

を実施したところ、マイクロアレイの結果をとほぼ一致していることが確認された。以上の病理組織学的検査結果とマイクロアレイ解析結果から、T-2 toxin は酸化ストレスを誘導し、脂質代謝をはじめとする代謝の変化等により細胞内環境が変化し、MAPK, c-jun 経路が活性化してアポトーシスが誘導されたものと推察された。

以上の結果より妊娠ラットに T-2 toxin を投与すると、母体肝臓、胎盤および胎児肝臓にアポトーシスが生じ、これらの組織に共通して、酸化ストレス関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、脂質代謝および薬物代謝関連遺伝子の発現が変化することが分かった。

#### 4. ニトロフラゾン投与ラットの肝臓における変化

ニトロフラゾン (NF) は抗生剤の一つとして、20 世紀前半から医学および獣医学領域で使用されている。従来より、その精巢毒性については比較的詳細な形態学的研究が行われてきたが、肝臓に対する影響に関する報告はごく少ない。本研究は、高用量と低用量の NF をラットに投与した際の肝臓に対する影響を明らかにすることを目的として行った。また、NF の代謝には還元反応が関与することが知られており、フリーラジカルの発生が推測されることから、NF による肝臓の変化

へのフリーラジカルの関与の有無を調べた。さらに、NF 低用量投与時に肝細胞増殖が確認されたため、それに至る経路の一端を解明すべく、肝細胞増殖関連因子の動態を、real time PCR の手法を用いて検討するとともに、各因子の動態に及ぼすフリーラジカルの関与についても調べた。

得られた結果は以下のとおりである。

(1) NF を致死量に近い 500 mg/kg の用量で F344 雄ラットに単回経口投与したところ、散在性の肝細胞小壊死巣が観察された。壊死巣は肝小葉の zone 2 に多くみられる傾向を示した。

(2) NF の高用量投与により誘発される肝細胞壊死は、グルタチオン (GSH) 枯渇剤である diethyl maleate (DEM) の前投与により増悪し、散在性であった小壊死巣は zone 2 全域に広がり、一部で zone 3 の肝細胞の変性もみられた。

(3) 低用量の NF を F344 雄ラットに単回投与し、投与後 1、2、3、および 5 日目の肝臓を調べたところ、肝重量と BrdU 取り込みの指標である labeling index (LI) の増加、すなわち肝細胞増殖は、2 日間対照群より高値を示し、その後対照群と同程度の値に戻った。

(4) 低用量の NF を F344 雄ラットに 1、2、3、5、および 7 日間投与したところ、肝重量は増加し、肝細胞増殖が増加した。肝細胞増殖は投与 2 日で最大となり、その後は減少し、投与を継続したに

もかかわらず、対照群と同程度の値に戻った。また、肝重量は数日間増加したものの、ある一定の値で停止し、それ以上は増加しなかった。

(5) NF の低用量群でみられた変化には用量依存性が認められた。

(6) 肝細胞増殖に先立ち、生化学的にも、組織学的にも、肝細胞傷害はみられなかった。

(7) NF の血中濃度は投与後速やかに上昇し、1 時間後に最大となり、その後徐々に低下した。

(8) 細胞内グルタチオン濃度を上げ、antioxidant としても作用する N-acetylcysteine (NAC) の前投与により、NF による肝細胞増殖は抑制された。

(9) NF 単回投与後の肝細胞増殖関連の遺伝子発現量を RT-PCR で調べたところ、投与後 1、2 時間目に c-jun、c-myc が増加し、続いて TNF- $\alpha$  および TGF- $\alpha$  が投与後 8 時間目にかけて増加、c-Ha-ras が投与後 8-12 時間目、およびサイクリン E が 16 から 20 時間目にかけて増加した。これらの遺伝子の発現増加は、NAC 前投与により抑えられた。

以上のことから、高用量 NF は肝毒性物質としての作用を示し、肝細胞壊死にはフリーラジカルの関与が示唆された。これに対し、低用量 NF は肝細胞の傷害を伴わずに肝細胞増殖作用を示す、すなわち、mitogen としての作用を有し、その作用は用量依存性、かつ可逆性で、連続投与し

てもある時点で停止することが明らかとなった。また、低用量 NF の mitogen 作用にもフリーラジカルが関与していることが示された。

肝切除後や肝毒性物質投与後にみられる compensatory proliferation と、mitogen による mitogen-induced proliferation では、c-jun、c-myc、TNF- $\alpha$  などの共通した遺伝子の関与が示唆されており、NF 投与後も同様な遺伝子の発現の増加がみられた。一方、compensatory proliferation でみられる EGF や HGF の増加はみられなかったが、TGF- $\beta$  の増加がみられ、この点は他の mitogen に関する報告とは異なっていた。本研究により、NF は用量によって肝傷害物質としても mitogen としても作用し、そのいずれにおいてもフリーラジカルが関与していることが明らかとなった。また、mitogen としての作用は可逆的で、連続投与時でも一過性で、肝臓は重量が増加した状態で定常状態に至ること、および、mitogenic な過程は、他の mitogen でみられるそれと類似していることも明らかとなった。

## 5. ブタ血清誘発肝線維化モデルラットの病態解析

肝臓はエネルギー合成、代謝、解毒といった多様な機能を有する器官であり、肝障害、特に肝線維症および肝硬変は長期にわたり生体に重篤な影響を及ぼす。

そのため、多くの実験動物モデルが作出され、利用されてきた。その中でブタ血清投与ラットの肝線維化はモデルとして汎用されているにもかかわらず、その病態発現機構、特に分子生物学的機構についてはほとんど知られていない。本研究では、この点を解明すべく、Brown Norway (BN) ラットおよびWistar ラットを用い、ブタ血清誘発ラット肝線維化モデルの初期病態について主に病理組織学的検索を実施し、ついで病態発現初期における遺伝子発現解析と炎症および免疫細胞の関与について詳細な解析を行った。

得られた結果は以下の通りである。

#### (1) 初期病態

6週齢雄のBNラットおよびWistarラットにブタ血清(PS)(0.5 ml / head)を週2回、腹腔内投与し、1、2、3、4および8週間後に剖検し、肝臓について病理組織学的検索ならびに炎症細胞および細胞外基質に関する免疫組織化学的検索を実施した。さらに、MMP-1、MMP-8、TIMP-1、TIMP-2およびTIMP-3の変動をみるため、RT-PCR、Gel reverse zymographyおよび免疫組織化学的検索を実施した。その結果、BNラットで投与2週間後から、およびWistarラットで投与4週間後から、それぞれ炎症細胞浸潤が観察され、BNラットで投与4週間後から、およびWistarラットで投与8週間後から、それぞれ肝線維化病変が確認された。炎症細胞の動態をみると、マクロファージ、リンパ球およ

び好酸球が炎症初期から浸潤し、その後、活性化星細胞の増数および肥満細胞の浸潤がみられた。また、形成された線維中隔の構成要素の主体はtype III collagenであった。TIMP-1、TIMP-2およびTIMP-3は、いずれの系統でも、RT-PCRで発現の増加が確認された。一方、MMP-1およびMMP-8には変化はみられなかった。Gel reverse zymographyを用いた検索では、TIMP-1およびTIMP-2が両系統の8週投与群でのみ有意な活性の増強を示し、TIMP-3には変化はみられなかった。免疫組織化学的検索では、全ての群の胆管上皮細胞および小葉中心静脈周囲の肝細胞でTIMP-1およびTIMP-2の陽性像が得られ、PS投与群と対照群との間に差はみられなかった。

#### (2) 病態発現初期における遺伝子発現解析

2および4週投与群の肝臓について、Affymetrix社GeneChip Microarrayを用い、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、その結果に基づき、RT-PCRおよび免疫組織化学的検索を実施した。その結果、BNラットの2週投与群では、MHC class II関連遺伝子、炎症関連遺伝子、ストレス/細胞傷害関連遺伝子、分泌産物および増殖反応タンパク関連遺伝子の発現の増加が認められた。一方、Wistarラットでは、4週投与群でMHC class II関連遺伝子および炎症関連遺伝子の発現が増加した。MHC class II分子に関するRT-PCR

を用いた検索では、GeneChip Microarray 解析結果とほぼ同様の結果が得られた。さらに、免疫組織化学的検索では、BN ラットで1週あるいは2週投与群より PS、OX-6、CD4 および CD8 陽性細胞が増加し、一方、Wistar ラットでは4週投与群で有意な増加が認められた。

### (3) ブタ血清特異的免疫グロブリンの動態

ELISA 法を用い、血中のブタ血清特異的免疫グロブリンの動態について検討するとともに、肝臓、胸腺、脾臓および腎臓について病理組織学および免疫組織化学的検索を実施した。その結果、ELISA 法では、血中のブタ血清特異的 IgG1、IgG2a および IgM の増加が両系統で認められた。肝炎および肝線維化が遅延する Wistar ラットでは、BN ラットと比べ、発現値が低値を示し、また、発現時期が遅延する傾向を示した。両系統で脾臓では1週あるいは2週投与群より、相対重量の有意な増加がみられ、白脾髄の腫大が認められた。BN ラットの8週投与群で白脾髄胚中心の拡大が観察された。さらに、免疫組織化学的検索では、肝臓で肝炎発症時に一致して IgG1 および IgG2a 陽性細胞が有意に増加し、線維中隔に IgG1 および IgG2a の沈着が認められた。8週投与群の脾臓では白脾髄の胚中心に PS、IgG1 および IgG2a 陽性細胞がみられ、また、腎臓でも糸球体メサンギウム領域に PS および IgG1 の沈着が認められた。

### (4) 胸腺・脾臓摘出による肝線維化抑制効果

本モデルの病態発現に免疫系が密接に関与していることが推察されたため、5週齢雄の BN ラットおよび Wistar ラットに胸腺あるいは脾臓摘出術を実施し、主に肝臓について病理組織学的検索、免疫組織化学的検索、フローサイトメトリー解析および RT-PCR を用いた検索を実施した。その結果、ラットの系統に無関係に、胸腺あるいは脾臓の摘出によって肝炎および肝線維化病変が著しく抑制された。脾臓摘出に比べ、胸腺摘出では抑制効果は弱かった。フローサイトメトリー解析では、胸腺、脾臓および末梢血から肝臓への細胞動員は、CD45RA および RT1. B 陽性細胞を除き、ほとんどみられなかった。サイトカインに関する RT-PCR を用いた検索では、肝臓でのみ TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B および PDGF の発現の増加がみられた。一方、ケモカインに関する RT-PCR を用いた検索では、肝臓、胸腺および脾臓で MIP-1 $\alpha$  および Eotaxin の発現の増加ならびに胸腺および脾臓で IP-10 の発現の増加が認められた。

以上の結果から、TIMP の発現が微弱で、MMP の発現がみられないことは、肝細胞壊死がほとんどみられない本肝線維化モデルの特徴のひとつと考えられた。また、本モデルでは肝炎発症時に一致して MHC class II 分子の発現および PS、OX-6、CD4 および CD8 陽性細胞の出現がみられ、病

態発現に MHC class II を介した抗原提示機構が深く関与していることが示唆された。さらに、肝炎発症時からブタ血清特異的免疫グロブリンの産生増加がみられ、高免疫グロブリン血症を生ずることから、免疫グロブリン産生が病態の進展に関与しているものと推察され、病態発現に胸腺および脾臓が密接に関与していることが明らかとなった。

## 6. マウスにおけるストレプトゾトシン誘発肝毒性の性状

ストレプトゾトシン (SZ) は、*Streptomyces achromogenes* から分離され、当初抗生物質あるいは抗腫瘍剤として開発された。その後、SZ が膵島β細胞に傷害性を示すことが明らかにされ、その機序については詳しく調べられている。また、SZ の発癌性についても以前から知られており、投与後長期間経ってから、膵島細胞腫、腎の腺腫等の発生報告がある。肝においても SZ 投与後約 2 年で肝細胞腫や胆管腫の発生報告がある。こうしたことから、SZ は膵島β細胞のみならず肝細胞や胆管上皮細胞に対してもなんらかの傷害作用を及ぼすことが推測されるが、SZ の肝毒性そのものを対象に詳細な病理学的検索を行った報告はほとんどない。本研究は、SZ による直接および二次的な肝傷害の性状を、主として病理学的観点から明らかにすることを目的とし

て実施した。

まず、SZ 投与 4 から 12 週間後の糖尿病惹起後の肝病変を病理学的に明らかにした。最も顕著な変化の一つとして胆管上皮細胞の増生が挙げられ、胆道系への影響が示唆された。SZ 投与による胆管腫瘍の発生報告を除けば、胆道系への影響の報告は少ない。肝細胞への影響としては、核膜陥入による核内封入体形成が顕著であった。核膜陥入による核内封入体形成については、SZ が酸化ストレスを介して脂質過酸化を惹起することから、それによる核膜傷害に起因していることが考えられる。さらに、SZ 投与マウスの肝細胞では、クロマチンの分布やサイズが異なる二核細胞が多く認められ、また、非常に大きな核を有する肝細胞が認められた。こうした核の変化は、SZ による DNA 傷害や SZ による肝腫瘍発生と関連している可能性が考えられる。細胞質に認められた変化としては、グリコーゲンの減少、脂質蓄積などが挙げられるが、最も特徴的な変化はミトコンドリアの増生であった。このように、ほぼ正常構造を示すミトコンドリアの増生を特徴とする oncocytic cell あるいは oxyphilic cell と呼ばれる細胞の出現は、N-nitrosomorpholine の投与時などに認められ、前癌状態である可能性を示唆する報告もある。一方で、後述するように、SZ 投与 6 時間後にミトコンドリアの傷害像が認められること、SZ によりミトコン

ドリアの機能を直接的に傷害するとの報告があることなどから、SZ 投与後早期に傷害されたミトコンドリアの代償性増生の可能性も高い。

次に、SZ による直接的な肝への影響を明らかにする目的で、高血糖が惹起される以前（24 時間以内）を中心に、急性期の肝臓の変化を追った。同時に実施した膵臓の病理組織学的検査および血清生化学的検査の結果から、投与 6 および 12 時間後には膵島  $\beta$  細胞が急激に傷害を受け、血清インスリン値が上昇し、血糖値が減少すること、24 時間を境に血清インスリン値は正常よりも低下し、血糖値が上昇することが確認された。肝の病理組織学的検査では、血糖値が上昇する以前（SZ 投与 6 時間後）に肝細胞のミトコンドリアの膨化が認められ、SZ がミトコンドリアに直接的な傷害を及ぼすことが示された。また、この時間帯には、脂質過酸化の指標となる TBARS やリン脂質過酸化物が増加することが確認され、酸化ストレスがミトコンドリア傷害の一因となることが示された。

DNA マイクロアレイによる遺伝子変動解析からも、細胞周期関連、特に細胞周期の停止を起こす遺伝子の up-regulation が認められ、細胞分裂抑制方向にあることが示された。同時に、apoptosis 関連遺伝子の up-regulation も認められ、核の傷害との関連性が示唆された。さらに、脂質代謝関連の遺伝子

の down-regulation も観察され、血中および肝臓中の脂質値の変動の一要因となっているものと考えられた。SZ は膵島  $\beta$  細胞では細胞内の NAD や ATP を減少させることが知られているが、肝細胞内でも同様なことが生じ、それが肝における脂質代謝関連遺伝子の down-regulation と関連している可能性が示唆された。その他、SZ 投与動物でこれまでに報告の無い胆嚢の潰瘍・浮腫が観察された。

さらに、SZ の直接的影響を見る目的で、*in vitro* 初代培養肝細胞に SZ を暴露した。SZ 暴露により、培養肝細胞核クロマチンのマージネーションが観察され、これは *in vivo* および下記の *in vitro* に共通して確認された apoptosis 関連遺伝子 up-regulation を反映しているものと考えられた。DNA マイクロアレイを用いた遺伝子変動解析では、その他、*in vivo* での遺伝子変動と *in vitro* での遺伝子変動の間に、細胞周期関連遺伝子や脂質代謝関連遺伝子の変動など多くの類似性が認められ、*in vivo* の肝で早期に認められる変化は SZ の直接的影響であることが強く示唆された。

以上のことから、SZ は肝に対して、ミトコンドリアへの傷害作用、核への傷害作用および胆管上皮への傷害作用を有することが明らかとなり、これらの作用は高血糖による二次的影響ではなく、SZ による直接作用であることが示された。こうした肝毒性の発現メカニズムとしては、

酸化ストレスによる脂質過酸化, DNA 傷害に基づく細胞分裂抑制および apoptosis 関連遺伝子の up-regulation が関与している可能性が強く示唆された。

#### E. 結論

薬物誘発性のラットまたはマウスの肝病変について、その発現機構を肝病変と遺伝子発現プロファイルとの時間的・空間的対応関係に即して解析した。傷害性肝病変においては酸化ストレス関連遺伝子, アポトーシス関連遺伝子, 脂質代謝の発現増加および薬物代謝関連遺伝子の発現プロファイル変化が観察された。また、母体肝、胎盤、胎児肝のそれぞれで遺伝子発現プロファイルに差がみとめられ、さらに妊娠、分娩、授乳の各期によっても遺伝子発現プロファイルが異なっていた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### CYP

1. Ejiri N., Katayama K., Nakayama H., and Doi K. Expression of cytochrome P450 (CYP) isozymes in rat placenta through pregnancy. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 53:387-391, 2001.
2. Ejiri N., Katayama K., and Doi K. Induction of CYP3A1 by dexamethasone

and pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 54:273-280, 2003.

3. Ejiri N., Katayama K., and Doi K. Induction of cytochrome P450 isozymes by phenobarbital in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp. Mol. Pathol.*, 78:150-155, 2005.
4. Ejiri N., Katayama K., Kiyosawa N., Baba Y., and Doi K. Microarray analysis on CYPs expression in pregnant rats after treatment with pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile and phenobarbital. *Exp. Mol. Pathol.*, 78:71-77, 2005.
5. Ejiri N., Katayama K., Kiyosawa N., Baba Y., and Doi K. Microarray analysis on phase II drug metabolizing enzymes expression in pregnant rats after treatment with pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile or phenobarbital. *Exp. Mol. Pathol.*, 79:272-277, 2005.
6. He X. J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.*, 78, 64-70, 2005.
7. He X. J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Changes in cytochrome P450 isozymes (CYPs) protein levels during lactation in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.*, 79:224-228, 2005.

T-2 toxin

8. Sehata S., Teranishi M., Atsumi F., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. T-2 toxin-induced morphological changes in pregnant rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 16:59-65, 2003.

9. Sehata S., Kiyosawa N., Sakuma K., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Gene expression profiles in pregnant rats treated with T-2 toxin. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55:357-366, 2004.

10. Sehata S., Teranishi M., Yamoto T., Matsunuma N., and Doi K. T-2 toxin-induced toxicity in pregnant rats- histopathology and gene expression profiles. *Proceedings of The International Symposium of Mycotoxicology in Kagawa 2003*, pp.33-39, Bikoohsha, Japan, 2004.

11. Sehata S., Kiyosawa N., Makino T., Atsumi F., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Morphological and microarray analysis of T-2 toxin - induced fetal brain lesion. *Food Chem. Toxicol.*, 42:1727-1736, 2004.

12. Sehata S., Kiyosawa N., Atsumi F., Ito K., Yamoto T., Teranishi M., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K.

Microarray analysis of T-2

toxin-induced liver, placenta and fetal liver lesions in pregnant rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 57:15-28, 2005.

13. Doi K., Shinozuka J., and Sehata S. T-2 toxin and apoptosis. *J. Toxicol. Pathol.*, 19: 15-27. 2006.

Nitrofurazone

14. Ito K., Ishida K., Takeuchi A., Nii A., Okamiya H., and Doi K. Nitrofurazone induces non-regenerative hepatocyte proliferation in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 53:421-426, 2002.

15. Ito K., Kajikawa S., Nii A., Hanada T., and Doi K. Antioxidants suppress nitrofurazone-induced proliferation of hepatocytes. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55:247-250, 2003.

16. Ito K., Takeuchi A., Nii A., Hanada T., and Doi K. Nitrofurazone at a high dose induces hepatocyte and adrenal necrosis in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 17:59-61, 2004.

17. Ito K., Kajikawa S., Nii A., and Doi K. Nitrofurazone-induced gene expressions in rat hepatocytes and their modification by N-acetylcysteine.

*Exp. Toxicol. Pathol.*, 56:333-339, 2005.

Porcine serum



18. Baba Y., Uetsuka K., Nakayama H., and Doi K. Rat strain differences in the early stage of porcine-serum-induced hepatic fibrosis. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55:325-330, 2004.

19. Baba Y. and Doi K. MHC class II-related genes expression in porcine-serum-induced rat hepatic fibrosis. *Exp. Mol. Pathol.*, 77:214-221, 2004.

20. Baba Y., Saeki K., Onodera T., and Doi K. Serological and immunohistochemical studies on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Exp. Mol. Pathol.*, 79:229-235, 2005.

#### Streptozotocin

21. Kume E., Fujimura H., Matsuki N., Itoh M., Aruga C., Toriumi W., Kitamura K., and Doi K. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetic mice. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 55: 467-480, 2004.

22. Kume E., Aruga C., Ishizuka Y., Takahashi K., Miwa S., Itoh M., Ishizuka Y., Fujimura H., Toriumi W., Kitamura K., and Doi K. Gene expression profiling in streptozotocin treated mouse liver using DNA

microarray. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 56:235-244, 2005.

23. Kume E., Aruga C., Takahashi K., Miwa S., Dekura E., Itoh M., Fujimura H., Toriumi W., and Doi K. Morphological and gene expression analysis in mouse primary cultured hepatocytes exposed to streptozotocin. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 56:245-253, 2005.

#### 2. 学会発表

1. 武藤幸子、武田真記夫、片山圭一、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「マウス肝臓における connexin 32, 26 の発現に及ぼす T-2 トキシシン投与の影響」第18回日本毒性病理学会、2002年1月、東京

2. 江尻紀子、片山圭一、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「Pregnenolon-16  $\alpha$ -carbonitrile および Dexamethasone 投与に対する妊娠ラットの受ける影響について」第18回日本毒性病理学会、2002年1月、東京

3. 山内啓史、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「糖尿病モデル db/db マウスにおける部分肝切除後の肝再生」第134回日本獣医学会、2002年9月、青森

4. 馬場也須子、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「ブタ血清誘発性肝線維症に関するラットの系統差」第135回日本獣医学会、2003年3月、東京

5. 山内啓史、片山圭一、八十島昭、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「Ara-Cの胎児・胎盤毒性に関する形態学的研究」第135回日本獣医学会、2003年3月、東京
6. 白井真人、上塚浩司、山内啓史、中山裕之、土井邦雄「db/dbマウスにおける肝再生障害メカニズムの探索(1) - アレイ解析からのアプローチ」第136回日本獣医学会、2003年9月、札幌
7. 上塚浩司、山内啓史、中山裕之、土井邦雄「db/dbマウスにおける肝再生障害メカニズムの探索(2) - 類洞血管からのアプローチ」第136回日本獣医学会、2003年9月、札幌
8. Sehata S, Teranishi M, Yamoto T, Matsunuma N, Doi K T-2 toxin-induced toxicity in pregnant rats - Histopathology and gene expression profiles. International Symposium of Mycotoxicity, Nov. 2003, Kagawa
9. Baba Y, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K Porcine-serum-induced hepatic fibrosis in Brown Norway and Wistar rats. International Meeting of Toxicological Pathology, Feb. 2004, Kobe
10. 馬場也須子、中山裕之、土井邦雄「ラットブタ血清誘発肝線維化モデルにおける免疫グロブリンの変化」第93回日本病理学会、2004年6月、札幌
11. Baba Y, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K Porcine-serum-induced hepatic fibrosis in Brown Norway and Wistar rats. 23rd Annual Meeting of Society of Toxicological Pathology, Jun. 2004, Salt Lake City
12. Uetsuka K, Yamauchi H, Nakayama H, Doi K Impaired liver regeneration in db/db mice after 2/3 partial hepatectomy. 23rd Annual Meeting of Society of Toxicological Pathology, Jun. 2004, Salt Lake City
13. 上塚浩司、中山裕之、土井邦雄「マウス3分の2肝部分切除後の肝再生に対する血管新生阻害薬 FR118487 投与の影響」第138回日本獣医学会、2004年9月、札幌
14. He XJ, Ejiri N, Nakayama H, Doi K Effects of pregnancy on CYPs protein expression in rat liver. 第21回日本毒性病理学会、2005年1月、浜松
15. 馬場也須子、土井邦雄「ラットブタ血清誘発肝線維化モデルにおける線維化関連因子の変化」第21回日本毒性病理学会、2005年1月、浜松
16. 上塚浩司、山内啓史、白井真人、中山裕之、土井邦雄「db/dbマウスの肝再生障害における非実質細胞の関与についての検討」第52回日本実験動物学会、2005年6月、東京
17. 馬場也須子、土井邦雄「ブタ血清誘発ラット肝線維化モデルにおける胸腺・脾臓摘出術の影響」第140回2005

年 9 月、鹿児島

18. Yamauchi, H, Katayama, K, Ueno, M, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K Pathway of p53-dependent trophoblast cell apoptosis in cytosine arabinoside-treated placenta.

ACVP/ASVCP Annual Meeting, Dec. 3-7, 2005, Boston

19. He, XJ, Ejiri N, Yamauchi H, Nakayama H, Doi K Effect of pregnancy and lactation on CYPs protein and gene expression profiling during pregnancy in rat liver. ACVP/ASVCP Annual Meeting, Dec. 3-7, 2005, Boston

20. Baba Y, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K Porcine-serum-induced fibrosis in Brown Norway and Wistar rats, 49th Annual Meeting of KSVS. Sep. 23, 2005 Cheju.

21. 何希君、中山裕之、山内啓史、上塚

浩司、土井邦雄 「MPTP 誘発神経前駆細胞アポトーシス- MPTP 誘発パーキンソン病のマウスモデルにおける新知見」第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年 7 月、名古屋

22. 山内啓史、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄 「Cytosine arabinoside は胎盤迷路部栄養膜細胞に p53 依存性のアポトーシスを誘導する」第 33 回日本トキシコロジー学会、2006 年 7 月、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 特許出願

なし

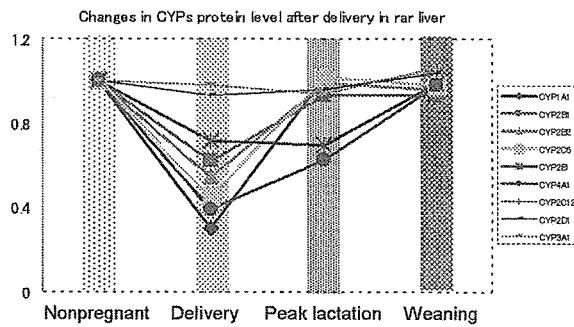
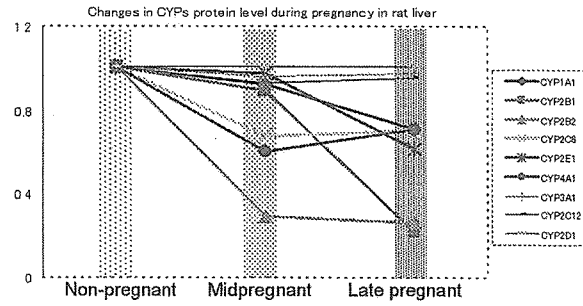
薬物誘発ラット肝病変の発現機構と  
遺伝子発現プロファイルに関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科  
獣医病理学研究室  
土井邦雄・中山裕之

妊娠期および泌乳期ラットの肝臓における  
遺伝子発現プロファイルの変化

## 1. Western blot

妊娠後期から出産時に発現低下

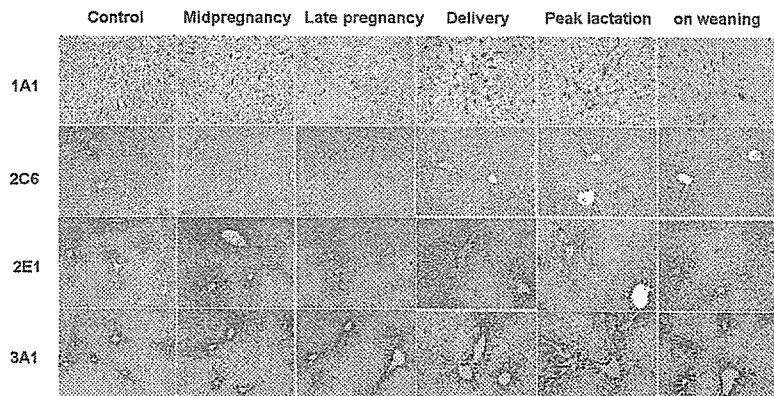


## 2. 免疫染色

多くのCYP isozymes は主に小葉中心性に発現

非妊娠、妊娠、授乳でCYPの分布と発現強度に差はない

CYP1A1 は類洞と静脈の内皮細胞に発現



### 薬物代謝関連遺伝子の発現変化 (CYPs)

Gene family	Probe ID	Accession number	GeneBank definition and comment	Fold change			
				GD 13	GD 19	PPD* 0	PPD 2w
CYPs	1367871_at	gb:NM_031543.1	Cytochrome P450, subfamily 2e1 (ethanol-inducible) (Cyp2e1)		-1.37		
	1367917_at	gb:NM_012730.1	Cytochrome P450, subfamily IID2 (Cyp2d2)		-1.68		
	1367988_at	gb:U04733.1	cytochrome P450 arachidonic acid epoxidase (cyp 2C23)		-1.46		
	1387109_at	gb:NM_031576.1	P450 (cytochrome) oxidoreductase (For)		-1.46		-1.62
	1368265_at	gb:NM_134369.1	cytochrome P450 monooxygenase CYP2T1 (Cyp2t1)		-1.87	-2.14	
	1368435_at	gb:NM_031241.1	cytochrome P450, 8b1		-2.93		
	1387243_at	gb:K02422.1	Cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), member A2	-1.32	-1.37	-1.57	-1.52
	1368608_at	gb:NM_019303.1	Cytochrome P450, subfamily IIF, polypeptide 1 (Cyp2f1)		-1.93	-2.38	-1.27
	1368934_at	gb:NM_016999	Cytochrome P450, subfamily IVB, polypeptide 1 (Cyp4b1)		-1.74		
	1387511_at	gb:NM_012692	Cytochrome P450 IIA1 (hepatic steroid hydroxylase IIA1) gene (Cyp2a1)		-1.52	-2.14	
	1369275_s_at	gb:NM_012692.1	Cytochrome P450 IIA1 (hepatic steroid hydroxylase IIA1) gene (Cyp2a1)		-1.57	-2.14	
	1387914_at	gb:M73231.1	CYP 27	-1.87	-2.3		
	1370377_at	gb:M25143.1	cytochrome P450CMF1b		-1.87	-1.52	
	1387973_at	gb:U39206.1	cytochrome P450 4F4 (CYP4F4)	-1.52	-1.8		
	1370496_at	gb:AB008424.1	mRNA for CYP2D3		-2.46	-1.62	
	1370706_s_at	gb:U39943.1	cytochrome P450 monooxygenase (CYP2J3)	-1.46	-2.46		
	1371076_at	gb:AI454613	cytochrome P450, 2b19	-2.14	-2.64	-1.32	

妊娠後期から分娩時にかけて発現低下

### 薬物代謝関連遺伝子の発現変化 (Nr, GST, UDPGT)

Gene family	Probe ID	Accession number	GeneBank definition and comment	Fold change			
				GD 13	GD 19	PPD 0	PPD 2w
Ephx1	1387669_s_at	gb:NM_012844	Epoxide hydrolase 1 (microsomal xenobiotic hydrolase) (Ephx1)	-1.57	-1.74	-2.14	
	1387152_at	gb:NM_021188.1	nuclear receptor binding factor 2 (Nrbf2)		-1.41		
	1368376_at	gb:NM_057133.1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (Nr0b2)	-1.8	-2.83		-2.64
	1368797_at	gb:NM_022941.1	nuclear receptor (CAR) (Nr1c3)	-2.22	-2.14	1.93	
	1369073_at	gb:NM_021745.1	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 (Nr1h4)		-1.57		
	1369270_at	gb:NM_052940.1	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2 (Nr1i2)		-1.62		-1.46
	1370541_at	gb:U20796.1	nuclear receptor Rev-Erba-beta mRNA		-1.62	1.68	
GST	1386985_at	gb:M28241.1	Glutathione S-transferase, mu type 2 (Yb2)	-1.46	-1.74	-1.8	
	1387023_at	gb:NM_031134.1	glutathione S-transferase, mu type 3 (Yb3) (Gstm3)	-1.52	-1.62	-2	
	1368354_at	gb:NM_053293.1	Glutathione S-transferase 1 (theta) (Gstt1)		-2.55	-4.44	
	1368409_at	gb:NM_012794.1	glutathione S-transferase, theta 2 (Gstt2)	-1.46	-1.68	-2.07	
	1370952_at	gb:AI169331	Glutathione S-transferase, mu type 2 (Yb2)		-1.62	-3.86	
UDPGT	1389832_at	gb:BE113459	Highly similar to GTO1_FAT GLUTATHIONE TRANSFERASE OMEGA 1		-1.52		
	1387759_s_at	gb:J02612.16	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A		-1.46		
	1370613_s_at	gb:AF46738.1	UDP-glucuronosyltransferase 1A7		-1.68		

妊娠後期から分娩時にかけて発現低下

### 酸化ストレス関連遺伝子の発現変化

Gene Function	Probe ID	Accession Number	GeneBank definition and comment	GD 13	GD 19	PPD 0	PPD 2w
Induction of antioxidant genes	1387759_s_at	gb:J02612	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A6 (Ugt1a6)		-1.46		
	1368309_at	gb:NM_022584.1	thioredoxin reductase 2 (Txrd2)				-1.62
	1370688_at	gb:J05181.1	Glutaryl-cysteine gamma synthetase light chain (Gclc)		1.52	1.41	
	1368409_at	gb:NM_012796.1	glutathione S-transferase, theta 2 (Gstt2)	-1.46	-1.68	-2.07	
	1369061_at	gb:NM_053906.1	glutathione reductase (Gsr)				-1.62
	1370172_at	gb:AA8922.54	Superoxide dismutase 2, mitochondrial (Sod2)				-1.41
	1368322_at	gb:NM_012880.1	Superoxide dismutase 3 (Sod3)				-1.32
Repression of ROS-producing systems	1370946_at	gb:BF420722	Nfix		-2.46		

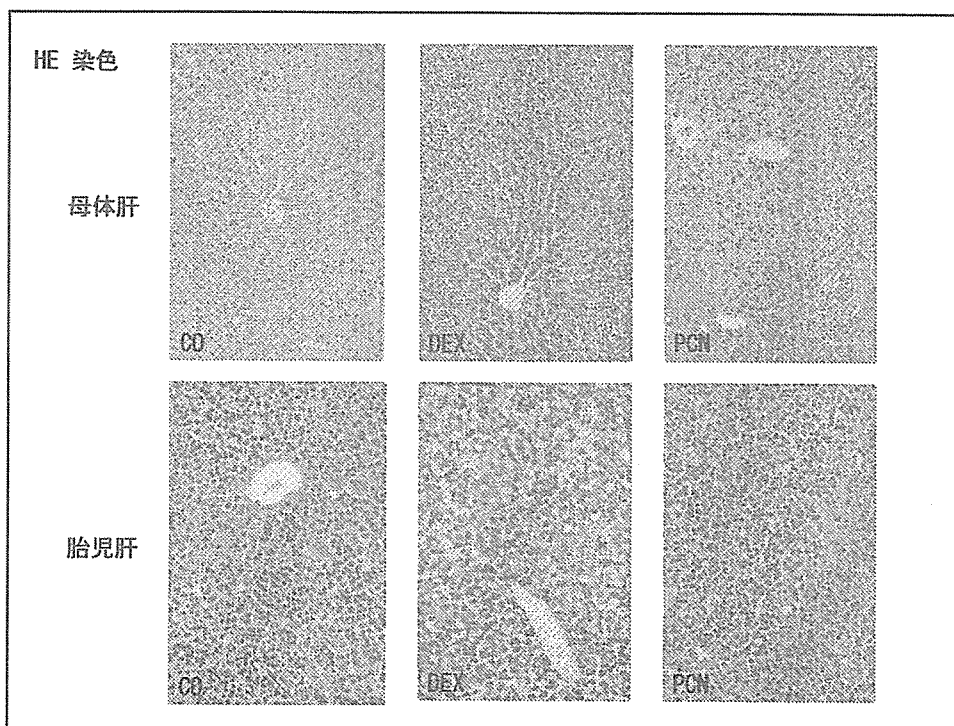
妊娠後期から分娩時にかけて発現低下

### まとめ

薬物代謝関連遺伝子(CYPs, Nrs GST UDPGTなど)、酸化ストレス関連遺伝子の多くは妊娠後期から分娩時にかけて発現が低下したが、離乳時には非妊娠時のレベルに戻った。

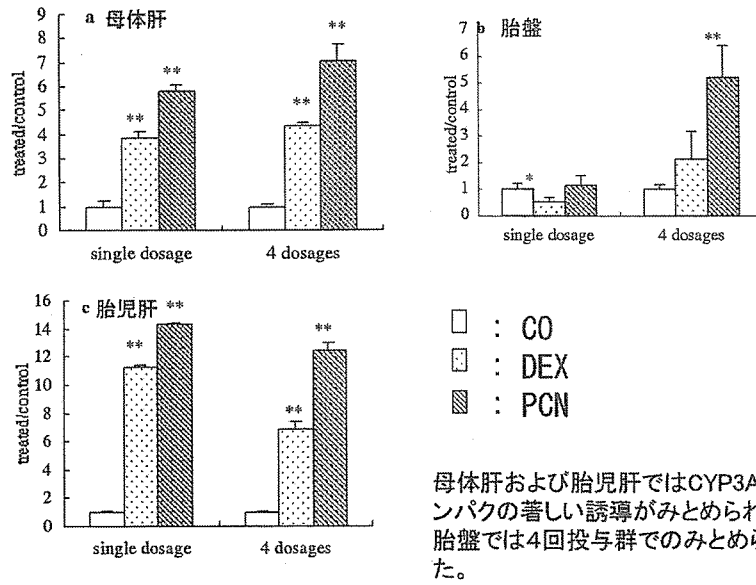
多くのCYPは主に肝小葉中心性に発現していたが、非妊娠、妊娠、授乳で、分布と発現強度に差はなかった。

薬物代謝酵素誘導剤投与による妊娠ラットの  
肝—胎盤—胎児肝におけるCYPの発現状態



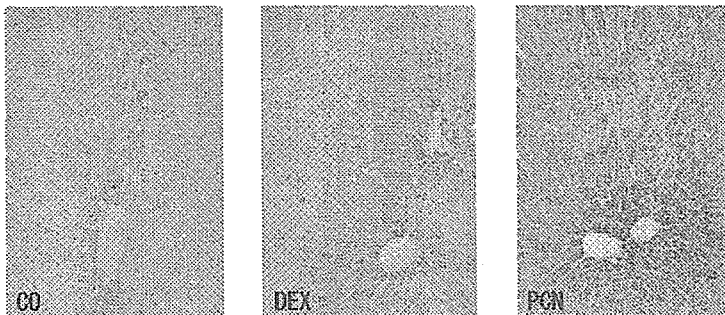


## Western blot CYP3A1



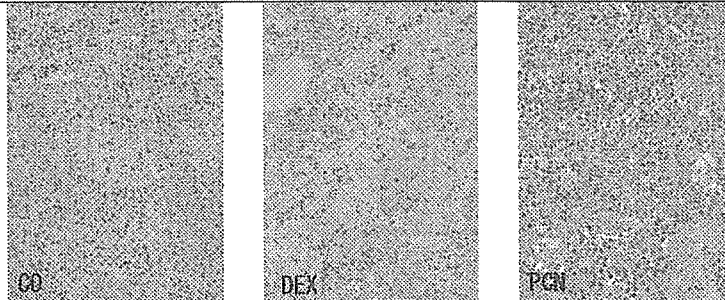
免疫染色  
CYP3A1

母体肝



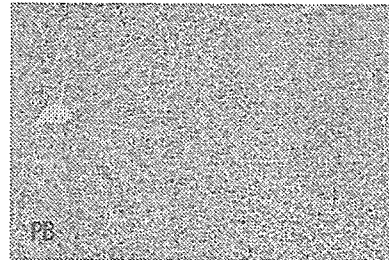
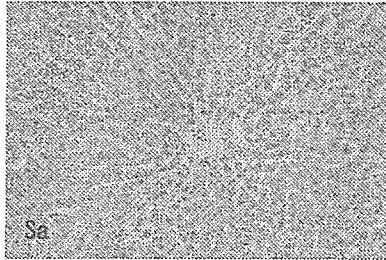
母体肝および胎児肝ではCYP3A1タンパクの著しい誘導がみとめられた。

胎児肝



HE 染色

母体肝



Western blot および免疫染色 (PB)

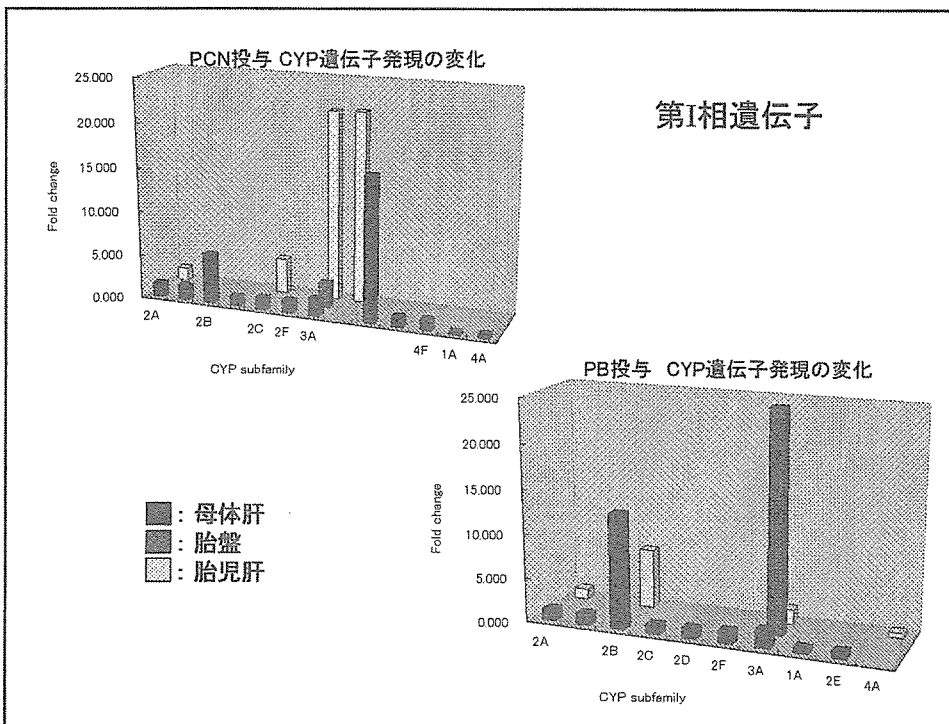
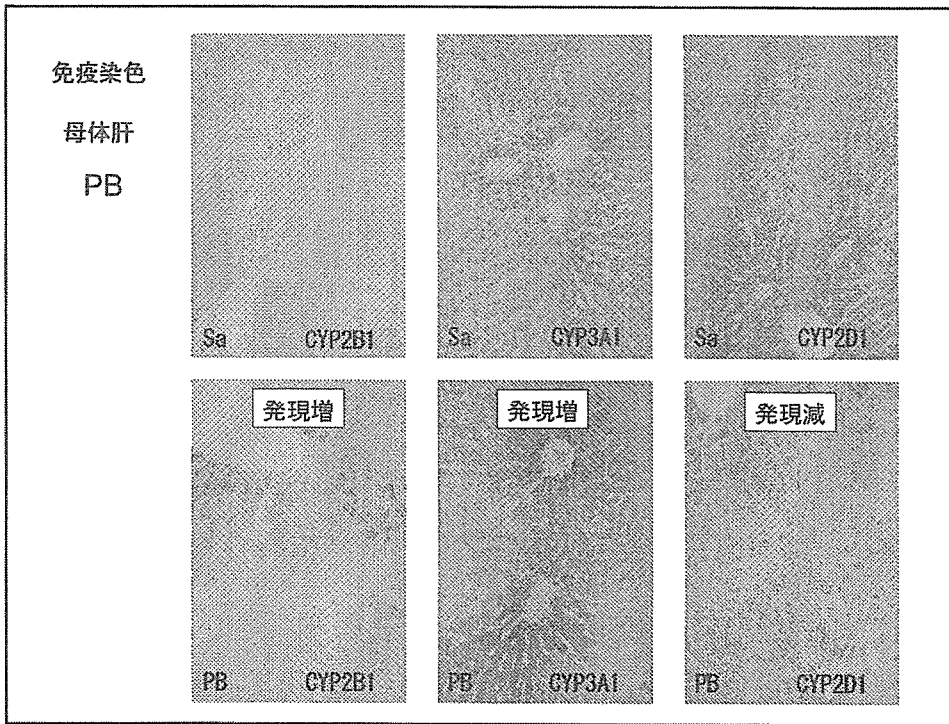
Western blot 解析

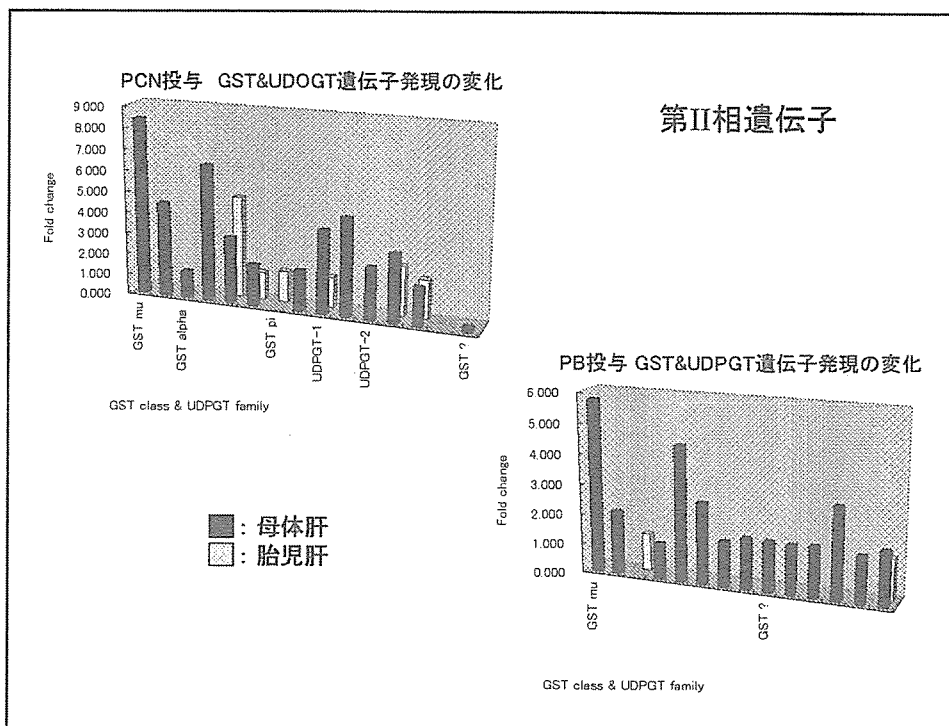
	CYP1A1	CYP2B1	CYP2C6	CYP2C12	CYP2D1	CYP2D4	CYP2E1	CYP3A1	CYP4A1
母体肝	→	↑↑	→	→	↓↓	—	→	↑↑	→
胎盤	—	—	—	—	—	—	—	→	—
胎児肝	—	—	↑	—	→	—	→	↑↑	→

免疫組織化学的検索

	CYP1A1	CYP2B1	CYP2C6	CYP2C12	CYP2D1	CYP2D4	CYP2E1	CYP3A1	CYP4A1
母体肝	+	↑↑	+	+	↓↓	—	+	↑↑	+
胎盤	—	—	—	—	—	—	—	+	—
胎児肝	—	—	±	—	—	—	—	±	—

母体肝ではCYP2B1とCYP3A1タンパクの著しい発現増加とCYP2D1の発現減少がみとめられた。胎盤では変化がなかった。





## まとめ

DEX、PCN、PBの投与により、母体肝および胎児肝で肝細胞の軽度空胞化と腫大がみられた。

母体肝および胎児肝でCYP3A1タンパクの著しい誘導がみとめられたが、胎盤ではみとめられなかった。

母体肝ではPB投与によりCYP2B1タンパクが発現した。

胎盤では、DEX、PCN、PBによっても一部を除いてCYP遺伝子、タンパクの顕著な誘導はおこらなかった。

胎児肝で発現しているCYPおよび第II相遺伝子の種類は母体肝よりも少なかった。