

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

特異体質性薬物肝障害発症の機構解明と予測実験系の開発

平成 19 年度 分担研究報告書

主任研究者 横 井 毅

分担研究者 中 島 美 紀

平成 20 (2008) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

γ -Glutamylcysteine synthetase ノックダウンによるグルタチオン減少モデル
ラットを用いた薬物誘導性肝障害試験系の評価

主任研究者 横井 毅 金沢大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

グルタチオン(GSH)は、グリシン、グルタミン酸およびシステインから構成されるトリペプチドであり、内因性物質や薬物から生じるフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護している。GSTは薬物および活性代謝物を解毒することに深く関わっているが、ヒトに比べてげっ歯類で酵素活性が高いことが知られており、この代謝能の違いが前臨床試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。本研究においては、GSH 減少モデルラットを用いてジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害の発現について検討し、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出できることを明らかにした。しかし、ヒトにおいて毒性が認められる投与量と比べると薬物の投与量が過剰である点を考慮すると、今後はラット肝臓中にヒトCYPを過剰発現させる、あるいはヒトと比べてラットで高い代謝能を持つ酵素をさらにノックダウンさせるなどして、ヒトにおける毒性発現に近い実験系を確立する必要があると考えられる。種差に起因する代謝能の違いは、医薬品開発中止の主な原因の一つである薬物誘導性肝障害の予測を困難にしている。このため、ヒトにより近いモデル動物の作成が望まれている。今回、GSH 減少モデルラットが急性および亜急性の薬物誘導性肝障害を高感度に検出する有用な手段となり得ることを明らかにした。本研究で検討したGSH 減少モデルラットが医薬品開発の安全性研究で用いられ、前臨床試験におけるスクリーニングの段階で薬物誘導性肝障害を高感度に検出し、ヒトにおける副作用を未然に防ぐ有用な手段になることを期待する。

A. 研究目的

医薬品開発研究において、候補化合物が医薬品として認可されるまで 10～15 年もの年月と 150～200 億円の研究費を要すると言われている。前臨床の薬効試験、安全性試験や薬物動態試験などの多くの試験は、マウスやラットなどのげっ歯類やイヌやサルを用いて行われている。化学物質の多くは肝臓で代謝・解毒されるが、実験動物とヒトでは、代謝活性に大きな種差があることが知られている。このため、ヒトにおける体内動態を前臨床試験の段階で予測することは困難であり、実際に臨床試験の段階で開発中止となる候補化合物は 60%に達し、その原因の約 80%は種差に起因するものであると言われている (Nedeicheva and Gut, 1994; Kola and Landis, 2004)。

グルタチオン (5-L-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) は、グリシン、グルタミン酸およびシステインから構成されるトリペプチドであり、内因性物質や薬物より生じるフリーラジカルを捕獲することで、組織中の核酸やタンパク質を酸化ストレスから保護している (Reed, 1986; Lu, 1999)。グルタチオン S-転移酵素 (GST) は薬物および活性代謝物を解毒することに

深く関わっているが、ヒトに比べげっ歯類で酵素活性が高いことが知られており (Sims and Grover, 1965; Jackson et al., 2000; Grover and Sims, 1964)、この代謝能の違いが非臨床安全性試験における毒性予測を困難にしている原因の一つと考えられている。活性代謝物が核酸やタンパク質と共有結合する結果、遺伝毒性や、直接的に細胞機能を傷害し臓器障害を引き起こす例も少なくない (有吉ら, 2000)。GSH は γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) により、グルタミン酸とシステインから γ -グルタミルシステインが合成され、さらに glutathione synthetase (GSS) によってグリシンと γ -グルタミルシステインから合成される (Orlowski and Meister, 1971)。この反応の律速酵素である γ -GCS は、ヘテロダイマーを形成している酵素であり、catalytic サブユニット (heavy chain; 73 kDa) および modulatory サブユニット (light chain; 27.7 kDa) から構成されており、catalytic サブユニットは酵素活性部位として、modulatory サブユニットは GSH 蓄積による GSH 合成のフィードバック阻害を減弱させることが知られている (Huang et al., 1993)。また、

catalytic サブユニットのノックアウトは胎生致死である (Dalton et al., 2000)。

現在、ある特定の遺伝子がどのような機能に影響を及ぼすかを検討する方法として、RNA interference (RNAi) による標的遺伝子のノックダウンが簡便なものとして利用されている。RNAi は二本鎖 RNA が生体内に取り込まれた後、RNase III ファミリーに属する Dicer という酵素によって 2 塩基のオーバーハングを持つ 20 塩基程度の small interfering RNA (siRNA) に分割され (Elbashir et al., 2001b)、その siRNA が RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれ、相補的な配列を持つ RNA を分解するという現象である (Hammond et al., 2000)。近年、哺乳類細胞に対する RNAi が盛んに行われるようになり、様々研究分野に応用されはじめている。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法は *in vivo* での簡便な遺伝子導入法として注目されており、遺伝子治療の分野で様々な検討がなされている (Peng, 2005; Chu et al., 2004; Kruyt and Curiel, 2002)。さらに近年、生体内で siRNA として作用する short hairpin RNA (shRNA) を発現する配列を組み込んだアデノウイルスを用い

た検討がマウスで行われ、ノックダウンを行うことによる目的遺伝子の生体での役割、薬物開発のターゲット因子の決定等の検討がされている (Xu et al., 2006)。

本研究室では、 γ -GCS の heavy chain に相補的な short hairpin RNA を発現するアデノウイルス (AdGCSh-shRNA) をすでに作製している。さらに、アデノウイルスが主に肝組織に感染することを利用し、ラット肝臓中の γ -GCS の heavy chain をノックダウンさせ、GSH 合成を抑制させた GSH 減少モデルラットにおいて、GSH 減少によって毒性が増強される典型的肝障害化合物であるアセトアミノフェン (APAP) による肝障害を高感度に検出した (Akai et al., 2007)。本研究では、GSH 減少ラットにジクロフェナクあるいはフルタミドを投与することで、薬物誘導性肝障害の発現について検討した。

薬物誘導性肝障害は、医薬品の販売中止の主な理由の一つであり、米国では、急性の肝障害の 50%以上を占めている (Lee, 2003)。肝機能の変化における最も重要な所見として“Hy's Law”と呼ばれる法則に言及する報告がある (Temple, 2001)。この法則のひとつ

では、肝障害時に上昇する血清パラメーターである AST あるいは ALT 値が通常の状態と比較して3倍以上に上昇すると一般的に肝障害を示すと規定している。本研究では、AST および ALT 値に加えてビリルビン値と肝組織像によって肝障害の発現を検討することにした。

現在ヒトに使用されている多くの薬物には、頻度は低いものの肝障害の報告がある。中でも本研究では、ジクロフェナクおよびフルタミドに注目した。

ジクロフェナクは、非ステロイド性消炎鎮痛剤の一種であり、その作用機序は主としてアラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼの活性を阻害することにより、炎症、疼痛等に関与するプロスタグランジン (PG) の合成を阻害するものと考えられている。しかし、一部の患者に重篤な肝障害を引き起こすことが報告されている (Purcell et al., 1991; Walker, 1997)。

ジクロフェナクは活性代謝物となる経路として二つの経路が同定されており、一つ目は UDP-glucuronosyltransferase (UGT) によって acyl glucuronide が、二つ目はシトクロム P450 (CYP) によって

quinoneimine が生成すると考えられている (Tange et al., 1999a; Poon et al., 2001; Kretz-Rommel and Boelsterli, 1993)。また、ジクロフェナクと GSH との複合体が、ジクロフェナクとともに培養したヒト肝細胞、ラット肝細胞やラット肝ミクロソーム、さらに、ジクロフェナクを投与したラットの胆汁およびジクロフェナクを服用したヒトの尿中から検出されている (Tang et al., 1999a; Grillo et al., 2003; Poon et al., 2001)。

フルタミドは、前立腺癌の治療に用いられる非ステロイド性抗アンドロゲン薬であり、その作用機序は、水酸化フルタミドに代謝され前立腺癌内に存在するアンドロゲンレセプターに結合し、アンドロゲン作用を阻害することにより抗腫瘍効果を発揮するものと考えられている。しかし、肝障害のマーカーであるトランスアミナーゼが一時的に増加することや、稀に重篤な肝障害を引き起こすことが報告されている (Wysowski and Fourscroy, 1996; Osculati and Castiglioni, 2006; Gomez et al., 1992; Cetin et al., 1999; Nakagawa et al., 1999)。

フルタミドは CYP によって酸化され、活性代謝物を生成するとされてい

るが、その明確な構造は同定されていない。しかし、フルタミドと GSH との複合体は、フルタミドとともに培養したヒト肝ミクロソームや前立腺癌患者の尿中から検出されている (Kang et al., 2007; Soglia et al., 2006; Tevel et al., 2006)。

以上のことから、ジクロフェナク、フルタミドはともに GSH 抱合により解毒されることが示唆される。そこで本研究では、ジクロフェナクおよびフルタミドを用いて、GSH 減少モデルラットが薬物による急性、および亜急性の薬物誘導性肝障害を広く、高感度に検出する際に有用であるかについて検討した。

B. 研究方法

B-1 実験材料および試薬

ヒト胎児腎由来 293 細胞は、大日本製薬 (Osaka, Japan) から購入した。DMEM 培地は日水製薬 (Tokyo, Japan) より、ウシ胎児血清 (FBS) はインビトロジェン (Melbourne, Australia) より、Cell matrix TypeI-C は新田ゼラチン (Osaka, Japan) より購入した。ウイルス力価測定に用いた QuickTiter™ Adenovirus Titer Immuno- assay Kit はコスモバイオ (Tokyo, Japan) より、

Bovine serum albumin (BSA)、Diclofenac sodium salt は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。0.22 μ m PES ボトルトップフィルターは Corning (New York, USA) より購入した。アデノウイルス濃縮に用いた Amicon Ultra-15 はミリポア (Osaka, Japan) より購入した。Glutathione Reductase (1000 Units/mL)、GSH、DTNB、カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC)、トランスアミナーゼ CII-テストワコーキット、ビリルビン BII-テストワコーキットおよび Flutamide はいずれも和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。10 cm シャーレは Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ) より購入した。吸光度の測定には日立の分光光度計 U-2001 (Tokyo, Japan) を使用した。その他の試薬は和光純薬工業等の特級または生化学用のものを用いた。

B-2 細胞培養

293 細胞は 10% FBS と NEAA を含む DMEM を用いて 10 cm シャーレで培養した。継代時、培地を除去した後 1 × PBS 溶液 4 mL を加え、培地を 5 mL 入れておいた 50 mL のチューブにシャーレより剥離した細胞を移し、4,000

rpm (1,000 g)、4°C で 5 分間遠心分離した。得られた沈殿を再度培地に懸濁してシャーレに播種し、5 % CO₂ 存在下 37°C で培養した。

B-3 アデノウイルス液の調製

本研究室で作成済みのアデノウイルス液から、293 細胞を用いて以下の方法で大量調製を行った。コラーゲンコートした 10 cm シャーレにコンフルエントに増やした 293 細胞を用意し、アデノウイルス液を 2 mL、ウイルス量 MOI 10 で感染させた。シャーレを数回振とうさせる操作を 15 分間隔で 3 回行い、その間細胞は、5% CO₂ 存在下 37°C でインキュベートした。1 時間の感染後 5% FBS-DMEM 5 mL 加え、3 日後に培養液ごと細胞を回収し、50 mL チューブにシャーレ 5 枚分の 293 細胞を培地ごと集め、4,000 rpm (1,000 g)、4°C で 5 分間遠心分離した。次回からのウイルス感染を行うため上清 25 mL を別の容器に移し、一時的に保存した。残りの細胞の沈殿および培養液を回収し、シャーレ 20 枚分を 50 mL チューブに集めた。この操作を数回繰り返す。シャーレ 20 枚分のアデノウイルス感染 293 細胞が入った 50 mL チューブを大量に作成し、ドライアイス

および 37°C 水浴を用いて凍結融解を 3 回繰り返し、5,000 rpm (1,500 g)、4°C で 15 分間遠心分離した。上清を回収し、0.22 μm PES ボトルトップフィルターに通して均一に混合した後、50 mL チューブに分注し、使用する直前まで -80°C で保存した。

B-4 アデノウイルス液の濃縮

Amicon Ultra-15 に本研究室で作成した力価測定済みアデノウイルス液を添加し、3,000 rpm (700 g)、4°C で遠心分離し、目的のウイルス濃度になるまでアデノウイルス液を限界ろ過法にて濃縮した。

B-5 アデノウイルス液の力価測定

QuickTiter™ Adenovirus Titer Immunoassay Kit を用い、添付のプロトコールに従い以下の方法でアデノウイルス液の力価を測定した。I-2-2 の操作に従い回収した 293 細胞 2.5 × 10⁵ cells/mL の細胞懸濁液を、5% FBS を含む DMEM を用いて調製した。コラーゲンコートした 24 ウェルプレートに 293 細胞懸濁液を各ウェル 1 mL ずつ加え、5% CO₂ 存在下 37°C で 1 時間培養した。作製したウイルス原液 10 μL と 5% FBS を含む DMEM 990 μL を

混合し、 10^{-2} ウイルス液を作製した。さらに 10^{-2} ウイルス液 $100 \mu\text{L}$ と 5 % FBS を含む DMEM $900 \mu\text{L}$ を混合し、 10^{-3} ウイルス液を作製した。同様の操作をさらに 4 回繰り返す、 10^{-3} から 10^{-7} 倍のウイルス希釈液を作成し、24 well プレートの左端のウェルから $100 \mu\text{L}$ ずつ加えた。一番右端のウェルはブランクとして、5% FBS を含む DMEM を $100 \mu\text{L}$ 加えた。その後 5% CO_2 存在下 37°C で 48 時間培養した。48 時間後培養液を回収し、各ウェルに 0.5 mL ずつ冷メタノールを加え、 -20°C に 20 分間置き、細胞を固定させた。細胞を 2 回、 $1 \times \text{PBS } 250 \mu\text{L}$ で 5 分間洗浄した。 $1\% \text{ BSA in } 1 \times \text{PBS}$ を各ウェル $250 \mu\text{L}$ ずつ加え、1 時間室温で振とうした。 $1\% \text{ BSA in } 1 \times \text{PBS}$ を除き diluted $1 \times \text{anti-Hexon antibody}$ を各ウェルに $250 \mu\text{L}$ ずつ加え、1 時間室温で振とうした。細胞を 2 回、 $1 \times \text{PBS } 250 \mu\text{L}$ で 5 分間洗浄した。diluted $1 \times \text{secondary antibody solution}$ を各ウェル $250 \mu\text{L}$ ずつ加え、1 時間室温で振とうした。細胞を 3 回、 $1 \times \text{PBS } 250 \mu\text{L}$ で 5 分間洗浄した。Diluted $1 \times \text{DAB working solution}$ を各ウェル $250 \mu\text{L}$ ずつ加え、10 分間室温で振とうした。Diluted $1 \times \text{DAB working solution}$ を回収し、各ウ

ェルを $1 \times \text{PBS } 250 \mu\text{L}$ で細胞を 5 分間洗浄し、 $1 \times \text{PBS } 1 \text{ mL}$ を加えた。接眼レンズ、対物レンズともに 10 倍に設定した顕微鏡で各ウェルを観察した。視野の中に約 60 個の茶色に染色された細胞が現れるウイルス希釈 (dilution factor) のウェルを選び出し、少なくとも 5 視野の染色された細胞数を計測し、その平均値を求めた (average positive cells/field)。ウイルス力価 (Viral Titer) は以下の式に基づき算出した。なお、接眼レンズ、対物レンズともに 10 倍に設定した顕微鏡で 24 ウェルプレートを観察した場合、視野面積は 1.8 mm^2 である。24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり面積は 2.0 cm^2 であるので、補正值 (Fields/well) および Viral Titer (ifu/mL) は下記の通りとなる。

$$(\text{Fields/well}) = 2.0 \text{ cm}^2 / 2.54 \text{ cm}^2 \times 10^{-2} \text{ cm}^2 = 79$$

$$\text{Viral Titer (PFU/mL)} = (\text{average positive cells/field} \times (79 \text{ fields/well}) \times (\text{dilution factor}) / (0.1 \text{ mL}))$$

B-6 ラットへのアデノウイルスおよび薬物の投与

Fisher 344 系ラット (雄性、8 週齢 $140 \sim 160 \text{ g}$; 日本 SLC, Shizuoka, Japan)

に、AdGCSh-shRNA またはルシフェラーゼ (Luc) に相補的な shRNA を発現するアデノウイルス (AdLuc-shRNA) を 1.5×10^{11} PFU/mL に調製し、尾静脈より投与 (1 mL/body) した (Sima et al., 2007)。単回投与実験ではアデノウイルス投与 10 日後に、連続投与実験ではアデノウイルス投与 2 週間後に薬物投与実験を行った。単回投与実験では、ジクロフェナクについては生理食塩水に溶解させたものを腹腔内投与 (0、50、100 mg/kg) した。各群 3~5 匹のラットを使用した。フルタミドについては 0.5% CMC に懸濁させたものを経口投与 (0、1,000、1,500 mg/kg) した。各群 3~5 匹のラットを使用した。薬物投与前および投与 6 時間後に尾静脈より採血を行い、投与 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。連続投与実験では、ジクロフェナクについては生理食塩水に溶解させたものを 1 日 1 回 1 週間腹腔内投与 (0、5、10 mg/kg) した。各群 3~5 匹のラットを使用した。フルタミドについては 0.5% CMC に懸濁させたものを 1 日 1 回 1 週間経口投与 (0、100、500 mg/kg) した。各群 3~5 匹のラットを使用した。薬物投与前に尾静脈より採血を行い、ジクロフェナクに

ついては 7 日間連続投与の 6 時間後に、フルタミドについては 7 日間連続投与の 24 時間後に下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-7 肝臓中総 GSH 含量の測定

Tietze (1969) の方法を一部修正して、以下の方法によって肝臓中総 GSH 含量を測定した。ラット肝 100 mg に対して 5% スルホサリチル酸 1 mL 加え、ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、1.5 mL チューブに分注後、10,000 rpm (6,500 g)、4°C で 10 分間遠心分離した後、上清を新しいチューブに移した。検量線は 200 μ M GSH 溶液を 0.5% Sulfosalicylic acid 100 μ L を用いて、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 および 100 μ M となるように希釈して使用した。96 ウェルプレートを用いて、各ウェルに 0.3 mM β -NADPH 溶液 140 μ L と 4.8 mM DTNB 溶液を 25 μ L 加え、5 分間室温で反応させ、検量線溶液と上記操作で得られた肝ホモジナイズ溶液の上清を 20 μ L ずつ加えた。Glutathione reductase 溶液 (4 Units/mL) 25 μ L を加え、5 分後 405 nm の吸光度を Biotrak II plate reader を用いて測定し、肝臓中総 GSH 含量を定量した。

B-8 AST および ALT 値の測定

ラットの末梢血を尾静脈または下行大静脈より採取した。1 時間室温で放置し、5,000 rpm (1,500 g)、4°C で 15 分間遠心分離した後、血清約 50 μ L をサンプルチューブに採取した。AST および ALT 値をトランスアミナーゼ CII-テストワコーキットを用い、マニュアルに従って以下の方法で定量した。血清 10 μ L に AST または ALT 用基質酵素液を 250 μ L 加えた後よく混合し、37°C で 5 分間インキュベートした後、発色試液を加えよく混合し、37°C で正確に 20 分間加温した。20 分後に反応停止液を加えて反応を停止させ、よく混合後、555 nm での吸光度を測定し、AST および ALT 活性を測定した。

B-9 総ビリルビン濃度の測定

ラットの末梢血を尾静脈または下行大静脈より採取した。1 時間室温で放置し、5,000 rpm (1,500 g)、4°C で 15 分間遠心分離した後、血清 100 μ L をサンプルチューブに採取した。総ビリルビン量をビリルビン BII-テストワコーキットを用い、マニュアルに従って以下の方法で定量した。室温で血清 25 μ L に対して、総ビリルビン測定用発

色試液 A 250 μ L、発色試液 B 250 μ L を加えて直ちに混合し、12 分間室温に放置した。その後、発色試液 C を 250 μ L 加えた後よく混合し、600 nm での吸光度を測定し総ビリルビン量を定量した。

B-10 倫理

本検討における動物実験については、全て金沢大学動物実験指針に従って行った。

C. 実験結果

C-1 ジクロフェナクによる急性肝障害の検討

薬物の投与経路としては、ヒトと同じく経口投与が望ましい。しかし、ジクロフェナクは、主な副作用として消化管潰瘍などの消化器系の症状がある。そこで、消化器系の副作用を避け、肝障害への影響を検討するために投与経路は腹腔内投与とした。肝臓中総 GSH 含量を減少させる AdGCSH-shRNA またはネガティブコントロールである AdLuc-shRNA を投与し、2 週間が経過したラットにジクロフェナクを 0、50 および 100 mg/kg 単回投与した。投与 6、24 時間後に血清を採取し、肝障害時に上昇する血清

パラメーターである AST、ALT および総ビリルビン値を測定した。AdLuc-shRNA は肝臓中総 GSH 含量を減少させないことが報告されている (Akai et al., 2007)。

その結果、AdLuc-shRNA を投与した群においては、非投与群と比べて、50 および 100 mg/kg のジクロフェナク投与による AST および ALT 値の有意な上昇は認められなかった。しかし、AdGCSh-shRNA を投与した群においては、投与 6 時間後において、100 mg/kg のジクロフェナク投与で、有意な AST および ALT 値の上昇 (AST : 349 ± 131 U/L, ALT : 79 ± 41 U/L) が AdLuc-shRNA 投与群 (AST : 37 ± 4 U/L, ALT : 14 ± 3 U/L) と比べて認められた。一方、50 mg/kg のジクロフェナク投与では、わずかながら AST および ALT 値の上昇 (AST : 108 ± 54 U/L, ALT : 24 ± 7 U/L) が AdLuc-shRNA 投与群と比べて認められた (Figs. 1A and 1B)。投与 24 時間後においても、値は減少したものの、AdGCSh-shRNA 投与群において、100 mg/kg のジクロフェナク投与で有意な AST および ALT 値の上昇 (AST : 105 ± 42 U/L, ALT : 36 ± 16 U/L) が AdLuc-shRNA 投与群 (AST : 36 ± 5

U/L, ALT : 13 ± 2 U/L) と比べて認められた。一方、総ビリルビン値は AdLuc-shRNA 投与群および AdGCSh-shRNA 投与群ともにジクロフェナク投与による有意な上昇は認められなかった (Fig. 1C)。さらに、AdGCSh-shRNA 投与ラットにおけるジクロフェナク単回投与による肝障害性の検討をするため、HE および Ag 染色による肝組織像の検討を行った。結果として、典型的な薬剤性肝障害に見られるような肝細胞脱落などは認められなかった。しかし、AdGCSh-shRNA を投与した群においては、100 mg/kg ジクロフェナク投与によって中心静脈周囲で繊細な繊維化が軽度に認められる傾向があった (data not shown)。

C-2 ジクロフェナクによる亜急性肝障害の検討

ネガティブコントロールとして AdLuc-shRNA あるいは PBS を投与したラットを使用した。以前の本研究室での検討で、AdLuc-shRNA 投与群と PBS 投与群との間に有意な GSH 含量の減少は認められず、ウイルス投与による肝障害の影響もまったく見られなかったことから、

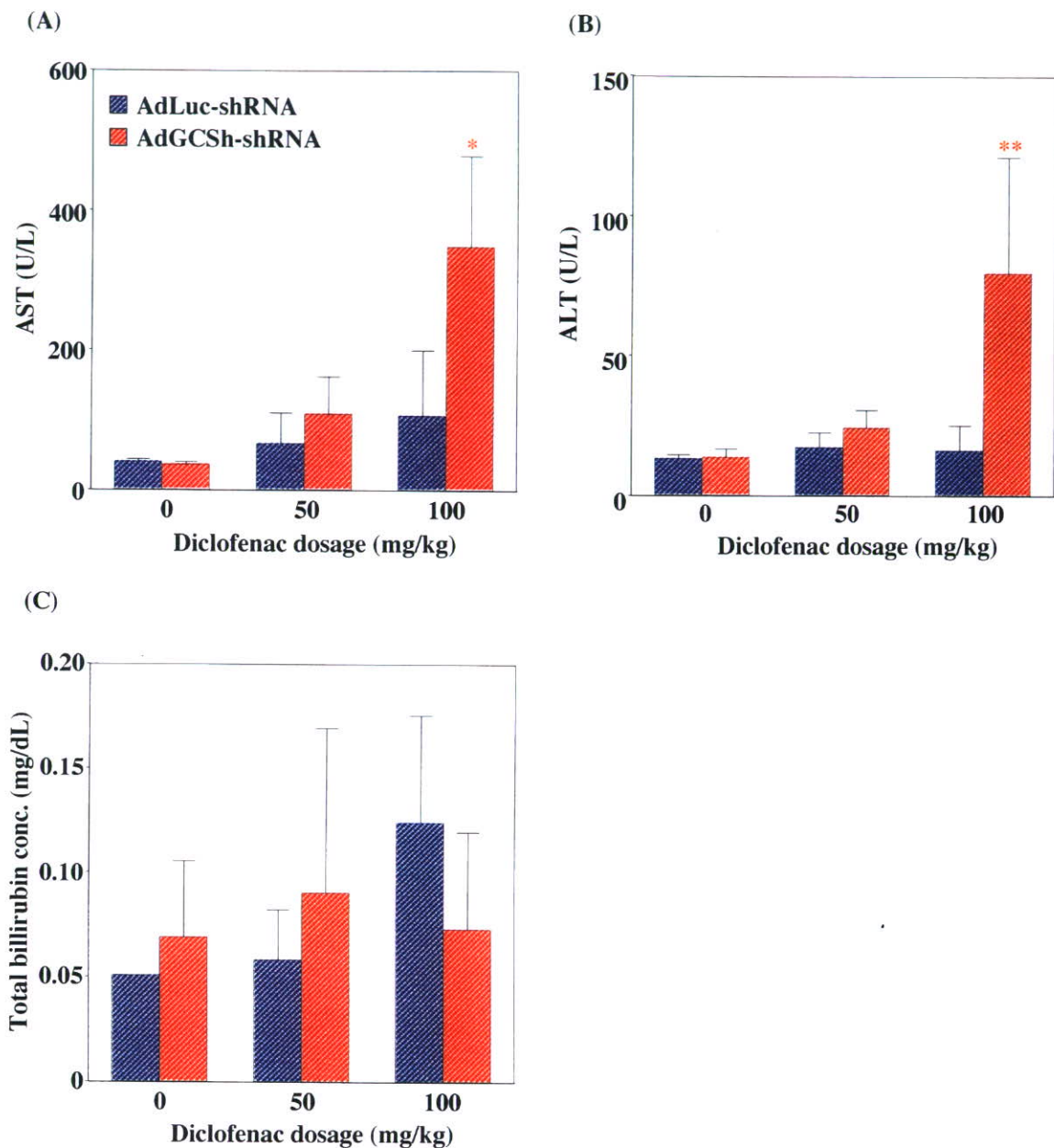


Fig. 1. Acute effects of diclofenac on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSH-shRNA infected rat. Diclofenac were intraperitoneally administered 0, 50 or 100 mg/kg. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 6 hrs after administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with each AdLuc-shRNA infected group.

ネガティブコントロールとして AdLuc-shRNA 投与群の代わりに PBS 投与群で検討することが可能であることが示唆された (data not shown)。さ

らに本研究では、ジクロフェナクによる急性の肝障害の検討で、AdLuc-shRNA 投与群と PBS 投与群との間に有意な差は認められなかった (data not shown)。よって、以降の検討ではネガティブコントロールとして PBS 投与群を使用することにした。

AdGCSh-shRNA またはネガティブコントロールである PBS を投与し、10 日が経過したラットに、1 日 1 回 1 週間ジクロフェナクを腹腔内に 0、5 および 10 mg/kg 連続投与した。最後の投与を行った 6 時間後に血清を採取し、AST、ALT および総ビリルビン値を測定した。その結果、PBS を投与した群においては、0 mg/kg 投与群と比べて、5 および 10 mg/kg のジクロフェナク投与による AST および ALT 値の有意な上昇は認められなかった (Figs. 2A and 2B)。一方、AdGCSh-shRNA を投与した群においては、最終投与から 6 時間後において、10 mg/kg のジクロフェナク投与で、有意な ALT 値の上昇 (14 ± 2 U/L) が PBS 投与群 (8 ± 1 U/L) と比べて認められた (Fig. 2B)。しかし、AdGCSh-shRNA を投与したジクロフェナク非投与群と比較すると有意な上昇は認められなかった。一方、総ビリルビン値は PBS 投与群および

AdGCSh-shRNA 投与群ともにジクロフェナク投与による有意な上昇は認められなかった (Fig. 2C)。

また、AdGCSh-shRNA 投与群にジクロフェナクを 20 mg/kg 連続投与すると 5 匹中すべてのラットが死亡した (data not shown)。

C-3 フルタミドによる急性肝障害の検討

AdGCSh-shRNA またはネガティブコントロールである PBS を投与し、2 週間が経過したラットにフルタミドを 0、1,000 および 1,500 mg/kg 単回経口投与した。投与を行った 6、24 時間後に血清を採取し、AST、ALT および総ビリルビン値を測定した。その結果、PBS を投与した群においては、非投与群と比べて、1,000 および 1,500 mg/kg のフルタミド投与による AST および ALT 値の有意な上昇は認められなかった。しかし、AdGCSh-shRNA を投与した群においては、投与 24 時間後において、1,500 mg/kg のフルタミド投与で、有意な AST および ALT 値の上昇 (AST : 420 ± 192 U/L, ALT : 161 ± 79 U/L) が PBS 投与群 (AST : 39 ± 9 U/L, ALT : 13 ± 2 U/L) と比べて認められた。

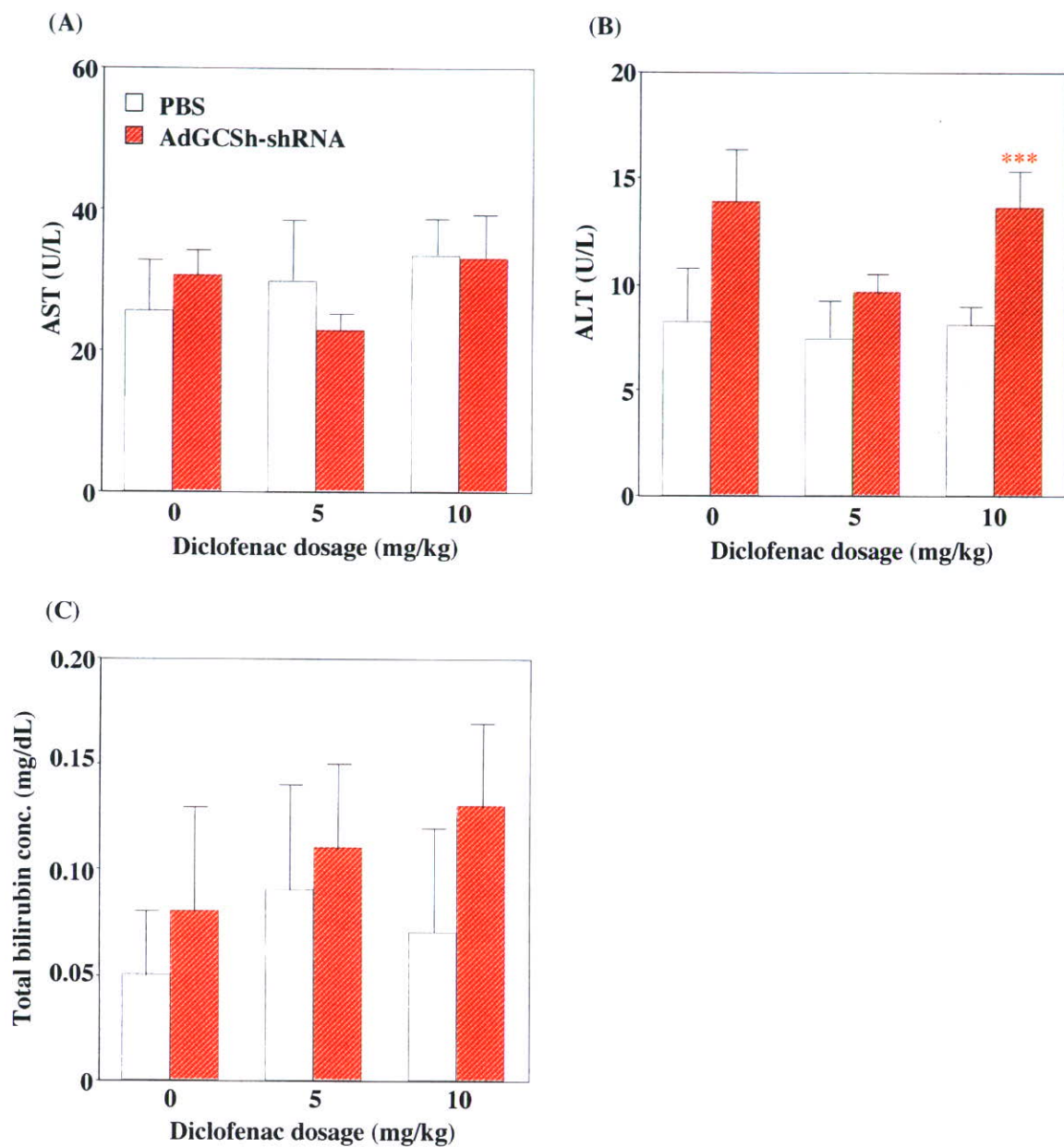


Fig. 2. Subacute effects of diclofenac on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSH-shRNA infected rat. Diclofenac were intraperitoneally administered 0, 5 or 10 mg/kg once a day for a week. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 6 hrs after the last administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). *** $P < 0.001$ compared with PBS treated group.

さらに、1,000 mg/kg のフルタミド投与でも同様に、有意な AST および ALT

値の上昇 (AST : 431 ± 230 U/L, ALT : 157 ± 76 U/L) が PBS 投与群 (AST : 55

± 35 U/L, ALT : 17 ± 5 U/L) と比べて認められた (Figs. 3A and 3B)。

一方、フルタミド投与6時間後では、PBS 投与群、AdGCSh-shRNA 投与群ともにフルタミド投与による AST および ALT 値の有意な上昇は認められなかった (data not shown)。

AdGCSh-shRNA 投与群においては、1,500 mg/kg のフルタミド投与において、24 時間後にわずかながらビリルビン値の上昇 (0.17 ± 0.07 mg/dL) が PBS 投与群 (0.08 ± 0.04 mg/dL) と比べて認められた。さらに、1,000 mg/kg のフルタミド投与でも同様に、24 時間後にわずかながらビリルビン値の上昇 (0.18 ± 0.08 mg/dL) が PBS 投与群 (0.08 ± 0.03 mg/dL) と比べて認められた (Fig. 3C)。AdGCSh-shRNA 投与ラットにおけるフルタミド単回投与による肝障害性への検討をするため、HE 染色による肝組織像の検討を行った (Fig. 4)。結果として、AdGCSh-shRNA 投与ラットにおいてのみ、フルタミド投与によって矢印の部分で示すように、中心静脈周辺が目立った肝細胞の変性が認められ、さらに肝細胞の脱落も認められた。また、微小な脂肪滴も認められた。

C-4 フルタミドによる亜急性肝障害の検討

AdGCSh-shRNA またはネガティブコントロールである PBS を投与し、10 日が経過したラットに、1 日 1 回 1 週間フルタミドを経口で 0、100 および 500 mg/kg 連続投与した。最後の投与を行った 24 時間後に血清を採取し、AST、ALT および総ビリルビン値を測定した。その結果、PBS を投与した群においては、非投与群と比べて、100 および 500 mg/kg のフルタミド投与による AST および ALT 値の有意な上昇は認められなかった。しかし、AdGCSh-shRNA を投与した群においては、最終投与から 24 時間後に、500 mg/kg のフルタミド投与で、有意な ALT 値の上昇 (36 ± 22 U/L) が PBS 投与群 (9 ± 3 U/L) と比べて認められた。一方 AST 値は、AdGCSh-shRNA 投与群において、500 mg/kg のフルタミド投与でわずかながら上昇が認められた (AdGCSh-shRNA infected group : 51 ± 30 U/L, PBS treated group : 25 ± 7 U/L)。また、100 mg/kg のフルタミド投与では、有意な ALT 値の上昇 (16 ± 1 U/L) が PBS 投与群 (10 ± 1 U/L) と比べて認められ、AST 値の上昇は認められな

かった (Figs. 5A and 5B)。

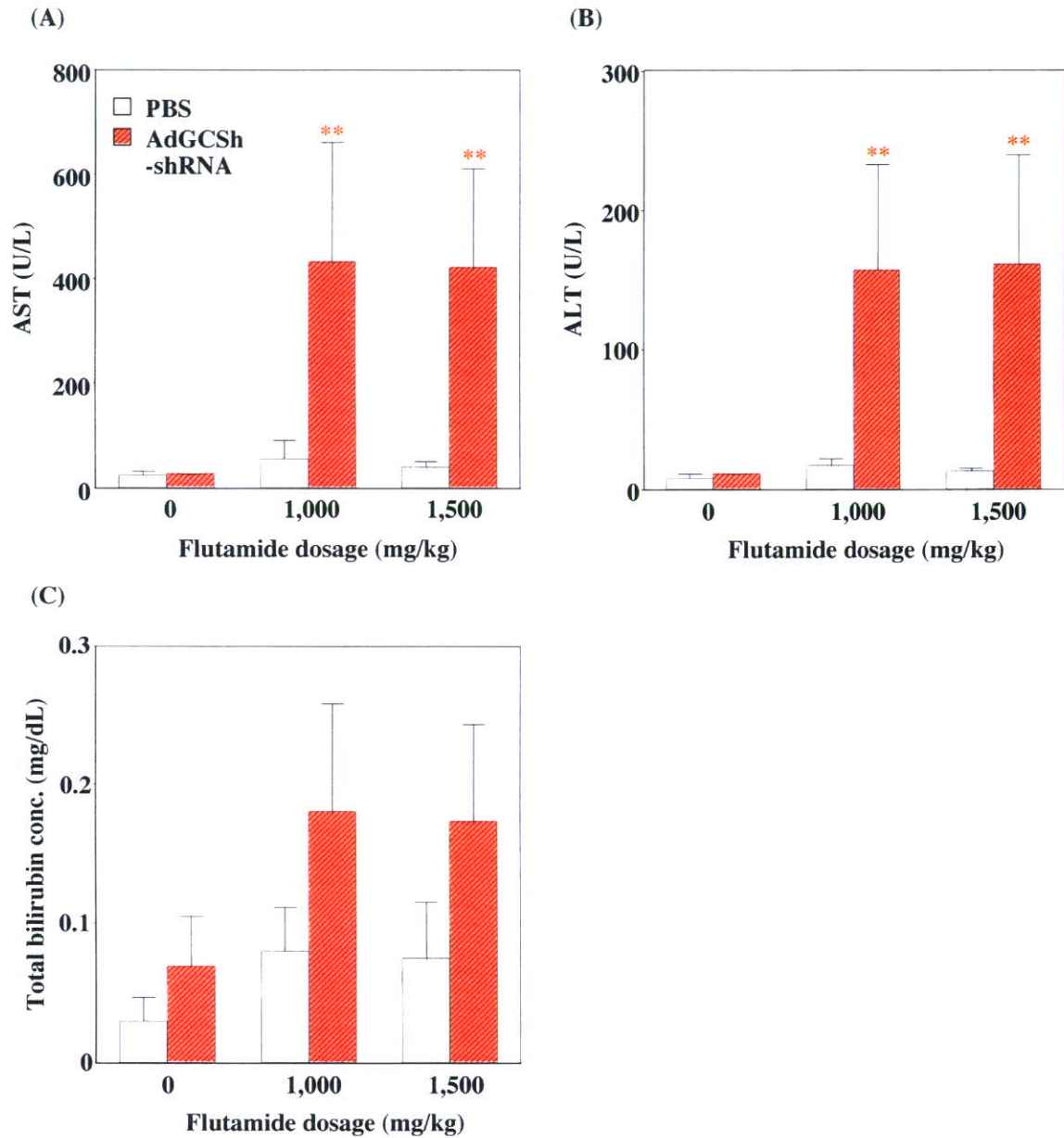


Fig. 3. Acute effects of flutamide on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSh-shRNA infected rat. Flutamide were orally administered 0, 1,000 or 1,500 mg/kg. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 24 hrs after administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). ** $P < 0.01$ compared with each PBS treated group.

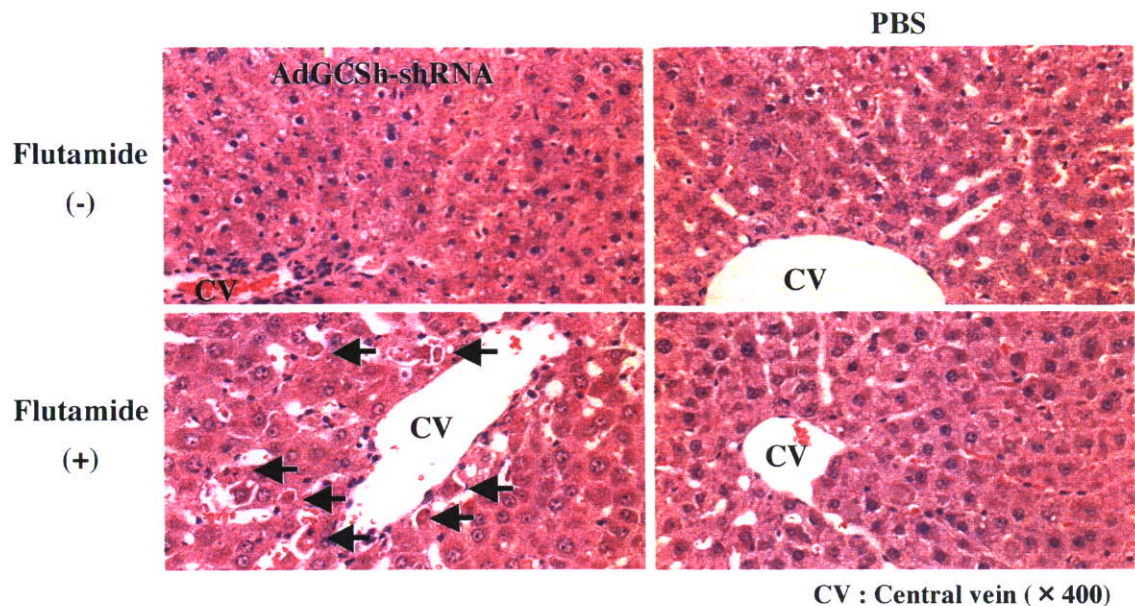


Fig. 4. Histopathological examination of liver 24 hrs after administration of flutamide in AdGCSh-shRNA infected rat. Arrows indicate area of degenerated hepatocyte in HE stained section caused by flutamide (1,500 mg/kg).

また AdGCSh-shRNA 投与群においては、500 mg/kg のフルタミド投与において、ビリルビン値の有意な上昇 (0.08 ± 0.02 mg/dL) が PBS 投与群 (0.04 ± 0.02 mg/dL) と比べて認められた。一方、100 mg/kg のフルタミド投与では、ビリルビン値の上昇は認められなかった (Fig. 5C)。

AdGCSh-shRNA 投与ラットにおけるフルタミド頻回投与による肝障害性への検討をするため、HE 染色による肝組織像の検討を行った (Fig. 6)。結果として、AdGCSh-shRNA 投与ラッ

トにおいてのみ、フルタミド投与によって矢印で示すように、肝細胞の変性が認められ、さらに肝細胞の脱落もいくつか認められた。

C-5 ジクロフェナク投与ラットにおける肝臓中総 GSH 含量減少の確認

ラットに AdGCSh-shRNA を 2×10^{11} PFU/body 投与すると、2 週間後肝臓中の GSH 含量が AdLuc-shRNA あるいは PBS を投与した群と比較して、80% 程度まで減少する (Akai et al., 2007)。

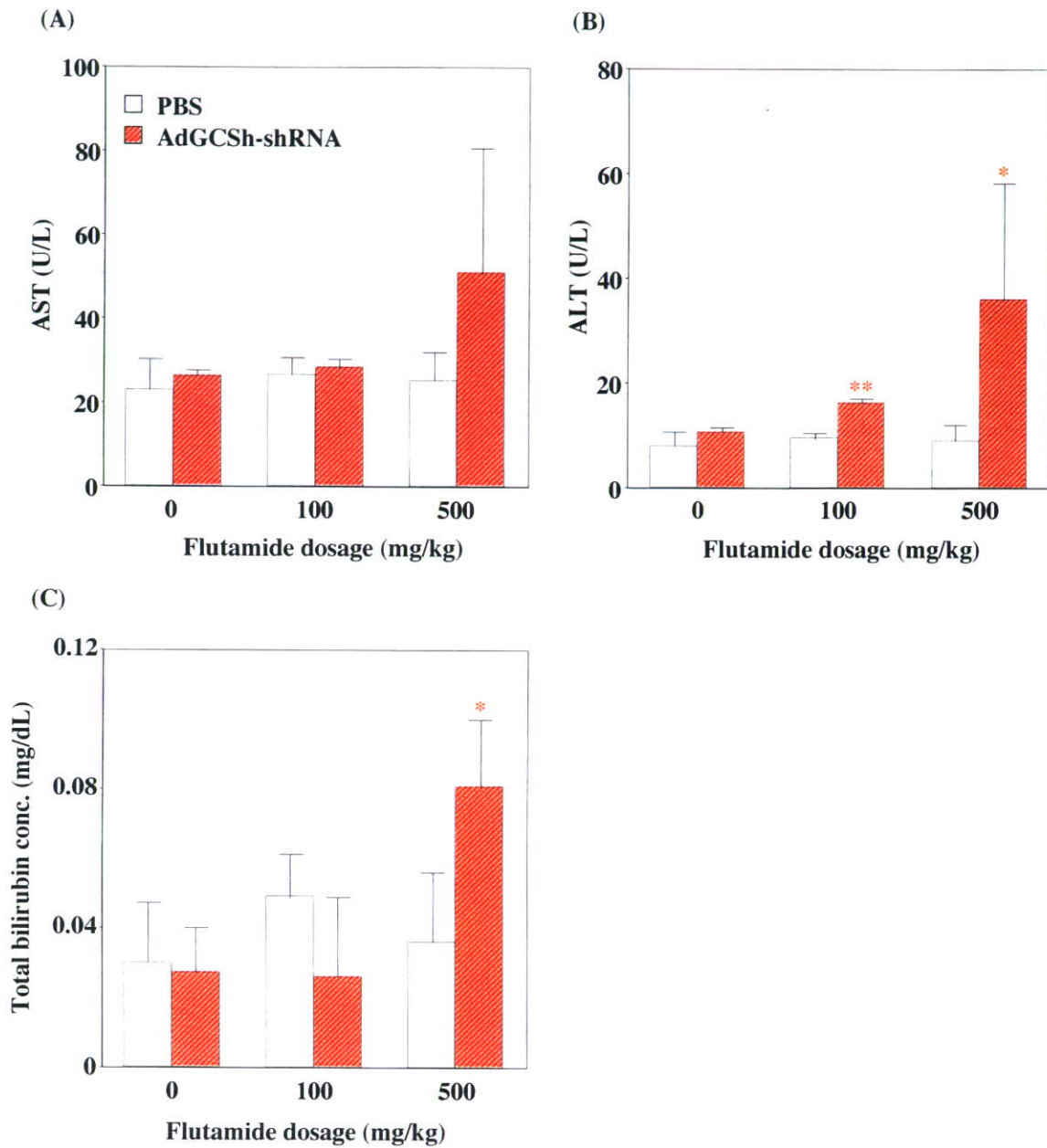


Fig. 5. Subacute effects of flutamide on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSH-shRNA infected rat. Flutamide were orally administrated 0, 100 or 500 mg/kg once a day for a week. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 24 hrs after the last administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with each PBS treated group.

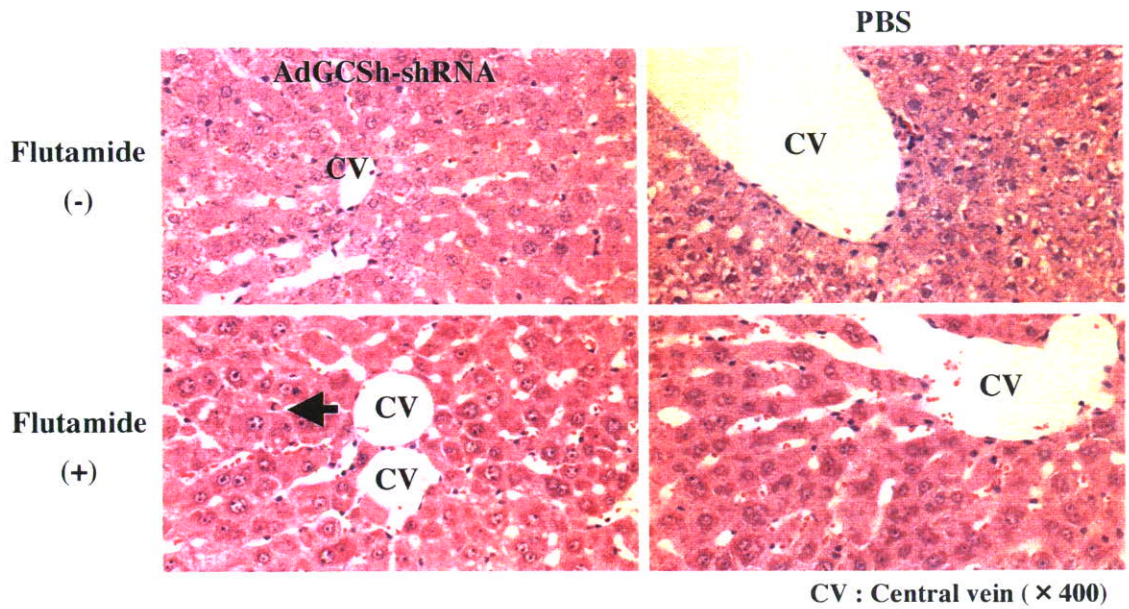


Fig. 6. Histopathological examination of liver 24 hrs after the last administration of flutamide in AdGCSh-shRNA infected rat. Arrow indicates area of degenerated hepatocyte in HE stained section caused by flutamide (500 mg/kg).

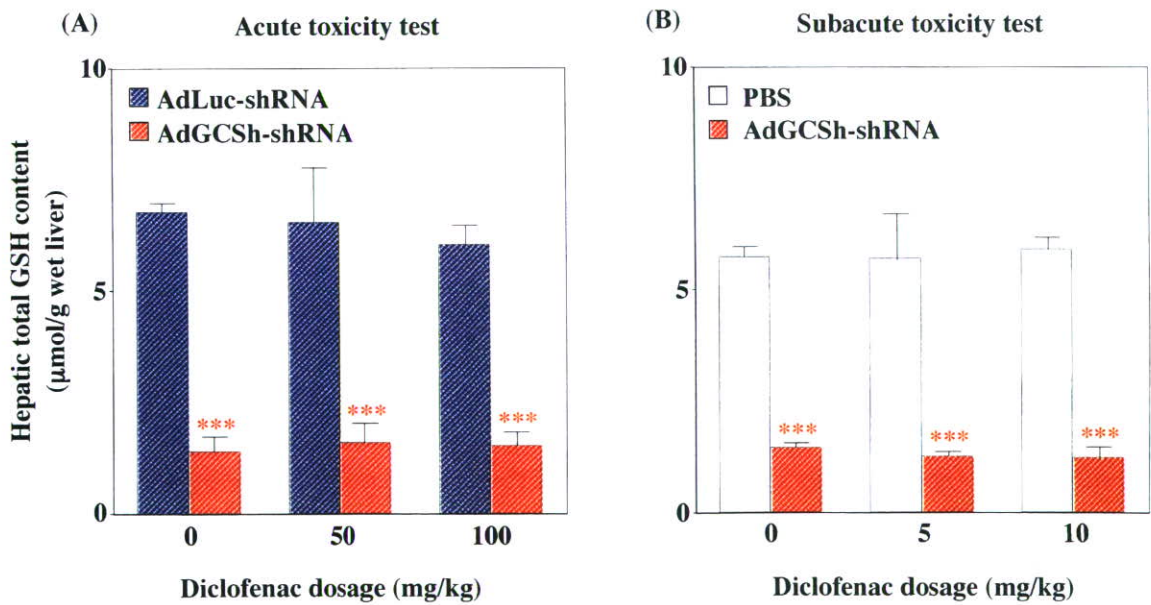


Fig. 8. Effect of AdGCSh-shRNA infection on hepatic total GSH content in diclofenac administered rat in acute or subacute toxicity test. Hepatic total GSH content is measured 6 hrs after administration in acute toxicity test (A) and 6 hrs after last administration in subacute toxicity test (B). Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). *** P < 0.001 compared with each AdLuc-shRNA or PBS treated group.