

Raloxifene (RAL) の前投与により TA 誘導性肝障害の軽減が認められ、特に TAM で顕著であった。ICI 182,780 (ICI) の前投与では軽減は認められなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2) の発現が TAM により顕著に誘導されたことに注目し詳細な検討を行った。Mmd2 に対する siRNA (siMmd2) をマウス尾静脈内に投与することにより肝 Mmd2 mRNA の約 70% の減少が得られ、さらに TA 誘導性肝障害の増強および TAM による肝保護作用の減弱が認められた。また、ERa KO マウスにおいては TAM による Mmd2 mRNA の誘導は認められず、肝保護作用も認められなかった。また、Mmd2 の肝保護作用のメカニズムを明らかにするため、ERa を介して肝再生を担うことで知られる Amphiregulin (Areg) の mRNA を測定した。TAM 投与により Areg mRNA の上昇が認められ、ERa KO マウスにおいてはその上昇は認められなかった。また、siMmd2 投与により、肝臓における Areg mRNA の減少が認められ、Mmd2 との関連が示唆された。Mmd2 による肝保護作用メカニズムの一つ

として、Areg を上昇させることによる肝再生促進が考えられた。以上より、TAM による肝保護作用は ERa を介した Mmd2 発現の上昇、およびそれに伴う Areg 発現の上昇が関与していることが示された。

G. 研究発表

2. 学会発表

吉川幸孝、豊田泰之、津久井通、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井 毅：薬物誘導性肝障害に対する Tamoxifen による肝保護作用、第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 2010.6.16-18 口頭&ポスター 沖縄

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明人：横井 毅、吉川幸孝
特願 2010-065172 出願日：2010 年 3 月 19 日
発明の名称：肝保護作用を有するタンパク質、肝障害予防・保護用化合物のスクリーニング方法

参考文献

Bajt ML, Yan HM, Farhood A, and Jaeschke H (2008) Plasminogen activator inhibitor -1 limits liver injury and facilitates regeneration after acetaminophen overdose.

- Toxicol Sci* **104**: 419-427.
- Behjati S and Frank MH (2009) The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem* **16**:3076-3080.
- Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, Prieto J, and Avila MA (2007) Amphiregulin: a new growth factor in hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* **254**: 30-41.
- Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaria M, Lee DC, Prieto J, and Avila MA (2005) Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem* **280**: 19012-19020.
- Cosman F and Lindsay R (1999) Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. *Endocr Rev* **20**: 418-434.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, and Korach KS (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors a and b. *Science* **286**: 2328-2331.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, and Mark M (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors a (ERa) and b (ERb) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127**: 4277-4291.
- Dyroff MC and Neal RA (1981) Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res* **41**: 3430-3435.
- Ganey PE, Luyendyk JP, Newport SW, Eagle TM, Maddox JF, Mackman N, and Roth RA (2007) Role of the coagulation system in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* **46**: 1177-1186.
- Gunawan BK, Liu ZX, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, and Kaplowitz N (2006) c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* **131**: 165-178.
- Harada H, Bharwani S, Pavlick KP, Korach KS, and Grisham MB (2004) Estrogen receptor- α , sexual dimorphism and reduced-size liver ischemia and reperfusion injury in mice. *Pediatr Res* **55**: 450-456.
- Harada H, Pavlick KP, Hines IN, Hoffman JM, Bharwani S, Gray L, Wolf RE, and Grisham MB (2001) Selected contribution: Effects of gender on reduced-size liver ischemia and reperfusion injury. *J Appl Physiol* **91**: 2816-2822.
- Heijne WH, Slitt AL, van Bladeren PJ, Groten JP, Klaassen CD, Stierum RH, and van Ommen B (2004) Bromobenzene-induced hepatotoxicity at the transcriptome level. *Toxicol Sci* **79**:

411-422.

Hétu C, Dumont A and Joly JG (1983) Effect of chronic ethanol administration on bromobenzene liver toxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **67**: 166-177.

Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hochtin-Boes G, Houghton J, Locker GY, and Tobias JS (2005) Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* **365**: 60-62.

Hunter AL, Holscher MA, and Neal RA (1977) Thioacetamide-induced hepatic necrosis. I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* **200**: 439-448.

Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, and Gillette JR (1974) Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* **11**: 151-169.

Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 489-499.

Koen YM, Williams TD, and Hanzlik RP (2000) Identification of three protein

targets for reactive metabolites of bromobenzene in rat liver cytosol. *Chem Res Toxicol* **13**: 1326-1335.

Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, and Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15677-15682.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, and Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* **138**: 863-870.

Lee WM (2003) Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis* **23**: 217-226.

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, and Smithies O (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11162-11166.

Miceli V, Cervello M, Azzolina A, Montalto G, Calabrò M, and Carruba G (2009) Aromatase and amphiregulin are correspondingly expressed in human liver cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* **1155**: 252-256.

- Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, and Ochiya T (2004) Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucl Acids Res* **32**: e109.
- Mitlak BH and Cohen FJ (1997) In search of optimal long-term female hormone replacement: the potential of selective estrogen receptor modulators. *Horm Res* **48**: 155-163.
- Morita M, Akai S, Hosomi H, Tsuneyama K, Nakajima M, and Yokoi T (2009) Drug-induced hepatotoxicity test using g-glutamylcysteine synthetase knockdown rat. *Toxicol Lett* **189**: 159-165.
- Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, and Karin M (2007) Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* **317**: 121-124.
- Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, Sumita Y, Hisada A, Itoh H, Nagai Y, and Terada M (1999) New delivery system for plasmid DNA *in vivo* using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med* **5**: 707-710.
- Osborne CK and Fuqua SA (1994) Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* **32**: 49-55.
- Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, and Williams DP (2005) The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 177-202.
- Porter WR, Gudzinowicz MJ, and Neal RA (1979) Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **208**: 386-391.
- Porter WR and Neal RA (1978) Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **6**: 379-388.
- Purcell P, Henry D, and Melville G (1991) Diclofenac hepatitis. *Gut* **32**: 1381-1385.
- Ramaiah SK, Apte U, and Mehendale HM (2001) Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug Metab Dispos* **29**: 1088-1095.
- Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, and Ochiya T (2005) Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using

atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12177-12182.

Walker AM (1997) Quantitative studies of the risk of serious hepatic injury in persons using nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum* **40**: 201-208.

Wang T, Shankar K, Ronis MJ, and Mehendale HM (2000) Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to

induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 473-479.

Yamamoto Y, Moore R, Hess HA, Guo GL, Gonzalez FJ, Korach KS, Maronpot RR, and Negishi M (2006) Estrogen receptor α mediates 17 α -ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J Biol Chem* **281**: 16625-16631.

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

グルタチオン減少モデルラットにおける薬物誘導性肝障害の検討

分担研究者 中島 美紀 金沢大学医薬保健研究域薬学系准教授

研究要旨

薬物誘導性肝障害は、医薬品開発や臨床薬物療法における主要な問題の一つであるが、その発現には大きな種差が存在し、前臨床試験における毒性の予測を困難にしている。薬物が肝臓をはじめ各組織で代謝を受けた場合には、より極性が高くなり、排泄されやすくなる場合が多い。しかし、代謝的活性化を受け反応性代謝物を生成することで、肝障害を惹起する例も少なくない。肝障害発現の種差の原因として、薬物代謝反応の一つである酸化および抱合などの酵素活性の差異が挙げられる。酸化反応は薬物の代謝的活性化の大部分を担うが関与する酵素が多く、種差も大きいいためそのすべての遺伝子変動を把握することは困難である。一方、代謝的活性化によって生成した反応性代謝物の抱合反応による解毒は、最終的には GSH とそれを利用する酵素系が担うとされている。GSH を補酵素とする GST には基質特異性の異なる多数の分子種が存在するため、すべての発現を制御することは困難であるが、GSH の合成経路は一つのみであり、GSH 合成酵素を制御することで GSH による解毒能を調節できると考えられる。

GSH は、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 は薬物および反応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。

本研究では、GSH 合成酵素をノックダウンすることで GSH 減少モデルラットを構築した。このラットを用いて、トログリタゾン、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。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く、特に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。よって、GSH 減少モデルラットは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と考えられる。

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250~500億円の研究費を要すると言われている。医薬品は *in vitro* 試験や実験動物を対象とした前臨床試験により薬効と安全性が確認された上で初めてヒトに投与される。前臨床の薬効試験、安全性試験や薬物動態試験を含む多くの試験では、マウスおよびラットなどのげっ歯類、イヌ、サルなどが用いられている。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、代謝酵素の活性に大きな種差が存在する。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近年90%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 (Kola and Landis, 2004; Nedeicheva and Gut, 1994)。薬物の薬効や毒性の種差や個人差は、主に薬物動態学的な差異によって惹起され、薬物動態はADME (吸収、分布、代謝、排泄) によって決定される。薬物代謝反応は主に肝臓で行われ、大別すると酸化、還元、加

水分解の第I相反応と、抱合の第II相反応から成る。酸化反応は薬物の代謝的活性化に重要な役割を持つが、関与する酵素が多く、種差も大きいためそのすべての遺伝子変動を把握することは困難である。一方、代謝的活性化によって生成した反応性代謝物の抱合反応による解毒は、最終的にはグルタチオン

(5-L-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH) とそれを利用する酵素系が担うとされている。

GSHは、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する役割を有している (Lu, 1999; Reed, 1986)。グルタチオン S-転移酵素 (GST) は第II相酵素に分類され、薬物および反応性代謝物の解毒に深く関わっている。しかし、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 (Grover and Sims, 1964; Jackson et al., 2000; Sims and Grover, 1965)、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。GSTには基質特異性の異なる多

数の分子種が存在するため、そのすべての発現を制御することは困難である。一方、補酵素である GSH の合成経路は一つのみであり、GSH 合成酵素を制御することで GSH による解毒能を調節できると考えられる。GSH 合成反応の律速酵素である γ -GCS は、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、それぞれ酵素活性部位、および GSH 蓄積による GSH 合成のフィードバックを阻害する部位としての役割が知られている (Huang et al., 1993)。 γ -GCS には複数の分子種の存在は報告されておらず、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、small interfering RNA (siRNA) による標的遺伝子のノックダウンが広く利用されている。また、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いる。近年では、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てノックダウンを行うことにより、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などの検討がされている (Wang et al., 2008)。

当研究室では、 γ -GCS の heavy chain に相補的な shRNA を発現するアデノウイルス (AdGCS_h-shRNA) をすでに作製し、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 GSH 合成を抑制させた GSH 減少モデルラットを構築した。さらに、本モデルラットを用いて、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ている (Akai et al., 2007)。本研究では、GSH 減少ラットにトログリタゾン、ジクロフェナク、およびフルタミドを投与し、薬物誘導性肝障害の発現について検討した。

トログリタゾンはチアゾリジン系の糖尿病治療薬であり、その作用機序は、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ) に結合し、インスリン抵抗性を改善させるものと考えられている。画期的な糖尿病治療薬として上市されたが、稀に重篤な肝障害を惹起することが報告され、市場から撤退している。しかし前臨床試験では、サルを含む実験動物でいかなる肝障害も認められていない (Watanabe et al., 1999)。トログリタゾンとともに培養したヒト肝細胞およびミ

クロソームからはGSHとの複合体が検出されている (Kassahun et al., 2001; Prabhu et al., 2002)。

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、疼痛などに関与するプロスタグランジンの合成を阻害するものと考えられている。しかし、稀に重篤な肝障害を惹起することが報告されている (Purcell et al., 1991; Walker, 1997)。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マイクロソーム、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はジクロフェナクとGSHとの複合体が検出されている (Grillo et al., 2003; Poon et al., 2001; Tang et al., 1999)。

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、稀に重篤な肝障害を惹起することが報告されている (Nakagawa et al.,

1999; Osculati and Castiglioni, 2006)。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はフルタミドとGSHとの複合体が検出されている (Kang et al., 2007; Soglia et al., 2006; Tevell et al., 2006)。

以上のことから、トログリタゾン、ジクロフェナク、およびフルタミドはGSH抱合により解毒されることが示唆される。これらの薬物を用いて、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のGSH減少モデルラットの有用性について検討した。

B. 実験材料および実験方法

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 Type I-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、ウシ血清アルブミン (BSA)、ジクロフェナクナトリウム塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より、

3,3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩 (DAB) は同仁化学 (Kumamoto, Japan) 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、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。トログリタゾンは第一三共 (Tokyo, Japan) より御供与頂いた。 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸4ナトリウム還元型 (β -NADPH)、およびグルタチオン還元酵素 (GR) (1000 Units/mL) はオリエンタル酵母工業 (Tokyo, Japan) より購入した。エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム塩2水和物 (EDTA)、スルホサリチル酸、GSH、5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) (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、およびフルタミド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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C で培養した。

B-3 アデノウイルス液の調製

当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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 回繰り返す、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 に当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 2.5×10^5 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 μL と 5% FBS を含む DMEM 900 μL 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 μL 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 μL 加えた。その後 5% CO₂ 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 × PBS 250 μL で 5 分間洗浄した。1% BSA in 1 × PBS を各ウェル 250 μL ずつ加え、1 時間室温で振とうした。1% BSA in 1 × PBS を除き diluted 1 × anti-Hexon antibody を各ウェルに 250 μL ずつ加え、1 時間室温で振とうした。細胞を 2 回、1 × PBS 250 μL で 5 分間洗浄した。diluted 1 × secondary antibody solution を各ウェル 250 μL ずつ加え、1 時間室温で振とうした。細胞を 3 回、1 × PBS 250 μL で 5 分間洗浄した。Diluted 1 × DAB working solution を各ウェル 250 μL ずつ加え、10 分間室温で振とうした。Diluted 1 × DAB working solution を回収し、各

ウェルを1 × PBS 250 μL で細胞を5分間洗浄し、1 × PBS 1 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 mm²である。24ウェルプレートの1ウェルあたり面積は2.0 cm²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140~160 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 × 10¹¹ PFU/mL に調製し、尾静脈より投与 (1 mL/body) した (Sima et al., 2007)。被験薬の単回投与実験ではアデノウイルス投与2週間後に、連続投与実験では、トログリタゾンについてはアデノウイルス投与2週間後に、その他の薬物については10日後に薬物投与実験を行った。

被験薬の単回投与実験では、トログリタゾンについては0.5% CMCに懸濁させたものを経口投与 (0, 1,000 mg/kg) した。各群3~4匹のラットを使用した。ジクロフェナクについては生理食塩水に懸濁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4~5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。

被験薬の連続投与実験では、トログリタゾンについては0.5% CMCに懸濁させたものを1日1回4週間経口投与 (0, 1,000 mg/kg) した。各群3~4匹のラットを使用した。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。薬物投与前に加えて、トログリタゾンについては、7、14、21、28日間連続投与のそれぞれ24時間後に、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時間後に採血を行った。それぞれ最終投与の24時間後以外は尾静脈より、最終投与の24時間後には下行大静脈より採血を行った後、肝臓を採取した。

B-7 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。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、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。GR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 (GE Healthcare)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、血漿約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。血漿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Biotrak II plate reader (GE Healthcare)を用いて測定し、ASTおよびALT値を定量した。

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、血漿 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。室温で血漿 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 Biotrak II plate reader

C. 実験結果

C-1 トログリタゾンによる肝障害の検討

急性の肝障害の検討においては、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 PBS を投与し、2 週間が経過したラットにトログリタゾンを 0 および 1,000 mg/kg 単回経口投与した。以前の検討では、コントロールウイルスである 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認められていない (data not shown)。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)。このため、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

(GE Healthcare) 測定し、総ビリルビン量を定量した。

B-10 統計解析

各群における統計学的評価は Student's *t*-test または Dunnett's post hoc test により解析し、 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意と判断した。

与群で検討することが可能であると考えられる。

投与を行った 24 時間後に血漿を採取し、肝障害時に上昇するパラメーターである AST および ALT 値を測定した。その結果両群において、非投与群と比べ、1,000 mg/kg のトログリタゾン投与による AST および ALT 値の有意な上昇は認められなかった (Figs. 1A and 1B)。

亜急性の肝障害の検討においては、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、1 日 1 回 4 週間トログリタゾンを経口で 0 および 1,000 mg/kg 連続投与した。1、2、3、および 4 週間後の最終投与を行った 24 時間後に血漿を採取し、AST および ALT 値を測定した。その結果両群において、1、2、および 3 週間後にお

いて、非投与群と比べて、1,000 mg/kg のトログリタゾン投与によるAST、ALT 値の有意な上昇は認められず (data not

shown)、最終投与の24時間後においても上昇は認められなかった (Figs. 1A and 1B)。

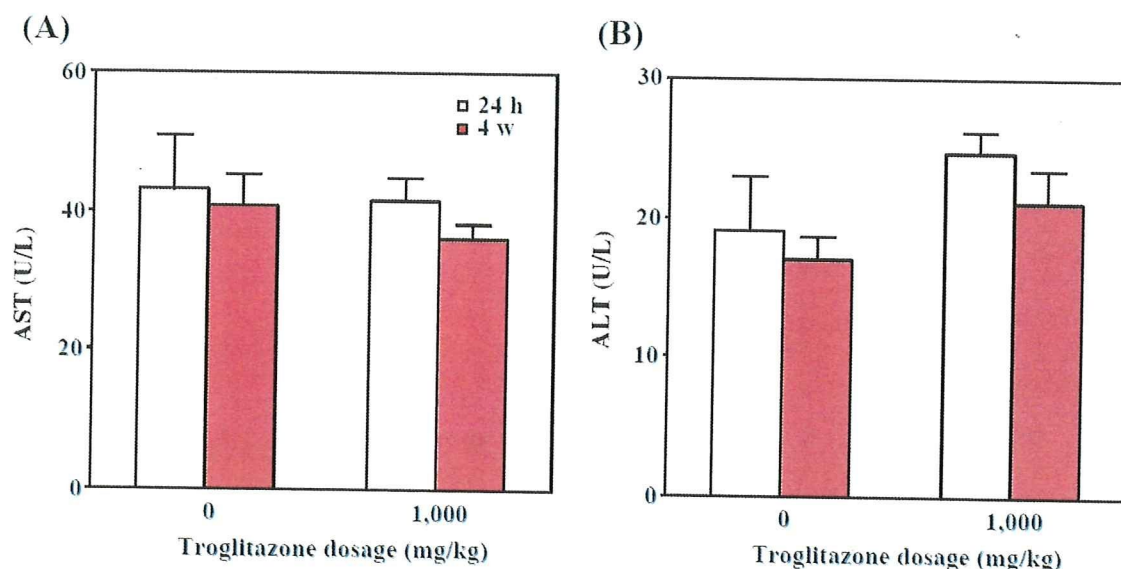


Fig. 1. Acute and subacute hepatotoxic effects of troglitazone in AdGCSH-shRNA infected rats. Troglitazone was orally administered 0 or 1,000 mg/kg once in acute toxicity study and once a day for 4 weeks in subacute study. AST (A) and ALT (B) were measured 24 h after administration in acute toxicity study and 24 h after the last administration in subacute study. Data are mean \pm SD (n = 3 to 4).

C-2 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、臨床投与時と同様の経路が望ましい。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。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週間後の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時間後に血漿を採取し、AST および ALT 値に加え、肝障害時に上昇するパラメーターである総ビリルビン値を測定した。

その結果図2に示すように、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. 2A and 2B)。

投与 24 時間後においても、6 時間後における値と比べて減少したものの、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. 2C)。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の肝障害性を検討する

ため、HE 染色による肝病理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 (data not shown)。

C-3 ジクロフェナク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 日間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。最終投与を行った 6 時間後に血漿を採取し、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、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. 3A and 3B)。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. 3B)。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 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

った (Fig. 3C)。

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)。

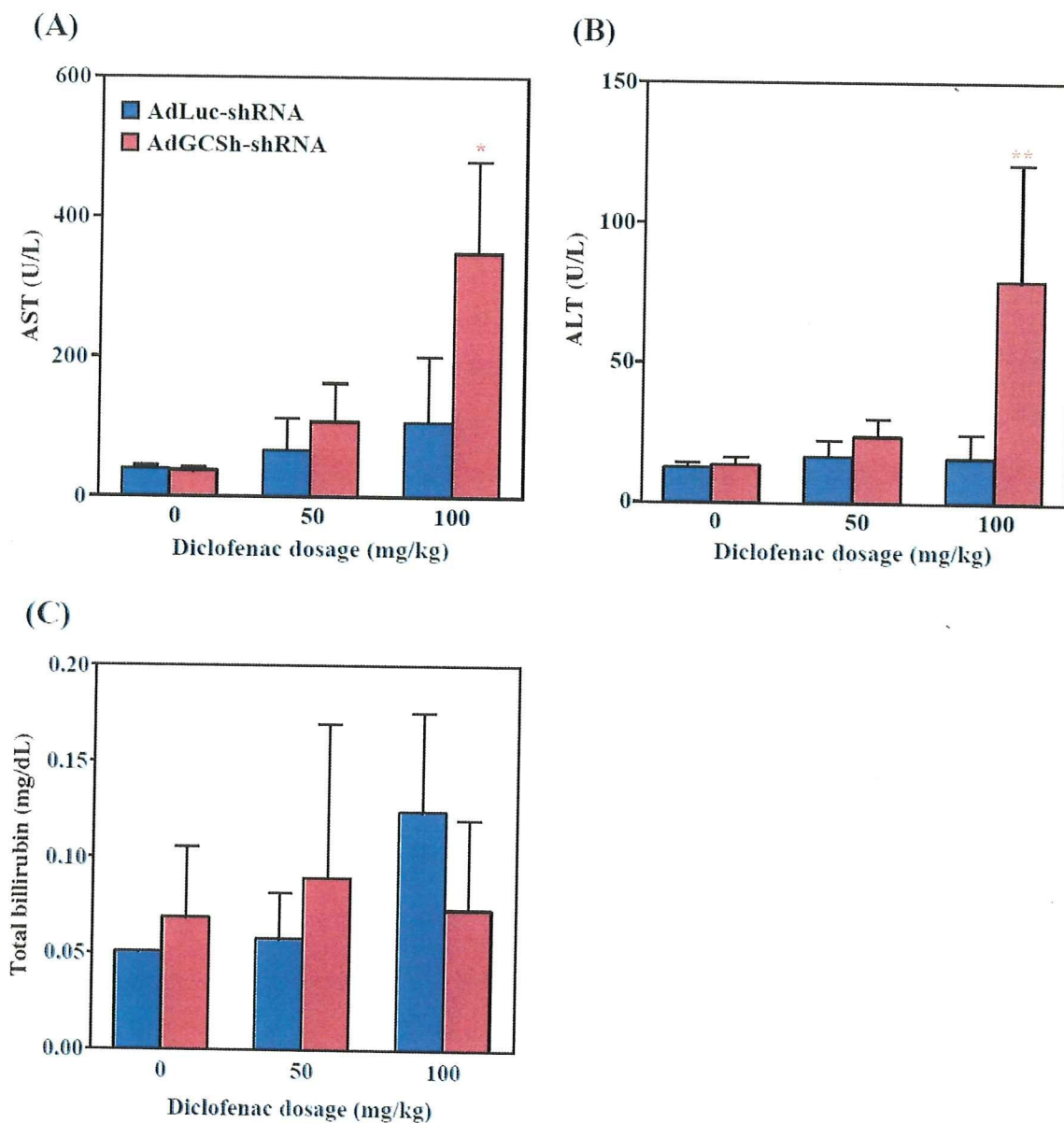


Fig. 2. Acute hepatotoxic effects of diclofenac in AdGCSH-shRNA infected rats. Diclofenac was intraperitoneally administered 0, 50 or 100 mg/kg. AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 6 h after administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with each AdLuc-shRNA infected group.

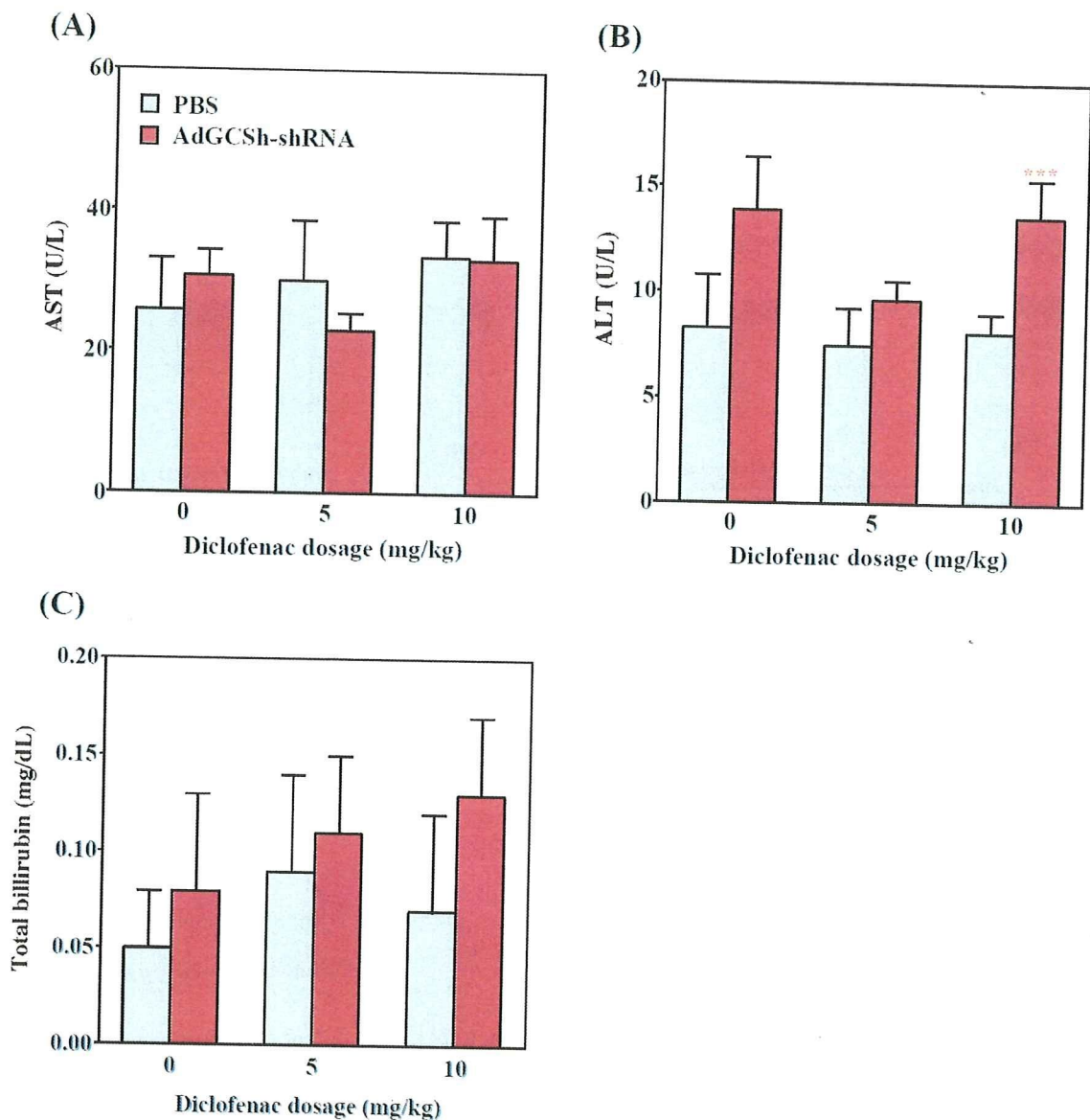


Fig. 3. Subacute hepatotoxic effects of diclofenac in AdGCSH-shRNA infected rats. Diclofenac was intraperitoneally administered 0, 5 or 10 mg/kg once a day for a week. AST (A), ALT (B) and total bilirubin concentration (C) were measured 6 h after the last administration. Data are mean \pm SD (n = 3 to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

C-4 ジクロフェナク投与ラットにおける肝臓中総 GSH 含量の変動

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

投与した群と比べて、20%程度まで減少する (Akai et al., 2007)。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. 4)。

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 を投与した群と比べて、有意に肝臓中 GSH 含量が減少していたことを確認した

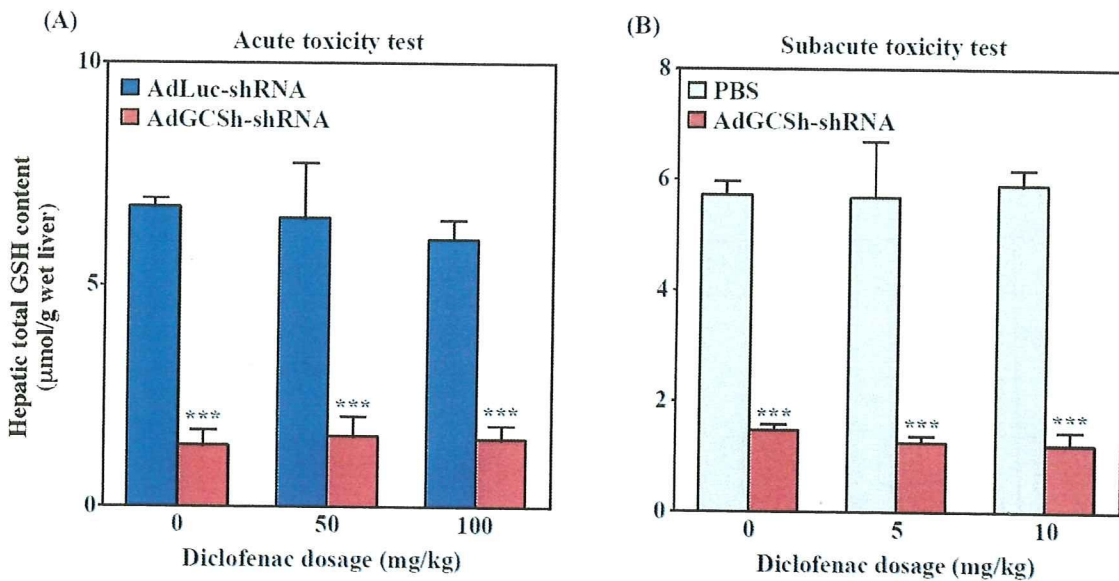


Fig. 4. Effects of AdGCSh-shRNA infection on hepatic total GSH content in diclofenac administered rats in acute or subacute toxicity test. Hepatic total GSH content is measured 6 h after administration in acute toxicity test (A) and 6 h after last administration in subacute toxicity test (B). Data are mean \pm SD (n = 3 to 5). *** $P < 0.001$ compared with each AdLuc-shRNA or PBS treated group.

C-5 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 AdLuc-shRNA 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 時間後に血漿

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、AdLuc-shRNA 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 AdLuc-shRNA 投与群 (AST: 34 ± 4 U/L, ALT: 22 ± 3 U/L) 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、有意な AST および ALT 値の上昇 (AST: 431 ± 230 U/L, ALT: 157 ± 76 U/L) が AdLuc-shRNA 投与群 (AST: 31 ± 4 U/L, ALT: 19 ± 5 U/L) と比べて認められた (Figs. 5A and 5B)。

一方、フルタミド投与 6 時間後では、AdLuc-shRNA 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 AdLuc-shRNA 投与群 (0.08 ± 0.05 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 AdLuc-shRNA 投与群 (0.09 ± 0.03 mg/dL) と比べて認められた (Fig. 5C)。AdGCSh-shRNA 投与ラットにおけるフルタミド単回投与の肝障害性を検討するため、HE 染色による肝病理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。