

予 備 審 査 の 学 位 論 文 の 要 旨

（ 又 は ， 学 位 論 文 の 要 旨 ）

No.....

論文題名	
急性肝障害とその生体防御に関する研究	
氏 名 吉岡 弘毅	学籍番号若しくは 金城学院大学 薬学部 所 属 機 関 名 神戸学院大学 研究員
主 論 文	
<p>1. H. Yoshioka, H. Usuda, T. Nonogaki, S. Onosaka, Carbon tetrachloride-induced lethality in mouse is prevented by multiple pretreatment with zinc sulfate, <i>J Toxicol Sci</i>, 41 (2016) 55-63.</p> <p>2. H. Yoshioka, H. Usuda, N. Fukuishi, T. Nonogaki, S. Onosaka, Carbon Tetrachloride-Induced Nephrotoxicity in Mice Is Prevented by Pretreatment with Zinc Sulfate, <i>Biol Pharm Bull</i>, 39 (2016) 1042-1046.</p> <p>3. H. Yoshioka, S. Onosaka, Zinc sulfate pretreatment prevents carbon tetrachloride-induced lethal toxicity through metallothionein-mediated suppression of lipid peroxidation in mice, <i>Fundam Toxicol Sci</i>, 3 (2016) 151-156.</p> <p>4. H. Yoshioka, S. Fukaya, N. Fukuishi, A. Nagatsu, T. Nonogaki, S. Onosaka, Bromobenzene-induced lethal toxicity in mouse is prevented by pretreatment with zinc sulfate, <i>Chem Biol Interact</i>, 254 (2016) 117-123.</p> <p>5. H. Yoshioka, T. Nonogaki, N. Fukuishi, S. Onosaka, Calcium-deficient diet attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice through suppression of lipid peroxidation and inflammatory response, <i>Heliyon</i>, 2 (2016) e00126.</p>	
本学位論文は 4 章から構成し、第 1 章は主論文 1、第 2 章は主論文 2 および 3、第 3 章は主論文 4、第 4 章は主論文 5 で述べた。	

要 旨

肝臓は、物質代謝や解毒において、それぞれ重要な役割を果たしている [1]。それ故、肝臓は、化学物質の毒性が最初に顕れやすい臓器である。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。医薬品の服用は我々が生活するうえで、いまや欠かせないものとなっており、平均寿命の伸長に貢献していることは疑う余地はない。その一方で、医薬品の服用により、肝臓に障害を引き起こし、場合によっては死亡する事例も報告されている [2]。しかし、定期的な肝機能検査や食欲不振などに注意をする程度に留まっており、根本的な予防法や治療法は確立されていない。このことから、致死を引き起こす薬物性肝障害に対する研究を行うことは重要と考えられる。

四塩化炭素 (CCl_4) は種々の動物で肝臓に重篤な障害を起こす。その病態がヒトの肝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 [3]。また、 CCl_4 は肝障害を引き起こすことが広く知られている一方で、腎臓・脳・生殖器などにも毒性を示すことが明らかとなっている [4, 5]。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、これらが脂質過酸化、グルタチオンと結合し、その結果、毒性発現が惹起されることが提唱されている [6]。 CCl_4 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いる。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、肝障害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 [7, 8]。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防御の研究は、ほとんど見られない。 CCl_4 は肝障害モデル化合物であることから、モデル化合物による致死毒性に対する防御機構の研究を行うことで、実際の薬物性肝障害に応用できると考えた。そこで、本論文では致死を引き起こす高濃度の CCl_4 に対する毒性防御機構を検討すると共に、肝障害を引き起こす因子とその機構の探索を行った。

第 1 章では、致死を引き起こす投与量を探索すると同時に、致死作用を抑制する化合物の探索を行った。まず、致死を引き起こす投与量を探索することを目的に、1-16 g/kg の用量で、経口・腹腔内・皮下投与の 3 種類の投与経路による CCl_4 致死毒性を検討した。使用した動物として、8 週齢の ddY 雄性マウスを用いた。24 時間後における死亡率を投与経路による違いを比較すると、皮下投与では検討した濃度域ではマウスの死亡が認められなかった。経口投与では 16 g/kg でのみ 6 割のマウスが死亡した。腹腔内投与では 4 g/kg の投与量で 8 割の死亡が認められ、8 g/kg 以上の投与量ではすべてのマウスの死亡が確認された。この結果から、4 g/kg の用量を

腹腔内投与することで CCl_4 致死毒性を検討することとした。次に、 CCl_4 を投与する 24 時間前に亜鉛またはカドミウムを前投与した際の致死毒性を検討した。その結果、 CCl_4 単独投与と比較すると、改善傾向は認められたが、完全な致死毒性抑制効果は認められなかった。そこで、亜鉛の前投与を CCl_4 投与 3 日前から 24 時間ごとに 3 回前投与すると、 CCl_4 投与 24 時間後の致死は完全に抑制された。

第 2 章では亜鉛の前投与における CCl_4 致死毒性抑制の作用機構の解明を肝臓と腎臓での臓器ごとによる影響を検討した。まず、肝臓においては肝障害の指標となる血漿中の ALT 及び AST の値は CCl_4 によって上昇するが、亜鉛の前投与でそれぞれ有意な減少が認められた。次に、酸化ストレスの指標として、チオバルビツール酸 (TBA) 反応を用いて、肝臓中の脂質過酸化を測定したところ、血漿中の ALT や AST と同様の推移を示した。さらに生化学的解析と並行して組織学的解析を行った結果、 CCl_4 投与によってクロマチンの凝縮・核消失・好酸球・グリコーゲン消失などが認められたが、それらが亜鉛前投与によって正常状態レベル付近にまで回復した。また、亜鉛の前投与によって肝臓中の抗酸化力が増加し、その中でメタロチオネイン (MT) の有意な上昇が認められた。MT はラジカルスカベンジャー能を有しており、その作用は生体内抗酸化物質として知られているグルタチオンより 300 倍以上強いことが報告されている [9]。また、亜鉛前投与によって増加した MT が CCl_4 によって 40 % 以上減少した。このことから、MT が肝臓における CCl_4 毒性を抑制していることが示唆された。

さらに、腎臓においても同様に検討したところ、 CCl_4 によって増加した血漿中のクレアチニンおよび尿素窒素、腎臓中の脂質過酸化が亜鉛の前投与で減少した。また、肝臓と同様に腎臓においても亜鉛前投与で MT に起因した抗酸化力の増加が認められ、さらに亜鉛前投与によって増加した MT が CCl_4 によって 70 % 以上減少した。このことから、肝臓・腎臓の両臓器における CCl_4 の毒性抑制機構として、MT が関与していることは明らかである。また、腎臓においても組織学的検討を実施したが、その傷害部位は近位尿細管に限局されており、肝臓と比較すると傷害の度合いは小さかった。

第 3 章では、 CCl_4 以外の肝障害惹起化合物であるブロモベンゼン (BB) でも同様の結果が得られるか検討した。8 週齢の ddY 系雄性マウス 12 匹に対して、1.2 g/kg の用量の BB を腹腔内投与すると、投与 24 時間で 7 匹のマウスの死亡が確認された。また、48 時間後で 11 匹のマウスが死亡した。その一方で、亜鉛を前投与すると、72 時間で 1 匹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。

次に BB 投与 18 時間後における肝臓への障害に対する亜鉛の効果を検証した。血漿中の ALT 及び AST の値は BB 投与によって有意に上昇するが、亜鉛の前投与ではそれぞれ正常値に限り

なく近い値であった。次に、肝臓中の脂質過酸化を測定したところ、血漿中の ALT や AST と同様の推移を示した。さらに生化学的解析と並行して組織学的解析を行った結果、BB 投与によって中心静脈付近に広範囲の壊死が認められたが、それらは亜鉛前投与によって正常状態レベルであった。また、亜鉛の前投与によって肝臓中の抗酸化力が増加し、その中で MT の有意な上昇が認められ、その MT は BB 投与によって有意に減少した。さらに、腎臓においても同様に検討したところ、BB によって増加した腎障害が亜鉛の前投与で軽減することを明らかとした。このことから、肝臓・腎臓の両臓器において、亜鉛前投与が BB の毒性を抑制し、その抑制機構として MT の関与が示唆された。

第 4 章では、肝障害に関与する因子としてカルシウムに着目し、 CCl_4 毒性発現にカルシウムが関与するか否か検討した。そこで、4 週齢の雄性 ddY マウスにカルシウム欠乏食を 4 週間給餌した。カルシウム欠乏食は AIN-93 を基準に作成し、自由摂食下で飼育をした。また、2 週間ごとに血漿中のカルシウム濃度を測定した。その結果、給餌開始の 2 週間で早くもカルシウムの低下が認められ、給餌 4 週間では約 30 % の血漿カルシウム濃度の低下が認められた。その一方で、体重や肝機能および腎機能に影響は認められなかった。この条件下で 2 g/kg の用量（非致死量）の CCl_4 を腹腔内投与したところ、投与 6 時間及び 24 時間後において、通常食のマウスと比較して、血漿中の ALT および AST の有意な減少が確認された。また、血漿中のクレアチニンおよび尿素窒素においては 2 群間で差は確認されなかった。肝臓において、TBA 反応によって脂質過酸化を測定したところ、カルシウム欠乏食では脂質過酸化の亢進は認められるものの、その程度は通常食のマウスより低いことが確認された。さらに、組織学的検討でも、生化学的検討を反映した結果が得られた。すなわち、通常食のマウスよりもカルシウム欠乏食のマウスは肝傷害が軽度であった。そして、カルシウム欠乏食による毒性軽減の作用点を明らかにすることを目的に *CYP2E1* の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法で検討した。その結果、 CCl_4 によって *CYP2E1* の mRNA 発現レベルの減少は認められるが、そのレベルは両群で同等であった。このことから、低カルシウム血症による CCl_4 肝障害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可能性が考えられた。

これまで、 CCl_4 を含めた肝障害を引き起こす化合物において、肝臓中の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 [10]。しかしながら、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初めて見出した。カルシウムは医薬品や健康食品等で広く使用されている。本研究では、それらを過剰に摂取すると肝障害の作用増強を示唆するものである。今後、実際の薬物性肝障害を引き起こす薬物とカルシウムの関与を網羅的に検討していくことで、薬物の副作用の軽減に繋がると考えられる。また、肝臓特異的にカルシウ

ムを阻害するような薬物を開発することが出来れば、肝障害に対する特効薬となりうることが期待できる。そして、これらの作用機序が普遍的であれば、肝障害だけでなく、他臓器による障害に対しても応用可能な万能薬になりうる可能性も秘めている。今後、これらの研究が進むことを期待したい。

文 献

1. 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.
2. 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.
3. R.O. Recknagel, Carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Pharmacol Rev*, 19 (1967) 145-208.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. D.H. Hamer, Metallothionein, *Annu Rev Biochem*, 55 (1986) 913-951.
10. F.A. Schanne, A.B. Kane, E.E. Young, J.L. Farber, Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway, *Science*, 206 (1979) 700-702.