

することで発症するといわれている (Michel et al., 2010; Seong et al., 2009)。TAM 投与により steatosis モデルマウスの ALT 値および AST 値の低下が認められ (Fig. 1)、組織染色においては、細胞の肥大化および炎症の減弱が認められた (Fig. 2)。また遺伝子レベルにおいても炎症性因

子の低下が認められた (Fig. 5)。炎症性因子が直接 steatosis 悪化に関与している報告はない。しかし、TAM により肝障害が改善され、その結果、炎症性因子が低下したことも考えられるがさらに詳細な検討が必要と思われる。

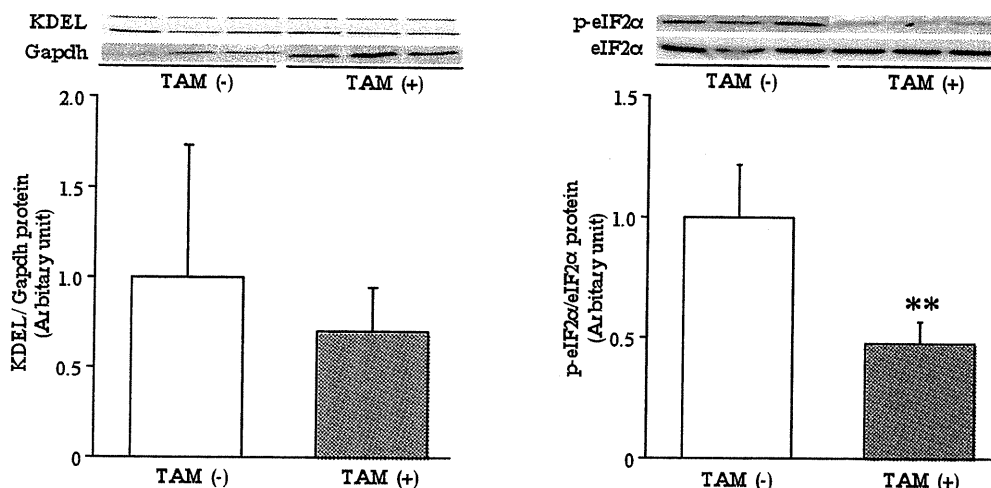


Fig. 15. Effects of TAM on ER stress and signaling pathways in NASH model mice. Mice were administered TAM for 5 days (1 mg/kg, *i.p.*). Equal protein sample (50 μ g) were subjected to immunoblot analyses using antibodies of anti-KDEL, and anti-Ser51 phosphorylated eIF2 α . The data mean \pm SD of 3 mice. ** p < 0.01, compared with TAM-unadministered mice.

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)。今回、steatosis モデルマウスにおける GSH 含量 (0.56 ± 0.09) は、対象群のマウス (1.00 ± 0.12) と比べて、有意な減少が認められた。このことは、HFD 給餌により血中および肝臓における脂肪酸が増加し、慢性的なストレスが生じるためと考えられる。しかし、steatosis モデルマウスにおいて GSH 含量に対する TAM 投与の影響は認められなかったことから (Fig. 3)、GSH 含量は本検討による

TAM の肝障害減弱の原因に直接関わる因子ではないものと考えられる。

Steatosis 発症には脂肪酸の合成および分解のバランスが重要だとされている。(Michel et al., 2010; Seong et al., 2009)。本検討では脂肪酸合成に関与する因子として SREBP-1 および FASN を測定したが、TAM 投与による発現変動が認められなかったことから (Fig. 6)、脂肪酸合成においては TAM が関与しないことが示唆された。また、脂肪酸を分解する機構としてミトコンドリア、ペルオキシソームおよび小胞体の 3 つが存在し、そのうちミトコンドリアにおける β 酸化が主な分解経路として機能することが知られている

(Rao and Reddy, 2001)。今回脂肪酸分解に関与する遺伝子である CPT-1 は脂肪酸をミトコンドリア内へ輸送させる機能を有し、ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化に関わるが、その機能は E2 により発現が上昇する malonyl-CoA により阻害されることが報告されている (McGarry and Foster et al., 1980)。一方で、過度な脂肪酸β酸化は活性酸素の発生の原因ともなっていることから (Yang et al., 2000)、CPT-1 の発現低下はミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化を抑制することで活性酸素の発生を抑制すること、またその作用が TAM の E2 作用によるものであることが考えられる。また、本検討において、TAM 投与により酸化ストレスマーカーである MDA 含量が減少傾向を示したことから (Fig. 4)、CPT-1 発現減少が酸化ストレス低下に関与する可能性を示唆している。

MAPK は多くの細胞内シグナル伝達経路における重要な構成要素のひとつであり、主に MAPK として、ERK1/2、p38 MAPK および JNK1/2 が知られている。MAPK はリン酸化を受けて活性化体へ変換されることにより、シグナルカスケードおよび炎症反応に関与する下流遺伝子を活性化する (Defranco et al., 1998)。

ERK1/2、JNK1/2 および p38 に関しては酸化ストレスや炎症性サイトカインにより活性化されることにより、下流因子にシグナル伝達をする。ERK1/2 は細胞増殖および分化に関与することが知られている (Segar and Krebs, 1995; Saxena et al., 2004)。また、JNK1/2 および p38 はアポトーシスおよび炎症性因子の増加を引き起こす

(Martindale and Holbrook, 2002)。E2 は ERK1/2 活性化を引き起こすことが知られており、本検討においても TAM 投与により ERK1/2 リン酸化の有意な増加が認められた (Fig. 7)。また、E2 投与により JNK1/2 の抑制が認められるという報告もあるが (Vilatoba et al., 2005)、steatosis モデルマウスにおいて、TAM 投与による JNK1/2 に対する影響は認められなかった。HFD 給餌により E2 の反応性が減少するという報告もあるため (Olson et al., 2010)、E2 に対する反応性低下が MAPK 変動の認められなかった原因である可能性が示唆された。TAM 投与により ERK1/2 シグナルの活性化が生じ、肝細胞増殖および分化といった肝再生能が上昇し、肝障害の改善が認められたと考えられるが、下流の遺伝子など、さらなる解析が必要だと思われる。

肥満により炎症性因子が誘導される詳細なメカニズムは解明されていないが、肥満による代謝のバランスの乱れが細胞内のオルガネラによって察知され、次にオルガネラの機能不全の誘発とともにストレスシグナルが活性化されることで、最終的にホメオスタシスが崩れる可能性が示唆されている。そのオルガネラの一つとして小胞体がある。つまり、小胞体が細胞内の代謝とストレスを結びつけ、その機能不全が炎症反応を誘導するのではないかと考えられている (Gregor and Hotamisligil, 2007)。小胞体は、分泌タンパク質および膜貫通タンパク質が規則正しく折りたたまれ、立体構造を整える場であるとともに、細胞内カルシウムの主要

な貯蔵庫として、またリン脂質、コレステロールおよびセラミドの合成など、脂質代謝の主要器官として、様々な生理機能を有している。タンパク質の折りたたみが正しく行われない場合、小胞体タンパク質分解機構 Endoplasmic Reticulum-associated degradation (ERAD) により分解され除去されるが、その分解を上回る量のタンパク質が小胞体に蓄積されると小胞体ストレスが生じる (Schroder and Kaufman, 2005)。小胞体ストレス応答として、分子シャペロン (KDEL) の生成量増大によるタンパク質折りたたみ機能向上およびタンパク質凝集阻害、タンパク質の翻訳量低下による小胞体の作業負荷軽減、ERAD 活性化、細胞機能が極端に阻害された場合におけるアポトーシス誘導がある。また、小胞体ストレスのシグナル伝達には PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、inositol requiring 1 (IRE1)、activating transcription factor 6 (ATF6) の3つの膜タンパク質が存在し、小胞体ストレス応答の調節を行っている。また、KDEL は非ストレス下においてフォールディングの促進に加え、PERK、IRE1 および ATF6 のストレスシグナル応答タンパクに結合し、非活性化状態を維持している。しかし、小胞体ストレスが生じると、KDEL が外れシグナル活性化状態となる (Ron and Walter, 2007)。PERK に関しては自身でオリゴマー化し自己リン酸化し、下流の eIF2 α をリン酸化し、翻訳抑制をさせる。これは小胞体に運び込まれるタンパク質の量を減らすことになるため、細胞の生

存につながる。しかし、eIF2 α のリン酸化はアポトーシスに関与する転写因子である C/EBP homologous protein (CHOP) の発現上昇にも関与している。つまり、小胞体ストレス初期においては翻訳量を減少させることで細胞生存に有利に作用するが、ストレスが持続する場合にはアポトーシスへと向かわせる (Harding et al., 2000)。本検討においても、小胞体ストレスにより誘導される KDEL の発現増加が認められた (Fig. 8)。しかし、TAM 投与により KDEL および eIF2 α シグナルへの影響が認められなかった (Fig. 8)。TAM による小胞体ストレスに対する影響は小さいことが考えられるが、他の2つのシグナルについても詳細な検討が必要だと考えられる。

また、本研究では steatosis モデルマウス同様、NASH モデルマウスに対しても TAM が肝障害の程度を減弱させることを示した。また、その作用の一因として TAM による ERK1/2 活性化の増加による肝再生能の上昇、JNK1/2 活性化の減少による炎症性因子の低下、および小胞体ストレス eIF2 α 活性化の減少によるアポトーシスの抑制が関与することが示唆された。NASH モデルマウスに対して TAM を投与し、症状が改善された報告はなく、本研究が初めてである。

NASH は steatosis とインスリン抵抗性を基礎に、酸化ストレスによる脂質過酸化、エンドトキシンおよび TNF- α をはじめとする炎症性因子により発症するとされている (Day et al., 1998)。TAM 投与により NASH モデルマウスの ALT 値および

AST 値の低下が認められ (Fig. 9)、組織染色において、脂肪滴および炎症の減弱が認められた (Fig. 10)。また遺伝子レベルにおいても炎症性因子の低下が認められた (Fig. 13)。これらのことから、TAM により肝障害の程度が減弱し、またその減弱の一因が NASH 発症および増悪に関与する炎症性因子の低下であることが示唆された。

NASH モデルマウスにおいて、steatosis モデルマウス同様に GSH 含量および MDA を測定した。今回、NASH モデルマウスにおける GSH 含量 (0.22 ± 0.07) は、通常マウス (1.00 ± 0.12) と比べて、有意な減少が認められた。MCDD は必須アミノ酸のメチオニンおよびコリンの欠乏した餌である。生体内においてメチオニンはシステインとなり GSH が合成されることから、本検討ではメチオニンの欠乏により GSH 含量が低下したと考えられる。また、酸化ストレスのマーカーである MDA 含量 (1.88 ± 0.816) は通常マウス (1.00 ± 0.13) と比べて有意な上昇が認められた。しかし、NASH モデルマウスにおいて GSH 含量および MDA 含量はともに TAM 投与による影響は認められなかったことから、TAM による肝障害減弱作用にこれらの因子が関与していないものと考えられる。

Steatosis モデルマウス同様に NASH モデルマウスにおいても MAPK および小胞体ストレスシグナル活性化に変動が認められるか検討した。TAM 投与により ERK1/2 活性化の増加、JNK1/2 活性化の減少 (Fig. 14) および eIF2 α 活性化の減少

が認められた (Fig. 15)。Steatosis モデルマウスと同様に、ERK1/2 活性化により、肝再生能が上昇したと考えられる。また酸化ストレスや小胞体ストレスといった因子は、JNK1/2 を活性化しインスリン抵抗性や炎症に関与すると報告されている (Hotamisligil, 2003; Samuel et al., 2004; Ozcan et al., 2004; Kamata et al., 2005)。また、E2 投与により JNK1/2 活性の減少が認められるという報告から (Vilatoba et al., 2005)、TAM の E2 作用により JNK1/2 活性の減少が認められ、下流の炎症因子が低下したことが示唆された。KDEL は小胞体ストレス時に誘導されてくるが、本検討において TAM による肝障害減弱時に KDEL の変動は認められなかったが、eIF2 α 活性の減少が認められた (Fig. 15)。eIF2 α のリン酸化は下流因子を翻訳抑制し、最終的に CHOP というアポトーシス誘導因子を活性化する (Rutkowski et al., 2006)。本検討では、TAM 投与により eIF2 α 活性化が減少したことから、下流の CHOP 活性化が減少することによりアポトーシスが抑制され、肝障害の程度の減弱が生じたと考えられる。

本研究では、steatosis および NASH モデルマウスにおいて TAM が肝障害改善作用を有することを明らかにした。臨床において、乳がん患者への TAM 投与により steatosis および NASH が発症するという報告があり問題となっている (Murata et al., 2000)。またその原因の一つとして肥満が挙げられているが、詳細なメカニズムは解明されていない部分が多い。また、通常マウスへの TAM 投与による脂肪酸

の増加が、steatosis の原因の一つと考えられているが (Cole et al., 2010)、本検討における steatosis および NASH モデルマウスへの TAM 投与において、脂肪酸合成因子の変動は認められなかった (Fig. 6)。モデルマウスと通常マウスにおいて生体内状態の違いにより TAM に対する反応性が異なることが考えられるが詳細な原因は不明である。また、モデルマウス間においても TAM による反応性の違いが、MAPK や小胞体ストレスシグナルにおいて認められたことから、各病態によっても TAM の作用が異なることが示唆された。しかしながら、E2 が HFD 誘導性の steatosis に対して保護的に作用するという報告からも (Riant et al., 2009)、マウスにおいて E2 が肝障害に対する防御因子であることが示唆されているため、本検討における steatosis および NASH モデルマウスに対しても TAM による E2 作用により肝障害が減弱したと考えられる。また、TAM は SERM であるため、今後マウスを用いて検討するうえで肝臓以外の組織、特に steatosis および NASH 発症に関与する脂肪組織における TAM の作用、また E2 作用との比較も必要と思われる。

E. 結論

本研究は、steatosis および NASH モデルマウスに対して、TAM の post 投与が肝障害改善作用を示すことを初めて明らかにした報告であり、また肝障害に対する薬物治療を考える上で役立つ有用な情報が提供できると考えられる。

<参考文献>

- Behjati S and Frank MH (2009) The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem* **16**: 3076-3080.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, and Hobbs HH (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* **40**: 1387-1395.
- Brunt EM (2010) Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**: 19-25.
- Cole LK, Jacobs RL, and Vnace DE (2010) Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis. *Hepatology* **52**: 1258-1265.
- Cosman F and Lindsay R (1999) Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. *Endocr Rev* **20**: 418-434.
- Day CP and James OFW (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits". *Gastroenterology* **114**: 842-845.
- Defranco AL, Crowley MT, Finn A, Hubbleton J, and Weinstein SL (1998) The role of tyrosine kinases and map kinases in LPS-induced signaling. *Prog Clin Biol Res* **397**: 119-136.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, and Parks EJ (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* **115**: 1343-1351.
- Gregor MG and Hotamisligil GS (2007) Thematic review series: Adipocyte biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* **48**: 1905-1914
- Harada H, Bharwari 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.
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, and Ron D (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**: 897-904.
- Hotamisligil GS (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 (Suppl)**: S53-S55.
- Howell A, Cuzick, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hoctin-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.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, and Karin M (2005) Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**: 649-661.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, and Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor α and β . *Endocrinology* **138**: 863-870.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lu SC (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* **13**: 1169-1183.
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, and Oh BJ (1980) Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* **55**: 434-438.
- Martindale JL and Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**: 1-15.
- McGarry JD and Foster DW (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Ann Rev Biochem* **49**: 395-420.
- Michel T, Marco A, and Martin W (2010) Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **1801**: 299-310.
- 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.
- Murata Y, Ogawa Y, Saibara T, Nishioka A, Fujiwara Y, Fukumoto M, Inomata T, Enzan H, Onishi S, and Yoshida S (2000) Unrecognized hepatic steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in adjuvant tamoxifen for breast cancer patients. *Oncol Rep* **7**: 1299-1304.
- 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.
- Obsorne CK and Fuqua SA (1994) Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* **32**: 49-55.
- Olson LK, Tan Y, Zhao Y, Aupperlee MD, and Haslam SZ (2010) Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness. *Int J Obes* **34**: 1415-1426.
- Ono M and Saibara T (2006) Clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis in Japan: Evidence from literature. *J Gastroenterol* **41**: 725-732.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, and Hotamosligil GS (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**: 457-461.
- 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.
- Rao KS and Reddy JK (2001) Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis* **21**: 43-55.
- Reed DJ (1986) Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem Pharmacol* **35**: 7-13.
- Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, and Gourdy P (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* **150**: 2109-2117.
- Ron D and Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Rev* **8**: 519-529.
- Rutkowski DT, Arnold SM, and Miller CN (2006) Adaptation of ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PloS Biol* **4**: e374.
- Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, and Shulman GI (2004) Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* **279**: 32345-32353.
- Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan SV, and Anania FA (2004) Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* **18**: 1612-1614.
- Schroder M and Kaufman RJ (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**: 739-789.
- Seeger R and Krebs EC (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* **9**: 726-735.
- Seong HH, Sung HK, Eun JB, Hyun EK, and Sang GK (2009) Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones. *Hepatology* **49**: 1913-1925.
- Tietze F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to

mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**: 502-522.

Towbin H, Staehelin T, and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.

Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Frennete L, Eckhoff DE, and Contreras JL (2005) 17 β -Estradiol differentially activates mitogen-activated protein-kinases and improves survival following reperfusion injury of reduced-size liver in mice. *Transplant Proc* **37**: 399-403.

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.

Yang S, Zhu H, Li Y, Lin H, Gabrielson K, Trush MA, and Diehl AM (2000) Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* **378**: 259-268.

Yoshiike N and Lwin H (2005) Epidemiological aspects of obesity and NASH/NAFLD in Japan. *Hepatology* **33**: 77-82.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1.論文発表

Yasuyuki Toyoda, Taishi Miyashita, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Estradiol and progesterone modulate halothane-induced liver injury in mice.

Toxicol. Lett., 204: 17-24 (2011).

Yasuyuki Toyoda, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Taishi Miyashita, Azusa Yano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi. Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury. *Toxicol. Sci.*, 126: 16-27 (2012).

2.学会発表

宮下泰志、豊田泰之、常山幸一、深見達基、中島美紀、横井毅：Steatosis および NASH モデルマウスに対するタモキシフェンの影響、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 2011.7.11-13 口頭&ポスター 横浜

豊田泰之、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女性ホルモンの影響、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 2011.7.11-13 ポスター 横浜

H. 知的財産権の出願・登録

該当なし。

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

フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に 関与する酵素の検討

分担研究者 深見 達基 金沢大学医薬保健研究域薬学系助教

解熱鎮痛薬であるフェナセチンは腎盂腎炎、腎細胞がん、血液毒性などの副作用が知られている。フェナセチンは約 70–80% が主に CYP1A2 により薬理活性を有する代謝物である APAP に代謝される。この反応とは別に加水分解により *p*-フェネチジンが生成し、さらに *N* 位が水酸化された *N* 位水酸化フェネチジンが毒性発現に関与すると考えられている。しかし、実際にこの代謝経路がフェナセチンの毒性発現に関与しているか実証された例はない。その原因の 1 つとしてはこの一連の代謝を触媒する酵素が不明であるという背景がある。フェナセチン誘発性の血液毒性として Met-Hb 血症が知られている。ラットを用いた検討で、フェナセチン投与により Met-Hb 濃度の上昇が認められたのに対し、加水分解酵素阻害剤である bis-(*p*-nitrophenyl)phosphate (BNPP) とフェナセチンの併用投与により Met-Hb 濃度が減少したことから、フェナセチンの Met-Hb 血症誘発に加水分解代謝経路の関与が示唆されている。当研究室の最近の研究でヒトでは、AADAC がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関与する可能性が示唆された。本研究では、マウスにフェナセチンを投与することで Met-Hb 血症誘発に加水分解代謝経路が関与しているのか詳細な検討を行い、さらに *in vitro* において Met-Hb 血症発現に関わる酵素を同定することを目的とし検討を行った。フェナセチンをマウスに経口投与したところ、加水分解代謝物である *p*-フェネチジンが投与 15 分から 1 時間で高い血漿中濃度を示し、Met-Hb 濃度は投与 1 時間後に最大値を示した。さらに、加水分解酵素阻害剤である TOTP を前投与することでフェナセチン投与による Met-Hb 濃度と *p*-フェネチジンの血漿中濃度の低下が認められた。以上の結果より、加水分解代謝経路がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症の発現に重要な役割を有することが示唆された。また、*in vitro* 試験系において *p*-フェネチジンを HLM、NADPH 生成系および赤血球とインキュベートすることで Met-Hb 濃度の上昇が認められたことから、毒性発現に加水分解代謝経路が関与することが示された。発現系を用いた検討ではフェナセチンを AADAC と CYP1A2 または CYP2E1 とインキュベートすることで Met-Hb 濃度の上昇が認められ、これらの酵素がフェナセチンの毒性発現に関与すると考えられた。以上の結果より、AADAC、CYP1A2 および CYP2E1 がフェナセチン誘導

性 Met-Hb 血症発現に高い寄与を有することを明らかにした。

A. 研究目的

薬物代謝酵素はビリルビンやステロイドなどの内因性化合物および薬物や環境汚染物質などの外因性化合物を代謝し、生体内で化合物の構造を変化させて極性を増大させ、体外へと排泄させやすくする。第 I 相薬物代謝酵素は、酸化、還元、加水分解などの反応を触媒し、第 II 相薬物代謝酵素は抱合反応を触媒する。第 I 相反応の 1 つである加水分解は、エステル、アミド、 β -ラクタムおよびチオエステルなどの構造を有する薬物の代謝的活性化や解毒過程において重要な役割を果たしている。例えば、抗悪性腫瘍薬である塩酸イリノテカン (CPT-11) はエステル結合が加水分解され活性代謝物である SN-38 が生成する。また、局所麻酔薬であるプロカインはエステル基が加水分解されて薬効を失う。

エステル、アミドおよびチオエステル結合やラクトン環を有する化合物の加水分解に関与する薬物代謝酵素としてカルボキシエステラーゼ (CES)、コリンエステラーゼ、パラオクソナーゼ (PON) などが知られており、それぞれ CPT-11、 β 2 受容体アゴニストのバムブテロール、ムスカリン性コリン作動薬のピロカルピンなどの医薬品の加水分解を触媒することが知られている (Nyberg et al., 1998; Humerickhouse et al., 2000; Hioki et al., 2011)。しかし、薬物の加水分解についてこれらの薬物代謝酵素のみでは説明できない。

薬物代謝に関与する加水分解酵素として当研究室ではアリルアセタミドデアセチラーゼ (AADAC) について注目してきた。AADAC は小胞体内腔に存在するタンパク質であり、活性中心にセリン残基を有するセリンエステラーゼに属する加水分解酵素である。ヒトにおいては薬物代謝を担う主要臓器である肝臓や消化器官に発現が認められている (Watanabe et al., 2009)。AADAC は変異原性物質である 2-アセチルアミノフルオレンの脱アセチル化反応を触媒する酵素として同定され (Probst et al., 1991)、その活性部位がホルモン感受性リパーゼと高い相同性を有していることから脂質代謝への関与が注目されており (Probst et al., 1994)、実際にコレステロールエステルを加水分解することが知られている (Tiwari et al., 2007)。また、当研究室の研究によりヒト AADAC が前立腺癌治療薬のフルタミド、解熱鎮痛薬のフェナセチン、抗結核薬のリファマイシン系薬物などの臨床で使用されている薬物の加水分解反応を触媒することを明らかにした (Watanabe et al., 2009 and 2010, Nakajima et al., 2011)。

フェナセチンは解熱鎮痛薬として広く使用されていたが、腎盂腎炎や腎細胞がんといった重篤な副作用のために日本では 2001 年に販売中止となった (Sicardi et al., 1991; Gago-Dominguez et al., 1999)。ヒトにおいてフェナセチンは CYP1A2 による脱エチル化反応により薬理活性代謝物であるアセトアミノフェン (APAP) に

変換される主代謝経路と、AADAC が触媒する加水分解反応により *p*-フェネチジンに代謝される経路がある (Butler et al., 1989; Kudo et al., 2000; Watanabe et al., 2010)。 *p*-フェネチジンはさらに *N* 位水酸化を受け *N* 位水酸化フェネチジンに変換される。フェナセチンは腎毒性の他に血液毒性の副作用も知られており、この水酸化代謝物が腎毒性や血液毒性の原因物質として考えられている (Wirth et al., 1982; Jensen and Jollow, 1991)。そのため毒性の発症は加水分解代謝経路が関与していると考えられるが、詳細は明らかにされていない。また、ラットおよびマウスにおいてもフェナセチンの脱エチル化代謝経路および加水分解代謝経路の存在が知られているが (McLean, 1978; Nakayama and Masuda, 1985)、詳細な検討

は行われていない。フェナセチンの血液毒性としてメトヘモグロビン (Met-Hb) 血症が知られている (Jensen and Jollow, 1991)。Met-Hb とは赤血球中に存在するヘモグロビンが過剰に酸化された状態を意味しており、ヘモグロビンは酸素運搬能を有するのに対し、Met-Hb は酸素運搬能を有していない。そのため血中の Met-Hb 濃度の上昇にともなってチアノーゼや意識障害などの症状が現れる。この毒性発現にはフェナセチンの加水分解およびそれに続く水酸化反応が関与していると考えられているが、この加水分解代謝経路が毒性発現に関与していることを証明した例はない。そこで本研究ではフェナセチンの血液毒性に AADAC による加水分解反応とそれに続く水酸化反応が関与するのか明らかにすることを目的とした。

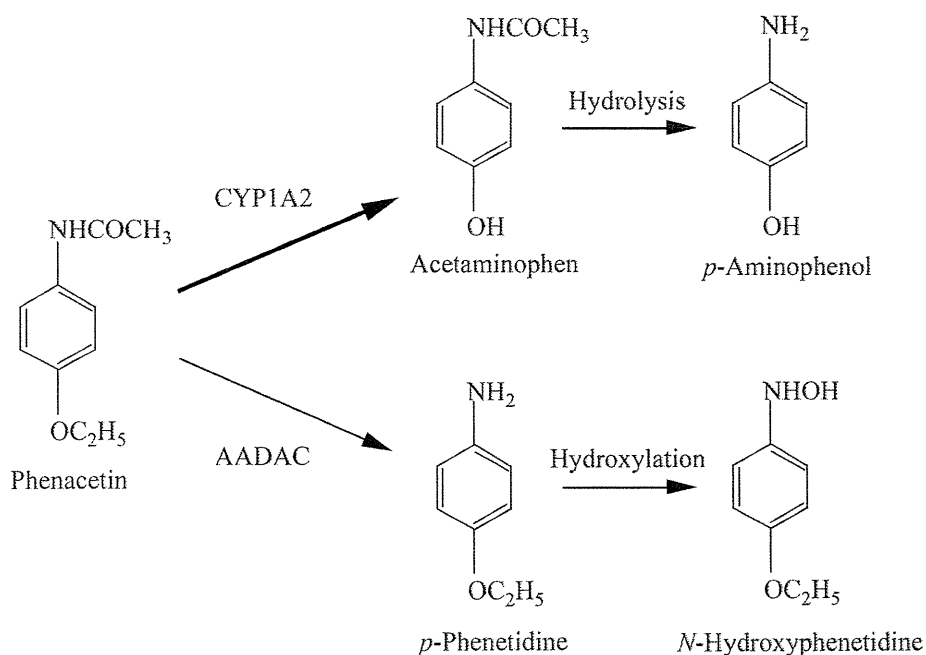


Fig. 1. Metabolic pathways of phenacetin in human.

B. 研究方法

ヒト CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A5 バキュロウイルス発現系スーパーソームは BD Gentest (Woburn, MA) より購入した。BNPP は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。マウスへのフェナセチンおよび加水分解酵素阻害剤 TOTP 投与については、6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを 1 週間予備飼育後、250 mg/kg フェナセチン (in 9% solutol) を単回経口投与した。血液中の Met-Hb 濃度および薬物濃度の経時的変化を検討するために、投与 0、0.25、0.5、1、2、3、6 時間後にヘパライズした器具を用いて下行大静脈より採血を行った。

加水分解酵素阻害剤である TOTP (Emeigh Hart et al., 1991) によるフェナセチン加水分解酵素活性への影響を確認するため、TOTP の投与検討を行った。マウスを 1 週間予備飼育後、125 mg/kg TOTP (in corn oil) を単回腹腔内投与した。肝臓における酵素活性を測定するために、投与 0、1、6、12 時間後のマウス肝臓を採取した。フェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に対する TOTP の影響を検討するために、フェナセチンおよび TOTP の併用投与を行った。マウスを 1 週間予備飼育後、125 mg/kg TOTP を単回腹腔内投与し、12 時間後、250 mg/kg フェナセチンを単回経口投与した。血液中の Met-Hb 濃度および薬物濃度を測定するために、フェナセチン投

与 1 時間後にヘパライズした器具を用いて下行大静脈より採血を行った。

pH 6.6 における Met-Hb の吸光度は 630 nm で最大であり、シアンメトヘモグロビンの吸光度は 540 nm で最大となり 630 nm では吸収を示さない。この原理を元に、血中 Met-Hb 濃度を Wang ら (2009) の方法に修正を加え測定した。精製水 8 mL を加えたファルコンチューブに全血 100 μ L を加え、転倒攪拌して約 30 分間室温で放置し、溶血させた。100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6) を 2 mL 加え転倒攪拌し、1,000 g で 10 分間遠心分離した後、上清を 2.5 mL ずつ 2 つの試験管に採取した。最初の試験管では、630 nm および 680 nm における吸光度の差 ($A_1 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した後、5%シアン化カリウムを 25 μ L 加え再度 630 nm および 680 nm における吸光度の差 ($A_2 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した。2 つ目の試験管に 20%フェリシアン化カリウムを 25 μ L 加え 30 分間放置することで血中のヘモグロビンを全て Met-Hb に変換した。630 nm および 680 nm における吸光度の差 ($A_3 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した後、5%シアン化カリウムを 25 μ L 加え再度 630 nm および 680 nm における吸光度の差 ($A_4 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した。吸光度の測定には U-2001 スペクトロメーター (日立) を使用した。下記の式を用いて、総ヘモグロビン中に占める Met-Hb の割合 (Met-Hb 濃度) を算出した。

$$\text{Met-Hb (\%)} = (A_1 - A_2) / (A_3 - A_4) \times 100$$

フェナセチンおよび *p*-フェネチジンの血漿中濃度は、Watanabe ら (2010) の方法に修正を加え測定した。Real-time RT-PCR および SDS-PAGE とウェスタンブロッティングは、常法に従って行った。

In vitro 試験系におけるフェナセチンおよび代謝物誘導性メトヘモグロビン血症の検出は、フェナセチン、*p*-フェネチジンおよび APAP による Met-Hb 血症は、Nakayama and Masuda (1985) の方法に修正を加え下記の方法で測定した。6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスからヘパリナイズした器具を用いて下行大静脈より採血した全血を 1,000 g、4 °C で 5 分間遠心分離した後、血漿および Buffy-coat を除いたものを赤血球として使用した。反応系は酵素源である HLM (1.0 mg/mL)、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4, 最終濃度 100 mM)、NADPH 生成系 20 μ L およびマウス赤血球 20 μ L に精製水を加え、全量を 196 μ L (フェナセチン) もしくは 198 μ L (*p*-フェネチジンおよび APAP) とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、最終濃度が 0.1、1、5 mM になるようフェナセチンをそれぞれ 4 μ L 添加、もしくは最終濃度が 0.01、0.1、1 mM になるよう *p*-フェネチジンおよび APAP をそれぞれ 2 μ L 添加することにより反応を開始した。なお基質の溶媒はアセトニトリルとし、反応液中の有機溶媒の濃度は 2%以下となるようにした。37°C で 120 分間 (フェナセチン) もしくは 60 分間 (*p*-フェネチジンおよび APAP) インキュベートした後、氷上で冷却することで反応を停止した。なお予備検討で 5 mM フェナセチン

および 1 mM *p*-フェネチジンにおいて 120 分間インキュベートを行った結果、フェナセチンでは 120 分まで Met-Hb 濃度が上昇し、*p*-フェネチジンでは 60 分で Met-Hb 濃度が飽和に達したことから (data not shown)、フェナセチンは 120 分間インキュベートし、代謝物である *p*-フェネチジンおよび APAP は 60 分間インキュベートすることとした。

Met-Hb 濃度は II-2-3 の方法に修正を加え測定した。精製水 0.8 mL を加えたサンプルチューブに上記反応液 50 μ L を加え、転倒攪拌して約 30 分室温に放置し、完全に溶血させた。100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6) を 0.2 mL 加え転倒攪拌し、1,000 g で 10 分間遠心分離した後、上清を 250 μ L ずつ 2 つのサンプルチューブに採取した。最初のサンプルチューブには、630 nm および 680 nm における吸光度 ($A_1 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した後、5%シアン化カリウムを 2.5 μ L 加え再度 630 nm および 680 nm における吸光度 ($A_2 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した。2 つ目のサンプルチューブに 20%フェリシアン化カリウムを 2.5 μ L 加え 30 分間放置し、630 nm および 680 nm における吸光度 ($A_3 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した後、5%シアン化カリウムを 2.5 μ L 加え再度 630 nm および 680 nm における吸光度 ($A_4 = OD_{630} - OD_{680}$) を測定した。吸光度の測定には U-2001 スペクトロメーター (日立) を使用した。

In vitro 試験系における *p*-フェネチジン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する CYP 分子種の同定は、フェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関与する CYP 分子種を

同定するためにフェナセチンの加水分解代謝物である *p*-フェネチジンを基質として下記の検討を行った。反応系は酵素源、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4, 最終濃度 100 mM)、NADPH 生成系 20 μ L およびマウス赤血球 20 μ L に精製水を加え、全量を 198 μ L とした。酵素源にはヒト CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 および CYP3A5 発現系スーパーソームを使用し、最終濃度はそれぞれ 25 pmol CYP/mL とした。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、最終濃度が 1.0 mM になるよう *p*-フェネチジンをそれぞれ 2 μ L 添加することにより反応を開始した。なお基質は溶媒にアセトニトリルを用いており反応液中の有機溶媒の濃度は 1%以下となるようにした。37°C で 60 分間インキュベートした後、氷上で冷却することで反応を停止した。

In vitro 試験系におけるフェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与するエステラーゼの同定は、フェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関与するエステラーゼを同定するためにフェナセチンを基質として下記の検討を行った。反応系は酵素源、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4, 最終濃度 100 mM)、NADPH 生成系 20 μ L およびマウス赤血球 20 μ L に精製水を加え、全量を 196 μ L とした。酵素源としてエステラーゼ発現系と CYP 発現系を組み合わせ使用した。エステラーゼの酵素源としてヒト AADAC、CES1 および CES2 発現系を、CYP の酵素源としてヒト CYP1A2 および CYP2E1 発現系スーパー

ソームを使用し、最終濃度はエステラーゼは 1.0 mg/mL、CYP 発現系スーパーソームは 25 pmol CYP/mL とした。なお、ヒト CES1 および CES2 各バキュロウイルス発現系は、当研究室の高橋 志織修士により樹立された。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、最終濃度が 5.0 mM になるようフェナセチンをそれぞれ 4 μ L 添加することにより反応を開始した。なお基質は溶媒にアセトニトリルを用いており反応液中の有機溶媒の濃度は 2%以下となるようにした。37°C で 120 分間インキュベートした後、氷上で冷却することで反応を停止した。

In vitro 試験系におけるフェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症の阻害実験については、フェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に対する AADAC の関与を検討するためにフェナセチンを基質として阻害実験を行った。反応系は酵素源である HLM (1.0 mg/mL)、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4, 最終濃度 100 mM)、NADPH 生成系 20 μ L、マウス赤血球 20 μ L および阻害剤 (10 μ M) に精製水を加え、全量を 196 μ L とした。阻害剤としてエセリンおよび BNP を用いた。37°C で 2 分間プレインキュベートした後、最終濃度が 5.0 mM になるようフェナセチンをそれぞれ 4 μ L 添加することにより反応を開始した。なお基質は溶媒にアセトニトリルを用いており反応液中の有機溶媒の濃度は 2%以下となるようにした。37°C で 120 分間インキュベートした後、氷上で冷却することで反応を停止した。

統計解析は、*In vivo* における 2 群間の

統計学的評価は nonparametric

Mann-Whitney test により、*in vitro* における多群間の統計学的評価は ANOVA および Tukey 検定により解析した。 $P < 0.05$ の時、統計学的に有意であると判断した。

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. 研究結果

C-1. フェナセチン投与によるメトヘモグロビン濃度およびフェナセチンおよび代謝物血漿中濃度の経時的変化

マウスにフェナセチン (250 mg/kg) を経口投与し、Met-Hb 濃度、フェナセチン、*p*-フェネチジンおよび APAP の血漿中濃度を、投与 0 時間から 6 時間後にかけて経時的に測定した (Fig. 2)。フェナセチン投与により Met-Hb 濃度は上昇し、投与後 1 時間において最大値 ($16.7 \pm 2.1\%$) を示し、3 時間後にはほとんど Met-Hb 濃度は認められなくなった (Fig. 2A)。フェナセチンの血漿中濃度は投与 15 分後で最大値を示し、2 時間後にはほとんど消失した (Fig. 2B)。*p*-フェネチジンおよび APAP の血漿中濃度は 15 分から 1 時間後にかけて高値を示し、2 時間後から低下を示した (Figs. 2C and D)。

C-2 TOTP 投与によるフェナセチン加水

分解酵素活性の阻害検討

加水分解酵素阻害剤として知られている TOTP (Emeigh Hart et al., 1991) をマウスに投与することで MLM におけるフェナセチン加水分解酵素活性が減少するか検討した。最初に、TOTP (125 mg/kg) を腹腔内単回投与したマウスから 0、1、6 および 12 時間後に肝臓を採取し、AADAC mRNA およびタンパク質発現への影響を real-time RT-PCR、および SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングにより検討した (Fig. 3)。TOTP 投与 12 時間後のマウス肝臓において 0 時間に比べ AADAC mRNA の有意な減少が認められたが、減少の程度は $28.4 \pm 9.4\%$ と軽微であった (Fig. 3A)。また、AADAC タンパク質の発現量は TOTP 投与 12 時間後まで変動は認められなかった (Fig. 3B)。次に、TOTP が酵素活性に与える影響を検討するために TOTP 投与 0、1、6、12 時間後のマウス肝臓から調製した MLM を用いてフェナセチン加水分解酵素活性および脱エチル化酵素活性を測定した (Fig. 4)。TOTP 投与 12 時間後に、フェナセチン加水分解酵素活性は 0 時間と比べ $93.1 \pm 2.3\%$ 減少した (Fig. 4A)。一方、TOTP 投与 12 時間後までフェナセチン脱エチル化酵素活性に変動は認められなかった (Fig. 4B)。以上より、TOTP はフェナセチン脱エチル化酵素活性には影響を与えず、加水分解酵素活性を阻害することが示された。

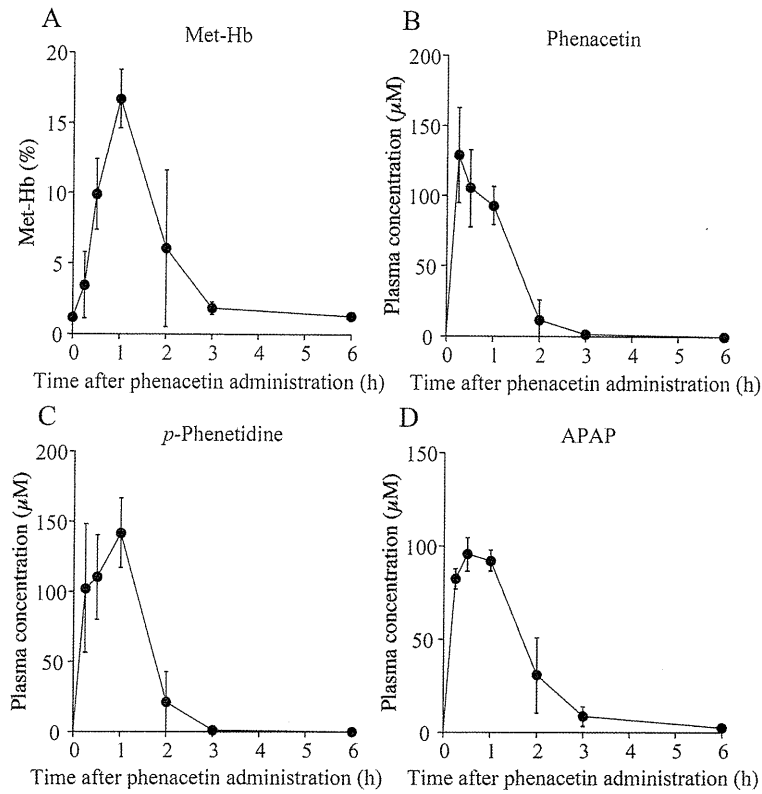


Fig. 2. Time-dependent changes of Met-Hb levels (A), plasma concentrations of phenacetin (B), *p*-phenetidine (C), and APAP (D) in phenacetin-treated mice. Mice were administered phenacetin (250 mg/kg, *p.o.*), and blood were collected 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, and 6 h after administration. Each data point represents the mean \pm SD ($n = 3$ to 5).

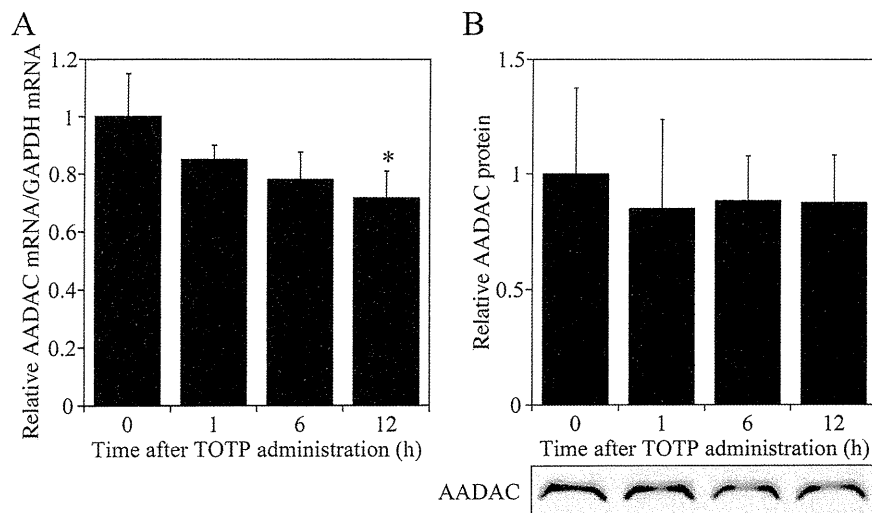


Fig. 3. Effects of *in vivo* treatment of TOTP on the expression levels of AADAC mRNA (A) and AADAC protein (B). Mice were administered TOTP (125 mg/kg, *i.p.*), and were sacrificed 0, 1, 6, and 12 h after administration. Each column represents the mean \pm SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ compared with 0 h.

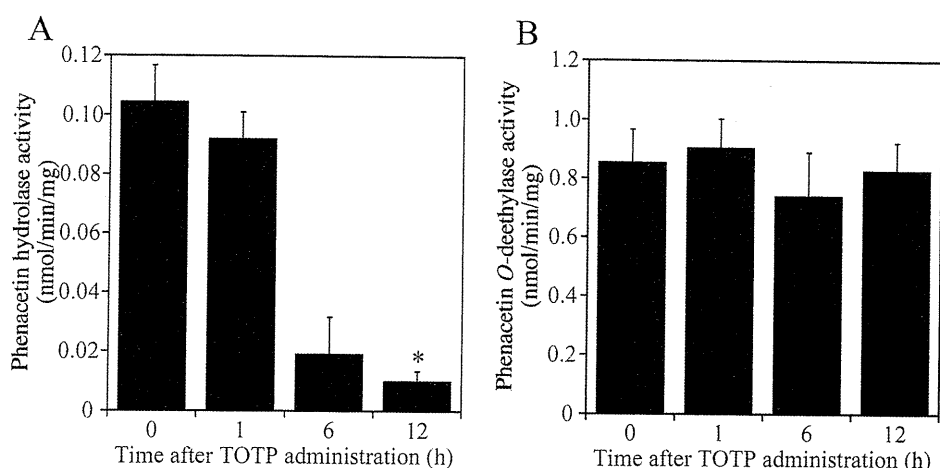


Fig. 4. Effects of *in vivo* treatment of TOTP on phenacetin hydrolase activity (A) and *O*-deethylase activity (B) in MLM. Mice were administered TOTP (125 mg/kg, *i.p.*), and were sacrificed 0, 1, 6, and 12 h after administration. Each column represents the mean \pm SD (n = 4). * $P < 0.05$ compared with 0 h.

C-3 TOTP 投与によるフェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症の阻害検討

TOTP を前投与することで、フェナセチン誘導性 Met-Hb 血症が減少するか検討した。TOTP (125 mg/kg) をマウスに腹腔内投与し、12 時間後にフェナセチン (250 mg/kg) を経口投与した。フェナセチン投与 1 時間後のマウスから採血を行い、Met-Hb 濃度、フェナセチン、*p*-フェネチジンおよび APAP の血漿中濃度を測定した。Met-Hb 濃度は TOTP の前投与により $25.0 \pm 6.5\%$ から $1.2 \pm 0.2\%$ に有意に減少した (Fig. 5A)。フェナセチンの血漿中濃度は TOTP の前投与により変化が認められなかったが (Fig. 5B)、フェナセチンの加水分解代謝物である *p*-フェネチジンの血漿中濃度の有意な減少が認められた

(Fig. 5C)。一方、APAP の血漿中濃度に有意な変化は認められなかったが、加水分解代謝経路が阻害されたことにより上昇傾向を示したと考えられた (Fig. 5D)。以上の結果から、フェナセチンの加水分解代謝経路が Met-Hb 血症の誘発に関与することが示唆された。

C-4 *In vitro* 試験系におけるフェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に関与する酵素の同定

In vivo の検討でフェナセチンの加水分解代謝経路がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関与することが示唆された。次に酵素発現系を用いた *in vitro* による検討で毒性発現に関与する酵素の検討を行った。

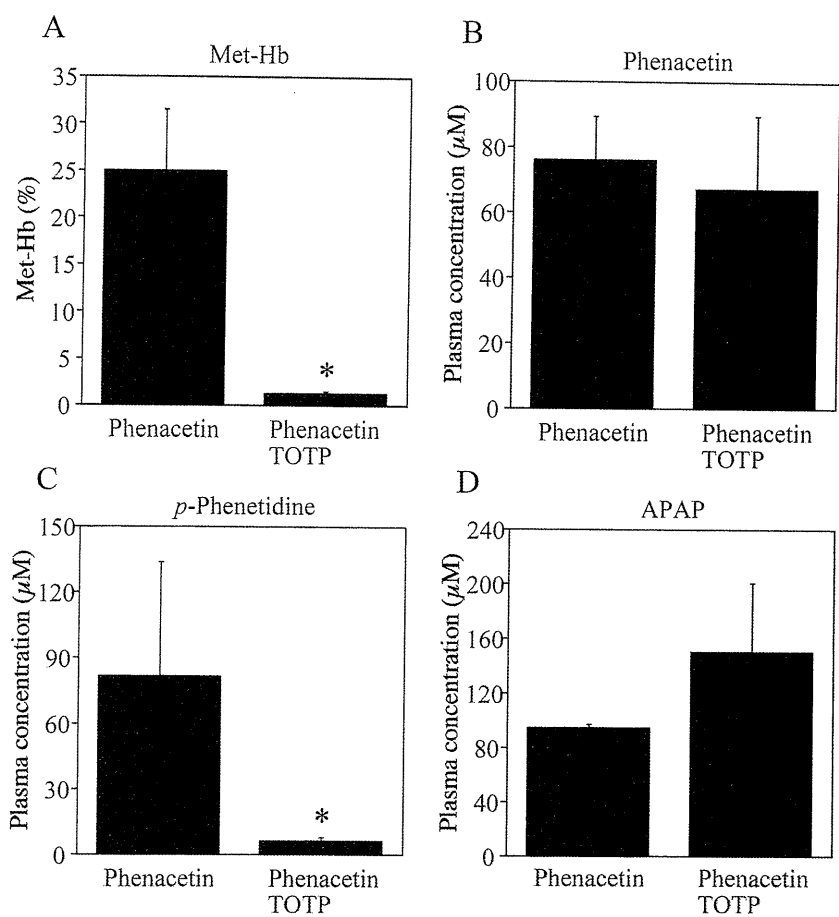


Fig. 5. Effects of TOTP on Met-Hb formation (A), and plasma concentrations of phenacetin (B), *p*-phenetidine (C), and APAP (D) in phenacetin-treated mice. TOTP (125 mg/kg, *i.p.*) were administered 12 h before administration of phenacetin (250 mg/kg, *p.o.*), and mice were sacrificed 1 h after administration of phenacetin. Each column represents the mean \pm SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ compared with no treatment of TOTP.

C-5 フェナセチン、*p*-フェネチジンおよび APAP 濃度依存的なメトヘモグロビン血症の検討

フェナセチン (0.1、1、5 mM)、*p*-フェネチジン (0.01、0.1、1 mM) および APAP (0.01、0.1、1 mM) をそれぞれ基質とし、HLM (1.0 mg/mL) およびマウス由来の赤血球とともにフェナセチンは 120 分間、*p*-フェネチジンおよび APAP は 60 分間インキュベートし Met-Hb 濃度を測定した (Fig. 6)。1 mM および 5 mM フェナセチンにおいて溶媒であるアセトニトリルと比

べて、濃度依存的な Met-Hb 濃度の上昇が認められた。また、0.01 mM から 1 mM の *p*-フェネチジンにおいても濃度依存的な Met-Hb 濃度の上昇が認められた。一方、APAP を基質とした際、0.01 mM から 1 mM の全ての濃度で Met-Hb 濃度の上昇は認められなかった。*p*-フェネチジンはインキュベート時間がフェナセチンよりも短いにも関わらず高値を示し、かつフェナセチンより低濃度から Met-Hb 濃度の上昇が認められたことより、フェナセチンの加水分解反応が毒性発現における律速

反応である可能性が考えられた。以上より、フェナセチンの脱エチル化代謝経路

は毒性に関与せず、加水分解代謝経路が毒性に関与することが証明された。

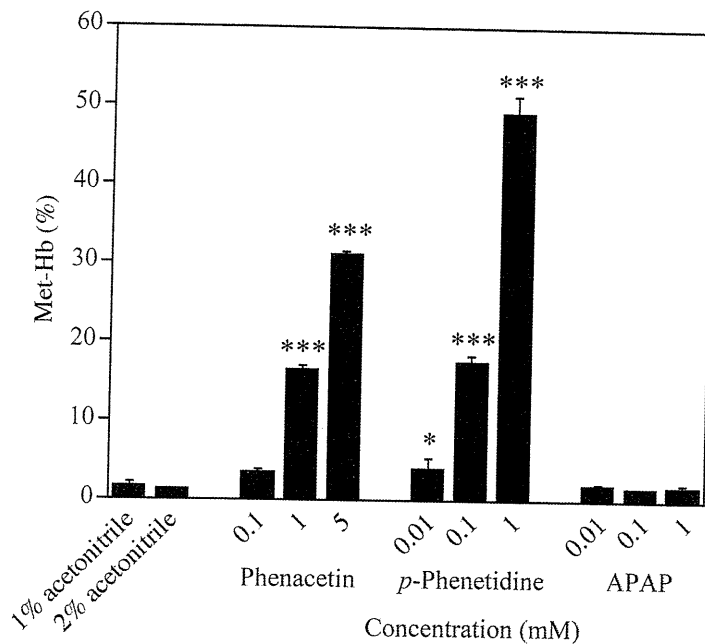


Fig. 6. Concentration-dependent phenacetin, *p*-phenetidine, and APAP-induced methemoglobinemias. Phenacetin (0.1, 1, and 5 mM), *p*-phenetidine (0.01, 0.1, and 1 mM), and APAP (0.01, 0.1, and 1 mM) were incubated with HLM (1.0 mg/mL), an NADPH-generating system, and mouse red blood cells. Each column represents the mean \pm SD of triplicate determinations. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with 1% acetone nitrile (*p*-phenetidine and APAP) or 2% acetone nitrile (phenacetin).

C-6 CYP 発現系による *p*-フェネチジン誘導性メトヘモグロビン血症発現の検討
 フェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関する CYP 分子種を同定するために *p*-フェネチジン (1 mM) を基質として、ヒト CYP バキュロウイルス発現系 (25 pmol CYP/mL) をマウス赤血球とともに 60 分間インキュベートし Met-Hb 濃度を測定した (Fig. 7)。CYP 分子種はヒト肝臓において高い発現が認められる CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 および CYP3A5 を用いた。ポジティブコ

ントロールとしてヒト CYP 発現系の代わりに HLM (1.0 mg/mL) を加えたものも測定した。ポジティブコントロールである HLM または CYP1A2、CYP2C19、CYP2D6 および CYP2E1 発現系と *p*-フェネチジンをインキュベートした群において CYP 発現系未添加のコントロールと比較して Met-Hb 濃度の有意な上昇が認められた。特に CYP1A2 (66.0 \pm 1.8%) および CYP2E1 (25.2 \pm 0.6%) において高い値を示し、これらの CYP 分子種がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に大きく関与することが示唆された。

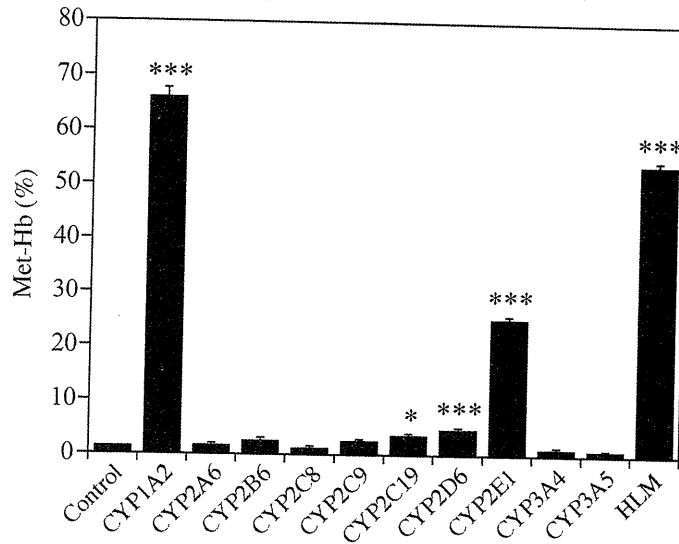


Fig. 7. *p*-Phenetidine-induced methemoglobinemia assessed by incubation with CYP enzymes. Each CYP expression system (25 pmol CYP/mL) and HLM (1.0 mg/mL) were incubated with 1 mM *p*-phenetidine, an NADPH-generating system, and mouse red blood cells. Each column represents the mean \pm SD of triplicate determinations. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with control (Supersomes expressing no CYPs).

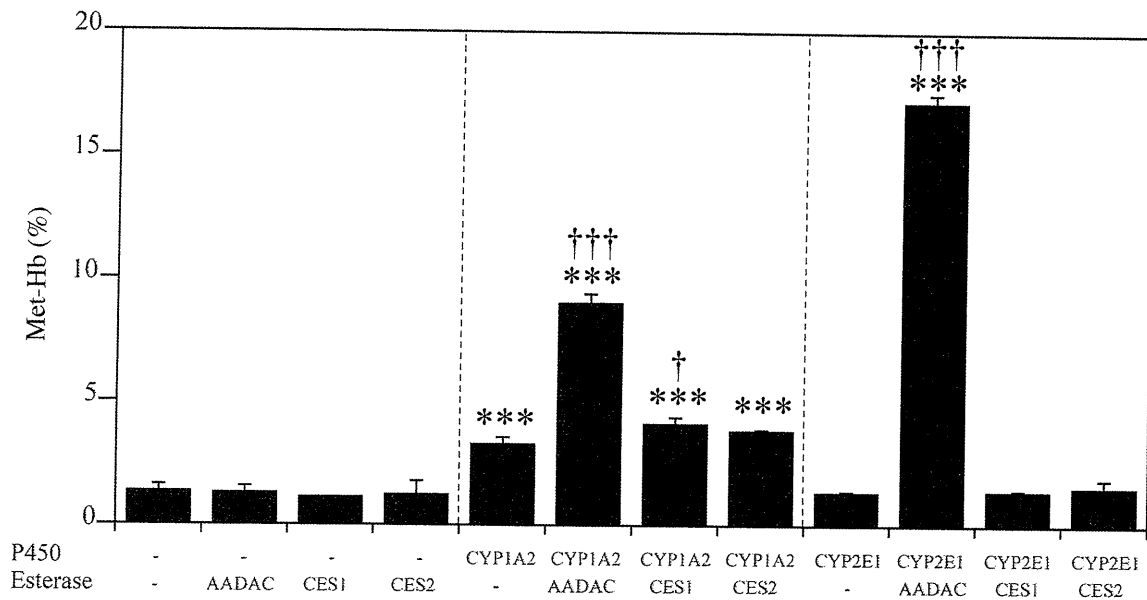


Fig. 8. Phenacetin-induced methemoglobinemia assessed by incubation with esterases and CYP enzymes. Human esterases (AADAC, CES1, and CES2: 1.0 mg/mL) and CYPs (CYP1A2 and CYP2E1: 25 pmol CYP/mL) were incubated with 5 mM phenacetin, an NADPH-generating system, and mouse red blood cells. Each column represents the mean \pm SD of triplicate determinations. *** $P < 0.001$ compared with CYP (-) and esterase (-). † $P < 0.05$ and ††† $P < 0.001$ compared with CYP (+) and esterase (-).

C-7 フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症に対する加水分解酵素阻害剤による阻害実験

これまで、AADAC の他に CES1 と CYP1A2 を組み合わせることによって Met-Hb 濃度の上昇が軽微に認められた。当研究室の研究でヒト肝臓では CES1 mRNA は AADAC mRNA よりも高く発現していることを明らかにしており (data not shown)、実際の生体内においてフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症発現に対する CES1 の寄与が低いことを証明できていない。また、HLM にはこれまでに検討した酵素の他にも、多くの酵素が発現している。エセリンおよび BNPP はそれぞれ AADAC および CES に対する阻害効果が高いことが知られている (Wang et al., 2011; Watanabe et al., 2009)。最初に、エステラーゼの一般的な基質である PNPA (500 μ M) を用いて、上記阻害剤のヒト AADAC、CES1 および CES2 発現系に対する阻害効率を検討した (Fig. 9)。AADAC の PNPA 加水分解酵素活性は 10 μ M エセリンにより強く阻害され、酵素活性は平均で 6.8%まで減少し、10 μ M BNPP 添加により 82.6%までしか減少なかった。CES1 の酵素活性は 10 μ M エセリン添加

により平均で 97.5%までしか減少せず、10 μ M BNPP 添加により強く阻害され 0.2%まで減少した。CES2 の酵素活性に対しては 10 μ M エセリン (8.6%) および 10 μ M BNPP (1.0%) とともに高い阻害効率を示した。以上より 10 μ M エセリンは AADAC および CES2 に対し高い阻害効率を有し、CES1 に対する阻害効率は低い。一方、10 μ M BNPP は AADAC に対する阻害効率は低く、CES1 および CES2 に対して高い阻害効率を有することが明らかになった。

これらの阻害剤を用いてフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症の阻害検討を行った (Fig. 10)。5 mM フェナセチンと HLM に上記阻害剤 (10 μ M) を添加しマウス赤血球とともにインキュベートし、Met-Hb 濃度を測定した。阻害剤未添加のコントロール ($36.3 \pm 1.0\%$) と比べ、10 μ M エセリンの添加により Met-Hb 濃度 ($9.1 \pm 0.3\%$) は有意に減少した。また、10 μ M BNPP の添加によっても Met-Hb 濃度 ($30.1 \pm 0.8\%$) の有意な減少が認められたが、エセリンに比べ減少の程度は軽微であった。阻害剤のみを添加した場合は Met-Hb 濃度は低値のままであった。以上の結果より、AADAC がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に対して高い寄与を有することが示唆された。