

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マイ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 Type1-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 μm 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 \times 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して、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 回繰り返して、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 回繰り返し、 10^3 から 10^7 倍のウイルス希釈液を作成し、24 well プレーッ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、

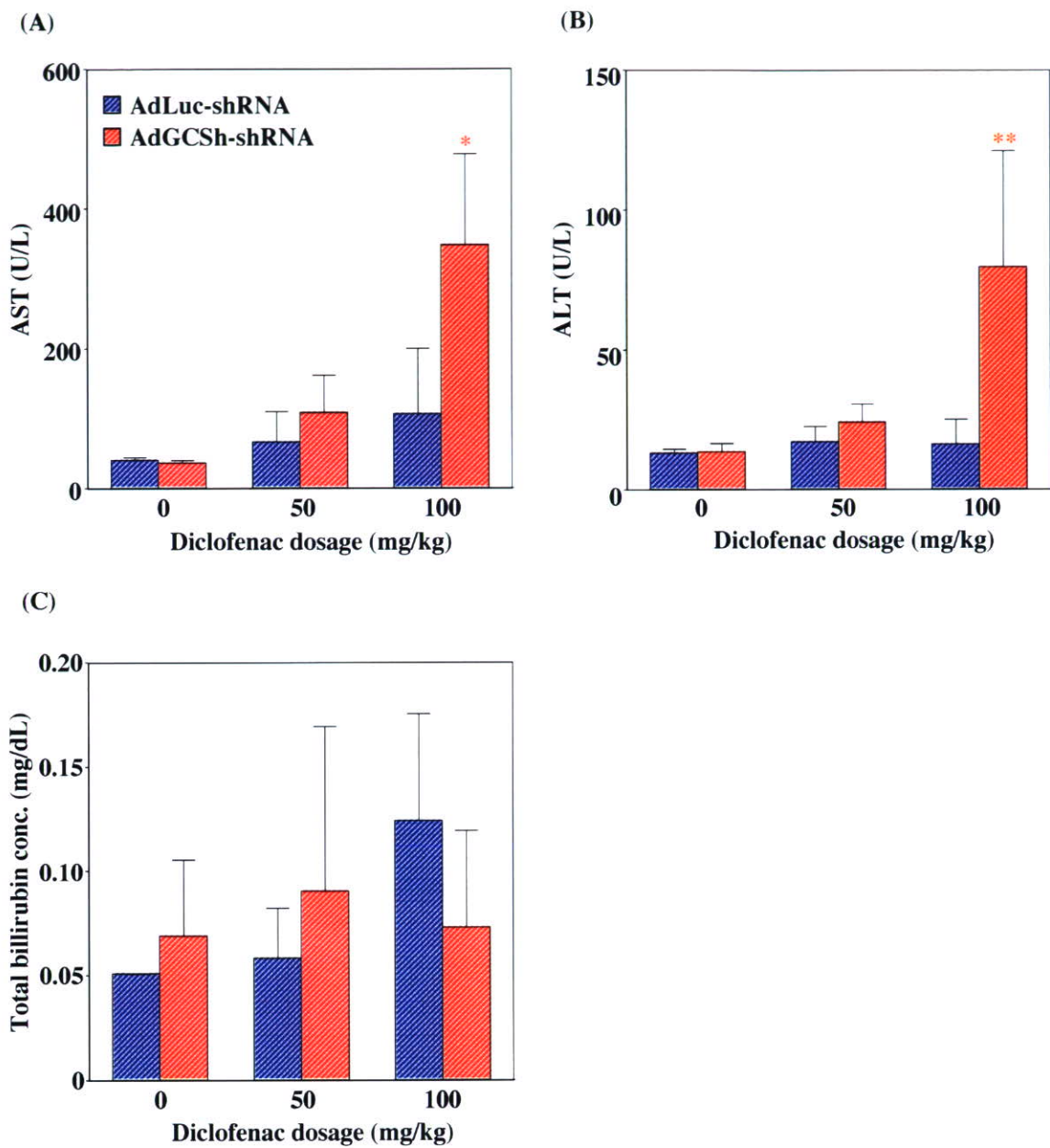


Fig. 1. Acute effects of diclofenac on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSH-shRNA infected rat. Diclofenac were intraperitoneally administered 0, 50 or 100 mg/kg. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 6 hrs after administration. Data are mean \pm SD (n = 3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

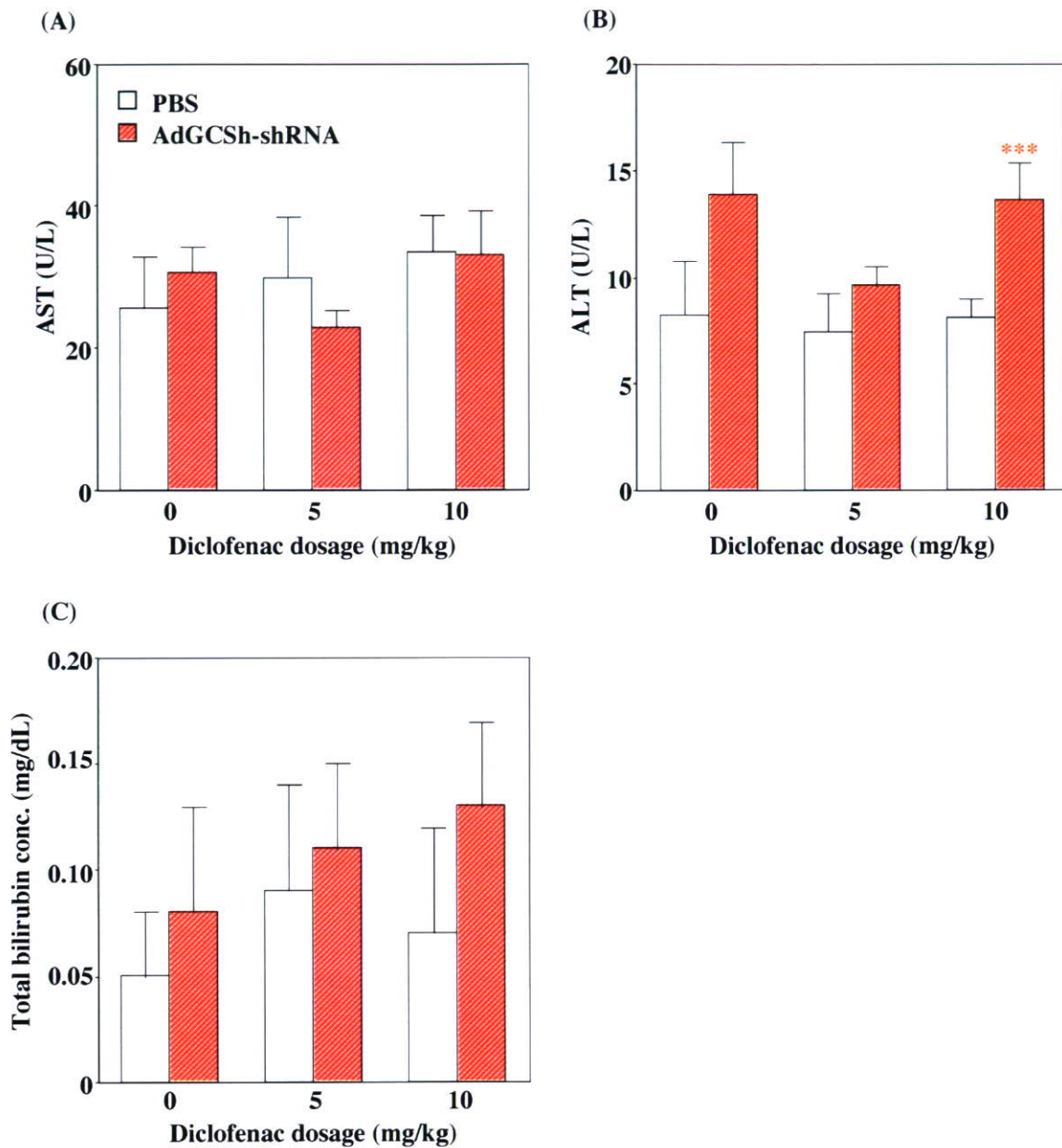


Fig. 2. Subacute effects of diclofenac on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSh-shRNA infected rat. Diclofenac were intraperitoneally administered 0, 5 or 10 mg/kg once a day for a week. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 6 hrs after the last administration. 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 時間後において、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)。

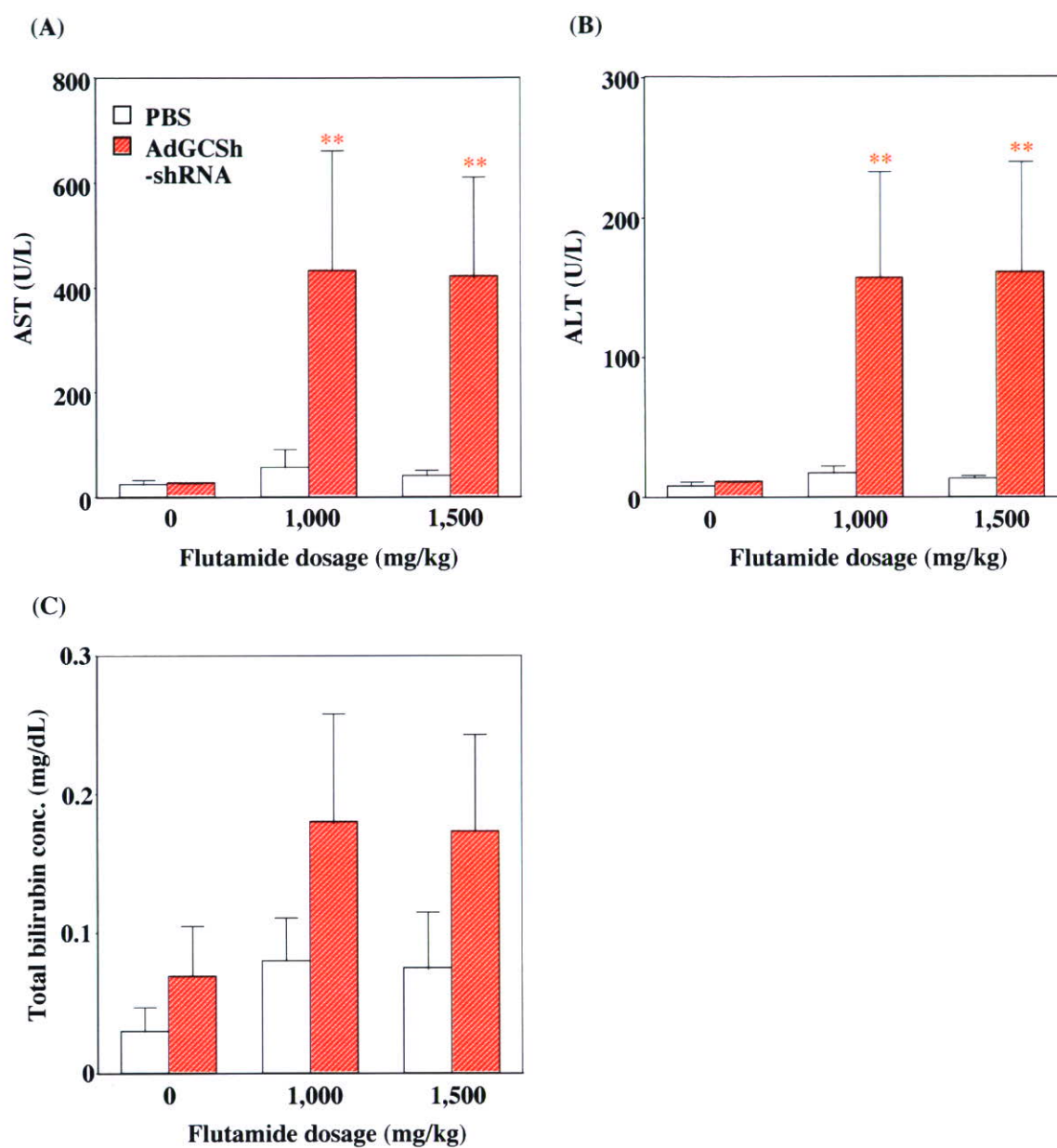


Fig. 3. Acute effects of flutamide on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSH-shRNA infected rat. Flutamide were orally administered 0, 1,000 or 1,500 mg/kg. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 24 hrs after administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5).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

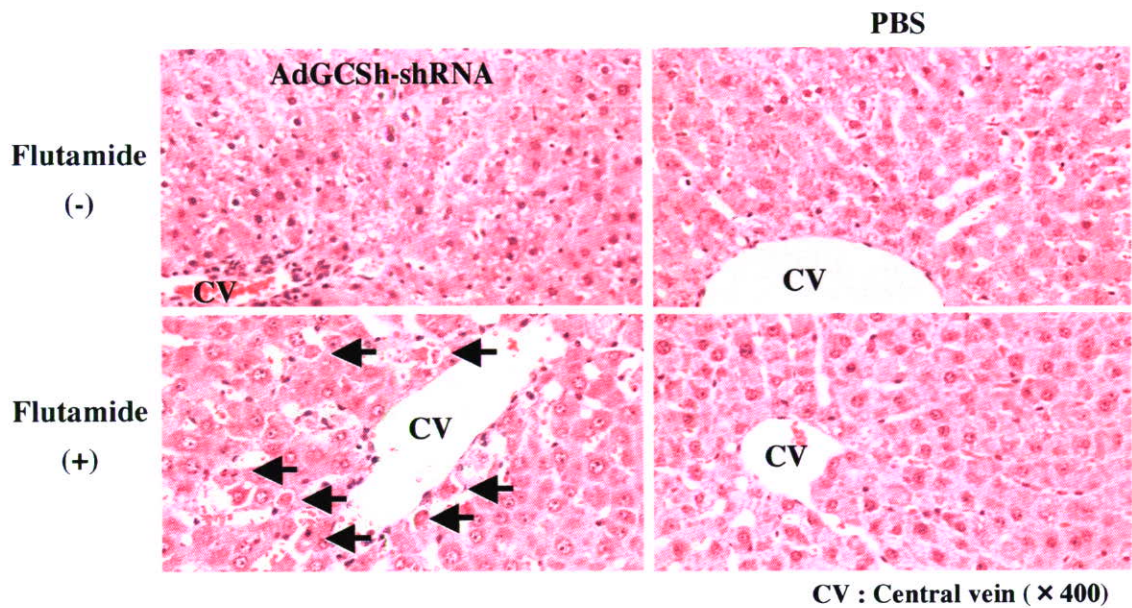


Fig. 4. Histopathological examination of liver 24 hrs after administration of flutamide in AdGCSH-shRNA infected rat. Arrows indicate area of degenerated hepatocyte in HE stained section caused by flutamide (1,500 mg/kg).

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)。

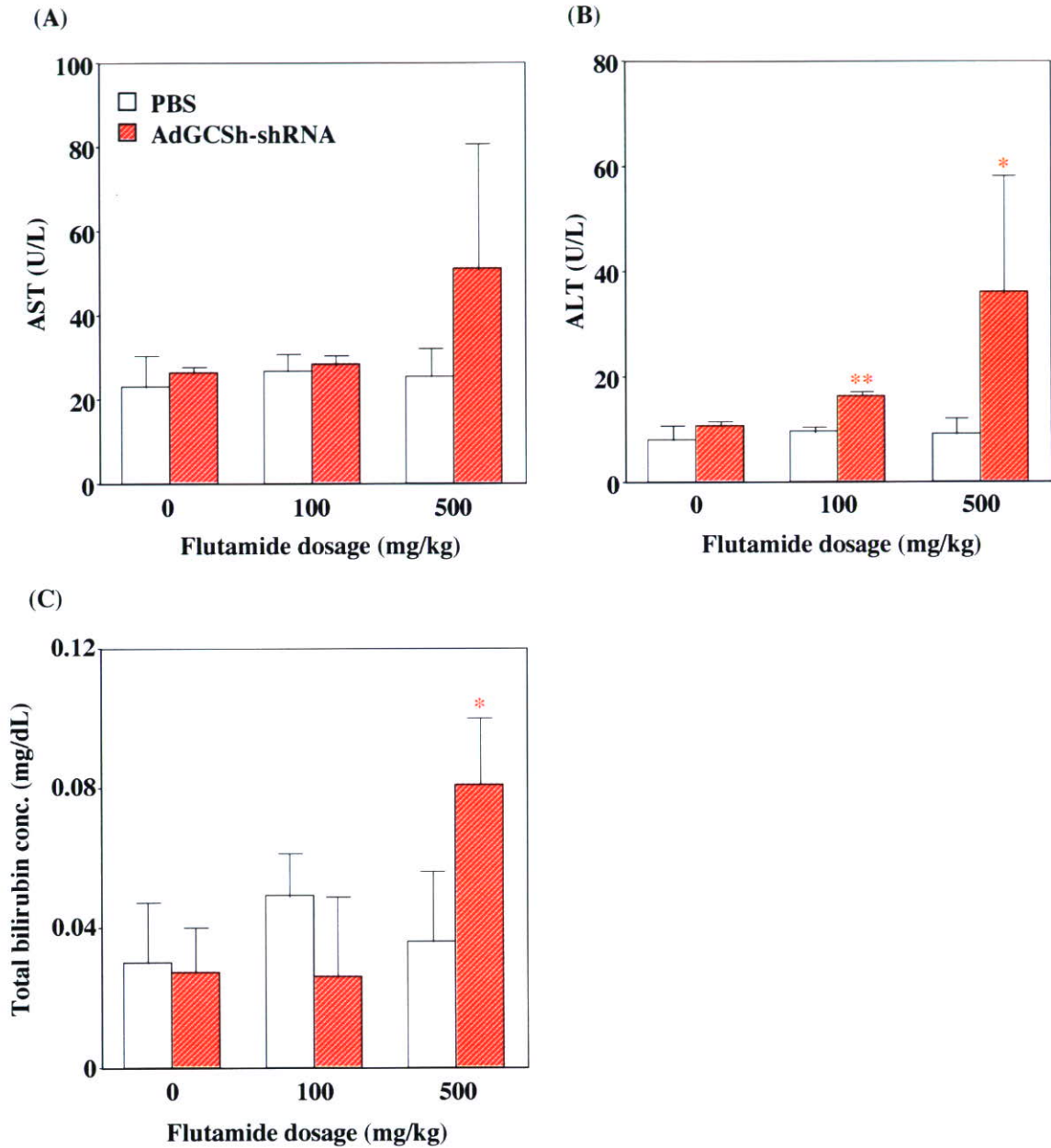


Fig. 5. Subacute effects of flutamide on serum AST, ALT and total bilirubin in AdGCSh-shRNA infected rat. Flutamide were orally administrated 0, 100 or 500 mg/kg once a day for a week. Serum AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 24 hrs after the last administration. Data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

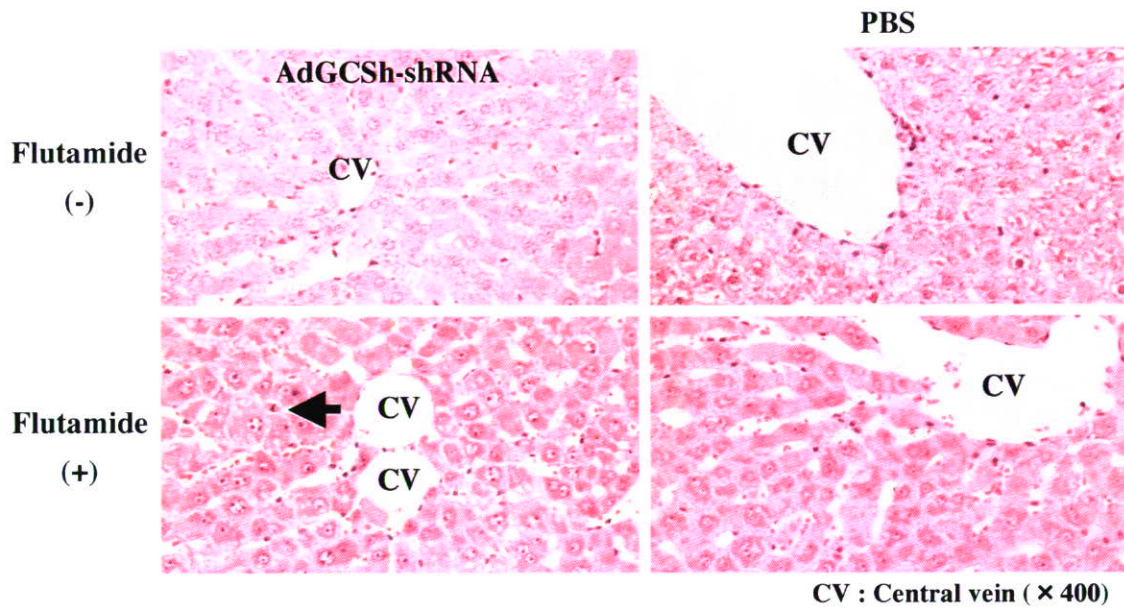


Fig. 6. Histopathological examination of liver 24 hrs after the last administration of flutamide in AdGCSH-shRNA infected rat. Arrow indicates area of degenerated hepatocyte in HE stained section caused by flutamide (500 mg/kg).

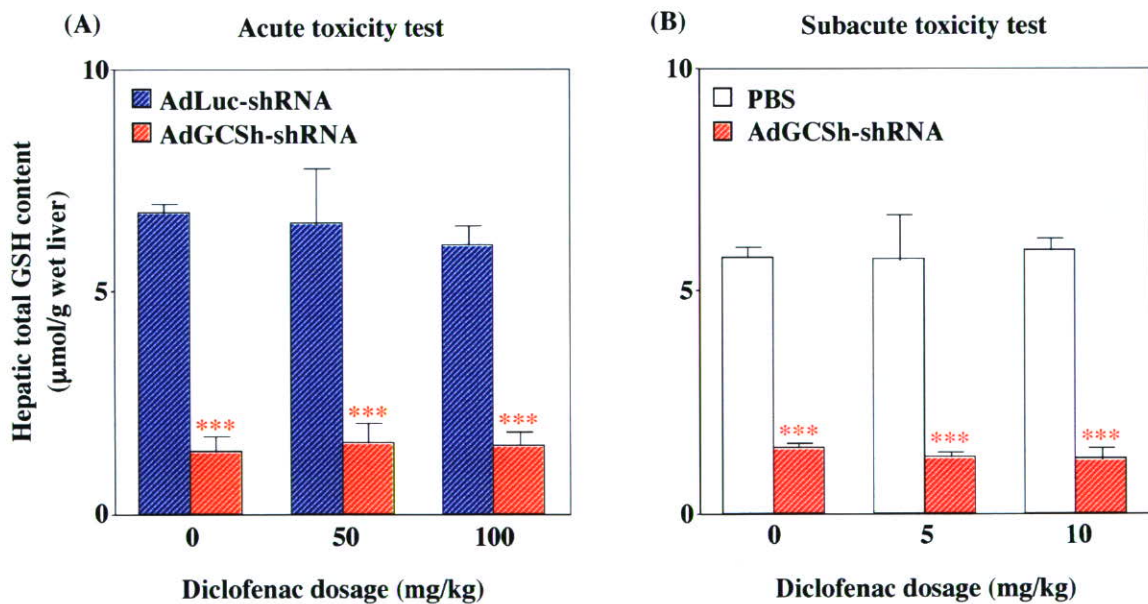


Fig. 8. Effect of AdGCSH-shRNA infection on hepatic total GSH content in diclofenac administered rat in acute or subacute toxicity test. Hepatic total GSH content is measured 6 hrs after administration in acute toxicity test (A) and 6 hrs after last administration in subacute toxicity test (B). Data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

今回、AdGCSH を 1.5×10^{11} PFU/body で投与しても、2 週間後において同程度の GSH 含量の減少が認められた (data not shown)。

ジクロフェナクによる肝障害を検討したラットにおいても、GSH 含量が減少していたかを確認するため、急性の肝障害を検討する単回投与では投与 24 時間後、亜急性の肝障害を検討する連続投与では最終投与から 6 時間後に肝臓を採取し、GSH 含量を測定した (Fig. 7)。

その結果、単回および連続投与における検討で、AdGCSH-shRNA を投与した群では、AdLuc-shRNA あるいは PBS を投与した群と比較して、有意に肝臓中 GSH 含量が減少していたことを確認した。

C-6 フルタミド投与ラットにおける肝臓中総 GSH 含量減少の確認

フルタミドによる肝障害を検討したラットにおいても、GSH 含量が減少していたかを確認するため、急性の肝障害を検討する単回投与では投与 24 時間後、亜急性の肝障害を検討する連続投与では最終投与から 24 時間後に肝臓を採取し、GSH 含量を測定した (Fig. 8)。

その結果、単回および頻回投与における検討で、AdGCSH-shRNA を投与した群では、PBS を投与した群と比較して、有意に肝臓中 GSH 含量が減少していたことを確認した。また、単回投与群においてフルタミドを投与することにより GSH 含量の増加が認められた。

D. 考察

ジクロフェナクおよびフルタミドは前臨床試験において肝障害が認められていない。しかし、販売後の調査ではともに頻度は低いものの肝障害が報告されている。本研究では、一部のヒトにおいて重篤な肝障害が発現すると報告されているジクロフェナクおよびフルタミドを、AdGCSH-shRNA を投与した GSH 減少モデルラットに単回および連続投与することにより、前臨床試験で頻繁に用いられるげっ歯類であるラットにおいて薬物誘導性の急性および亜急性の肝障害を高感度に検出できるかについて検討した。ジクロフェナクについては、単回投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 100 mg/kg の投与で肝障害が認められた (Fig. 1)。

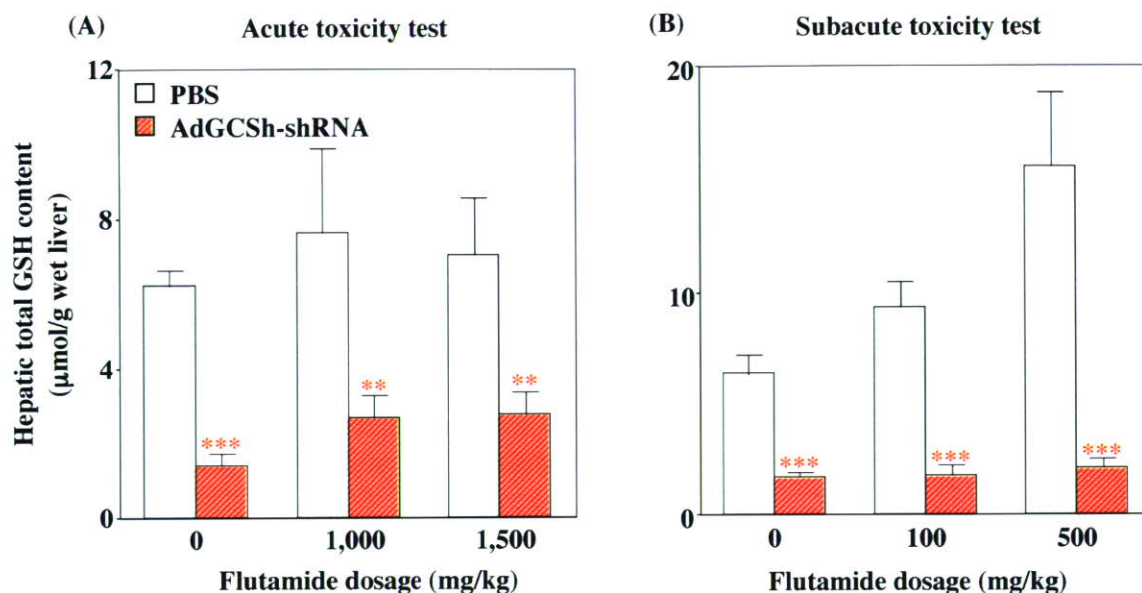


Fig. 8. Effect of AdGCSh-shRNA infection on hepatic total GSH content in flutamide administered rat in acute or subacute toxicity test. Hepatic total GSH content is measured 24 hrs after administration in acute toxicity test (A) and 24 hrs after last administration in subacute toxicity test (B). Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). ** P < 0.01 and *** P < 0.001 compared with each PBS treated group.

しかし、肝組織像での検討で顕著な変化は認められなかった。今回の検討ではAST値が特に上昇した (Fig. 1A)。また、ジクロフェナクは重大な副作用として肝障害以外にうっ血性心不全が挙げられる。ASTおよびALTは肝臓に多く含まれるがASTが最も多く含まれるのは心筋である。よって、血清肝障害マーカーの上昇は心疾患も寄与していたため、肝組織像で顕著な変化は認められなかったという可能性も考えられる。連続投与の検討においては、どの投与群においても肝障害

が認められなかった (Fig. 2)。単回投与の際、ASTおよびALT値の上昇は6時間後と比べて24時間後では小さくなっていた。今回、連続投与ではジクロフェナクを1日1回で投与したため、肝毒性が蓄積せず肝障害が認められなかったと考えられる。いずれにしても単回投与の検討結果から、GSH減少モデルラットはジクロフェナクによる急性の肝障害を高感度に検出できることを示した。

ジクロフェナクは代謝されて活性代謝物となり、GSH抱合を受けるとさ

れている。今回、GSH 減少モデルラットにおいてジクロフェナクによる肝障害の増強が認められたことから、ジクロフェナクの解毒に GSH が関与していることが示された。一方、Akai らの報告によると、GSH 減少モデルラットでは CYP2C11 タンパク質の発現量が減少しており、APAP を投与した際の、血中 APAP の抱合体代謝物は、グルクロン酸抱合体が増加し、硫酸抱合体が減少している。この報告の中で筆者らは、APAP のグルクロン酸抱合体は multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) の基質であり (Xiong et al., 2000)、MRP2 の発現量は GSH 濃度に依存するという報告がある (Sekine et al., 2006) とし、GSH 減少による MRP2 発現量の低下で APAP のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄が減少し、血清中のグルクロン酸抱合体が増加したと考察している。ジクロフェナクは活性代謝物として、ヒトにおいては UGT によってグルクロン酸抱合された acyl glucuronide、および CYP2C9 あるいは CYP3A4 により酸化代謝を受けた quinoneimine が報告されている。GSH 減少による影響として、UGT により生成される acyl glucuronide への寄与は小さいと考え

られるが、CYP2C9 と相同性が高い分子種であるラットの CYP2C11 により生成される quinoneimine への寄与は無視できないと考えられる。よって、GSH 減少モデルラットにおけるジクロフェナクの毒性増強のメカニズムについてはさらに詳しい検討が必要であると考えられる。

フルタミドについては、単回投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 1,000 および 1,500 mg/kg の投与で肝障害が認められた (Figs. 3 and 4)。1,500 mg/kg 投与群において、投与量が増えているにもかかわらず 1,000 mg/kg 投与群と比べて肝障害の増強が認められなかったのは、薬物の吸収が飽和した可能性があると考えられる。連続投与の検討においては、GSH 減少モデルラットでのみ 500 mg/kg の投与で肝障害が認められた (Fig. 5)。単回投与の検討と比較して肝障害の程度は穏やかだが、投与を続けることによってさらに強い肝障害が認められる可能性が考えられる。肝臓の病態としては大きく分けて肝細胞障害と胆汁うっ滞の二つが挙げられる。AST および ALT 値は主に肝細胞障害のマーカーとして、総ビリルビン値は主に胆汁うっ滞のマーカーとして用いられて

いる (赤木ら, 2006)。今回、AST および ALT 値の上昇に加えて総ビリルビン値の上昇も認められたことから、フルタミドによる肝障害は胆汁うっ滞も寄与していると考えられる。単回および頻回投与の検討の結果から、GSH 減少モデルラットはフルタミドによる急性および亜急性の肝障害を高感度に検出できることを示した。フルタミドもジクロフェナクと同様に、代謝されて活性代謝物となり、GSH 抱合を受けるとされている。今回、GSH 減少モデルラットにおいてフルタミドによる肝障害の増強が認められたことから、フルタミドの解毒に GSH が関与していることが示された。フルタミドの代謝は主に CYP1A2、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A5 などが関与するとされており、グルタチオン減少モデルラットにおける CYP2C11 の減少の影響はあまりないと考えられる。

一方、フルタミドの投与によって、グルタチオン減少モデルラットおよび PBS 投与ラットで肝臓中総 GSH 含量の増加が認められた (Fig. 8)。今回、AdGCSH-shRNA 投与によってノックダウンした GSH 合成酵素である γ -GCS は、様々な環境因子、酸化物、抗酸化物および炎症による刺激に応

答する、プロモーター領域の activator protein-1 (AP-1) responsive element および antioxidant response element (ARE) などの転写因子認識配列によって制御されていることが示されてきている (Jaiswal, 1994; Pinkus, 1996)。AP-1 は主に、Jun および Fos と呼ばれる癌原遺伝子から発現したタンパク質の二量体から構成されている。しかし Jun は、塩基性-ロイシンジッパー (b-zip) 構造を持つ転写因子である nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor-1 (Nrf1)、Nrf2 および Maf とも二量体を形成すると報告されている (Motohashi and Yamamoto, 2004)。しかし、転写制御におけるこれら二量体の生物学的な重要性は明らかになっていない。Nrf は ARE に結合することが知られているが、ARE は NF-E2 結合配列として知られる Maf recognition element (MARE) と非常に似た配列を示している。また、Nrf2 が求電子剤やフェノール系抗酸化剤による、ARE を介した γ -GCS 遺伝子の誘導に不可欠であることが報告されている (Hayes and McLellan, 1999)。さらに、Nrf が酸化ストレスになどによって ARE に結合することが報告されている (Dhakshinamoorthy et al.,

2000)。ARE は Nrf2 のリン酸化を引き起こす protein kinase C (PKC) や mitogen-activated protein kinase (MAPK) によって制御されることが示されてきている (Huang et al., 2000; Yu et al., 2000)。フルタミドによって、Nrf2 のリン酸化を引き起こす PKC や MAPK の一つである extracellular signal-regulated kinase (ERK) の発現が、それぞれラットの前立腺、ヒト前立腺癌細胞で増加したという報告がある (Montalvo et al., 2002; Zhu et al., 1999)。今回フルタミドを投与することによって、フルタミドが活性代謝物となり酸化ストレスが増大すること、PKC あるいは ERK、またはその両方の発現が増加し、Nrf2 がリン酸化されることによって ARE を介した γ -GCS の誘導が引き起こされ、GSH 含量が増加した可能性も考えられる。

アデノウイルスおよびフルタミド投与によりラット肝重量が増加する傾向が認められた (data not shown)。グルタチオン減少モデルラットにフルタミドを単回投与すると、微小脂肪滴が認められたため、フルタミドの検討においては、肝重量増加の原因の一つとして脂肪沈着が考えられる。一方、アデノウイルス投与のみでは微小脂

肪滴は認められないため、アデノウイルスによる肝重量の増加は、免疫系の活性化等により肝肥大が引き起こされたためかもしれない。しかし、アデノウイルスあるいはフルタミドのみの投与では、AST および ALT 値の上昇や肝組織像の変化は認められなかったため、肝障害性を検討する際には、考慮しなくても問題ないと考えられる。

本研究で使用した GSH 減少モデルラットでは、GSH 含量が最も低くなる AdGCSh-shRNA 投与後 2 週間から、投与後 4 週間までは同程度の GSH 含量を保てると報告されている (Akai et al., 2007)。そこで、亜急性の肝障害の検討では、GSH 含量が低く保たれている期間において検討を行うために、薬物の投与期間を AdGCSh-shRNA を投与後 10 日から 1 週間という短い期間に設定した。これは肝障害の発現を検討するためには、十分な期間であったと考えられる。一方、アデノ随伴ウイルスベクターは今回用いたアデノウイルスと比較して、*in vivo* において半年から 1 年程度と長期間目的遺伝子を発現できるとされており (Grimm et al., 2006)、ヒトにおける病原性は知られていない。アデノ随伴ウイルスを用

いれば、長期間安定した GSH 減少を持続させることができ、慢性毒性試験のような長期間の薬物投与ができる GSH 減少モデルラットの作製が可能であると考えられる。しかし、アデノ随伴ウイルスはゲノムが 1 本鎖 DNA であるため、遺伝子発現が起こるには 2 本鎖になる必要があり、発現効率が良好ではないため、ある程度の発現量を得るには膨大な量のベクターウイルスが必要であると報告されている (Russell and Kay, 1999)。よって、本研究で用いた GSH 減少モデルラットと同程度の GSH 含量の減少を引き起こすことは困難と考えられる。

マウスやラットは、飼育しやすいことや、個体同士で代謝が類似していることから、医薬品開発における研究に用いられることが多い。マウスはラットに比べて代謝速度が速く、血液や尿などのサンプルを大量にあるいは連続して回収することが困難であるという欠点がある。このため、ラットは医薬品開発における動態研究および安全性研究において頻繁に用いられている (Gad et al, 2007; Johnson and Gad, 2007)。本研究において、GSH 減少モデルラットがジクロフェナクおよびフルタミドの肝障害を高感度に

検出できることを示した。今後、安全性研究において GSH 減少モデルラットを用いることで、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ことに本モデルラットが貢献できると考えられる。

E. 結論

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