

論文審査の結果の要旨

まきの としひこ
申請者氏名 牧野 俊彦

肝臓は薬物代謝をおこなう主要な臓器であり、体内での薬物動態に大きな影響を及ぼし毒性の標的臓器になりやすい。このため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。多くの化合物によって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その多くが第 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、第 I 相と第 II 相酵素の両方を誘導する phenobarbital (PB) による変化と比較することで、肝臓への影響を評価した。11 週齢の雄 F344 ラットに 7 日間反復投与したところ、BHA、2PY-e 投与群ともに PB 投与群とほぼ同程度の肝臓重量の増加が認められたが、電子顕微鏡学的検査も含め、形態学的変化は認められなかった。免疫組織化学的検査から、BHA、2PY-e 投与群ともに成熟ラットの肝細胞では発現しない GST Yp が、それぞれ、肝小葉辺縁部および中心部で誘導されることが明らかとなった。

次いで、前述の 3 化合物を 11 週齢の雄 F344 ラットに 7 日間投与し、浸透圧ポンプにより bromodeoxyuridine (BrdU) を 3 日間標識し、肝細胞の増殖活性を調べた。BHA、2PY-e 投与群ともに肝細胞増殖活性の一過性の増加がみられ、投与 7 日では低下する傾向がみられた。また、増殖活性の高い部位は GST Yp 誘導部位と一致しており、抗 BrdU 抗体と抗 GST Yp 抗体を用いた二重染色により、肝小葉内の部位に関わらず、GST Yp 陽性の肝細胞で増殖活性が高いことが示された。第 II 相酵素誘導剤による肝細胞増殖は一過性のものであり、この肝細胞増殖と GST Yp 誘導には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 を反復経口投与後、1, 2, 4, 7 および 14 日に解剖し、GeneChip® と二次元電気泳動 (2D-DIGE) による肝臓の網羅的な遺伝子およびタンパク質発現解析を行った。BHA 投与群では GSTp 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、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。2D-DIGE では細胞増殖に関連する carbamoyl phosphate synthetase および arginosuccinate synthetase の投与 1 日での発現増加、G1 細胞周期停止による細胞増殖抑制作用がある formyltetrahydrofolate dehydrogenase の投与 4 および 14 日での発現増加が認められた。また、細胞の G1~M 期を検出する抗 Ki-67 抗体による免疫組織化学的染色では投与 4 日以降においても増殖活性の高値が認められた。

次いで、ビーグル犬に clofibrate (CPIB) あるいは PB を 14 日間反復漸増経口投与し、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かを確認した。2D-DIGE で PB 投与群における第 I 相酵素タンパクの変動を確認できなかったが、GeneChip および Westen blot 法により確認することができた。さらに PB 投与群では滑面小胞体の増生が認められ、小胞体関連遺伝子およびタンパク質の発現増加も認められた。これに対し、CPIB 投与群ではではミトコンドリアの増生が認められ、ミトコンドリア関連遺伝子およびタンパク質の発現増加が認められた。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。

今回の一連の研究により、BHA を代表とする第 II 相酵素誘導剤の肝臓に対する影響について様々な有用な知見を得た。第 II 相酵素誘導についてはこれまで研究があまり行われておらず、本研究成果の有用性は計り知れない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。