

神戸学院大学大学院食品薬品総合科学研究科学学位論文

急性肝障害とその生体防御に関する研究

2017 年 1 月

吉 岡 弘 毅

目次

緒論	1
第 1 章 四塩化炭素投与に対する致死消失作用を有する化合物の探索	3
第 1 節：目的	3
第 2 節：実験材料および実験方法	4
第 3 節：実験結果	8
第 1 項：四塩化炭素投与致死毒性による投与量と投与経路の影響	8
第 2 項：亜鉛およびカドミウム前投与が四塩化炭素致死毒性に与える効果	9
第 4 節：考察	13
第 2 章 肝臓および腎臓での四塩化炭素毒性に対する亜鉛前投与の防御効果	15
第 1 節：目的	15
第 2 節：実験材料および実験方法	16
第 3 節：実験結果	21
第 1 項：亜鉛前投与が肝臓における四塩化炭素毒性軽減に及ぼす効果	21
第 2 項：亜鉛前投与が腎臓における四塩化炭素毒性軽減に及ぼす効果	25
第 4 節：考察	28

第3章 亜鉛前投与がブロモベンゼン毒性発現に及ぼす効果	30
第1節：目的	30
第2節：実験材料および実験方法	31
第3節：実験結果	33
第1項：ブロモベンゼン致死毒性に対する亜鉛の効果	33
第2項：亜鉛前投与が肝臓におけるブロモベンゼン毒性軽減に及ぼす効果	34
第3項：亜鉛前投与が腎臓におけるブロモベンゼン毒性軽減に及ぼす効果	39
第4節：考察	43
第4章 低カルシウム血症が四塩化炭素毒性軽減に及ぼす効果	45
第1節：目的	45
第2節：実験材料および実験方法	46
第3節：実験結果	49
第4節：考察	54
総括	56
参考文献	59
謝辞	66

緒 論

厚生労働省が発表した平成 26 年簡易生命表によると男性の平均寿命は 80.50 年、女性の平均寿命は 86.83 年となっており、年々伸長している。この要因としては、豊かな食生活、公衆衛生の向上、医療制度の充実などの生活水準の向上が挙げられる。また、優れた医薬品の寄与するところも大きい。その一方で、解熱鎮痛剤や生活習慣病の治療薬など、身近に使用する医薬品の服用により、これらの薬物との因果関係が否定できない死亡例などが数多く報告されている [1, 2]。

肝臓は物質代謝や解毒、腎臓は生体異物の排泄において、それぞれ重要な役割を果たしていることから、肝臓と腎臓は、生命を維持する上で不可欠の臓器である [3-6]。それ故、肝臓や腎臓は化学物質の毒性が最初に顕れやすい臓器である [7-10]。化学物質や毒物を研究する毒性学では、その毒性が明確に顕れる臓器を標的臓器と定義している。しかし、カドミウムの投与時には、精巣に明瞭な出血性変化が見られるが、精巣が致死の原因とすることは無い。すなわち、「致死」は、標的臓器の概念では十分な説明が出来ない。

「致死」は、回復不能の最悪の状態である。臓器の中で、その障害・機能低下によって死に至る原因となる臓器は、「致命臓器」と命名できる。致命臓器としては心臓・肺・脳に加え、上記の肝臓と腎臓の 5 臓器が挙げられる。

死は毒性学の分野において、究極の状態である。その探究には、モデル動物を作製する必要がある。モデル動物により医療は飛躍的に発展した。しかし、致死モデル動物の作製や治療法・予防法の確立を目的とした研究は、ほとんど見られない。

四塩化炭素 (CCl_4) は古くには麻酔薬としても使用されていた化合物であるが、肝臓に重篤な障害を起こす。その病態は、ヒトの肝障害と酷似していることから、 CCl_4 は、肝障害惹起化合物として現在広く用いられている [11-14]。 CCl_4 を用いた研究は、1960 年代から開始された。また、今なお精力的に行われており、 CCl_4 による肝障害が天然物など様々な成分によって、軽減できることが明らかにされている。しかしなが

ら、肝障害の指標としては、酵素レベルの変動が用いられており、障害の軽減は酵素レベルの改善がほとんどを占める [3, 14-16]。対照的に、致死を抑制する個体レベルの毒性発現の研究は、ほとんど見られない。

その理由は、致死を究極の毒性の病態モデルとして捉え、毒性発現と予防の研究をするという発想がなかったからであろう。当然、致死を抑制する化合物は、報告されていない。致死の抑制・防御には、1) 致死の鍵となる「致命臓器」の定義づけ、2) 致命臓器の特定、3) 関与する因子の明確化、が必要不可欠である。そこで本研究では、まず CCl_4 の致死を抑制・防御する物質の探索を行った。次に CCl_4 の致命臓器を検討した。さらに、肝障害を引き起こす因子の特定を試みた。

第1章

四塩化炭素投与に対する致死消失作用を有する化合物の探索

第1節 目的

CCl_4 は種々の動物で肝臓に激しい重篤な障害を起こし、その病態がヒトの障害と非常に類似しているため、急性肝障害・肝硬変・肝再生のメカニズムの研究等に広く用いられている [11-16]。そのメカニズムとして、シトクロム P450 (CYP2E1) によって代謝された後、トリクロロメチルラジカル ($\cdot\text{CCl}_3$)、過酸化トリクロロメチルラジカル ($\cdot\text{OOCCL}_3$)、ホスゲン (COCl_2) 等の反応性の高い中間代謝物が生じる。これらのラジカルが、グルタチオンと結合し、脂質過酸化を引き起こす。その結果、毒性発現が惹起されると推定されている (Fig.1)。 CCl_4 を肝障害惹起化合物として用いた研究は、1960 年代から開始され、数多くの報告がある [12, 17-26]。しかしながら、それらのほとんどは低濃度の CCl_4 投与に限定され、肝機能マーカーであるアラニントランスアミナーゼ (ALT) やアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) および肝臓の組織学的検討に焦点が当てられている [3, 14-16]。その一方で、致死作用を示す高濃度の CCl_4 を投与し、致死を抑制する個体レベルの毒性発現の研究は、ほとんど見られない。そこで、第一章では致死を引き起こす高濃度の CCl_4 に対する影響を検討し、 CCl_4 致死毒性に対して、致死を抑制させる化合物の探索を行った。

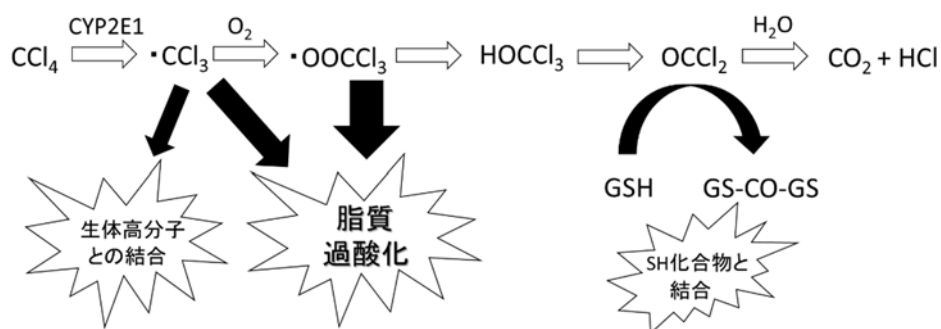


Figure 1. Mechanism of carbon tetrachloride-induced toxicity.

第2節 実験材料および実験方法

1. 試薬

全ての試薬は、市販の特級試薬および研究用試薬を使用した。商品名・販売業者および特に必要なものに関しては別途記載した。

2. 動物

7週齢の ddY 系雄性マウスを日本 SLC から購入し、1週間飼育環境に馴化させてから検討を行った。明暗周期 12 時間 (8 時～20 時：明、20 時～8 時：暗)、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の環境で飼育し、固形飼料 MF (オリエンタル酵母) 及び水は自由摂取させた。本研究は神戸学院大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

3. CCl_4 単独毒性試験

8週齢の ddY 系雄性マウスに対して、1-16 g/kg の用量の CCl_4 (和光純薬) を腹腔内、経口または皮下に投与し、24 時間後における死亡率を算出した。希釈は 4 g/kg の用量からオリーブ油 (和光純薬) にて希釈し、16 g/kg の用量では体重 10 g あたり 0.1 mL (10 mL/kg body weight)、8 g/kg 以下の用量では体重 10 g あたり 0.05 mL (5 mL/kg body weight) の液量をそれぞれ投与した。また、投与は毒性の日内変動を考慮し、14 時に投与時刻を合わせて検討した。

4. 亜鉛及びカドミウム前投与による CCl_4 毒性試験

CCl_4 を投与する 24 時間前に硫酸亜鉛・7 水和物 (ナカライテスク) を 50 mg Zn/kg (10 mL/kg body weight)、または塩化カドミウム・2.5 水和物 (和光純薬) を 3 mg Cd/kg (10 mL/kg body weight) の用量で皮下投与した。0 時間に CCl_4 を 4 g/kg の用量で腹腔内投与し、3 時間ごとに生存の有無を確認し、24 時間まで観察を行った。また、 CCl_4 を投与する 72、48 及び 24 時間前に硫酸亜鉛・7 水和物を 50 mg Zn/kg の用量で皮下投与する検討も同様の方法で実施した。

5. Total RNA の抽出

肝臓を摘出し、氷上で冷やした生理食塩水で洗浄操作を行った後、組織 80 mg を 2 mL チューブにとり、ISOGEN II (ニッポンジーン) 0.8 mL を加えた後、破砕機でホモジネート処

理を行い、DEPC (和光純薬) 処理水 0.32 mL を加え手で 30 秒攪拌した後、室温で 15 分間静置し、15 分間遠心した (19,300×g, 4°C)。遠心後、上層(水層)を別の 1.5 mL チューブにとり、等量のイソプロパノール (和光純薬) を加え、転倒混和した後、室温で 10 分間静置し、10 分間遠心した (19,300×g, 4°C)。上清を取り除き、75% エタノール 0.5 mL を加えた後、5 分間遠心した (19,300×g, 4°C)。この作業を 2 回繰り返した後、上清をデカンテーションで取り除き、5~10 分間風乾後、DEPC 処理水 0.3 mL を加え、数回ピペッティングして沈殿を溶解し、-80°C に保存した。

6. Single strand cDNA の合成

マウス肝臓組織から抽出した total RNA 1 µg 相当を 10 µM mixed oligo dT primer (TP: 5'-GCGAGTCGACCGTTTTTTTTTTTTTTVN-3' (V=A or C or G, N=A or C or G or T) を 2 µL、10 mM dNTP mix (Invitrogen) 1.0 µL、加え、全量が 14 µL になるように DEPC 処理水を加えた。RNA の高次構造を壊すために 65°C で 5 分間加熱した後、1 分間氷上で急冷した。Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen) に添付されている 5×First-Strand Buffer 4 µL、0.1 M DTT 1 µL、Super Script III RT 1 µL を加えた。25°C で 5 分間、50°C で 60 分間、70°C で 15 分間反応させ、氷上で冷却後、TE 60 µL を加え、作成した cDNA を -20°C に保存した。

7. リアルタイム RT-PCR

cDNA 1 µL に標的遺伝子に特異的な 10 pmol/ µL forward primer (FP) 0.8 µL および 10 pmol/µL reverse primer (RP) 0.8 µL、SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ) 10 µL、滅菌蒸留水 7.4 µL を加え、これを Applied Biosystems 7300 (APPLIED Biosystems) を用いて PCR 反応を行い、データを解析した。解析は比較 Ct 法を用いた。また、リアルタイム RT-PCR の条件及びプライマー配列は Table 1.に示す。なお、内部標準として *GAPDH* を使い、各測定値を補正した。

8. Cd-hem 法

肝臓を摘出し、氷上で冷やした生理食塩水で洗浄操作を行った後、組織 0.1 g を 2 mL チューブにとり、0.25 M スクロース (ナカライテスク) 0.5 mL を加えた後、破砕機でホモジネー

ト処理を行い、15 分間遠心した ($19,300\times g$, 4°C)。得られた上清を用いて Cd による置換反応を行った。上清 0.1 mL、Cd ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$) 0.5 mL、Tris-HCl (0.03 M, pH 8.0) 0.6 mL を 1.5 mL チューブに取り、転倒混和した後、5 分間室温で静置した。次に、ラットの赤血球成分を用いたヘモリゼート液 0.1 mL を加えて、転倒混和した後、室温で 3 分間静置した。そして、 100°C でチューブの色が茶色になるまで反応させ (1~2 分間)、5 分間遠心した ($8,000\times g$, 4°C)。遠心後、上清を新しい 1.5 mL チューブに取り、ヘモリゼート液 0.1 mL を加えて同様の作業をおこなった。さらに、上清を新しい 1.5 mL チューブに取り、ヘモリゼートを加え、同様の手順で遠心分離まで実施した (3 回目の遠心分離は $12,000\times g$, 4°C の条件で 5 分間遠心した)。次に上清を試験管に加えた後、Tris-HCl (0.03 M, pH 8.0) 2.6 mL を加え、総量が 4 mL になった後に原子吸光 Z-2300 にて Cd 量を測定することで相対的にメタロチオネイン量を測定した。なお、検量線は 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 ppm の 6 点を使用し、一次式にて Cd 量を算出した。

また、ヘモリゼート液はラットの血液 10 mL に対して、50 単位のヘパリン生理食塩水を加え、 $1,500\times g$, 20°C の条件で 10 分間遠心し、得られた沈殿を 15 mL の 50 単位のヘパリン生理食塩水で洗浄し、5 分間遠心 ($1,500\times g$, 20°C) した後、沈殿に 10 mL の蒸留水を加えて、赤血球を破壊した。その後、5 分間遠心 ($1,500\times g$, 20°C) した後の上清を Tris-HCl (0.03 M, pH 8.0) で 10 倍希釈したものをヘモリゼート液とした。

9. 統計

検定は SPSS 19.0 (SPSS Inc.) を用いて、致死率の有意差検定は χ^2 乗検定、2 群間の比較は t 検定、3 群以上の複数の比較検定は Tukey-Kramer method による一元配置分散分析によって実施した。

Table 1. Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for real-time RT-PCR

Gene (Accession No.)	Primer sequences		PCR Product length (bp)
		Sequence (5' to 3')	
MT-I (NM_013602)	Forward	TTC ACC AGA TCT CGG AAT GG	99
	Reverse	GAG GTG CAC TTG CAG TTC TTG	
MT-II (NM_008630)	Forward	CCT GCA AAT GCA AAC AAT GC	118
	Reverse	CAC TTG TCG GAA GCC TCT TTG	
GAPDH (NM_008084)	Forward	TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC	98
	Reverse	GTC GTT GAT GGC AAC AAT CTC C	

第3節 実験結果

第1項 四塩化炭素投与致死毒性による投与量と投与経路の影響

本項では、致死を引き起こす CCl₄ の投与量及び、投与経路の探索を実施した。8 週齢の ddY 系雄性マウスに、CCl₄ (和光純薬) を 1-16 g/kg の用量で腹腔内、経口または皮下に投与した。その 24 時間後の死亡率を算出した。

その結果、腹腔内投与では、CCl₄ を 4 g/kg の用量で 80 %、8 g/kg 以上では全てのマウスが死亡した。また、経口投与では 16 g/kg の濃度でのみ 40 % の致死が認められ、皮下投与においては検討した用量において、致死は確認されなかった (Table 2.)。以上の結果から、CCl₄ 投与 24 時間において、4 g/kg の用量で腹腔内投与が致死作用を示す最適条件として、以後の検討を行った。

Table 2. Mortality of three different administration routes on acute CCl₄ toxicity

CCl ₄ dose (g/kg)	i.p.	p.o.	s.c.
1	0/5	0/5	0/5
2	0/5	0/5	0/5
4	4/5	0/5	0/5
8	5/5	0/5	0/5
16	5/5	2/5	0/5

Mortality was tracked for 24 hr following exposure at a given dose level.

第2項 亜鉛及びカドミウム前投与が四塩化炭素致死毒性に与える効果

第1項の検討により、 CCl_4 の致死を起こす最適条件 (4 g/kg, 腹腔内投与, 24 時間後) を定めた。そこで、次に致死を抑制させる化合物として、亜鉛 (Zn) とカドミウム (Cd) を用いた。

CCl_4 単独投与では、致死は投与 6 時間後から認められ、24 時間後には 6 匹 (7 匹中、85.7 %) のマウスの死亡が確認された。この結果は第1項の結果と一致した。一方、Zn を 1 回前投与した際には、 CCl_4 投与 9 時間後から致死が確認され始め、24 時間後では 2 匹 (7 匹中、28.5 %) の死亡と減少傾向を見出した (Fig. 2)。Cd の前投与でも、 CCl_4 投与 9 時間後から致死が確認され始め、24 時間後では 2 匹 (8 匹中、25 %) の死亡が確認され、Zn とほぼ同様の結果を示した (Fig. 3)。さらに、Zn について前投与を 1 日から 3 日間連続前投与を実施して同様の毒性試験を実施したところ、 CCl_4 投与 24 時間までにおいて、致死が完全に抑制した (Fig. 3)。

Zn 及び Cd は、共にメタロチオネイン (MT) を誘導することが知られているので、肝臓中の MT 発現レベルを mRNA レベル及びタンパクレベルで検討した。その結果、Zn 及び Cd でそれぞれ MT の遺伝子発現の誘導が認められた。さらに、Zn に関しては投与量依存的な発現誘導亢進が明らかとなった (Fig. 4 and 5)。

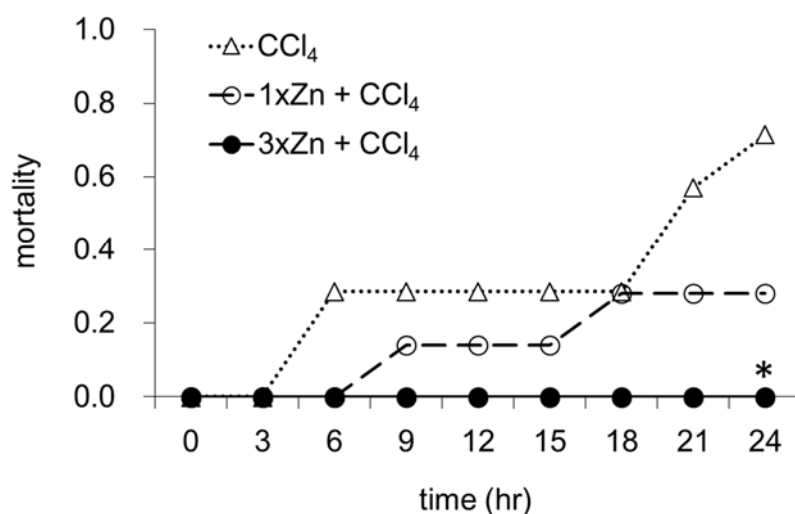


Figure 2. Effect of multiple pretreatment with Zn on acute CCl₄ toxicity.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn three times per 24 hr. After pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. The mice were observed every 3 hr for 24 hr to calculate mortality in each group. Data indicate seven mice. * $P < 0.05$ versus CCl₄ group.

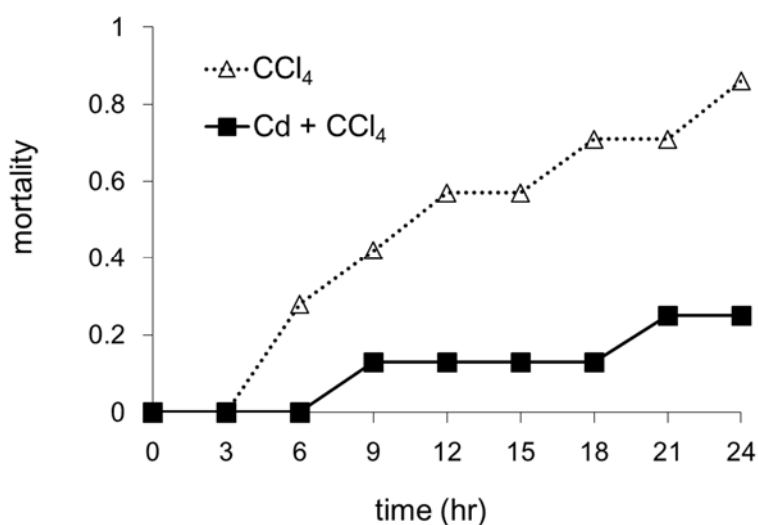


Figure 3. Effect of single pretreatment with Cd on acute CCl₄ toxicity.

Mice were injected s.c. once with 3 mg/kg Cd 24 hr before CCl₄ injection. After pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. The mice were observed every 3 hr until 24 hr to calculate mortality in each group. Data indicate seven or eight mice.

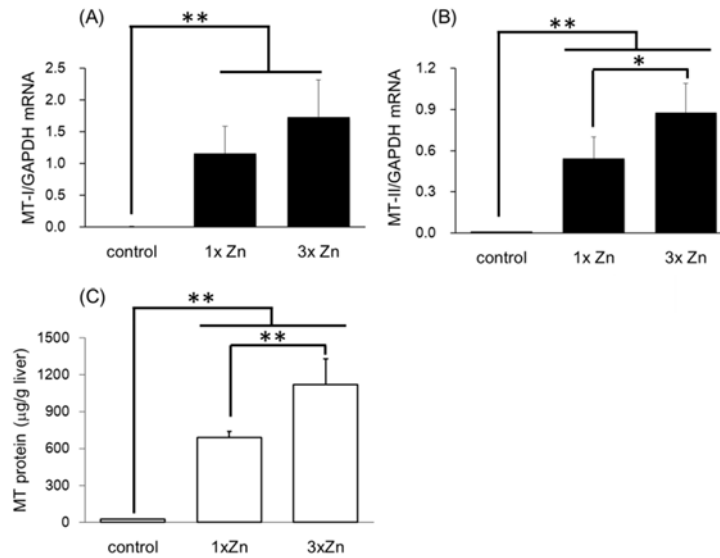


Figure 4. Effect of multiple pretreatment with Zn on MT levels in mouse liver.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn every 24 hr for three times. (A) and (B) : Total RNA was isolated from mouse livers. Quantitative RT-PCR analysis was then performed. The amount of quantified target mRNA was normalized by *GAPDH*. (A) and (B) indicate *MT-I* and *MT-II*, respectively. (C) : The liver samples were collected followed by determining the MT protein levels. Data are expressed as mean \pm S.D. of three or four mice. *, **, significantly different from compared values (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

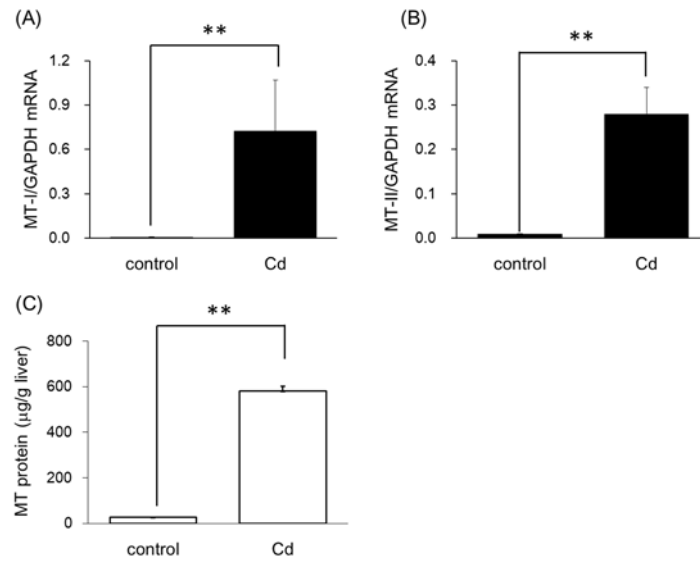


Figure 5. Effect of single pretreatment with Cd on MT levels in mouse liver.

Mice were injected s.c. with 3 mg/kg Cd. (A) and (B) : 24 hr later, total RNA was isolated from mouse livers. Quantitative RT-PCR analysis was then performed. The amount of quantified target mRNA was normalized by *GAPDH*. (A) and (B) indicate *MT-I* and *MT-II*, respectively. (C) : The liver samples were collected followed by determining the MT protein levels. Data are expressed as mean \pm S.D. of three mice. $**P < 0.01$ versus control group.

第4節 考察

CCl₄を肝障害惹起化合物として用いた研究は、今なお精力的に行われている。それらの多くは低濃度の CCl₄ 投与で軽度な肝障害を惹起し、候補化合物の防御機構を解明する報告となっている [3, 14-16]。その一方で、致死を抑制する個体レベルの毒性発現の研究は、ほとんど見られない。この原因は、致死を究極の毒性の病態モデルとして考え、毒性発現の研究を遂行するという発想がないことによる。また、軽度な障害に対する治療効果は認められるものの、致死を引き起こすほどの用量に効果のある化合物をこれまでに明らかに出来ていないこと等が推察される。しかし、医薬品の服用での薬物性肝障害による死亡例も報告されているから、致死を引き起こす高濃度の毒物に対する治療効果を研究することも非常に重要な研究領域であると考えられる。また、致死を引き起こすことが報告されている医薬品は複数あることから、すべての医薬品で研究を実施することは困難を極める。そこで、薬物性肝障害の擬似モデルとして、CCl₄を用いることで、薬物性肝障害に対する治療効果を目指して、高濃度の CCl₄による致死毒性の研究を開始した。

最初に、CCl₄に対して、致死を生じる投与量及び投与経路の探索を行った。マウスにおける腹腔内投与、経口投与及び皮下投与の LD₅₀はそれぞれ 0.9~4.7 g/kg、12.1~14.4 g/kg、30.4 g/kg と報告がある [27-29]。今回の 4 g/kg の用量での腹腔内投与はこれらの報告と一致するものであり、経口と皮下投与に関しても既報と一致していた (Table 2.)。次に、4 g/kg の用量の CCl₄ 腹腔内投与による致死毒性に対して、Zn と Cd の2種類の化合物を用いて、致死に対する予防効果を検討した。単回前投与では完全な致死消失作用は認められなかったが、Zn を3回前投与することで致死を完全に消失させることを明らかにし (Fig. 2)、さらに MT が関与していることを明白にした (Fig. 4)。

MT は 1957 年にウマの腎臓から見出された低分子の重金属結合タンパク質であり、その構成アミノ酸の 3 割がシステインという特徴的な構造を有する [30-32]。これらの作用は金属の代謝調節、抗酸化作用や抗がん作用など非常に多岐にわたる [33-36]。

また、低濃度の Cd を前投与することで、致死を引き起こす用量の Cd に対して、耐性を示す。それは MT の誘導に起因することが報告されている [37-39]。また、MT を欠損させた MT KO マウスでは、Cd の LD₅₀ の値が野生型マウスと比較し、6.9 倍低くなることも報告されている [40]。このことから金属毒性に対して、MT は重要な役割を担っているといえる。さらに、金属毒性だけでなく、肝障害を引き起こすことが知られているアセトアミノフェンや除草剤として知られているパラコートに対しても同様に MT KO マウスでは感受性が増加することから様々な化合物に対して、MT は防御的な役割を果たしている [41, 42]。そして、Cd だけでなく、Zn も MT を大量に誘導することが知られており、様々な毒物に対する検討が行われてきた [31, 43, 44]。CCl₄ に対する Zn の影響もこれまでに実施されており、Zn によって CCl₄ 毒性が軽減することも既に明らかとなっている。

しかし、MT KO マウスを用いても Zn 投与で毒性が軽減する報告も存在し[45, 46]、MT が CCl₄ の本質的な防御因子となり得るかは議論の余地が残っている。本章では Zn の前投与が 1 回では致死が抑制傾向はあるものの、完全な致死抑制は認められず、3 回の前投与によって、完全な致死の消失が認められた。その際に MT の遺伝子発現量は mRNA 及びタンパクレベル共に投与量依存的であったことから、致死率と関連性が認められた。このことから MT が CCl₄ の致死毒性に対して、有効な防御因子であることが示唆される。MT KO マウスを用いた検討で、MT が存在しない条件での試験であることから代償機構が働くことが推察される。また、これらの報告での投与量は LD₅₀ などと比較すると非常に低容量であった [45, 46]。このことから、MT 以外の因子の関与は野生型マウスでは少ないものの、障害の度合いが小さいために一定の効果が得られたのではないだろうか。しかしながら、本章では CCl₄ 投与前の MT の発現レベルを示したが、CCl₄ と MT との結合などの直接的な作用機序の解明は、今後の課題である。

第 2 章

肝臓および腎臓での四塩化炭素毒性に対する亜鉛前投与の防御効果

第 1 節 目的

CCl_4 による毒性に対して、 Zn を 3 回前投与すれば致死が完全に消失することを見出した (第 1 章)。しかし、個体レベルでの生死を判定した検討であり、臓器ごとの影響は不明である。また、 Zn や Cd は、 MT を誘導することが知られている一方で、他の抗酸化物質などの調節などにも寄与していることも推察される。

そこで、 CCl_4 致死毒性に対する Zn の軽減作用とその作用機構の解明を目的に、肝臓と腎臓の MT の関与を検討した。

第2節 実験材料および実験方法

1. 試薬

全ての試薬は、市販の特級試薬および研究用試薬を使用した。商品名・販売業者および特に必要あるものに関しては別途記載した。

2. 動物

7週齢の ddY 系雄性マウスを日本 SLC から購入し、1週間飼育環境に馴化させてから検討を行った。明暗周期 12 時間 (8 時～20 時：明、20 時～8 時：暗)、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の環境で飼育し、固形飼料 MF (オリエンタル酵母) または CE-2 (日本クレア) 及び水は自由摂取させた。本研究は神戸学院大学動物実験委員会および金城学院大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

3. Zn 前投与による CCl_4 毒性試験

CCl_4 を投与する 72、48 及び 24 時間前に硫酸亜鉛・7 水和物を 50 mg Zn/kg (10 mL/kg body weight) の用量で皮下投与した。0 時間に CCl_4 を 4 g/kg の用量で腹腔内投与し、6 時間後に肝臓、腎臓および血液を麻酔下で摘出および採取した。肝臓および腎臓はミンチ状にしたあとに、約 0.1 g を 2 mL チューブに加え、液体窒素に入れた後で -80°C に保存した。また、肝臓の左葉および左腎の組織を 2-3 mm ずつに切り分けてティッシュ・テックのカセットの中に入れた後、15 % 中性ホルマリン緩衝液 (pH 7.2: 和光純薬) を加え、脱気処理を真空ポンプ (アズワン) にて行ったものを保存した。血液は 10 分間遠心 ($3,000\times g$, 4°C) した後、上清 (血漿) を取り、 -80°C で保存した。

4. 生化学的パラメーター解析

ALT および AST はトランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) のプロトコールに従って行なった。96 well plate (NUNC) に血漿 1.5 μL を加えた後、ALT または AST 用基質酵素液を 37.5 μL 加え、 37°C で 5 分間インキュベートした後、発色試液 37.5 μL を加え、 37°C で 15 分間反応させた。その後、反応停止液を 150 μL 加え、直ちに 555 nm の吸光度を測定した。

総コレステロール値はラボアッセイコレステロール (和光純薬) のプロトコールに従

って行なった。96 well plate に血漿 2 μL を加えた後、発色試薬を 200 μL 加え、37°C で 5 分間インキュベートした後、主波長 600 nm、副波長 700 nm の条件で吸光度を測定し、数値を計算した。

クレアチニンは Creatinine Liquid Reagents Assay (DIAZYME) のプロトコールに従って検討した。96 well plate に血漿 4 μL を加えた後、Reagent 1 を 135 μL 加え、37°C で 5 分間インキュベートした後、550 nm の吸光度を測定した (A_1 値)。次に、Reagent 2 を 45 μL 加え、マイクロプレートリーダー (Bio-RAD) で混和、さらに室温で 5 分間インキュベートした後、再度 550 nm の吸光度を測定した (A_2 値)。 A_2 値から A_1 値の吸光度を引いた値から、血漿クレアチニン値を算出した。

尿素窒素 (BUN) は尿素窒素 B-テストワコー (和光純薬) のプロトコールに従って行なった。96 well plate に血漿 2 μL を加えた後、緩衝液とウレアーゼ溶液を 20 : 1 の比率で混和した発色試液 A を 100 μL 加え、37°C で 15 分間インキュベートした。次に、発色試液 B を 100 μL 加え、37°C で 10 分間インキュベートした後、直ちに 570 nm の吸光度を測定した。これらの数値の算出は各パラメーターで検量線を作成し、その数値に対する相対的な吸光度より計算した。

5. 脂質過酸化の測定

2 mL チューブにマウス肝臓組織または腎臓組織 0.1 g を入れ、プロテアーゼインヒビター (ナカライテスク) を含む ice-cold PBS 0.9 mL を加え、破砕機でホモジネート処理を行い、15 分間遠心した (19,300 \times g, 4°C)。上清 25 μL 、1 %リン酸 (和光純薬) 150 μL および 0.6 % 2-チオバルビツール酸 (TBA, 和光純薬) 50 μL を 1.5 mL チューブに加え、混和した後 80°C で 45 分間反応させた後、反応液 200 μL を 96 well plate に移し、532 nm の吸光度を測定することで脂質過酸化量を測定した。なお、組織ホモジネート上清のタンパク濃度は 10 mg/mL に合わせてから検討を実施した。また、0.6% TBA は使用直前に粉末の TBA 0.06 g を滅菌蒸留水 6 mL に溶かした後、50 °C で完全に溶解するまで反応させた後、4 mL の酢酸 (ナカライテスク) を加えたものを使用した。

6. 総抗酸化力の測定

総抗酸化力は Total Antioxidant Power (TA02 : Oxford Biomedical Research) のプロトコールに従って行なった。2 mL チューブにマウス肝臓組織または腎臓組織 0.1 g を入れ、プロテアーゼインヒビターを含む ice-cold PBS 0.9 mL を加え、破砕機でホモジネート処理を行い、15 分間遠心した (19,300×g, 4°C)。上清 3 μL を 96 well plate に加えた後に Dilution Buffer を 117 μL 加えた。その後、450 nm の波長で吸光度を測定した (T₁ 値)。次に、Copper Solution を 30 μL 加え、マイクロプレートリーダーで混和処理後、室温で 3 分間インキュベートした後、Stop Solution を 30 μL 加え再度 450 nm の吸光度を測定した (T₂ 値)。T₂ 値から T₁ 値の吸光度を引いた値から、総抗酸化力値を算出した。なお、組織ホモジネート上清のタンパク濃度は 10 mg/mL に合わせてから検討を実施した。

7. 包埋

パラフィンブロックの作成は自動包埋機 (サクラ バキュームロータリー : サクラファインテックジャパン株式会社) で行った。15 % 中性ホルマリン緩衝液で保存したサンプルを一晩水洗後、以下の反応条件で包埋を行った。①80 % エタノール : 8 時間, ②90 % エタノール : 4 時間, ③95 % エタノール : 4 時間, ④100 % エタノール : 4 時間, ⑤無水エタノール : 5 時間, ⑥無水エタノール : 5 時間, ⑦キシレン : 2 時間, ⑧キシレン : 3 時間, ⑨キシレン : 4 時間, ⑩パラフィン : 3 時間, ⑪パラフィン : 3 時間, ⑫パラフィン : 3 時間, の計 12 工程 48 時間の反応終了後、ティッシュ・テック TEC プラス ディスペンシング・コンソール (サクラファインテックジャパン株式会社) を用いて、パラフィンを冷却し固めることでパラフィンブロックを作成した。次にライディングミクロトーム (大和光機工業株式会社) で 4 μm の薄切りの切片を作成し、38~40 °C の温浴上で切片を伸展させたあと、スライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に載せ、43 °C に設定したホットプレート上 (アズワン) で乾燥させた。

8. Hematoxylin and eosin 染色および periodic acid-Schiff 染色

スライドガラスに載せた切片を染色する前日からキシレンに浸漬後、脱パラフィンの処理を行った。まず、パラフィンを融解させるためにキシレンが入ったバットで 3 分間ずつ反応させる作業を 5 回実施した。その後、無水エタノール、無水エタノール、

100 %エタノール、95 %エタノール、80 %エタノールの順に3分間ずつ各バットに標本を反応させた。

その後、hematoxylin and eosin (H&E) 染色では、マイヤーのヘマトキシリンで12分間染色後に、1時間水道水で水洗した。その後、蒸留水で洗った後、酢酸の入った0.1 %エオジンで3分間染色を行なった。次に①水洗：10秒間、②70 %エタノール：10秒間、③80 % エタノール：10秒間、④95 %エタノール：10秒間、⑤100 %エタノール：3分間、⑥無水エタノール：3分間、⑦無水エタノール：3分間、の7工程を実施後、さらにキシレンで3分間ずつ反応させる作業を5回行った後、封入し、顕微鏡で観察した。

Periodic acid-Schiff (PAS) 染色では、脱パラフィン後に水道水で水洗を2分間、蒸留水で1分間水洗した後に、0.5 % 過ヨウ素酸水溶液 (Sigma-Aldrich：0.75 g の過ヨウ素酸粉末を150 mL の蒸留水に溶解させ作成) で30分間反応させた。その後、水道水で水洗を10分間、蒸留水で1分間洗った後に、シッフ試薬 (和光純薬) をスライドガラス上にパスツールピペットで滴下し、60分間遮光した。次に、亜硫酸水 (Sigma-Aldrich：ピロ硫酸ナトリウム2.7 g、1 M 塩酸 22.5 mL と蒸留水 477.5 mL を加えて作成) で2分間反応させる作業を3回実施した後に水道水で水洗を10分間した後に、蒸留水で1分間洗浄した。その後、マイヤーのヘマトキシリンで1分間核を染色した後、水道水で水洗を10分間、蒸留水で1分間洗浄した。さらに、①70 %エタノール：10秒間、②80 % エタノール：10秒間、③95 %エタノール：10秒間、④100 %エタノール：3分間、⑤無水エタノール：3分間、⑥無水エタノール：3分間、の6工程を実施後、さらにキシレンで3分間ずつ反応させる作業を5回行った後、封入し、顕微鏡で観察した。

9. Cd-hem 法

第1章に記載した方法に準じて定量した (page 8)。なお、腎臓組織採取は髄質と皮質を均一に入れるため、よく混ぜてから0.1 g 採取した。また、第1章とは異なり、上清を0.25 mL 加えて、検討した。

10. 統計

検定は SPSS 19.0 (SPSS Inc.) を用いて Tukey-Kramer method による一元配置分散分析を実施した。

第3節 実験結果

第1項 亜鉛前投与が肝臓における四塩化炭素毒性軽減に及ぼす効果

本項では、まず、Znによる前投与の効果を肝臓で検討した。CCl₄投与6時間後における血漿中のALTおよびASTを測定したところ、CCl₄によって有意な上昇が認められたが、Znの前投与で両パラメーターの減少が確認された (Fig. 6A, B)。また、総コレステロール値も同様に検討した結果、CCl₄によって減少した数値の改善がZn前投与で認められた (Fig. 6C)。

次に、生化学的検討と並行して組織学的検討を実施した。まず、H&E染色による組織学的形態変化を検討した。controlと比較し、CCl₄投与マウスでは、クロマチンの凝縮・核消失及び好酸球などが確認された。その一方で、Znを前投与したCCl₄投与群では、完全ではないもののCCl₄単独投与群と比較して、組織学的にも傷害度が減弱している結果が得られた (Fig. 7)。さらに、グリコーゲンを染色するPAS染色を実施したところ、controlでは肝臓組織全体にグリコーゲンが蓄積しているが、CCl₄投与マウスではグリコーゲンがほとんど枯渇していた。それに対して、Znを前投与すると、グリコーゲンの減少は認められるものの、一定量のグリコーゲンの保持が確認された (Fig. 8)。なお、H&E染色およびPAS染色において、Znの前投与のみではcontrol群と比較し、明らかな変化は認められなかった。

次に、より詳細に肝臓におけるCCl₄毒性に対するZnの効果を検証するために、酸化ストレスの測定を行った。酸化ストレスの指標として、TBA反応による脂質過酸化量、また抗酸化力を算出した。その結果、CCl₄によって脂質過酸化量の増加及び、抗酸化力の低下が認められるが、Znの前投与でそれらの変化が消失した。またZnの単独前投与では、脂質過酸化量に変化は確認されなかったが、抗酸化力の有意な増加が認められた (Fig. 9)。

また、Znの前投与におけるMTの影響を検討する目的で、Cd-hem法によるMTの測定を行った (Fig. 10)。その結果、Znの前投与でMT量が1113 µg/g liver (controlと

比較し、26 倍上昇) まで上昇したのに対して、CCl₄ を投与することで 711 μ g/g liver (36 % 減少)まで減少していることが明らかとなった。

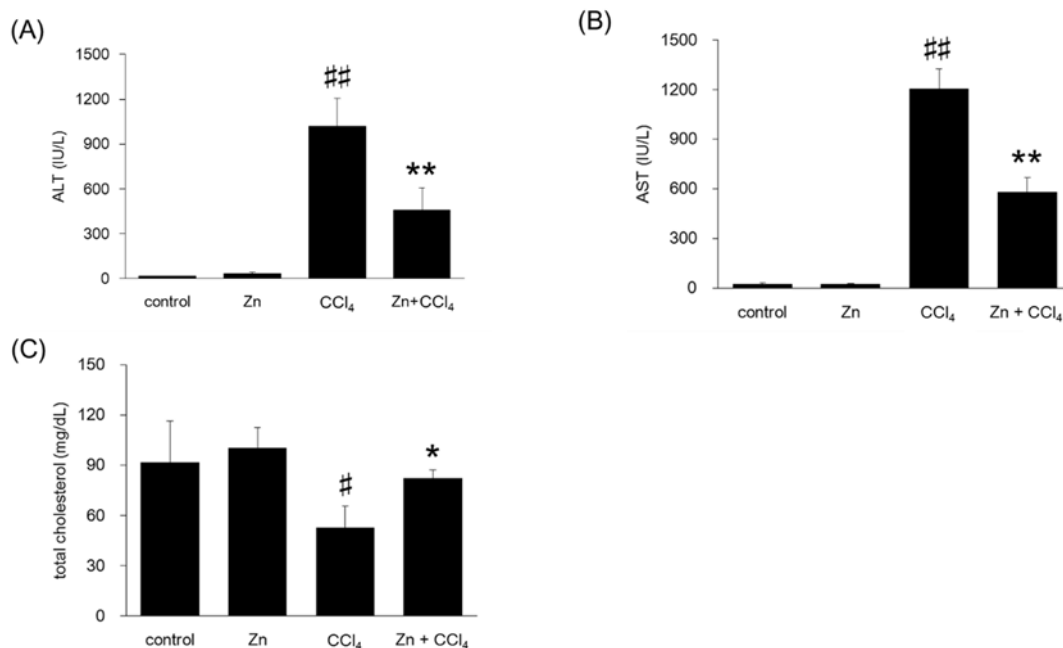


Figure 6. Effect of pretreatment with Zn on ALT, AST, and total cholesterol levels. Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn three times at 24 hr intervals. Twenty-four hours after the final pretreatment, the mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. The ALT (A), AST (B) and total cholesterol activity (C) in plasma were determined 6 hr after the injection. Data are representative of mean \pm S.D. of five or six mice. [#]*P* < 0.05 and ^{##}*P* < 0.01 versus control group, and ^{*}*P* < 0.05 and ^{**}*P* < 0.01 versus CCl₄ group.

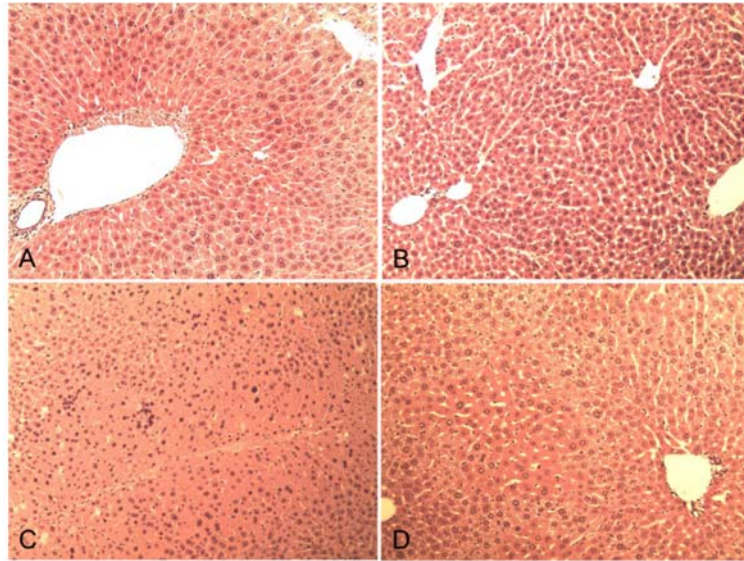


Figure 7. Hepatoprotective effect of pretreatment with Zn on acute CCl₄ toxicity.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn three times per 24 hr. Twenty-four hours after final pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. H&E staining of livers were taken 6 hr after the injection. (A), (B), (C) and (D) indicate control, Zn, CCl₄, and Zn + CCl₄ group.

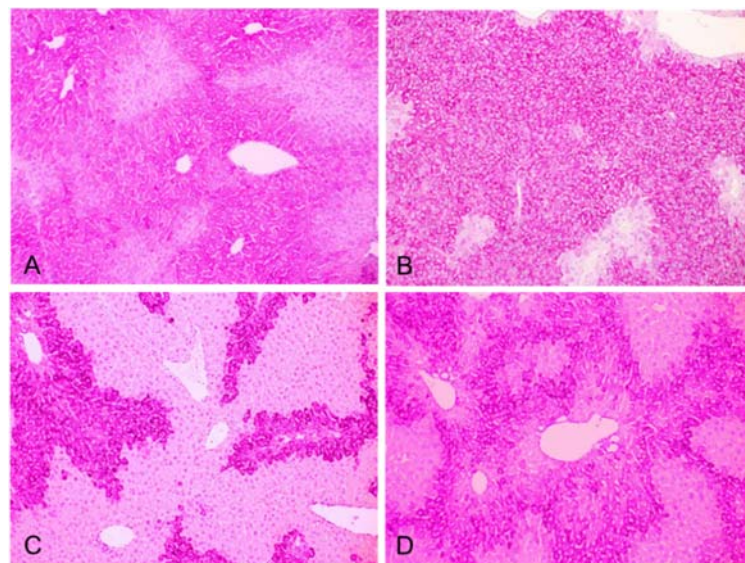


Figure 8. Glycogen storage effect of pretreatment with Zn on acute CCl₄ toxicity.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn three times per 24 hr. Twenty-four hours after final pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. PAS staining of livers were taken 6 hr after the injection. (A), (B), (C) and (D) indicate control, Zn, CCl₄, and Zn + CCl₄ group.

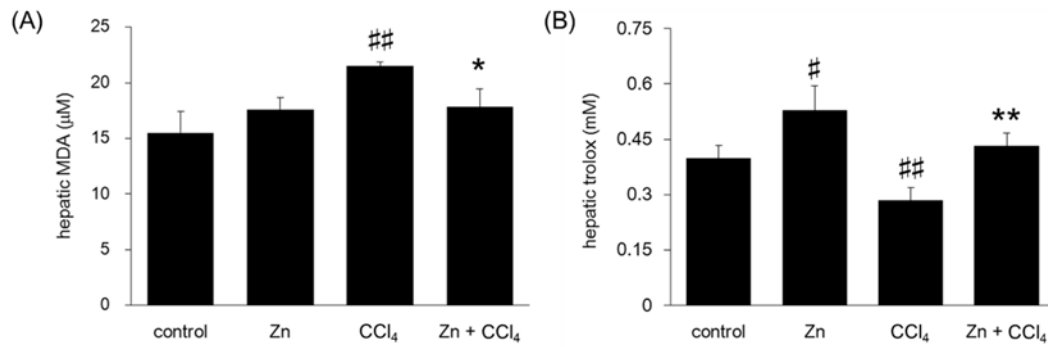


Figure 9. Effect of pretreatment with Zn on MDA levels and antioxidant power in acute CCl₄-induced toxicity.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn three times at 24 hr intervals. Twenty-four hours after the final pretreatment, the mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. MDA levels (A) and the antioxidant power (B) in the liver was determined 6 hr after the injection. Data are representative of mean \pm S.D. of five or six mice. $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ versus control group and $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ versus CCl₄ group.

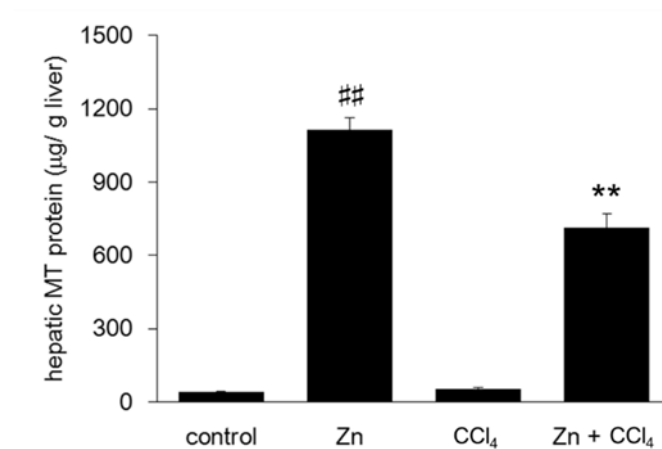


Figure 10. Effect of pretreatment with Zn on hepatic MT protein levels in acute CCl₄-induced toxicity.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn three times at 24-hr intervals. Twenty-four hours after the final pretreatment, the mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. The MT levels in the liver were determined 6 hr after the injection. Data indicate mean \pm S.D. of five or six mice. $^{##}P < 0.01$ versus control group and $^{**}P < 0.01$ versus Zn group.

第2項 亜鉛前投与が腎臓における四塩化炭素毒性軽減に及ぼす効果

第1項の検討では、肝臓における影響を検討したが、本項では腎臓における影響を検討した。

まず、はじめに腎障害の指標となる血液パラメーターの測定を行った。クレアチニンでは、 CCl_4 によって上昇した数値がZnの前投与でcontrolレベルにまで回復が認められた (Fig. 11A)。また、他の障害マーカーであるBUNについても同様に検討したところ、コントロールレベルまでは回復しないものの、 CCl_4 単独投与と比較すると、有意な減少が確認された (Fig. 11B)。

次に、血液パラメーターと並行して、H&E染色による組織学的解析を行った。 CCl_4 投与によって腎臓の近位尿細管付近の核の膨張やタンパク円柱などが認められた。また、Znの前投与でこれらの傷害は認められなくなった (Fig. 12)。

さらに、腎臓による CCl_4 毒性におけるZnの関与をより詳細に検討するために、肝臓と同様に脂質過酸化と抗酸化力の測定を行った (Fig. 13)。その結果、 CCl_4 によって増加した脂質過酸化量がZnの前投与で正常値レベルではないものの、有意な減少を示した。また抗酸化力についても脂質過酸化同様に、 CCl_4 によって減少した抗酸化力がZnの前投与によって上昇が認められた。

次に、Znの前投与におけるMTの影響を検討する目的で、Cd-hem法によるMT量の測定を行った。その結果、Znの前投与でMT量がcontrol群と比較し、23倍上昇した ($367 \mu\text{g/g kidney}$)。それに対して、 CCl_4 を投与することで70%以上減少 ($108 \mu\text{g/g kidney}$) した (Fig. 14)。

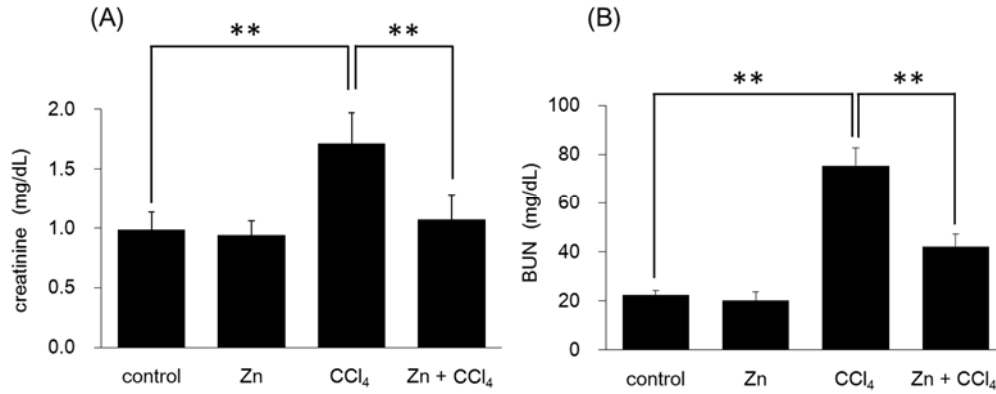


Figure 11. Effect of pretreatment with Zn on acute CCl₄ toxicity as measured by creatinine and BUN levels.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn (three times, q24h). Twenty-four hours after final pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. Creatinine (A) and BUN (B) levels in plasma were determined at 6 hr after i.p. injection. Data are presented as mean \pm S.D. of five or six mice. **, significant difference between compared values (** $P < 0.01$).

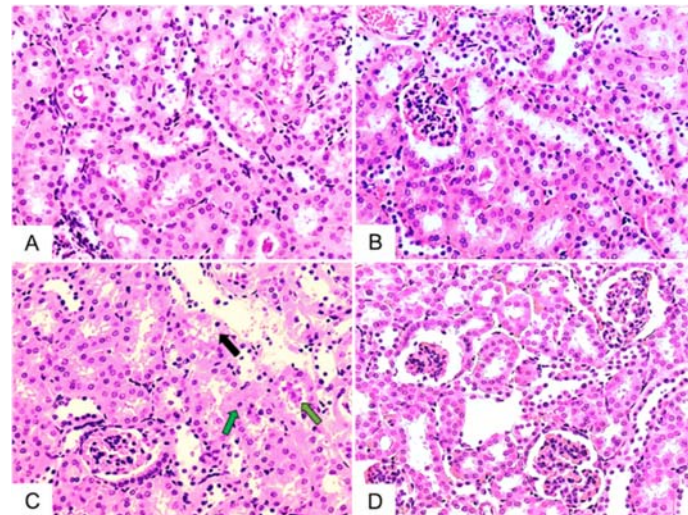


Figure 12. Nephroprotective effect of Zn pretreatment on acute CCl₄ toxicity.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn (three times, q24h). Twenty-four hours after final pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. Kidneys were harvested 6 hr after i.p. injection, fixed, processed, and stained with H&E. (A), (B), (C), and (D) provide 20 x magnification images of representative H&E-stained sections from kidneys obtained from control, Zn, CCl₄, and Zn + CCl₄ animals. Section for (C) reveals swelling, degeneration, and the appearance of protein column (penetration of protein) in renal proximal tubules in a CCl₄-exposed animal, in contrast to the mostly normal renal structure seen in (A), (B), and (D). Green arrows, black arrows and orange arrows indicate swelling, degeneration, and protein column, respectively.

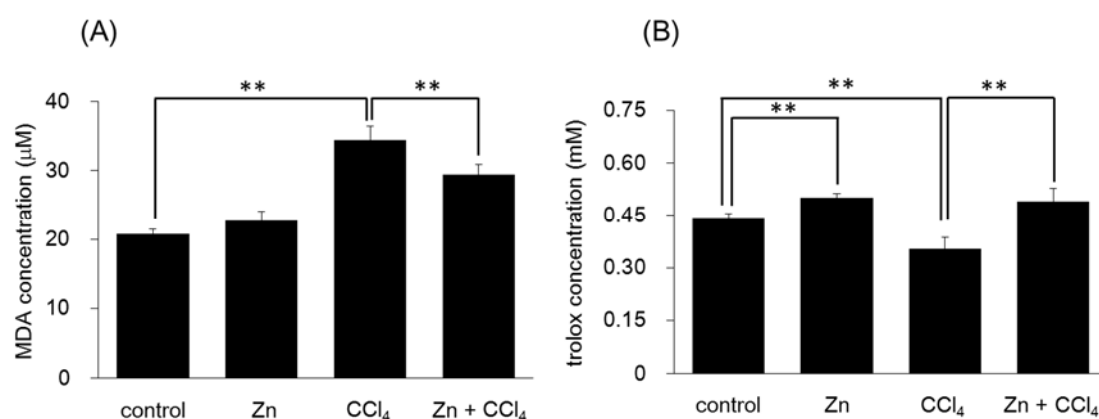


Figure 13. Effect of pretreatment with Zn on acute CCl₄ toxicity, as measured by MDA levels and antioxidant power.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn (three times, q24h). Twenty-four hours after final pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. MDA levels (A) and the antioxidant power (B) in kidney were determined 6 hr after i.p. injection. Data are presented as mean \pm S.D. of five or six mice. **, significant difference between compared values (** $P < 0.01$).

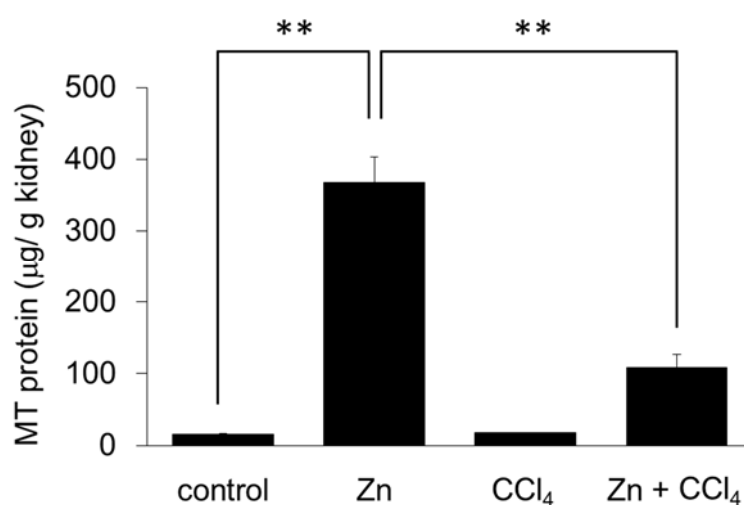


Figure 14. Effect of pretreatment with Zn on acute CCl₄ toxicity, as measured by renal MT protein levels.

Mice were injected s.c. with 50 mg/kg Zn (three times, q24h). Twenty-four hours after final pretreatment, mice were injected i.p. with 4 g/kg CCl₄. MT levels in kidney were determined 6 hr after i.p. injection. Data are presented as mean \pm S.D. of five or six mice. **, significant difference between compared values (** $P < 0.01$).

第4節 考察

CCl₄ は古くから肝臓に影響を与えることが知られていることから肝障害惹起化合物として広く使用されている。その一方で、腎臓にも影響を及ぼすことが報告されている[12, 17-26]。また、放射標識した CCl₄ を単回投与すると肝臓よりも腎臓により多くの CCl₄ が蓄積するという報告も存在する [47]。これらのことから、肝臓だけでなく、腎臓が致命臓器になりうることも考えられる。

本章の検討により、肝臓・腎臓共に CCl₄ によって臓器への障害が認められた。さらに Zn の前投与で両臓器の障害ともに生化学的ならびに組織学的に傷害の軽減作用が認められた。また、肝臓では CCl₄ 投与 6 時間においても重篤な肝臓の状態であるのに対して、腎臓における傷害は近位尿細管に局限しており、遠位尿細管・糸球体や髓質などには傷害は確認されなかった。このことから、よりダメージの大きい肝臓が致命臓器である可能性が高まった。

CYP2E1 が欠損したマウスでは、CCl₄ による毒性感受性が弱まることが報告されている [48]。また、CYP2E1 は肝臓や腎臓に発現していることも明らかとなっており、腎臓においては特に皮質に発現が多く認められている [49, 50]。肝臓と腎皮質の CYP2E1 の発現量を比較すると、肝臓で明らかに発現量が多いことも明らかとなっている [50]。CCl₄ は主に CYP2E1 によって代謝を受けた後、ラジカルが生成され、そのラジカルが毒性を惹起するものと考えられている。そのため、腎臓は肝臓よりも CCl₄ 蓄積量が多いにも関わらず、毒性では逆の結果となった一因として、CYP2E1 発現量の違いが関与することが示唆された。また、CCl₄ における腎傷害が髓質より皮質に起こりやすいことも、この仮説を支持するものといえる。

CCl₄ はアルキル化剤に分類され、CYP2E1 によって代謝されたラジカルが細胞膜に存在する還元型グルタチオン (GSH) や組織と結合し酸化が起こる。その結果、連鎖的脂質過酸化反応を介して障害が発生する。GSH は主要な抗酸化物質として知られており、CCl₄ 投与数時間の間に GSH が減少し、酸化型グルタチオン (GSSG) に変換されることが明らかとなっている [51-54]。また、CCl₄ 投与 3 時間においても組織学

的にも傷害が報告されている [55]。このことから、GSH などの抗酸化物質を前もって増加させておくことが CCl₄ 毒性軽減に重要であり、様々な物質が報告されている。MT は GSH と同様に SH 基をもっており、抗酸化力・ラジカルスカベンジャー能を有することが知られている [33-36]。また、GSH と比較し、MT のラジカルスカベンジャー能は 300 倍以上高いことから [34]、MT を上昇させることが GSH を増加させることよりも防御効果を高められると考えられる。本論文では、Zn を 3 回前投与することで、肝臓・腎臓で共に 20 倍以上 MT を誘導することに成功した。この条件下で CCl₄ を投与すると MT 量は肝臓・腎臓でそれぞれ 43 % と 71 % 減少が認められた。本実験で MT の測定に使用した Cd-hem 法は MT が 7 つの Cd と結合することを利用し、Cd 量から相対的に MT 量を測定する方法である [31, 43]。そのため、ラジカルによって攻撃された MT は酸化型に変化し、その結果 Cd 結合能が消失するため、数値として反映されないと推察される。このことから MT が自身のラジカルスカベンジャー能によって GSH などの他の抗酸化物質の代償物質として機能することで、CCl₄ によって誘導されるラジカルに対して防御的に働くことが示唆された。また、放射標識した CCl₄ と MT が結合することも報告されていることもその仮説を支持するものといえる。

第 1 章と第 2 章の結果から、Zn によって誘導された MT が CCl₄ によって誘導されるラジカル作用を抑制することで、脂質過酸化などの下流のイベントが生じにくくなっていることが推察される。これらは既存の抑制機構と同等であるといえる。しかし、これまでの報告と比較すると、Zn を複数回ならびに高用量を投与することで MT 量の発現誘導レベルを最大限高めている。このことが、致死という究極の毒性への対応策であると考えられる。

第3章

亜鉛前投与がブロモベンゼン毒性発現に及ぼす効果

第1節 目的

ブロモベンゼン (BB) は難燃剤、医薬、農薬、香料の中間体などの用途で利用される有用な化合物である一方で、重篤な肝障害を引き起こすことが報告されている [56-60]。このことから、 CCl_4 と同様に、肝障害惹起化合物として、しばしば研究で用いられている。BB の毒性発現機構は多段階の反応を経る [62-66]。まず、BB が CYP によって代謝を受け、BB-3,4-oxide、2-bromohydroquinone、4-bromocatechol などに変換される [67-69]。次の段階としてラジカルが生成される。これらのフリーラジカルは抗酸化物質に捕捉される (GSH やチオールタンパクと反応する) と考えられる。しかし、これらのフリーラジカルが過剰量になると、GSH などの枯渇が起こる結果、酸化ストレスが惹起され、Ca ホメオスタシスが破綻する。第4段階として、ATP の枯渇や細胞内 Ca の上昇が引き起こされ、最終的に壊死となる。また、 CCl_4 は GSH を直接的には減少させないアルキル化剤として分類されているが、BB は GSH 枯渇化合物として分類されており、作用機構が異なる [61]。このことから、BB は CCl_4 とは異なる毒性発現機構を有した肝障害惹起化合物として考えられている。MT が CCl_4 だけでなく、BB に対しても毒性防御効果があるならば、肝障害を惹起する化合物に対する抑制効果の普遍化に繋がる。

そこで、BB による毒性に対する Zn 前投与の毒性軽減効果を検討した。

第2節 実験材料および実験方法

1. 試薬

全ての試薬は、市販の特級試薬および研究用試薬を使用した。商品名・販売業者および特に必要あるものに関しては別途記載した。

2. 動物

6週齢の ddY 系雄性マウスを日本 SLC から購入し、1週間飼育環境に馴化させてから検討を行った。明暗周期 12 時間 (8 時-20 時 : 明、20 時-8 時 : 暗)、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の環境で飼育し、固形飼料 CE-2 及び水は自由摂取させた。本研究は金城学院大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

3. Zn 前投与による BB 毒性試験

BB (東京化成工業株式会社) を投与する 72、48 及び 24 時間前に硫酸亜鉛・7 水和物を 50 mg Zn/kg (10 mL/kg body weight) の用量で皮下投与した。0 時間に BB を 1.2 g/kg の用量で腹腔内投与し、24 時間ごとに生存の有無を確認し、72 時間まで観察を行った。また、同様の方法で BB を投与 18 時間後に肝臓・腎臓および血液を麻酔下で摘出および採取した。肝臓および腎臓は 0.1 g を 2 mL チューブに加え、液体窒素に入れた後で -80°C に保存した。また、肝臓の左葉および左腎の組織を 2~3 mm ずつに切り分けてティッシュ・テックのカセットの中に入れた後、15% 中性ホルマリン緩衝液 (pH 7.2) を加え、脱気処理を真空ポンプ (アズワン) にて行ったものを保存した。血液は 10 分間遠心 ($1,500 \times g$, 4°C) した後、上清 (血漿) を取り、 -80°C で保存した。また、肝臓および腎臓 0.2~0.3 g を試験管の中に加えた組織を原子吸光による Ca 測定に用いた。なお、BB や Zn の投与は 14 時に実施した。

4. 生化学的パラメーター解析

ALT、AST、クレアチニンおよび BUN は第 2 章の方法と同様に実施した (page 16)。

5. H&E 染色および PAS 染色

H&E 染色および PAS 染色は、第 2 章の方法と同様に実施した (page 19)。

6. 脂質過酸化の測定

マウス肝臓組織の脂質過酸化の測定は第 2 章の方法と同様に実施した (page 17)。

7. 総抗酸化力の測定

マウス肝臓中の総抗酸化力は第 2 章の方法と同様に実施した (page 18)。

8. 原子吸光による Ca 測定

肝臓および腎臓 0.2～0.3 g を均一になるように混ぜた組織を試験管の中へ入れた後、過塩素酸 (Sigma-Aldrich) : 硝酸 (関東化学株式会社) を 1 : 4 で混ぜた溶液 (微量元素測定用グレード) を 0.5 mL 加え、一晩反応させた。翌日に、湿式法によって灰化を実施した。90 °C で 2 時間、110 °C で 2 時間反応させた後、130 °C まで温度を上昇させ、灰化が完全に完了するまで反応させた。なお、混合液が蒸発した際は硝酸を随時加えた。反応終了後、メッシュによってフィルターろ過を実施しながら、滅菌蒸留水でメスフラスコを用いて、5 mL になるようメスアップした。

Ca 濃度は、原子吸光 Z-2300 にて測定した。検量線として、0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 ppm の標準液を用い、二次の回帰式で Ca 量を算出した。

9. Cd-hem 法

第 1 章、第 2 章に記載した方法に準じた (page 5, 20)。

10. 統計

検定は SPSS 19.0 (SPSS Inc.) を用いて、致死率の有意差検定は χ^2 乗検定、その他の複数の比較検定は Tukey-Kramer method による一元配置分散分析によって実施した。

第3節 実験結果

第1項 ブロモベンゼン致死毒性に対する亜鉛前投与の効果

本項では、Zn の前投与によって BB による致死毒性を消失できるか否か検討を行った。

12 匹の 8 週齢の ddY 系雄性マウスに対して、1.2 g/kg の用量の BB を腹腔内投与すると、投与 24 時間で 58.3 % のマウスの死亡が確認された (7 匹死亡)。また、48 時間後で 91.7 % とほとんどのマウスが死亡した (11 匹死亡)。その一方で、Zn を前投与すると、72 時間で 1 匹 (8.3%) のマウスが死亡したが、48 時間までは死亡例は観察されなかった。

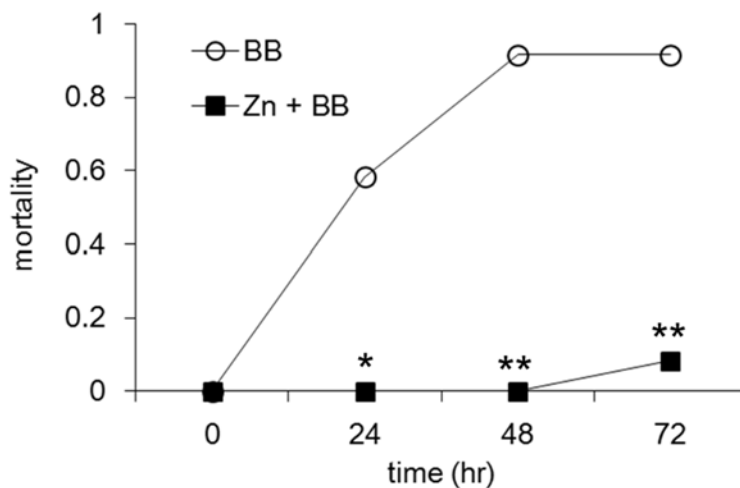


Figure 15. Effect of multiple pretreatment with Zn on acute BB-induced lethal toxicity.

Mice (groups of $n=12$) were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn or saline for a total of three doses at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally with 1.2 g/kg BB. The mice were observed every 24 hr until 72 hr post-BB injection to determine mortality in each group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus BB group.

第2項 亜鉛前投与が肝臓におけるBB毒性軽減に及ぼす効果

BB投与18時間後における肝臓への障害に対するZnの効果を検討した。まず、肝臓障害を検討する目的で、血漿中のALTおよびASTを測定した (Fig. 16)。その結果、ALTの平均値は約4000 IU/L、ASTでは約7000 IU/Lまで上昇が確認された。それに対して、Znを前投与すると、ALTが44 IU/L、ASTが117 IU/Lと正常値に限りなく近い値であった。

次に、生化学的検討と並行して組織学的検討を実施した (Fig. 17)。まず、H&E染色による組織学的形態変化を検討したところ、BB投与マウスでは中心静脈付近に多くの壊死が認められた。その一方で、Znを前投与することで、壊死はほとんど確認されなかった。

肝臓中の酸化ストレスを測定する目的に、脂質過酸化および抗酸化力を測定した (Fig. 18)。その結果、BBによって脂質過酸化の増加ならびに抗酸化力の低下が認められた。また、Znの前投与でそれらの変化が消失した。

さらに、肝臓中のCa量を原子吸光によって測定した。その結果、BB投与によって、肝臓中のCa量が有意に増加するのに対して、Znを前投与すると、有意なCa量の減少が確認された (Fig. 19)。

また、Znの前投与におけるMTの影響を検討する目的で、MT量の測定を行った (Fig. 20)。その結果、Znの前投与でMT量は、対照群の約33倍の1240 µg/g liverまで上昇した。Znにより誘導されたMT量は、BBを投与することで26%減少し、909 µg/g liverであった。

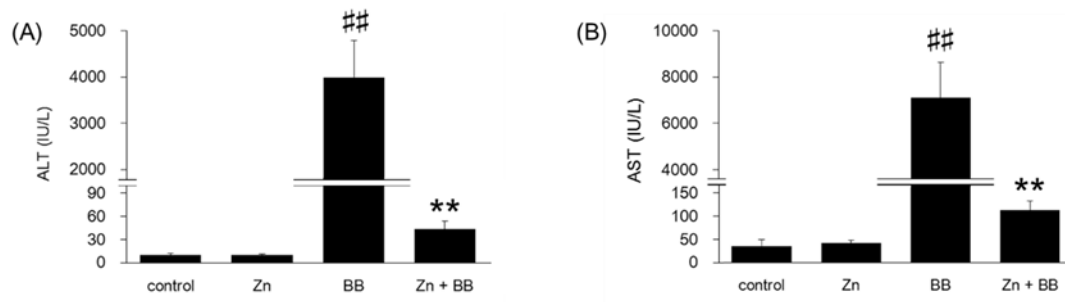


Figure 16. Effect of pretreatment with Zn on hepatic function levels.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Plasma levels of hepatic enzymes were determined 18 hr after the administration of BB. Panels (A), (B) indicate ALT and AST, respectively. Data are plotted as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. ^{##} $P < 0.01$ versus control group, and ^{**} $P < 0.01$ versus BB group.

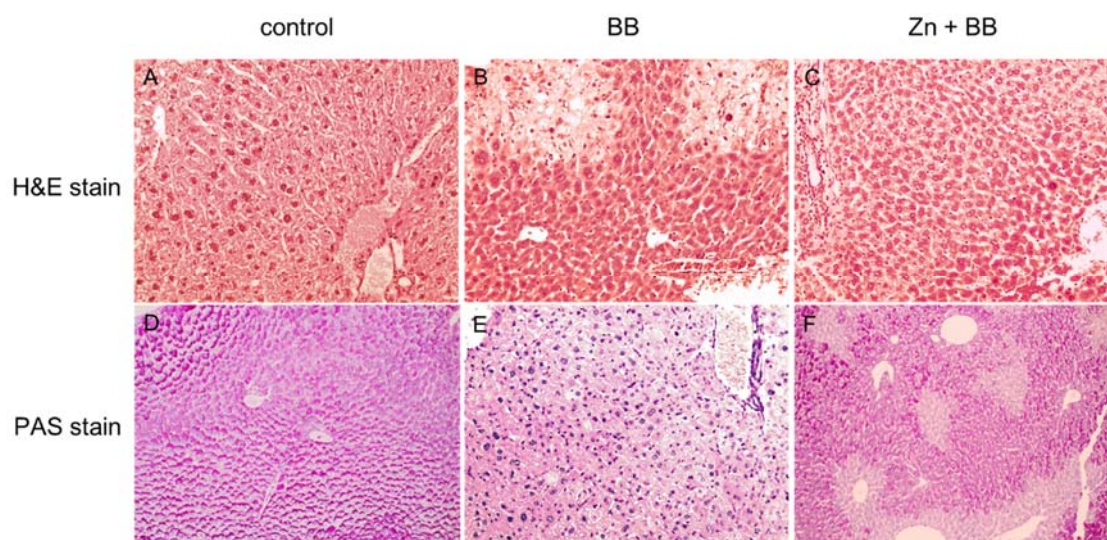


Figure 17. Pretreatment with Zn protects animals from acute BB-induced hepatotoxicity. Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and livers were harvested at necropsy. Liver specimens were fixed and processed by standard methods, and sections were stained with H&E (A-C) or PAS (D-F). These micrographs provide 10x magnified images of representative H&E- or PAS-stained sections from liver obtained from control (A and D), BB (B and E), and Zn + BB (C and F) animals. The image in (B) reveals severe necrosis around the central vein (zone 3) in a BB-exposed animal, in contrast to the mostly normal hepatic structure seen in (A) and (C). The image in (E) reveals almost complete depletion of hepatic glycogen following BB intoxication; in contrast, pretreatment with Zn prevented some of this glycogen depletion in BB-treated animals (F).

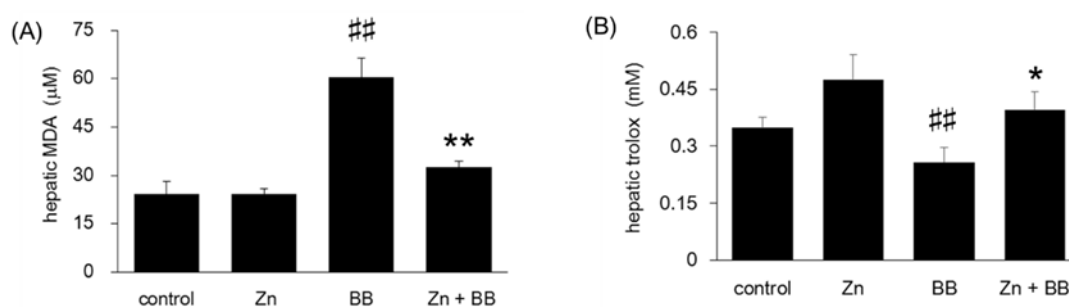


Figure 18. Pretreatment with Zn counteracts the effects of acute BB-induced toxicity on hepatic MDA levels and antioxidant power.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and livers were harvested at necropsy. Specimens of liver were assessed for MDA levels and trolox levels. Data are presented as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. $^{##}P < 0.01$ versus control group, $^{*}P < 0.05$ versus BB group, and $^{**}P < 0.01$ versus BB group.

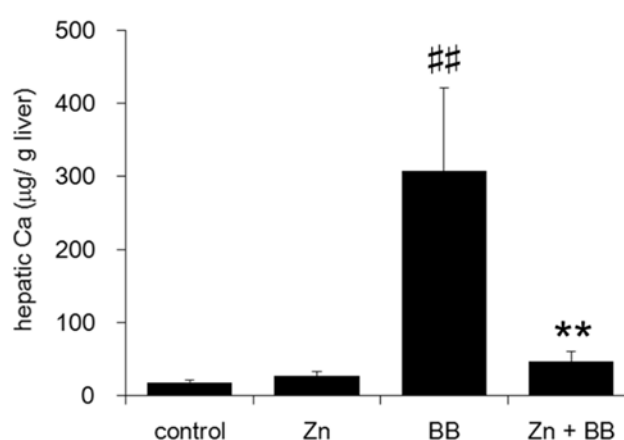


Figure 19. Pretreatment with Zn counteracts the effects of acute BB-induced toxicity on hepatic Ca levels.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and livers were harvested at necropsy. Specimens of livers were assessed for Ca levels. Data are presented as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. $^{##}P < 0.01$ versus control group and $^{**}P < 0.01$ versus BB group.

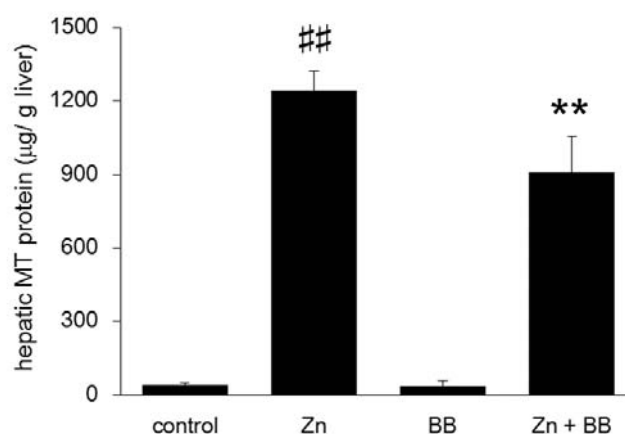


Figure 20. Effect of pretreatment with Zn on hepatic MT protein levels following acute BB-induced toxicity.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and livers were harvested at necropsy. Specimens of livers were assessed for MT levels. Data are presented as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. $^{##}P < 0.01$ versus control group and $^{**}P < 0.01$ versus Zn group.

第3項 亜鉛前投与が腎臓におけるブロモベンゼン毒性軽減に及ぼす効果

BB の標的臓器として肝臓が広く知られているが、その一方で腎臓にも障害を及ぼすことが報告されている。そこで、本項では、BB 投与 18 時間後における腎臓への障害に対する Zn の効果を検討した。

まず、BB 投与による腎障害のパラメーターとして血漿中のクレアチニンおよび BUN を測定した (Fig. 21)。その結果、両パラメーターで、それらの平均値は、各々 1.8 倍と 3.2 倍に増加していた ($P < 0.01$)。それに対して、Zn を前投与すると、有意な減少が認められた ($P < 0.01$)。

次に、組織学的検討を実施した (Fig. 22)。H&E 染色による組織学的形態変化を検討したところ、BB 投与マウスでは近位尿細管に障害が認められた。その一方で、Zn 前投与では、BB 投与で認められた障害は確認されなかった。

また、腎臓中の酸化ストレスを測定する目的で、脂質過酸化および抗酸化力を測定した (Fig. 23)。その結果、BB によって脂質過酸化の増加ならびに抗酸化力の低下が認められた。また、Zn の前投与でそれらの変化が消失した。

さらに、Ca 濃度を測定した。その結果、BB 投与によって、腎臓中の Ca 濃度が有意に増加するのに対して ($P < 0.01$)、Zn を前投与すると、Ca 濃度は有意に減少した ($P < 0.01$) (Fig. 24)。

また、MT の測定を行ったところ、Zn の前投与で MT 量が 548 $\mu\text{g/g kidney}$ (control と比較し、52 倍上昇) まで上昇したのに対して、BB を投与することで 343 $\mu\text{g/g kidney}$ (36 % 減少) まで減少していることが明らかとなった (Fig. 25)。

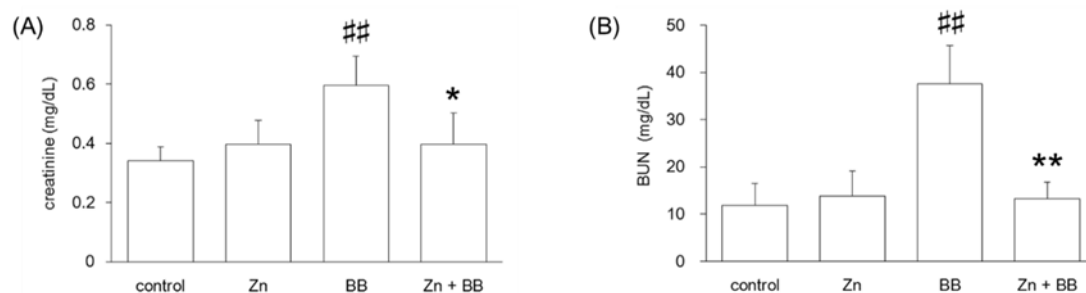


Figure 21. Effect of pretreatment with Zn on renal function levels.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Plasma levels of renal enzymes were determined 18 hr after the administration of BB. Panels (A), (B) indicate creatinine and BUN, respectively. Data are plotted as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. ^{##} $P < 0.01$ versus control group, ^{*} $P < 0.05$ versus BB group and ^{**} $P < 0.01$ versus BB group.

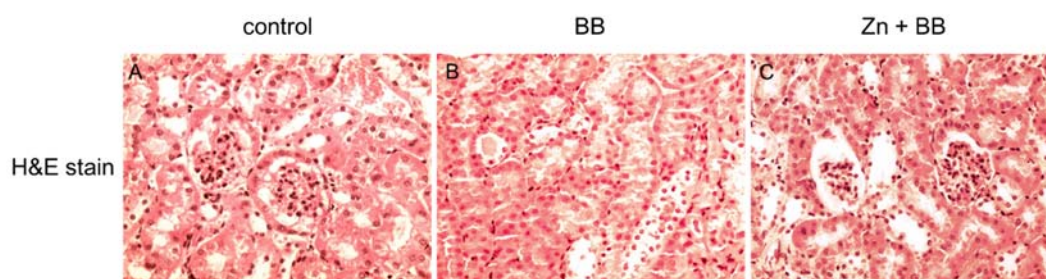


Figure 22. Pretreatment with Zn protects animals from acute BB-induced nephrotoxicity.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and kidneys were harvested at necropsy. Kidney specimens were fixed and processed into paraffin blocks by standard methods, and sections were stained with H&E. Micrographs in (A), (B), and (C) provide 20x magnified images of representative H&E-stained sections from kidneys obtained from control, BB, and Zn + BB animals, respectively. The image in (B) reveals swelling, degeneration, and the appearance of protein columns (indicative of penetration of protein into the renal proximal tubules) in a BB-exposed animal, in contrast to the mostly normal renal structures seen in (A) and (C).

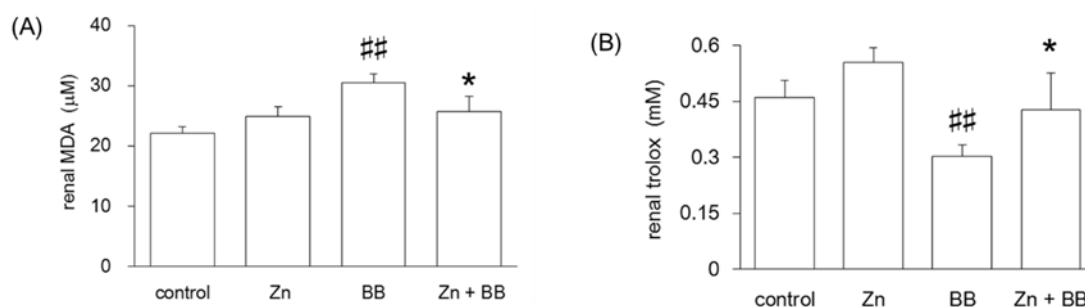


Figure 23. Pretreatment with Zn counteracts the effects of acute BB-induced toxicity on renal MDA levels and antioxidant power.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and kidneys were harvested at necropsy. Specimens of kidneys were assessed for MDA levels and trolox levels. Data are presented as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. ^{##} $P < 0.01$ versus control group and ^{*} $P < 0.05$ versus BB group.

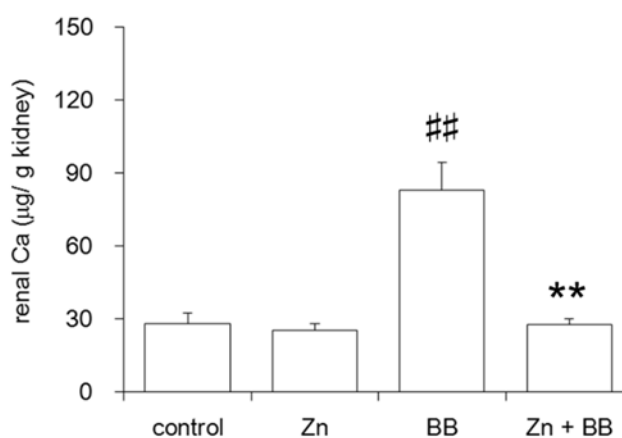


Figure 24. Pretreatment with Zn counteracts the effects of acute BB-induced toxicity on renal Ca levels.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and livers were harvested at necropsy. Specimens of kidneys were assessed for Ca levels. Data are presented as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. ^{##} $P < 0.01$ versus control group and ^{**} $P < 0.01$ versus BB group.

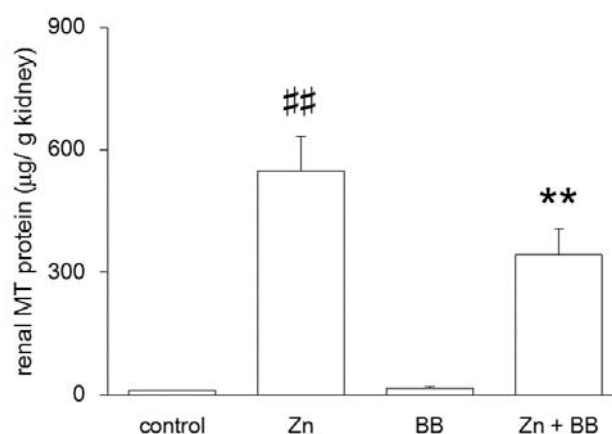


Figure 25. Effect of pretreatment with Zn on renal MT protein levels following acute BB-induced toxicity.

Mice were injected subcutaneously with 50 mg/kg Zn for a total of three times at 24-hr intervals. At 24 hr after the final pretreatment dose, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 1.2 g/kg BB. Animals were euthanized at 18 hr post-intraperitoneal injection and livers were harvested at necropsy. Specimens of kidneys were assessed for MT levels. Data are presented as mean \pm S.D. of groups of four or six mice each. $^{##}P < 0.01$ versus control group and $^{**}P < 0.01$ versus Zn group.

第4節 考察

CCl₄は代表的な肝障害惹起化合物として知られているが、すべての肝障害を網羅できているわけではない。すなわち、Zn 前投与によって得られた結果が CCl₄ のみで得られた現象であることも否めない。このことから、他の肝障害や腎障害を引き起こす化合物に対して拡張・一般化を検討するために、GSH 枯渇化合物として分類されている BB を用いて実験を行った。

本検討では、Zn の前投与によって、BB による致死毒性を 48 時間までは完全に抑制することが確認できた (Fig. 15)。また、肝臓や腎臓の障害マーカーや組織学的検討でもそれぞれの臓器で障害の抑制作用が認められた。BB の毒性は、肝臓では主に BB-3,4-oxide、腎臓では 2-bromohydroquinone、4-bromocatechol が障害を引き起こすと考えられており、臓器によって化合物が異なっている [67-72]。このことから、肝臓と腎臓のそれぞれにおいて、BB の代謝物を抑制することが考えられた。

肝臓組織では小葉付近の広範囲にわたって壊死が観察できた (Fig. 17)。それに対して、腎臓では障害は近位尿細管に局限していた。これらの結果は、腎臓での障害は軽度であり、BB による致死を引き起こす臓器 (致死臓器) としては肝臓であることを示唆する。

前述のとおり、BB による毒性発現機構は多段階であり、これらの多くの作用点に着目して、様々な化合物を用いて、毒性軽減の研究が行われている [63, 73-77]。肝障害では、細胞死に伴い、細胞質の Ca 濃度が上昇することが報告されている。また、MDA は脂質過酸化の最終生成物として知られている。本章では肝臓および腎臓中の Ca ならびに MDA が有意に減少していることから少なくとも最終的な段階よりは前の作用点で毒性を軽減していると考えられる。

さらに、MT はラジカルスカベンジャー能が非常に高い抗酸化物質であり、Zn によって大量に誘導される [31, 43, 44]。Zn の前投与で 30 倍近く MT 量が増加することを確認しているが (第2章)、BB を投与すると 18 時間後には肝臓では 26 %、腎臓では 36 %の MT 量が減少していた。Cd-hem 法は MT が 7 つの Cd と結合することを利用

している [31, 43]。そのため、ラジカルによって攻撃された **MT** は酸化型に変化し、その結果 **Cd** 結合能が消失するため、数値として反映されないことが考えられる。このことから **MT** が自身のラジカルスカベンジャー能によって **GSH** などの他の抗酸化物質の代償物質として機能することで、**BB** によって誘導されるラジカルに対して防御的に働くことが示唆される。

Nigel らの報告では、**BB** 投与 55 時間までの **ALT** や **AST** の値の推移を検討したところ時間依存的な肝障害マーカーの増加が確認されている [78]。また、肝障害を示すアセトアミノフェンは 12 時間 [79]、**CCl₄** は 24 時間 [80] という報告があり、**BB** の作用時間は長いといえる。**Zn** 前投与の効果として **CCl₄** による致死毒性は 24 時間後までは完全に抑制できている点は **BB** も同様であるが、**BB** では 72 時間後では 1 匹のマウスが死亡した。この相違は化合物の特徴の違いによって規定されたと考えられた。

BB による肝障害モデル動物に対しても、**Zn** の前投与で致死を抑制できることを見出した。複数の肝障害モデル動物で致死を抑制する作用を明らかと出来たことから、今後は実際に副作用として致死を引き起こすような医薬品に対象を拡張し、より意義のあるものにしたい。

第4章

低カルシウム血症が四塩化炭素毒性軽減に及ぼす効果

第1節 目的

第1、2章では CCl₄ 致死毒性に対する Zn 前投与の毒性軽減の検討、第3章では BB による致死毒性に対する Zn 前投与の毒性軽減の検討を実施した。これらはそれぞれメカニズムの異なる肝障害惹起化合物である。本研究にて複数の肝障害モデル動物に対して、亜鉛の前投与で致死を防御出来る結果が得られた。しかしながら、Zn による前投与によって肝臓および腎臓の両臓器に対する毒性を軽減していることを明らかにしている。このことは、ある臓器が重篤なダメージを受けることで、動物が死に至るだけでなく、複数の臓器の障害が相加的に加わることで致死が起こることも否定できない。つまり、肝臓や腎臓といった一臓器が致命臓器になるだけでなく、多臓器不全によって死亡する場合も否定できない。また、Zn の前投与によって、致死の抑制は明らかとしたが、どのような因子が原因となって致死が引き起こすかは明らかに出来ていない。また、そのような報告は筆者の知る限り存在しない。

カルシウムは骨代謝や神経伝達など重要な役割を果たしている。また、肝障害に関しても、障害の終末現象としてカルシウムが増加することが明らかとなっている [8, 12, 66]。最近、培養細胞を用いた検討で、細胞を Cd 処理する際に、カルシウムを含まない培地中では Cd の毒性が軽減されることを見出している (data not shown)。Cd は急性毒性として肝障害を引き起こすこと、また CCl₄ や BB と同様に、酸化ストレスの亢進を引き起こすことが明らかとなっている。このことから、類似した毒性発現機構が成立すると推察される。カルシウムを含まない培地で Cd の毒性が軽減されたという知見は、カルシウムが肝障害の終末現象以前にも作用することが考えられる。

そこで、本章ではカルシウム欠乏食を与えて低カルシウム血症モデル動物を作製することで、実際にカルシウムが CCl₄ の毒性に関与しているか否か検討した。

第2節 実験材料および実験方法

1. 試薬

全ての試薬は、市販の特級試薬および研究用試薬を使用した。商品名・販売業者および特に必要あるものに関しては別途記載した。

2. 動物

3 週齢の ddY 系雄性マウスを日本 SLC から購入し、1 週間飼育環境に馴化させてから検討を行った。明暗周期 12 時間 (8 時-20 時 : 明、20 時-8 時 : 暗)、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の環境で飼育し、CE-2 (日本クレア) またはカルシウム欠乏食 (オリエンタル酵母 : AIN-93 を基準にカルシウムを除いた餌) 及び水は自由摂取させた。本研究は金城学院大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

3. カルシウム欠乏食を給餌させた動物の血漿カルシウム濃度の測定

4 週齢の ddY 系雄性マウスを 2 群に分けて、通常食 (CE-2) およびカルシウム欠乏食をそれぞれ自由に与え、4 週間飼育を行った。また、1 週間ごとに体重の測定を実施するとともに、2 週間ごとに血漿中のカルシウム濃度を測定した。

4. CCl_4 毒性試験

8 週齢まで飼育した ddY 系雄性マウスに対して、 CCl_4 を 2 g/kg の用量で腹腔内投与し、6 時間後および 24 時間後に血液を採取した。血液は 10 分間遠心 ($1,500 \times g, 4^{\circ}\text{C}$) した後、上清 (血漿) を取り、 -80°C で保存した。また、 CCl_4 投与 24 時間後では、麻酔下で肝臓を摘出した。肝臓 0.1 g を 2 mL チューブに加え、液体窒素に入れた後で -80°C に保存した。また、肝臓の左葉の組織を $2\text{-}3 \text{ mm}$ ずつに切り分けてティッシュ・テックのカセットの中に入れた後、 15% 中性ホルマリン緩衝液 ($\text{pH}7.2$) を加え、脱気処理を真空ポンプにて行ったものを保存した。

5. 生化学的パラメーター解析

ALT、AST、クレアチニンおよび BUN は第 2 章の方法と同様に実施した (page 16)。血漿中のカルシウム濃度はカルシウム E-テストワコー (和光純薬) のプロトコールに従って行っ

た。96 well plate (NUNC) に血漿 2.5 μ L を加えた後、緩衝液を 100 μ L 加えた後、発色試液 50 μ L を加えた。発色試液を加えた後に、直ちに 610 nm の吸光度を測定した。これらの数値の算出は各パラメーターで検量線を作成し、その数値に対する相対的な吸光度より計算した。

6. 脂質過酸化の測定

マウス肝臓組織による脂質過酸化の測定は第 2 章の方法と同様に実施した (page 17)。

7. 総抗酸化力の測定

マウス肝臓中の総抗酸化力は第 2 章の方法と同様に実施した (page 18)。

8. H&E 染色および PAS 染色

H&E 染色および PAS 染色は、第 2 章の方法と同様に実施した (page 19)。

9. total RNA の抽出

total RNA の抽出は第 1 章の方法と同様に実施した (page 4)。

10. one step リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR は One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR kit (Perfect Real Time : タカラバイオ) のプロトコールに従って行った。Total RNA 30 ng に標的遺伝子に特異的な 10 pmol/ μ L forward primer (FP) 0.8 μ L および 10 pmol/ μ L reverse primer (RP) 0.8 μ L、2 x step SYBR RT-PCR Buffer 4 を 10 μ L、TaKaRa Ex Taq HS Mix 1.2 μ L、PrimeScript Plus RTase Mix 0.4 μ L、ROX Reference Dye 0.4 μ L、DEPC 処理水 4.4 μ L を加え、これを Applied Biosystems 7300 (APPLIED Biosystems) を用いて PCR 反応を行い、データを解析した。反応条件は 42°C で 5 分間反応させた後、95°C で 10 秒間熱変性を行った。その後、95°C で 5 秒間、60°C で 31 秒を 1 サイクルとして、40 サイクル反応を行った。なお、解析には比較 Ct 法を用いた。また、リアルタイム RT-PCR のプライマー配列は Table 4 に示す。なお、内部標準として *GAPDH* を用い、各測定値を補正した。

11. 統計

検定は SPSS 19.0 (SPSS Inc.) を用いて Tukey-Kramer method による一元配置分散分析を実施した。

Table 4. Oligonucleotide primer sequences and PCR conditions for real-time RT-PCR

Gene (Accession No.)	Primer sequences		PCR Product length (bp)
		Sequence (5' to 3')	
TNF α (NM_013693)	Forward	GAA CTT CGG GGT GAT CGG TC	84
	Reverse	GTG AGG GTC TGG GCC ATA G	
IL-6 (NM_031168)	Forward	GAA ATG ATG GAT GCT ACC AAA CTG	94
	Reverse	TAC TCC AGG TAG CTA TGG TAC TC	
CYP2E1 (NM_021282)	Forward	CAT TCC TGT GTT CCA GGA GTA CAA G	91
	Reverse	GAT ACT TAG GGA AAA CCT CCG CAC	
GAPDH (NM_008084)	Forward	TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC	98
	Reverse	GTC GTT GAT GGC AAC AAT CTC C	

第3節 実験結果

まず、カルシウム欠乏食における影響を検討した。4週間の給餌条件下において、体重に関しては通常食とカルシウム欠乏食で大きな差は認められなかった (Fig. 26B)。その一方で、血漿中のカルシウム濃度は給餌 2 週間から減少が確認された。また、4週間の給餌で約 30%の減少が認められた (Fig. 26A)。このことから、4週間のカルシウム欠乏食の給餌で、体重等に影響はなく、低カルシウム血症モデルマウスの作製に成功した。

次に、この条件下で、 CCl_4 を投与し、毒性影響の検討を行った。その結果、カルシウム欠乏食を与えたマウスにおいては、通常食を与えたマウスと比較して、 CCl_4 の毒性は軽減された (CCl_4 投与 6 時間、24 時間後の血漿中 ALT および AST の活性上昇は通常食給餌の 50 %程度であった; Fig. 27)。次にクレアチニンおよび BUN の測定を CCl_4 投与 24 時間で実施した (Table 5)。その結果、 CCl_4 の投与によって、両パラメーターの上昇が確認されたが、カルシウム欠乏食の影響は認められなかった。さらに、肝臓について、酸化ストレスマーカーとして、脂質過酸化 (MDA) と抗酸化力を測定したところ、 CCl_4 によって上昇した MDA 値がカルシウム欠乏食では減少し、抗酸化力はカルシウム欠乏食では低下の割合が減弱した (Fig. 28)。

次に、組織学的検討を実施した (Fig. 29)。H&E 染色による組織学的形態変化を検討したところ、control では、細胞質や核小体が正常な機能形態を示しているのに対して、 CCl_4 投与マウスでは、壊死が広範囲にわたって確認された (Fig. 29A)。その一方で、カルシウム欠乏食を給餌した CCl_4 投与群では、通常食を給餌した CCl_4 投与マウスと比較して、組織学的にも傷害度が減弱している結果が得られた (Fig. 29C)。さらに、グリコーゲンを染色する PAS 染色を実施したところ、control では肝臓組織全体にグリコーゲンが蓄積していた。また、通常食を給餌した CCl_4 投与マウスではグリコーゲンがほとんど枯渇していた。それに対して、カルシウム欠乏食を給餌した CCl_4 投与群では、グリコーゲンの減少は認められるものの、一定量のグリコーゲンの保持が

確認された (Fig. 29F)。

次にカルシウム欠乏食による CCl_4 肝毒性の影響を検証する目的で、炎症系サイトカインとして知られる $\text{TNF-}\alpha$ と IL-6 、またラジカル生成に必要とされている CYP2E1 の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR にて測定した (Fig. 30)。その結果、 $\text{TNF-}\alpha$ と IL-6 は CCl_4 投与によって、有意な上昇が認められているが、カルシウム欠乏食では通常食を給餌したマウスより有意な減少が確認された。また、 CYP2E1 は CCl_4 投与で、30 % 前後の低下が認められたが、餌による変化は確認されなかった。

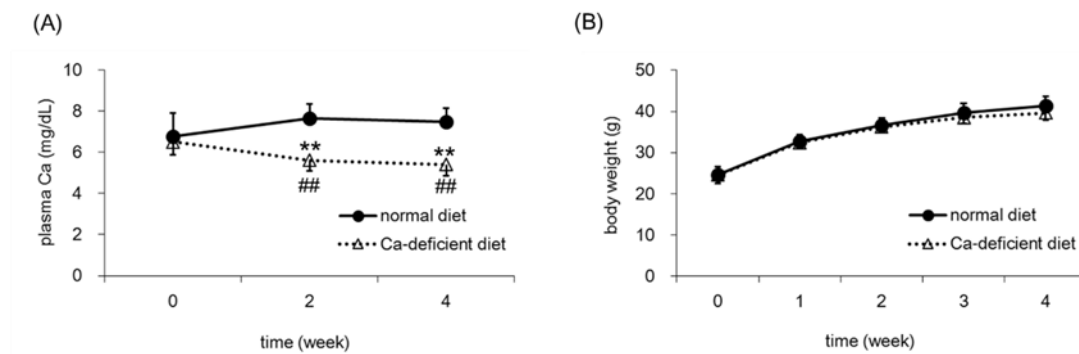


Figure 26. Effect of feeding a normal diet versus a Ca-deficient diet on body weight and plasma Ca concentration.

Mice were freely fed a normal diet or a Ca-deficient diet for 4 weeks of age for a period of 4 weeks. Plasma Ca levels (A) were determined every 2 weeks and body weight change (B) was observed every week. Data indicate mean \pm S.D. for 8-9 mice. ** $P < 0.01$ versus 0-week Ca-deficient group, ## $P < 0.01$ versus normal diet group at the same week.

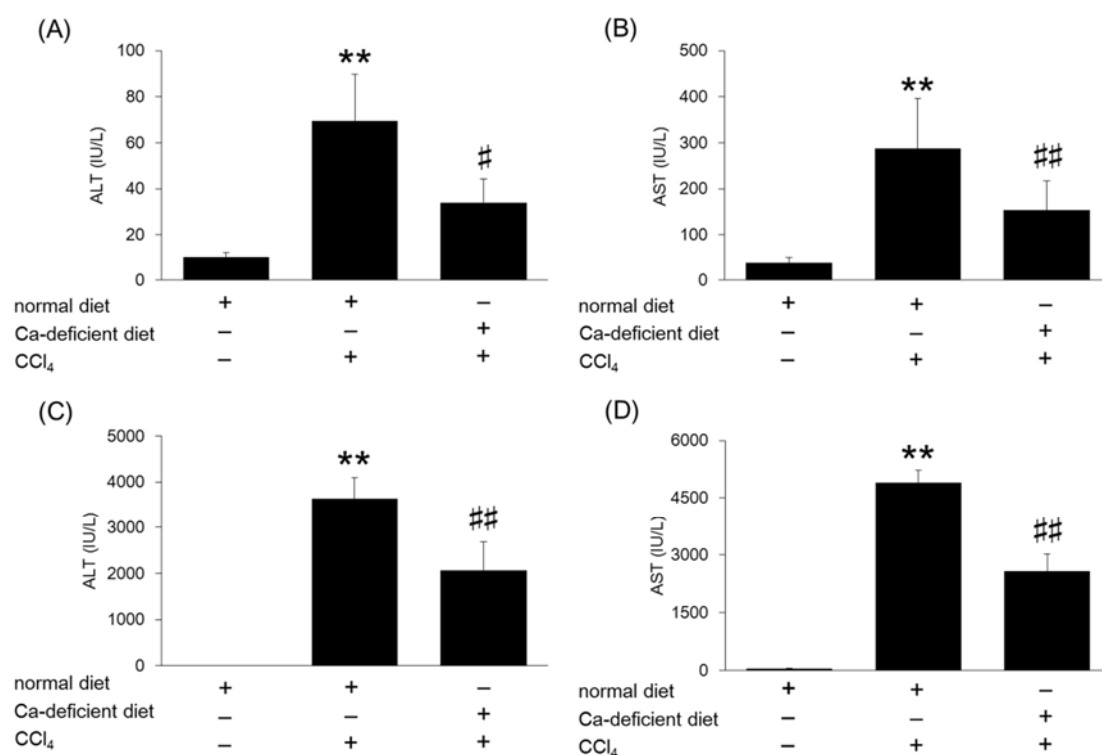


Figure 27. Effect of Ca-deficient diet on ALT and AST activities in CCl₄-induced toxicity.

Mice were fed a normal diet or a Ca-deficient diet for from 4 weeks of age for a period of 4 weeks. At 8 weeks of age, the mice were injected intraperitoneally with 2 g/kg CCl₄. At 6 hr (A and B) and 24 hr (C and D) post CCl₄ injection, plasma ALT (A and C) and AST (B and D) activities were determined. Data indicate mean \pm S.D. for 6-9 mice. ** $P < 0.01$ versus control, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus normal diet + CCl₄ group.

Table 5. Effect of Ca-deficient diet on creatinine and BUN levels in CCl₄-induced toxicity.

	creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
control	0.34 \pm 0.05	20.03 \pm 2.82
normal diet + CCl ₄	0.72 \pm 0.15**	32.69 \pm 10.82**
Ca-deficient diet + CCl ₄	0.71 \pm 0.14**	29.79 \pm 7.59*

Mice were fed a normal diet or a Ca-deficient diet from 4 weeks of age for a period of 4 weeks. At 8 weeks of age, the mice were injected intraperitoneally with 2 g/kg CCl₄. Plasma creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were determined after 24 hr injection. Data indicate mean \pm S.D. for 6-9 mice. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control.

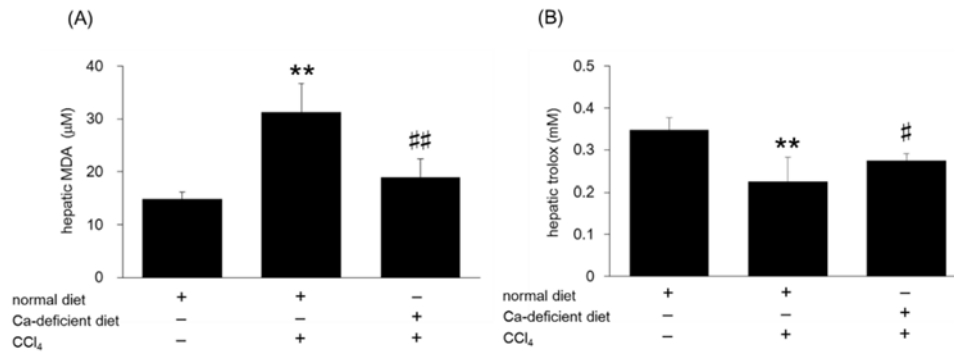


Figure 28. Effect of Ca-deficient diet on MDA levels and antioxidant power in CCl₄-induced toxicity.

Mice were fed a normal diet or a Ca-deficient diet from 4 weeks of age for a period of 4 weeks. At 8 weeks of age, the mice were injected intraperitoneally with 2 g/kg CCl₄. MDA levels (A) and total antioxidant power (B) in the liver were determined 24 hr after injection. Data indicate mean \pm S.D. for 6-9 mice. ** $P < 0.01$ versus control, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus normal diet + CCl₄ group.

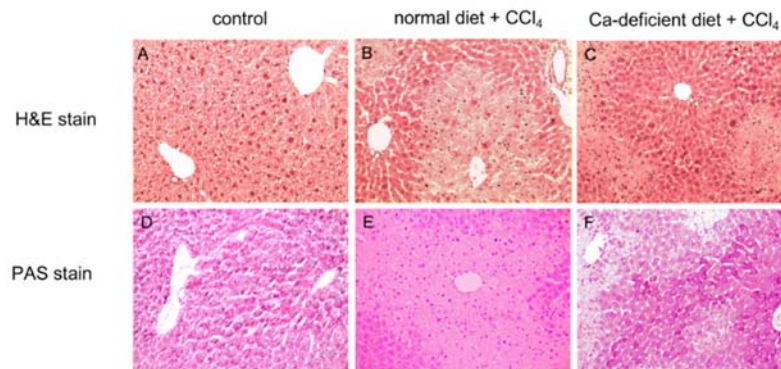


Figure 29. Ca-deficient diet protects animals from acute CCl₄-induced hepatotoxicity.

Mice were fed a normal diet or a Ca-deficient diet from 4 weeks of age for a period of 4 weeks. At 8 weeks of age, the mice were injected intraperitoneally with 2 g/kg CCl₄. Animals were euthanized at 24 hr after the intraperitoneal injection and livers were harvested at necropsy. Liver specimens were fixed and processed by standard methods, and sections were stained with H&E (A-C) or PAS (D-F). These micrographs provide 10x magnified images of representative H&E- or PAS-stained sections from liver obtained from control (A and D), normal diet + CCl₄ (B and E), and Ca-deficient diet + CCl₄ (C and F) animals. The image in (B) reveals severe necrosis around the central vein in CCl₄ exposed animals fed a normal diet, in contrast to the mostly normal hepatic structure seen in (A) and (C). The image in (E) reveals almost complete depletion of hepatic glycogen following CCl₄ intoxication while on a normal diet; in contrast, Ca-deficient diet group shows prevention of some of this glycogen depletion (F).

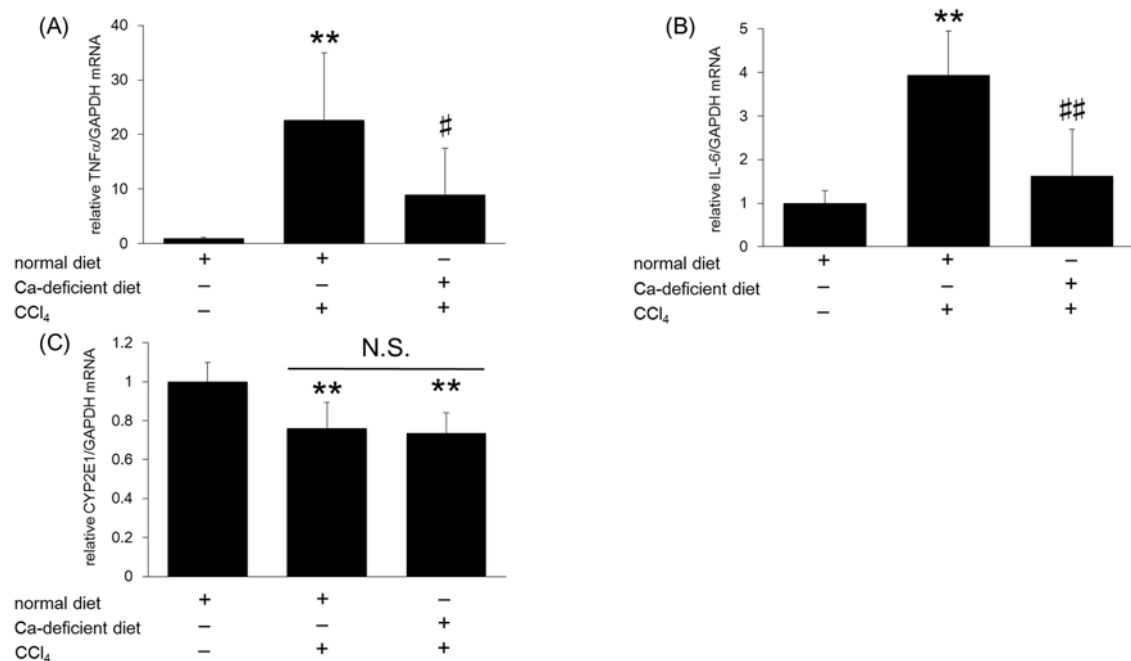


Figure 30. Effect of Ca-deficient diet on CCl_4 -induced liver inflammation and CYP induction. Mice were fed a normal diet or a Ca-deficient diet from 4 weeks of age for a period of 4 weeks. At 8 weeks of age, the mice were injected intraperitoneally with 2 g/kg CCl_4 . 24 hr after CCl_4 injection, total RNA was isolated from the mice livers. Quantitative RT-PCR analysis was performed. The amount of quantified target mRNA was normalized by *GAPDH* mRNA. (A), (B), and (C) indicate *TNF α* , *IL-6*, and *CYP2E1*, respectively. Data indicate mean \pm S.D. for 6-9 mice. ** $P < 0.01$ versus control, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus normal diet + CCl_4 group. N.S.: not significant.

第4節 考察

本章では、4週間のカルシウム欠乏食の給餌で、体重や肝・腎への障害もなく低カルシウム血症モデルマウスを作製することが出来た。この条件下で、 CCl_4 を投与したところ、カルシウム欠乏食群で肝障害は軽減されたが、腎臓について、差は認められなかった。このことから CCl_4 の致命臓器は肝臓であることが示唆される。また、肝臓中のカルシウム濃度は今回の検討では有意な差は認められなかったことから (data not shown)、血漿中のカルシウム濃度が重要であることが示唆された。

CCl_4 毒性に対する血漿中カルシウムの作用点を明らかにする目的で、CYP2E1の発現量を測定した。 CCl_4 はCYP2E1によって活性化を受けラジカルとなった後に、ラジカル自身がCYP2E1を攻撃することで、CYP2E1の発現量が減少することが明らかとなっている [81, 82]。また、 CCl_4 毒性を抑制するものとして、CYP2E1の発現量が CCl_4 投与群と比べ、回復していることも報告されている [83-86]。このことから、CYP2E1の発現量の回復が CCl_4 の毒性軽減に関与している可能性を検証した。しかし、 CCl_4 投与で両群とも減少が認められたが、群間での差は認められなかった。このことから、カルシウムの関与はCYP2E1以降の経路であるといえる。

CCl_4 による毒性はCYP2E1によって誘導されるラジカルが酸化ストレスを介して毒性を惹起すると考えられている[12, 48, 87, 88]。そこで、酸化ストレスマーカーとして知られている脂質過酸化を測定した。その結果、カルシウム欠乏食では通常食よりも脂質過酸化量が減少していることを明らかとした。また、炎症と CCl_4 毒性に関しても多くの報告が存在する[16, 55, 86, 89, 90]。炎症におけるカルシウム欠乏食の関与を検討したところ、 $\text{TNF-}\alpha$ および IL-6 mRNA 発現量の減少がカルシウム欠乏食で認められた。これらのことから、少なくとも脂質過酸化の亢進と炎症反応に対してカルシウムが寄与するものと考えられる。脂質過酸化の亢進と炎症反応の経路は複合的であるため、それぞれを抑制しているか、もしくは上流に対してカルシウムが関与しているかは明らかとなっていないが、その点については今後の課題となるであろう。

また、カルシウムシグナルは、きわめて多様でかつ重要な細胞機能の制御に寄与し

ており、カルシウムだけでなくカルシウム結合タンパクの存在や細胞内カルシウム濃度を調節するためのイオンチャネル・ポンプ・トランスポーターなど複合的な経路が複雑に関与しあっている[91]。また、本章においては、カルシウム全体の量を見ているため、詳細な検討ができていない。そのため、今後、細胞内のカルシウムの分子型などをより詳細に検討し、肝臓特異的にカルシウム濃度の増加を阻害するような化合物を開発できれば、画期的な治療薬になりうる。本研究はその基盤となる研究となると考える。

総括

肝臓は代謝、腎臓は生体異物の排泄において主要な役割を果たしている。このため、肝臓や腎臓は化学物質の毒性が惹起された際に多くの攻撃を受ける臓器であるといえる。これらは、生命を維持する上で重要な臓器であり、肝臓や腎臓の増悪化によって生活習慣病にかかりやすいことも明らかになっている。そのため、肝臓や腎臓を良好な状態に保つことが QOL を上昇させる上で重要となってくる。CCl₄ は種々の動物で肝臓に激しい障害を起こし、その病態がヒトの障害と非常に類似している。このことを利用して、肝障害惹起化合物として研究等で広く用いられている。CCl₄ を用いた研究は 1960 年代から開始され、今なお精力的に行われており、天然物など様々な成分が肝障害を軽減させる結果が明らかとなっている。その一方で、致死を抑制する個体レベルの毒性発現の研究は、ほとんど見られない。この原因として、致死を究極の毒性の病態モデルとして考え、毒性発現の研究を遂行するという発想は、これまでに見られない。また、軽度な障害に対する治療効果は認められるが、致死を引き起こすほどの用量については効果が認められない等が推察される。天然物等に含まれる成分の作用機構の解明を行うことは非常に重要である。その一方で、解熱鎮痛剤や生活習慣病の改善薬を服用することが原因で、死亡する例もあることから致死を引き起こす高濃度の毒物に対する防御作用を研究することも非常に重要な研究領域である。

第 1 章では、致死を引き起こす CCl₄ 投与の投与量および投与経路の探索を行った結果、投与量は 4 g/kg、投与経路は腹腔内投与と決定した。この条件下に対して、Zn を 3 回前投与することで、CCl₄ による致死毒性を完全に抑制することを示した。この抑制作用は Zn や Cd の 1 回前投与では致死の減少傾向は認められたものの、完全な抑制は認められなかった。また、Zn や Cd に共通して誘導される因子として、MT が挙げられ、肝臓中の発現量を検討した。その結果、投与回数依存的な発現増加と致死率の減少に関連が認められた。

第 2 章では Zn を前投与した際の、CCl₄ 致死毒性抑制の防御機構を肝臓と腎臓を用

いて、比較検討した。肝臓と腎臓の両臓器において Zn による臓器障害の減少が生化学的パラメーターおよび組織学的観察において明らかとなった。また、Zn によって上昇した MT が CCl₄ の投与で明らかな減少を示した。以上の結果から、MT が生体内抗酸化物質の代償物質として機能することにより、毒性を抑制していることを提示した。また、肝臓と腎臓の傷害の程度を比較すると、腎傷害は軽度であり、致死を引き起こす致命臓器は肝臓であることが示唆された。なお、防御機構は既存の報告と同じ Zn によって誘導された MT のラジカルスカベンジャー能を介した抑制であった。そのため、致死を引き起こす毒性に対して、防御を行うためには大量の MT を誘導させる必要があるといえる。

第 3 章では、CCl₄ 以外の肝障害惹起化合物である BB を用いて、Zn による前投与で防御作用が認められるか検討を行った。その結果、CCl₄ の結果と同様に Zn の前投与で、BB による致死毒性を防御することを見出した。

第 4 章では、致死を引き起こす因子の候補としてカルシウムに着目し、低カルシウム血症条件下での CCl₄ 毒性に対する影響を評価した。また低カルシウム血症のマウスは、4 週間のカルシウム欠乏食の給餌で作製した。その結果、肝障害マーカー・組織学的検討・脂質過酸化および炎症系サイトカインなどの増悪因子に対して、低カルシウム血症のマウスでは毒性の減弱作用が認められた。また、CCl₄ の毒性起点となる *CYP2E1* の mRNA 発現レベルを検討したが有意な差は認められなかった。このことから、低カルシウム血症による CCl₄ 軽減の作用点としてはラジカル生成以降の段階から脂質過酸化の間で起こることが示唆された。

これまで、CCl₄ を含めた肝障害を引き起こす化合物において、カルシウム増加は認められるが、それらは細胞死の終末現象として捉えられていた。しかし、本論文において、カルシウムが細胞死の終末以外のイベントにも関与することを見出した。カルシウムは生態の維持に不可欠な役割を果たしている。そのため、作用点は非常に多岐にわたることから、現段階で詳細な作用点を明らかにすることは困難である。しかしながら、CCl₄ 以外の化合物においてもカルシウムによって毒性が変動するか明らかに

することが出来れば非常に有意義な研究となることが期待される。また、カルシウムのタブレットは医薬品だけでなく、健康食品として広く販売されている。本研究で、それらを過剰に摂取すると毒性の作用増強を示唆するものであり栄養学の学問領域においても非常に意義のある結果を提示できたものといえる。

参考文献

- [1] C. Sudo, K. Maekawa, K. Segawa, T. Hanatani, K. Sai, Y. Saito, Trend in drug-induced liver injury base on reports of adverse reactions to PMDA in Japan, *Bull Natl Inst Health Sci*, 130 (2012) 66-70.
- [2] S. Chitturi, J. George, Hepatotoxicity of commonly used drugs: nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid-lowering agents, psychotropic drugs, *Semin Liver Dis*, 22 (2002) 169-183.
- [3] J.Q. Ma, J. Ding, L. Zhang, C.M. Liu, Hepatoprotective properties of sesamin against CCl₄ induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway, *Food Chem Toxicol*, 64 (2014) 41-48.
- [4] K.R. Thilakchand, R.T. Mathai, P. Simon, R.T. Ravi, M.P. Baliga-Rao, M.S. Baliga, Hepatoprotective properties of the Indian gooseberry (*Emblica officinalis* Gaertn): a review, *Food Funct*, 4 (2013) 1431-1441.
- [5] A.F. Castro, J. Coresh, CKD surveillance using laboratory data from the population-based National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), *Am J Kidney Dis*, 53 (2009) S46-55.
- [6] J. Coresh, B.C. Astor, T. Greene, G. Eknoyan, A.S. Levey, Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Am J Kidney Dis*, 41 (2003) 1-12.
- [7] P.D. Bhondave, P.P. Devarshi, K.R. Mahadik, A.M. Harsulkar, 'Ashvagandharishta' prepared using yeast consortium from *Woodfordia fruticosa* flowers exhibit hepatoprotective effect on CCl₄ induced liver damage in Wistar rats, *J Ethnopharmacol*, 151 (2014) 183-190.
- [8] T. Wang, K. Shankar, M.J. Ronis, H.M. Mehendale, Mechanisms and outcomes of drug- and toxicant-induced liver toxicity in diabetes, *Crit Rev Toxicol*, 37 (2007) 413-459.
- [9] G. Auzinger, J. Wendon, Intensive care management of acute liver failure, *Curr Opin Crit Care*, 14 (2008) 179-188.
- [10] A.S. Go, G.M. Chertow, D. Fan, C.E. McCulloch, C.Y. Hsu, Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization, *N Engl J Med*, 351 (2004) 1296-1305.
- [11] R.O. Recknagel, Carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Pharmacol Rev*, 19 (1967) 145-208.
- [12] L.W. Weber, M. Boll, A. Stampfl, Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model, *Crit Rev Toxicol*, 33 (2003) 105-136.
- [13] S.J. Lee, K.T. Lim, Glycoprotein of *Zanthoxylum piperitum* DC has a hepatoprotective effect via anti-oxidative character in vivo and in vitro, *Toxicol In Vitro*, 22 (2008) 376-385.
- [14] N. Singh, V. Kamath, K. Narasimhamurthy, P.S. Rajini, Protective effect of potato peel extract against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats, *Environ Toxicol Pharmacol*, 26 (2008) 241-246.
- [15] G.J. Huang, J.S. Deng, C.S. Chiu, J.C. Liao, W.T. Hsieh, M.J. Sheu, C.H. Wu, Hispolon

Protects against Acute Liver Damage in the Rat by Inhibiting Lipid Peroxidation, Proinflammatory Cytokine, and Oxidative Stress and Downregulating the Expressions of iNOS, COX-2, and MMP-9, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012 (2012) 480714.

[16] F. Zhang, X. Wang, X. Qiu, J. Wang, H. Fang, Z. Wang, Y. Sun, Z. Xia, The protective effect of esculentoside a on experimental acute liver injury in mice, *PLoS One*, 9 (2014) e113107.

[17] E.S. El Denshary, M.A. Al-Gahazali, F.A. Mannaa, H.A. Salem, N.S. Hassan, M.A. Abdel-Wahhab, Dietary honey and ginseng protect against carbon tetrachloride-induced hepatonephrotoxicity in rats, *Exp Toxicol Pathol*, 64 (2012) 753-760.

[18] Z.A. Fadhel, S. Amran, Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats, *Phytother Res*, 16 Suppl 1 (2002) S28-32.

[19] K.V. Anand, R. Anandhi, M. Pakkiyaraj, P. Geraldine, Protective effect of chrysin on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced tissue injury in male Wistar rats, *Toxicol Ind Health*, 27 (2011) 923-933.

[20] P. Abraham, G. Wilfred, Cathrine, Oxidative damage to the lipids and proteins pf the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication, *Clin Chim Acta*, 289 (1999) 177-179.

[21] E. Al-Sayed, M.M. Abdel-Daim, Protective role of Cupressuflavone from Cupressus macrocarpa against carbon tetrachloride-induced hepato- and nephrotoxicity in mice, *Planta Med*, 80 (2014) 1665-1671.

[22] A.A. Hismiogullari, S.E. Hismiogullari, O. Karaca, F.B. Sunay, S. Paksoy, M. Can, I. Kus, K. Seyrek, O. Yavuz, The protective effect of curcumin administration on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced nephrotoxicity in rats, *Pharmacol Rep*, 67 (2015) 410-416.

[23] A. Hermenean, A. Ardelean, M. Stan, H. Herman, C.V. Mihali, M. Costache, A. Dinischiotu, Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney, *Chem Biol Interact*, 205 (2013) 138-147.

[24] H. Ebaid, J. Al-Tamimi, I. Hassan, I. Alhazza, M. Al-Khalifa, Antioxidant bioactivity of Samsum ant (*Pachycondyla sennaarensis*) venom protects against CCL(4)-induced nephrotoxicity in mice, *Oxid Med Cell Longev*, 2014 (2014) 763061.

[25] T. Kataoka, Y. Nishiyama, T. Toyota, M. Yoshimoto, A. Sakoda, Y. Ishimori, Y. Aoyama, T. Taguchi, K. Yamaoka, Radon inhalation protects mice from carbon-tetrachloride-induced hepatic and renal damage, *Inflammation*, 34 (2011) 559-567.

[26] A.B. Hsouna, M. Saoudi, M. Trigui, K. Jamoussi, T. Boudawara, S. Jaoua, A.E. Feki, Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of Ceratonia siliqua leaf extract against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats, *Food Chem Toxicol*, 49 (2011) 3183-3191.

[27] C.D. Klaassen, G.L. Plaa, Relative effects of various chlorinated hydrocarbons on liver and kidney function in mice, *Toxicol Appl Pharmacol*, 9 (1966) 139-151.

[28] C.D. Klaassen, G.L. Plaa, Susceptibility of male and female mice to the nephrotoxic and

hepatotoxic properties of chlorinated hydrocarbons, *Proc Soc Exp Biol Med*, 124 (1967) 1163-1166.

[29] P.J. Gehring, Hepatotoxic potency of various chlorinated hydrocarbon vapours relative to their narcotic and lethal potencies in mice, *Toxicol Appl Pharmacol*, 13 (1968) 287-298.

[30] K.T. Suzuki, M. Yamamura, Induction and degradation of copper-induced metallothioneins in rat liver as studied at isometallothionein levels, *Toxicol Lett*, 6 (1980) 301-307.

[31] S. Onosaka, K. Tanaka, M.G. Cherian, Effects of cadmium and zinc on tissue levels of metallothionein, *Environ Health Perspect*, 54 (1984) 67-72.

[32] K.S. Min, Y. Terano, S. Onosaka, K. Tanaka, Induction of hepatic metallothionein by nonmetallic compounds associated with acute-phase response in inflammation, *Toxicol Appl Pharmacol*, 111 (1991) 152-162.

[33] S.Z. Cagen, C.D. Klaassen, Protection of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by zinc: role of metallothionein, *Toxicol Appl Pharmacol*, 51 (1979) 107-116.

[34] P.J. Thornalley, M. Vasak, Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals, *Biochim Biophys Acta*, 827 (1985) 36-44.

[35] M. Sato, I. Bremner, Oxygen free radicals and metallothionein, *Free Radic Biol Med*, 14 (1993) 325-337.

[36] M. Sato, M. Kondoh, Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals, *Tohoku J Exp Med*, 196 (2002) 9-22.

[37] M. Webb, Protection by zinc against cadmium toxicity, *Biochem Pharmacol*, 21 (1972) 2767-2771.

[38] G.S. Probst, W.F. Bousquet, T.S. Miya, Correlation of hepatic metallothionein concentrations with acute cadmium toxicity in the mouse, *Toxicol Appl Pharmacol*, 39 (1977) 61-69.

[39] T.P. Coogan, R.M. Bare, E.J. Bjornson, M.P. Waalkes, Enhanced metallothionein gene expression is associated with protection from cadmium-induced genotoxicity in cultured rat liver cells, *J Toxicol Environ Health*, 41 (1994) 233-245.

[40] J.D. Park, Y. Liu, C.D. Klaassen, Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals(1), *Toxicology*, 163 (2001) 93-100.

[41] M. Sato, M.D. Apostolova, M. Hamaya, J. Yamaki, K.H. Choo, A.E. Michalska, N. Kodama, C. Tohyama, Susceptibility of metallothionein-null mice to paraquat, *Environ Toxicol Pharmacol*, 1 (1996) 221-225.

[42] J. Liu, Y. Liu, D. Hartley, C.D. Klaassen, S.E. Shehin-Johnson, A. Lucas, S.D. Cohen, Metallothionein-I/II knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity, *J Pharmacol Exp Ther*, 289 (1999) 580-586.

[43] S. Onosaka, M.G. Cherian, The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rats in response to metals. II. Influence of zinc status and specific effect on pancreatic metallothionein, *Toxicology*, 23 (1982) 11-20.

- [44] A. Santon, A. Formigari, V. Albergoni, P. Irato, Effect of Zn treatment on wild type and MT-null cell lines in relation to apoptotic and/or necrotic processes and on MT isoform gene expression, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763 (2006) 305-312.
- [45] N. Itoh, T. Kimura, H. Nakanishi, N. Muto, M. Kobayashi, I. Kitagawa, K. Tanaka, Metallothionein-independent hepatoprotection by zinc and sakuraso-saponin, *Toxicol Lett*, 93 (1997) 135-140.
- [46] Y. Liu, D.P. Hartley, J. Liu, Protection against carbon tetrachloride hepatotoxicity by oleanolic acid is not mediated through metallothionein, *Toxicol Lett*, 95 (1998) 77-85.
- [47] U.Y. Sanzgiri, V. Srivatsan, S. Muralidhara, C.E. Dallas, J.V. Bruckner, Uptake, distribution, and elimination of carbon tetrachloride in rat tissues following inhalation and ingestion exposures, *Toxicol Appl Pharmacol*, 143 (1997) 120-129.
- [48] F.W. Wong, W.Y. Chan, S.S. Lee, Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression, *Toxicol Appl Pharmacol*, 153 (1998) 109-118.
- [49] A. Sapone, A. Affatato, D. Canistro, M. Broccoli, S. Trespidi, L. Pozzetti, G.L. Biagi, G. Cantelli-Forti, M. Paolini, Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice, *Mutat Res*, 527 (2003) 67-80.
- [50] J.M. Starkey, Y. Zhao, R.G. Sadygov, S.J. Haidacher, W.S. Lejeune, N. Dey, B.A. Luxon, M.A. Kane, J.L. Napoli, L. Denner, R.G. Tilton, Altered retinoic acid metabolism in diabetic mouse kidney identified by O isotopic labeling and 2D mass spectrometry, *PLoS One*, 5 (2010) e11095.
- [51] M.R. Khan, W. Rizvi, G.N. Khan, R.A. Khan, S. Shaheen, Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: protective role of *Digera muricata*, *J Ethnopharmacol*, 122 (2009) 91-99.
- [52] R.A. Khan, M.R. Khan, S. Sahreen, J. Bokhari, Prevention of CCl₄-induced nephrotoxicity with *Sonchus asper* in rat, *Food Chem Toxicol*, 48 (2010) 2469-2476.
- [53] S.A. Sheweita, M. Abd El-Gabar, M. Bastawy, Carbon tetrachloride-induced changes in the activity of phase II drug-metabolizing enzyme in the liver of male rats: role of antioxidants, *Toxicology*, 165 (2001) 217-224.
- [54] V.I. Lushchak, Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions, *J Amino Acids*, 2012 (2012) 736837.
- [55] L. Knockaert, A. Berson, C. Ribault, P.E. Prost, A. Fautrel, J. Pajaud, S. Lepage, C. Lucas-Clerc, J.M. Begue, B. Fromenty, M.A. Robin, Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver, *Lab Invest*, 92 (2012) 396-410.
- [56] W.H. Heijne, A.L. Slitt, P.J. van Bladeren, J.P. Groten, C.D. Klaassen, R.H. Stierum, B. van Ommen, Bromobenzene-induced hepatotoxicity at the transcriptome level, *Toxicol Sci*, 79 (2004) 411-422.
- [57] N.E. Miller, D. Thomas, R.E. Billings, Bromobenzene metabolism in vivo and in vitro.

The mechanism of 4-bromocatechol formation, *Drug Metab Dispos*, 18 (1990) 304-308.

[58] A.F. Casini, A. Pompella, M. Comporti, Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene, and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis, *Am J Pathol*, 118 (1985) 225-237.

[59] S.S. Lau, T.J. Monks, The contribution of bromobenzene to our current understanding of chemically-induced toxicities, *Life Sci*, 42 (1988) 1259-1269.

[60] T.J. Monks, J.A. Hinson, J.R. Gillette, Bromobenzene and p-bromophenol toxicity and covalent binding in vivo, *Life Sci*, 30 (1982) 841-848.

[61] M. Comporti, Three models of free radical-induced cell injury, *Chem Biol Interact*, 72 (1989) 1-56.

[62] S.J. Locke, M. Brauer, The response of the rat liver in situ to bromobenzene--in vivo proton magnetic resonance imaging and ³¹P magnetic resonance spectroscopy studies, *Toxicol Appl Pharmacol*, 110 (1991) 416-428.

[63] B.H. Wang, K.A. Zuzel, K. Rahman, D. Billington, Protective effects of aged garlic extract against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices, *Toxicology*, 126 (1998) 213-222.

[64] A. Benedetti, A. Pompella, R. Fulceri, A. Romani, M. Comporti, 4-Hydroxynonenal and other aldehydes produced in the liver in vivo after bromobenzene intoxication, *Toxicol Pathol*, 14 (1986) 457-461.

[65] A.F. Casini, E. Maellaro, A. Pompella, M. Ferrali, M. Comporti, Lipid peroxidation, protein thiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver damage, *Biochem Pharmacol*, 36 (1987) 3689-3695.

[66] A.F. Casini, E. Maellaro, A. Pompella, M. Ferrali, M. Comporti, Lipid peroxidation, protein thiols and calcium homeostasis in bromobenzene-induced liver damage, *Basic Life Sci*, 49 (1988) 773-776.

[67] C. Madhu, C.D. Klaassen, Bromobenzene-glutathione excretion into bile reflects toxic activation of bromobenzene in rats, *Toxicol Lett*, 60 (1992) 227-236.

[68] D.E. Slaughter, R.P. Hanzlik, Identification of epoxide- and quinone-derived bromobenzene adducts to protein sulfur nucleophiles, *Chem Res Toxicol*, 4 (1991) 349-359.

[69] R.B. Bambal, R.P. Hanzlik, Bromobenzene 3,4-oxide alkylates histidine and lysine side chains of rat liver proteins in vivo, *Chem Res Toxicol*, 8 (1995) 729-735.

[70] S.S. Lau, T.J. Monks, J.R. Gillette, Identification of 2-bromohydroquinone as a metabolite of bromobenzene and o-bromophenol: implications for bromobenzene-induced nephrotoxicity, *J Pharmacol Exp Ther*, 230 (1984) 360-366.

[71] S.S. Lau, T.J. Monks, K.E. Greene, J.R. Gillette, The role of ortho-bromophenol in the nephrotoxicity of bromobenzene in rats, *Toxicol Appl Pharmacol*, 72 (1984) 539-549.

[72] G.F. Rush, J.H. Smith, J.F. Newton, J.B. Hook, Chemically induced nephrotoxicity: role of metabolic activation, *Crit Rev Toxicol*, 13 (1984) 99-160.

[73] W. Bursch, R. Schulte-Hermann, Cytoprotective effect of the prostacyclin derivative iloprost against liver cell death induced by the hepatotoxins carbon tetrachloride and

- bromobenzene, *Klin Wochenschr*, 64 Suppl 7 (1986) 47-50.
- [74] A.S. El-Sharaky, A.A. Newairy, M.A. Kamel, S.M. Eweda, Protective effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats, *Food Chem Toxicol*, 47 (2009) 1584-1590.
- [75] B.H. Wang, K.A. Zuzel, K. Rahman, D. Billington, Treatment with aged garlic extract protects against bromobenzene toxicity to precision cut rat liver slices, *Toxicology*, 132 (1999) 215-225.
- [76] E. Maellaro, A.F. Casini, B. Del Bello, M. Comporti, Lipid peroxidation and antioxidant systems in the liver injury produced by glutathione depleting agents, *Biochem Pharmacol*, 39 (1990) 1513-1521.
- [77] D.A. McMillan, R.C. Schnell, Amelioration of bromobenzene hepatotoxicity in the male rat by zinc, *Fundam Appl Toxicol*, 5 (1985) 297-304.
- [78] N.J. Waters, C.J. Waterfield, R.D. Farrant, E. Holmes, J.K. Nicholson, Integrated metabolomic analysis of bromobenzene-induced hepatotoxicity: novel induction of 5-oxoprolinosis, *J Proteome Res*, 5 (2006) 1448-1459.
- [79] N. Matsunaga, N. Nakamura, N. Yoneda, T. Qin, H. Terazono, H. To, S. Higuchi, S. Ohdo, Influence of feeding schedule on 24-h rhythm of hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 311 (2004) 594-600.
- [80] P. Chen, C. Li, W. Pang, Y. Zhao, W. Dong, S. Wang, J. Zhang, The protective role of Per2 against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, *Am J Pathol*, 174 (2009) 63-70.
- [81] D.J. Tierney, A.L. Haas, D.R. Koop, Degradation of cytochrome P450 2E1: selective loss after labilization of the enzyme, *Arch Biochem Biophys*, 293 (1992) 9-16.
- [82] Y. Dai, A.I. Cederbaum, Inactivation and degradation of human cytochrome P4502E1 by CCl₄ in a transfected HepG2 cell line, *J Pharmacol Exp Ther*, 275 (1995) 1614-1622.
- [83] G. Ekstrom, C. von Bahr, M. Ingelman-Sundberg, Human liver microsomal cytochrome P-450IIE1. Immunological evaluation of its contribution to microsomal ethanol oxidation, carbon tetrachloride reduction and NADPH oxidase activity, *Biochem Pharmacol*, 38 (1989) 689-693.
- [84] J.F. Brady, F. Xiao, M.H. Wang, Y. Li, S.M. Ning, J.M. Gapac, C.S. Yang, Effects of disulfiram on hepatic P450IIE1, other microsomal enzymes, and hepatotoxicity in rats, *Toxicol Appl Pharmacol*, 108 (1991) 366-373.
- [85] F.P. Guengerich, D.H. Kim, M. Iwasaki, Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects, *Chem Res Toxicol*, 4 (1991) 168-179.
- [86] G.J. Huang, J.S. Deng, S.S. Huang, C.Y. Lee, W.C. Hou, S.Y. Wang, P.J. Sung, Y.H. Kuo, Hepatoprotective effects of eburicoic acid and dehydroeburicoic acid from *Antrodia camphorata* in a mouse model of acute hepatic injury, *Food Chem*, 141 (2013) 3020-3027.
- [87] R.O. Recknagel, E.A. Glende, Jr., J.A. Dolak, R.L. Waller, Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity, *Pharmacol Ther*, 43 (1989) 139-154.
- [88] M.K. Manibusan, M. Odin, D.A. Eastmond, Postulated carbon tetrachloride mode of

- action: a review, *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 25 (2007) 185-209.
- [89] G.A. Nasir, S. Mohsin, M. Khan, S. Shams, G. Ali, S.N. Khan, S. Riazuddin, Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice, *J Transl Med*, 11 (2013) 78.
- [90] H. Shi, X. Liu, G. Tang, H. Liu, Y. Zhang, B. Zhang, X. Zhao, W. Wang, Ethanol extract of *Portulaca Oleracea* L. reduced the carbon tetrachloride induced liver injury in mice involving enhancement of NF-kappaB activity, *Am J Transl Res*, 6 (2014) 746-755.
- [91] G.R. Mundy, T.A. Guise, Hormonal control of calcium homeostasis, *Clin Chem*, 45 (1999) 1347-1352.

謝辞

本研究の推進にあたり、終始ご懇親なる御指導、御鞭撻を賜りました神戸学院大学
栄養学部公衆衛生・衛生学部門 小野坂敏見教授に謹んで深甚なる謝意を表します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました神戸学院大学薬学部社会薬学部
門 山崎裕康教授、同薬学部生命薬学部部門 河合裕一教授、同栄養学部給食経営管
理学部門 戸谷永生教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、有益な御助言、御協力を頂いた、金城学院大学薬学部 野々
垣常正教授、福石信之教授、島根大学医学部医学科薬理学講座 臼田春樹助教に深謝
いたします。