO (ヤギ IgG あるいはウサギ IgG) キットを用いて, ABC 法により行った。画像解析は, スキャナーでコンピュータへ取り込んだ後, NIH Image Ver 1.62 により数値化した。

### (3) CYP 遺伝子発現解析

GIBCO BRL (MD, USA) より購入したトリゾル試薬を用いてラット肝トータル RNA の抽出を行った後, 以下に示すラット CYP3A の各分子種特異的なプライマーを用いて PCR 解析を行った。

|                |  |
|----------------|--|
| CYP3A1         | forward: 5'-ATCCGATATGGAGATCAC-3'<br>reverse: 5'-GAAGAAGTCCTTGTCTGC-3'       |
| CYP3A2         | forward: 5'-CGACTTGGAAACCCATAGAC-3'<br>reverse: 5'-CATGTCAAATCTCCCTAAGCC-3'  |
| CYP3A9         | forward: 5'-GGACGATTCTTGCTTACAGG-3';<br>reverse: 5'-ATGCTGGTGGGCTTGCCCTTC-3' |
| CYP3A18        | forward: 5'-GGAAATTCGATGTGGAGTGC-3'<br>reverse: 5'-AGGTTTGCCCTTCTCTTGCC-3'   |
| CYP3A23        | forward: 5'-GGAAATTCGATGTGGAGTGC-3'<br>reverse: 5'-AGGTTTGCCCTTCTCTTGCC-3')  |
| $\beta$ -actin | forward: 5'-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3'<br>reverse: 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'   |

逆転写反応及び PCR 反応は, ABI PRISM™ 7700 System (PE Applied Biosystems) を用いて

実験を行った。1 サンプルあたりの反応液の組成は以下の通りとした。

|                                   |              |
|-----------------------------------|--------------|
| SYBR Green PCR Master Mix         | 12.5 $\mu$ L |
| 20 pmol of forward PCR primer     | 1 $\mu$ L    |
| 20 pmol of reverse PCR primer     | 1 $\mu$ L    |
| MultiScribe Reverse Transcriptase | 0.25 $\mu$ L |
| RNase inhibitor                   | 1 $\mu$ L    |
| RNA sample (0.1 mg/mL)            | 2.5 $\mu$ L  |
| H <sub>2</sub> O                  | X $\mu$ L    |
| 計                                 | 25 $\mu$ L   |

上記組成の PCR 反応液を 96 穴プレートに添加し、反応を行った。逆転写反応は 48°C で 30 分を行った。PCR 反応の 1 サイクルにおける温度および反応時間は、変性を 94°C で 1 分、結合を 56°C で 1 分、伸張を 72°C で 1 分にて行った。また、サイクル数は 40 で行った。

PCR 反応後、各 CYP3A 分子種 mRNA 量について、ABI-7700 による算出されるそれぞれの数値化された蛍光強度 (Rn 値) を、内因性のハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -アクチン mRNA 発現量の Rn で補正した。

#### (4) サイトカインおよびホルモン量測定

剖検時に得られた血漿および肝臓を用いて、サイトカインとして IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 および TNF- $\alpha$  と、ホルモンとして GH および MEL の量を測定した (ホルモンは血漿中のみ)。肝臓は、Yamano らの方法 (82) に従い、摘出後直ちにプロテアーゼ阻害剤 (2 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL antipain, 1  $\mu$ g/mL leupeptin および 1  $\mu$ g/mL pepstatin) を溶解した 9 倍量の PBS でホモジナイズした後、8°C, 15,000 $\times$ g で 15 分遠心して、得られた上清をサンプルとした。血漿および肝臓より調製したサンプルいずれも、測定時まで -80°C にて凍結保存した。

血漿中および肝臓中サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 および TNF- $\alpha$ ) 測定には、BioSource International, Inc. (Camarillo, CA) より購入した Cytoscreen<sup>TM</sup> Immunoassay Kit (Rat IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 および TNF- $\alpha$ ) を、また血漿中ホルモン (GH および MEL) 測定には、Amersham Pharmacia Biotech 社 (Buckinghamshire, UK) より購入した Rat growth hormone enzymeimmuno-assay (EIA) system および Bühlmann Laboratories AG 社 (Allschwil, Switzerland) より購入した Direct saliva melatonin ELISA を用いて、いずれも ELISA 法にて測定した。

## 結果

### 肝中 CYP タンパク発現量

肝中 CYP アイソザイムのウエスタンブロット解析の写真を Fig. 6-1 に、数値化した結果を Fig. 6-2 に、それぞれ示した。CYP3A2 抗体と交叉するタンパクの発現は、雄の E2011 投与群では対照群と比べて 75% に、同様に雌では 36% に抑制された。一方、CYP1A1 抗体と交叉するタンパクの発現は、雄の E2011 投与群で対照群の 1.8 倍、雌で 1.3 倍といずれも

有意に増加した。CYP2B1, CYP2C11 および CYP2E1 抗体と交叉するタンパクは、雌雄いずれも E2011 投与によって変動しなかった。

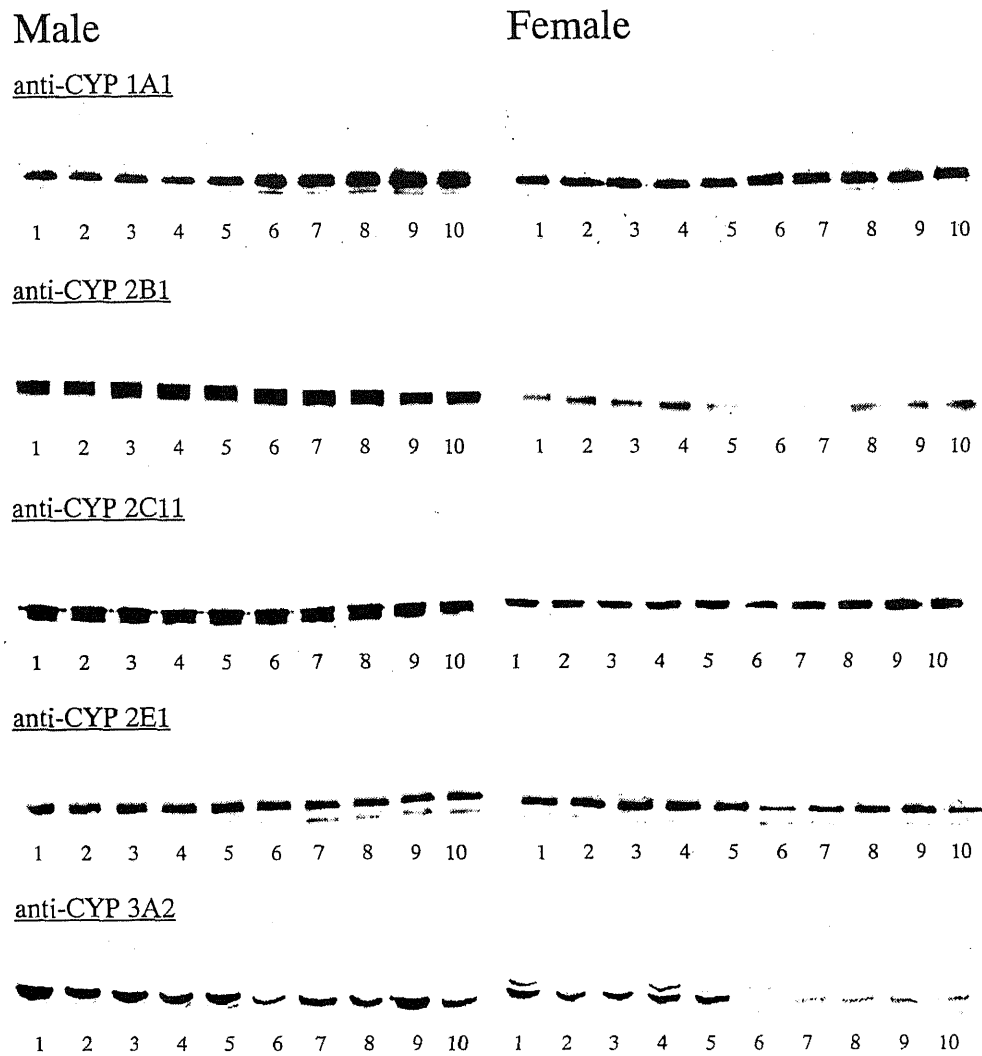
#### CYP 遺伝子発現解析

CYP3A 各分子種の遺伝子発現解析した結果を、Fig. 6-3 に示した。対照群の CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18 および CYP3A23 の mRNA 発現量を  $\beta$ -アクチンの mRNA 発現量で補正した値を 100%として、E2011 投与群の値と比較した。E2011 投与により、CYP3A2 mRNA の発現量は、対照群と比較して雄で 38%に低下し、同様に CYP3A9 は雄で 16%、雌で 9%に、CYP3A18 は雄で 14%に、CYP3A23 は雄で 38%に、雌で 68%にまで低下した。なお、雌雄における CYP3A1 mRNA の発現と、雌における CYP3A2 および CYP3A18 mRNA の発現は、対照群および E2011 投与群いずれにおいても認められなかった。

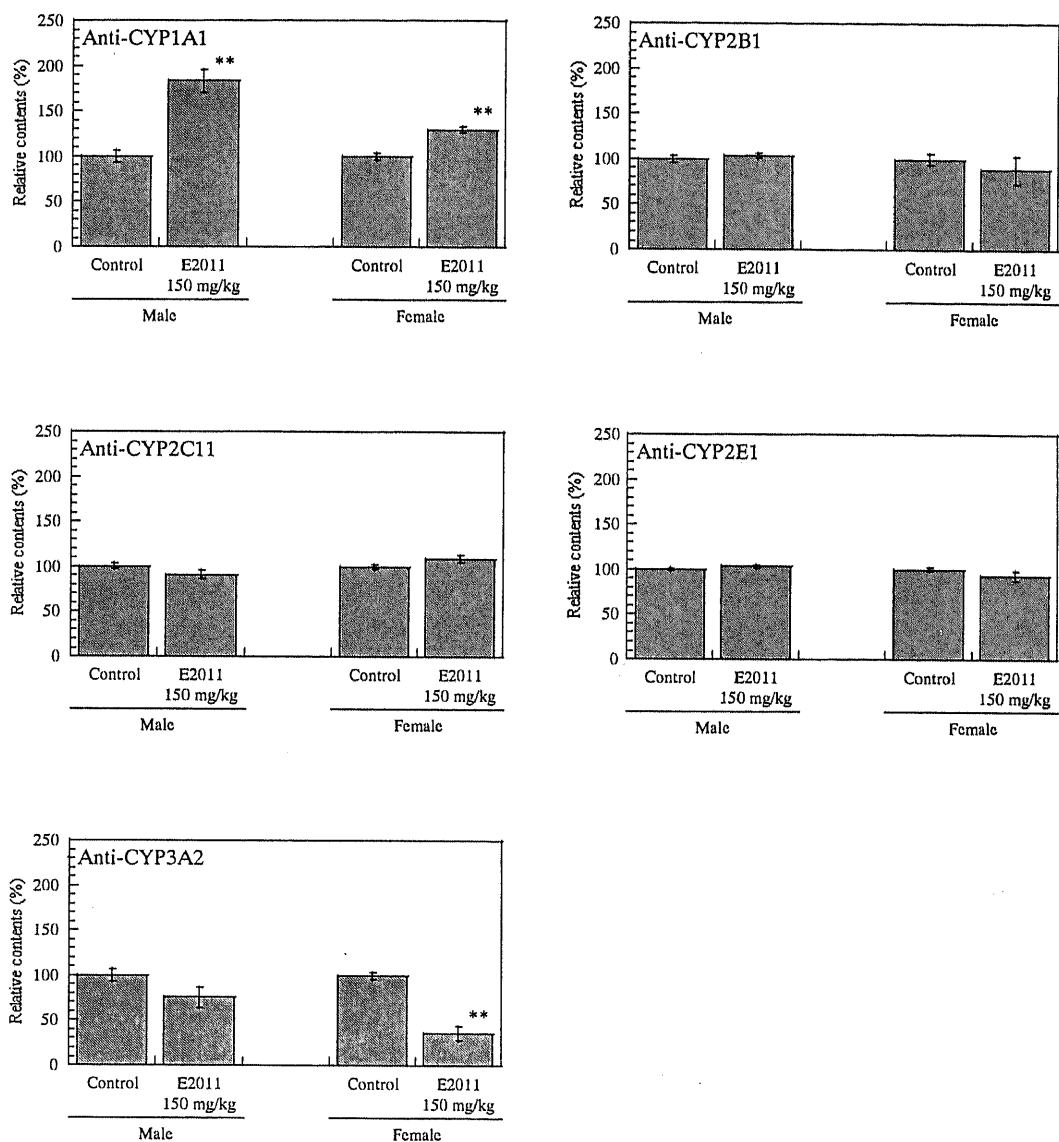
#### サイトカインおよびホルモン量測定

サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 および TNF- $\alpha$ ) およびホルモン (GH および MEL) 量を測定した結果を、Fig. 6-4 および Fig. 6-5 に示した。雌雄いずれにおいても、測定した肝臓のサイトカイン含量はすべて E2011 投与により有意に減少し、IL-1 $\beta$  は雄で対照群の 58%、雌で 65%、IL-2 は雄で 57%、雌で 56%、IL-6 は雄で 42%、雌で 32%、TNF- $\alpha$  は雄で 44%、雌で 37%となった。血漿中サイトカイン濃度は、いずれも検出限界以下であった。

血漿中ホルモンレベルについて、GH は雌雄いずれも E2011 投与群と対照群との間に差は認められなかったが、MEL は E2011 を投与した雄で 2.5 倍、雌で 4 倍と有意に上昇した。

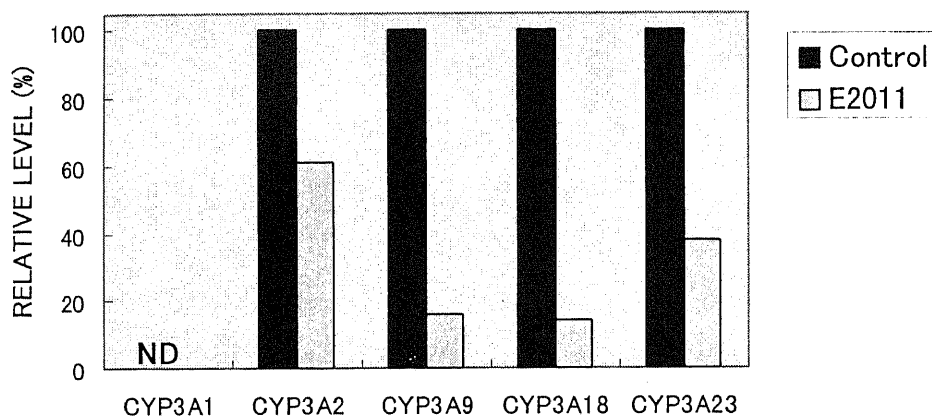


**Fig. 6-1.** Effects of E2011 on expression of various CYP isoforms (1A1, 2B1, 2C11, 2E1 and 3A2). Immunoblotting of individual hepatic microsomal samples from control (lane 1 to 5) and E2011 treated rats (lane 6 to 10) was carried out.

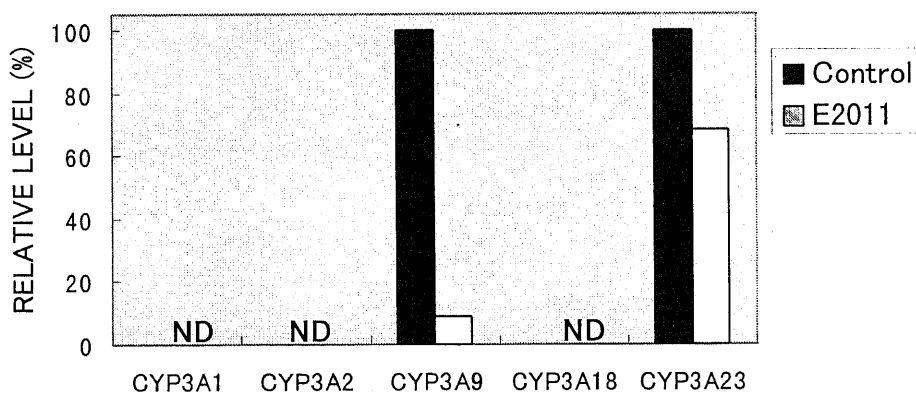


**Fig. 6-2.** Effects of E2011 on expression of various CYP isoforms (1A1, 2B1, 2C11, 2E1 and 3A2). Immunoblotting of microsomal samples from control and E2011 treated rats was carried out as described in Fig. 6-1. Values are expressed as means  $\pm$  SE for five animals. \*\*, Significantly different from control animals,  $p < 0.01$  (Student's  $t$  test).

### Male

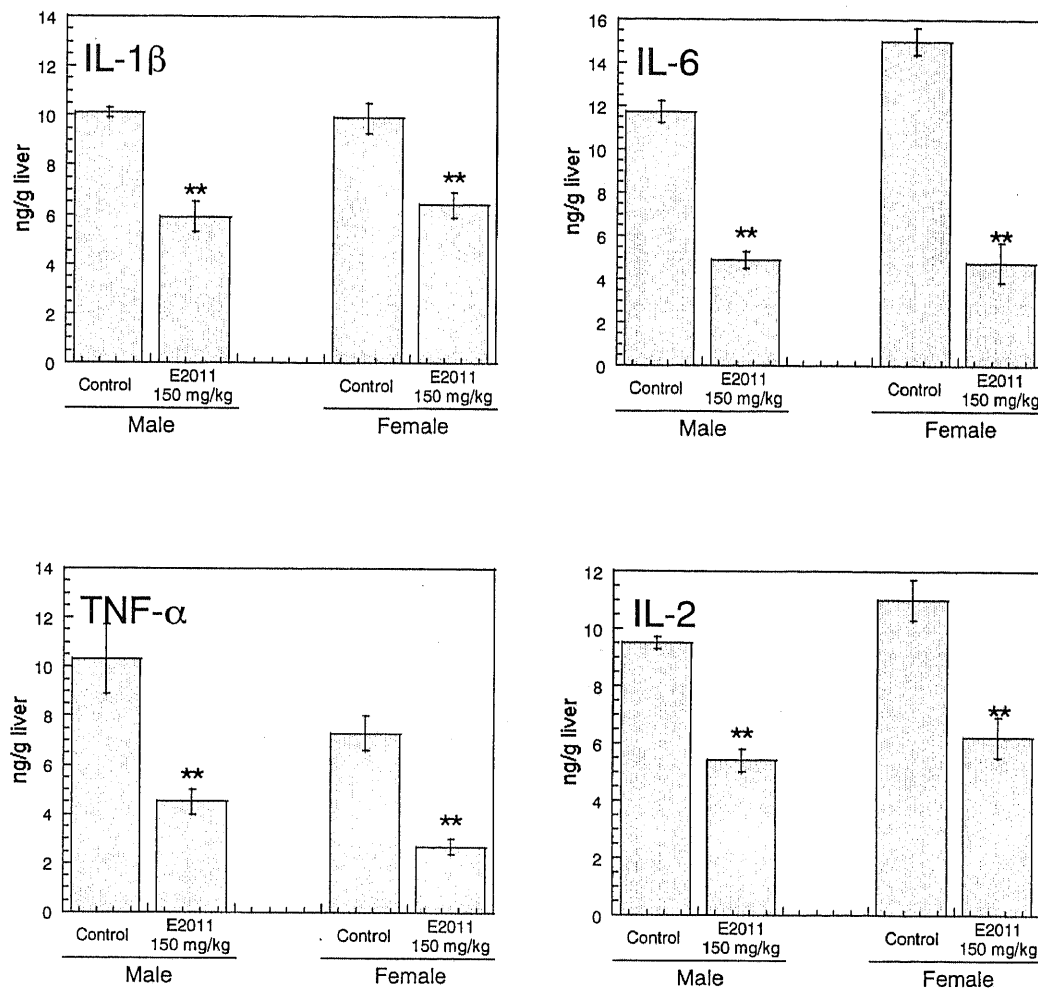


### Female



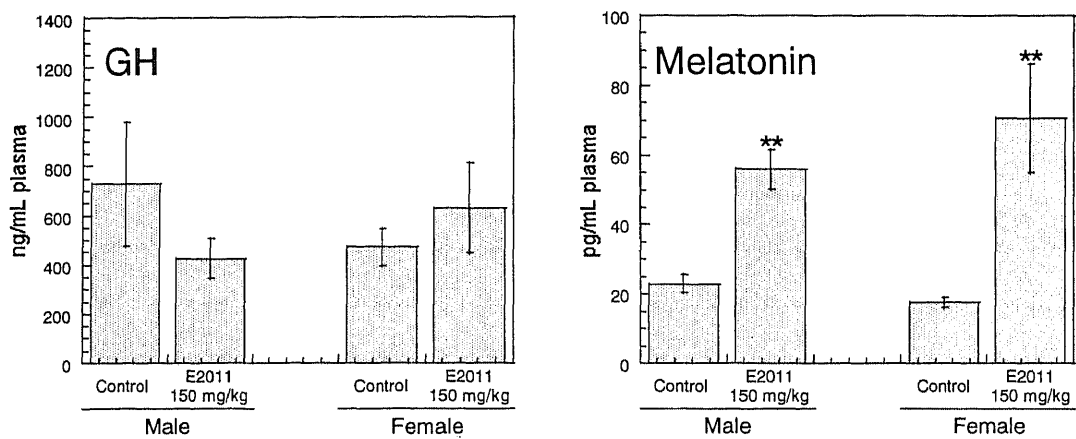
**Fig. 6-3.** Relative abundance of CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9, CYP3A18 and CYP3A23 mRNAs estimated by RT-PCR of the liver total RNAs of male and female rats treated with E2011 at 150 mg/kg for 2 weeks.

The data are averages of three determinations of mRNA from three independent rats after correction using data obtained with  $\beta$ -actin. After correction, the control values were set arbitrarily at 100 %. ND, not detectable.



**Fig. 6-4.** Inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and an immunologic responses-related cytokine (IL-2) contents in the liver of male and female rats treated with E2011 at 150 mg/kg for 2 weeks. Livers were removed and cytokines concentrations were measured by ELISA procedures. Values are means  $\pm$  SE for five animals. \*\*, Significantly different from control animals,  $p < 0.01$  (Student's  $t$  test).





**Fig. 6-5.** Growth hormone (GH) and melatonin concentrations in the plasma of male and female rats treated with E2011 at 150 mg/kg for 2 weeks. Plasma concentrations of hormones were measured by ELISA methods. Values are means  $\pm$  SE for five animals. \*\*, Significantly different from control animals,  $p < 0.01$  (Student's  $t$  test).

## 第2節 E2011投与による血中メラトニンレベルの経時的変動

### 実験方法

#### 化合物および試薬

E2011 (第1章, 第1節) を用いた。また, 血漿中 MEL 濃度測定に, Direct saliva melatonin ELISA (本章, 第1節) を用いた。

#### 動物

6週齢の雄性 SD (IGS) ラットを日本チャールズリバー (株) より導入し, 2週間の検疫期間および馴化期間を実施した後, 体重による層別化法で群分けを行い, 8週齢で実験に使用した。動物の飼育方法は, 第1章, 第1節に記載した。

なお, ストレスによる血中 MEL 濃度の変動を避けるため, 実験前日まで約一週間にわたり, 使用する動物に対して擬似的な経口投与や保定等ハンドリングを行い, 実験操作に起因する物理的的刺激に馴化させた。

#### 試験デザイン

35匹のラットを5匹ずつ7群に分け, プレ採血群を1群と, 対照群と E2011 150 mg/kg 投与群を3群ずつ (それぞれ投与後1, 3および6時間採血群) を設定した。E2011は0.5% MC水溶液を用いて, 5 mL/kgの投与容量となるように, 3%懸濁液を調製した。この投与検体を, 胃ゾンデを用いて動物に単回強制経口投与した。対照群には, 媒体のみを傾向投与した。

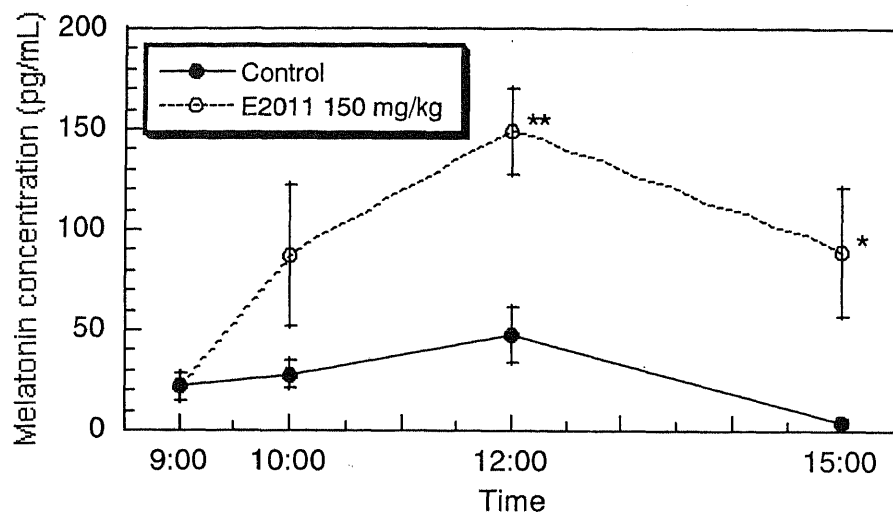
各採血時間に動物をギロチンにて断頭して, ヘパリン処理したチューブで血液採取し, 冷却遠心によって得られた血漿画分を得た。血漿サンプルは, 測定時まで-80℃にて凍結保存した。

#### 血中 MEL 濃度測定

本章, 第1節に記載した。

### 結果

E2011の150 mg/kgを雄ラットに単回経口投与した後, 血中 MEL 濃度を経時的に測定した結果を Fig. 7-6 に示した。投与前の MEL 血中濃度は 20 pg/mL 程度であったが, E2011 投与の1時間後に 90 pg/mL, 3時間後には 150 pg/mL へと有意な上昇を示した。E2011 投与群の MEL 血中濃度は, 投与後6時間の時点でも 90 pg/mL と対照群に比べて高い値を示した。これに比べて対照群では, 投与前の値から2倍程度の変動範囲にとどまった。



**Fig. 6-6.** Effect of single oral dose of 150 mg/kg E2011 on melatonin plasma concentrations. The values are means  $\pm$  SEM of 5 male rats. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 vs. control (Student's  $t$  test).

### 第3節 考察

ラットへの E2011 の 2 週間反復投与により、雌雄いずれの肝においても CYP3A2 抗体と交叉性を示すタンパクが減少し、また CYP1A1 抗体と交叉性を示すタンパクの上昇が認められた。特に、CYP3A2 は成熟した動物では雄特異的なアイソザイムであることから (83)、ラットで発現が報告されている各 CYP3A アイソザイム (84-89) について、雌雄それぞれで mRNA の発現量を測定した。その結果、程度に違いはあるが、対照群の雄で発現しているアイソザイム (3A2, 3A9, 3A18 および 3A23) と雌で発現しているアイソザイム (3A9 および 3A23) のすべてが、E2011 投与により減少したことが明らかとなった。

ウエスタンブロット解析で認められた雌の CYP3A2 抗体と交叉性を示したタンパクの実体は不明であったが、本実験で用いた抗体はポリクローナルであることから、アミノ酸配列の類似した 3A アイソザイム (この場合は 3A9 ないし 3A23) と交叉性を示した可能性が高いと考えられた。実際、これらのアイソザイムの mRNA は減少しており、対応するタンパクも減少していたものと推察された。なお、今回用いた CYP1A1 抗体は CYP1A2 とも交叉性を示すことから、雌雄のラットで誘導された分子種は CYP1A1/2 のいずれであるか、あるいは両方のアイソザイムであるか不明であった。

初期の MAO 阻害剤の特徴として、ヒトで強い肝毒性を引き起こすことと、他の薬物と相互作用を引き起こすことが知られている (90)。前者は、ヒドラジド系 MAO 阻害薬として用いられたイソニアジドによる肝毒性に代表されるように、部分である構造ヒドラジンのアセチル化に起因し (91-94)、また後者は、近年、薬物相互作用の原因として重要視されている CYP 活性の阻害作用 (95-97) に基づくと考えられる (98,99)。本章では、CYP の mRNA およびタンパクのいずれも減少していることから、E2011 が初期の MAO 阻害剤とは異なり、CYP への直接阻害ではなく、さらに上流で CYP の調節を行っていたことが確認された。

次に、今回確認された CYP3A (mRNA およびタンパク) 減少の機序解明として、局所的なサイトカインおよびホルモンの変動を検索した。その結果、今回検討したサイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 および TNF- $\alpha$ ) は、いずれも E2011 投与により雌雄の肝臓で減少することが示された。今回測定した 2 種のホルモンのうち、血中 GH 濃度は E2011 投与により変動しなかったが、血中 MEL 濃度は雌雄いずれにおいても上昇することが示された。

サイトカインの関与する CYP ダウンレギュレーションとしては、肝毒性物質による炎症性反応と CYP ダウンレギュレーションとの関係について、1990 年代初めから多くの研究者によって報告されており、クッパー細胞からの IL-1 $\beta$  や IL-6, TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの放出や、これに関連した NO の生成が、CYP の変動と密接に関わっていることが判明している (100-102)。また、強力な T 細胞増殖因子として知られる IL-2 は (103)、ラット肝培養細胞において *c-myc* の発現を介して総 CYP 量を減少させることが報告されている (104,105)。IL-2 はまた、ラットのみならずヒトへの投与によっても肝臓の CYP 量の減

少させることが知られている (106)。

ホルモンの関与する CYP ダウンレギュレーションとしては、GH による機序がよく研究されており、特に性特異的なアイソザイムの調節に関与することが示されている (89,107-109)。Furukawa らは、CYP の性差は、性特異的な GH の分泌パターンに依存していることを報告している (110)。また、GH 以外のホルモンとして、Kothari らは松果体ホルモンである MEL が、9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセンによって誘発されるラット乳腺腫瘍に対して抗がん作用を有することを報告し、その機序として、MEL 投与によって肝 GSH レベルおよび GST 活性の上昇による保護作用と、チトクロム b<sub>5</sub> および CYP 量の低下による代謝活性化の減弱を挙げている (111)。

以上のことから、今回検索を行ったサイトカインおよびホルモンのうち、CYP 量を減少させる方向に作用するパラメータは MEL のみであり、E2011 投与による CYP3A (mRNA およびタンパク) のダウンレギュレーションは、MEL の血中濃度上昇に伴う変化である可能性が高いと考えられた。そこで、E2011 単回投与による血中 MEL 濃度の経時推移を検索したところ、投与後 1 時間から上昇し、6 時間の時点でも対照群に比べて有意に高いことが示された。したがって、E2011 の 2 週間投与後 (最終投与の 6 時間後) に認められた MEL 血中濃度の上昇は、初回投与から毎日繰り返されていたことが示唆された。このことは、E2011 投与に伴う CYP3A のダウンレギュレーションが、MEL を介している可能性を支持するものと考えられた。

E2011 に限らず、ある種の MAO 阻害剤は、ラット (112,113) をはじめ、サル (114) やヒト (29,30,112,114) においても松果体や血中の MEL レベルを上昇させることが報告されている。この機序としては、薬理作用である MAO 阻害によってセロトニン (=モノアミン) の酸化を抑制し、代替的に MEL の合成を亢進させるだけでなく、MEL 合成酵素活性を高めることが考えられている (28,115,116)。

MEL は他にも、ラジカルスカベンジャー作用に基づく抗変異原作用や抗がん作用を有することが知られている (117-122)。このことは、E2011 が代謝活性化により発がん作用を示す一方で、MAO 阻害作用に基づき血中 MEL 濃度が上昇して、二次的に肝の保護作用を発揮している可能性が考えられた。MEL の *in vitro* 抗酸化作用や *in vivo* 抗がん作用の実験で用いられる用量はそれぞれ 0.5 mM, 50 mg/kg 程度と高く、MAO 阻害剤により変動しうる MEL 血中濃度からかけ離れている。しかしながら、季節的な MEL 血中濃度のわずかな変化によっても、がん原性試験における対照群の自然発生的な腫瘍発生率が変化する (MEL 血中濃度が相対的に高くなる冬場は、腫瘍発生率が低下する) という報告から (123)、E2011 が構造的に発がん作用を持ち、一方で薬理作用に関連した二次的な抗がんを持つ可能性が十分に考えられた。

その他にも、臨床的に血管肉腫に対して有効性の認められている IL-2 の肝中含量の減少や (103)、芳香族アミンの代謝活性化に関与することが知られている CYP1A1/2 (5,13) の誘導により、発がんの起こる方向へ傾いていることが明らかにされ、総合的なバランスによ

って、第5章に記載したような発がんが引き起こされたものと考えられた。

核内に存在するレセプターで、構造的類似性を有する一連のスーパーファミリーは、オーファンレセプターと呼ばれているが、MELはその一つであるRZR $\beta$ や、RZR $\beta$ の属するRZR/RORファミリーに対して高い親和性を持つことが知られている(124-126)。RZR/ROR $\alpha$ は脳以外の臓器、例えば末梢血、肝、平滑筋あるいは精巣などにも発現していることが示されている(127-129)。ラット肝細胞核におけるMEL特異的な結合部位の存在は、他の研究者らによっても報告されているが、これがRZR/ROR $\alpha$ と同一であるかどうかは不明である(130,131)。一方、近年CYP3A誘導のメカニズムとして、核内オーファンレセプターの一つであるPXR(あるいはPAR)の関与が報告されている(132-134)。E2011の投与により、MELを介した誘導と逆の現象(ダウンレギュレーション)がmRNAレベルで行われたが、核内にMELの結合しうるオーファンレセプターが存在する事実は、CYPの誘導とダウンレギュレーションが非常に近い位置で相互に調節しながら行われている可能性を示唆していた。

#### 第4節 小括

E2011 投与によって mRNA およびタンパクレベルで認められた CYP3A ダウンレギュレーションについて、機序の検索を行った。この現象は E2011 の薬理作用 (MAO 阻害) に基づく血中 MEL の上昇に起因すると考えられた。MEL は抗がん作用も併せ持つことから、血中 MEL 濃度の上昇は前章で認められた E2011 による発がん作用とは相反すると考えられた。その他認められた、肝臓における CYP1A1/2 の上昇や IL-2 の減少は、いずれも E2011 による発がんに関与していると考えられた。

## 総括

選択的 MAO-A 阻害剤として開発中であった E2011 のラットへの 13 週間反復投与により、肝臓に GST-P 陽性変異細胞巢の増加が認められた。この毒性は前がん病変と位置づけられており、ヒトへの外挿やリスク評価の際に解釈が必要であると考え、第 II 相抱合酵素を中心とした代謝的観点から肝毒性発現機序の解明を行った。

各章で得られた知見を、以下にまとめた。

第 1 章では、13 週間にわたりラットに E2011 の 30 および 100 mg/kg を強制経口投与して、E2011 の毒性学的プロファイルを評価した。病理組織学的検査では、肝細胞において核小体の顕在化を伴う核肥大が認められ、雌ではさらに GST-P 陽性細胞巢の顕著な増加が認められた。こうした一連の肝病変から、E2011 が発がん性を有する可能性が危惧された。

第 2 章では、APAP の代謝様式を指標として、抱合酵素の阻害動物モデルの作成を行った。DCNP、PCP あるいはラニチジンの反復投与により、ST あるいは UDP-GT を 2 週間継続的に阻害する動物モデルを確立することに成功した。またこの時に、AST、ALT あるいは UN 等の血液生化学的パラメーターを指標とした肝毒性および腎毒性は伴わないことが示された。したがって、抱合酵素が毒性発現に大きく関与するケースでは、本章で確立した動物モデルを利用することによって、毒性発現機序解明に大きな手がかりが得られると考えられた。

第 3 章では、E2011 代謝物の一つである脱炭酸体 (芳香族アミン) が生成した後、抱合酵素により代謝活性化を受けるという仮説に基づき、各種抱合酵素阻害剤が E2011 の肝毒性に与える影響を検討した。E2011 の 150 mg/kg を 2 週間投与した際に認められた細胞核肥大に代表される肝毒性は、DCNP 併用により単細胞壊死を伴って増悪することが示されたが、一方、PCP 併用群では肝細胞核の肥大等の変化は消失した。このことは、PCP が ST 阻害作用に加えて AT 阻害作用を併せ持つことに起因しているためであると考えられ、E2011 の代謝活性化過程に AT が大きく関与していることが示唆された。

第 4 章では、E2011 およびその関連化合物について、抱合反応を考慮した変異原性試験を行い、E2011 の代謝活性化について検討を行った。E2011 は脱炭酸により潜在的なイニシエーション活性を発現し、さらに *N*-脱アルキルされることで、より強力な変異原へと変換されることが示された。その際、CYP および AT が代謝活性化に関与することが示された。また、6-ABT を用いた実験から、E2011 脱炭酸体の変異原性発現には CYP1A、AT およびニトレニウムイオン発生が関与することが示唆された。



第5章では、E2011のラットへの13週間反復投与試験の病理組織学的検査で認められた肝の変異細胞巣について、さらに長期間投与した場合に腫瘍化するかどうか探る目的で、雌雄ラットにE2011を52週間にわたって経口反復投与した。その結果、肝細胞腫瘍の発生は認められなかったものの、雌雄いずれもGST-P陽性細胞巣は投与期間が長くなるにつれて数・面積ともに増加し、特に雌で著明であった。一方、肝血管細胞由来の悪性腫瘍である血管肉腫が、100 mg/kg投与群の雄12例中3例、雌12例中1例の肝で認められたことから、E2011は発がん性を有することが示された。

第6章では、E2011投与によってmRNAおよびタンパクレベルで認められたCYP3Aダウンレギュレーションについて、機序の検索を行った。この現象はE2011の薬理作用(MAO阻害)に基づく血中MELの上昇に起因すると考えられた。MELは抗がん作用も併せ持つことから、血中MEL濃度の上昇は前章で認められたE2011による発がん作用とは相反すると考えられたが、その他に認められた肝臓におけるCYP1A1/2の上昇やIL-2の減少は、いずれもE2011による発がんに寄与していると考えられた。

以上の内容から、E2011によるラット肝毒性の機序は、代謝物の一つである脱炭酸体のCYPによる水酸化およびATによるエステル化、およびニトロニウムイオンの生成に由来すると考えられ、この一連の反応によりE2011はイニシエーション活性を発現することが示唆された。E2011の代謝活性化に重要な役割を担っているATは、ヒト肝においてもNAT1および2として存在しており(135,136)、このうちNAT2はある種の発がん性アリルアミンの解毒や代謝活性化に重要な役割を担っていることから(137)、ヒトでもE2011がAT(NAT)によって代謝活性化され、ラットと同様に肝毒性(発がん性を含む)を引き起こす可能性が十分考えられた。また、今後さらに詳細なヒトへの外挿を行う場合には、ヒトCYPアイソザイム(58,60,62)やNAT1および2(55,57,61)を発現させた変異原性試験菌株の利用などが有用であると考えられた。

本研究では、E2011の肝毒性発現機序解明の事例を通じて、毒性発現における抱合反応の役割を明らかにした。ここで得られた知見は、単にE2011による肝毒性機序解明にとどまらず、今後の医薬品開発にも応用可能である。特に、構造(E2011の場合は、潜在的な芳香族アミン構造)に起因した毒性は、あらかじめ排除することが可能である。我々はこうした研究を通じて毒性に寄与する構造を見つけだし、今後の薬作りに役立てていく必要があると考えられた。

## 掲載雑誌目録

本学位論文の内容は、次の発表論文を基礎とした。

1. G. Sato, T. Chimoto, T. Aoki, S. Hosokawa, S. Sumigama, K. Tsukidate and F. Sagami: Toxicological response of rats to a novel monoamine oxidase type-A inhibitor, (5R)-3-[2-((1S)-3-cyano-1-hydroxypropyl)benzothiazol-6-yl]-5-methoxy-2-oxazolidinone (E2011), orally administered for 13 weeks. *J. Toxicol. Sci.*, **24**, 165-175 (1999)
2. G. Sato, S. Katoh, S. Sumigama, F. Sagami and K. Tsukidate: Modification of drug conjugation pathway by repeated administration of conjugating enzyme. *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, **4**, 17-26 (1999)
3. G. Sato, T. Aoki, S. Hosokawa, F. Sagami and K. Tsukidate: Protection from drug-induced hepatocellular changes by pretreatment with conjugating enzyme inhibitors in rats. *Life Sci.*, (in press)
4. G. Sato, S. Asakura, A. Hakura, Y. Tsutsui-Hiyoshi, N. Kobayashi and K. Tsukidate: Assessment of potential mutagenic activities of a novel benzothiazole MAO-A inhibitor E2011 using *Salmonella typhimurium* YG1029. *Mutat. Res.*, **472**, 163-169 (2000)

## 謝辞

本論文提出の機会を与えていただき、また御指導御鞭撻、さらに御校閲を賜りました千葉大学薬学部 千葉 寛 教授に謹んで感謝いたします。また、本論文に対して、有益な御助言をいただきました、千葉大学薬学部 佐藤 哲男 名誉教授（現・HAB 霊長類機能研究所長）に深謝いたします。

本研究遂行の機会を与えて下さり、また終始御指導いただきました、エーザイ株式会社薬理安全性研究所 築館 一男 所長、並びに薬理安全性研究所 開発安全性研究部 佐神 文郎 元部長（現・薬事政策部 担当部長）に厚く御礼申し上げます。

本研究に御協力および御助言をいただきました、エーザイ株式会社 薬理安全性研究所 開発安全性研究部 青木 豊彦氏、細川 暁氏に深く感謝いたします。

また、本研究に終始御助言と御協力いただきました、エーザイ株式会社 薬理安全性研究所 羽倉 昌志氏、朝倉 省二氏、柿木 基治氏、エーザイ株式会社 創薬第一研究所 窪田 篤彦氏、貴重な化合物を提供して下さった、エーザイ株式会社 創薬技術研究所 小林 直樹氏に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究を支えていただいた、エーザイ株式会社 薬理安全性研究所の皆様、特に論文作成への御理解および御協力をいただきました、炭竈 秀二氏、加藤 聡氏、知本 忠士氏、関戸 徹氏、筒井（日吉）美枝さん（現、研開企画部）に心より感謝いたします。

最後に、本研究を行う機会を与えていただきました、エーザイ株式会社 内藤 晴夫 社長、並びに本論文作成を支持して下さいました、篠田 愛信 研究開発本部長に心より感謝いたします。

## 参考文献

1. 医薬品の安全性. In: 医薬品トキシコロジー (佐藤哲男, 仮家公夫, 北田光一 共編), 株式会社 南江堂, 東京, pp. 43-133 (1996)
2. 加藤隆一: 化学物質の生体内抱合機構. 解毒と活性化. トキシコロジーフォーラム **8**, 253-255 (1985)
3. J.A. Miller and E.C. Miller: The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Prog. Exp. Tumor Res.* **11**, 273-301 (1969)
4. C.C. Irving: Metabolic activation of *N*-hydroxy compounds by conjugation. *Xenobiotica* **1**, 387-398 (1971)
5. 出川雅邦: 薬物代謝酵素の多様性と発がん感受性. 変異原性試験 **3**, 83-91 (1994)
6. D.W. Hein, A. Trinidad, T. Yerokun, W.G. Kirilin, F. Ogolla, R.J. Ferguson and A.F. Andrews: Genetic regulation of acetyltransferase in the Syrian inbred hamster: a model for man. *Mutat. Environ. (part B)* 115-124 (1990)
7. E.J. Calabrese: How to address human interindividual variation in the process of animal extrapolation. *Mutat. Environ. (part D)* 315-322 (1990)
8. V. Nedelcheva and I. Gut: P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**, 1151-1175 (1994)
9. H. Glatt, W. Davis, W. Meinl, H. Hermersdörfer, S. Venitt and D.H. Phillips: Rat, but not human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture. *Carcinogenesis* **19**, 1709-1713 (1998)
10. 加藤隆一: I. 薬物代謝とは. 変異原と毒性 **5**, 382-386 (1982)
11. J.C. Stevens, L.A. Shipley, J.R. Cashman, M. Vandenbranden and S.A. Wrighton: Comparison of human and rhesus monkey *in vitro* phase I and phase II hepatic drug metabolism activities. *Drug Metab. Dispos.* **21**, 753-759 (1993)
12. D.H. Phillips, P.L. Carmichael, A. Hewer, K.J. Cole, I.R. Hardcastle, G.K. Poon, A. Keogh and A.J. Strain: Activation of tamoxifen and its metabolite  $\alpha$ -hydroxytamoxifen to DNA-binding products: comparisons between human, rat and mouse hepatocytes. *Carcinogenesis* **17**, 89-94 (1996)
13. 加藤隆一: 薬物代謝酵素による化学物質の代謝的活性化の研究. 薬物動態 **10**, 269-281 (1995)
14. T. Kagaya, A. Kajiwara, S. Nagato, K. Akasaka and A. Kubota: E2011, a novel, selective and reversible inhibitor of monoamine oxidase type A. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **278**, 243-251 (1996)
15. E2011 説明書, エーザイ株式会社 開発部 (1994)
16. G.M. Williams: The significance of chemically-induced hepatocellular altered foci in rat liver

- and application to carcinogen detection. *Toxicol. Pathol.* **17**, 663-674 (1989)
17. S.E. Theocharis, A.P. Margeli, E.V. Agapitos, M.G. Mykoniatis, C.N. Kittas and P.S. Davaris: Effect of hepatic stimulator substance administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced liver injury in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **33**, 656-663 (1998)
  18. G.A. Clawson, L.J. Blankenship, J.G. Rhame and D.S. Wilkinson: Nuclear enlargement induced by hepatocarcinogens alters ploidy. *Cancer Res.* **52**, 1304-1308 (1992)
  19. T. Naitoh, M. Kakiki, T. Kozaki, M. Mishima, T. Yuzuriha and T. Horie: Identification of the metabolites of a new oxazolidinone MAO-A inhibitor in rat. *Xenobiotica* **27**, 1071-1089 (1997)
  20. C.M. King, S.J. Land, R.F. Jones, M. Debiec-Rychter, M.-S. Lee and C.Y. Wang: Role of acetyltransferases in the metabolism and carcinogenicity of aromatic amines, *Mutat. Res.* **376**, 123-128 (1997)
  21. H.-U. Aeschbacher and R.J. Turesky: Mammalian cell mutagenicity and metabolism of heterocyclic aromatic amines, *Mutat. Res.* **259**, 235-250 (1991)
  22. H. Glatt: Bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB J.* **11**, 314-321 (1997)
  23. R. Kato and T. Kamataki: Cytochrome P-450 as a determinant of sex difference of drug metabolism in the rat. *Xenobiotica* **12**, 787-800 (1982)
  24. R. Kato and Y. Yamazoe: Sex-specific cytochrome P450 as a cause of sex- and species-related differences in drug-toxicity. *Toxicol. Lett.* **64/65**, 661-667 (1992)
  25. J.E. Harkness and M.D. Ridgway: Chromodacryorrhea in laboratory rats: etiologic consideration. *Lab. Anim. Sci.* **30**, 841-844 (1980)
  26. T. Kajimura, H. Satoh and M. Nomura: Effect of hyperprolactinemia induced by neuroleptic agent, timiperone, on porphyrin content of mouse Harderian gland. *J. Toxicol. Sci.* **22**, 219-229 (1997)
  27. M.J. Rodriguez-Colunga, C. Fernandez, I. Antolin, C. Rodriguez, D. Tolia and A. Menendez-Pelaez: Chronic administration of melatonin induces changes in porphyrins and in the histology of male and female hamster Harderian gland: interrelation with the gonadal status. *J. Pineal. Res.* **11**, 42-48 (1991)
  28. T.S. King, B.A. Richardson and R.J. Reiter: Regulation of rat pineal melatonin synthesis: effect of monoamine oxidase inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* **25**, 327-338 (1982)
  29. D.L. Murphy, L. Tamarkin, T. Sunderland, N.A. Garrick and R.M. Cohen: Human plasma melatonin is elevated during treatment with the monoamine oxidase inhibitors clorgyline and tranylcypromine but not deprenyl. *Psychiatr. Res.* **17**, 119-127 (1986)
  30. P.R. Bieck, K.-H. Antonin, R. Balon and G. Oxenkrug: Effect of brofaromine and pargyline on human plasma melatonin concentrations. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* **12**, 93-101 (1988)
  31. G.D. Osweiler: Factors influencing toxicity. In: E.A. Nieginski, M. Cann, A.G. Dinkel, P.J.

- Carley and J.P. Kluge (eds) *Toxicology*. Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 27-35 (1996)
32. J. Nakamura, S. Baba, T. Nakamura, H. Sasaki and J. Shibasaki: A method for the preparation of calibration curves for acetaminophen glucuronide and acetaminophen sulfate in rabbit urine without use of authentic compounds in high-performance liquid chromatography. *J. Pharmacobio-Dyn.* **10**, 673-677 (1987)
  33. M.L.M. van de Poll, R.B. Tijdens, P. Vondráček, A.P. Bruins, D.K.F. Meijer and J.H.N. Meerman: The role of sulfation in the metabolic activation of *N*-hydroxy-4'-fluoro-4-acetylamino-biphenyl. *Carcinogenesis* **10**, 2285-2291 (1989)
  34. G.J. Mulder and E. Scholtens: Phenol sulphotransferase and uridine diphosphate glucuronyltransferase from rat liver *in vivo* and *in vitro*: 2,6-dichloro-4-nitrophenol as selective inhibitor of sulphation. *Biochem. J.* **165**, 553-559 (1977)
  35. H. Koster, E. Scholtens and G.J. Mulder: Inhibition of sulfation of phenols *in vivo* by 2,6-dichloro-4-nitrophenol: selectivity of its action in relation to other conjugations in the rat *in vivo*. *Med. Biol.* **57**, 340-344 (1979)
  36. S.A. Rogers, K.C. Gale, J.F. Newton, J.G. Dent and T.B. Leonard: Inhibition by ranitidine of acetaminophen conjugation and its possible role in ranitidine potentiation of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **245**, 887-894 (1988)
  37. D.M. Woodbury: Analgesic-antipyretics, anti-inflammatory agents, and inhibitors of uric acid synthesis. In, *The pharmacological basis of therapeutics*, 4<sup>th</sup> edition. L.S. Goodman and A. Gilman (eds) pp.314-347, The MacMillan Company, London (1970)
  38. J.H. Knox and J. Jurand: Determination of paracetamol and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography using ion-pair systems. *J. Chromatogr.* **149**, 297-312 (1978)
  39. J.M. Wilson, J.T. Slattery, A.J. Forte and S.D. Nelson: Analysis of acetaminophen metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with UV and amperometric detection. *J. Chromatogr.* **227**, 453-462 (1982)
  40. J. Miners, J.F. Adams and D.J. Birkett: A simple HPLC assay for urinary paracetamol metabolites and its use to characterize the C3H mouse as a model for paracetamol metabolism studies. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **11**, 209-217 (1984)
  41. P. Colin and G. Sirois: Simultaneous determination of the major metabolites of styrene and acetaminophen, and of unchanged acetaminophen in urine by ion-pairing high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **377**, 243-251 (1986)
  42. V.O. Bhargava, S. Emodi and J. Hirate: Quantitation of acetaminophen and its metabolites in rat plasma after a toxic dose. *J. Chromatogr.* **426**, 212-215 (1988)
  43. D.O. Scott, L.R. Sorensen and C.E. Lunte: *In vivo* microdialysis sampling coupled to liquid chromatography for the study of acetaminophen metabolism. *J. Chromatogr.* **506**, 461-469

(1990)

44. F. Kamali and B. Herd: Liquid-liquid extraction and analysis of paracetamol (acetaminophen) and its major metabolites in biological fluids by reversed-phase ion-pair chromatography. *J. Chromatogr.* **530**, 222-225 (1990)
45. K.B. Delclos, E.C. Miller, J.A. Miller and A. Lien: Sulfuric acid esters as major ultimate electrophilic and hepatocarcinogenic metabolites of 4-aminoazobenzene and its N-methyl derivatives in infant male C57BL/6J × C3H/HeJ F<sub>1</sub> (B6C3F<sub>1</sub>) mice. *Carcinogenesis* **7**, 277-287 (1986)
46. E.W. Boberg, E.C. Miller, J.A. Miller, A. Poland and A. Liem: Strong evidence from studies with brachymorphic mice and pentachlorophenol that 1'-sulfoöxysafrole is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of 1'-hydroxysafrole in mouse liver. *Cancer Res.* **43**, 5163-5173 (1983)
47. E.W. Boberg, A. Liem, E.C. Miller and J.A. Miller: Inhibition by pentachlorophenol of the initiating and promoting activities of 1'-hydroxysafrole for the formation of enzyme-altered foci and tumors in rat liver. *Carcinogenesis* **8**, 531-539 (1987)
48. K.R. Krijgheld, H.J. Koster, E. Scholtens and G.J. Mulder: Cholestatic effect of harmol glucuronide in the rat. Prevention of harmol-induced cholestasis by increased formation of harmol sulfate. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **221**, 731-734 (1982)
49. J.A. Holme, G. Brunborg, J. Alexander, B. Trygg and C. Bjørnstad: Modulation of the mutagenic effects of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ) in bacteria with rat-liver 9000 × g supernatant or monolayers of rat hepatocytes as an activation system. *Mutat. Res.* **197**, 39-49 (1988)
50. H. Yamazaki, M. Mimura, Y. Oda, Y. Inui, T. Shiraga, K. Iwasaki, F.P. Guengerich and T. Shimada: Roles of different forms of cytochrome P450 in the activation of the promutagen 6-aminocrysene to genotoxic metabolites in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **14**, 1271-1278 (1993)
51. A.S. Wilson, D.P. Williams, C.D. Davis, M.D. Tingle and B.K. Park: Bioactivation and inactivation of aflatoxin B<sub>1</sub> by human, mouse and rat liver preparations: effect on SCE in human mononuclear leucocytes. *Mutat. Res.* **373**, 257-264 (1997)
52. M. Sawada and T. Kamataki: Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays. *Mutat. Res.* **411**, 19-43 (1998)
53. H. Glatt, A. Seidel, R.G. Harvey and M.W.H. Coughtrie: Activation of benzylic alcohols to mutagens by human hepatic sulphotransferases. *Mutagenesis* **9**, 553-557 (1994)
54. A. Hakura, S. Suzuki and T. Satoh: Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutat. Res.* **438**, 29-36 (1999)
55. D.M. Grant, P.D. Josephy, H.L. Lord and L.D. Morrison: *Salmonella typhimurium* strains

- expressing human arylamine *N*-acetyltransferases: metabolism and mutagenic activation of aromatic amines. *Cancer Res.* **52**, 3961-3964 (1992)
56. M. Ando, Y. Shindo, M. Fujita, S. Ozawa, Y. Yamazoe and R. Kato: A new *Salmonella* tester strain expressing a hamster acetyltransferase shows high sensitivity for arylamines. *Mutat. Res.* **292**, 155-163 (1993)
57. D. Wild, W. Feser, S. Michel, H.L. Lord and P.D. Josephy: Metabolic activation of heterocyclic aromatic amines catalyzed by human arylamine *N*-acetyltransferase isozymes (NAT1 and NAT2) expressed in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis* **16**, 643-648 (1995)
58. P.D. Josephy, L.S. DeBruin, H.L. Lord, J.N. Oak, D.H. Evans, Z. Guo, M.-S. Dong and F.P. Guengerich: Bioactivation of aromatic amines by recombinant human cytochrome P4501A2 expressed in Ames tester strain bacteria: a substitute for activation by mammalian tissue preparations. *Cancer Res.* **55**, 799-802 (1995)
59. P.D. Josephy, P. Gruz and T. Nohmi: Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays. *Mutat. Res.* **386**, 1-23 (1997)
60. A. Constable, N. Varga, P.D. Josephy, P. Guy and R.J. Turesky: Evaluation of *Escherichia coli* DJ4309 expressing human P450 1A2 in mutagenicity testing of complex food mixtures. *Mutat. Res.* **442**, 79-87 (1999)
61. Y. Oda, H. Yamazaki and T. Shimada: Role of human *N*-acetyltransferases, NAT1 or NAT2, in genotoxicity of nitroarenes and aromatic amines in *Salmonella typhimurium* NM6001 and NM6002. *Carcinogenesis* **20**, 1079-1083 (1999)
62. P. Aryal, K. Yoshikawa, T. Terashita, F.P. Guengerich, T. Shimada and Y. Oda: Development of a new genotoxicity test system with *Salmonella typhimurium* OY1001/1A2 expressing human CYP1A2 and NADPH-P450 reductase. *Mutat. Res.* **442**, 113-120 (1999)
63. M. Watanabe, M. Ishidate Jr. and T. Nohmi: Sensitive method for detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated *O*-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.* **234**, 337-348 (1990)
64. 能美健彦, 渡辺雅彦: ニトロアレーン, 芳香族アミンに高感受性を示す新しいサルモネラ株の特性とその利用文献. *変異原性試験* **1**, 60-62 (1992)
65. R. Kato and Y. Yamazoe: Metabolic activation and covalent binding to nucleic acids of carcinogenic heterocyclic amines from cooked foods and amino acid pyrolysates. *Jpn. J. Cancer Res.* **78**, 297-311 (1987)
66. D.M. Maron and B.N. Ames: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215 (1983)
67. A. Hakura, H. Mochida, Y. Tsutsui and K. Yamatsu: Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 559-567 (1994)
68. K. Saito, A. Shinohara, T. Kamataki and R. Kato: Metabolic activation of mutagenic *N*-



- hydroxyarylamines by *O*-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA98. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 286-295 (1985)
69. P. Paterson and J.K. Chipman: Activation of 2-amino-3-methylimidazo (4,5-*f*) quinoline in rat and human hepatocyte/*Salmonella* mutagenicity assays: the contribution of hepatic conjugation. *Mutagenesis* **2**, 137-140 (1987)
70. A. Suzuki, H. Kushida, H. Iwata, M. Watanabe, T. Nohmi, K. Fujita, F.J. Gonzalez and T. Kamataki: Establishment of a *Salmonella* tester strain highly sensitive to mutagenic heterocyclic amines. *Cancer Res.* **58**, 1833-1838 (1998)
71. H. Glatt, G. Werle-Schneider, N. Enders, S. Monnerjahn, J. Pudil, A. Czich, A. Seidel and M. Schwarz: 1-Hydroxymethylpyrene and its sulfuric acid ester: toxicological effects in vitro and in vivo, and metabolic aspects. *Chem.-Biol. Int.* **92**, 305-319 (1994)
72. H. Glatt, K. Pauly, H. Frank, A. Seidel, F. Oesch, R.G. Harvey and G. Werle-Schneider: Substance-dependent sex differences in the activation of benzylic alcohols to mutagens by hepatic sulfotransferases of the rat. *Carcinogenesis* **15**, 2605-2611 (1994)
73. F.A. Beland and F.F. Kadlubar: Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons. In: C.S. Cooper and P.L. Grover (eds) *Chemical carcinogenesis and mutagenesis I*. Springer-Verlag, Berlin, pp 267-325 (1990)
74. M.W. Anders: Bioactivation mechanisms and hepatocellular damage. In: I.M. Arias, W.B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter and D.A. Shafritz (eds) *The liver: Biology and Pathobiology, Second Edition*. Raven Press, New York, pp. 389-400 (1988)
75. G.M. Zwicker, R.C. Eyster, D.M. Sells and J.H. Gass: Spontaneous vascular neoplasms in aged Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Pathol.* **23**, 518-526 (1995)
76. H.-H.L. Hong, T.R. Devereux, R.L. Melnick, C.R. Moomaw, G.A. Boorman and R.C. Sills: Mutations of *ras* protooncogenes and *p53* tumor suppressor gene in cardiac hemangiosarcoma from B6C3F1 mice exposed to 1,3-butadiene for 2 years. *Toxicol. Pathol.* **28**, 529-534 (2000)
77. P.L. Viola, A. Bigotti and A. Caputo: Ongoing response of rat skin, lungs and bones to vinyl chloride. *Cancer Res.* **31**, 516-522 (1971)
78. J.L. Creech and M.N. Johnson: Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl chloride. *J. Occup. Med.* **16**, 150-151 (1974)
79. H. Popper, C. Maltoni and I.J. Selikoff: Vinyl chloride-induced hepatic lesions in man and rodents. A comparison. *Liver* **1**, 7-20 (1981)
80. O. Froment, S. Boivin, A. Barbin, B. Bancel, C. Trepo, and M.-J. Marion: Mutagenesis of *ras* proto-oncogenes in rat liver tumors induced by vinyl chloride. *Cancer Res.* **54**, 5340-5345 (1994)
81. A. Barbin, O. Froment, S. Boivin, M.-J. Marion, F. Belpoggi, C. Maltoni and R. Montesano: *p53* Gene mutation pattern in the rat liver tumors induced by vinyl chloride. *Cancer Res.* **57**,

- 1695-1698 (1997)
82. T. Yamano, L.A. DeCicco and L.E. Rikans: Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male Fisher 344 rats: role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **162**, 68-75 (2000)
  83. S. Imaoka, S. Fujita and Y. Funae: Age-dependent expression of cytochrome P-450s in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1097**, 187-192 (1991)
  84. K. Nagata, F.J. Gonzalez, Y. Yamazoe and R. Kato: Purification and characterization of four catalytically active testosterone 6 $\beta$ -hydroxylase P-450s from rat liver microsomes: comparison of a novel form with three structurally and functionally related forms. *J. Biochem.* **107**, 718-725 (1990)
  85. 永田 清: ステロイド 6 $\beta$ -水酸化酵素 (CYP3A) の分子多様性と遺伝子発現. *薬物動態* **11**, 427-435 (1996)
  86. K. Nagata, N. Murayama, M. Miyata, M. Shimada, A. Urahashi, Y. Yamazoe and R. Kato: Isolation and characterization of a new rat P450 (CYP3A18) cDNA encoding P450<sub>6 $\beta$ -2</sub> catalyzing testosterone 6 $\beta$ - and 16 $\alpha$ - hydroxylations. *Pharmacogenetics* **6**, 103-111 (1996)
  87. S.E.S. Brown, L.C. Quattrochi and P.S. Guzelian: Characterization of a pretranscriptional pathway for induction by phenobarbital of cytochrome P450 3A23 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 134-142 (1997)
  88. W. Jäger, M.A. Correia, L.M. Bornheim, A. Mahnke, W.G. Hanstein, L. Xue and L.Z. Benet: Ethynylestradiol-mediated induction of hepatic CYP3A9 in female rats: implication for cyclosporine metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **27**, 1505-1511 (1999)
  89. M. Kawai, S.M. Bandiera, T.K.H. Chang and G.D. Bellward: Growth hormone regulation and developmental expression of rat hepatic CYP3A18, CYP3A9, and CYP3A2. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 1277-1287 (2000)
  90. 菅原和信: 抗うつ薬と他剤との薬物相互作用. *薬局* **46**, 1695-1700 (1995)
  91. J.M. Wright and J.A. Timbrell: Factors affecting the metabolism of [<sup>14</sup>C]acetylhydrazine in rats. *Drug Metab. Dispos.* **6**, 561-566 (1978)
  92. J.A. Timbrell, J.R. Mitchell, W.R. Snodgrass and S.D. Nelson: Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **213**, 364-369 (1980)
  93. B.H. Lauterburg, C.V. Smith, E.L. Todd and J.R. Mitchell: Oxidation of hydrazine metabolites formed from isoniazid. *Clin. Pharmacol.* **38**, 566-571 (1985)
  94. E. Peretti, G. Karlaganis and B.H. Lauterburg: Acetylation of acetylhydrazine, the toxic metabolite of isoniazid, in humans. Inhibition of concomitant administration of isoniazid. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **243**, 686-689 (1987)
  95. 千葉 寛: チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア* **31**, 992-996 (1995)

96. 鎌滝哲也: 薬物代謝に関連する相互作用. *薬物動態* **11**, 282-285 (1996)
97. 仲佐啓詳, 北田光一: 2. 薬物動態を決定する機能蛋白質 チトクローム P450. *月刊薬事* **42**, 746-752 (2000)
98. P.M. Bélanger and A. Atitsé-Gbeassor: The inhibitory effect of monoamine oxidase inhibitors on hepatic microsomal enzyme systems of rat liver. *Pharmacol. Res. Commun.* **13**, 819-828 (1981)
99. U. Sharma, E.S. Roberts and P.F. Hollenberg: Inactivation of cytochrome P4502B1 by the monoamine oxidase inhibitors R-(-)-deprenyl and clorgyline. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 669-675, (1996)
100. T.J. Carlson and R.E. Billings: Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* **49**, 796-801 (1996)
101. B. Alexander: The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrit.* **14**, 376-390 (1998)
102. N. Milosevic, H. Schawalder and P. Maier: Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **368**, 75-87 (1999)
103. 北村 聖: サイトカインの臨床応用. In: 疾患とのかかわりを探る サイトカインの最前線 (平野俊夫 編), 株式会社 羊土社, 東京, pp. 174-187 (2000)
104. M. Tinel, M.-A. Robin, J. Doostzadeh, M. Maratrat, F. Ballet, N. Fardel, J. El Kahwaji, P. Beaune, M. Daujat, G. Labbe and D. Pessayre: The interleukin-2 receptor down-regulates the expression of cytochrome P450 in cultured rat hepatocytes. *Gastroenterology* **109**, 1589-1599 (1995)
105. M. Tinel, J. Elkahwaji, M.A. Robin, N. Fardel, V. Descatoire, D. Haouzi, A. Berson and D. Pessayre: Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **289**, 649-655 (1999)
106. J. Elkahwaji, M.A. Robin, A. Berson, M. Tinel, P. Lettéron, G. Labbe, P. Beaune, D. Elias, P. Rougier, B. Escudier, P. Duvillard and D. Pessayre: Decrease in hepatic cytochrome P450 after interleukin-2 immunotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 951-954 (1999)
107. M. Shimada, N. Murayama, K. Nagata, H. Hashimoto, H. Ishikawa and Y. Yamazoe: A specific loss of growth hormone abolished sex-dependent expression of hepatic cytochrome P450 in dwarf rats: reversal of the profiles by growth hormone-treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 34-42 (1997)
108. E. Rasmussen, B. Ask, N. Finnström, A. Skottner-Lundin and A. Rane: Insulin-like growth factor 1 (IGF-I) effects on sex-specific cytochrome P450 enzymes in normal and hypophysectomised male rats. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 459-466 (1998)
109. Y.E. Timsit and D.S. Riddick: Interference with growth hormone stimulation of hepatic cytochrome P4502C11 expression in hypophysectomized male rats by 3-methylcholanthrene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **163**, 105-114 (2000)

110. T. Furukawa, S. Manabe, T. Watanabe, S. Sharyo and Y. Mori: Sex difference in the daily rhythm of hepatic P450 monooxygenase activities in rats is regulated by growth hormone release. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **161**, 219-224 (1999)
111. L. Kothari and A. Subramanian: A possible modulatory influence of melatonin on representative phase I and II drug metabolizing enzymes in 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene induced rat mammary tumorigenesis. *Anti-Cancer Drugs* **3**, 623-628 (1992)
112. G.F. Oxenkrug, P.J. Requentina and A. Yuwiler: Dose moclobemide stimulate melatonin synthesis as the other selective MAO-A inhibitors do? *J. Neural. Transm. [Suppl.]* **32**, 171-175 (1990)
113. G.F. Oxenkrug and P.J. Requentina: The effect of MAO-A inhibition and cold-immobilization stress on N-acetylserotonin and melatonin in SHR and WKY rats. *J. Neural. Transm. [Suppl]* **52**, 333-336 (1998)
114. D.L. Murphy, N.A. Garrick, L. Tamarkin, P.L. Taylor and S.P. Markey: Effects of antidepressants and other psychotropic drugs on melatonin release and pineal gland function. *J. Neural. Transm. [Suppl.]* **21**, 291-309 (1986)
115. G.F. Oxenkrug, R. McCauley, I.M. McIntyre and C. Filipowicz: Selective inhibition of MAO-A but not MAO-B activity increases rat pineal melatonin. *J. Neural. Transm.* **61**, 265-270 (1985)
116. G.F. Oxenkrug, R. Balon, A.K. Jain and I.M. McIntyre: Melatonin plasma response to MAO inhibitor: influence on human pineal activity? *Acta Psychiatr. Scand.* **77**, 160-162 (1988)
117. D.-X. Tan, B. Pöeggeler, R.J. Reiter, L.-D. Chen, S. Chen, L.C. Manchester and L.R. Barlow-Walden: The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* **70**, 65-71 (1993)
118. R.J. Reiter, D.-X. Tan, B. Poeggeler, A. Menendez-Palaez, L.-D. Chen and S. Saarela: Melatonin as a free radical scavenger: implication for aging and age-related diseases. *Ann. of the N.Y. Acad. of Sci.* **719**, 1-12 (1994)
119. W.M. Awara, M. El-Gohary, S.H. El-Nabi and W.A. Fadel: In vivo and in vitro evaluation of the mutagenic potential of carbamazepine: does melatonin have anti-mutagenic activity? *Toxicology* **125**, 45-52 (1998)
120. Vijayalaxmi, R.J. Reiter, T.S. Herman and M.L. Meltz: Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.* **397**, 203-208 (1998)
121. W. Qi, R.J. Reiter, D.X. Tan, L.C. Manchester, S.J. Kim and J.J. Garcia: Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney. *Toxicology* **139**, 81-91 (1999)
122. Vijayalaxmi, M.L. Meltz, R.J. Reiter, T.S. Herman and K.S. Kumar: Melatonin and protection from whole-body irradiation: survival studies in mice. *Mutat. Res.* **425**, 21-27 (1999)

123. W. Löscher, M. Mevissen and M. Häußler: Seasonal influence on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced carcinogenesis in Sprague-Dawley rats under controlled laboratory conditions. *Pharmacol. Toxicol.* **81**, 265-270 (1997)
124. V. Giguère, M. Tini, G. Flock, E. Ong, R.M. Evans and G. Otulakowski: Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR $\alpha$ , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes & Dev.* **8**, 538-553 (1994)
125. M. Becker-André, I. Wiesenberg, N. Schaeren-Wiemers, E. André, M. Missbach, J.-H. Saurat and C. Carlberg: Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* **269**, 28531-28534 (1994)
126. I. Wiesenberg, M. Missbach, J.-P. Kahlen, M. Schröder and C. Carlberg: Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR $\alpha$  by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* **23**, 327-333 (1995)
127. M. Becker-André, E. André and J.F. DeLamarter: Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1371-1379 (1993)
128. B.M. Forman, J. Chen, B. Blumberg, S.A. Kliewer, R. Henshaw, E.S. Ong and R.M. Evans: Cross-talk among ROR $\alpha$ 1 and the Rev-erv family of orphan nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1253-1261 (1994)
129. R. Retnakaran, G. Flock and V. Giguère: Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1234-1244 (1994)
130. D. Acuña-Castroviejo, M.I. Pablos, A. Menendez-Pelaez and R.J. Reiter: Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **82**, 253-256 (1993)
131. D. Acuña-Castroviejo, R.J. Reiter, A. Menéndez-Peláez, M.I. Pablos and A. Burgos: Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal. Res.* **16**, 100-112 (1994)
132. G. Bertilsson, J. Heidrich, K. Svensson, M. Åsman, L. Jendeberg, M. Sydow-Bäckman, R. Ohlsson, H. Postlind, P. Blomquist and A. Berkenstam: Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for *CYP3A* induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12208-12213 (1998)
133. S.A. Kliewer, J.T. Moore, L. Wade, J.L. Staudinger, M.A. Watson, S.A. Jones, D.D. McKee, B.B. Oliver, T.M. Willson, R.H. Zetterström, T. Perlmann and J.M. Lehmann: An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92**, 73-82 (1998)
134. J.M. Lehmann, D.D. McKee, M.A. Watson, T.M. Willson, J.T. Moore and S.A. Kliewer: The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate *CYP3A4* gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* **102**, 1016-1023 (1998)

135. 上野和行: 薬物の代謝; CYP の遺伝的多型性. *月刊薬事* **42**, 3113-3120 (2000)
136. 喜多知子, 栄田敏之, 奥村勝彦: 3. 生体側の要因で変動する薬物動態 薬物代謝酵素の遺伝的多型と薬物動態 (4) アセチル化酵素. *月刊薬事* **42**, 872-880 (2000)
137. E.J.D. Lee, B. Zhao and F. Seow-Choen: Relationship between polymorphism of *N*-acetyltransferase gene and susceptibility to colorectal carcinoma in a Chinese population. *Pharmacogenetics* **8**, 513-517 (1998)

## 主査，副査名

本学位論文の審査は，千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

|    |                 |      |       |
|----|-----------------|------|-------|
| 主査 | 千葉大学教授（薬学部）     | 薬学博士 | 千葉 寛  |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部）     | 薬学博士 | 鈴木 和夫 |
| 副査 | 千葉大学教授（医学部附属病院） | 薬学博士 | 北田 光一 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部）     | 薬学博士 | 堀江 利治 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部）     | 医学博士 | 上田 志朗 |