

## 論文の内容の要旨

論文題目 薬物誘発性障害に対する耐性発現に関する研究

氏名 田中 宏治

新薬開発のために実施される毒性試験は、候補物質の決められた投与用量を一定期間にわたって実験動物に投与して行われる。このような毒性試験において、投与期間の初期に惹起された障害が、同投与量の投与を継続しても増悪することなく、むしろ軽減し、投与期間終了後の検査時で障害が検出されないことがある。これは投与初期には標的器官に対して毒性量であった投与用量が反復投与の結果無毒性量になったこと、換言すれば、その化学物質の毒性に対して生体あるいは標的器官の反応性が減少したことを示している。これまで薬理作用における耐性発現の研究は数多くなされてきたが、毒性の耐性に関する研究はほとんど見当たらない。本研究では、このような化学物質の連続的な曝露により、毒性発現の反応性が減少する「耐性」について検討した。第1章では、毒性発現の標的器官となることが多い肝臓に注目した。肝毒性物質であるブロモベンゼン (BB) の毒性量をラットに反復投与して、BB の肝障害に対する耐性の発現について検討を行った。一方、反復投与による耐性の発現は、肝障害に特異的な事象ではなく、その他の器官/組織の障害においても経験することがある。そこで第2章では、臨床において幅広く使用されているスタチンと同様な薬理作用の HMG-CoA 還元酵素阻害活性を有する 8-オキシムデカリン誘導体により惹起される骨格筋障害に対する耐性の発現について検討した。

## 1. BB誘発肝障害に対する耐性発現

F344 ラット（雄，7週齢）にコーンオイルに懸濁した BB を 150 mg/kg の投与量で単回投与した。投与 20 時間後に aspartate aminotransferase (AST) を測定し，AST の上昇 (100 U/L 以上) が認められた動物 (I 群)，および AST に著変が認められなかった (100 U/L 未満) 動物 (II 群) に群分けした。これらの動物の一部 (n=5) は，群分け後解剖し，残りのラットには同用量の投与を合計 9 日間行った。その結果，群分け時に対照群比約 3 倍の高値であった I 群の AST は低下し，投与 9 日目では AST および alanine aminotransferase (ALT) とも正常レベルであった。病理学的には，投与 1 日目で肝細胞の変性/壊死が観察されたが，投与 9 日目では変性/壊死は観察されなかった。これらのことから，初回投与により肝障害が惹起された I 群は BB の反復投与により肝障害に対して耐性を発現したと考えた。一方，BB の初回投与により肝障害が検出されなかった II 群については，BB の反復投与により，耐性を発現しているか否かは不明であった。

次に II 群のラットが反復投与により耐性を発現しているかを検討するため，上記の実験条件を施したラットに続けて，2 倍量に相当する 300 mg/kg の BB を対照群，I 群および II 群のラットに単回腹腔内投与した。その結果，対照群（溶媒+300 mg/kg の BB）と比較して，肝障害は明らかに抑制されていることが明らかになった。この結果から，BB の単回投与による初期障害の発現の有無に関わらず，BB の反復投与により耐性が発現すると考えられた。

次に耐性の機序について検討した。肝薬物代謝酵素をタンパクレベルで測定したところ，第 I 相反応の肝チトクローム P450 (CYP) の低下，および第 II 相反応のグルタチオン抱合能の亢進が投与 4 日目から認められた。第 II 相反応の亢進は，投与 9 日目でも観察された。マイクロアレイ解析を行ったところ，CYP の抑制およびグルタチオン S-トランスフェラーゼをはじめとするグルタチオン抱合・代謝の亢進を示唆する所見が遺伝子発現レベルでも観察された。BB の代謝に関わる他の第 II 相反応であるエポキシドヒドラーゼおよび NAD(P)H:quinone oxidoreductase を介した加水分解の亢進も明らかになった。さらに，薬物排泄トランスポーターのひとつである Mrp3 (abcc3) の mRNA レベルの増加が検出され，従来の第 I 相 (CYP)，第 II 相 (抱合) に加え第 III 相 (排泄) 反応も耐性に関与していることが示唆された。

以上のことから、本実験で認められた BB の肝障害に対する耐性は、BB 誘発障害の標的器官である肝臓において、BB の肝毒性を無毒化する方向に機能が変化したことによる能動的な耐性であり、BB の肝毒性に対して発現した特異的な耐性と考えた。

## 2. HMG-CoA還元酵素阻害作用を有する 8-オキシムデカリン誘導体誘発骨格筋障害に対する耐性発現

高脂血漿治療剤である HMG-CoA 還元酵素阻害剤（いわゆるスタチン）は、臨床において広く用いられており、忍容性の高い薬剤である。しかしながら、副作用の一つとして筋障害が稀な頻度で発生することが報告されている。第 2 章では、HMG-CoA 還元酵素阻害作用を有する 8-オキシムデカリン誘導体（8-ODD）が骨格筋障害を惹起するか、そして惹起される骨格筋障害に対して 8-ODD を反復投与することにより耐性が認められるかを検討した。

8-ODD を 0.12% の濃度で混じた餌（約 100 mg/kg に相当）をラットに 56 日間自由に摂取させた。対照群には通常の餌を与えた。その結果、投与 8 日から投与 15 日にかけて、投与群に体重増加の抑制が認められたが、投与 15 日目以降は抑制傾向は認められなかった。骨格筋障害の指標となるクレアチン・キナーゼ（CK）を経時的に測定したところ、著明な CK の上昇が投与 10 日目から観察され、投与 12 日目では対照群と比して約 30 倍の高値であった。病理組織学的に重度の筋線維の壊死が観察され、化合物 A の投与による骨格筋障害が認められた。しかしながら、同投与を継続したところ、CK 値は減少し、投与 19 日以降 CK 値は正常値に復帰した。投与 56 日目の骨格筋組織に病理組織学的な異常は検出されなかった。すなわち、8-ODD の反復投与により骨格筋障害に対して耐性を発現したと考えた。8-ODD および活性体である M1 の曝露量を調べたところ、骨格筋障害前（CK 上昇前）と耐性発現期（CK 正常）において、曝露量に著しい差は認められなかった。以上のことから、本実験で認められた骨格筋障害に対する耐性は、曝露量が低下したことによる受動的な耐性ではなく、障害に対して何らかの抵抗因子に起因した能動的な耐性であると考えた。

次に耐性の機序を明らかにするため、耐性を発現する骨格筋のマイクロアレイ解析を実施した。対照群と比較したところ、CK 値の変化から耐性を発現したと考えられる投与 42

日および 56 日目ともに, inhibitor for nuclear factor- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) の mRNA レベルが対照群比約 2 倍の有意な増加を示した。さらに投与 56 日目においては CCAAT/enhancer-binding protein delta の発現増加(約 1.5 倍) および cAMP-response element-binding protein /p300 の低下(約 0.6 倍) が観察された。これらのことは, 骨格筋障害に対して耐性を発現する骨格筋では, NF- $\kappa$ B 依存性転写活性が抑制されていることを示唆する。以上のことから, 化合物 A の骨格筋障害に対する耐性は, 8-ODD および M1 の曝露減少に起因したものではなく, 抵抗因子の発現に起因した能動的な耐性であることが明らかになった。その原因としては, NF- $\kappa$ B 依存性転写活性の抑制が寄与している可能性が示唆された。しかしながら, NF- $\kappa$ B 依存性転写活性の抑制は, 他の骨格筋障害でも防護的な作用を示すことから, HMG-CoA 還元酵素阻害作用に関連した骨格筋障害に特異的な耐性発現に関与するかどうかは断定できない。

以上, 本論文において化学物質に誘発される毒性がその投与を継続しても増強されず, むしろ軽減するという耐性の機序の存在を明らかにした。筆者が示した BB 誘発肝障害および化合物 A 誘発骨格筋障害に対する耐性は, 他の要因により標的器官/組織が曝露される toxicant 量の減少した結果である受身的な耐性ではなく, 標的器官/組織が障害に対して抵抗因子を発現することによる能動的な耐性であった。さらに能動的な耐性は, 毒性機序に対して特異的な耐性と非特異的な耐性に分類される可能性が示唆された。