

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 18 年度博士課程 入学

氏 名 牧野 俊彦

指導教員名 中山 裕之

論文題目 第Ⅱ相酵素誘導剤投与による肝臓への影響に関する病理学的研究

肝臓は薬物代謝の主要臓器であり、体内での薬物動態に大きな影響を及ぼす。また、消化管から吸収された薬物はまず肝臓へ運ばれるため、肝臓での薬物濃度は高く、毒性の標的臓器になりやすいことから、化合物の毒性を評価する上で重要な臓器である。肝臓の薬物代謝酵素は、チトクローム P450 などの第Ⅰ相酵素と glutathione *S*-transferase (GST)、UDP-glucuronosyltransferase (UDP-GT) などの第Ⅱ相酵素に分けられる。第Ⅰ相酵素は化合物を水酸化、エポキシ化、脱アルキル化、酸化あるいは還元したり、官能基を導入したりして化合物の水溶性を高める働きをする。第Ⅱ相酵素は硫酸抱合、グルクロン酸抱合などの抱合反応である。化合物は第Ⅰ相酵素で代謝され、続いて第Ⅱ相酵素で代謝後体外へ排泄される。多くの化合物でこれらの薬物代謝酵素が誘導され、肝細胞肥大が惹起されることが良く知られている。

これまで肝臓を毒性の標的臓器とした研究や薬物代謝酵素に関する研究は数多くあり、一般的にもその知見は広く知られている。しかし、肝薬物代謝酵素誘導にかんする研究の多くは第Ⅰ相酵素、あるいは第Ⅰ相と第Ⅱ相の酵素を両方誘導する化合物についてなされたものであり、第Ⅱ相酵素のみを誘導する化合物を投

与した際の肝臓の変化についてはほとんど報告がない。第 I 相酵素を誘導する化合物については、これまでの知見に基づき、ヒトに対する適切なリスクアセスメントが可能である。しかし、第 II 相酵素誘導については、未だ知識の蓄積が十分とは言えず、ヒトに対するリスクアセスメントが困難な場合も多い。したがって、第 II 相酵素のみが誘導された場合の肝臓の変化を詳細に調べることは非常に有意義であると考えられる。

そこで、第 II 相酵素のみを誘導する化合物として butylated hydroxyanisole (BHA) および 1,2-bis(2-pyridyl)ethylene (2PY-e) の 2 剤を用い、また、第 I 相と第 II 相酵素の両方を誘導する化合物として phenobarbital (PB) を用いて、肝臓への影響を評価する目的で研究を行った。これらの薬剤を 11 週齢の雄 F344 ラットに 7 日間反復投与したところ、いずれの化合物も 7 日間投与によりほぼ同程度（対照群に対し約+20%増）の肝臓重量の増加が認められた。薬物代謝酵素活性では PB 投与で第 I 相酵素である P450 含量の増加、ACD 活性の上昇が認められたのに対し、BHA および 2PY-e 投与群では P450 含量、ACD 活性ともに対照群レベルあるいはそれより低値を示した。第 II 相酵素である GST および UDP-GT の活性については、3 剤ともに上昇が認められた。病理組織学的には PB 投与群では滑面小胞体の増加を伴う小葉中心性の肝細胞肥大が認められたが、BHA および 2PY-e 投与群では形態学的変化は認められなかった。免疫組織化学的検査では、PB 投与群でのみ第 I 相酵素である CYP2B1/2 の小葉中心性の染色強度の増強が認められた。第 II 相酵素の GST Ya および Yb については 3 剤ともに小葉中心性に染色強度の増加が認められた。GST Yp は PB 投与群では発現が認められなかったが、BHA 投与群では小葉辺縁部の、2PY-e 投与群では小葉中心部の肝細胞で発現が認められた。以上のことから、第 II 相酵素のみ誘導する化合物では 1) 組織学的に肝細胞肥大が認められない、2) 電子顕微鏡学的検査でも変化が認められない、3) 成熟ラットの肝細胞では発現しない GST Yp の誘導が認められる、ことが明らかとなった。

次いで、第 II 相酵素誘導剤では肝細胞肥大が認められないにも関わらず肝臓重量の増加が認められたことから、肝細胞の増殖活性について検討した。前述の 3 化合物を 11 週齢の雄 F344 ラットに 7 日間投与した。解剖の 3 日前に浸透圧ポンプに bromodeoxyuridine (BrdU) を入れ、背部皮下に移植して、3 日間標識を行った。3 化合物のいずれでも投与 3 日後に有意な肝細胞の増殖活性増加がみられ、とくに BHA および 2PY-e 投与群で著しかった。投与 7 日後では、PB 投与群では投与 3 日後とほぼ同程度の増殖活性がみられたが、BHA 投与群では対照群と同程度まで減少し、2PY-e 投与群でも投与 3 日後と比べると減少傾向が認められた。したがって、第 II 相酵素誘導剤による肝細胞増殖活性の増加は一過性のものであると

考えられた。増殖活性を肝小葉中心部および肝小葉辺縁部に分けて調べたところ、BHA 投与群では小葉辺縁部、2PY-e 投与群では小葉中心部でより著しい増殖活性の増加が認められた。これらの群で、肝細胞増殖活性増加部位と GST Yp の誘導部位とが一致していたことから、抗 BrdU 抗体と抗 GST Yp 抗体を用いた二重染色を実施した。BHA および 2PY-e 投与群ともに GST Yp 陰性肝細胞の増殖活性は対照群と比べて増加し、さらに、GST Yp 陽性肝細胞では肝小葉中心部、辺縁部ともに増殖活性が非常に高かった。以上の結果から第 II 相酵素誘導剤による肝肥大は 1) 一過性の肝細胞増殖が惹起される結果生じること、2) この肝細胞増殖と GST Yp 誘導に何らかの関連があることが示された。

次いで、9 週齢の雄 F344 ラットに BHA または PB を 14 日間反復経口投与し、1, 2, 4, 7 および 14 日後に解剖、肝臓を採材し、GeneChip®と二次元電気泳動 (2D-DIGE) による網羅的な遺伝子およびタンパク質発現解析を行った。GeneChip®解析の結果、PB 投与群で CYP2B や CYP3A などの第 I 相酵素関連遺伝子および GST アイソザイムや UDP-GT などの第 II 相酵素関連遺伝子の発現上昇が認められたが、GST π 関連遺伝子の発現上昇は認められなかった。BHA 投与群では CYP2B を除く第 I 相酵素関連遺伝子の発現上昇は認められなかったが、GST π など多くの第 II 相酵素関連遺伝子の発現上昇が認められた。また、PB、BHA 投与群ともにアポトーシス、細胞周期・増殖、DNA 修復、シグナル伝達、転写関連遺伝子などの細胞増殖に関連する遺伝子が投与 1~2 日後に一過性に発現上昇していた。タンパク質発現解析では、PB および BHA 投与群ともに各種 GST タンパクの増加がみられた。また、BHA 投与群では細胞増殖に関連する carbamoyl phosphate synthetase および arginosuccinate synthetase が投与 1 日後に増加し、2 日後以降減少した。また、G1 細胞周期停止による細胞増殖抑制作用がある formyltetrahydrofolate dehydrogenase が、投与 4 および 14 日後で増加した。G1~M 期を検出する抗 Ki-67 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ったところ、S 期のみを検出する BrdU の結果と異なり、投与 2 日後から 7 日後で対照群よりも高い肝細胞増殖活性が観察された。以上のことから、BHA による肝細胞の一過性の増殖が遺伝子およびタンパク質の発現レベルでも確認できた。加えて、投与 4 日後以降の肝細胞増殖抑制は G1 細胞周期停止による可能性が示唆された。

上述した GeneChip®解析や 2D-DIGE 解析がげっ歯類以外の動物種を用いた薬物代謝酵素誘導研究においても有用であることを確認する目的で、ビーグル犬に代表的な薬物代謝酵素誘導剤である clofibrate (CPIB) あるいは PB を 14 日間反復漸増経口投与し、肝臓について GeneChip®および 2D-DIGE による網羅的な遺伝子、タンパク質発現解析を行った。組織学的には、いずれの化合物においても肝小葉中

心性の肝細胞肥大が認められ、PB 投与群では滑面小胞体の増生、CPIB 投与群ではミトコンドリアの増生が認められた。PB 投与群では Western blot 法および遺伝子発現解析で CYP などの第 I 相酵素誘導が認められたが、これら酵素のタンパク質発現は確認できなかった。CPIB 投与群では Western blot 法、遺伝子およびタンパク質発現解析のいずれにおいても明確な酵素誘導は確認できなかったが、ミトコンドリア増生に対応してミトコンドリア関連遺伝子とタンパク質の発現上昇が認められた。PB 投与群でも滑面小胞体の増生に対応して小胞体関連タンパク質の発現上昇が認められた。以上のことから、これらの網羅的手法は、げっ歯類以外の動物を用いた薬物代謝酵素誘導研究においても有用と考えられた。

以上、BHA を中心に第 II 相酵素誘導剤の肝臓に対する影響について、肝細胞増殖に主眼をおいて研究を行い、様々な有用な知見を得た。第 II 相酵素誘導については研究があまり行われておらず、第 I 相酵素誘導と同じレベルでヒトへのリスクアセスメントが可能になるためにはさらに多くの知見を蓄積していかなければならない。