

毒性試験に応用可能な
薬物代謝活性変動モデル動物に関する研究

2004年

渡邊 稔之

目次

略語	2
序論	4
第1章 UGT1sの活性を欠損するGunnラットの毒性試験への応用	8
第1節 Gunnラットにおけるtroglitazoneの3箇月間反復経口投与毒性試験	9
第2節 Gunnラットにおけるtroglitazoneの <i>in vivo</i> 代謝プロファイル	15
小括	22
第2章 Low GSTイヌのスクリーニングとその薬物代謝・薬物動態学的特徴の解析	23
第1節 Low GSTイヌの発見とその薬物代謝酵素活性の特徴	24
第2節 Low GSTイヌにおけるDCNBのGSH抱合反応の酵素反応速度論的解析	32
第3節 二次元電気泳動を用いたタンパク質発現解析によるlow GSTイヌにおけるGST欠損分子種の同定	35
第4節 Low GSTイヌにおけるDCNBの体内動態	42
小括	46
第3章 BSOによる持続的GSH低下マウスの毒性試験への応用	47
第1節 BSOによるGSH低下マウスの作製	48
第2節 BSOによるGSH低下マウスにおけるGSH低下の持続性	56
第3節 BSOによる持続的GSH低下マウスにおけるacetaminophen誘発肝および腎障害の増強	62
小括	69
第4章 RifampicinによるCYP3A誘導マーモセットの作製	70
第1節 マーモセットに対するrifampicin投与によるCYP3A誘導	71
第2節 マーモセット尿中6 β -OH/F比とCYP3A誘導の相関	75
小括	80
総括	81
謝辞	82
参考文献	83
主論文目録	93

略 語

本論文中では以下の略語を使用した。

試薬

- ・BSO : *L*-ブチオニン (*S,R*)-スルフォキシミン (*L*-buthionine (*S,R*)-sulfoximine)
- ・CDNB : 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)
- ・CMC : カルボキシメチルセルロース ナトリウム (carboxymethylcellulose sodium)
- ・DCNB : 1,2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (1,2-dichloro-4-nitrobenzene)
- ・EDTA-2K : エチレンジアミン四酢酸二カリウム (ethylenediaminetetraacetic acid dipotassium)

生体成分

- ・6 β -OHF : 6 β -ヒドロキシコルチゾール (6 β -hydroxycortisol)
- ・F : フリーコルチゾール (free cortisol)
- ・GSH : グルタチオン (glutathione)

薬物代謝酵素関連

- ・Cs : サイトソル (cytosol)
- ・CYP : シトクロム P450 (cytochrome P450)
- ・ECD 活性 : 7-エトキシクマリン O-脱エチル化 (7-ethoxycoumarin O-deethylase) 活性
- ・GST : グルタチオン転移酵素 (glutathione S-transferase)
- ・GST-C 活性 : CDNB 基質に対する GST 活性
- ・GST-D 活性 : DCNB 基質に対する GST 活性
- ・MCD 活性 : 7-メトキシクマリン O-脱メチル化 (7-methoxycoumarin O-demethylase) 活性
- ・Ms : ミクロゾーム (microsome)
- ・PCD 活性 : 7-プロポキシクマリン O-脱プロピル化 (7-propoxycoumarin O-depropylase) 活性
- ・ST : 硫酸転移酵素 (sulfotransferase)
- ・UGT : グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronosyltransferase)
- ・UGT1s : UGT1 ファミリーに属する一連の UGT 分子種

血液生化学的検査項目

- ・A/G 比 : アルブミン/グロブリン比 (albumin/globulin 比)
- ・ALB : アルブミン (albumin)
- ・ALP : アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase)
- ・ALT : アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase)
- ・AST : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase)
- ・Ca : カルシウム (calcium)
- ・Cl : クロール (chlor)

- ・ CRE : クレアチニン (creatinine)
- ・ D.BIL : 直接ビリルビン (direct bilirubin)
- ・ GLU : グルコース (glucose)
- ・ I.BIL : 間接ビリルビン (indirect bilirubin)
- ・ IP : 無機リン (inorganic phosphorus)
- ・ K : カリウム (potassium)
- ・ Na : ナトリウム (sodium)
- ・ T.BIL : 総ビリルビン (total bilirubin)
- ・ T.CHO : 総コレステロール (total cholesterol)
- ・ TG : トリグリセリド (triglyceride)
- ・ T.PRO : 総タンパク質 (total protein)
- ・ UN : 尿素窒素 (urea nitrogen)

血液学的検査項目

- ・ ALY : リンパ球実数 (absolute lymphocyte)
- ・ ANE : 好中球実数 (absolute neutrophil)
- ・ APTT : 活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time)
- ・ FIB : フィブリノゲン量 (fibrinogen)
- ・ HB : ヘモグロビン濃度 (hemoglobin)
- ・ HT : ヘマトクリット値 (hematocrit)
- ・ RBC : 赤血球数 (red blood cell)
- ・ MCH : 平均赤血球ヘモグロビン量 (mean corpuscular hemoglobin)
- ・ MCHC : 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration)
- ・ MCV : 平均赤血球容積 (mean corpuscular volume)
- ・ PLT : 血小板数 (platelet)
- ・ PT : プロトロンビン時間 (prothrombin time)
- ・ RET : 網赤血球数 (reticulocyte)
- ・ WBC : 白血球数 (white blood cell)
- ・ WBC% : 白血球数百分率 (white blood cell percentage)

その他

- ・ AUC : 血漿中濃度時間曲線下面積 (area under the plasma concentration time curve)
- ・ Cmax : 最高血漿中濃度 (maximum plasma concentration)
- ・ Day XX : 投与 XX 日目
- ・ γ -GCS : γ -グルタミルシステインシンセターゼ (γ -glutamylcysteine synthetase)
- ・ HPLC : 高速液体クロマトグラフ装置 (high performance liquid chromatograph)
- ・ Km : ミカエリス定数 (Michaelis constant)
- ・ Vmax : 最大速度 (maximum velocity)

序 論

薬物に起因する障害（副作用）の多くは、投与用量に相関して認められ、かつ正常動物での再現が可能な中毒性の機序で発現する。ほとんどの場合、中毒性の薬物障害は上市前の毒性試験や臨床試験で見出されており、その障害が発現すると予想される用量や血漿中濃度と薬効が発現する用量や血漿中濃度の間に十分な乖離（安全域）があると判断された薬物のみが上市に至る。しかし、上市前に行われる毒性試験には、特定の疾患や特徴をもたない正常動物が用いられているのに対し、上市後に実際に薬物を服用するヒトは、性別や年齢、生活環境や薬物服用歴等が多様である。また、特定の反応に人種差が認められることや、ヒトの多くの遺伝子に多型が存在することも近年明らかになってきている。したがって、同性、同年齢、同一人種のヒトでも特定の反応に個人差が認められることは珍しくはなく、時にそれは、正常動物を用いた毒性試験では検出不可能な薬物障害として発現することがある。

このような特定のヒトにのみ認められる薬物障害には、複数の薬物を同時に服用することによって発現する薬物相互作用によるものと、患者一人一人の特異体質によるものが知られている。前者に関しては、同時に服用している薬物がすべて明らかになっていればある程度の予測が可能である。さらに、1990年代に定着した医薬分業により、薬剤師による薬物服用歴チェックや服薬指導がより徹底されれば大幅に減少すると考えられる。一方、後者、すなわち特異体質性の薬物障害に関しては、臨床上 Table 1 に示す特徴が知られているものの¹⁾、その発症機序については不明な点が多く、現時点では予測は非常に困難である。

Table 1 The features of drug-induced injury

Key issues	Host idiosyncrasy		
	Intrinsic	Immunological	Metabolic
Duration until onset	2 ~ 3 days	2 ~ 4 weeks	1 week ~ 1 year
Dose-dependency	Dependent	Independent	Independent
Frequency of failure at high dose	High	Low	Low
Reproducibility in animals	Easy	Difficult	Difficult
Individual difference	Small	Large	Large

例えば、インスリン抵抗性改善薬 troglitazone は、1997年3月の日米での発売後、少数（国内では約20万人に110人）の患者に死亡例（8例）を含む重篤な肝障害が認められ²⁾、2000年3月に日米で発売が中止された。本剤による肝障害は、発症頻度が低い、発症までの期間が長い、発熱、発疹、好酸球増多などのアレルギー反応が認められないなどの臨床における特徴から、特異体質性の肝障害と推察された³⁾。Troglitazone の開発にあたっては非常に多くの毒性試験が実施されたが、特異体質性肝障害が報告された後、我々は特に高用量で長期間の投与を行った一般毒性試験ならびにがん原性試験の結果を再評価した⁴⁾。それらの試験における troglitazone の曝露を、血漿中濃度時間曲線下面積 (AUC₀₋₂₄) あるいは投与用量でヒトと比較した結果を Table 2 に示す。ラットのがん原性試験ではヒトと比較して投与用量比で最

大 66.7 倍, AUC_{0-24} 比で最大 29.5 倍の曝露が 2 年間継続した. 同様に, マウスのがん原性試験では投与用量比で最大 66.7 倍, AUC_{0-24} 比で最大 14.2 倍の曝露が 2 年間, また, サルの一般毒性試験では投与用量比で 100 倍, AUC_{0-24} 比で最大 3.4 倍の曝露が 1 年間それぞれ継続した. しかし, これほどの曝露を実験動物の一生涯に近い期間で継続しても, 加齢性病変, 薬物代謝酵素の軽度な誘導に伴う肝細胞肥大などが一部の試験で見られたのみで, 肝細胞の変性や壊死などの肝障害はまったく認められなかった. したがって, 正常動物を用いた毒性試験のみでは, ヒトにおける troglitazone の特異体質性肝障害予測は困難であったと考えられる.

Table 2 Exposure comparison between animals and human

Animal species	Administration period	Sex	Exposure comparison ^{a)} (\times times)	
			by AUC_{0-24}	by dose
Wistar rat	2 years	Male	\times 7.6	\times 66.7
		Female	\times 29.5	\times 16.7
B6C3F ₁ mouse	2 years	Male	\times 10.1	\times 66.7
		Female	\times 14.2	\times 66.7
Cynomolgus monkey	1 year	Male	\times 3.4	\times 100
		Female	\times 3.3	\times 100

a) The human exposure level (AUC_{0-24} : 21.4 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$), which obtained in clinical studies of humans given maximal clinical dose (600 mg/body = 12 mg/kg), was compared with those of animals

特異体質性の薬物障害に関しては, 総説が数多く執筆されるなど精力的に研究が行われている⁵⁻¹⁰⁾. しかし現時点では, 幾つかの薬物による障害発症機序の仮説が立てられているに過ぎない感がある. 一般にはその発症機序として Fig. 1 に示す 2 つの機序が考えられている^{5,9)}. すなわち, 免疫反応を介する機序, および troglitazone による肝障害の発症機序とも推察されている特異体質性の薬物代謝異常による機序である. Fig. 1 から明らかなように, これらの発症機序にはいずれも活性代謝物の生成過程が含まれる (前者は活性代謝物が生体内高分子に共有結合しハプテン化, 後者は少数のヒトでのみ生成する活性代謝物が生体内高分子に共有結合して機能障害誘発). したがって, 正常動物での再現が困難な特異体質性薬物障害の一部は, 薬物代謝酵素の発現や活性の異常を示し, 活性代謝物をより多く生成するモデル動物, あるいは活性代謝物の解毒が抑制されたモデル動物を用いた毒性試験により検出可能になることが考えられる. しかし, その検証および新規モデルの提案は必ずしも充分とは言い難い.

そこで本研究では, 低用量の薬物による毒性の検出, すなわち高感度な検出, および正常動物では検出が困難な特異体質性薬物障害の検出を視野に入れ, 毒性試験に応用可能な薬物代謝活性変動モデル動物に関する基礎的検討を行った. 本研究で着目した薬物代謝反応は, Fig. 2 に示す troglitazone の *in vivo* 代謝反応^{11, 12)} であるグルクロン酸抱合反応, 硫酸抱合反応および cytochrome P450 (CYP) による酸化反応のうち, グルクロン酸抱合反応および CYP の 1 分子種である CYP3A による酸化反応とした. また, その他に, troglitazone による肝障害は, glutathione S-transferase (GST) 分子種, GSTM1 および GSTT1 の同時欠損者で発症頻度が有意に高いことから¹³⁾, グルタチオン (GSH) 抱合反応にも着目した.

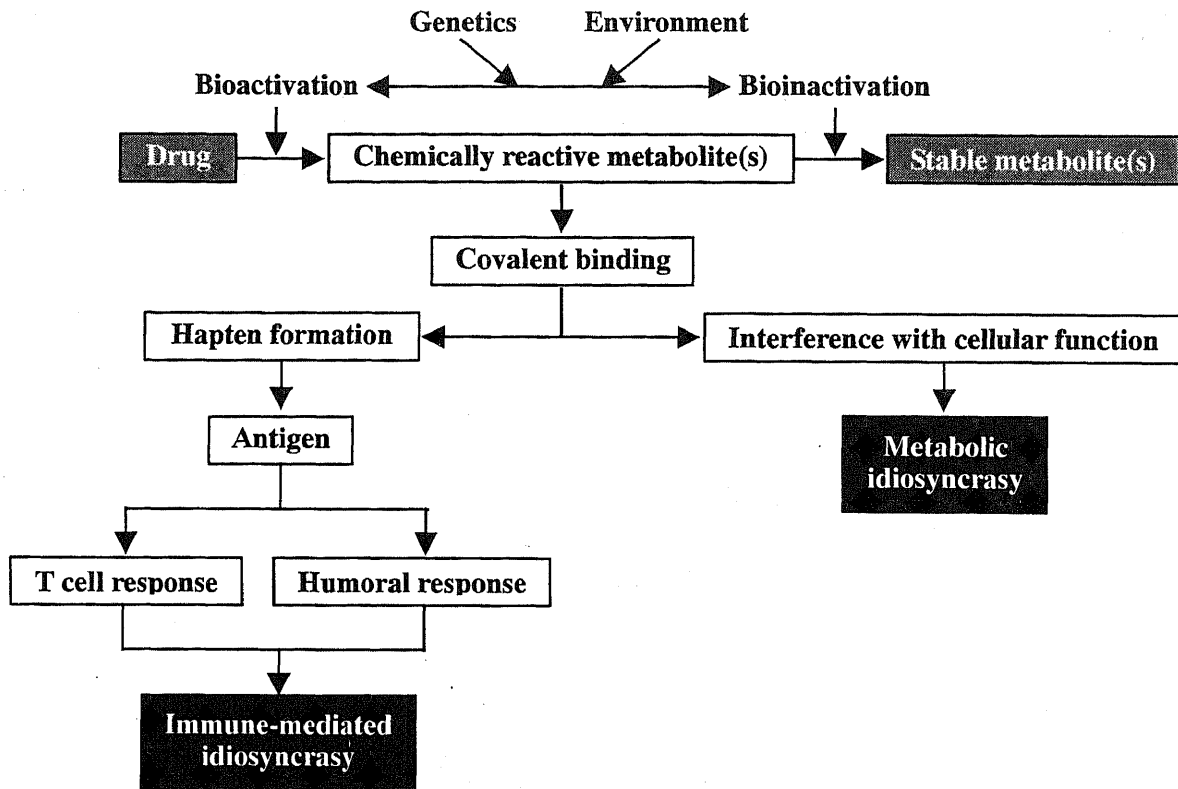


Fig. 1 Proposed mechanisms of toxicity induced by immune-mediated or metabolic idiosyncrasy.

第1章では、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) のうち、UGT1 ファミリーに属する一連の分子種 (UGT1s) の活性を欠損する薬物代謝酵素発現異常モデルである Gunn ラット^{14, 15)} を、毒性試験に応用可能か検討した。すなわち、troglitazone の3箇月間反復経口投与による毒性試験を Gunn ラットならびにその親系統である Wistar ラットで実施し、これまでに報告のない Gunn ラットを用いた長期毒性試験の実施が可能か、得られる結果から毒性の評価が可能か、およびヒトで認められる troglitazone の肝障害が Gunn ラットで特異的に発現するか、の3点につき検討した。

第2章および第3章では、GSH 抱合活性の低下したモデル動物に着目した。GSH 抱合反応は、一部例外はあるものの、一般に求電子性で反応性の高い活性代謝物の解毒反応として知られていることから、本反応の持つ毒性学的意義は大きい。また、ヒトでは複数の GST 分子種に欠損多型が報告されているにもかかわらず¹⁶⁻¹⁸⁾、先天的に GST を欠損する実験動物に関しては報告がない。そこで第2章では、安全性試験に繁用される実験動物のうち、GST に関する報告が極端に少ないイヌにおいて、GST 分子種を欠損する個体のスクリーニングを行った。その結果、1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) に対する GST 活性 (GST-D 活性) をほとんど示さない low GST イヌを見出すことができた。その特徴を解析するとともに、low GST イヌにおける低 GST 活性が、化学物質の *in vivo* 体内動態にどのように影響するかを検討した。一方、第3章では、GSH 合成の阻害剤である *L*-buthionine (*S,R*)-sulfoximine (BSO)¹⁹⁻²¹⁾ の飲水投与により、BSO 自身による毒性を発現することなく、脳を除くすべての組織で GSH 含量が持続的に低値を示すマウスを作製した。また、この持続的 GSH 低下マウスで、GST で代謝

れる薬物の毒性が増強するか検討し、本モデルの毒性試験への応用の可能性を検証した。

第4章では、CYP3Aの誘導モデル作製を試みた。CYP3Aはもっとも多く医薬品の代謝に関与する薬物代謝酵素の一つであり^{22, 23)}、CYP3Aの誘導や阻害に起因した薬物相互作用の報告は数多い²⁴⁻²⁹⁾。また、isoniazidによる肝障害はCYP3Aを誘導することが知られるrifampicinとの併用例で発症頻度が高いという報告もあることから^{30, 31)}、CYP3Aが代謝的活性化に関与するケースも考えられる。そこで第4章では、CYP3Aの相同性がヒトに近いサル類の中で体重が軽く扱いやすいコモンマーモセットに、臨床用量のrifampicinを投与し、CYP3A誘導モデルを作製した。また、本モデルにおけるCYP3A誘導が、尿中の6 β -hydroxycortisol (6 β -OHF)とfree cortisol (F)の比(6 β -OHF/F比)により評価可能であることを、実験動物で初めて明らかにした。

総括では、以上の研究成果をまとめ、これらの薬物代謝活性変動モデル動物をどのように毒性試験に応用すれば、従来以上に安全性の高い医薬品の供給が可能になるかの展望を記載した。

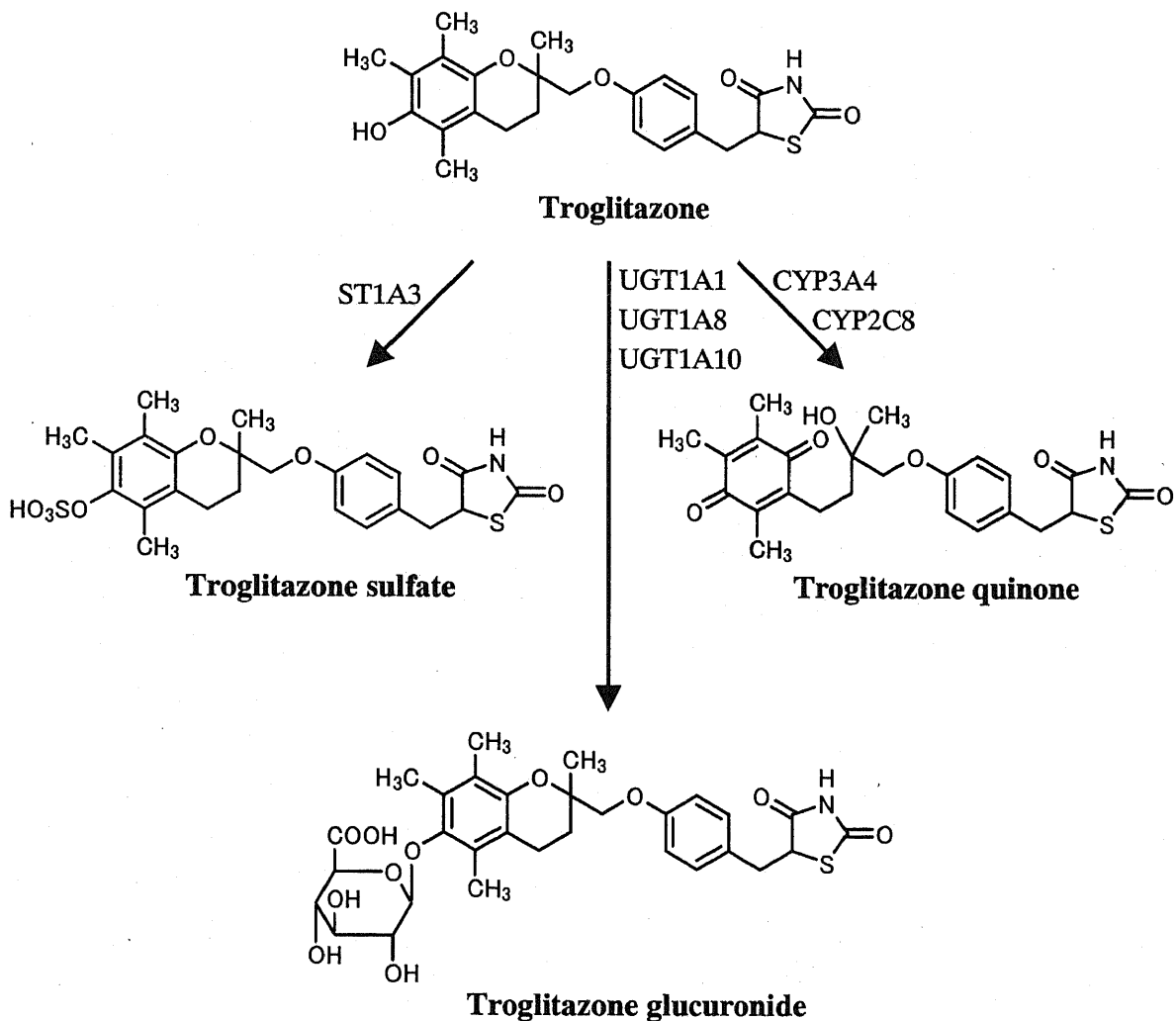


Fig. 2 Major metabolic pathways for troglitazone in humans.

第1章 UGT1sの活性を欠損する Gunn ラットの毒性試験への応用

1938年に Gunn によって報告された Gunn ラット^{14, 15)}は、UGT1sをコードする塩基配列のうち1つを欠失する^{32, 33)}。これにより、その直後に終止コドンが現れることから、Gunn ラットは、ビリルビンを含む各種基質に対するグルクロン酸抱合活性を欠損する^{32, 33)}。また、その結果、非抱合型ビリルビン（間接ビリルビン）が体内に蓄積し、高ビリルビン血症を示す。ヒトでも Gunn ラット同様の UGT1 遺伝子異常による高ビリルビン血症（Crigler-Najjar 症候群 I 型および II 型、Gilbert 症候群など）が知られており³⁴⁻³⁹⁾、その臨床的特徴は Gunn ラットと酷似している。したがって、Gunn ラットは新生児黄疸の治療法や核黄疸の予防法開発、黄疸の光線治療法の効果ならびに副作用の検討、神経細胞に対するビリルビンの毒性やその解毒に関する研究など、高ビリルビン血症に関連した研究に古くから用いられてきた⁴⁰⁻⁴³⁾。

一方、グルクロン酸抱合反応は、脂溶性の高い薬物に水溶性の高いグルクロン酸を導入し排泄を促進する、薬物を含む化学物質の解毒代謝反応を考える上で重要な反応である。これまでに、抗がん剤 irinotecan による下痢の原因とされる活性代謝物 SN-38 のグルクロン酸抱合が、Crigler-Najjar 症候群 I 型の患者の肝臓ならびに Gunn ラット肝臓より調製した酵素画分では進行しないことが報告されている⁴⁴⁾。このことから Gunn ラットは、Crigler-Najjar 症候群や Gilbert 症候群の患者における毒性予測、UGT1s で解毒される薬物による毒性の低用量での検出、すなわち高感度な検出、および特異体質性の薬物障害の検出など毒性試験での活用も期待される。しかし、現実には acetaminophen 単回投与後の肝障害が Gunn ラットでより増強されることが血液生化学的に報告されているのみで^{45, 46)}、そもそも長期毒性試験の実施が可能か、また、得られた結果から毒性の評価が可能か等、毒性試験への応用面で不明な点が多い。

そこで、第1章では、Gunn ラットを用いた troglitazone の3箇月間反復経口投与毒性試験を実施した。臨床でごく少数の患者に死亡例を含む重篤な肝障害が認められた troglitazone は、硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体ならびにキノン型代謝物などに代謝されることが知られており (Fig. 2)^{11, 12)}、また、重篤な肝障害を発症した患者の知見からビリルビンの高値が予後不良の徴候とされている³⁾。このような知見から、我々は troglitazone による肝障害の発症機序としてビリルビンと troglitazone によるグルクロン酸抱合の競合を仮定した。すなわち、troglitazone のグルクロン酸抱合反応がビリルビンに競合的に阻害される結果、代謝プロファイルが変化し肝障害を発症する可能性、およびビリルビンのグルクロン酸抱合が troglitazone に競合的に阻害され、高ビリルビン血症がさらに増悪して肝障害を発症する可能性を考えた。この仮説が正しければ、正常動物では発症しない troglitazone による肝障害が UGT1s の活性を欠損する Gunn ラットで再現できる可能性がある。第1章では、病態動物である Gunn ラットを用いた毒性試験を親系統である Wistar ラットと同様に実施可能か、得られる結果から毒性の評価が可能か、さらに臨床で認められる troglitazone による特異体質性肝障害が UGT1s の活性を欠損する Gunn ラットで再現可能か、の3点を検討することを目的とした。

第1節 Gunn ラットにおける troglitazone の3箇月間反復経口投与毒性試験

第1節では、Gunn ラットおよびその親系統である Wistar ラットを用い、troglitazone の3箇月間反復経口投与毒性試験を実施した。本試験では、UGT1s の活性を欠損し高ビリルビン血症を示す Gunn ラットを用いた長期毒性試験の実施が可能か、得られた結果から毒性の評価が可能か、および臨床で認められる troglitazone による特異体質性肝障害の Gunn ラットでの再現が可能かの3点を検討した。なお、本論文では投与 X 日目を Day X と表記する。

【実験方法】

実験動物

日本エスエルシー株式会社で生産育成された Gunn ラット (Gunn rat Slc) および Wistar ラット (Slc:Wistar) の雌雄に、1週間の馴化を経て、7週齢より投与を開始した。

群構成、投与用量および投与方法

0, 100 および 400 mg/kg 投与群の3群を設定し、各群雌雄各5例構成とした。0.5% carboxymethylcellulose sodium (CMC: 和光純薬工業株式会社) 水溶液で troglitazone を 0, 2 および 8% の濃度で含む懸濁液を調製し、ラット体重 100 g あたり 0.5 mL の投与容量で3箇月間 (94日間) 反復経口投与した。なお、troglitazone は三共株式会社にて合成され、固体分散体として 60.1% の troglitazone を含む製剤を使用した。また、懸濁液の調製は毎投与時に行った。

一般状態、体重および器官重量

一般状態は、投与開始4日前より解剖日まで毎日1回以上個体別に観察した。体重は、投与開始4日前より解剖日まで週1回以上個体別に測定した。また、死亡例を除く全例につき、解剖後、脳、下垂体、甲状腺 (上皮小体含む)、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓 (左右)、脾臓、副腎 (左右)、精巣 (左右)、前立腺、精囊、卵巣 (左右) および子宮の絶対重量を測定した。さらに、その重量を体重で除し、相対重量を算出した。

血液生化学的検査

解剖日にすべての生存例にエーテル麻酔を施し、腹大動脈より採血した。得られた血液から常法に従って血清を調製し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総ビリルビン (T.BIL)、直接ビリルビン (D.BIL)、間接ビリルビン (I.BIL)、総コレステロール (T.CHO)、トリグリセリド (TG)、グルコース (GLU)、総タンパク質 (T.PRO)、アルブミン (ALB)、アルブミン/グロブリン比 (A/G 比)、尿素窒素 (UN)、クレアチニン (CRE)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl) を測定した。これらの測定

には自動分析装置（7250：株式会社日立製作所）を使用した。

血液学的検査

解剖日に血液生化学的検査と同様に採取した血液に抗凝固剤（15% EDTA-2K あるいは 3.13% sodium citrate）を添加し、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（HB）、ヘマトクリット値（HT）、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、網赤血球数（RET）、血小板数（PLT）、白血球数（WBC）、白血球数百分率（WBC%）、好中球実数（ANE）、リンパ球実数（ALY）、プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）およびフィブリノゲン量（FIB）を測定した。このうち、RET および WBC% の測定には血液細胞自動分析装置（マイクロックス HEG-120A：オムロン株式会社）、PT、APTT および FIB の測定には血液凝固分析装置（コアグマスターII：三共株式会社）、その他の項目の測定には全自動多項目血球計数装置（SYSTEM9000：日本テクニコン株式会社）をそれぞれ使用した。

病理解剖学的検査

解剖時に、器官および組織を肉眼的に観察した。

病理組織学的検査

Wistar ラットは肝臓について実施した。また、Gunn ラットは肝臓の他、途中死亡例で病理組織学的に異常の認められた腎臓、心臓、脾臓および骨髄について実施した。組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液中で固定した後、常法に従ってパラフィンワックス 60（サクラファインテックジャパン株式会社）に包埋した。その後、マイクロトームを用いて 2-3 μm 厚の薄切切片を作製した。脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

【実験結果】

一般状態

400 mg/kg 投与群の Gunn ラット雄の 1 例で Day 77 から排糞の減少が、Day 83 から呼吸不整が観察され、Day 89 に死亡した。また、400 mg/kg 投与群の Gunn ラット雌 1 例で Day 64 から Day 69 に排糞の減少が認められた。その他の個体には投与期間を通じて一般状態に変化は認められず、死亡例も認められなかった。

体重・肝臓重量

解剖時の体重、ならびに器官重量のうち肝臓の絶対重量および相対重量を Table 3 に示す。体重は、Gunn ラットおよび Wistar ラットとも投与期間中に一過性に troglitazone 投与群で有意な高値や低値が散見された。しかし、解剖時には両系統とも対照群と troglitazone 投与群で

有意な変化は認められなかった。一方、100 および 400 mg/kg 投与群の Gunn ラット雌で肝臓の絶対重量および相対重量がいずれも有意に増加した。また、400 mg/kg 投与群の Wistar ラット雄で肝臓の相対重量が有意に増加した。肝臓以外の器官では、400 mg/kg 投与群の Gunn ラット雌で心臓の絶対重量ならびに相対重量が有意に増加した。その他の器官の重量に投与に起因する変化は認められなかった。

血液生化学的検査

肝障害時に顕著に上昇することが知られる AST, ALT, ALP, T.BIL, D.BIL および I.BIL の結果を Table 4 に示す。UGT1s の活性を欠損する Gunn ラットでは、Wistar ラットに比べ、雌雄とも T.BIL, D.BIL および I.BIL が顕著に高値を示した。対照群と troglitazone 投与群を比較すると、Wistar ラット雌雄で AST の低下が、Wistar ラット雄で ALP の上昇が、Gunn ラット雌で D.BIL の上昇が認められた。このうち、AST が低下した場合の毒性学的意義は明確ではないが、少なくとも肝障害を示唆する変化ではないと思われる。また、ALT ならびに D.BIL の上昇は 20%前後のごく軽度な上昇であり、他の検査値に変化が認められなかったことから、偶発的な変化と推察された。上記以外の検査項目にも、投与に起因した変化は認められなかった。また、BIL 関連の検査値以外に、Gunn ラット特異的な検査値の異常は認められなかった。

血液学的検査

100 および 400 mg/kg 投与群の Gunn ラット雌で、RBC, HB, HT および PLT が有意に低下した。また、400 mg/kg 投与群の Wistar ラット雌雄ならびに 400 mg/kg 投与群の Wistar ラット雄で HB が有意に低下した。その他の検査項目には、投与に起因した変化は認められなかった。また、血液学的検査値には Gunn ラットに特異的な異常は認められなかった。

病理解剖学的検査

途中死亡例も含め、いずれの系統のラットにも投与に起因した変化は認められなかった。

病理組織学的検査

400 mg/kg 投与群の Gunn ラット雄の死亡例では、肝臓、腎臓、心臓、脾臓および骨髄に組織学的な異常が観察された。すなわち、肝臓では肝細胞への胆汁色素沈着および肝細胞の好酸性細胞質変化が、腎臓では乳頭部への胆汁色素沈着および乳頭壊死が、脾臓では白脾髄の萎縮および色素沈着の増加が、心臓では間質の線維化が、骨髄では造血低下が観察された。

途中死亡例を除く Gunn ラットでは、肝臓および腎臓に組織学的な異常が観察された。すなわち、肝臓では対照群を含む全群に肝細胞細胞質の好酸性変化が散見された。また、雌の対照群および 100 mg/kg 投与群の各 1 例に胆管の増生が認められた。腎臓では対照群を含む全群に腎臓乳頭部への胆汁色素沈着および進行性の腎症が高率に認められた。さらに、雌では対照群を含む全群に腎盂炎が散見された。その他、乳頭部壊死、腎盂の拡張および水腎症が散見された。心臓、脾臓および骨髄には組織学的な異常は認められなかった。

一方、Wistar ラットの肝臓に組織学的な異常は認められなかった。

Table 3 Body weights, absolute liver weights and relative liver weights in rats treated orally with troglitazone for 3 months.

Item	Dose (mg/kg)	Gunn rat		Wistar rat	
		Male	Female	Male	Female
B.W. (g)	0	391.4 ± 30.6	194.2 ± 12.4	382.4 ± 22.6	200.6 ± 11.9
	100	368.2 ± 33.8	202.6 ± 5.8	362.8 ± 17.7	195.0 ± 10.6
	400	391.3 ± 56.9	210.6 ± 10.5	381.2 ± 29.9	211.2 ± 11.6
A.L.W. (g)	0	13.0 ± 1.7	7.7 ± 0.5	12.5 ± 1.6	6.4 ± 0.7
	100	11.4 ± 2.2	8.8 ± 0.5**	12.6 ± 0.9	6.2 ± 0.4
	400	13.7 ± 2.0	9.7 ± 0.5**	14.4 ± 1.1	7.1 ± 0.3
R.L.W. (g%)	0	3.3 ± 0.3	4.0 ± 0.1	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1
	100	3.1 ± 0.3	4.4 ± 0.2**	3.5 ± 0.2	3.2 ± 0.1
	400	3.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1**	3.8 ± 0.2**	3.4 ± 0.1

Each value represents the mean ± SD of 5 rats except for the value of male Gunn rat given 400 mg/kg. The value of male Gunn rat given 400 mg/kg represents the mean ± SD of 4 rats.

** : Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.01$, Dunnett's test).

B.W., A.L.W. and R.L.W. mean body weight, absolute liver weight and relative liver weight, respectively.

Table 4 Blood biochemical parameters in rats treated orally with troglitazone for 3 months.

Parameter	Dose (mg/kg)	Gunn rat		Wistar rat	
		Male	Female	Male	Female
AST (U/L)	0	175.0 ± 59.9	103.6 ± 13.7	127.4 ± 27.3	134.2 ± 24.3
	100	113.0 ± 27.5	126.4 ± 35.8	81.8 ± 9.5**	111.8 ± 11.8
	400	107.8 ± 24.8	98.0 ± 12.2	81.2 ± 7.0**	90.2 ± 5.7**
ALT (U/L)	0	83.6 ± 30.9	49.6 ± 6.7	75.6 ± 19.0	88.8 ± 10.9
	100	51.4 ± 15.6	65.2 ± 23.9	53.4 ± 9.3	72.2 ± 11.3
	400	52.3 ± 14.7	54.2 ± 12.1	52.0 ± 4.3	69.2 ± 11.9
ALP (U/L)	0	654.4 ± 147.6	175.0 ± 38.4	756.6 ± 61.4	877.0 ± 116.2
	100	627.2 ± 148.1	657.4 ± 119.6	910.4 ± 53.0**	935.0 ± 110.1
	400	830.5 ± 115.8	673.8 ± 192.2	907.6 ± 24.3**	990.8 ± 70.5
T.BIL (mg/dL)	0	7.13 ± 1.01	6.26 ± 0.47	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00
	100	7.73 ± 1.33	5.45 ± 0.54	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.00
	400	6.12 ± 1.18	6.05 ± 0.82	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.00
D.BIL (mg/dL)	0	0.64 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
	100	0.63 ± 0.03	0.57 ± 0.03*	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01
	400	0.61 ± 0.03	0.63 ± 0.05**	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
I.BIL (mg/dL)	0	6.48 ± 1.02	5.76 ± 0.46	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
	100	7.10 ± 1.30	4.88 ± 0.55	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00
	400	5.52 ± 1.15	5.43 ± 0.79	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00

Each value represents the mean ± SD of 5 rats except for the value of male Gunn rat given 400 mg/kg.

The value of male Gunn rat given 400 mg/kg represents the mean ± SD of 4 rats.

* and **: Significantly different from the mean value of the control group (p<0.05 and p<0.01, respectively, Dunnett's test).

【考察】

Gunn ラットを用い、troglitazone の 3 箇月間反復経口投与毒性試験を実施した。本試験では、これまでに報告のない Gunn ラットを用いた長期間の毒性試験が実施可能か、およびその結果が評価に値するものかを検討した。また、臨床で認められる troglitazone の特異体質性肝障害を、UGT1s の活性を欠損する Gunn ラットで再現することが可能かについても同時に検討した。

その結果、Gunn ラットにおいて、400 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例で一般状態の悪化が認められ、雄が Day 89 に死亡した。この死亡例では、肝細胞への胆汁色素沈着および肝細胞の好酸性細胞質変化、腎乳頭壊死および腎乳頭部への胆汁色素の沈着が観察された。さらに、脾臓や骨髄で萎縮性あるいは機能低下性の変化が観察された。これらの変化から、この個体は重度の高ビリルビン血症に関連して死亡したと推察された。しかし、肝細胞の壊死などはまったく認められなかったことから、troglitazone 投与に起因した肝障害による死亡ではないと判断した。Wistar ラットも含め、その他の動物には一般状態の変化は観察されなかった。

血液生化学的検査では、Gunn ラット特異的な検査値の異常として UGT1s の活性欠損に伴うビリルビンの顕著な高値が認められた。しかし、その他の検査値には異常が認められず、Gunn ラットを用いた毒性試験実施時に注意する必要があるのは、ビリルビンの高値のみであった。また、肝障害も含め、両系統ラットに troglitazone 投与に起因する変化は認められなかった。

血液学的検査では、Gunn ラット特異的な検査値の異常は認められなかった。Troglitazone 投与に起因した変化として、RBC, HB, HT および PLT の低下が散見されたが、これらは循環血漿量の増加に伴う見かけ上の変化と推察された。

病理学的検査では、Gunn ラットの肝臓および腎臓に胆汁色素沈着等の変化が認められた。しかし、これらは対照群を含む全群に散見されたことから、高ビリルビン血症を示す Gunn ラットに特異的な変化と判断した。Troglitazone 投与に起因した変化として、肝臓重量ならびに心臓重量の増加が散見されたが、前者は酵素誘導に伴う適応的な変化、後者は循環血漿量の増加による負荷増大に伴う変化と推察された。

以上、Gunn ラットでは、ビリルビンが高値を示し、肝臓や腎臓に高ビリルビン血症に伴う変化が観察された。しかし同時に、3 箇月までの毒性試験が実施可能な安定したバックグラウンドを有することも明らかとなった。したがって、対照群との比較により Gunn ラット特異的な変化を適切に評価すれば、薬物起因性の毒性の評価も可能と推察された。グルクロン酸抱合で代謝される acetaminophen を Gunn ラットおよび Wistar ラットに単回投与すると、Gunn ラットで肝障害がより増悪することが報告されていることから^{45, 46)}、Gunn ラットを用いた長期毒性試験により、UGT1s で代謝される薬物による毒性の高感度な検出や、Crigler-Najjar 症候群および Gilbert 症候群等の特異体質に起因する毒性の予測が可能になることが示唆された。

一方、グルクロン酸抱合で代謝される troglitazone の投与により臨床で認められる肝障害は、予後不良の徴候としてビリルビンの高値が報告されている。したがって、UGT1s の活性を欠損し、高ビリルビン血症を示す Gunn ラットを用いた今回の毒性試験で、肝障害が再現されることを期待したが、肝障害の徴候はまったく認められなかった。次節では、この原因を検討する目的で troglitazone の *in vivo* 代謝プロファイルを Gunn ラットと Wistar ラットで比較する。

第2節 Gunn ラットにおける troglitazone の *in vivo* 代謝プロファイル

前節では、UGT1s の活性を欠損し高ビリルビン血症を示す Gunn ラットを用い、troglitazone の毒性試験を実施したが、臨床で認められる特異体質性肝障害を再現できなかった。この原因を明らかにする目的で、前節の毒性試験で Day 1, Day 14 および Day 94 に採取した血漿中の troglitazone およびその代謝物(グルクロン酸抱合体ならびに硫酸抱合体)の濃度を測定し、troglitazone の代謝プロファイルを Gunn ラットと Wistar ラットで比較した。

【実験方法】

採血

前節に示した毒性試験の中で、Day 1 および Day 14 の投与前および投与後 1, 2, 4, 8 および 24 hr に、Day 94 は投与後 1 hr に、0.3 mL/point ずつ採血した。

血漿中濃度測定

血液サンプルを、4°C 下、10,000 rpm で 5 分間遠心分離して血漿を得た。この 0.1 mL に内部標準物質である 9-acetylanthracene (シグマ・アルドリッチ ジャパン株式会社) のエタノール溶液 0.4 mL を添加し攪拌後、25°C 下、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して除タンパクした。得られた上清 50 μ L を高速液体クロマトグラフ装置 (HPLC, Waters 2690 Separation Module System: 日本ウォーターズ株式会社) に注入し、血漿中の troglitazone, 硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体の濃度を定量した。HPLC 分析条件は以下に示す。血漿中濃度の測定後、AUC₀₋₂₄ を台形法にて算出した。なお、硫酸抱合体ならびにグルクロン酸抱合体の標品は、三共株式会社で合成されたものを使用した。

カラム: ERC-ODS-1262 (100 mm \times 6.0 mm I.D., 5 μ m: イー・エル・シー株式会社) および YMC Pack ODS-AMAM-302 (150 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m: ワイエムシー株式会社)

カラム温度: 40°C

移動相: acetonitrile / water / phosphoric acid = 53 / 47 / 0.1

波長: UV 230 nm

サンプルクーラー温度: 5°C

【実験結果】

400 mg/kg 投与群における Day 1 および Day 14 の troglitazone とその代謝物の血漿中濃度推移をそれぞれ Fig. 3 および Fig. 4 に示す。また、400 mg/kg 投与群の AUC₀₋₂₄ を Table 5 に、同群の Day 1, Day 14 および Day 94 の投与後 1 hr の血漿中濃度を Table 6 に示す。

Day 1 の血漿中濃度

Troglitazone の血漿中濃度は、雄では両系統でほぼ同等であったが (Fig. 3a), 雌では Gunn ラットで各採血ポイントとも約 2 倍以上の高値を示した (Fig. 3d). 硫酸抱合体は雌雄とも両系統で大差はなかった (Fig. 3b および 3e). 興味深いことに、グルクロン酸抱合体は Wistar ラットのみならず Gunn ラットでも雌雄で生成した. 雄では Wistar ラットで Gunn ラットより高い血漿中濃度を示したが、雌では両系統でほぼ同等であった (Fig. 3c および 3f).

Day 14 の血漿中濃度

Troglitazone の血漿中濃度は、Day 1 同様、雌のみ Gunn ラットで Wistar ラットより約 2 倍高値を示した. また、雄では両系統とも Day 1 と同等の血漿中濃度を示したが、雌では両系統とも Day 1 に比べ、Day 14 で低値を示した (Fig. 4a および 4d). 硫酸抱合体の血漿中濃度は、Day 1 と同様に雌雄とも両系統で差は認められなかったが、雌雄いずれも Day 1 に比べ Day 14 で低値を示した (Fig. 4b および 4e). 一方、グルクロン酸抱合体は、Day 1 と同様に Gunn ラットでも検出された. しかし Day 14 には、雄では両系統ともほぼ同程度の血漿中濃度を示したのに対し、雌では Gunn ラットで Wistar ラットより高値を示した (Fig. 3c および 3f).

Day 94 の血漿中濃度

Troglitazone およびその代謝物の Day 94 の血漿中濃度を Day 1 および Day 14 と比較する目的で、投与後 1 hr の各々の濃度を Table 5 にまとめた. 両系統とも Day 14 と Day 94 の濃度に大差はなく、Day 14 以降 Day 94 まで troglitazone および代謝物の血漿中濃度はほぼ同様の推移をしたと考えられた. すなわち、本試験では Day 14 の曝露が 3 箇月間継続したと判断した.

曝露量の比較

Gunn ラットおよび Wistar ラットにおける曝露量を AUC_{0-24} 値で比較した (Table 6). その結果、Day 1 の雄で硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体の AUC_{0-24} が Gunn ラットで Wistar ラットより低値を示したが、それ以外の AUC_{0-24} はすべて Gunn ラットで Wistar ラットより高値を示した. しかし、両系統間の差は、雌における troglitazone を除き顕著ではなかった. Troglitazone の代謝プロファイルは、雄では両系統とも 硫酸抱合体 > troglitazone > グルクロン酸抱合体 の順であった. 一方、雌では両系統とも troglitazone > 硫酸抱合体 > グルクロン酸抱合体 の順であった. すなわち、troglitazone の代謝プロファイルには両系統で差は認められず、同等であった.

Troglitazone および代謝物の AUC_{0-24} を雌雄で比較すると、両系統とも雄で硫酸抱合体が高く、雌で troglitazone が高かった. これは、硫酸抱合能の性差 (雄 > 雌) によると推察された.

一方、Day 14 の troglitazone の AUC_{0-24} を、最大臨床用量 (600 mg/body) を投与時のヒト AUC_{0-24} ($21.4 \mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$) と比較した. その結果、今回実施した毒性試験では、Gunn ラット雄でヒトの 2.0 倍、Gunn ラット雌で 10.1 倍、Wistar ラット雄で 0.9 倍、Wistar ラット雌で 3.6 倍の troglitazone 曝露が得られたと推察された. Gunn ラット雌で臨床の 10 倍を超える曝露が得られたことから、本試験では毒性を評価するのに十分な曝露が得られたと判断した.

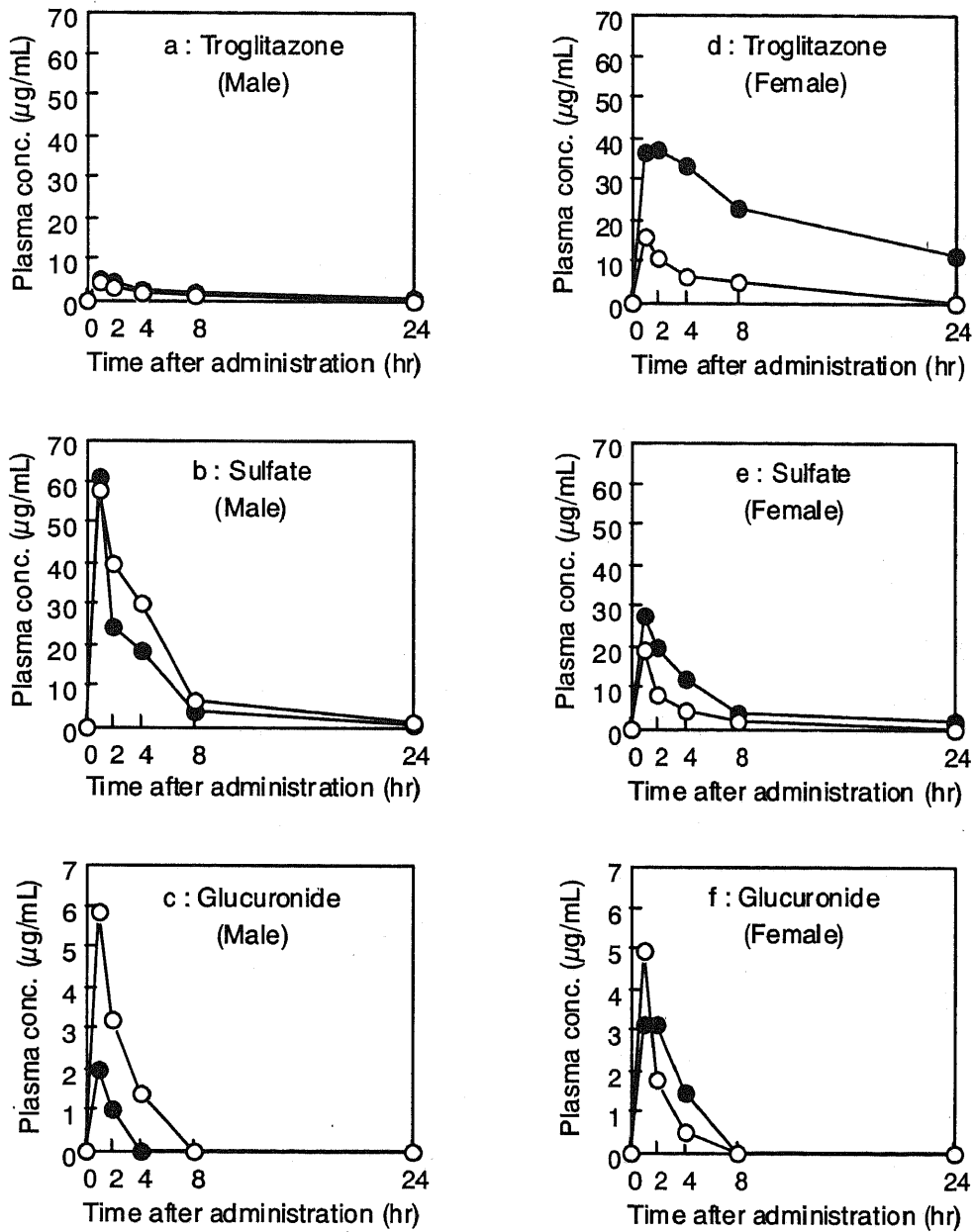


Fig. 3 Plasma concentrations of troglitazone and its metabolites on Day 1 in rats treated orally with troglitazone at a dose level of 400 mg/kg.

Each concentration represents mean value of 5 rats. ● and ○ represent Gunn rat and Wistar rat values, respectively.

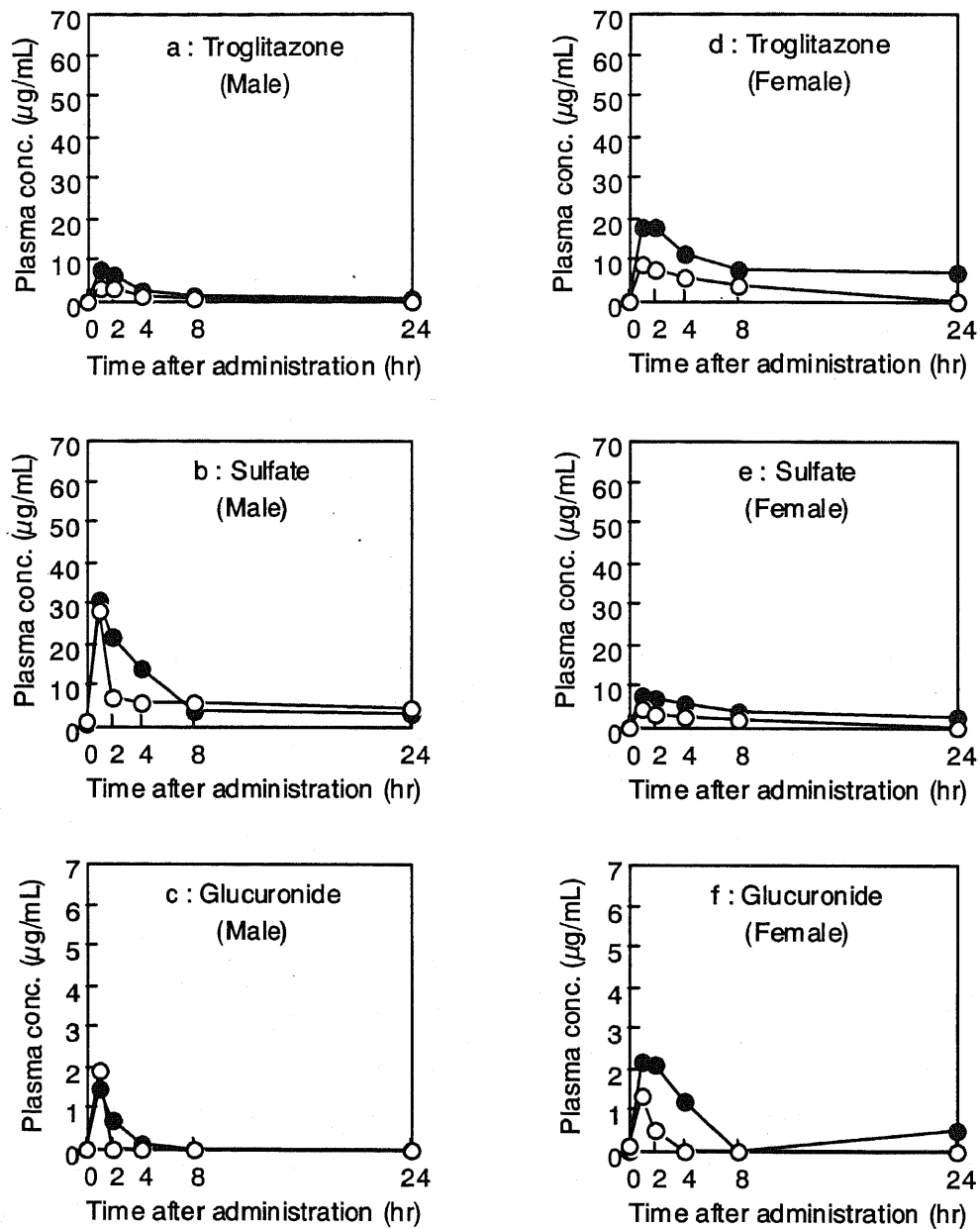


Fig. 4 Plasma concentrations of troglitazone and its metabolites on Day 14 in rats treated orally with troglitazone at a dose level of 400 mg/kg.

Each concentration represents mean value of 5 rats. ● and ○ represent Gunn rat and Wistar rat values, respectively.

Table 5 Plasma concentrations of troglitazone and its metabolites at 1 hr after administration in rats treated orally with troglitazone at a dose level of 400 mg/kg,

Analyte	Sex	Days	Plasma concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
			Gunn rat	Wistar rat
Troglitazone	Male	Day 1	5.3 \pm 0.6	4.7 \pm 1.1
		Day 14	8.0 \pm 2.4	3.4 \pm 2.7
		Day 94	6.5 \pm 2.1	4.5 \pm 0.9
	Female	Day 1	36.8 \pm 13.4	16.0 \pm 1.2
		Day 14	17.8 \pm 8.8	8.8 \pm 5.1
		Day 94	16.2 \pm 7.1	16.8 \pm 5.2
Sulfate	Male	Day 1	61.1 \pm 26.2	58.0 \pm 13.6
		Day 14	31.0 \pm 17.8	28.2 \pm 37.6
		Day 94	28.5 \pm 11.0	20.0 \pm 7.6
	Female	Day 1	27.8 \pm 6.1	19.2 \pm 2.9
		Day 14	7.7 \pm 5.4	4.7 \pm 6.7
		Day 94	4.5 \pm 2.9	10.0 \pm 7.4
Glucuronide	Male	Day 1	2.0 \pm 0.6	5.8 \pm 2.1
		Day 14	1.5 \pm 1.0	1.9 \pm 2.6
		Day 94	1.1 \pm 0.6	1.5 \pm 0.2
	Female	Day 1	3.1 \pm 1.3	4.9 \pm 0.9
		Day 14	2.2 \pm 1.9	1.4 \pm 1.2
		Day 94	3.0 \pm 1.7	2.5 \pm 1.8

Each value represents the mean \pm SD of 5 rats except for the value of male Gunn rat on Day 94. The value of male Gunn rat on Day 94 represents the mean \pm SD of 4 rats.

Table 6 AUC₀₋₂₄s of troglitazone and its metabolites in rats treated orally with troglitazone at a dose level of 400 mg/kg.

Analyte	Sex	Days	AUC ₀₋₂₄ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	
			Gunn rat	Wistar rat
Troglitazone	Male	Day 1	45.7 \pm 6.2	24.8 \pm 4.3
		Day 14	43.1 \pm 9.7	19.3 \pm 9.2
	Female	Day 1	510.9 \pm 148.0	100.6 \pm 16.1
		Day 14	215.8 \pm 63.3	77.3 \pm 7.8
Sulfate	Male	Day 1	196.7 \pm 55.0	283.2 \pm 20.5
		Day 14	172.1 \pm 48.7	148.3 \pm 45.1
	Female	Day 1	145.5 \pm 19.0	63.6 \pm 17.6
		Day 14	88.9 \pm 26.8	34.5 \pm 12.1
Glucuronide	Male	Day 1	3.6 \pm 1.2	14.9 \pm 3.5
		Day 14	3.0 \pm 2.8	1.9 \pm 2.6
	Female	Day 1	12.3 \pm 7.8	9.1 \pm 3.4
		Day 14	12.9 \pm 7.8	2.2 \pm 2.0

Each value represents mean \pm SD of 5 rats.

【考察】

臨床でごく少数の患者に troglitazone による肝障害が報告され、その発症原因として特異体質性の薬物代謝異常が推察された。また、予後不良の徴候としてはビリルビンの高値が示唆された。Fig. 2 に示す如く、troglitazone はヒトおよび実験動物で硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体およびキノン型代謝物等に代謝されることから、前節では、肝障害の実験動物での再現を目的として、UGT1s の活性を欠損し高ビリルビン血症を示す Gunn ラットにおける troglitazone の毒性試験を実施した。しかし、このような特異体質を持つ Gunn ラットでも肝障害は認められなかった。この原因を検討する目的で、本節では、毒性試験で得られた血漿における troglitazone ならびにその代謝物の濃度測定を行い、troglitazone の *in vivo* 代謝プロファイルを Gunn ラットとその親系統である Wistar ラットで比較した。

その結果、興味深いことに、いずれの系統にも troglitazone のグルクロン酸抱合体が検出された。400 mg/kg 投与群の血漿中グルクロン酸抱合体濃度を両系統で比較すると、Day 1 の雄では Gunn ラットで Wistar ラットより低値を示したが、Day 1 の雌ならびに Day 14 の雌雄では両系統でほぼ同等か、逆に Gunn ラットで Wistar ラットより高値を示した。この結果、troglitazone のグルクロン酸抱合反応には Gunn ラット、Wistar ラット間の系統差は認められず、本反応はラットにおいて UGT1s 以外の UGT 分子種により触媒されることが推察された。一方、troglitazone の血漿中濃度を両系統で比較すると、雄では Day 1 および Day 14 とも大差なかったが、雌では両日とも Gunn ラットで Wistar ラットよりも高値を示した。また、硫酸抱合体の血漿中濃度は雌雄とも両系統で大差はなかった。以上の結果から、Gunn ラットと Wistar ラットで troglitazone の代謝プロファイルには本質的に差がなかったと結論した。なお、100 mg/kg 投与群でも 400 mg/kg 投与群と同様 Gunn ラットと Wistar ラットの代謝プロファイルは同等であった（データ省略）。

本研究の後、troglitazone のグルクロン酸抱合反応に関する多くの研究結果が報告された。Watanabe らは、ヒト試料を用いた *in vitro* 試験からヒト肝では UGT1A1 が、ヒト小腸では UGT1A8 および UGT1A10 が本反応を触媒することを報告した⁴⁷⁾。しかし、興味深いことに Yoshigae らは、Gunn ラットおよび Wistar ラット肝臓を用いた *in vitro* 試験から、troglitazone のグルクロン酸抱合反応が Gunn ラットでも進行すること、およびラット肝臓では UGT2B2 が主に本反応を触媒することを報告した⁴⁸⁾。したがって、本試験で troglitazone の代謝プロファイルに系統差が認められなかった原因として、ラットでは troglitazone のグルクロン酸抱合が Gunn ラットで欠損する UGT1s ではなく、UGT2B2 により触媒されることが考えられる。

以上、Gunn ラットにおける troglitazone の3箇月間反復経口投与毒性試験で、ヒトで認められる特異体質性肝障害の再現ができなかったのは、正常動物である Wistar ラットと UGT1s の活性を欠損する Gunn ラットで troglitazone の代謝プロファイルが同等であったためと推察された。Gunn ラットのような薬物代謝酵素活性変動モデルは、毒性の高感度な検出や場合によっては特異体質性薬物障害の検出に有用と思われるが、今回の結果から、代謝に関与する酵素分子種の同定およびそれを考慮した上でのモデルの選択等、薬物代謝酵素活性変動モデルを用いた毒性評価の困難さも浮き彫りになった。

小 括

第1章では、UGT1sの活性を欠損し高ビリルビン血症を示す Gunn ラットを用いた毒性試験を親系統である Wistar ラットと同様に実施可能か、得られる結果から毒性の評価が可能か、およびヒトで認められる troglitazone の特異体質性肝障害が Gunn ラットで再現可能かを検討することを目的として、Gunn ラットを用いた troglitazone の3箇月間反復経口投与毒性試験を実施した。本試験の結果、以下の知見を得た。

- Gunn ラットでは、胆汁色素の肝細胞や腎乳頭部への沈着など、高ビリルビン血症に起因する変化が散見されたが、安定したバックグラウンドを示し、3箇月間までの毒性試験の実施が可能であった。
- さらに、対照群との比較により、Gunn ラット特異的な変化を適切に評価すれば、Gunn ラットにおいて薬物起因性の毒性の評価も可能と推察された。
- 本試験では、Gunn ラット雌において臨床における troglitazone 曝露の10倍以上の高い曝露が得られた。しかし、高ビリルビン血症の増悪も含め、血液生化学的にも、病理組織学的にも肝障害はまったく認められなかった。
- UGT1sの活性を欠損する Gunn ラットでも、troglitazone のグルクロン酸抱合体が雌雄とも血漿中に検出され、その濃度は Wistar ラットと大差なかった。すなわち、troglitazone の代謝プロファイルは、グルクロン酸抱合体生成も含め、Gunn ラットと Wistar ラットで差がなかった。
- UGT1sの活性を欠損する Gunn ラットで troglitazone の肝障害が認められなかった原因として、Gunn ラットと正常動物である Wistar ラットで代謝プロファイルに差がなかったことが考えられた。

以上、ヒトで認められた troglitazone による特異体質性肝障害を Gunn ラットで再現することはできなかったが、本試験を通じ、これまでに報告のなかった Gunn ラットを用いた長期毒性試験における毒性評価が可能であることを見出すことが出来た。Gunn ラットを用いた毒性試験は、acetaminophen や irinotecan のように UGT1s で解毒される薬物による毒性の高感度な検出や、Crigler-Najjar 症候群および Gilbert 症候群などの特異体質を有するヒトで起こりうる毒性の予測に有用であると推察される。

第2章 Low GST イヌのスクリーニングとその薬物代謝・薬物動態学的特徴の解析

第1章では、UGT1sの活性を欠損するGunnラットの有用性を検討した。しかし、Gunnラットのようにヒトで認められる薬物代謝酵素の欠損が実験動物でも認められるケースは稀である。UGTと同様に第II相の薬物代謝酵素として知られるGSTに関しては、mu, piおよびthetaクラスの分子種（それぞれ、GSTM1, GSTP1およびGSTT1）など、多くの分子種にヒトで遺伝的多型による欠損が報告されているにもかかわらず¹⁶⁻¹⁸⁾、先天的にGSTを欠損する動物の報告はない。GSTは、一部例外はあるものの、一般に薬物を含む各種化学物質から生体内で生成する活性代謝物をGSH抱合により不活性化し、DNAや高分子タンパク質の共有結合による化学的修飾を防御する酵素として認識されている⁴⁹⁻⁵¹⁾。DNAの化学的修飾は細胞の変異や発がんにつながることで知られており^{52, 53)}、また、高分子タンパク質の化学的修飾は組織の壊死等の直接的な障害につながることで⁵³⁻⁵⁵⁾、修飾された高分子タンパク質が抗原性を獲得することにより免疫学的機序による障害（アレルギー性の障害）につながることで^{5-7, 55)}などが知られている。したがって、GSTは生体にとって必須の酵素とすることができる。

このようなGSTの生体に対する防御的な働きから、GSTの欠損者では、GSH抱合で代謝される化学物質や代謝過程で反応性の高い活性代謝物を生成する化学物質を摂取した時の感受性が、非欠損者と異なることが報告されている。例えば、GSTM1の欠損者では、非欠損者に比べ喫煙による細胞遺伝学的障害のリスクが高い⁵⁶⁾。また、GSTP1の欠損者では、肺がんのリスクが非欠損者に比べ約2倍高く、多環芳香族炭化水素などの環境汚染物質に対する感受性が高いことが示唆されている⁵⁷⁾。これらの事実から、GSTを欠損するモデル動物を見出すことができれば、そのモデル動物は求電子性で反応性の高い活性代謝物を生じる化学物質による毒性の高感度な検出に有用と推察される。特に、序論で述べたとおり、求電子性で反応性の高い活性代謝物による高分子タンパク質の化学的修飾は、特異体質性の薬物障害を誘発する可能性が示唆されていること^{9, 55, 58)}、およびGSTM1とGSTT1の両方を欠損するヒトではtroglitazoneによる特異体質性肝障害の発症頻度が有意に高いことなどから¹³⁾、GSTを欠損するモデル動物では、正常動物での予測が困難な特異体質性薬物障害の予測が可能となることも考えられる。

そこで第2章では、これまでに報告のないGSTの欠損動物をスクリーニングすること、およびその特徴を解析し欠損が化学物質の体内動態にどのように影響するか検討することを目的とした。スクリーニングの対象は、毒性試験に繁用されているにもかかわらず、GSTに関する報告が極端に少ないイヌ（ビーグル）とした。

第1節 Low GST イヌの発見とその薬物代謝酵素活性の特徴

イヌは、非げっ歯類の一般毒性試験を行う際の第一選択候補とされる実験動物である。第1節では、GST 分子種を欠損するイヌが存在するかを検討する目的で、活性測定によるスクリーニングを行った。活性測定には、もっとも汎用される GST の基質である 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) および DCNB を使用した。

【実験方法】

実験動物

8 から 152 箇月齢のイヌ 280 例（雄 130 例，雌 150 例）を使用した。このうち，210 例は三共株式会社 安全性研究所で生産された。その他の 70 例のうち，34 例を HRP Inc.，20 例を株式会社ノード，12 例を株式会社 OBC，4 例を株式会社ナルクより購入した。

Cytosol (Cs) および microsome (Ms) の調製方法

35 mg/kg の pentobarbital sodium の静脈内投与によりイヌに麻酔を施した後，解剖した。肝臓および腎臓を摘出後，肝臓の外側左葉の一部および腎臓の皮質および髓質の一部を用い，Omura と Sato の方法⁵⁹⁾に従い，肝 Cs および Ms，ならびに腎 Cs を調製した。

CDNB に対する GST 活性 (GST-C 活性) の測定方法

Habig らの方法⁶⁰⁾に従い，CDNB の GSH 抱合体生成に伴う 340 nm の吸光度上昇を測定することによって定量した。本測定には 280 例の肝 Cs を使用した。

GST-D 活性の測定方法

Habig らの方法⁶⁰⁾に従い，DCNB の GSH 抱合体生成に伴う 345 nm の吸光度上昇を測定することによって定量した。本測定には 280 例の肝 Cs および 168 例の腎 Cs を使用した。

CYP 含量の測定方法

Omura と Sato の方法⁵⁹⁾に従い，還元型一酸化炭素結合差スペクトルから定量した。本測定には 254 例の肝 Ms を使用した。

7-Ethoxycoumarin O-deethylase (ECD) 活性の測定方法

Matsubara らの方法に従い⁶¹⁾，7-hydroxycoumarin 生成に伴う励起波長 370 nm，蛍光波長 456 nm の蛍光強度を測定することによって定量した。本測定には 254 例の肝 Ms を使用した。

p-Nitrophenol に対する UGT 活性の測定方法

Bock らの方法⁶²⁾に従い，p-nitrophenol の消失に伴う 405 nm の吸光度低下を測定すること

によって定量した。本測定には 249 例の肝 Ms を使用した。

タンパク質濃度の測定方法

Cs および Ms のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準物質とし、Lowry 法⁶³⁾ で測定した。

【実験結果】

イヌ肝 Cs における GST-C 活性

280 例のイヌ肝 Cs における GST-C 活性の分布を Fig. 5 に示す。本活性には雌雄とも大きな個体差 (451 – 2251 nmol/min/mg protein) が認められた。しかし、Fig. 5 のヒストグラムは一峰性で、本活性から GST を欠損する個体を見出すのは困難であった。

イヌ肝 Cs における GST-D 活性

280 例のイヌ肝 Cs における GST-D 活性の分布を Fig. 6 に示す。GST-C 活性同様、本活性にも雌雄で非常に大きな個体差 (0.0 – 189.9 nmol/min/mg protein) が認められた。しかし、GST-C 活性と異なり、本活性をほとんど示さない個体が存在することが明らかとなった。また、Fig. 6 のヒストグラムは三峰性を示し、イヌは本活性を指標に低 (0 – 10 nmol/min/mg protein)、中 (10 – 80 nmol/min/mg protein) および高 (80 nmol/min/mg protein 以上) 活性群の 3 群に分類可能であった。そこで、各々の群に属するイヌを low GST イヌ、middle GST イヌおよび high GST イヌと定義した。Table 7 に各群の平均活性、総個体数および動物生産施設ごとの個体数を示す。Low GST イヌは 280 例中 34 例 (12.1%)、middle および high GST イヌは 280 例中それぞれ 116 例 (41.4%) および 130 例 (46.4%) 存在した。また、low GST イヌは 5 つの動物生産施設のいずれにも存在し、特定の動物生産施設に限定されることはなかった。一方、GST-D 活性と GST-C 活性との間には、相関係数 0.811 の良好な正の相関が認められた (Fig. 7)。

イヌ腎 Cs における GST-D 活性

168 例のイヌ腎 Cs における GST-D 活性の分布を Fig. 8 に示す。肝臓における活性と同様、腎臓における活性にも雌雄とも非常に大きな個体差 (0.0 – 84.7 nmol/min/mg protein) が認められた。また、腎臓の GST-D 活性と肝臓の同活性との間には、相関係数 0.910 の良好な正の相関が認められ (Fig. 9)、肝臓の GST-D 活性から low GST イヌと判断された 19 例すべてのイヌは、腎臓でも 10 nmol/min/mg protein 以下の非常に低い活性を示すことが明らかとなった。

イヌ肝 Ms における CYP 含量、ECD 活性および UGT 活性

肝臓における GST-D 活性とその他の薬物代謝酵素の含量や活性との関連を検討する目的で、肝 Ms における CYP 含量、ECD 活性および UGT 活性を活性群ごとにまとめた。結果を Table 8 に示す。CYP 含量ならびに各種 CYP 分子種により触媒される ECD 活性には、各活性群間

で有意な差は認められなかった (Mann-Whitney U-test). また, *p*-nitrophenol に対する UGT 活性も同様であった. さらに, Fig. 10 に示す如く, これら 3 つのパラメータと肝 Cs における GST-D 活性との間にはまったく相関は認められなかった.

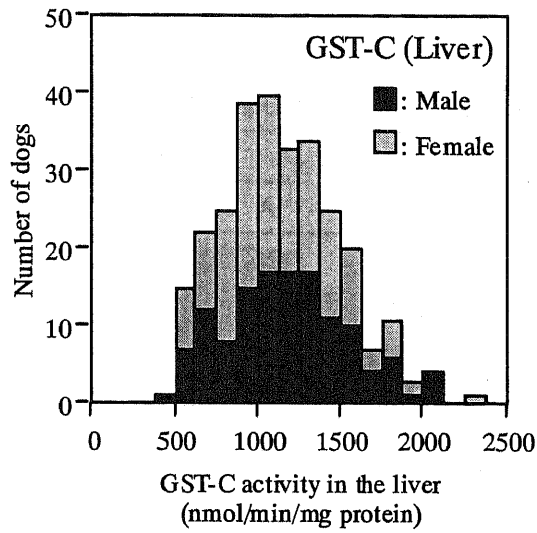


Fig. 5 GST-C activities in dog liver cytosols.
 Number of animals: 130 males and 150 females, 280 in total.

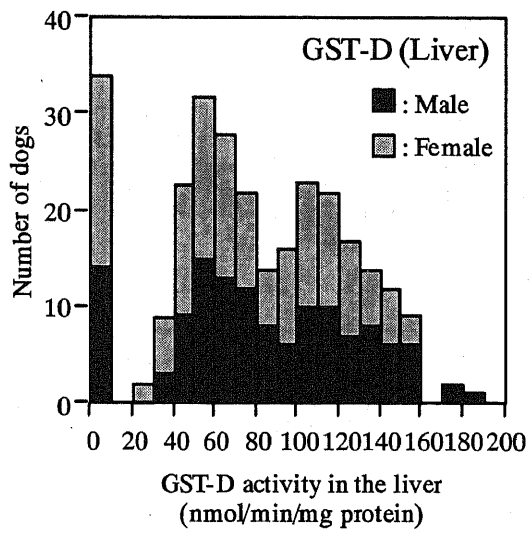


Fig. 6 GST-D activities in dog liver cytosols.
 Number of animals: 130 males and 150 females, 280 in total.

Table 7 Classification of dogs according to GST-D activity in the liver.

Group	Range of activity (nmol/min/mg protein)	Mean activity	Number of animals					Total	Percentage (%)
			A	B	C	D	E		
Low	< 10	3.18	28	1	3	1	1	34	12.1
Middle	10 - 80	57.32	87	16	10	2	1	116	41.4
High	80 <	117.83	95	17	7	9	2	130	46.4

Breeders: A, Sankyo Co., Ltd.; B, HRP, Inc.; C, Nord Co., Ltd.; D; OBC Co., Ltd.; E, Nark Co., Ltd.

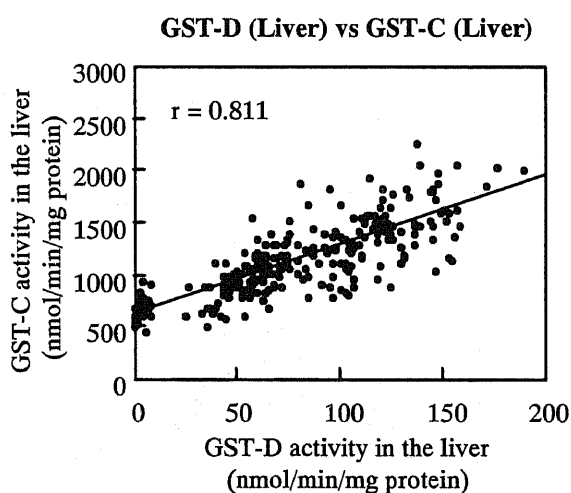


Fig. 7 Relationship between liver GST-D and GST-C activities.
The number of dogs analyzed was 280.

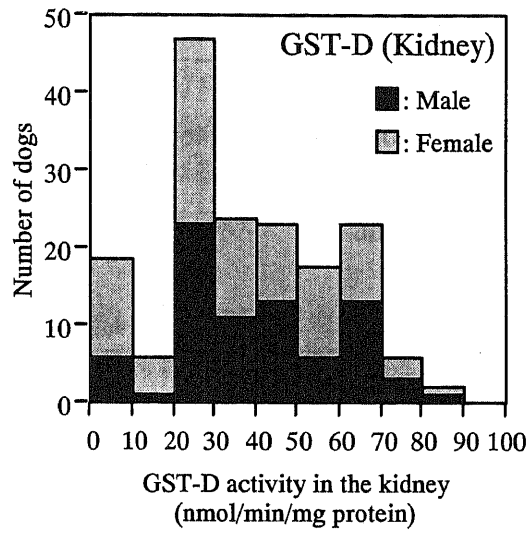


Fig. 8 GST-D activities in dog kidney cytosols.
 Number of animals: 77 males and 91 females, 168 in total.

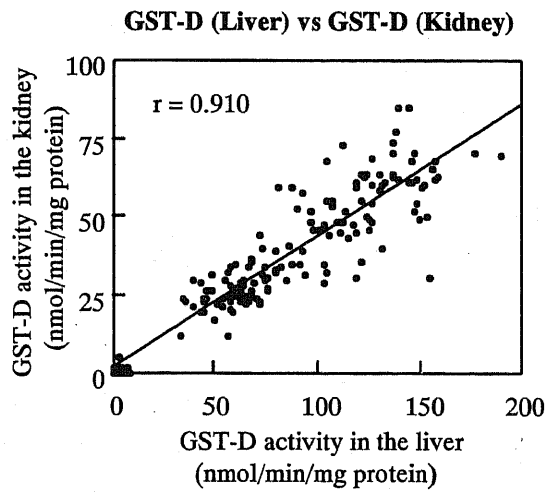


Fig. 9 Relationship between liver and kidney GST-D activities.
 The number of dogs analyzed was 280.

Table 8 Comparison of CYP content, ECD activity and UGT activity among each group.

Group		CYP content	ECD activity	UGT activity to <i>p</i> -nitrophenol
		(nmol/mg protein)	(nmol/min/mg protein)	
Low	N	32	32	31
	Mean ± SD	0.30 ± 0.098	1.46 ± 0.840	11.1 ± 2.79
Middle	N	106	106	104
	Mean ± SD	0.27 ± 0.086	1.59 ± 0.952	11.0 ± 4.24
High	N	116	116	112
	Mean ± SD	0.28 ± 0.102	1.50 ± 0.913	11.3 ± 3.39

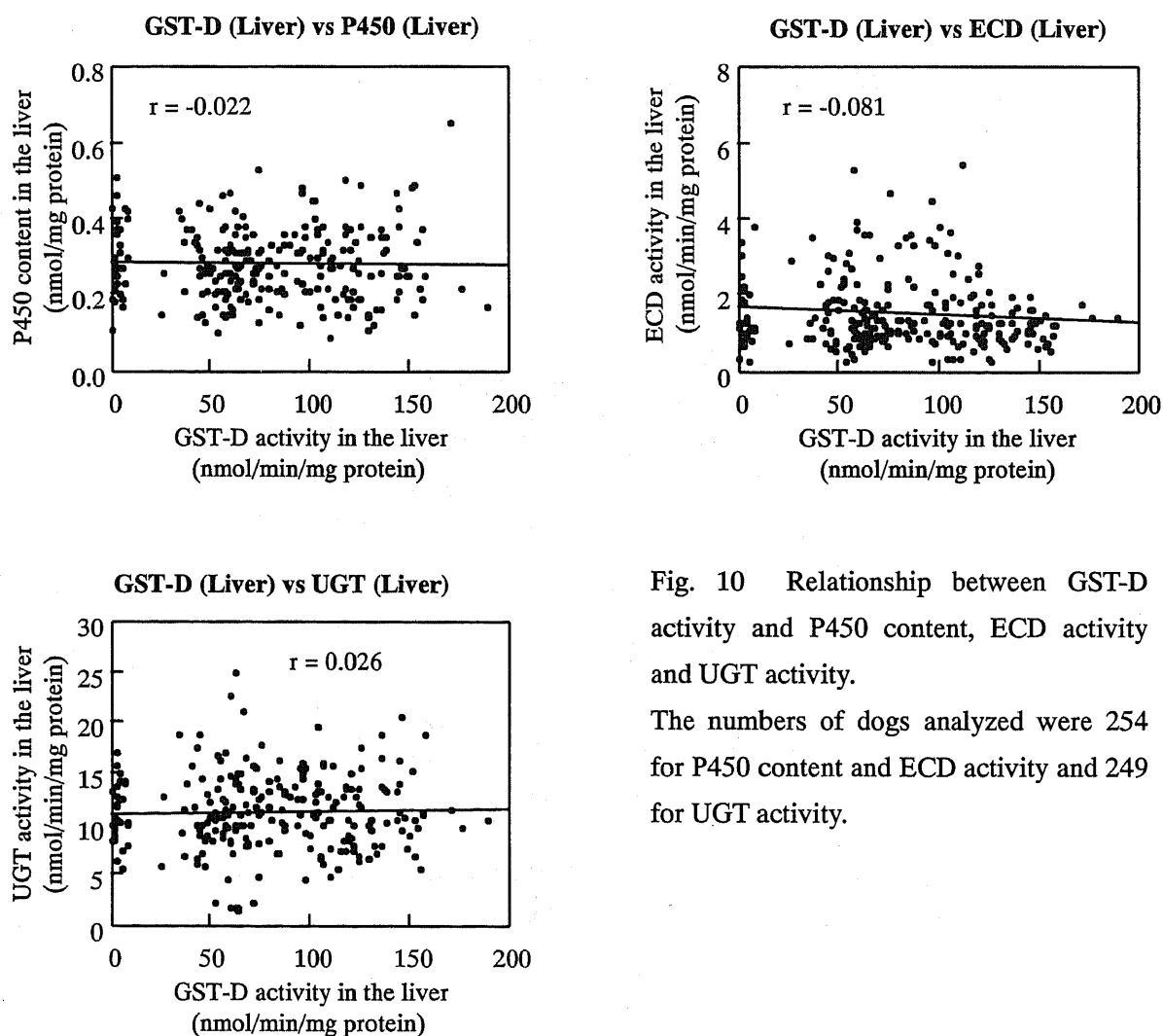


Fig. 10 Relationship between GST-D activity and P450 content, ECD activity and UGT activity.

The numbers of dogs analyzed were 254 for P450 content and ECD activity and 249 for UGT activity.

【考察】

イヌ肝 Cs における GST-C 活性には顕著な個体差が認められた。しかし、ヒストグラムは一峰性であり、GST-C 活性から GST を欠損するイヌを見出すことはできなかった。イヌの GST 分子種としては、これまでに $Yd_{1-1}Yd_{1-1}$, $Yd_{1-2}Yd_{1-2}$, $Yd_{2-1}Yd_{2-1}$, $Yd_{2-1}Yd_{2-2}$, Yd_3Yd_3 および Yd_fYd_f の 6 つの分子種が知られているが^{64, 65)}, CDNB の GSH 抱合反応はこれらすべての分子種で触媒されることが報告されている⁶⁵⁾。したがって、たとえ GST 分子種のいずれかが欠損していても、他の分子種が触媒する活性でそれが判別しにくくなっている可能性が考えられた。

一方、CDNB と類似した化学構造をもつ DCNB の GSH 抱合反応は、CDNB と対照的に theta クラスの GST 分子種、 Yd_fYd_f により特異的に触媒されることが報告されている⁶⁵⁾。GST Yd_fYd_f は CDNB の GSH 抱合反応を 6 つのイヌ GST 分子種の中でもっとも効率的に触媒することから⁶⁵⁾, GST-C 活性の個体差は GST Yd_fYd_f の個体差に起因している可能性が考えられる。そこで次に、GST Yd_fYd_f により特異的に触媒される GST-D 活性を検討した。その結果、本活性には非常に顕著な個体差が認められ、本活性を指標にイヌを低、中および高活性群の 3 群に分類可能であった。興味深いことに、低活性群の個体、すなわち low GST イヌは、10 nmol/min/mg protein 以下の非常に低い活性しか示さないことが明らかとなった。欠損例も含む本活性の個体差は、本活性を特異的に触媒する GST Yd_fYd_f の発現量の個体差あるいは変異型の酵素の出現等による触媒活性そのものの個体差によると推察された。顕著な個体差の認められた 2 つの GST 活性、すなわち GST-D 活性と GST-C 活性の相関を検討したところ、両活性の間には相関係数 0.8 を超える良好な相関が認められた。上述の如く、GST Yd_fYd_f は既知の 6 分子種の中でもっとも効率よく CDNB の GSH 抱合反応を触媒することから、GST-C 活性で認められた個体差も GST Yd_fYd_f の個体差に起因する可能性が高い。

また、腎 Cs における GST-D 活性にも非常に顕著な個体差が認められた。各個体とも腎臓における活性は肝臓における活性の約 50% の値を示し、両組織の GST-D 活性には相関係数 0.9 を超える非常に良好な相関が認められた。また、low GST イヌは、腎臓においても 10 nmol/min/mg protein 以下のごく低い活性しか示さなかったことから、肝臓および腎臓の両方で DCNB の GSH 抱合がほとんど行われないことが明らかとなった。

肝臓における GST-D 活性と GST-C 活性あるいは腎臓における GST-D 活性との間に良好な相関が認められたことから、その他の薬物代謝酵素との相関についても検討した。その結果、GST-D 活性と CYP 含量、ECD 活性および *p*-nitrophenol に対する UGT 活性の間にはまったく相関は認められず、また、これらのパラメータの平均値は各活性群で同等であった。したがって、low GST イヌは GST 活性が低いことのみを特徴とし、CYP や UGT の活性には差が認められないことが明らかとなった。

第2節 Low GST イヌにおける DCNB の GSH 抱合反応の酵素反応速度論的解析

前節では、イヌにおける GST-D 活性に顕著な個体差が認められること、および本活性をほとんど示さない low GST イヌが存在することを示した。この個体差の原因としては、本反応を特異的に触媒することが知られる GSTY_dY_d の発現量の個体差あるいは変異型の GSTY_dY_d の発現等による質的な個体差が考えられる。これを明らかにするためには、DCNB の GSH 抱合反応の酵素反応速度論的解析が有用である。そこで本節では、低、中および高活性群のイヌ肝 Cs を使用し、DCNB の GSH 抱合反応のミカエリス定数 (K_m) および最大速度 (V_{max}) を活性群ごとに算出した。その値を比較することにより GST-D 活性の個体差の原因を検討した。

【実験方法】

使用したイヌ肝 Cs

低、中および高活性群の肝 Cs をそれぞれ 3 例 (雄 1 例, 雌 2 例), 6 例 (雌雄各 3 例) および 6 例 (雌雄各 3 例) 使用した。

GST-D 活性の測定方法

前節と同様に Habig らの方法⁶⁰⁾に従った。ただし、本節では酵素反応速度論的解析を行ったため、低活性群では DCNB の基質濃度を 0.25, 0.5, 0.8 および 1 mM, 中および高活性群では基質濃度を 0.02, 0.05, 0.08, 0.1, 0.125, 0.2, 0.25, 0.5, 0.8 および 1 mM としたときの活性をそれぞれ測定した。

K_m および V_{max} の算出

各基質濃度における活性値から Lineweaver-Burk plot を作成し、DCNB の GSH 抱合反応の K_m および V_{max} を算出した。

【実験結果】

各群の Lineweaver-Burk plot を Fig. 11 に、各群の GST-D 活性、 K_m ならびに V_{max} を Table 9 に示す。今回使用した Cs の GST-D 活性は、低、中および高活性群の順に 4.70, 60.42 および 136.30 nmol/min/mg protein であった。DCNB の GSH 抱合反応の K_m は、低、中および高活性群の順に 275.7, 260.0 および 283.7 mM で、各群でほぼ同等であった。一方、 V_{max} は、低、中および高活性群の順に 3.83, 80.64 および 169.18 nmol/min/mg protein で、各群の活性によく相関した顕著な差が認められた。

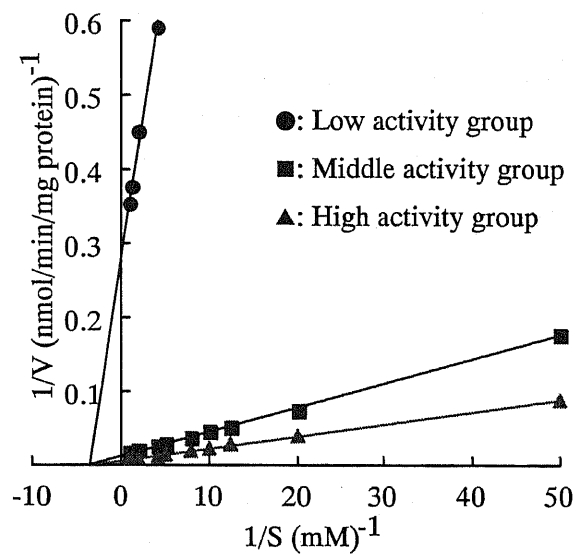


Fig. 11 Lineweaver-Burk plots for GST-D activities in dog liver cytosols.

Table 9 Kinetic parameters for GSH-conjugation of DCNB in each activity group.

Group	GST-D activity	Km	Vmax
	(nmol/min/mg protein)	(μ M)	(nmol/min/mg protein)
Low	4.70 ± 0.608	275.7 ± 18.33	3.83 ± 0.650
Middle	60.42 ± 4.376	260.0 ± 6.79	80.64 ± 3.660
High	136.30 ± 15.697	283.7 ± 4.65	169.18 ± 4.334

【考察】

本節では、GSTY_dY_dにより特異的に触媒される DCNB の GSH 抱合反応を、酵素反応速度論的に解析した。すなわち、低、中および高活性群のイヌ肝 Cs を使用し、DCNB の GSH 抱合反応の K_m および V_{max} を活性群ごとに算出し、その値を比較した。その結果、本反応の K_m は低、中および高活性群でほぼ同等であったことから、各群とも本反応が同一の酵素、すなわち質的な個体差のない GSTY_dY_dにより触媒される可能性が示唆された。一方、 V_{max} には各群で活性を反映した顕著な個体差が認められた。したがって、本反応の個体差は GSTY_dY_dの発現量の個体差によること、および low GST イヌでは GSTY_dY_dの発現量が著しく少ないこと強く示唆された。

第3節 二次元電気泳動を用いたタンパク質発現解析による low GST イヌにおける GST 欠損分子種の同定

前節で実施した DCNB の GSH 抱合反応の酵素反応速度論的解析で、GST-D 活性の個体差は、イヌで本反応を特異的に触媒することが知られる GSTY_dY_d の発現量の個体差によることが強く示唆された。そこで本節では、二次元電気泳動によりイヌ肝 Cs に発現するタンパク質を分離し、各々のタンパク質の発現量を各活性群で比較した。これにより、低活性群で中および高活性群に比べ有意に発現量の少ないタンパク質をスクリーニングし、それらを質量分析により同定した。

【実験方法】

使用した肝 Cs

低、中および高活性群とも雌雄各 4 例、計 8 例ずつの肝 Cs を使用した。また、これとは別にすべての Cs を同じタンパク質量ずつ混合した内部標準 (I.S.) 用の Cs を調製し、使用した。

イヌ肝 Cs におけるタンパク質発現解析 — サンプル調製 —

各 Cs を、Lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 5 mM magnesium acetate, 0.5 mM Pefablock SC (日本ロシユ株式会社), 2.5% Protector reagent (日本ロシユ株式会社), 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.5) で 20 倍に希釈後、100 μg protein ずつ分取した。このサンプルを 400 pmol の CyDye (Cy2, Cy3 あるいは Cy5: アマシャムバイオサイエンス株式会社) で標識後、この標識サンプルに等容量の 2×Sample buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 20 mg/mL dithiothreitol, 4% Pharmalyte (pH 3-10)) を添加し、タンパク質発現解析用のサンプルとした。

イヌ肝 Cs のタンパク質発現解析 — 一次元目: 固定化 pH 勾配等電点電気泳動 —

同時に泳動するサンプルを以下の組合せで混合した後、膨潤液 (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 2 mg/mL dithiothreitol, 4% Pharmalyte (pH 3-10)) を添加し、総量を 450 μL とした。これを Immobiline Dry Strip (pH 3-10, 24 cm: アマシャムバイオサイエンス株式会社) に添加し、Strip を膨潤化した。膨潤化後の Strip は Ettan IPGphor (アマシャムバイオサイエンス株式会社) にセットし、遮光下、マニュアルに従って固定化 pH 勾配等電点電気泳動を実施した。

Gel No.	Cy2-Cs (I.S.)	Cy3-Cs (Male)	Cy5-Cs (Male)	Gel No.	Cy2-Cs (I.S.)	Cy3-Cs (Female)	Cy5-Cs (Female)
1	I.S.	High-1	Middle-1	7	I.S.	High-11	Middle-11
2	I.S.	High-2	Middle-2	8	I.S.	High-12	Middle-12
3	I.S.	High-3	Low-1	9	I.S.	High-13	Low-11
4	I.S.	High-4	Low-2	10	I.S.	High-14	Low-12
5	I.S.	Middle-3	Low-3	11	I.S.	Middle-13	Low-13
6	I.S.	Middle-4	Low-4	12	I.S.	Middle-14	Low-14

イヌ肝 Cs のタンパク質発現解析 –二次元目：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動–

等電点電気泳動の終了した Strip は、平衡化 buffer (6M urea, 30% glycerol, 1% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 6.8) 中で dithiothreitol による還元および iodoacetamide によるアルキル化処理を行った。この Strip を、あらかじめ作成した 1 mm 厚の 12.5%ポリアクリルアミドゲルにセットし、電気泳動装置 (Ettan-DALT II System : アマシャムバイオサイエンス株式会社) で展開した。

イヌ肝 Cs のタンパク質発現解析 –タンパク質発現量の差異解析–

蛍光スキャナー (2D 2920 Master Imager : アマシャムバイオサイエンス株式会社) を使用し、各 Cy に特異的な検出波長で 1 枚のゲルから Cy2, Cy3 および Cy5 で標識したそれぞれのサンプルの泳動像を取得した。この泳動像から、解析ソフト (DeCyder ver. 3.0 : アマシャムバイオサイエンス株式会社) を用いスポットを検出した後、I.S.を介してゲル間のスポットマッチングならびに発現量の標準化を行った。各活性群間で発現量の異なるスポットを Student's *t*-test ($p < 0.01$) でスクリーニング後、発現量と GST-D 活性との相関を検討した。

低活性群と高活性群で有意に発現量の異なるタンパク質の同定

タンパク質発現解析の結果、低活性群と高活性群で発現量に有意な相違が認められたタンパク質を同定する目的で、低活性群の Cs (雌 1 例) と高活性群の Cs (雄 1 例) に含まれるタンパク質を二次元電気泳動で分離した。この二次元電気泳動ではサンプルの Cy による標識は行わず、各々 500 μ g のタンパク質を 1 枚ずつのゲルで泳動した後、SyproRuby (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社) で染色し、泳動像を取得した。これら 2 枚の泳動像上で目的とするスポットを確認した後、スポット切り出し装置 (Ettan Spot Picker : アマシャムバイオサイエンス株式会社) を使用し、スポットの切り出しを行った。この際、低活性群で多く発現するスポットは低活性群のゲルから、高活性群に多く発現するスポットは高活性群のゲルから切り出した。切り出したゲル片は 50% acetonitrile 含有 20 mM ammonium bicarbonate で洗浄、acetonitrile で脱水した後、遠心エバポレータでゲルを乾燥させた。このゲル片に 20 mM ammonium bicarbonate に溶解した 10 ng/ μ L の trypsin (sequencing grade modified trypsin : プロメガ株式会社) 溶液を添加し、37°C で一晩、タンパク質を消化させた。反応後の上清を 1% formic acid で酸性化した後、HPLC (CapLC system : Waters Co.) を接続したタンデム質量分析装置 (MS/MS, Q-TOF2 : Micromass UK Limited) で分析した。分析条件は以下に示す。

カラム : 3 μ m Develosil C18 (野村化学株式会社) 充填自作逆相チップカラム
(250 mm \times 4.0 mm I.D.)

イオン化法 : ナノエレクトロスプレーイオン化法

移動相 : 0.05% formic acid (グラジエント : 0 – 60% acetonitrile)

流速 : 200 nL/min

タンパク質の同定には LC/MS/MS タンパク質同定プログラム (MASCOT : Matrix Science) を使用した。また、データベースとしては NCBIInr ならびに SwissProt を使用した。

【実験結果】

各活性群で発現量が異なるタンパク質のスクリーニング

イヌ肝 Cs の二次元電気泳動像の 1 例（高活性群 雄）を Fig. 12 に示す。タンパク質に由来しないスポット（ダスト）を除くと、いずれの泳動像からもタンパク質のスポットが約 2000 ずつ検出された。このうち、各活性群間で発現量が有意に異なるスポットを Table 10 に示す。低活性群と中活性群の比較では 2 スポット、中活性群と高活性群の比較では 3 スポット、低活性群と高活性群の比較では 14 スポットの発現量が有意に異なることが明らかとなった。このうち、Spot No. 1960 および 1971 は、低活性群で中活性群および高活性群よりも発現量が有意に少なく、さらに前者は中活性群と高活性群の比較でも中活性群で有意に発現量が少なかった。統計検定により見出された延べ 16 スポットの発現量と GST-D 活性の相関を検討した結果を Fig. 13 に示す。16 スポットのうち、上述の Spot No. 1960 および 1971 の発現量と GST-D 活性の間には相関係数 0.8 を超える良好な正の相関が認められた。一方、その他の 14 スポットの発現量と GST-D 活性の間の相関係数は、いずれも絶対値が 0.7 以下と低かった。GST-D 活性と発現量が良好な相関を示した Spot No. 1960 および 1971 のスポットを低活性群および高活性群の泳動像中で確認した。その結果、Fig. 14 に示す如く、高活性群には発現が認められるものの、低活性群にはほとんど発現が認められないことが明らかとなった。また、両スポットの分子量はほぼ同等であったが、等電点には相違が認められた。

低活性群と高活性群で有意に発現量の異なるタンパク質の同定

イヌ肝 Cs のタンパク質発現解析により、GST-D 活性と発現量がよく相関するスポットが 2 つ見出されたことから、この 2 スポットを含む低活性群と高活性群で発現量に有意な相違が認められた計 14 スポットの同定を試みた。同定を目的として改めて行った泳動では、14 スポットのうち 4 スポットが他のスポットとの分離が不十分で切り出せなかったものの、Spot No. 1960 および 1971 を含む計 10 スポットを切り出すことができた (Fig. 15)。これらの同定結果を Table 11 に示す。Spot No. 1960 および 1971 からは、GSTY_dY_d に特異的なトリプシン消化ペプチド「AIYIFALK」が検出され、これらはいずれも GSTY_dY_d であることが明らかとなった。また、Spot No. 1971 からはその他に 2 つのタンパク質が同定され、それらは GTP-binding protein Ran/TC4 および triosephosphate isomerase であることが明らかとなった。しかし、Fig. 14 から明らかのように、低活性群では Spot No. 1971 の位置にスポットはほとんど検出されていないことから、これらの発現量は非常に少ないと思われる。一方、その他の 8 スポットはいずれも低活性群で多く発現するタンパク質であったが、serum albumin precursor 等いずれも GST とは異なるタンパク質として同定された。

Fig. 12 Typical CyDye-stained two dimensional electrophoresis image of liver cytosolic proteins from dogs.

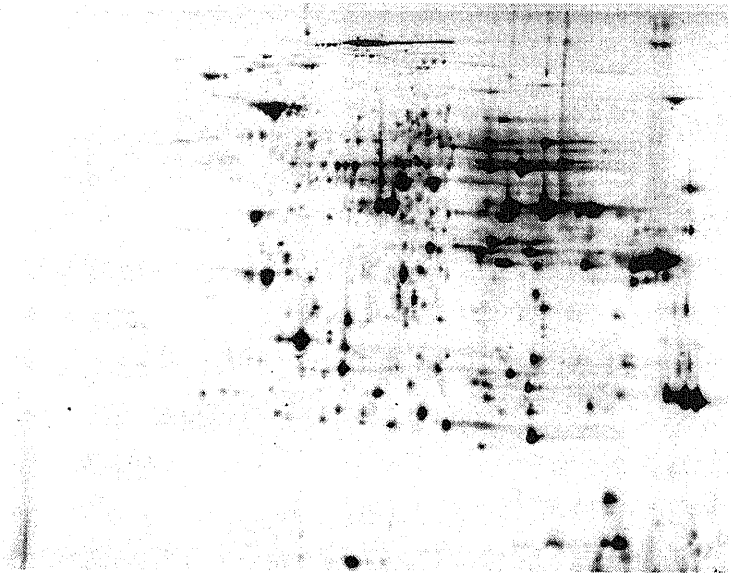


Table 10 The protein spots whose expression levels were significantly different among each group.

Comparison	Spot No.	Appearance ^{*1}	p value ^{*2}	Ratio ^{*3}
Low vs. Middle	1960	24	< 0.0001	0.35
	1971	23	0.0086	0.65
Middle vs. High	1960	24	0.0006	0.63
	2113	24	0.0082	1.23
	509	22	0.0092	0.66
Low vs. High	1960	24	< 0.0001	0.22
	1971	23	< 0.0001	0.50
	934	22	0.0012	1.22
	1997	24	0.0014	2.71
	587	22	0.0027	1.28
	1821	23	0.0030	2.41
	1999	24	0.0039	1.64
	1813	24	0.0054	2.57
	1719	24	0.0071	1.50
	1302	24	0.0072	1.53
	1112	24	0.0075	1.39
	508	20	0.0077	1.22
	1771	21	0.0086	1.55
1811	24	0.0097	2.28	

*1: The number of images that contain its protein spot.

*2: The results of Student's *t*-test.

*3: Low/Middle, Middle/High or Low/High ratio of protein expression level.

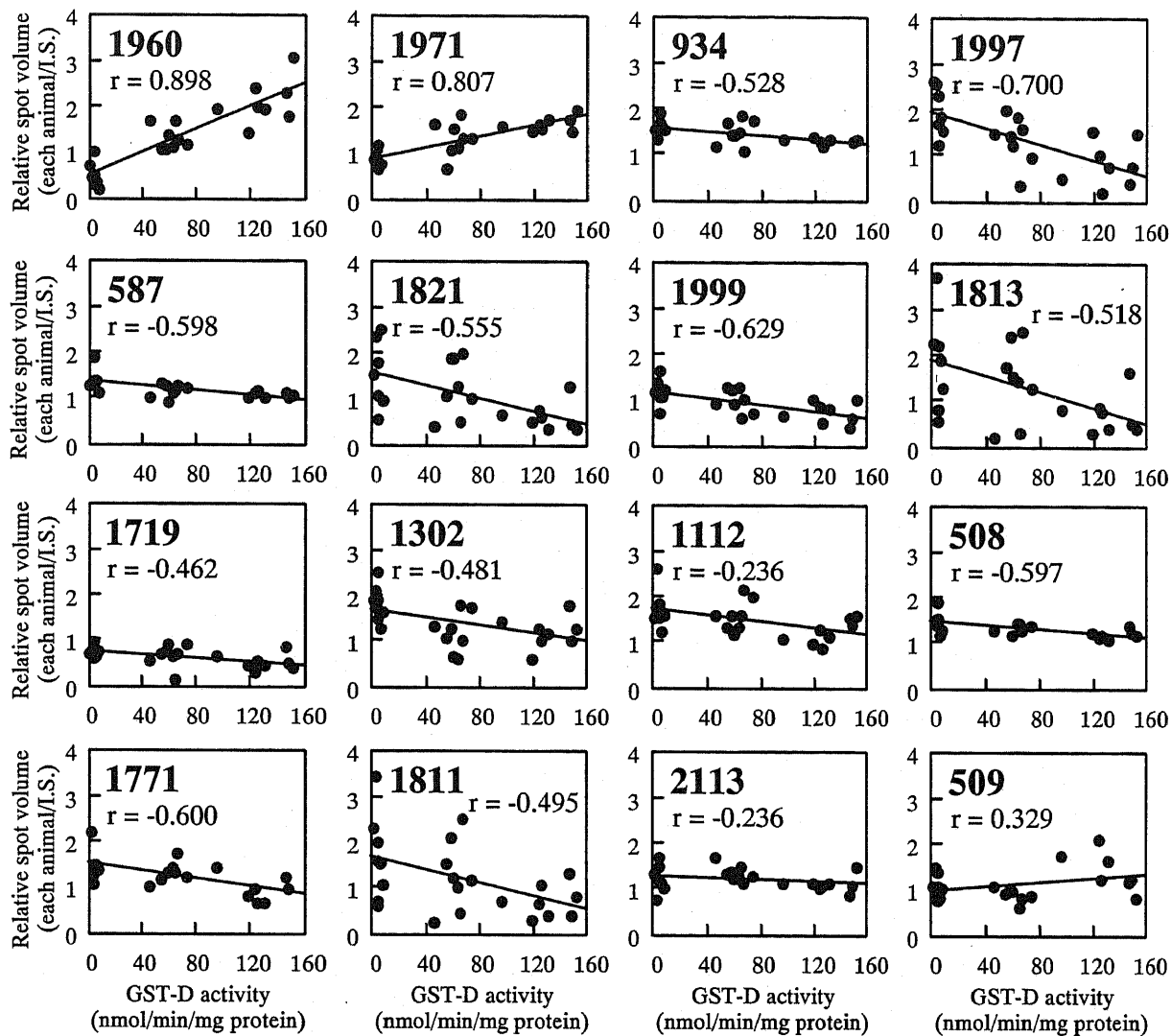


Fig. 13 The relationships between GST-D activity and the expression levels for 16 protein spots.

A: High GST dog

B: Low GST dog

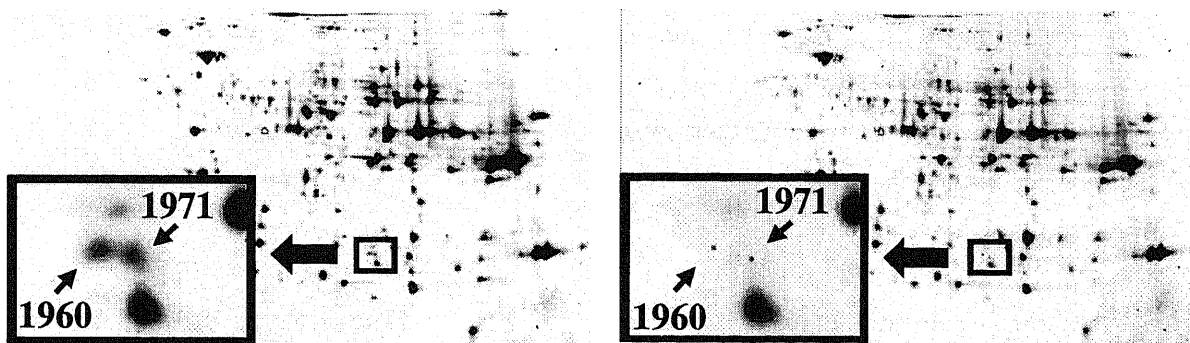


Fig. 14 Typical separation images of liver cytosolic proteins from dogs.

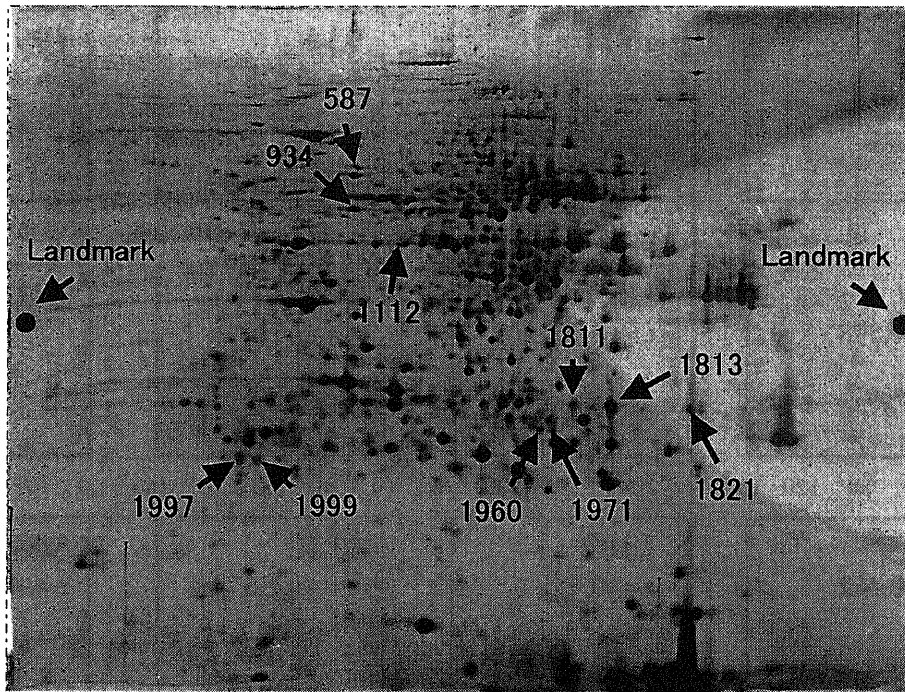


Fig. 15 The protein spots that are picked for identification.
Landmark means the positional standard for picking.

Table 11 Identification of differentially expressed proteins between low and high activity groups.

Spot No.	Protein name	Animal species	Matched peptide ion
1960	Glutathione S-transferase class Theta isozymes YdfYdf	Dog	1
1971	Glutathione S-transferase class Theta isozymes YdfYdf	Dog	1
	GTP-binding protein Ran/TC4	Dog	4
	Triosephosphate isomerase	Rabbit	2
934	Serum albumin precursor	Dog	21
	Actin-like protein 3	Dog	4
1997	Proteasome subunit beta type 6 precursor	Human	3
	Peroxiredxin 2	Pig	3
587	Protein disulfide isomerase A3 precursor	Human	7
1821	Hemoglobin beta chain	Dog	10
	Hemoglobin alpha chain	Dog	5
1999	Peroxiredxin 2	Pig	3
1813	Carbonic anhydrase III	Human, Horse, Rat	10
1112	Similar to 45 kDa secretory protein	Human	6
1811	Carbonic anhydrase III	Human, Horse, Rat	7

【考察】

前節までに、イヌで認められる GST-D 活性の個体差は GSTY_{d_f}Y_{d_f} の発現量の個体差によること、および low GST イヌでは GSTY_{d_f}Y_{d_f} の発現量が著しく少ないことが強く示唆された。そこで、本節ではこれを確かめる目的で、二次元電気泳動によりイヌ肝 Cs のタンパク質を分離し、各々の発現量を低、中および高活性群で比較した。その結果、群間で発現量が有意に異なるスポットが延べ 16 スポット見出された。このうち 2 スポット (Spot No. 1960 および 1971) の発現量と GST-D 活性との間には相関係数 0.8 を超える良好な正の相関が認められ、また、これら 2 スポットは低活性群にはほとんど発現が認められないことが明らかとなった。一方、それ以外の 14 スポットの発現量と GST-D 活性の間の相関係数は、いずれも絶対値が 0.7 以下と低かった。

これら 16 スポットのうち、低活性群と高活性群で有意に発現量の異なる 14 スポットの同定を試みた結果、10 スポットの同定が可能であった。発現量と GST-D 活性の相関からもっとも注目される Spot No. 1960 と 1971 からは、GSTY_{d_f}Y_{d_f} のトリプシン消化ペプチドである「AIYIFALK」が見出されたことから、これらはいずれも GSTY_{d_f}Y_{d_f} であることが明らかとなった。本解析では GSTY_{d_f}Y_{d_f} のトリプシン消化ペプチドのうち、1 つのペプチド断片しか適合しなかったが、これは、GSTY_{d_f}Y_{d_f} のアミノ酸配列が N 末端の 27 アミノ酸配列しか明らかになっていないためと推察される。また、1 つのタンパク質が 2 つに見出された原因は本試験からは明らかではないが、分子量がほぼ同じで等電点のみが異なっていたことから、両者の違いは酵素分子の化学的修飾によるものと推察される。一部の GST 分子種は、hydrogen peroxide による酸化的処理や dithiothreitol などによる還元的処理で酸化や還元を受けることが報告されていることから⁶⁶⁾、Spot No. 1960 と 1971 の違いは酸化型・還元型の違いによる可能性などが考えられる。一方、その他のスポットはすべて低活性群に多く発現していたことから、この中にストップコドンの形成等に伴う活性を持たない不完全な GSTY_{d_f}Y_{d_f} が存在する可能性も想定された。しかし、低活性群に多く発現するタンパク質はいずれも GST とは無関係なタンパク質として同定されたことから、活性を持たない不完全な GSTY_{d_f}Y_{d_f} が低活性群で発現している可能性はきわめて低いと思われる。

以上、二次元電気泳動を用いたタンパク質発現解析から、イヌで認められる GST-D 活性の個体差は GSTY_{d_f}Y_{d_f} の発現量の個体差によること、および low GST イヌでは GSTY_{d_f}Y_{d_f} の発現量が著しく少ないことが明らかとなった。

第4節 Low GST イヌにおける DCNB の体内動態

前節までに、low GST イヌでは肝臓における theta クラスの GST 分子種 Yd_fYd_f の発現量が著しく少ないことが明らかとなった。Low GST イヌは肝臓のみならず腎臓でもきわめて低い GST-D 活性を示したことから、 $GSTYd_fYd_f$ で代謝される化学物質をイヌに投与すると、low GST イヌは middle あるいは high GST イヌとは異なる体内動態を示す可能性がある。そこで本節では、low GST イヌにおける低 GST 活性が化学物質の *in vivo* 体内動態にどのように影響するかを確認する目的で、イヌに DCNB を投与し、その血漿中濃度推移を比較した。

【実験方法】

実験動物、群構成、投与用量、投与方法、採血および解剖

三共株式会社 安全性研究所で生産されたイヌ 9 例を、5 例（雄 1 例、雌 4 例）および 4 例（雌雄各 2 例）の計 2 群に分類した。DCNB（和光純薬工業株式会社）を 5% の濃度でポリエチレングリコールに溶解し、前者には 5 mg/kg、後者には 100 mg/kg の投与用量で単回強制経口投与した。5 mg/kg 投与群は投与後 0.5, 1, 2, 4, 6 および 24 hr、100 mg/kg 投与群は投与後 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 30 および 48 hr に採血し、血漿中の DCNB 濃度を測定した。投与後 72 hr に両群の動物を解剖し、肝臓を摘出した。この肝臓から Cs を調製後、GST-D 活性を測定した。なお、解剖、Cs 調製および GST-D 活性の測定方法は本章 第 1 節に準じた。

血漿中 DCNB 濃度の測定方法

血液サンプルを、4°C 下、3,000 rpm で 10 分間遠心分離して血漿を得た。この血漿 0.3 mL に 0.6 mL のエタノールを添加し攪拌後、4°C 下、3,000 rpm で 20 分間遠心分離して除タンパクした。得られた上清 20 μ L を HPLC（D-6500 型：日立製作所）に注入し、血漿中の DCNB 濃度を測定した。HPLC 分析条件は以下に示す。血漿中濃度の測定後、最後に血漿中濃度が検出された時間までの AUC (AUC_{last}) を台形法にて算出した。また、最高血漿中濃度 (C_{max}) は実測値から採用した。

カラム： Packed column # 3056 (C18, 250 mm \times 4.0 mm I.D., 5 μ m：株式会社日立製作所)

カラム温度： 25°C

移動相： methanol / water / acetic acid = 79 / 20 / 1

流速： 0.8 mL/min

波長： UV 270 nm

【実験結果】

5 および 100 mg/kg 投与後の DCNB の血漿中濃度推移を Fig. 16 に、 C_{max} 、 AUC_{last} および GST-D 活性を Table 12 に示す。

5 mg/kg 投与群では、5 例中 3 例 (No. 1 から 3) でいずれの採血ポイントでも DCNB は定量限界 ($0.03 \mu\text{g/ml}$) 以下であった。一方、5 例中 2 例 (No. 4 および 5) は投与後 0.5 hr から 6 hr まで血漿中に DCNB が検出された。しかし、投与後 6 hr の血漿中濃度は定量限界に近く (それぞれ 0.05 および $0.06 \mu\text{g/ml}$)、投与後 24 hr にはこの 2 例でも定量限界以下に低下した。100 mg/kg 投与群では、4 例中 1 例 (No. 9) が他の 3 例 (No. 6 から 8) と比較して顕著に高い血漿中濃度を示した。すなわち、No. 9 のイヌでは C_{max} が $17.23 \mu\text{g/ml}$ 、 AUC_{last} が $161.58 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であったのに対し、それ以外の 3 例では C_{max} の最高値が $5.50 \mu\text{g/ml}$ 、 AUC_{last} の最高値が $7.79 \mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ で、 AUC_{last} には最低でも 20 倍以上の差が認められた。また、No. 6 から 8 のイヌでは、投与後 24 hr には血漿中濃度が定量限界以下に低下したにもかかわらず、No. 9 のイヌでは投与後 48 hr が経過しても血漿中に DCNB が検出された。GST-D 活性測定の結果、同群の他の個体と比較して顕著に高い血漿中濃度を示した 3 例 (No. 4, 5 および 9) はいずれも low GST イヌであることが明らかとなった。その他の個体は 65.2 から 119.5 nmol/min/mg protein の活性を示し、middle あるいは high GST イヌであった。

以上の結果から、イヌに DCNB を投与すると、low GST イヌでは middle や high GST イヌに比べ顕著に高い血漿中濃度を示すことが明らかとなった。

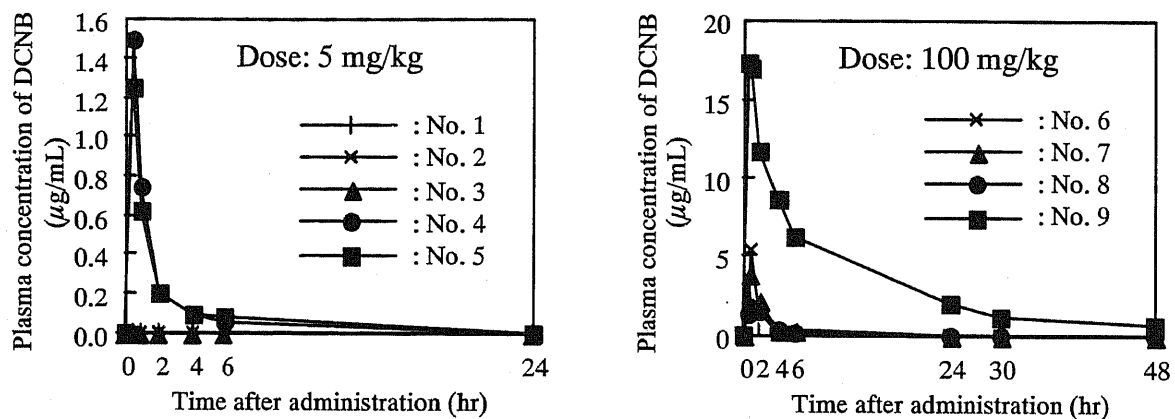


Fig. 16 Plasma concentrations of DCNB in dogs treated orally with DCNB at dose level of 5 or 100 mg/kg.

Each symbol represents an individual value.

Table 12 Pharmacokinetic parameters in dogs treated orally with DCNB at 5 or 100 mg/kg and hepatic GST-D activity.

Dose (mg/kg)	Animal No.	Sex	C _{max}	AUC _{last}	GST-D activity
			(µg/mL)	(µg·hr/mL)	(nmol/min/mg protein)
5	1	Male	—	—	65.2
	2	Female	—	—	119.5
	3	Female	—	—	107.1
	4	Female	1.49	2.30	8.1
	5	Female	1.25	2.39	2.9
100	6	Male	5.50	7.65	80.9
	7	Male	3.84	7.79	98.2
	8	Female	1.55	4.94	84.7
	9	Female	17.23	161.58	1.4

—: not determined

Each dog was autopsied 72 hrs post dose, after which GST-D activity was determined.

【考察】

本節では、イヌで認められる GSTYd_fYd_f の発現量の個体差、特に low GST イヌでの顕著な低発現が化学物質の体内動態にどのように影響するかを検討する目的で、イヌに 100 mg/kg の DCNB を単回投与し、血漿中の DCNB 濃度を測定した。その結果、low GST イヌ 1 例は high GST イヌ 3 例に比べ顕著に高い血漿中濃度を示した。本章 第 1 節での検討で GST-D 活性と CYP や UGT などその他の薬物代謝酵素の発現量や活性との間にまったく相関が認められなかったことから、low GST イヌで認められた DCNB の高い血漿中濃度は GSTYd_fYd_f の低発現によると推察された。この結果は、low GST イヌでは GSTYd_fYd_f で代謝される化学物質の消失が顕著に遅いことを意味しており、このような化学物質に対する感受性が low GST イヌで高いことが示唆された。GST は、一般に求電子性で反応性の高い化学物質や活性代謝物の解毒に関与すること、およびこのような反応性の高い活性代謝物は生体内高分子への共有結合などにより特異体質性の障害を誘発することがあることなどから、low GST イヌを用いた毒性試験により、毒性の高感度な検出や特異体質性薬物障害の予測が可能となることが期待される。

しかし、low GST イヌを毒性試験に利用するためには、事前に low GST イヌのスクリーニングが必要である。100 mg/kg の DCNB 投与後の血漿中濃度測定によるスクリーニングも可能であるが、DCNB のような chloronitrobenzene 誘導体は、血液、脾臓および肝臓に対する毒性⁶⁷⁻⁶⁹、腎毒性⁷⁰ および免疫毒性^{71, 72}などを示すことが報告されていることから、low GST イヌでは投与後 48 hr が経過しても血漿中に DCNB が残存する 100 mg/kg の DCNB 投与は、適切なスクリーニング方法とは言い難い。そこで、より低用量の DCNB で low GST イヌをスクリーニングすることを目的として、5 mg/kg の DCNB をイヌ 5 例に投与し、血漿中の DCNB 濃度を測定した。その結果、low GST イヌ 2 例では投与後 0.5 hr から 6 hr まで血漿中に DCNB が検出されたものの、middle および high GST イヌではいずれの採血時間でも血漿中に DCNB は検出されなかった。また、low GST イヌでも投与後 6 hr には定量限界近くにまで血漿中濃度が低下し、投与後 24 hr には血漿中から DCNB が消失したことから、5 mg/kg の DCNB 投与による影響は 100 mg/kg 投与の場合に比べ、大幅に少ないと推察された。以上の結果から、5 mg/kg の DCNB を投与後 0.5 hr に DCNB の血漿中濃度を測定することにより、low GST イヌのスクリーニングが可能であることが明らかとなった。

小 括

第2章では、求電子性で反応性の高い化学物質や活性代謝物の解毒に関与する GST に着目した。GST の欠損者では、一部の化学物質に対する感受性が高いことや特異体質性の薬物障害の頻度が高いことが報告されているが、これまでに GST の欠損動物に関する報告はなかった。そこで、毒性試験に繁用される実験動物の1つであるイヌにおいて GST を欠損する個体をスクリーニングし、以下の知見を得た。

- 280 例のイヌ肝臓における GST-D 活性には顕著な個体差 (0.0 – 189.9 nmol/min/mg protein) が認められ、本活性を指標にイヌは低、中および高活性群の3群に分類された。
- このうち、10 nmol/min/mg protein 以下のきわめて低い活性を示す低活性群の個体 (low GST イヌ) は約 12% の割合で存在した。また、この low GST イヌは検討を行った5つの動物生産施設すべてに存在し、特定の動物生産施設に限定されることはなかった。
- GST-D 活性の個体差は、イヌにおいて本活性を特異的に触媒することが報告されている theta クラスの GST 分子種、Yd_fYd_f の発現量の個体差によることが本反応の酵素反応速度論的解析から示唆され、二次元電気泳動によるタンパク質発現解析で証明された。
- すなわち、low GST イヌにおける低 GST-D 活性は、GSTYd_fYd_f の発現量が著しく少ないことに起因することが明らかとなった。
- 肝臓と腎臓の GST-D 活性の間には相関係数 0.9 を超えるきわめて良好な正の相関が認められ、low GST イヌは、肝臓のみならず腎臓でも本活性をほとんど示さなかった。
- イヌに DCNB を単回経口投与すると、low GST イヌではその他のイヌに比べ顕著に高い血漿中濃度を示した。
- CYP や UGT など、その他の薬物代謝酵素の発現量や活性と GST-D 活性の間に相関は認められなかったことから、low GST イヌでの DCNB の血漿中濃度の高値は、肝臓および腎臓における GSTYd_fYd_f の低発現に起因すると推察された。

以上の結果から、low GST イヌは GSTYd_fYd_f で代謝される薬物に対する感受性が高いことが考えられ、毒性試験への応用により毒性の高感度な検出や特異体質性薬物障害の予測が可能となることが推察された。なお、low GST イヌは検討したすべての動物生産施設から見出され、かつ、5 mg/kg の DCNB 投与後の血漿中濃度により容易にスクリーニングが可能であった。したがって、汎用性も高く、この点でも有用と考えられた。

第3章 BSO による持続的 GSH 低下マウスの毒性試験への応用

GSH 抱合は、一般に薬物を含む各種化学物質から生体内で生成する活性代謝物の不活性化反応であり、化学物質からの生体の防御を考える上でもっとも重要な反応の 1 つである。その反応を触媒するのが GST であり、第 2 章ではこれまでに報告のなかった GST 欠損動物として low GST イヌを見出し、その有用性を検討した。しかし、low GST イヌでは、欠損する GSTYd_fYd_f で代謝される化学物質による毒性を高感度に検出可能と推察される反面、他の GST 分子種で代謝される化学物質による毒性の高感度な検出は困難である。そこで我々は、GST の欠損動物以外で GSH 抱合能の低下したモデル動物として、GSH 抱合の際の補酵素である GSH の低下モデルを考えた。GSH 含量の低下したモデル動物は、代謝に関与する GST 分子種に非特異的に化学物質の GSH 抱合能が低下すると考えられることから、GST の欠損動物よりも汎用性の高いモデル動物となる可能性がある。

GSH の低下剤には、GSH の消去剤と GSH の合成阻害剤が知られている。前者では、消去剤自身が GSH 抱合を受けることにより GSH が低下する。したがって、GSH 抱合で解毒される薬物と併用した場合、GSH 抱合の競合により消去剤による毒性が認められる可能性が考えられ、GSH 低下モデル動物作製には不適切である。一方、後者としては、GSH 合成の律速酵素である γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) の阻害剤、BSO が知られている¹⁹⁾。BSO は γ -GCS を特異的かつ不可逆的に阻害することが報告されており²¹⁾、本剤をラットやマウスに単回投与すると、肝臓、腎臓、脾臓および骨格筋などで速やかに GSH 含量が低下することが知られている²⁰⁾。また、本剤単回投与の数時間後に GSH 抱合で解毒される薬物を投与すると、薬物を単独投与した場合と比較して毒性が増悪することが示されている⁷³⁻⁷⁶⁾。さらに、本剤を 14 日間飲水投与すると、単回投与でほとんど GSH 含量に変化の認められなかった組織でも GSH 含量の低下が認められることから²⁰⁾、BSO を 14 日間飲水投与したマウスは、GSH 低下モデル動物として薬物を含む化学物質による毒性の高感度な検出や特異体質性の薬物障害予測に応用可能となることが期待される。しかし、GSH 低下モデル動物を作製する上で考慮する必要がある重要な項目、すなわち、BSO 自身による毒性および BSO 飲水投与時の GSH 低下作用の持続性については、これまで十分に検討されていない。後者に関しては、BSO 単回投与後 10 hr 以降には GSH 含量は回復傾向を示すことや、肝臓など一部の組織の GSH 含量に顕著な日内変動が認められることなどが報告されていることから⁷⁶⁻⁷⁹⁾、特に重要な問題である。

そこで第 3 章では、GSH 合成阻害剤自身による毒性を発現することなく、GSH を持続的に低下するモデル動物として、BSO による持続的 GSH 低下マウスを作製した。また、この持続的 GSH 低下マウスに acetaminophen を投与し、毒性の高感度な検出モデルとしての本モデルの有用性を検討した。

第1節 BSO による GSH 低下マウスの作製

第1節では、毒性および薬物代謝酵素の誘導や阻害を惹起することなく GSH 含量の低下したモデル動物を作製することを目的として、GSH 合成阻害剤である BSO をマウスに 14 日間飲水投与し、各種組織における GSH 含量の低下、BSO による毒性および肝薬物代謝酵素の誘導や阻害の有無を検討した。

【実験方法】

実験動物

日本エスエルシー株式会社で生産育成された雄性 B6C3F₁ マウスに、1 週間の馴化を経て、6 週齢より投与を開始した。

群構成、投与用量および投与方法

0, 5, 10, 20 および 30 mM 投与群の計 5 群を設定し、各群 4 例構成とした。BSO (Fig. 17, シグマアルドリッチ ジャパン株式会社) は、0, 5, 10, 20 および 30 mM の濃度で水道水に溶解し、マウスに 14 日間自由に摂取させた。飲水量から、本試験では 1 日あたり 5, 10, 20 および 30 mM 投与群でそれぞれ 252, 536, 995 および 1502 mg/kg の BSO が投与されたと判断した。BSO の水溶液は、投与開始日および投与 8 日目に調製した。なお、水道水に 0.1% (4.5 mM) および 1% (45 mM) の濃度で溶解された BSO は、室温で 15 日間安定であった。したがって、今回投与に用いた水溶液中の BSO は、試験期間中安定であったことが保証された。

一般状態、体重、摂餌量、飲水量、器官重量および解剖

一般状態は、動物搬入日より解剖日まで毎日 1 回以上個体別に観察した。体重、摂餌量および飲水量は、投与開始日より解剖日まで週 2 回個体別に測定した。器官重量は、肝臓、腎臓 (左右)、脳、肺、心臓および脾臓の絶対重量を測定した。また、その重量を体重で除し、相対重量を算出した。解剖は午前 9:00 より実施した。

血液生化学的検査

解剖日に全例にエーテル麻酔を施し、後大静脈より採血した。得られた血液から常法に従って血漿を調製し、AST, ALT, ALP, T.Bil, T.CHO, TG, GLU, T.PRO, ALB, A/G 比, UN, CRE, Ca および IP を測定した。これらの測定には自動分析装置 (TBA-200FR: 東芝メディカル株式会社) を使用した。

肝薬物代謝酵素測定

全例の肝臓を用い、Ms および Cs を調製した。これらを用い、CYP 含量、*p*-nitrophenol に対する UGT 活性、GST-C 活性および GST-D 活性を測定した。Ms および Cs の調製方法、な

らびに CYP 含量, 各活性およびタンパク質濃度の測定方法は, 第 2 章 第 1 節に準じた.

GST 分子種の Western blot 分析

各群 2 例の肝 Cs を Tris-SDS BME sample loading buffer (第一化学薬品株式会社) で希釈後, 12.5% の SDS-ポリアクリルアミドゲル (EASY-GEL II: フナコシ株式会社) に 5 μ g のタンパク質を負荷し, 電気泳動を行った. 泳動後, タンパク質をゲルから Immobilon PVDF Transfer Membrane (第一化学薬品株式会社) に転写した. 膜をブロッキング後, 一次抗体 (抗ラット GSTYc 免疫ウサギ抗体, 抗ラット GSTYb2 免疫ウサギ抗体あるいは抗ラット GSTYp 免疫ウサギ抗体: 以上, フナコシ株式会社), 二次抗体 (biotin 標識抗ウサギ免疫ウマ抗体: アマシャムバイオサイエンス株式会社), streptavidin-horseradish peroxidase conjugate および ECL Western blotting detection reagent (以上, アマシャムバイオサイエンス株式会社) で処理し, フィルム (富士フィルム株式会社) に露光・現像した.

総 GSH 含量測定

肝臓, 腎臓, 脳, 肺, 心臓, 脾臓, 膵臓, 小腸 (回腸), 大腸 (結腸), 骨格筋 (右大腿部), 血漿および血球を, 5% の 5-sulfosalicylic acid (和光純薬工業株式会社) でホモジナイズした. このホモジネートを, 4°C 下, 8,000 \times g で 10 分間遠心分離し, 得られた上清を蒸留水で 10 倍に希釈したものを測定試料とした. 測定試料中の総 GSH (還元型と酸化型の総和) 含量の測定には, Total glutathione Quantification Kit (株式会社同仁化学研究所) を使用し, 吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー (SPECTRAMax PLUS: 日本モレキュラデバイス株式会社) を使用した.

【実験結果】

一般状態, 摂餌量, 飲水量, 体重および器官重量

投与期間を通じて, 対照群を含む全例に一般状態の異常ならびに死亡例は認められなかった. 摂餌量には対照群との比較で投与群に有意な変化は認められなかった. 飲水量は Day 1-5 に 20 および 30 mM 投与群, Day 5-8 に全投与群で一過性に有意な減少が認められたものの, Day 8 以降は対照群と投与群で有意な差は認められなかった. 解剖時の体重および器官重量を Table 13 に示す. 解剖時の体重は 20 および 30 mM 投与群で有意に減少したが, 10%以内のごく軽度な減少であった. 一方, 器官重量は, 30 mM 投与群で肝臓の絶対重量および相対重量がいずれも有意な低値を示したが, その他に有意な変化は認められなかった.

血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Table 14 に示す. AST が 30 mM 投与群で有意に上昇した. また, TG が 10, 20 および 30 mM 投与群で有意に低下した. その他の検査項目に有意な変化は認められなかった.

肝薬物代謝酵素測定および GST 分子種の Western blot 分析

肝薬物代謝酵素測定の結果を Fig. 18 に、Western blot 分析の結果を Fig. 19 に示す。CYP 含量、UGT 活性および GST-C 活性に有意な変化は認められなかった。一方、GST-D 活性は 10、20 および 30 mM 投与群で有意に上昇した。ラット GST サブユニットに対する抗体を用いた Western blot 分析の結果、抗ラット GSTYc (alpha クラス GST サブユニット) および GSTYp (pi クラス GST サブユニット) 抗体と交叉するタンパク質には、対照群と投与群で変化が認められなかった。一方、抗ラット GSTYb2 (mu クラス GST サブユニット) 抗体と交叉するタンパク質は、対照群と比較して 30 mM 投与群で軽度に増加した。

総 GSH 含量測定

組織中の総 GSH 含量を Fig. 20 に示す。検討したすべての組織で GSH 含量が有意に低下した。もっとも GSH 含量の多かった肝臓では、BSO の投与用量の増加とともに含量が低下し、20 および 30 mM 投与群では対照群の 50% 以下の値を示した。特に顕著な低下を示したのは、腎臓、骨格筋、大腸、心臓および脾臓で、20 あるいは 30 mM 投与群でいずれも 80% 以上の低下が認められた。また、肺、脾臓、小腸、血漿および血球でも 20 あるいは 30 mM 投与群で 50% 以上の低下が認められた。しかし、脳では 30 mM 投与群でも 15% の低下が認められたのみであった。

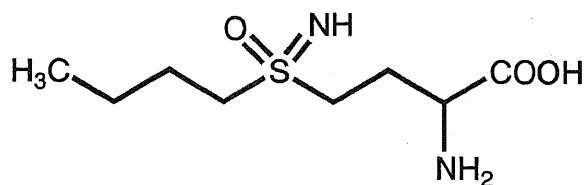


Fig. 17 Chemical structure of BSO.

Table 13 Body weights, absolute organ weights and relative organ weights in mice treated with BSO via drinking water for 14 days.

Item	0 mM	5 mM	10 mM	20 mM	30 mM
Body weight (g)	25.65 ± 0.90	25.93 ± 0.87	24.63 ± 0.76	24.00 ± 0.70*	23.95 ± 0.78*
Liver					
Absolute (g)	1.499 ± 0.091	1.517 ± 0.050	1.411 ± 0.058	1.377 ± 0.031	1.284 ± 0.074**
Relative (g%)	5.845 ± 0.301	5.853 ± 0.081	5.728 ± 0.075	5.740 ± 0.107	5.363 ± 0.307*
Kidney (R)					
Absolute (g)	0.216 ± 0.008	0.221 ± 0.009	0.200 ± 0.017	0.200 ± 0.003	0.203 ± 0.011
Relative (g%)	0.840 ± 0.047	0.850 ± 0.029	0.810 ± 0.047	0.833 ± 0.022	0.850 ± 0.068
Kidney (L)					
Absolute (g)	0.198 ± 0.014	0.197 ± 0.011	0.193 ± 0.015	0.202 ± 0.012	0.189 ± 0.017
Relative (g%)	0.773 ± 0.060	0.760 ± 0.014	0.785 ± 0.044	0.840 ± 0.035	0.788 ± 0.087
Brain					
Absolute (g)	0.484 ± 0.006	0.476 ± 0.019	0.484 ± 0.010	0.479 ± 0.016	0.481 ± 0.009
Relative (g%)	1.888 ± 0.074	1.835 ± 0.113	1.968 ± 0.053	1.995 ± 0.074	2.008 ± 0.097
Lung					
Absolute (g)	0.138 ± 0.003	0.136 ± 0.010	0.131 ± 0.009	0.132 ± 0.009	0.127 ± 0.013
Relative (g%)	0.535 ± 0.017	0.525 ± 0.024	0.530 ± 0.029	0.550 ± 0.029	0.530 ± 0.050
Heart					
Absolute (g)	0.115 ± 0.006	0.122 ± 0.007	0.120 ± 0.004	0.110 ± 0.002	0.111 ± 0.005
Relative (g%)	0.450 ± 0.029	0.473 ± 0.039	0.485 ± 0.006	0.458 ± 0.015	0.465 ± 0.024
Spleen					
Absolute (g)	0.062 ± 0.008	0.066 ± 0.006	0.063 ± 0.004	0.062 ± 0.002	0.061 ± 0.006
Relative (g%)	0.243 ± 0.030	0.253 ± 0.017	0.255 ± 0.013	0.258 ± 0.010	0.253 ± 0.021

The data of each parameter represent the mean ± SD of 4 mice.

* and **: Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Dunnett's test).

Table 14 Blood biochemical parameters in mice treated with BSO via drinking water for 14 days.

Parameter	0 mM	5 mM	10 mM	20 mM	30 mM
AST (U/L)	42.0 ± 5.0	35.5 ± 2.9	39.0 ± 3.6	44.3 ± 8.3	59.3 ± 4.3**
ALT (U/L)	28.3 ± 1.7	22.8 ± 2.2	21.0 ± 1.0	27.0 ± 12.1	29.3 ± 5.1
ALP (U/L)	374.8 ± 32.9	402.0 ± 34.5	341.3 ± 36.1	306.8 ± 45.4	289.5 ± 85.1
T.BIL (mg/dL)	0.030 ± 0.018	0.018 ± 0.010	0.030 ± 0.000	0.033 ± 0.015	0.023 ± 0.026
T.CHO (mg/dL)	91.0 ± 12.2	95.0 ± 6.5	95.7 ± 4.6	99.3 ± 6.4	99.0 ± 9.0
TG (mg/dL)	147.8 ± 51.1	120.0 ± 30.0	72.3 ± 15.0*	70.0 ± 14.7**	53.0 ± 10.3**
GLU (mg/dL)	252.8 ± 2.6	255.0 ± 24.4	250.7 ± 36.9	261.3 ± 63.2	249.5 ± 20.9
T.PRO (g/dL)	4.63 ± 0.28	4.78 ± 0.05	4.77 ± 0.06	4.90 ± 0.20	4.70 ± 0.14
ALB (g/dL)	1.53 ± 0.10	1.53 ± 0.05	1.53 ± 0.06	1.60 ± 0.08	1.58 ± 0.05
A/G ratio	0.478 ± 0.010	0.470 ± 0.008	0.480 ± 0.017	0.483 ± 0.017	0.488 ± 0.010
UN (mg/dL)	34.83 ± 6.63	36.03 ± 4.43	34.30 ± 5.56	30.23 ± 1.80	29.03 ± 5.15
CRE (mg/dL)	0.095 ± 0.013	0.098 ± 0.005	0.097 ± 0.023	0.085 ± 0.006	0.100 ± 0.038
Ca (mg/dL)	9.78 ± 0.22	10.03 ± 0.21	9.97 ± 0.32	10.13 ± 0.66	9.80 ± 0.36
IP (mg/dL)	7.73 ± 1.93	7.86 ± 1.00	6.62 ± 1.43	7.87 ± 2.32	7.36 ± 0.60

The data of each parameter represent the mean ± SD of 4 mice.

* and **: Significantly different from the mean value of the control group (p<0.05 and p<0.01, respectively, Dunnett's test).

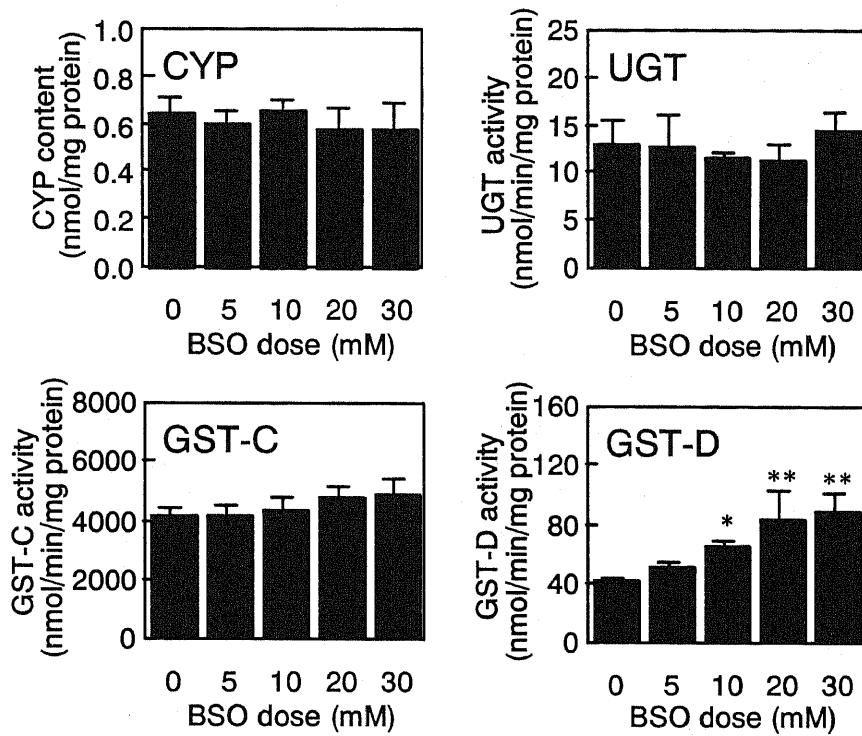


Fig. 18 Effect of BSO dosing via drinking water for 14 days on liver CYP content, UGT activity and GST activities.

Each bar represents the mean \pm SD of 4 mice.

* and **: Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Dunnett's test).

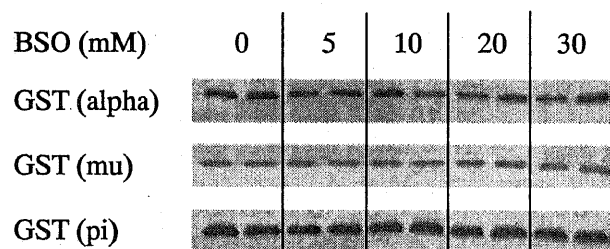


Fig. 19 Immunoblot analysis of liver cytosolic proteins from control and BSO-treated mice using anti-rat GST subunit antibodies.

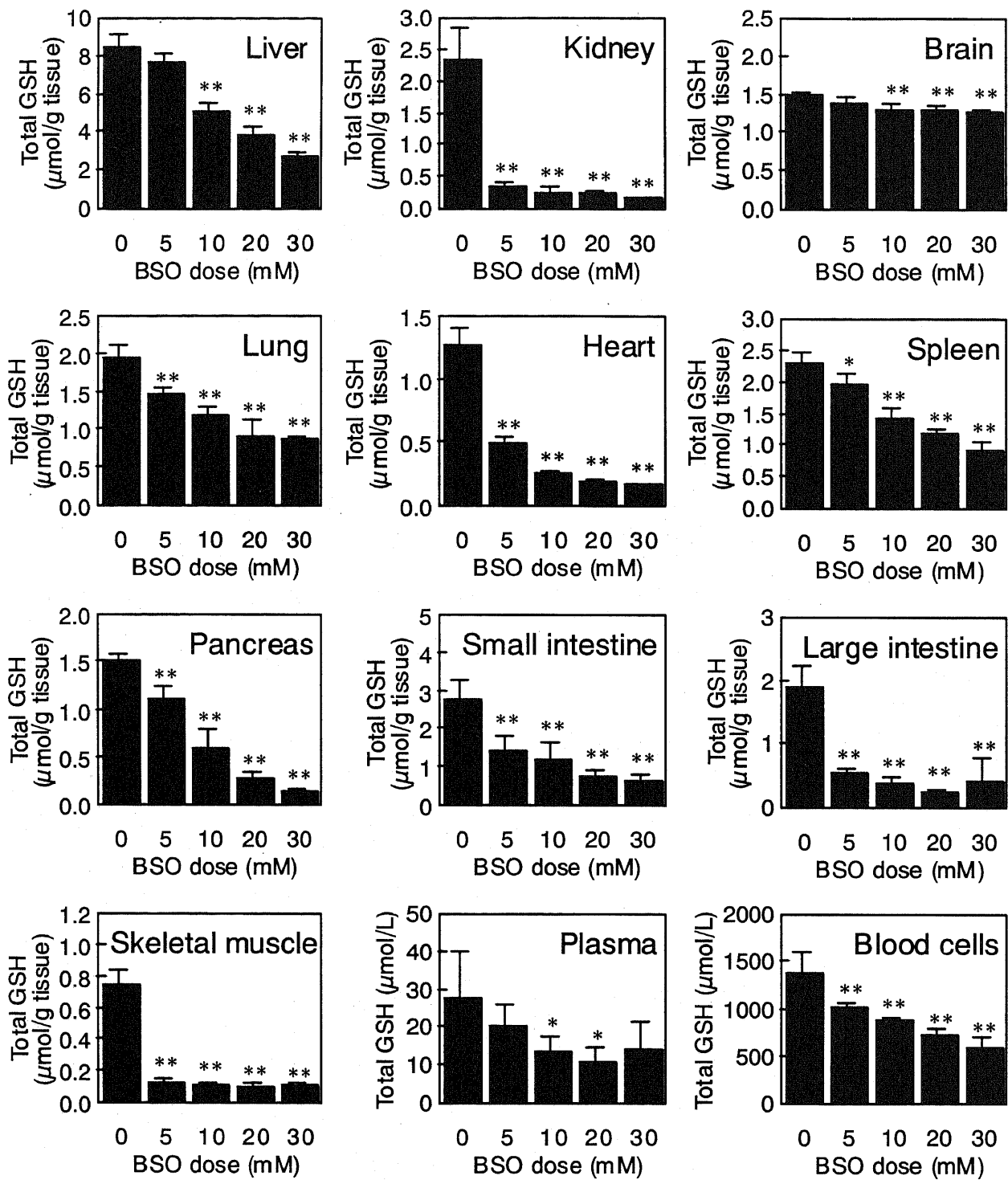


Fig. 20 Effect of BSO dosing via drinking water for 14 days on total GSH levels in various tissues.

Each bar represents the mean \pm SD of 4 mice.

* and **: Significantly different from the mean value of the control group (p < 0.05 and p < 0.01, respectively, Dunnett's test).

【考察】

本節では、毒性および薬物代謝酵素の誘導あるいは阻害を発現することなく、GSH 含量の低下したモデル動物を作製することを目的として、BSO をマウスに 14 日間飲水投与し、各種組織における GSH 含量、毒性および肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した。

総 GSH 含量測定の結果、検討を行ったすべての組織で GSH 含量が有意に低下し、20 および 30 mM 投与群では脳を除くすべての組織で対照群の約 50%以下に低下した。これらの結果は従来の報告²⁰⁾ とほぼ一致した。各組織で低下率に相違が認められたが、これは、 γ -GCS の発現量、GSH 合成に必須な cysteine の供給および GSH の消費量等に影響を受ける GSH の turnover の速さならびに BSO の分布量等の相違に関係すると推察される。すなわち、GSH の turnover の速い組織あるいは BSO の分布量の多い組織で GSH 含量の低下率が高かったと考えられた。なお、ラットの脳室内に BSO を直接投与すると脳内の GSH 含量が顕著に低下することが報告されていることから⁸⁰⁾、本試験で脳のみ GSH 含量の低下が軽度だったのは、血液脳関門の存在により BSO の脳への移行が少なかったためと思われる。

一方、本試験では、投与期間を通じて死亡例、一般状態の変化ならびに毒性と判断される 10%以上の体重減少は認められなかった。投与 8 日目まで飲水量の一時的な低下が認められたものの、その後回復したことから、BSO の忌避はないものと思われる。30 mM 投与群で認められた AST の有意な上昇は、ALT、ALP および T.BIL 等その他の肝機能検査値にまったく変化が認められなかったことから偶発的な変化と判断した。しかし、同群では肝臓の絶対重量および相対重量がいずれも有意な低値を示しており、30 mM の BSO は肝臓に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。その他、TG が投与用量の増加に伴い対照群の 50%以下に低下したが、TG には摂餌に伴う顕著な日内変動が認められることから、毒性学的に見て重篤な変化ではないと推察される。

薬物代謝酵素に関しては、CYP 含量および UGT 活性に有意な変化は認められなかった。30 mM 投与群で mu クラスの GST の軽度な誘導が認められたが、同群では GSH 抱合に必要な GSH が顕著に低下した状態にあることから、*in vivo* での GSH 抱合反応は低下すると推察される。なお、本試験で測定した *in vitro* での GST-D 活性は、測定時に GSH を過剰に添加していることから、GST の誘導が反映されて上昇したと考えられた。

以上、20 および 30 mM の BSO のマウスに対する 14 日間飲水投与により、脳を除く検討したすべての組織で GSH 含量が対照群の約 50%以下に低下した。しかし、30 mM 投与群では、肝臓重量の低下等、毒性の徴候も認められた。したがって、BSO をマウスに飲水投与し GSH 低下モデルを作製する際には、BSO の濃度を 20 mM までに抑える必要がある。すなわち、20 mM の BSO を 14 日間飲水投与したマウスは、毒性および薬物代謝酵素の変動を発現することなく各種組織で GSH 含量が顕著に低下したモデル動物であると結論した。

第2節 BSO による GSH 低下マウスにおける GSH 低下の持続性

前節では、20 mM の BSO をマウスに 14 日間飲水投与することにより、毒性および薬物代謝酵素の変動を発現することなく、脳を除く各種組織で GSH 含量を約 50% 以下に低下させることが可能であることを述べた。しかし、肝臓および膵臓など幾つかの組織では GSH 含量に日内変動が報告されている^{76-79, 81)}。また、BSO の単回投与後 10 hr 以降、低下した GSH 含量が回復し始めることなども報告されている⁸²⁾。したがって、今回作製した GSH 低下マウスが、1 日を通じて持続的に GSH が低値を示す持続的 GSH 低下マウスと考えられるかについては、前節の結果からは明らかではない。そこで、第2節では、20 mM の BSO を 14 日間飲水投与したマウスにおいて、GSH 低下の持続性を検討した。

【実験方法】

実験動物

日本エスエルシー株式会社で生産育成された雄性 B6C3F₁ マウスに、1 週間の馴化を経て、6 週齢より投与を開始した。

群構成、投与用量および投与方法

0 および 20 mM 投与群の計 2 群を設定し、各群 24 例構成とした。BSO (シグマアルドリッチ ジャパン株式会社) は 0 および 20 mM の濃度で水道水に溶解し、14 日間自由に摂取させた。飲水量から、本試験では 1 日あたり 1072 mg/kg の BSO が投与されたと判断した。前節同様、本試験でも BSO の水溶液は投与開始日および投与 8 日目に調製した。

一般状態、体重、摂餌量、飲水量および解剖

一般状態は、動物搬入日より解剖日まで毎日 1 回以上個体別に観察した。体重、摂餌量および飲水量は、投与開始日より解剖日まで週 2 回個体別に測定した。14 日間の投与期間終了後、動物は 1:00, 5:00, 9:00, 13:00, 17:00 および 21:00 に両群とも 4 例ずつ解剖した。

血液生化学的検査

解剖時に採血し、前節で検討した検査項目を同様の方法で測定した。

総 GSH 含量測定

前節で検討した組織における GSH 含量を同様の方法で測定した。なお本節では、GSH 含量の AUC を台形法により算出し、対照群と投与群で比較した。

【実験結果】

一般状態、摂餌量、飲水量および体重

投与期間を通じて、対照群を含む全例に一般状態の異常ならびに死亡例は認められなかった。摂餌量は、Day 1-4 および 4-8 に投与群で一過性に有意な減少が認められたものの、Day 8 以降は対照群と投与群で有意な差は認められなかった。飲水量には有意な変化は認められなかった。解剖時の体重は投与群で有意に減少したが、6.2%のごく軽度な減少であったことから、毒性とは判断しなかった。

血液生化学的検査

前節で投与により顕著な低下の認められた TG の結果を Fig. 21 に示す。投与群では、対照群と比較して 5:00、9:00 および 17:00 に有意な低値が認められた。しかし、両群とも摂餌に伴う顕著な日内変動が認められ、対照群および投与群の TG の日内変動範囲は、それぞれ 14.5 - 219.8 および 9.5 - 127.0 mg/dL であった。投与群の変動はほぼ対照群の変動範囲内での変動であったことから、前節で考察したとおり、TG の低下は毒性学的に重篤な変化ではないと判断した。その他の検査項目に関しては、投与に起因した変化は認められなかった。

総 GSH 含量測定

マウスにおける総 GSH 含量を AUC として Table 15 に示す。対照群の各組織における GSH 含量の AUC は、多い順に、肝臓 > 小腸 > 脾臓 > 大腸 > 腎臓 > 肺 > 脳 > 膵臓 > 心臓 > 骨格筋であった。また、血液中では血漿よりも血球に GSH が局在した。20 mM の BSO 投与により、1 日の GSH 含量を反映する AUC も、脳を除く各組織で約 50%以下に低下した。一方、組織中の総 GSH 含量の経時変化を Fig. 22 に示す。肝臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、小腸、大腸および骨格筋において、検討したすべての時間に対照群と比較して投与群で有意に低値を示した。また、それ以外の組織でも検討したすべての時間に投与群で低値を示した。

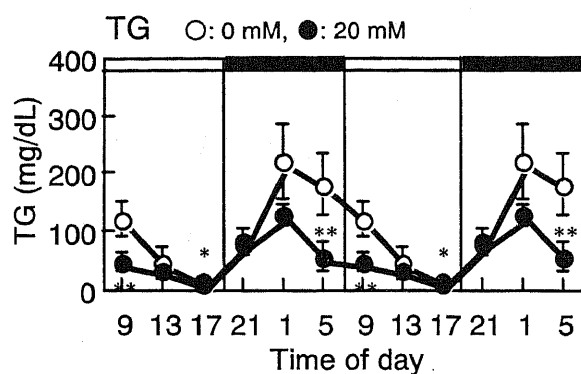


Fig. 21 Effect of BSO dosing via drinking water for 14 days on TG levels in plasma.

The data are shown with duplication in the second wave from the first.

Each symbol represents the mean \pm SD of 4 mice.

Open and closed bars illustrated in the upper region of the graph show the light and dark periods, respectively.

* and **: Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Student's *t*-test).

Table 15 AUC of GSH in mice treated with or without 20 mM BSO.

Tissue	AUC of GSH		AUC ratio, % (20 mM/0 mM)
	0 mM BSO	20 mM BSO	
Liver	182.3	84.6	46.4
Kidney	52.1	8.7	16.7
Brain	38.1	34.0	89.2
Lung	48.8	24.6	50.4
Heart	30.6	6.0	19.6
Spleen	72.0	37.1	51.5
Pancreas	33.7	9.1	27.0
Small intestine	72.2	23.4	32.4
Large intestine	52.6	8.6	16.3
Skeletal muscle	18.5	5.3	28.6
Plasma	580.1	304.5	52.5
Blood cells	39559.6	21528.8	54.4

The area under the concentration-time curve (AUC) is expressed as $\mu\text{mol}\cdot\text{hr/L}$ for plasma and blood cells, and $\mu\text{mol}\cdot\text{hr/g}$ tissue for other tissues and organs.

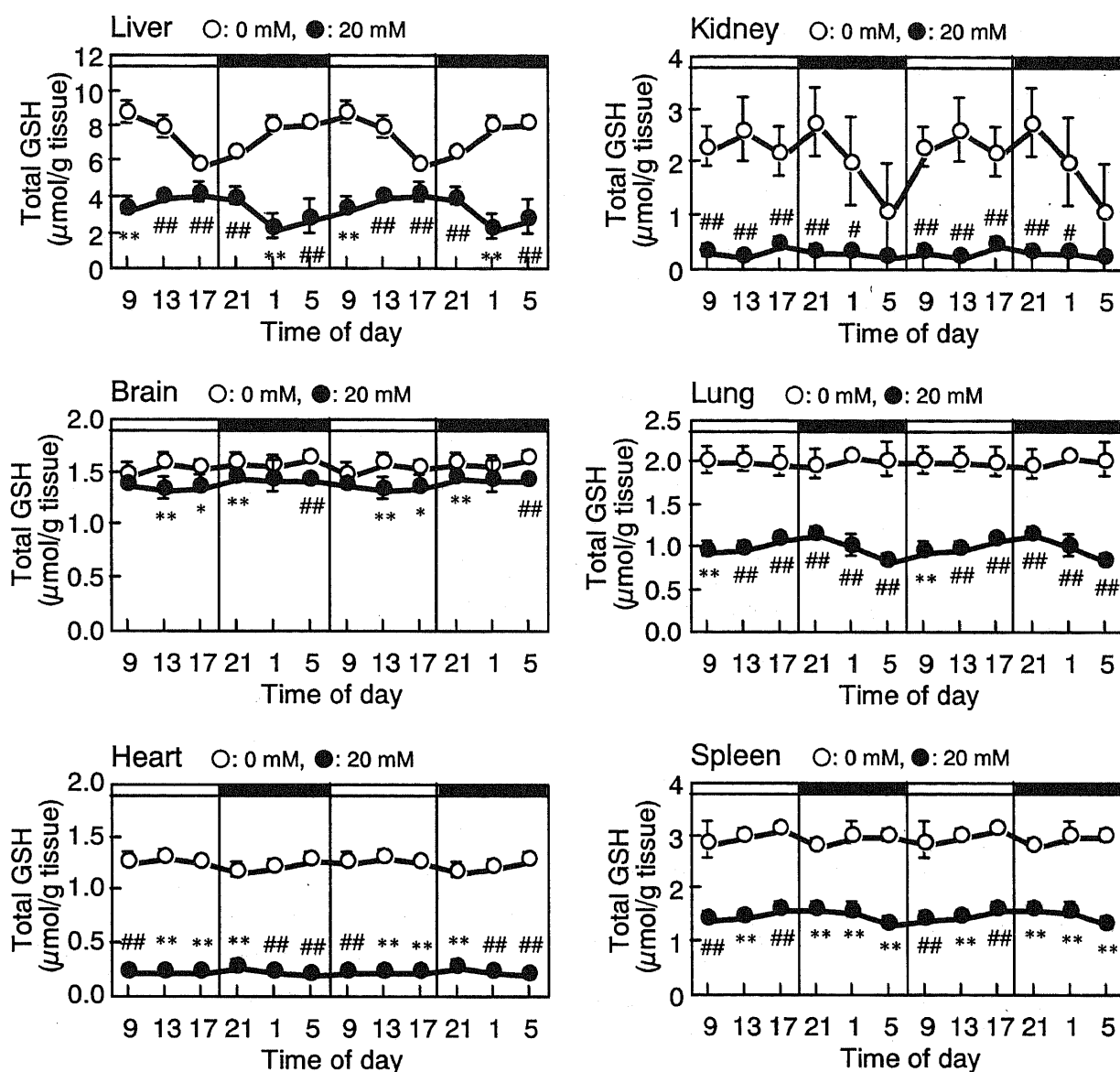


Fig. 22 Effect of BSO dosing via drinking water for 14 days on total GSH levels in various tissues.

The data are shown with duplication in the second wave from the first.

Each symbol represents the mean \pm SD of 4 mice.

Open and closed bars illustrated in the upper region of the graph show the light and dark periods, respectively.

* and **: Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Student's *t*-test).

and ##: Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Aspin-Welch's *t*-test).

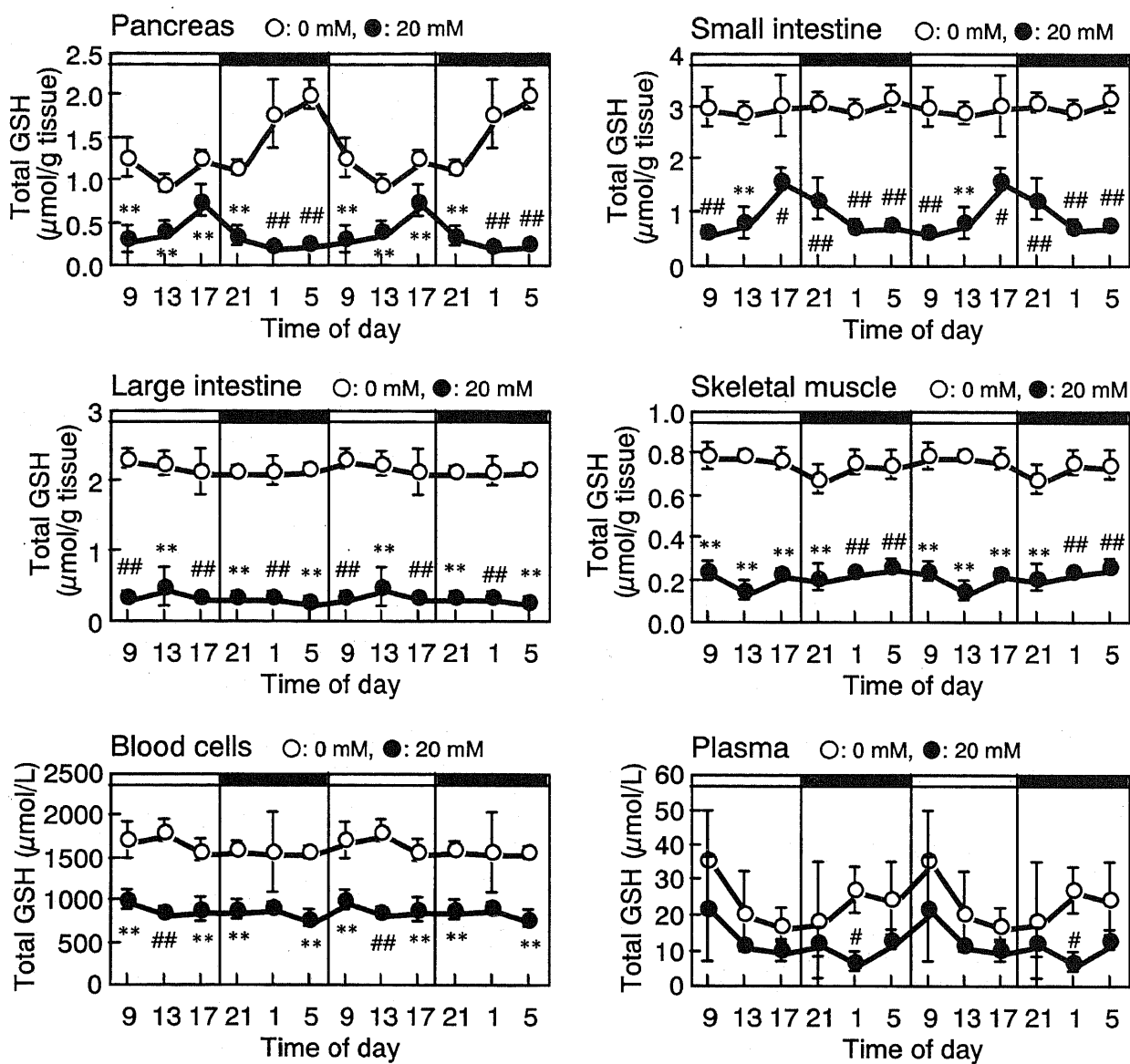


Fig. 22 (continued) Effect of BSO dosing via drinking water for 14 days on total GSH levels in various tissues.

The data are shown with duplication in the second wave from the first.

Each symbol represents the mean \pm SD of 4 mice.

Open and closed bars illustrated in the upper region of the graph show the light and dark periods, respectively.

** : Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.01$, Student's t -test).

and ## : Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, Aspin-Welch's t -test).

【考察】

本節では、20 mM の BSO を 14 日間飲水投与したマウスにおいて、各種組織の GSH 低下の持続性を検討した。その結果、肝臓および膵臓の対照群の GSH 含量には、暗期に上昇し明期に低下する従来の報告と同様の日内変動が認められた^{76-79, 81)}。肝臓における日内変動の原因は、GSH の生合成に必要な cysteine が摂餌に伴い暗期に摂取されるためと推察されている⁸³⁾。一方、投与群の肝臓および膵臓における GSH 含量は、対照群とは逆にむしろ暗期に低下し明期に上昇する傾向を示した。この原因としては、マウスが摂餌とともに暗期に飲水し、それに伴い BSO が暗期に摂取されたことが考えられた。一方、その他の組織の GSH 含量には明確な日内変動は認められなかったが、投与群では検討したすべての組織ですべての時間に対照群に比較して GSH 含量が低値を示した。

以上の結果から、20 mM BSO を 14 日間飲水投与したマウスは、1 日を通じて各種組織の GSH 含量が低値を示す持続的 GSH 低下マウスであることが明らかとなった。特に本モデルは、①投与方法が簡便、②毒性および薬物代謝酵素の誘導あるいは阻害が認められない、③通常暗期に高値を示す肝臓や膵臓の GSH 含量を効率的に低下させることが可能、④GSH 含量の低下が 1 日を通じて持続し、かつ脳を除くほとんどの組織で GSH 含量が約 50% 以下に低下する、という 4 つの点で優れた動物モデルであると考えられた。

第3節 BSOによる持続的GSH低下マウスにおけるacetaminophen誘発肝および腎障害の増強

前節までに、20 mMのBSOを14日間飲水投与したマウスは、脳を除く各種組織でGSH含量が持続的に低下したモデル動物であることを明らかにした。第3節では、本モデルの有用性を検討する目的で、マウスにBSOおよびacetaminophenを併用し、acetaminophenによる毒性が本モデルで増強される可能性を検討した。

【実験方法】

実験動物

日本エスエルシー株式会社で生産育成された雄性B6C3F₁マウスに、1週間の馴化を経て、6週齢より投与を開始した。

群構成、投与用量および投与方法

0および20 mMのBSO（シグマアルドリッチ ジャパン株式会社）ならびに0、0.125および0.25%のacetaminophen（シグマアルドリッチ ジャパン株式会社）を、1群10例のマウスに単独あるいは併用投与した。群構成は以下に示す。BSOは0および20 mMの濃度で水道水に溶解し、14日間自由に摂取させた。また、acetaminophenは0、0.125および0.25%の濃度で粉末餌（Certified Rodent Diet 5002：PMI Nutrition International Inc.）に混合し、14日間自由に摂取させた。なお、BSO水溶液およびacetaminophen混合餌は、投与開始日および投与8日目に調製した。

	0 mM BSO	20 mM BSO
0% acetaminophen	n = 10	n = 10
0.125% acetaminophen	n = 10	n = 10
0.25% acetaminophen	n = 10	n = 10

一般状態、体重、摂餌量、飲水量、器官重量および解剖

一般状態は、動物搬入日より解剖日まで毎日1回以上個体別に観察した。体重、摂餌量および飲水量は、投与開始日より解剖日まで週2回個体別に測定した。器官重量は、肝臓、腎臓（左右）、脳、肺、心臓および脾臓の絶対重量を測定した。また、その重量を体重で除し、相対重量を算出した。解剖は午前9:00より実施した。

血液学的検査

解剖日に、10例中5例/群にエーテル麻酔を施し、後大静脈より採血した。この血液に抗凝固剤（15% EDTA-2K）を添加し、RBC、HB、HT、MCH、MCV、MCHC、RET、PLT、WBC、WBC%、ANEおよびALYを測定した。このうち、WBC%の測定には血液細胞自動分析装置（マイクロックス HEG-120A：オムロン株式会社）を、その他の項目の測定には自動血球計

数装置（ADVIA120：バイエル メディカル株式会社）をそれぞれ使用した。

血液生化学的検査

解剖日に、血液学的検査に供さなかった残り 5 例/群にエーテル麻酔を施し、後大静脈より採血した。得られた血液から常法に従って血漿を調製し、AST, ALT, ALP, T.Bil, T.CHO, TG, GLU, T.PRO, ALB, A/G 比, UN, CRE, Ca および IP 測定した。これらの測定には自動分析装置（TBA-200FR：東芝メディカル株式会社）を使用した。またその他に、Day 2 に各群の生存例全例の眼窩静脈叢から少量の血液を採取し、血漿分離後、ALT および CRE を測定した。本測定には簡易型の分析装置（5500V：富士通株式会社）を使用した。

病理組織学的検査

血液学的検査に供した 5 例/群の肝臓および腎臓について実施した。病理組織標本の作製方法に関しては、第 1 章 第 1 節に準じた。

総 GSH 含量測定

解剖日に、血液生化学的検査に供した 5 例/群から本章 第 1 節で検討した組織を摘出し、GSH 含量を同様の方法で測定した。

【実験結果】

一般状態

BSO と 0.25% acetaminophen の併用群で 10 例中 9 例が Day 2 に死亡した。このため、残りの 1 例および 0.25% acetaminophen 単独投与群 10 例全例は Day 2 に臨時剖検した。一方、その他の群では、BSO と 0.125% acetaminophen の併用群の 1 例で、Day 4 および Day 5 に呼吸不整が認められた以外に一般状態の変化は認められなかった。

体重、摂餌量および飲水量

解剖日の体重には、0.125% acetaminophen 単独投与群および BSO と 0.125% acetaminophen の併用群とも、それぞれの対照群と比較して有意な変化は認められなかった。摂餌量は、BSO と 0.125% acetaminophen の併用群で Day 4-8 に一過性に有意な低下が認められた。飲水量は、0.125% acetaminophen 単独投与群では対照群との間に差は認められなかったものの、BSO と 0.125% acetaminophen の併用群では投与期間を通じて対照群よりも約 30%低値を示した。

器官重量

0.125% acetaminophen 単独投与群の肝臓の絶対重量および相対重量がいずれも有意に増加した。しかし、増加率はいずれも 10%前後でごく軽度な増加であり、肝細胞肥大等を示唆する変化ではなかった。その他に絶対重量ならびに相対重量がともに増減した器官はなかった。

血液学的検査

0.125% acetaminophen の投与に起因した変化は、単独投与群および BSO との併用群ともに認められなかった。

血液生化学的検査

血液生化学的検査項目のうち、肝障害および腎障害のもっとも典型的な指標となる ALT および CRE の結果を Table 16 に示す。Day 2 には、BSO と 0.25% acetaminophen 投与群の生存例 1 例で、ALT が 23300 U/L、CRE が 1.20 mg/dL と著しい高値を示し、同群では重度の肝障害および腎障害が認められることが推察された（詳細は病理組織学的検査の項参照）。しかし、0.25% acetaminophen 単独投与群では両検査項目ともに正常値を示した。一方、BSO と 0.125% acetaminophen の併用群の ALT には非常に顕著な個体差が認められたものの、対照群の平均値と比較していずれの個体も高値を示した。同群の CRE は対照群と差がなかった。また、0.125% acetaminophen 単独投与群では ALT および CRE とも正常値を示した。興味深いことに、解剖時には、ALT および CRE を含むすべての検査項目に 0.125% acetaminophen 投与に起因した変化は認められなかった。

病理組織学的検査

10 例中 9 例が Day 2 に死亡した BSO および 0.25% acetaminophen 併用群では、肝細胞および腎尿細管上皮細胞の重篤な壊死が認められた（それぞれ Photo 1b および 2b）。すなわち、血液生化学的検査から予想された通り、重度の肝障害ならびに腎障害が認められた。しかし、0.25% acetaminophen 単独投与群では、病理組織学的に肝障害および腎障害は認められなかった（それぞれ Photo 1a および 2a）。一方、BSO と 0.125% acetaminophen 併用群では、一部の個体で線維芽細胞の浸潤を伴う限局性の肝細胞壊死が認められたが（Photo 3d）、腎臓には変化は認められなかった。また、BSO および 0.125% acetaminophen それぞれの単独投与群（それぞれ Photo 3b および 3c）ならびに BSO と acetaminophen の非投与群（Photo 3a）では、肝臓および腎臓ともに変化は認められなかった。

総 GSH 含量

肝臓ならびに腎臓における GSH 含量を Fig. 23 に示す。BSO 投与の有無に関係なく、0.125% acetaminophen 投与による影響は認められなかった。一方、BSO と 0.25% acetaminophen の併用群 1 例の GSH 含量は、肝臓、腎臓ともに BSO 単独投与群の GSH 含量の平均値よりも、それぞれ 30 および 39% 低値を示した。

Table 16 Blood biochemical parameters (ALT and CRE) in mice treated with BSO and acetaminophen (APAP).

Day of measurement	Group	ALT (U/L)		CRE (mg/dL)	
		0 mM BSO	20 mM BSO	0 mM BSO	20 mM BSO
Day 2	0% APAP	28.1 ± 13.7	29.2 ± 17.4	0.16 ± 0.08	0.00 ± 0.00
	0.125% APAP	26.9 ± 10.4	2662.7 ± 8094.7	0.02 ± 0.06	0.02 ± 0.06
	0.25% APAP	31.7 ± 13.6	23300	0.17 ± 0.09	1.20
Day 15	0% APAP	26.4 ± 4.2	22.0 ± 2.0	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02
	0.125% APAP	29.0 ± 3.2	41.1 ± 33.6	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.03

The data of the parameters on Day 2 represent the mean ± SD of 10 mice except for the group that was dosed 20 mM BSO and 0.25% acetaminophen simultaneously.

The data of the parameters of the one mouse that survived on Day 2 are shown for this group.

The data of the parameters on Day 15 represent the mean ± SD of 5 mice.

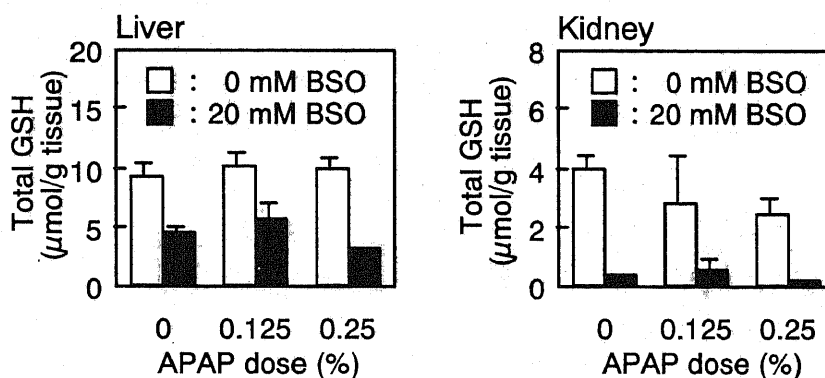


Fig. 23 Effect of BSO and/or acetaminophen (APAP) on total GSH levels in the liver and kidney. Each bar represents the mean ± SD of 5 mice except for the group that was dosed 20 mM BSO and 0.25% acetaminophen simultaneously.

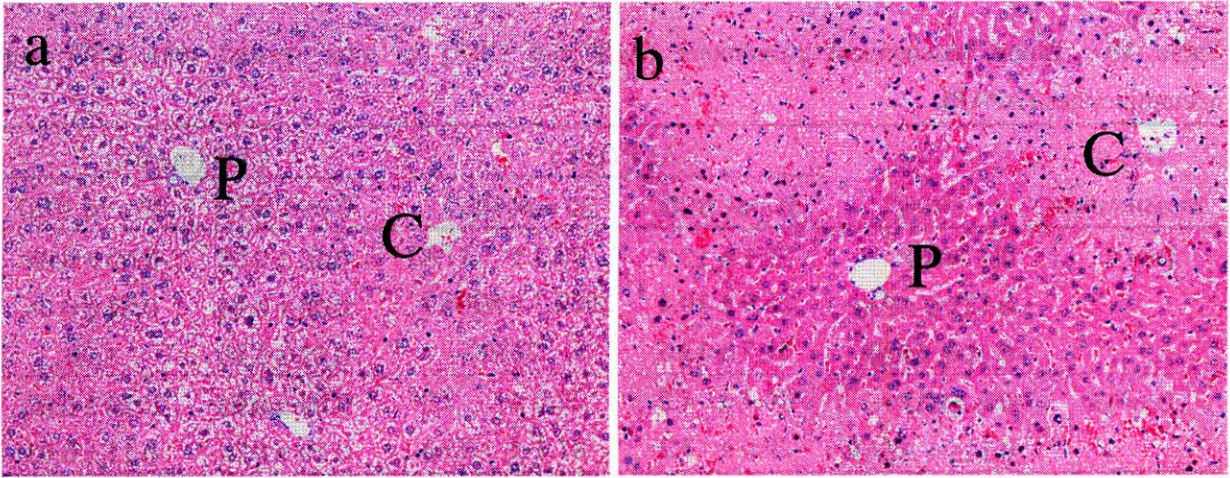


Photo 1 H&E-stained sections of mouse liver on Day 2 after 0.25% acetaminophen treatment (a) and both 20 mM BSO and 0.25% acetaminophen treatment (b).

C, central vein; P, portal triad.

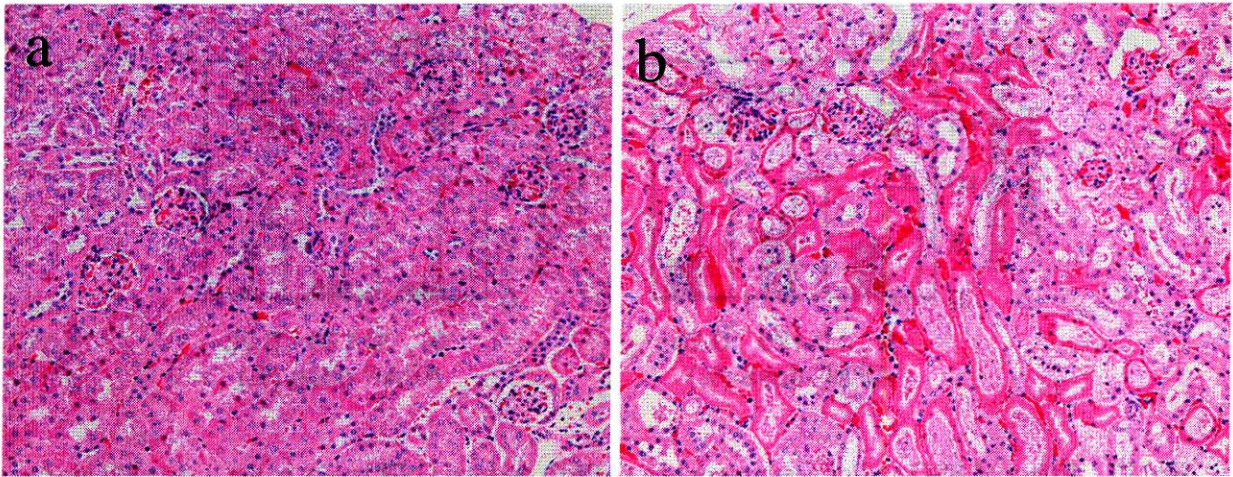


Photo 2 H&E-stained sections of mouse kidney on Day 2 after 0.25% acetaminophen treatment (a) and both 20 mM BSO and 0.25% acetaminophen treatment (b).

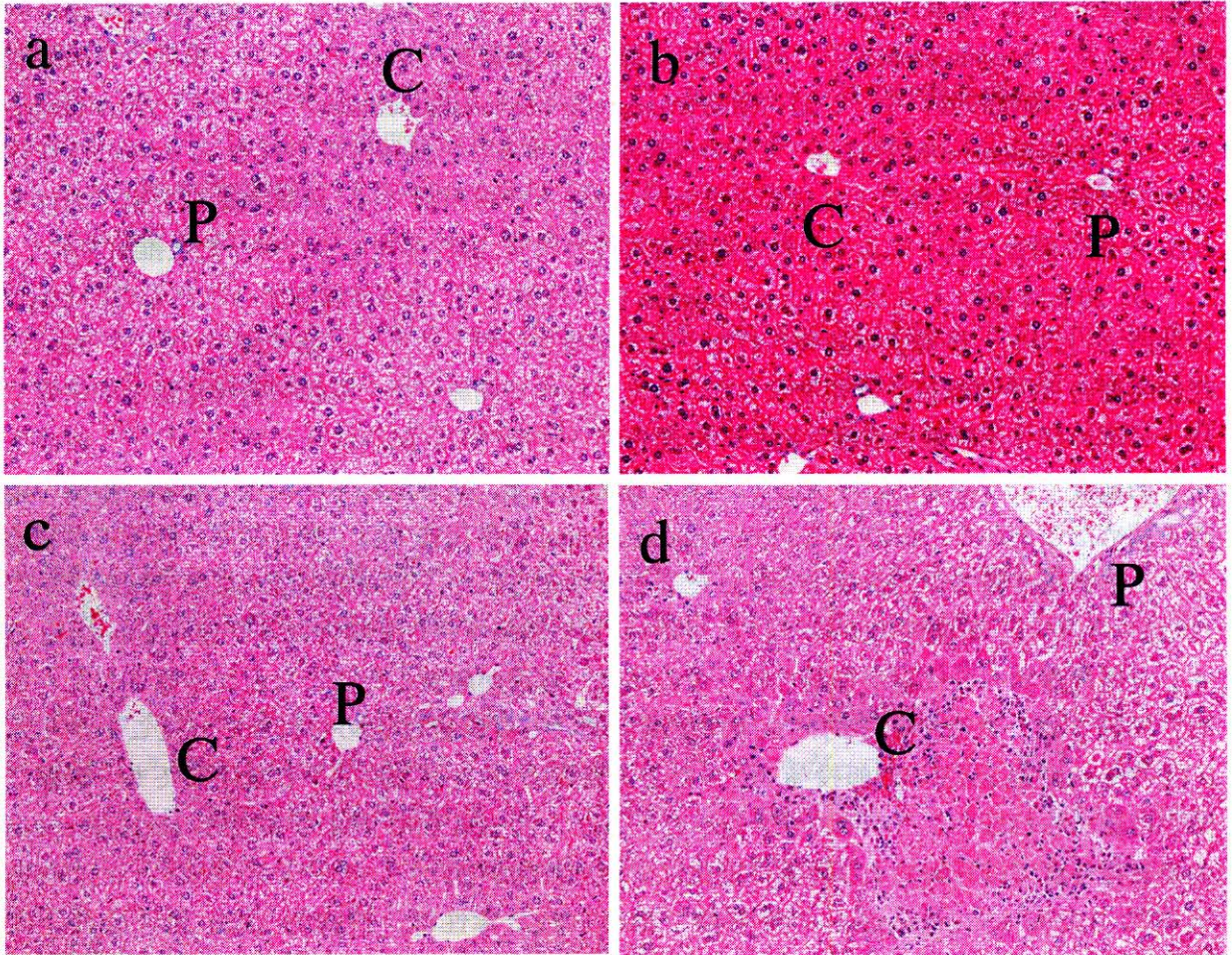


Photo 3 H&E-stained sections of mouse liver on Day 15 after non-treatment (a), 20 mM BSO treatment (b), 0.125% acetaminophen treatment (c) and both 20 mM BSO and 0.125% acetaminophen treatment (d).

C, central vein; P, portal triad.

【考察】

本節では、BSO による持続的 GSH 低下マウスの有用性を検討する目的で、マウスに BSO および acetaminophen を 14 日間併用し、acetaminophen による毒性が持続的 GSH 低下マウスで増強される可能性を検討した。その結果、20 mM BSO と 0.25% acetaminophen の併用群では、重度の肝および腎障害により 10 例中 9 例が Day 2 に死亡した。しかし、0.25% acetaminophen 単独投与群では、血液生化学的にも病理組織学的にも同日に肝障害あるいは腎障害は認められなかった。Acetaminophen の大量投与時には、主代謝経路であるグルクロン酸抱合や硫酸抱合が飽和し、毒性の強いキノン型代謝物 (*N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine)⁸⁴⁾ やラジカル (*N*-acetyl-*p*-benzosemiquinoneimine radical)⁸⁵⁾ への代謝が亢進することが知られている。これらの活性代謝物は通常 GSH 抱合等により解毒されるが、BSO との併用群では、肝臓および腎臓における GSH 含量の顕著な低下によりこれらの解毒が行われず、毒性発現につながったと推察された。

一方、20 mM BSO と 0.125% acetaminophen の併用群では、個体差は認められたものの Day 2 に ALT が上昇し、肝障害が誘発されたことが示唆された。しかし、興味深いことに、Day 15 には同群の ALT はほぼ正常値を示した。また、投与期間終了後の同群の病理組織学的検査では、一部の個体の肝臓に線維芽細胞の浸潤を伴う限局性の肝細胞壊死が認められた。血液生化学的検査で投与初期にのみ ALT の上昇を認めたこと、病理組織学的検査で線維芽細胞の浸潤を認めたことから、BSO と 0.125% acetaminophen の併用群では、投与初期に肝障害が認められ、その後、障害が回復傾向を示したことが考えられた。この原因は本試験では明らかではない。しかし、可能性の 1 つとして、投与初期に誘発された肝障害により acetaminophen のキノン型代謝物への代謝が抑制され、その結果、障害が軽減したことなどが推察された。なお、同群では、血液生化学的にも病理組織学的にも腎障害は認められなかったことから、0.125% acetaminophen の混餌投与では、たとえ腎臓の GSH が 20% 以下に低下しても、腎臓に障害は認められないことが明らかとなった。また、20 mM BSO および 0.125% acetaminophen の単独投与群では肝臓および腎臓に変化は認められなかった。したがって、BSO と 0.125% あるいは 0.25% acetaminophen の併用群で認められた毒性は、持続的 GSH 低下条件下で acetaminophen が投与されたことにより特異的に誘発された変化であることが明らかとなった。

以上の結果から、BSO による持続的 GSH 低下マウスでは、acetaminophen のように、GSH 抱合で解毒される反応性の高い活性代謝物を代謝過程で生じる化学物質による毒性が、より低用量で発現することが明らかとなった。したがって本モデルは、第 2 章に記載した low GST イヌ同様、毒性試験への応用により毒性の高感度な検出や特異体質性薬物障害の予測が可能となることが期待される。Low GST イヌの長所は、BSO 等の化学物質を投与することなく、先天的に低 GST 活性を示すことである。しかしその反面、low GST イヌで毒性を高感度に検出可能なのは GSTYd_fYd_f で代謝される化学物質に限定される、という短所が存在する。一方、本章で明らかとした BSO による持続的 GSH 低下マウスでは、GST 分子種に非特異的に GSH 抱合反応で解毒される化学物質による毒性の高感度な検出が可能と考えられる。したがって、BSO による持続的 GSH 低下マウスは、特定の GST 分子種の欠損モデルに比べ、より汎用性が高いと推察される。

小 括

第3章では、持続的 GSH 低下モデルの作製を試みた。GSH の低下剤としては GSH 合成阻害剤である BSO を用い、マウスにおいて GSH を持続的に低下させることが可能か検討した。また、この持続的 GSH 低下マウスに、高量投与時には GSH 抱合で解毒されることが知られている acetaminophen を投与し、GSH の低下により acetaminophen の毒性が増強する可能性を検討した。その結果、以下の知見を得た。

- BSO のマウスに対する 14 日間飲水投与により、30 mM 投与群で肝臓重量の有意な低下および mu クラス GST の軽度な誘導が認められた。しかし、20 mM 以下の投与群では毒性および薬物代謝酵素の変動は認められなかった。したがって、本モデル作製には BSO の投与用量を 20 mM 以下に設定する必要があると考えられた。
- 20 mM BSO のマウスに対する 14 日間飲水投与により、脳を除く検討したすべての組織で GSH 含量が約 50%以下に低下した。すなわち、もっとも含量の多かった肝臓では 50%以上の低下が認められ、もっとも顕著な低下を示した腎臓、心臓および大腸では 80%以上の低下が認められた。
- 20 mM BSO を 14 日間飲水投与したマウスにおいて GSH 低下の持続性を検討した。その結果、投与群の GSH 含量は、検討したすべての組織で1日を通じ対照群より低値を示した。
- 特に、対照群の肝臓では暗期に GSH 含量が上昇する日内変動が認められたが、投与群ではむしろ暗期に GSH 含量が低下する傾向を示した。したがって、本モデルは、通常もっとも GSH 含量の多い暗期の肝臓において効率的に GSH 含量が低下する、優れた持続的 GSH 低下モデルであることが明らかとなった。
- マウスに 20 mM BSO と acetaminophen を併用することにより、acetaminophen 単独投与ではまったく毒性の認められなかった投与用量で顕著な肝障害および腎障害が認められた。したがって、今回作製した持続的 GSH 低下マウスは、GSH 抱合で代謝される化学物質に対する感受性が高いことが示唆された。

以上の結果から、この持続的 GSH 低下マウスを毒性試験に用いることにより、GSH 抱合で解毒される薬物や求電子性で反応性の高い活性代謝物を代謝過程で生成する薬物による毒性を高感度に検出可能と考えられた。また、このような薬物により誘発される特異体質性障害の検出も可能となることが期待された。本モデルは GSH 抱合の補酵素である GSH が低下していることから、特定の GST 分子種に触媒される GSH 抱合活性のみならず、すべての GSH 抱合活性が非特異的に低下すると考えられる。したがって、特定の GST 分子種の欠損モデルに比べ、より汎用性が高い点が特に有用と思われる。

第4章 Rifampicin による CYP3A 誘導マーマセットの作製

第1章から第3章までは、薬物代謝酵素の欠損あるいは補酵素の枯渇による薬物代謝活性の低下モデルに着目した。これらのモデルでは、薬物あるいは薬物から生成する活性代謝物の消失の抑制により、毒性の高感度な検出が可能であることが示唆された。一方、薬物から活性代謝物への代謝が亢進したモデル動物も、薬物代謝酵素の欠損動物や薬物代謝活性の低下モデル動物と同様に、薬物による毒性がより低用量で発現することが考えられる。

こうしたいずれの場合も説明できる例が acetaminophen である。UGT1s の活性を欠損する Gunn ラットでは、Wistar ラットより低用量で acetaminophen による肝機能検査値の上昇が認められることが報告されている^{45, 46)}。また、第3章では、GSH の低下により acetaminophen による肝障害の顕著な増強が認められた。一方で、CYP2E あるいは CYP3A などの誘導剤前処置により、acetaminophen による肝障害が増強するとの報告もある⁸⁶⁻⁸⁹⁾。この毒性増強は、CYP の誘導により、acetaminophen から活性代謝物である *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine への代謝が亢進したためと考えられ、CYP の誘導モデルも、毒性試験への応用により毒性の高感度な検出や特異体質性薬物障害の検出に応用可能となることが推察される。

そこで第4章では、CYP 分子種のうち、ヒトでもっとも含量が多く⁹⁰⁾、50%以上の薬物の代謝に関与するとの報告もある^{22, 23)} CYP3A に着目し、CYP3A 誘導モデルの作製を試みた。実験動物としては、CYP3A の相同性がカニクイザル等の旧世界ザルに次いで高いことが報告されているコモンマーマセット (マーマセット)^{91, 92)} を選択し、CYP3A の誘導剤には抗結核薬である rifampicin を使用した。なお、本章では、マーマセットにおける CYP3A 誘導を非侵襲的に評価することを目的として、尿中の 6 β -OHF ならびに F の濃度を測定し、ヒトにおいて CYP3A 誘導の指標と報告されている尿中の 6 β -OHF と F の比 (6 β -OHF/F 比)⁹³⁻⁹⁵⁾ が、マーマセットでも同様の指標になり得るかについても併せ検討した。

第1節 マーモセットに対する rifampicin 投与による CYP3A 誘導

新世界ザルに分類されるマーモセットは、CYP3A を始めとする各種 CYP 分子種の相同性が旧世界ザルに次いでヒトに近いこと^{91, 92)}、成獣の大きさが 500 g 以下と小さく毒性試験実施時に必要となる被験物質が旧世界ザルに比べ少量で済むことなどから、今後毒性試験での利用が増えると予想される実験動物の1つである。第1節では、もっとも多くの薬物の代謝に関与する CYP3A^{22, 23)} の誘導モデルをマーモセットで作製することを目的として、ヒト⁹³⁾ および各種実験動物⁹⁶⁻⁹⁸⁾ で CYP3A を誘導することが知られる rifampicin をマーモセットに4日間反復経口投与し、CYP3A の誘導を検討した。

【実験方法】

実験動物

三共株式会社 安全性研究所生産の1-2歳齢の雄性コモンマーモセット計12例を使用した。

群構成、投与用量および投与方法

0, 10 および 20 mg/kg 投与群の計3群を設定し、各群4例構成とした。0.5% CMC (和光純薬工業株式会社) 水溶液で rifampicin (和光純薬工業株式会社) を懸濁し、胃カテーテルを用いて4日間反復経口投与した。なお、臨床では、rifampicin は1日に450-600 mg/body の投与用量でヒトに投与される。本試験の低用量群の投与用量は、臨床用量相当量である10 mg/kg と設定した。

一般状態、体重、肝臓重量および解剖

一般状態は、投与開始前より解剖日まで毎日1回以上個体別に観察した。体重は、投与開始前および解剖日に個体別に測定した。解剖日に0.5 mg/kg の ketamine hydrochloride (ケラタール50:三共株式会社) および0.1 mg/kg の xylazine (セラクター2%注射液:バイエル薬品株式会社) を同時に筋肉内投与し、マーモセットに麻酔を施した後、解剖した。その後、肝臓を摘出し絶対重量を測定した。また、その重量を体重で除し、相対重量を算出した。

肝薬物代謝酵素測定

全例の肝臓を用い、Ms および Cs を調製した。これらを用い、CYP 含量、ECD 活性、GST-C 活性、GST-D 活性および *p*-nitrophenol に対する UGT 活性を測定した。Ms および Cs の調製方法、ならびに CYP 含量、各活性およびタンパク質濃度の測定方法は、第2章 第1節に準じた。その他、7-methoxycoumarin および 7-propoxycoumarin の O-dealkylase 活性 (それぞれ、MCD 活性および PCD 活性) を、ECD 活性と同様に、Matsubara らの方法⁶¹⁾ に従い測定した。

CYP 分子種の Western blot 分析

各群 2 例の肝 Ms を Tris-SDS BME sample loading buffer (第一化学薬品株式会社) で希釈後, 7.5% の SDS-ポリアクリルアミドゲル (EASY-GEL II : フナコシ株式会社) に $6\mu\text{g}$ のタンパク質を負荷し, 電気泳動を行った. 泳動後, タンパク質をゲルから Immobilon PVDF Transfer Membrane (第一化学薬品株式会社) に転写した. 膜をブロッキング後, 一次抗体 (抗ラット CYP1A1 免疫ウサギ抗体, 抗ラット CYP2B1/2 免疫ウサギ抗体, 抗ラット CYP3A 免疫ウサギ抗体あるいは抗ラット CYP4A 免疫ヒツジ抗体:以上, アマシャムバイオサイエンス株式会社), 二次抗体 (biotin 標識抗ウサギ免疫ウマ抗体あるいは biotin 標識抗ヒツジ免疫ウマ抗体:アマシャムバイオサイエンス株式会社), streptavidin-horseradish peroxidase conjugate および ECL Western blotting detection reagent (以上, アマシャムバイオサイエンス株式会社) で処理し, フィルム (富士フィルム株式会社) に露光・現像した.

【実験結果】

体重および肝臓重量

体重ならびに肝臓の絶対重量および相対重量には, 対照群と rifampicin 投与群の間に有意な差は認められなかった.

肝薬物代謝酵素測定および CYP 分子種の Western blot 分析

肝薬物代謝酵素測定の結果を Fig. 24 に示す. CYP 含量が 10 および 20 mg/kg 投与群でいずれも対照群の 300% 以上に有意に増加した. また, CYP が触媒する MCD, ECD および PCD 活性のうち, MCD および ECD 活性が 20 mg/kg 投与群で 200% 前後に上昇した. また, PCD 活性は 10 および 20 mg/kg 投与群でいずれも 200% 以上に有意に上昇した. その他, GST-D 活性が 20 mg/kg 投与群で 200% 弱に有意に上昇したが, GST-C 活性および UGT 活性には有意な変化は認められなかった.

CYP 分子種の Western blot 分析の結果を Fig. 25 に示す. 抗ラット CYP3A 抗体と交叉するタンパク質が対照群と比較して 10 および 20 mg/kg 投与群で顕著に増加した. しかし, 抗ラット CYP1A1 抗体と交叉するタンパク質はほとんど検出されず, 抗ラット CYP2B1/2 抗体および抗ラット CYP4A 抗体と交叉するタンパク質には対照群と投与群でほとんど差が認められなかった.

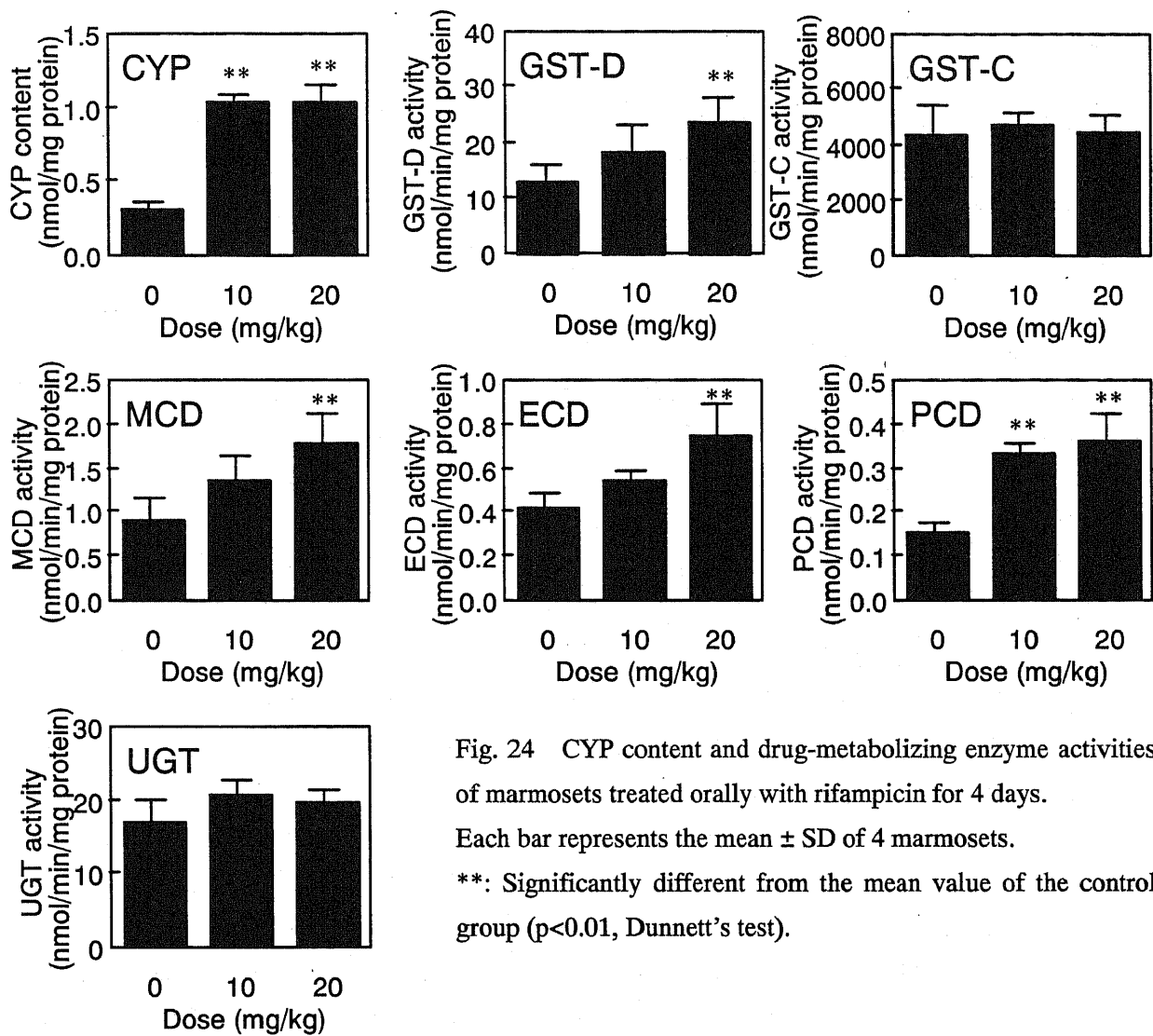


Fig. 24 CYP content and drug-metabolizing enzyme activities of marmosets treated orally with rifampicin for 4 days. Each bar represents the mean \pm SD of 4 marmosets. **: Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.01$, Dunnett's test).

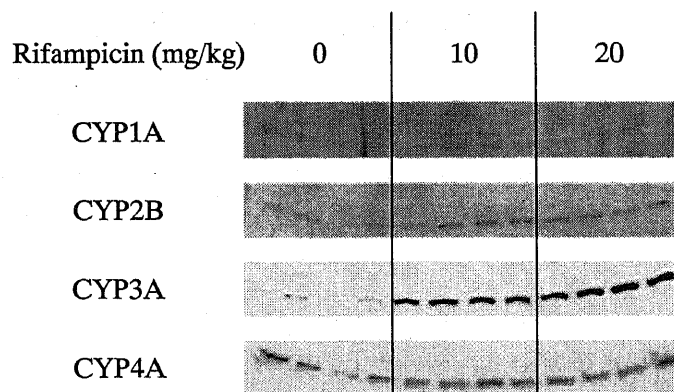


Fig. 25 Immunoblot analysis of liver microsomes from marmosets treated orally with rifampicin for 4 days.

【考察】

第1節では、ヒトでもっとも多く薬物の代謝に関与することが報告されている CYP3A の誘導モデルの作製を試みた。モデル作製に用いる実験動物には、CYP3A のヒトとの相同性が90%を超え、カニクイザルなどの旧世界ザルに次いで高いことが知られるマーモセット^{91, 92)}を用いた。このマーモセットに、ヒト⁹³⁾、ラット⁹⁶⁾、イヌ⁹⁷⁾ およびブタ⁹⁸⁾などで CYP3A を誘導することが報告されている rifampicin を4日間反復経口投与し、肝臓において CYP を含む各種薬物代謝酵素の発現あるいは活性を検討した。

その結果、肝臓重量の増加は認められなかったものの、CYP 含量ならびに CYP により触媒される MCD, ECD および PCD 活性が、10 および 20 mg/kg 投与群でいずれも有意な上昇あるいは上昇傾向を示した。CYP 分子種の Western blot 分析の結果、10 および 20 mg/kg 投与群のいずれにおいても CYP3A の特異的な誘導が認められた。したがって、マーモセットに rifampicin を投与すると、ヒトや他の動物種と同様に CYP3A の特異的かつ顕著な誘導が認められることが明らかとなった。

一方、その他の薬物代謝酵素では、GST-D 活性が 20 mg/kg 投与群で有意に上昇したことから、GST の誘導が示唆された。しかし、GST のほとんどの分子種で触媒される GST-C 活性には対照群と投与群で差がなかったことから、GST の誘導はごく軽度な誘導と判断した。*p*-nitrophenol に対する UGT 活性には、対照群と投与群で差がなかった。

以上の結果から、10 mg/kg の rifampicin 投与により、CYP3A が特異的に誘導されることが明らかとなった。また、20 mg/kg の rifampicin 投与では、CYP3A の他に GST の誘導も認められたが、その程度は軽度であると推察された。臨床では、rifampicin は1日に 450 – 600 mg/body (約 10 mg/kg) の投与用量でヒトに投与される。したがって、本試験では、臨床用量に相当する低用量の rifampicin をマーモセットに投与することにより、CYP3A の特異的誘導モデルを作製可能であることが明らかとなった。CYP3A は、ヒトで多くの薬物の代謝に関与すること^{22, 23)}、および幾つかの薬物の代謝的活性化に関与すること^{88, 99, 100)}が報告されていることから、本節で作製した CYP3A 誘導マーモセットを毒性試験に応用することにより、CYP3A の触媒で代謝的に活性化される薬物による毒性の高感度な検出が可能になることが期待される。なお、ヒトでは、CYP3A の誘導が尿中の 6 β -OHF/F 比を測定することにより予測可能であることが、rifampicin あるいは phenytoin 等を服用した患者の試料の検討結果から明らかとなっている⁹³⁻⁹⁵⁾。そこで、次節では、本試験で得られた尿中の 6 β -OHF および F を測定し、6 β -OHF/F 比がヒトと同様 CYP3A 誘導の指標となり得るかにつき検討した。

第2節 マーモセット尿中 6β-OHF/F 比と CYP3A 誘導の相関

前節では、マーモセットに臨床用量の rifampicin を4日間経口投与することにより、CYP3A の特異的な誘導モデルの作製が可能であることを示した。第2節では、CYP3A 誘導モデル作製時の CYP3A 誘導を、非侵襲的に評価することが可能か検討することを目的とし、前節で得られたマーモセット尿中の 6β-OHF および F を測定した。すなわち、ヒトで CYP3A 誘導の指標となることが報告されている 6β-OHF/F 比⁹³⁻⁹⁵⁾ をマーモセットで測定し、CYP3A 誘導との関連性について検討した。

【実験方法】

実験動物、群構成、投与用量、投与方法および採尿

前節の実験方法に記載した。尿は、投与開始前 6、3 日および Day 1 の投与前、Day 1 から Day 4 の投与後 24 hr に排泄されたものを採取した。

尿中 6β-OHF および F 濃度の測定

Lykkesfeldt らの方法¹⁰¹⁾ を一部改変して行った。すなわち、100 μL の尿に内部標準液 (2 μg/mL dexamethasone) 1 mL および蒸留水 9 mL を添加した後、methanol で活性化した固相カラム (Sep-pak plus C18 cartridge : 日本ウオーターズ株式会社) に 6β-OHF および F を吸着させた。固相カラムを 10 mL の蒸留水で洗浄後、5 mL の ethyl acetate/hexane (4/1, v/v) で 6β-OHF および F を溶出した。この溶出液を 2 mL の Na₂SO₄ 飽和 1 M NaOH 溶液および 2 mL の Na₂SO₄ 飽和 1% acetic acid 溶液で洗浄後、有機溶媒相を分取し、蒸発乾固した。得られた残渣を 250 μL の 20% ethanol で溶解後、80 μL を HPLC に注入し、尿中の 6β-OHF および F の濃度を定量した。HPLC 分析条件は以下に示す。

カラム : Nova-pak C18 (300 mm × 3.9 mm I.D. : 日本ウオーターズ株式会社)

カラム温度 : 30°C

波長 : UV 254 nm

サンプルクーラー温度 : 5°C

移動相 A : 10 mM acetic acid 含有 50 mM NaH₂PO₄

移動相 B : acetonitrile / 移動相 A (65 / 35, v/v)

グラジエント : time (0 min), 90 / 10 (移動相 A / 移動相 B)

time (20 min), 18 / 82 (移動相 A / 移動相 B)

time (22.5 min), 0 / 100 (移動相 A / 移動相 B)

time (27.5 min), 0 / 100 (移動相 A / 移動相 B)

time (30 min), 90 / 10 (移動相 A / 移動相 B)

CYP 発現量と尿中 6 β -OHF/F 比の相関

前節で実施した Western blot 分析で得られた抗ラット CYP 抗体と交叉するタンパク質の発現量をデンストメーター (Densitograph ver. 4.0 : ATTO 株式会社) で定量し, 尿中 6 β -OHF/F 比との相関を検討した. なお, 抗ラット CYP1A1 抗体と交叉するタンパク質については, ほとんど発現が認められなかったことから, 検討を行わなかった.

【実験結果】

尿中 6 β -OHF/F 比の経時的変化

マーモセット尿中 6 β -OHF および F 濃度, ならびに 6 β -OHF/F 比の個体別の経時変化を Table 17 に示す. 対照群の 6 β -OHF 濃度は 5.2 – 65.4 μ g/mL, F 濃度は 5.4 – 74.4 μ g/mL で, いずれも顕著な個体差ならびに同一個体内での日間変動が認められた. しかし, 同群の 6 β -OHF/F 比は 0.48 – 1.52 で, 個体差ならびに日間変動は 6 β -OHF および F 濃度に比べ軽度であった. 特に, 6 β -OHF/F 比には同一個体内での日間変動はほとんど認められなかった.

各群の尿中 6 β -OHF/F 比の経時的変化を Fig. 26 に示す. 上述の如く, 対照群では投与開始前から試験終了時までほぼ一定の値で推移した. 10 mg/kg 投与群では, Day 2 の投与後 24 hr 以降最終投与後 24hr まで対照群と比較して有意な高値が認められた. 20 mg/kg 投与群では, 10 mg/kg 投与群よりも 6 β -OHF/F 比の上昇は速やかで, Day 1 の投与後 24 hr より有意な高値が認められた. また, 投与期間を通じて, 20 mg/kg 投与群では 10 mg/kg 投与群より高値を示した. さらに, 両群とも投与日数の経過とともに値が上昇する傾向を示し, 最終投与後 24 hr の尿中 6 β -OHF/F 比は, 10 mg/kg 投与群で対照群の 4.7 倍, 20 mg/kg 投与群で同 5.3 倍に上昇した.

CYP 発現量と尿中 6 β -OHF/F 比の相関

CYP3A, CYP2B および CYP4A の発現量と尿中 6 β -OHF/F 比の相関図を Fig. 27 に示す. CYP3A の発現量と尿中 6 β -OHF/F 比の間には相関係数 0.906 のきわめて良好な相関が認められた. したがって, ヒトと同様にマーモセットでも尿中 6 β -OHF/F 比が CYP3A 誘導の指標となることが明らかとなった. 一方で, CYP2B および CYP4A と尿中 6 β -OHF/F 比の間にはまったく相関は認められなかった.

Table 17 Urinary 6 β -OHF and F concentrations, and 6 β -OHF/F ratios in marmosets treated orally with rifampicin for 4 days.

Dose (mg/kg)	Analyte	Animal No.	Experimental period (days)						
			-6	-3	1	2	3	4	5
0	6 β -OHF (μ g/mL)	1	21.9	12.6	12.8	21.1	20.4	12.5	11.4
		2	23.9	45.5	65.4	13.7	6.5	5.2	6.1
		3	15.9	8.0	14.4	6.9	30.7	12.4	10.7
		4	11.6	8.3	9.5	17.9	11.3	8.1	9.3
	F (μ g/mL)	1	31.4	22.5	19.9	31.3	27.2	19.6	18.4
		2	15.7	48.9	74.4	18.5	7.2	7.2	8.5
		3	12.7	8.1	11.3	5.4	26.9	11.4	9.3
		4	15.6	15.9	14.3	27.3	18.6	16.9	18.2
	6 β -OHF/F ratio	1	0.70	0.56	0.64	0.67	0.75	0.64	0.62
		2	1.52	0.93	0.88	0.74	0.90	0.72	0.72
		3	1.25	0.99	1.27	1.28	1.14	1.09	1.15
		4	0.74	0.52	0.66	0.66	0.61	0.48	0.51
10	6 β -OHF (μ g/mL)	5	27.3	13.0	18.4	44.8	65.1	32.0	36.5
		6	9.0	10.1	9.5	8.3	23.3	22.5	26.1
		7	10.2	8.7	8.7	11.4	15.2	11.1	31.3
		8	35.0	6.4	6.8	11.0	22.8	23.4	38.5
	F (μ g/mL)	5	27.4	22.8	29.3	38.6	22.2	11.6	9.7
		6	16.0	23.1	21.1	9.4	10.2	10.6	9.9
		7	14.7	14.4	14.8	10.3	5.6	3.8	9.7
		8	18.8	10.6	10.5	9.0	8.5	7.7	10.0
	6 β -OHF/F ratio	5	1.00	0.57	0.63	1.16	2.93	2.76	3.76
		6	0.56	0.44	0.45	0.88	2.28	2.12	2.64
		7	0.69	0.60	0.59	1.11	2.71	2.92	3.23
		8	1.85	0.60	0.65	1.22	2.68	3.04	3.85
20	6 β -OHF (μ g/mL)	9	14.2	8.6	16.5	12.1	29.1	26.8	56.5
		10	14.8	6.3	20.6	17.6	28.0	44.2	41.0
		11	16.2	8.2	18.3	12.2	42.0	53.5	75.2
		12	30.4	26.4	24.9	57.1	114.1	80.7	72.3
	F (μ g/mL)	9	17.9	12.2	19.7	8.6	10.3	11.2	13.7
		10	15.5	7.6	16.3	10.4	6.4	9.1	6.3
		11	21.8	12.1	26.5	8.0	13.7	14.3	16.6
		12	22.2	18.8	22.8	27.5	21.7	18.4	14.1
	6 β -OHF/F ratio	9	0.79	0.70	0.84	1.41	2.83	2.39	4.12
		10	0.95	0.83	1.26	1.69	4.38	4.86	6.51
		11	0.74	0.68	0.69	1.53	3.07	3.74	4.53
		12	1.37	1.40	1.09	2.08	5.26	4.39	5.13

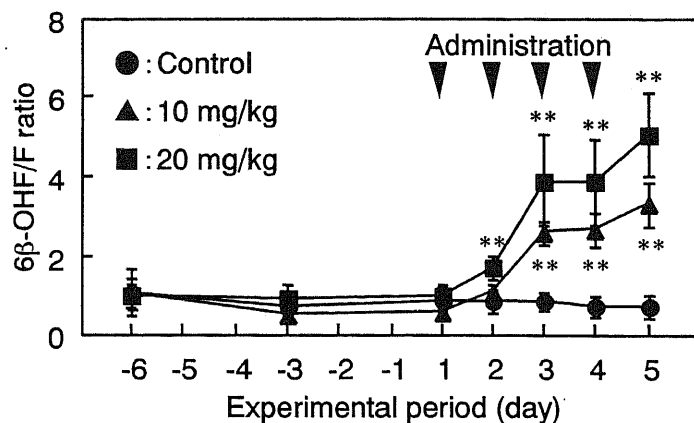


Fig. 26 Urinary 6 β -OHF/F ratios in marmosets treated orally with rifampicin for 4 days. Each symbol represents the mean \pm SD of 4 marmosets.

** : Significantly different from the mean value of the control group ($p < 0.01$, Dunnett's test).

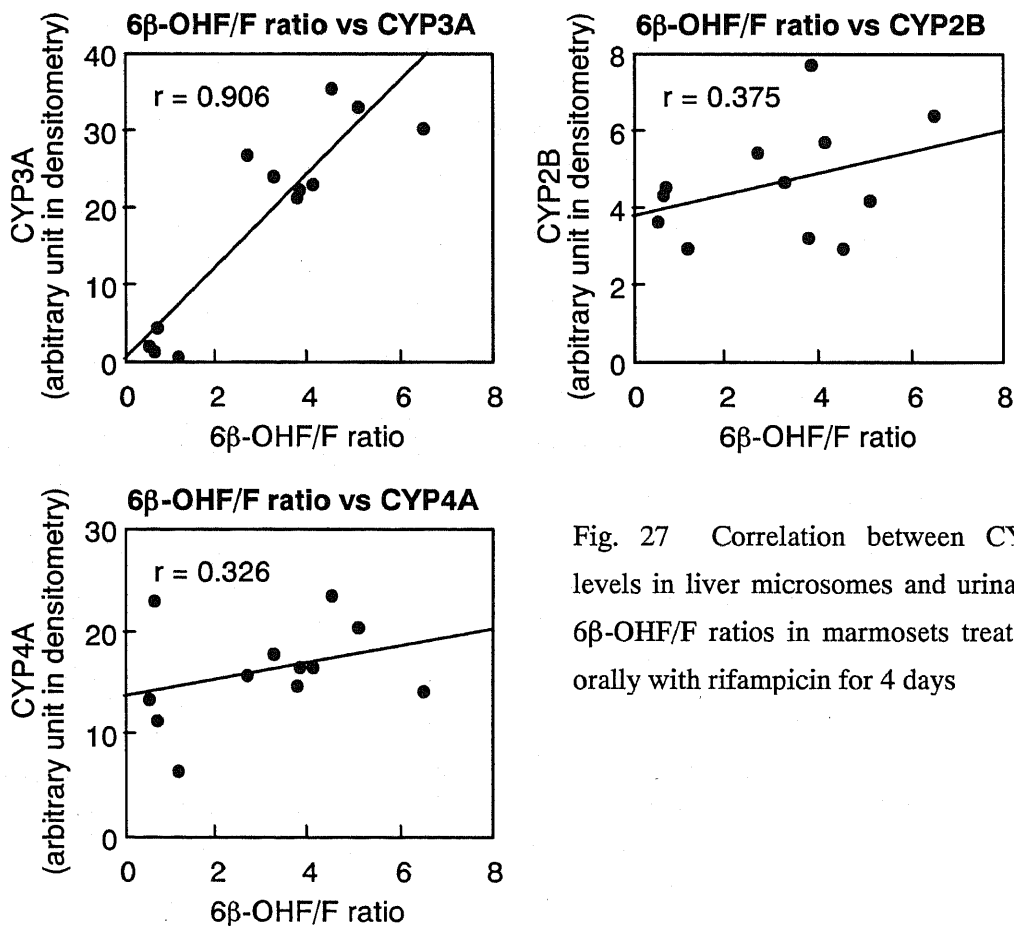


Fig. 27 Correlation between CYP levels in liver microsomes and urinary 6 β -OHF/F ratios in marmosets treated orally with rifampicin for 4 days

【考察】

本節では、前節で確立した rifampicin による CYP3A 誘導マーモセットから得られた尿を用い、ヒトで CYP3A 誘導の指標となることが知られる尿中 6 β -OHF/F 比⁹³⁻⁹⁵⁾が、マーモセットでも同様の指標となり得るかにつき検討した。その結果、マーモセットでもヒトとほぼ同様の分析方法で尿中 6 β -OHF および F の分析が可能なこと、および薬物非投与時の 6 β -OHF/F 比には同一個体内での日間変動が少ないことが明らかとなった。また、rifampicin 投与群では、投与日数の経過および投与用量の増加とともに 6 β -OHF/F 比が上昇した。解剖日の尿中 6 β -OHF/F 比と CYP2B, CYP3A および CYP4A の発現量との相関を検討したところ、CYP3A の発現量との間にのみ良好な相関が認められた。したがって、マーモセット尿中の 6 β -OHF/F 比は、ヒトのみならずマーモセットでも CYP3A 誘導の良好な指標になることが明らかとなった。本法の優れた点は、実験動物から非侵襲的に採取可能な尿を用い、投与前値との比較により CYP3A の *in vivo* での誘導を経時的に評価可能な点である。6 β -OHF/F 比を CYP3A 誘導モデル作製時に経時的に評価することにより、CYP3A 誘導を *in vivo* で非侵襲的に確認することが可能となることから、本法は確実に CYP3A の誘導されたマーモセットの作製に寄与すると思われる。また、本法により、新薬開発のリスクとなる CYP3A 誘導を簡便に評価可能となることから、この点でも有用と考えられた。

以上、本節では、マーモセット尿中 6 β -OHF/F 比が CYP3A 誘導の指標となることを実験動物で初めて明らかとした。CYP3A 誘導モデル作製時に 6 β -OHF/F 比を経時的に測定することにより、目的に応じて CYP3A 誘導の程度を見極めた上で毒性試験に利用することが可能になるとと思われる。

小 括

第4章では、活性代謝物への代謝が亢進したモデル動物に着目し、ヒトで50%以上の薬物の代謝に関与することが報告されているCYP3Aの誘導モデル作製を試みた。CYP3Aのヒトとの高い相同性から実験動物にはマーモセットを選択し、CYP3Aの誘導剤には、ヒトや多くの実験動物において低用量でCYP3Aを誘導することが知られるrifampicinを使用した。また、本モデル作製の過程で尿を採取し、ヒトにおけるCYP3A誘導の指標である尿中6 β -OHF/F比を検討した。その結果、以下の知見を得た。

- ・ 臨床用量に相当する10 mg/kgのrifampicinをマーモセットに4日間反復経口投与することにより、CYP3Aの特異的な誘導が認められた。
- ・ 20 mg/kgのrifampicin投与により、10 mg/kg投与で認められた以上の強いCYP3A誘導が認められたが、その他にGSTの軽度な誘導が認められたことから、CYP3A誘導の特異性は10 mg/kg投与時の方が高かった。
- ・ マーモセットでもヒトと同様に尿中の6 β -OHFおよびFの測定が可能であった。
- ・ 尿中6 β -OHF/F比は、対照群では投与期間を通じて一定した値を示した。また、rifampicin投与群では、投与日数の経過および投与用量の増加に伴い、尿中6 β -OHF/F比が上昇した。
- ・ 尿中6 β -OHF/F比とCYP3Aの発現量との間には、相関係数が0.9を超える非常に良好な相関が認められた。したがって、マーモセット尿中6 β -OHF/F比は、ヒトと同様*in vivo*におけるCYP3A誘導の指標となることが明らかとなった。

以上、臨床用量に相当する低用量のrifampicin投与により、CYP3Aの特異的誘導マーモセットを作製することができた。本モデルでは、投与用量によりCYP3Aの誘導の程度をコントロール可能で、かつ6 β -OHF/F比測定によりCYP3Aの誘導の程度をあらかじめ見極めた上で目的とする実験に使用可能である点が有用と推察された。ヒトではisoniazidによる肝障害の発症頻度がrifampicin投与患者で高いことが知られていることから^{30,31)}、今回作製したCYP3A誘導マーモセットを毒性試験に応用することにより、CYP3Aの触媒で代謝的に活性化される薬物による毒性の高感度な検出や特異体質性障害の検出が可能になることが期待される。

総括

医薬品の研究開発にあたって実施される *in vivo* 毒性試験には、一般に正常動物が用いられる。しかし、薬物を服用するヒトの多様性から、特異体質性薬物障害等、正常動物を用いた毒性試験での予測が困難な毒性が近年問題となっている。特異体質性薬物障害の発症原因の1つとして、薬物の代謝過程における活性代謝物の生成が考えられていることから、本研究では、薬物や薬物から生成する活性代謝物の解毒が低下したモデル動物、あるいは活性代謝物の生成が亢進したモデル動物に着目した。すなわち、こうした薬物代謝活性変動モデル動物が、特異体質性薬物障害を含む毒性の高感度な検出に応用可能であることを本研究で提案した。

第1章では、ヒトで多くの薬物のグルクロン酸抱合に関与する UGT1s の活性を欠損する Gunn ラットを長期毒性試験に応用した。第2章では、求電子性で反応性の高い活性代謝物の解毒に関与し、ヒトで多くの分子種に欠損多型が存在する GST に着目した。先天的な欠損動物の報告のなかった GST の欠損動物として、theta クラスの GST 分子種 Yd_fYd_f の発現が認められない low GST イヌを見出し、そのスクリーニング方法とともに示すことができた。さらに第3章では、より汎用性の高い GSH 抱合活性低下モデルである持続的 GSH 低下モデルの作製を試み、20 mM BSO の14日間飲水投与により、ほぼすべての組織で1日を通じ GSH が約50%以下に低下した持続的 GSH 低下マウスを作製することができた。第4章では、第1章から第3章までとは異なり、活性代謝物の生成亢進モデル作製を試みた。CYP 分子種のうち、もっとも多くの薬物の代謝に関与する CYP3A の特異的誘導モデルを、臨床用量に相当する 10 mg/kg の rifampicin をマーモセットに4日間経口投与することにより作製できた。

これら4種の実験動物を新薬開発時の毒性試験に必要な応じて利用することにより、正常動物を用いた毒性試験のみを実施した場合と比較し、高感度に毒性を検出することが可能になると考える。また、Fig. 28 に示す如く、正常動物を用いた毒性試験のみからは予測の困難な特異体質性薬物障害の一部も予測可能になることが期待される。

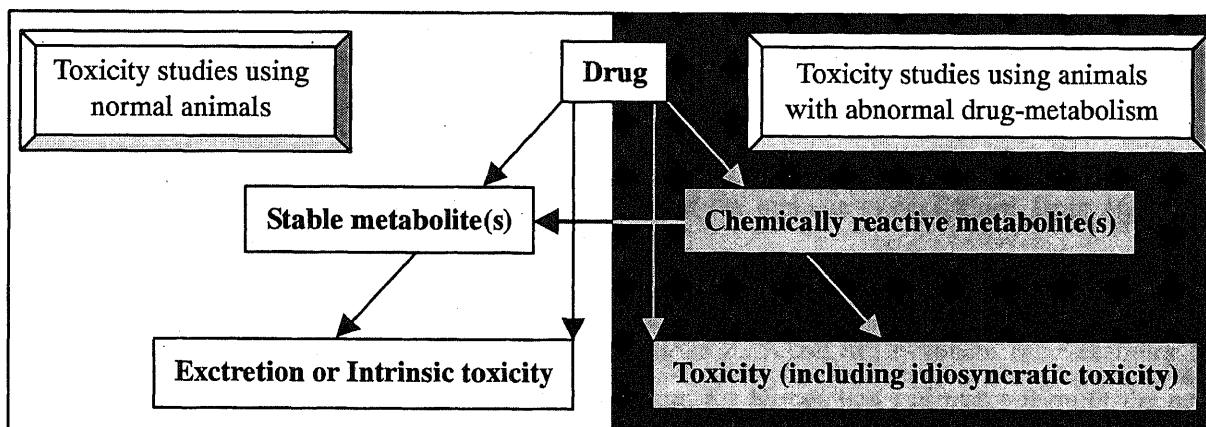


Fig. 28 Ideal *in vivo* toxicity studies using normal animals and animals with abnormal drug-metabolism.

謝 辞

本論文を終えるにあたり，御懇篤なる御指導を賜りました千葉大学 大学院 薬学研究院・堀江利治教授に深謝致します。

本研究の遂行に御支援，御配慮を賜りました三共株式会社・松沼尚史博士ならびに元 三共株式会社（現 科学技術研究所）・増田裕博士に厚く御礼申し上げますと共に，直接御指導下さいました三共株式会社・真鍋淳博士ならびに高崎渉博士に深く感謝致します。また，数々の貴重な御助言，御援助をいただきました元 三共株式会社（現 株式会社サイエンスインフォメーション）・平野光一博士ならびに三共株式会社・安田充也博士，高岡雅哉博士，矢本敬博士ならびに古川忠司博士に深く感謝致します。

さらに，本研究を進めるにあたり，御援助をいただきました三共株式会社・大橋芳彦氏ならびに戸塚繁夫氏に感謝すると共に，実験に御協力いただきました杉浦智美氏，田中美帆氏，柴谷由佳梨氏，荒川真悟氏，匂坂秀樹氏，田中宏治氏，社領聡氏，渡邊真弓氏，五十嵐功氏，小柳藤夫氏，寺田仁美氏，村松啓子氏，加藤かおり氏，中津川泰充氏，小澤み乃り氏ならびに大西和氏を始めとする三共株式会社・安全性研究所員の皆様に感謝の意を表します。

参考文献

1. 戸田剛太郎：インスリン抵抗性改善剤トログリタゾンによる肝障害. *内分泌・糖尿病科* **9**, 393-400 (1999)
2. 薬務公報：緊急安全性情報. 第 1752 号, No. 97-5, 平成 9 年 12 月
3. 蔵本築, 清水直容, 戸田剛太郎：トログリタゾン肝障害の臨床的検討. *臨床医薬* **14**, 461-466 (1999)
4. 渡辺稔之, 大橋芳彦, 安田充也, 高岡雅哉, 古川忠司, 矢本敬, 三分一所厚司, 真鍋淳：トログリタゾンの肝障害は非臨床安全性試験で予知できなかったか？－安全性の再評価－. *医薬品研究* **30**, 537-546 (1999)
5. Pirmohamed M., Madden S. and Park B.K.: Idiosyncratic drug reactions. Metabolic bioactivation as a pathogenic mechanism. *Clin. Pharmacokinet.* **31**, 215-230 (1996)
6. Uetrecht J.P.: New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the “danger hypothesis” and innate immune system. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 387-395 (1999)
7. Park B.K., Kitteringham N.R., Powell H. and Pirmohamed M.: Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**, 39-60 (2000)
8. Uetrecht J.P.: Is it possible to more accurately predict which drug candidates will cause idiosyncratic drug reactions? *Curr. Drug Metab.* **1**, 133-141 (2000)
9. Knowles S.R., Uetrecht J. and Shear N.H.: Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndromes. *Lancet* **356**, 1587-1591 (2000)
10. Ju C. and Uetrecht J.P.: Mechanism of idiosyncratic drug reactions: reactive metabolites, formation, protein binding and the regulation of the immune system. *Curr. Drug Metab.* **3**, 367-377 (2002)
11. Kawai K., Kawasaki-Tokui Y., Odaka T., Tsuruta F., Kazui M., Iwabuchi H., Nakamura T., Kinoshita T., Ikeda T., Komai T. and Nakamura K.: Disposition and metabolism of the new oral antidiabetic drug troglitazone in rats, mice and dogs. *Arzneimittelforschung* **47**, 356-368 (1997)

- 1 2. Smith M.T.: Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 679-687 (2003)
- 1 3. Watanabe I., Tomita A., Shimizu M., Sugawara M., Yasumo H., Koishi R., Takahashi T., Miyoshi K., Nakamura K., Izumi T., Matsushita Y., Furukawa H., Haruyama H. and Koga T.: A study to survey susceptible genetic factors responsible for troglitazone-associated hepatotoxicity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Pharmacol. Ther.* **73**, 435-455 (2003)
- 1 4. Gunn C.H.: Hereditary acholuric jaundice in a new mutant strain of rats. *J. Hered.* **29**, 137-139 (1938)
- 1 5. Roy Chowdhury J., Kondapalli R. and Roy Chowdhury N.: Gunn rat: a novel model for inherited deficiency of bilirubin glucuronidation. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **37**, 149-173 (1993)
- 1 6. Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.W. and Pearson W.R.: Hereditary differences in the expression of human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7293-7297 (1988)
- 1 7. Ali-Osman F., Akande O., Antoun G., Mao J.X. and Buolamwini J.: Molecular cloning, characterization and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 10004-10012 (1997)
- 1 8. Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B. and Taylor J.B.: Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* **300**, 271-276 (1994)
- 1 9. Griffith O.W. and Meister A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)*. *J. Biol. Chem.* **254**, 7558-7560 (1979)
- 2 0. Griffith O.W. and Meister A.: Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5606-5610 (1979)
- 2 1. Griffith O.W.: Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.* **257**,

13704-13712 (1982)

- 2 2. Guengerich F.P.: In vitro technologies for studying drug metabolism. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **24**, 521-533 (1996)
- 2 3. Smith D.A., Abel S.M., Hyland R. and Jones B.C.: Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica* **28**, 1095-1128 (1998)
- 2 4. Ahonen J., Olkkola K.T. and Neuvonen P.J.: Effect of route administration of fluconazole on the interaction between fluconazole and midazolam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **51**, 415-420 (1997)
- 2 5. Backman J.T., Olkkola K.T. and Neuvonen P.J.: Rifampin drastically reduces plasma concentrations of oral midazolam. *Int. J. Pharmacol. Ther.* **33**, 356-359 (1996)
- 2 6. Olkkola K.T. Aranko K., Luurila H., Hiller A., Saarnivaara L., Himberg J.J. and Neuvonen P.J.: A potentially hazardous interaction between midazolam and erythromycin in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **53**, 298-305 (1993)
- 2 7. Olkkola K.T. Backman J.F. and Neuvonen P.J.: Midazolam should be avoided in patients receiving the systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.* **55**, 481-485 (1994)
- 2 8. Wrighton S.A. and Ring B.J.: Inhibition of human CYP3A catalyzed 1'-hydroxy midazolam formation by ketoconazole, nifedipine, erythromycin, cimetidine, and nizatidine. *Pharm. Res.* **11**, 921-924 (1994)
- 2 9. Pelkonen O., Mäenpää J., Taavitsainen P., Rautio A. and Rautio H.: Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **12**, 1203-1253 (1998)
- 3 0. イソニアジド (INH) による重症型薬剤性肝炎の 1 例. *日本胸部臨床* **55**, 950-953 (1996)
- 3 1. Bass N.M. and Ockner R.K.: Drug-induced liver disease. *Hepatology; A text book of liver disease*. **2nd ed.** WB Saunders, Philadelphia, 754-791 (1990)
- 3 2. Sato H., Koiwai O., Tanabe K. and Kashiwamata S.: Isolation and sequencing of rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA: possible alternate splicing of a common primary transcript. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 260-264 (1990)

- 3 3. Sato H., Aono S., Kashiwamata S. and Koiwai O.: Genetic defect of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the hyperbilirubinemic Gunn rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 1161-1164 (1991)
- 3 4. Crigler F.J. and Najjar V.A.: Congenital familial non-hemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* **10**, 169-180 (1952)
- 3 5. Arias I.M., Gartner L.M., Cohen M., Ezzer J.B. and Levi A.J.: Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am. J. Med.* **47**, 395-409 (1969)
- 3 6. Owens I.S. and Ritter J.K.: The novel bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase UGT1 gene locus: implications for multiple non-hemolytic familial hyperbilirubinemia phenotypes. *Pharmacogenetics* **2**, 93-108 (1992)
- 3 7. Gilbert A. and Lereboullet P.: La cholemie simple familiale. *Sem. Med. Paris* **21**, 241-245 (1901)
- 3 8. Bosma P.J., Roy Chowdhury J., Bakker C., Gantla S., De Boer A., Ooatra B.A., Lindhout D., Tytgat G.N.J., Jansen P.L.M., Oude Elferink R.P.J. and Roy Chowdhury N.: The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *New Eng. J. Med.* **333**, 1171-1218 (1995)
- 3 9. Monaghan G., Ryan M.F., Seddon R., Hume R. and Burchell B.: Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet* **347**, 578-581 (1996)
- 4 0. 沢崎嘉男：黄疸ラット。 *生体の科学* **27**, 389-395 (1976)
- 4 1. 沢崎嘉男：遺伝性高ビリルビン血症 -Gunn ラットのビリルビンによる小脳発育障害-。 *神経研究の進歩* **23**, 992-1000 (1979)
- 4 2. Labrune P., Myara A., Trivin F. and Odievre M.: Gunn rats: a reproducible experimental model to compare the different methods of measurements of bilirubin serum concentration and to evaluate the risk of bilirubin encephalopathy. *Clin. Chim. Acta* **192**, 29-33 (1990)
- 4 3. Ostrow J.D., Pascolo L., Shapiro S.M. and Tiribelli C.: New concepts in bilirubin

- encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest.* **33**, 988-997 (2003)
- 4 4. Iyer L., King C.D., Whittington P.F., Green M.D., Roy S.K., Tephly T.R., Coffman B.L. and Ratain M.J.: Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J. Clin. Invest.* **101**, 847-854 (1998)
 - 4 5. de Morais S.M.F. and Wells P.G.: Deficiency in bilirubin UDP-glucuronyl transferase as a genetic determinant of acetaminophen toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**, 323-331 (1988)
 - 4 6. de Morais S.M.F. and Wells P.G.: Enhanced acetaminophen toxicity in rats with bilirubin glucuronyl transferase deficiency. *Hepatology* **10**, 163-167 (1989)
 - 4 7. Watanabe Y., Nakajima M. and Yokoi T.: Troglitazone glucuronidation in human liver and intestine microsomes: high catalytic activity of UGT1A8 and UGT1A10. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 1462-1469 (2002)
 - 4 8. Yoshigae Y., Konno K., Takasaki W. and Ikeda T.: Characterization of UDP-glucuronosyltransferases (UGTS) involved in the metabolism of troglitazone in rats and humans. *J. Toxicol. Sci.* **25**, 433-441 (2000)
 - 4 9. Morrow C.S. and Cowan K.H.: Glutathione S-transferases and drug resistance. *Cancer Cells* **2**, 15-22 (1990)
 - 5 0. Hayes J.D. and Pulford D.J.: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 445-600 (1995)
 - 5 1. Salinas A.E. and Wong M.G.: Glutathione S-transferases – A review. *Curr. Med. Chem.* **6**, 279-309 (1999)
 - 5 2. Pitot H.C. and Dragan Y.V.: Chemical carcinogens. *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons.* **6th ed.** Klassen C.D. Mc Graw Hill 241-319 (2001)
 - 5 3. Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G. and Monks T.J.: Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 135-160 (2000)
 - 5 4. Pirmohamed M., Kitteringham N.R. and Park K.B.: The role of active metabolites in drug

- toxicity. *Drug Safety* **11**, 114-144 (1994)
- 5 5. Pumford N.R. and Halmes N.C.: Protein targets of xenobiotic reactive intermediates. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 91-117 (1997)
 - 5 6. van Poppel G, de Vogel N., van Balderen P.J. and Kok F.J.: Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. *Carcinogenesis* **13**, 303-305 (1992)
 - 5 7. Stücker I., Hirvonen A., de Waziers I., Cabelguenne A., Mitrunen K., Cenee S., Koum-Besson E., Hemon D., Beaune P. and Lorient M.A.: Genetic polymorphism of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* **23**, 1475-1481 (2002)
 - 5 8. Petersen K.U.: From toxic precursors to safe drugs. Mechanisms and relevance of idiosyncratic drug reactions. *Arzneimittelforschung* **52**, 423-429 (2002)
 - 5 9. Omura T. and Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378 (1964)
 - 6 0. Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B.: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974)
 - 6 1. Matsubara T., Otsubo S., Yoshihara E. and Touchi A.: Biotransformation of coumarin derivatives (2). Oxidative metabolism of 7-alkoxycoumarin by microsomal enzymes and a simple assay procedure for 7-alkoxycoumarin O-dealkylase. *Jpn. J. Pharmacol.* **33**, 41-56 (1983)
 - 6 2. Bock K.W., Fröhling W., Remmer H. and Rexer B.: Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on substrate specificity of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **327**, 46-56 (1973)
 - 6 3. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
 - 6 4. Igarashi T., Nanba E., Sagami F., Tsukidate K., Fukuda T., Horie T., Satoh T. and Kitagawa H.: Dog liver glutathione S-transferase and its strong immunoreactivity with rat transferase-P(7-7). *Biochem. Pharmacol.* **37**, 4713-4718 (1988)

- 6 5. Igarashi T., Kohara A., Shikata Y., Sagami F., Sonoda J., Horie T. and Satoh T.: The unique feature of dog liver cytosolic glutathione S-transferases. An isozyme not retained on the affinity column has the highest activity toward 1,2-dichloro-4-nitrobenzene. *J. Biol. Chem.* **266**, 21709-21717 (1991)
- 6 6. Shen H.X., Tamai K., Satoh K., Hatayama I., Tsuchida S. and Sato K.: Modulation of class Pi glutathione transferase activity by sulfhydryl group modification. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**, 178-182 (1991)
- 6 7. Nair R.S., Johannsen F.R., Levinskas G.J. and Terrill J.B.: Subchronic inhalation toxicity of p-nitroaniline and p-nitrochlorobenzene in rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **6**, 618-627 (1986)
- 6 8. Nair R.S., Johannsen F.R., Levinskas G.J. and Terrill J.B.: Assessment of toxicity of o-nitrochlorobenzene in rats following a 4-week inhalation exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* **7**, 609-614 (1986)
- 6 9. Travlos G.S., Mahler J., Ragan, H.A., Chou B.J. and Bucher J.R.: Thirteen-week inhalation toxicity of 2- and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **30**, 75-92 (1996)
- 7 0. Hong S.K., Anestis D.K., Ball J.G., Valentovic M.A. and Rankin G.O.: In vitro nephrotoxicity induced by chloronitrobenzenes in renal cortical slices from Fischer 344 rats. *Toxicol. Lett.* **129**, 133-141 (2002)
- 7 1. Li Q., Minami M. and Inagaki H.: Acute and subchronic immunotoxicity of p-chloronitrobenzene in mice. I. Effect of natural killer, cytotoxic T-lymphocyte activities and mitogen-stimulated lymphocyte proliferation. *Toxicology* **127**, 223-232 (1998)
- 7 2. Li Q., Minami M., Hanaoka T. and Yamamura Y.: Acute immunotoxicity of p-chloronitrobenzene in mice: II. Effect of p-chloronitrobenzene on the immunophenotype of murine splenocytes determined by flow cytometry. *Toxicology* **137**, 35-45 (1999)
- 7 3. Miners J.O., Drew R. and Birkett D.J.: Mechanism of action of paracetamol protective agents in mice *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2995-3000 (1984)
- 7 4. Mizutani T., Nomura H., Nakanishi K. and Fujita S.: Hepatotoxicity of butylated hydroxytoluene and its analogs in mice depleted of hepatic glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **87**, 166-176 (1987)

- 7 5 . Mizutani T., Murakami M., Shirai M., Tanaka M. and Nakanishi, K.: Metabolism-dependent hepatotoxicity of methimazole in mice depleted of glutathione. *J. Appl. Toxicol.* **19**, 193-198 (1999)
- 7 6 . Boughattas N.A., Li X.M., Filipski J., Lemaigre G., Filipski E., Bouzouita K., Belhadj O. and Levi F.: Modulation of cisplatin chronotoxicity related to reduced glutathione in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **15**, 563-572 (1996)
- 7 7 . White B.P., Davies M.H. and Schnell R.C.: Circadian variations in hepatic glutathione content, γ -glutamylcysteine synthetase and γ -glutamyltransferase activities in mice. *Toxicol. Lett.* **35**, 217-223 (1987)
- 7 8 . Tunon M.J., Gonzalez P., Lopez P., Salido G.M. and Madrid J.A.: Circadian rhythms in glutathione and glutathione S-transferase activity of rat liver. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **100**, 83-87 (1992)
- 7 9 . Li X.M., Metzger G, Filipski E., Boughattas N., Lemaigre G., Hecquet B., Filipski J. and Levi F.: Pharmacologic modulation of reduced glutathione circadian rhythms with buthionine sulfoximine: relationship with cisplatin toxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**, 281-290 (1997)
- 8 0 . Pileblad E. and Magnusson T.: Marked reduction of rat brain glutathione following intracerebroventricular administration of the glutathione synthesis inhibitor L-buthionine sulfoximine. *Neurosci. Lett.* **95**, 302-306 (1988)
- 8 1 . Neuschwander-Tetri B.A. and Rozin T.: Diurnal variability of cysteine and glutathione content in the pancreas and liver of the mouse. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **114**, 91-95 (1996)
- 8 2 . Drew R. and Miners J.O.: The effects of buthionine sulfoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2989-2994 (1984)
- 8 3 . Jaeschke H. and Wendel A.: Diurnal fluctuation and pharmacological alteration of mouse organ glutathione content. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1029-1033 (1985)
- 8 4 . Dahlin D.C., Miwa G.T., Lu A.Y.H. and Nelson S.D.: *N*-acetyl-*p*-benzoquinone: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1327-1331 (1984)

- 8 5. Moldeus P., Andersson B., Rahimtula A. and Berggren M.: Prostaglandin synthetase catalyzed activation of paracetamol. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 1363-1368 (1982)
- 8 6. Nelson S.D.: Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin. Liver Dis.* **10**, 267-278 (1990)
- 8 7. Zimmerman H.J. and Maddrey W.C.: Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure. *Hepatology* **22**, 767-773 (1995)
- 8 8. Kostrubsky V.E., Szakacs J., Jeffery E.H., Wood S.G., Bement W.J., Wrighton S.A., Sinclair P.R. and Sinclair J.F.: Role of CYP3A in ethanol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**, 315-323 (1997)
- 8 9. Sinclair J., Jeffery E., Wrighton S., Kostrubsky V., Szakacs J., Wood S. and Sinclair P.: Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity. Role of CYP2E and CYP3A. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1557-1565 (1998)
- 9 0. Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y. and Guengerich F.P.: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 414-423 (1994)
- 9 1. Igarashi T., Sakuma T., Isogai M., Nagata R. and Kamataki T.: Marmoset liver cytochrome P450s: Study for expression and molecular cloning of their cDNAs. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**, 85-91 (1997)
- 9 2. 鎌滝哲也, 佐久間勉: 薬物代謝における動物種差 -チトクローム P450 を中心として-. *ファルマシア* **33**, 29-33 (1997)
- 9 3. Ged C., Rouillon J.M., Pichard L., Combalbert J., Bressot N., Bories P., Michel H., Beaune P. and Maurel P.: The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III_A induction. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **28**, 373-387 (1989)
- 9 4. Fleishaker J.C., Pearson L.K. and Peters G.R.: Phenytoin causes a rapid increase in 6 β -hydroxycortisol urinary excretion in humans. -A putative measure of CYP3A induction. *J. Pharm. Sci.* **84**, 292-294 (1995)

- 9 5. Pichard-Garcia L., Hyland R., Baulieu J., Fabre J.M., Milton A. and Maurel P.: Human hepatocytes in primary culture predict lack of cytochrome P-450 3A4 induction by eletriptan in vivo. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 51-57 (2000)
- 9 6. Oesch F., Arand M., Benedetti M.S., Castelli M.G. and Dostert P.: Inducing properties of rifampicin and rifabutin for selected enzyme activities of the cytochrome P-450 and UDP-glucuronosyltransferase superfamilies in female rat liver. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 1111-1119 (1996)
- 9 7. Eguchi K., Nishibe Y., Baba T. and Ohno K.: Quantitation of cytochrome P450 enzymes (CYP1A1/2, 2B11, 2C21 and 3A12) in dog liver microsomes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Xenobiotica* **26**, 755-763 (1996)
- 9 8. van den Broek J., ten Wolde-Kraamwinkel H.C., Kleinbloesem C.H. and Breimer D.D.: Effect of rifampicin treatment on in vitro drug-metabolizing activities in the pig. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 325-327 (1984)
- 9 9. Shou M., Korzekwa K.R., Brooks E.N., Krausz K.W., Gonzalez F.J. and Gelboin H.: Role of human hepatic cytochrome P450 1A2 and 3A4 in the metabolic activation of estrone. *Carcinogenesis* **18**, 207-214 (1997)
- 1 0 0. Shen S., Marchick M.R., Davis M.R., Doss G.A. and Pohl L.R.: Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 214-222 (1999)
- 1 0 1. Lykkesfeldt J., Loft S. and Poulsen H.E.: Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 β -hydroxycortisol by high-performance liquid chromatography to measure human CYP3A activity. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **660**, 23-29 (1994)

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Watanabe T., Furukawa T., Sharyo S., Ohashi Y., Yasuda M., Takaoka M. and Manabe S.: Effect of troglitazone on the liver of a Gunn rat model of genetic enzyme polymorphism. *J. Toxicol. Sci.* **25**, 423-431 (2000)
2. Watanabe T., Sugiura T., Manabe S., Takasaki W. and Ohashi Y.: Low glutathione S-transferase dogs. *Arch. Toxicol.* in press.
3. Watanabe T., Sagisaka H., Arakawa S., Shibaya Y., Watanabe M., Igarashi I., Tanaka K., Totsuka S., Takasaki W. and Manabe S.: A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J. Toxicol. Sci.* **28**, 455-469 (2003)
4. Totsuka S., Watanabe T., Koyanagi F., Tanaka K., Yasuda M. and Manabe S.: Increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol in common marmosets as a marker of hepatic CYP3A induction. *Arch. Toxicol.* **73**, 203-207 (1999)

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院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（薬学研究院）	薬学博士	堀江利治
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	医学博士	上田志朗
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	北田光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	鈴木和夫
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	山本恵司