

## 論文の内容の要旨

論文題目      ラットにおける肝チトクローム P450 活性の日周リズムに関する研究

氏 名      古 川 忠 司

ヒトを含めた種々の動物において、薬物の効力や毒性における日周リズムの存在が知られている。その薬効や毒性のリズムを規定するものとしては、薬物の吸収、分布、代謝、排泄といった体内動態に影響を及ぼす諸要因の変動や、作用部位の薬物に対する感受性の変動などが想定されるが、その中でも種々の外的・内的因子による影響を受けやすい薬物の代謝速度が、これらの日周リズムを規定する最も重要な要因と考えられる。肝臓における薬物代謝で中心的な役割を果たしているのはチトクローム P450（以下、P450）による酸化反応であり、このことから、肝臓の P450 活性における日周リズムの存在を明確にすることは、薬物の効力や毒性における日周リズムの成立要因を考察する上で極めて重要である。この肝臓の P450 活性には日周リズムが認められることが、これまでもいくつか報告されている。しかしながら、P450 には非常に多くの分子種が存在するため、P450 活性の日周リズムに関する情報はまだ充分とは言い難い。加えて、P450 活性の日周リズムの成立要因について検討した報告は少なく、いまだ不明の点が多い。そこで本研究では、P450 の幅広い基質となりえる 7-alkoxycoumarin の O-脱アルキル化 (ACD) 活性を指標とした時の P450 活性における日周リズムを確認し、その ACD 活性を指標として P450 活性の日周リズムの成立要因について検討を行った。

## 1. 雄性ラットにおける肝チトクローム P450 活性の日周リズム

肝臓の代謝酵素活性を調べる実験では、ラットの雄が比較的良好に用いられている。そこで本検討でも、ラットの雄を用いて飽食条件下あるいは非給餌条件下における肝 ACD 活性および P450 含量の日周リズムを調べた。肝臓の採材は、4 時間間隔となるように、13L11D (6:00-19:00 点灯) 条件下における明期の 9:00, 13:00, 17:00 および暗期の 21:00, 1:00, 5:00 に相当する時刻に肝臓を採材した。非給餌群については、採材開始時刻である明期の 9:00 に相当する時刻よりそれぞれの動物の肝臓摘出時まで、給餌を中止した。摘出した肝臓より microsome を作製し、ACD 活性および P450 含量を測定した。ACD 活性は、7-methoxycoumarin, 7-ethoxycoumarin, および 7-propoxycoumarin の 3 つの基質 (それぞれ MCD, ECD および PCD 活性) を用いて調べた。また、飽食条件下のラットについては雄で発現量の多いことが知られている CYP2C11 および CYP3A2 の Western blot 分析を、明期 (13:00) および暗期 (1:00) に相当する microsome を用いて実施した。

その結果、飽食条件下では MCD, ECD および PCD 活性のいずれにおいても暗期に高く明期に低い明瞭な日周リズムが認められた。そしてこれらの結果は、他の基質によって調べられた既報の肝 P450 活性の結果と一致したものであった。これらの結果より、P450 活性は多くの分子種において日周リズムを呈することが示唆された。また、P450 含量にはほとんど変動が認められず、CYP2C11 および CYP3A2 の Western blot 分析においても、特異的バンドに明期と暗期とで明確な差が認められなかった。このことから、ACD 活性の変動は P450 の量的変動には起因しない可能性が推察された。さらに ACD 活性における日周リズムは非給餌条件下においても認められ、このリズムは餌という外来因子の影響を受けないことが明らかとなった。

## 2. 肝チトクローム P450 活性における日周リズムの成立要因に関する検討

本検討では、雄性ラットで認められた肝 P450 活性の日周リズムを成立させている生体内因子について調べることを目的として、概日リズムの発振源が存在する視交叉上核 (SCN) を破壊したラットにおける ACD 活性の日周リズムを調べた。SCN の破壊位置は、頭蓋骨のプレグマより尾側へ 2.2 mm, 左右 0.5 mm, 深さ 8.6 mm とした。また、SCN の破壊位置よりも 6.0 mm 上方 (脳梁および/あるいは大脳皮質) を破壊したラットを擬手術群とした。13L11D (6:00-19:00 点灯) の動物室で飼育した SCN 破壊ラットおよび擬手術ラットから先の検討と同様に 4 時間間隔で肝臓を採取して 3 つの基質の ACD 活性を調べた結果、SCN 破壊ラットでは、通常の LD 条件下で飼

育しているのにも関わらず肝臓の各 ACD 活性の日周リズムは完全に消失した。擬手術ラットでは、ECD 活性には日周リズムが認められなかったものの、MCD および PCD 活性には暗期に有意な高値となる日周リズムが認められた。このことから、ラットにおける肝 ACD 活性の日周リズムは、単に明暗交代といった外部環境の変化に由来したものではなく、SCN の支配下にある概日性リズムであることが示唆された。

そこで次に、SCN の時刻情報がどのような要因によって肝臓へと伝えられているのかを調べるために、副腎を摘出したラットより 4 時間間隔で肝臓を採取して ACD 活性の推移を調べた。その結果、副腎摘出ラットにおいても肝 ACD 活性には暗期に有意な高値となる明瞭な日周リズムが認められた。

以上の結果より、ラットの肝臓における P450 活性の日周リズムは、計時機構の存在する SCN の支配下にあるものの、それは副腎由来ホルモン、特に明瞭な概日リズムを示す血中コルチコステロン濃度といった要因によって制御されているのではないことが判明した。

### 3. 肝チトクローム P450 活性の日周リズムにおける性差に関する検討

本検討では、肝 ACD 活性の日周リズムにおける性差の有無に着目して雌性ラットにおける肝 ACD 活性の日周リズムを調べ、雄性ラットの結果と比較した。13L11D (6:00-19:00 点灯) の動物室で飼育した雌性ラットから、上述の方法と同様、9:00 より 4 時間間隔で経時的に肝臓を摘出し、ACD 活性測定した。なお、性周期が代謝酵素活性に影響を及ぼす可能性も考慮し、発情前期および発情後期の動物から肝臓を採材して測定値を性周期のステージ別に集計し、評価した。また、肝 P450 活性の指標に用いられている hexobarbital を明期および暗期にラットへ単回投与し、sleeping time および薬物の血漿中濃度推移における日周リズムの雌雄差についても確認した。その結果、雌性ラットの肝 ACD 活性は発情前期および発情後期のいずれにおいても雄性ラットで認められたような明瞭な変動は認められず、この活性の日周リズムには性差の存在することが明らかとなった。また、雌性ラットにおける肝 ACD 活性の推移は発情前期と発情後期とでほぼ同様であったことから、P450 活性は性周期の影響をあまり受けないものと考えられた。Hexobarbital の sleeping time およびその血漿中濃度推移は、雄ではともに暗期に低値となる明瞭な明暗差を示したのに対し、雌では明瞭な明暗差は認められず、ACD 活性と一致した結果が得られた。

P450 活性における性差の成立には、成長ホルモン (GH) の分泌パターンの雌雄による違いが関与していることが知られている。そこで、次の検討として、P450 活性の日周リズムにおける

雌雄差の成立にも GH の分泌パターンの性差が関与しているか否かについて調べた。下垂体を摘出した雄性ラットに GH の雄型投与(明期に 2 回皮下投与)あるいは雌型投与(浸透圧ポンプによる持続注入)を 1 週間行い、これらの動物の ACD 活性および P450 含量を明期(13:00)および暗期(1:00)に測定した。これらの測定値の明暗差を、擬手術ラットの雌雄における明暗差と比較した。その結果、GH の雄型投与を施した下垂体摘出ラットにおける肝 ACD 活性は明瞭な明暗差を示し、擬手術ラットの雄の結果と類似した。しかしながら、GH の雌型投与を施した下垂体摘出ラットにおける肝 ACD 活性では明暗差は全く認められず、擬手術ラットの雌の結果と類似した。したがって、ラットの肝 P450 活性の日周リズムに認められる性差には、成長ホルモンの分泌パターンにおける性差が強く関与していることが示唆された。

以上、本研究では、P450 の幅広い基質となりえる ACD 活性を指標としてラットの肝 P450 活性を測定し、雄ではその活性値に明瞭な日周リズムが認められるが、雌ではその変動が明瞭でないことを明らかにした。また、P450 含量および雄で測定した CYP2C11 と CYP3A2 にはほとんど変動が認められなかったことから、ACD 活性の変動は P450 の量的変動には起因しない可能性が推察された。さらに、その P450 活性の日周リズムの成立要因を主として生理学的な観点から検討した結果、SCN の発振する時間情報が GH の日周変動を伴うパルス状分泌を経由して肝臓へと伝えられ P450 活性の日周リズムを形成するということが、および雌性ラットでは GH の分泌が雄性ラットの様なパルス状ではないために P450 活性の明瞭な日周リズムが形成されないという概念を提唱するに至った。成長ホルモンの分泌は、ヒトでも律動性が認められ、さらにラットの場合と同様、入眠時に血漿中成長ホルモン濃度が増加することが報告されている。したがって、ヒトで認められる薬物の効力や毒性の日周リズムのいくつかは、ラットの雄の場合と同様、成長ホルモンの分泌パターンに基づいた肝臓の薬物代謝酵素活性の日周リズムに由来したものである可能性が推察される。