The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラットにおける甲状腺腫瘍の発生機序における薬物代謝酵素の誘導と排出型トランスポーターの役割に関する研究 ： 抗てんかん薬クロバザムを用いた検討
Author(s)	宮脇, 出
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61692
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博 士 論 文

題 名：ラットにおける甲状腺腫瘍の発生機序における薬物代謝酵素の誘導と排出型トランスポーターの役割に関する研究—抗てんかん薬クロバザムを用いた検討

学位申請者　　宮脇　出

目次

第 1 章　緒論 3
第 2 章　クロバザムの短期投与によるラット甲状腺過形成モデルの作製とその妥当性の確認 7
第 1 節　緒言 7
第 2 節　甲状腺重量および甲状腺濾胞上皮の過形成を指標とした場合のクロバザムの投与期間との関係について 7
材料および方法 8
結果 10
第 3 節　甲状腺濾胞細胞過形成の機序検討(クロバザムの直接作用について) 13
材料および方法 13
結果 15
第 4 節　甲状腺濾胞細胞過形成の機序検討(間接作用について) 16
材料および方法 16
結果 18
第 5 節　考察および小括 20
第 3 章　クロバザムの肝臓に及ぼす影響について 22
第 1 節　緒言 22
第 2 節　クロバザム投与による肝臓の病理組織学的変化および代謝酵素関連遺伝子の発現変動について 22
材料および方法 22
結果 27
第 3 節　クロバザム投与の acute phase および sub-chronic phase における肝細胞の増殖およびアポトーシスに関する検討 31
材料および方法 31
結果 33
第 4 節　考察および小括 36
第 4 章　肝臓中トランスポーターの発現への影響 39
第 1 節　緒言 39
第 2 節　肝臓の甲状腺ホルモン取り込みおよび排出に関わるトランスポーターの発現 39
材料および方法 39
結果 42
第 3 節　考察および小括 44
第 5 章　UGT および MRP2 のラット甲状腺腫瘍への直接的な寄与に関する検討 45
第 1 節　緒言 45

第 2 節　遺伝子欠損動物(Gunn および EHBR ラット)を用いた検討 45
材料および方法 45
結果 48
第 3 節　考察および小括 54
第 6 章　総合考察および結論 55
謝辞 58
参考文献 59

第 1 章　緒論

医薬品開発において、臨床投与期間として 6 か月以上の使用が予定される場合にはげっ歯類 2 種、おもにラットとマウスでの 2 年間のがん原性試験が必要とされている。その中でもラットの甲状腺がんは比較的多く認められ、その多くは甲状腺の濾胞型のがんである。一方、ヒトにおける甲状腺がんは、その病理組織型から乳頭型、濾胞型、未分化型、がん髄様型と大きく 4 つに分けられ、その多くは乳頭型で全体の 70%以上を占め、濾胞型の発生頻度は 10%程度と少ない [1)]。ヒトにおける甲状腺がんは全体的に罹患率や死亡率が低く、5 年生存率も高い予後の良好な悪性腫瘍であるため、他の胃がんや大腸がんといったがん種に比べて臨床および非臨床の研究は少ない。発生原因についても唯一長崎大学　光武らのグループがいくつかの遺伝子変異との関連を報告しているものの [2)]、それ以外では放射性ヨウ素の暴露が知られている程度で、医薬品のみならず環境物質等どのような物質が原因になるかについては現在まで良くわかっていない。
このようにヒトでの甲状腺がんの発生メカニズムが明確になっていないことから、動物の発がん性試験で甲状腺の増殖性病変が現れた場合、たとえそれががんに至らない良性腫瘍(adenoma)であったとしても、ヒトへの安全性に関する考察が十分でない場合には認可が下りず、有望な新薬の創出機会を逸する原因ともなる。

現在までのげっ歯類の甲状腺発がん(良性腫瘍含む)における先行研究では、遺伝毒性(変異原性や染色体異常、DNA 損傷等)によらないメカニズムとして、図 1 のごとく甲状腺への直接作用と間接作用が知られている。直接作用としては過塩素酸塩(ClO_4^-)やチオシアネートで知られるような甲状腺ホルモン合成のためのヨウ素取り込み阻害やプロピルチオウラシル(PTU)で知られるような取り込んだヨウ素の有機化阻害が知られている [3)]。一方、フェノバルビタールに代表されるように甲状腺ホルモンの代謝・排泄を促進することで二次的に甲状腺がんが形成されることも知られている [3)]。このようなラットにおける甲状腺発がんにおいては、アミオダロン等発がん無作用量(NOEL)とヒトの臨床用量との間の安全係数が 10 倍以内と大きな乖離が無いにもかかわらず、ヒトでの発がん性は問題になっていない(表 1)。このことは甲状腺発がんのプロセスにおいてヒトとラットで明確な種差が存在することを示唆している。種差に関する研究には、上記直接作用および間接作用いずれにも関わるものとして、視床下部-下垂体-甲状腺系(HPT 系)の機能や制御の差に焦点が当たっている。しかしながら HPT 系のヒトとラットの間に質的な差異はなく、末梢血中の甲状腺ホルモン濃度をセンサーとしたフィードバック機構における感受性の差が最も有力な原因と考えられている [4)]。その感受性の差の主たる原因として、ラットにはヒトが有する甲状腺ホルモン結合タンパク(TBG；thyroxine-binding globulin)が存在しないことから、血中の甲状腺ホルモンの半減期がヒトに比べ短く [5)](ヒト 5–9 日 vs. ラット 0.5–1 日)、HPT 系のフィードバック機構が回転しやすいためと報告されている [6)]。その一方で薬剤による血中甲状腺ホルモンが減少しやすい原因としては、その代謝や排泄の増加、中でも代謝ではグルクロン酸抱合酵素(UGT：UDP-glucuronosyltransferase)がその中心的な役割を果たすと考えられているものの [4)]、

UGT の分子種あるいは排泄に関わるトランスポーターに関する報告は乏しい。

本研究は代表的な非遺伝毒性発がん物質である抗てんかん薬クロバザムを用いてラットの甲状腺の代謝排泄にかかわる酵素やトランスポーターに注目することで、非遺伝毒性性甲状腺腫瘍形成への重要な因子を明らかにし、ヒトとの種差を明確にする上で重要な知見を得ることを目的とした。

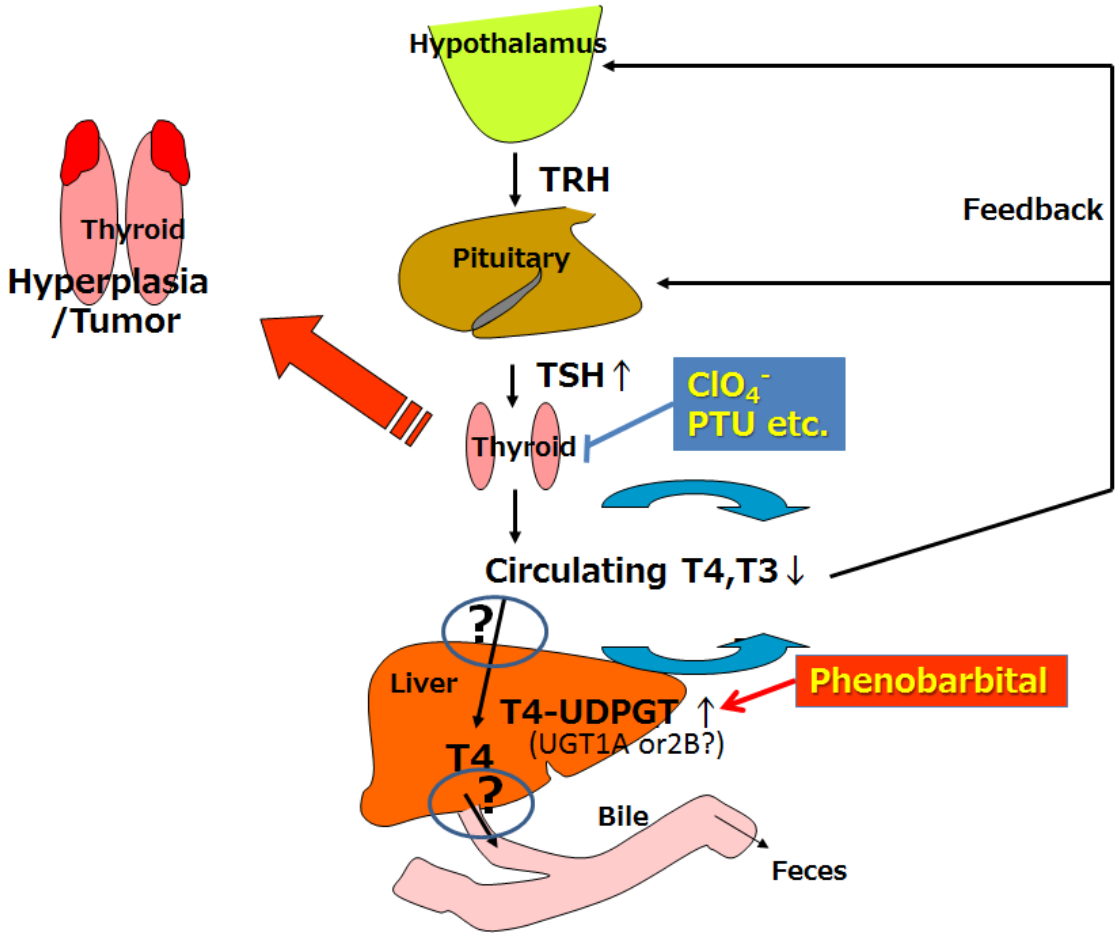

図 1　今までに知られているげっ歯類の甲状腺腫瘍発生機序(先行研究)

表 1 クロバザムおよび市販薬におけるラット甲状腺がん(濾胞細胞腺腫)発生とヒト臨床用量との比較

薬物名	薬効	作用	発癌用量 (mg/kg)	発癌NOEL (mg/kg)	ヒト臨床量 (mg/kg)	安全係数
Amiodarone	抗不整脈薬	Kチャネル遮断薬	5	< 5	4	< 1
Bepridil	降圧薬	カルシウム拮抗	100	< 100	4	< 25
Cadralazine	血管拡張薬	血管平滑筋弛緩作用	150	50	0.4	125
Fluvastatine	高脂血症	HMG-CoA還元酵素阻害	18-24	9	0.8	11
Nicadipine	降圧薬	カルシウム拮抗	45	15	1.2	13
Sertraline	抗うつ薬	SSRI	< 40	< 40	4	< 10
Simvastatin	高脂血症	HMG-CoA還元酵素阻害	25	5	0.2	25
Vesnarinone	強心薬	PDE3阻害薬	50	< 50	2.4	< 21
Clobazam	抗てんかん薬	ベンゾジアゼピン受容体作動薬	100	20	0.8	25
Brotizolam	睡眠薬	ベンゾジアゼピン受容体作動薬	200	10	0.005	2000

クロバザムについて

クロバザムはドイツのヘキスト社によって 1989 年に創出され、抗てんかん薬として広く利用されている。従来のベンゾジアゼピン系抗てんかん薬は複素環 1，4 位に窒素原子を持つのに対し，クロバザムは 1，5 位に窒素原子を有する(図 2)。クロバザムは，他のベンゾジアゼピン系薬剤と同様にベンゾジアゼピン受容体へ結合し，大脳辺縁系におけるガンマアミノ酪酸(GABA)ニューロンの働きを増強することによって抗てんかん作用を発現する(大日本住友製薬(株)社内資料)。

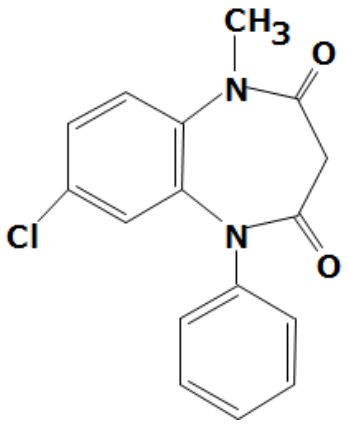

図 2　Chemical structure of clobazam

7-chloro-1-methyl-5-phenyl-1*H*-1, 5-benzodiazepine-2,4 (3*H*,5*H*)-dione

クロバザムの遺伝毒性試験

ネズミチフス菌 TA100, TA1537, TA98, TA1537 株および大腸菌 WP2uvrA 菌株を用いた復帰突然変異試験において、クロバザムは最大 5000 μg/plate まで復帰変異コロニーの増加を認めず、クロバザムの細菌における変異原性は陰性と判断されている。またチャイニーズハムスター肺由来細胞(CHL)を用いた染色体異常試験において、クロバザムは 3.00 mg/mL 濃度まで染色体異常細胞の出現頻度は低く、染色体異常誘発性は陰性と判断されている。さらに Crj:BDF1 雄マウスにクロバザムの最大 500 mg/kg まで単回投与した結果、骨髄中、小核を有する赤血球の出現頻度は低く、クロバザムの小核誘発性は陰性と判断されている(大日本住友製薬(株)社内資料)。

以上の結果から、クロバザムに遺伝毒性ポテンシャルはないと考えられる。

がん原性試験について

がん原性試験は、げっ歯類(ラットおよびマウス)に医薬品を 2 年間にわたり生涯曝露させ、全臓器について病理組織学的検査により腫瘍性病変の種類、数および程度等を評価し、候補医薬品が生体に発がんをもたらす作用を有するのか否かを判断する試験である。WHO からは下記の 4 つの基準が提案されている [7]。

① 対照群にみられない腫瘍の発生があった場合
② 対照群にもみられる腫瘍が被験物質投与群でより高率に発生した場合
③ 対照群に比べてより多種類の器官・組織に腫瘍が発生した場合
④ 対照群と被験物質投与群との間で腫瘍発生率に差はないが，被験物質投与群における腫瘍の発生が対照群と比して，より早期にみられた場合

本研究に用いるクロバザムのがん原性試験の結果は表 2 のとおりである。

Sprague-Dawley (SD)系ラットにクロバザムを最大 100 mg/kg まで 104 週間混餌投与し病理組織学的に腫瘍の発生を基に発がん性を評価している。その結果、腫瘍性変化としては 100 mg/kg 投与群の雄に甲状腺の良性腫瘍である濾胞細胞腺腫の発生率の有意な上昇をみとめ、クロバザムは発がん性ありと判断されている(大日本住友製薬(株)社内資料)。

表 2 クロバザムのラット 104 週間がん原性試験における腫瘍発生例数

投与量 (mg/kg/日)	対照		4		20		**100**	
検査動物数	雄48	雌33	雄51	雌38	雄52	雌33	**雄49**	雌40
甲状腺濾胞細胞腺腫	3	0	2	1	4	0	**11***	3

*フィッシャーの直接確率検定(< 0.05)

(大日本住友製薬(株)社内資料より抜粋)

第 2 章　クロバザムの短期投与によるラット甲状腺過形成モデルの作製とその妥当性の確認

第 1 節　緒言

ラットの甲状腺腫瘍の発生メカニズムを検討するにあたり、まず実験的な甲状腺腫瘍モデルを作製する必要がある。これまでの報告からクロバザムの 100 mg/kg の 1 日 1 回　SD 系雄ラットへの 2 年間投与にて甲状腺濾胞腺腫が発生することが判明している。研究の目的から短期間投与で甲状腺腫瘍のメカニズムを検討できることが重要であり、そのためには腫瘍にかわる適切なエンドポイントの設定とそれに必要な投与期間を決定する必要がある。一般的に上皮発がん過程は多段階を経ることが多く、刺激を受けた細胞の選択的な増殖(過形成：hyperplasia)、腫瘍(adenoma)へと続く。さらに一部変異細胞の増殖が続くと異型細胞の集団 (悪性腫瘍：carcinoma) へ進展することが知られている [8)]。そこで本検討では甲状腺濾胞腺腫の発生メカニズムからその初期段階である過形成(hyperplasia)あるいは肥大(hypertrophy)をエンドポイントとすることとした。また一般的に甲状腺重量の変化も腫瘍性病変における感度の良い指標であることから、甲状腺重量の変化も併せて検討した。さらに甲状腺の代謝排泄にかかわる酵素やトランスポーターに注目し研究するためには、クロバザムによる甲状腺腫瘍発生メカニズムが甲状腺への直接作用ではなく甲状腺ホルモンのクリアランス亢進による間接作用によることを示す必要がある。本章ではこれらの点を実験的に検証することで短期甲状腺腫瘍モデル（甲状腺過形成モデル）としての妥当性を評価した。

第 2 節　甲状腺重量および甲状腺濾胞上皮の過形成を指標とした場合のクロバザムの投与期間との関係について

本検討に際し、用いるクロバザムの投与量について一般毒性試験情報(大日本住友製薬(株)社内資料)を参考にした。クロバザムの投与量 0 (媒体)、100、400 および 1000 mg/kg を雄ラットに 1 日 1 回 4 週間にわたり経口投与した結果、100 mg/kg では肝臓や甲状腺に変化はなく、400 mg/kg 以上の投与量で甲状腺の重量増加が起こることが報告されている。一方、1000 mg/kg では肝臓や甲状腺への影響に加え、毒性変化を示唆する体重や血液検査パラメータ（赤血球減少、網赤血球増加）、さらにはストレスを示唆する副腎重量の増加が確認された (表 3)。これらのことから、クロバザムの甲状腺過形成モデルを検討するには 400 mg/kg が適切であると考えて本研究に適用した。

表 3　クロバザムのラット 4 週間反復投与毒性試験概要

動物	SD系　ラット（雄）　5週齢（投与開始時）　N=10			
投与量 (mg/kg)	0 (媒体対象)	100	400	1000
肝臓変化	−	−	肥大	肥大
甲状腺変化	−	−	重量増加	重量増加
毒性変化	−	−	−	体重増加抑制 赤血球減少 網赤血球増加 副腎重量増加

−：異常なし

(大日本住友製薬(株)社内資料より抜粋)

材料および方法

1)　被験物質、投与方法および実験デザイン

クロバザム(ロット番号, 40N086；純度, 99.8%)は、Aventis Pharma.(Frankfurt, Germany)によって供給された。クロバザム投与液は最終濃度が 8%(w/v)となるように 2%バレイショデンプン水溶液を用いて懸濁し、5 mL/kg の容量で 1 日 1 回最大 4 週間、400 mg/kg の投与量で動物に強制経口投与した。対照群の動物には同様に 2%バレイショデンプン水溶液を与えた。実験デザインを図 3 に示す。

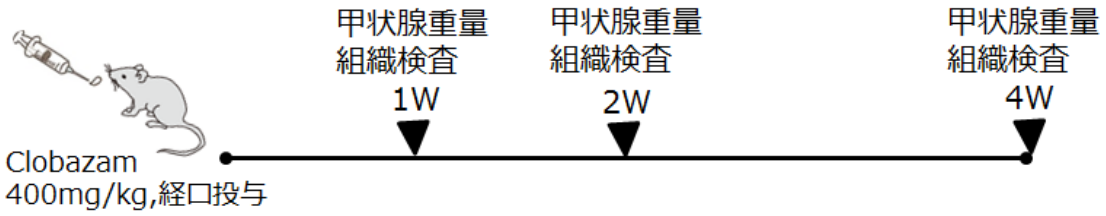

図 3 実験デザイン

2)　使用動物、飼育条件および群構成

動物の使用に関しては大日本住友製薬(株)の実験動物倫理委員会にて承認された。4 週齢の雄性 SD 系ラット(CLEA Japan Inc., Japan)を購入し、一週間の馴化後 5 週齢で実験に用いた。飼育環境条件は 12 時間照明(6 a.m.− 6 p.m.)サイクル、24°C ± 2°C の温度および 55%±10%の相対湿度でコントロールされた飼育室で、金網ケージにて個別飼育した。動物にはオートクレーブで滅菌した飼料 (CA-1; CLEA Japan Inc., Japan)および水道水を自由に与えた。

表 4　群構成

Groups	Number of animals		
	1week	2week	4week
Control	10	10	10
Clobazam 400 mg/kg	10	10	10

3)　甲状腺の重量測定

各投与期間(1, 2 および 4 週)投与後にラットをエーテル麻酔した後、放血致死させて速やかに甲状腺を摘出し、その重量(絶対重量)を電子天秤で測定した。さらに解剖日の体重を基に体重比の甲状腺重量(相対重量)を算出した。

4)　甲状腺の病理組織学的検査

重量測定後の甲状腺(両側)を 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン切片とした後にヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を施して光学顕微鏡下で観察した。

5)　統計処理

甲状腺重量については投与期間ごとに対照群とクロバザム群で 2 群間の分散の均一性を F 検定により行い、分散が均一の場合には Student の t 検定を、また分散が均一でない場合には Aspin-Welch 検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

結果

1) 甲状腺重量

結果を表 5 に示す。

甲状腺絶対重量は対照群およびクロバザム投与群いずれも投与期間に伴い増加し、クロバザム投与群では投与 2 週の段階で対照群に比較し有意な増加が認められた。一方、甲状腺相対重量(体重あたりの重量)は投与期間の延長に伴い対照群およびクロバザム投与群いずれも減少したが、投与 2 週の段階からクロバザム投与群は対照群に比較し有意な高値を示した。これらの対照群でもみられた投与期間に依存した絶対重量および相対重量の変化はラットの成長に伴った臓器重量と体重との関係性を示しており、一定の割合で臓器の成長(重量増加)は起こるが、体重の伸び率の方が臓器重量の成長よりも大きいことを意味していると考えられる。

表 5 クロバザム投与後の甲状腺重量

Treatment	Terminal body weights (g)	Thyroid weights	
		Absolute (mg)	Relative (mg /100 g BW)
1week			
Control	238.0±12.7	15.3±1.7	6.4±0.7
Clobazam 400 mg/kg	233.9±16.4	16.9±2.6	7.2±1.0
2week			
Control	299.9±18.1	15.0±2.2	5.0±0.6
Clobazam 400 mg/kg	296.5±16.5	19.5± 3.0**	6.6±1.2**
4week			
Control	403.9±27.3	19.4±1.8	4.8±0.4
Clobazam 400 mg/kg	394.7±28.1	23.8±3.0**	6.0±0.7**

Animals were weighed and necropsied on the day after completion of each treatment regime.

Data represent the mean ± SD of 10 rats per group.

Significantly different (**; $p<0.01$) from control at a given time point, based on Student's t-test.

2)　甲状腺の病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を表 6 および図 4 に示す。甲状腺の病理組織学的検査の結果、投与 1 週からクロバザム投与群では軽微な甲状腺濾胞上皮の過形成が確認された。本変化は投与期間の長さに応じた例数の増加および程度の増強が確認された。

表 6　クロバザムの投与期間の違いによる甲状腺の病理組織学的検査の結果

Findings	Test substance	Control			Clobazam 400 mg/kg		
	Treatment period	1week	2week	4week	1week	2week	4week
Thyroid gland							
Hyperplasia of follicular cells		0/10 [a)]	0 /10	0/10	5 /10	6/10	8 /10

Animals were necropsied on the day after completion of each treatment regime.　Specimens of the thyroid glands from each animal were stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic examination.

a: Number of animals with lesion per number of animals examined

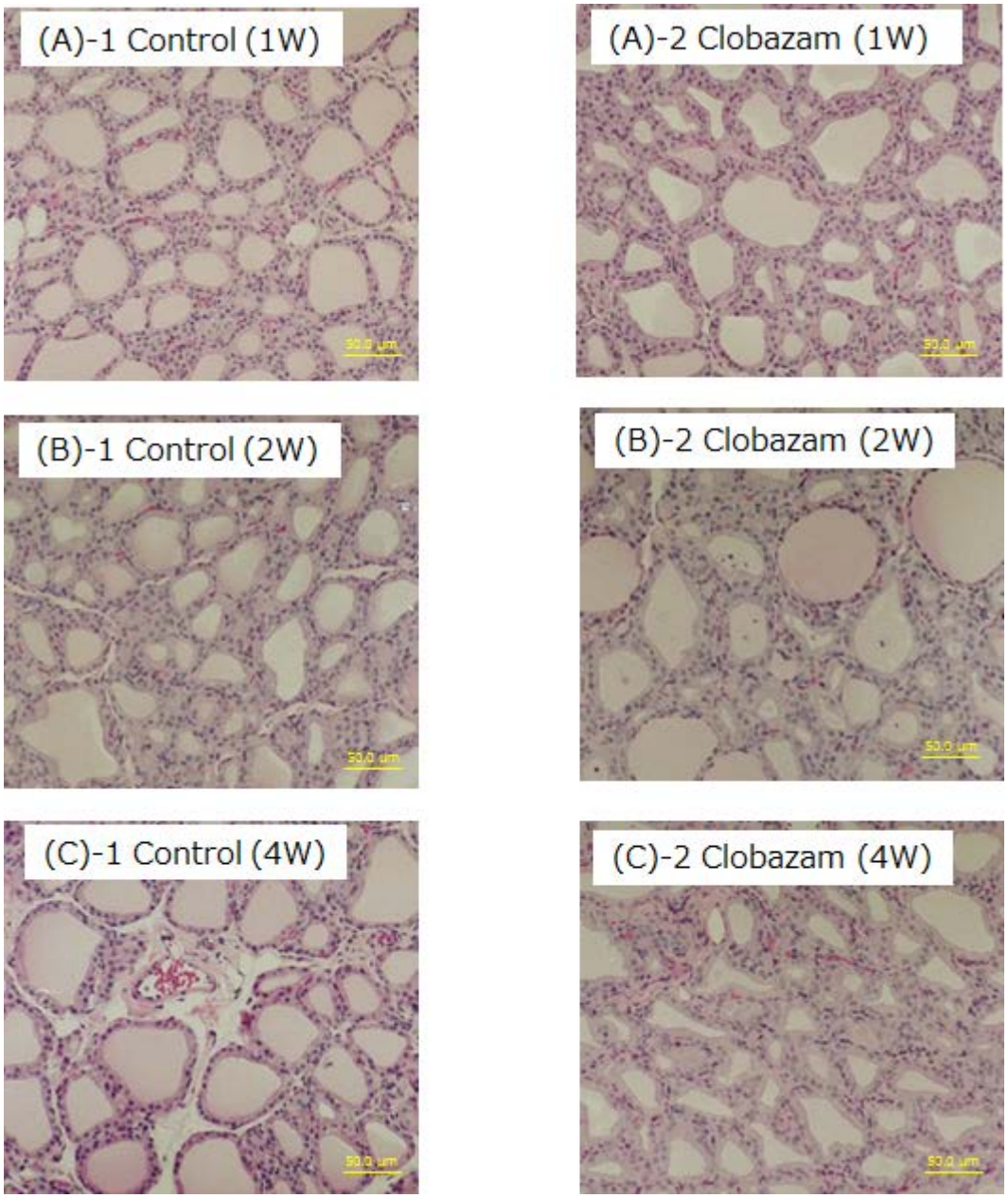

図 4 クロバザムの投与期間の違いによる甲状腺の形態変化(代表例の病理組織写真)

Photomicrographs of hematoxylin and eosin (HE) stained sections of thyroid from control (left; A-1, B-1, C-1) and clobazam-treated (right; A-2, B-2, C-2) rats (representative animal with the finding of each group).

The (A) indicates the photomicrographs from 1-week treatment rats (A-1 control, A-2 clobazam), (B) from 2-week treatment rats (B-1 control, B-2 clobazam), and (C) from 4-week treatment rats (C-1 control, C-2 clobazam). The yellow bar in the each photo is standard of length and indicates 50.0 micro-meters.

第 3 節　甲状腺濾胞細胞過形成の機序検討(クロバザムの直接作用について)

クロバザムが甲状腺に対して直接的に甲状腺ホルモンの合成過程に影響を与えているかを調べる目的で甲状腺における甲状腺ホルモンの生合成過程における、ヨードの取り込みおよびヨードの有機化に対する作用を検討した。

材料および方法

1)　被験物質、投与方法および試験デザイン

被験物質および投与方法については第 2 章第 2 節材料および方法 1)を参照。

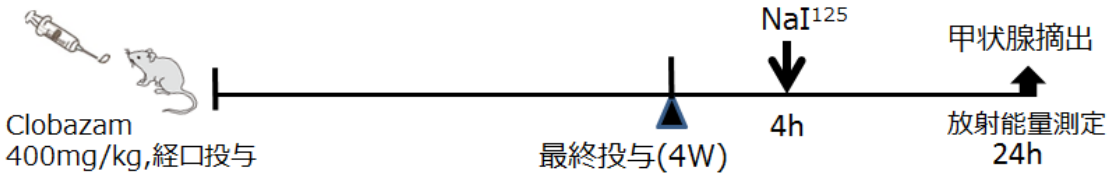

図 5　試験デザイン

2)　使用動物、飼育条件および群構成

使用動物および飼育条件については第 2 章第 2 節材料および方法 2)を参照。

表 7 群構成

Groups	Number of animals
	4week
Control	10
Clobazam 400 mg/kg	10

3)　甲状腺におけるヨードの取り込みおよび有機化の測定

28 日間の最終投与 4 時間後に生理食塩水にて 5 μCi/mL に希釈した $Na^{125}I$ を 2 mL/kg(10μCi/kg の用量で腹腔内へ投与し、その 20 時間後にラットをエーテル麻酔化で放血致死させ、甲状腺を摘出した。電子天秤にて湿重量を測定した後、放射能量を γ カウンター(Auto-Gamma® 5530 Gamma Couting System, Packard Instrumental Co.,Ltd., Japan：以下本文中の γ カウンターは同機器)で 1 分間測定した。次に甲状腺に 0.5 mL の冷 0.15M NaCl-1mM KI を加えて氷冷下でホモジナイズし、ホモジネート 0.1mL の放射能量を γ カウンターにて 1 分間測定した。

また、ホモジネートの一部を分取し、等量の 10w/v%TCA を添加後、十分に撹拌して遠心分離(1,600 g, 4°C, 10 分間)した。上清を除去した後、沈殿に 5w/v%TCA を加えて再懸濁して遠心分離(1,600 g, 4°C, 10 分間)し、さらに上清を除去して沈殿中の放射能量を γ カウンターにて 1 分間測定した。

得られた cpm 値はそれぞれ計数効率および減衰の補正を行い、dpm 値に換算した値を表記した。投与した総放射能量に対する甲状腺への取り込み量から ^{125}I の摂取率を、ホモジネートの放射能量に対する TCA 沈殿中の放射能量の割合からヨードの有機化率を算出した。

4)　統計処理

各計数値について対照群とクロバザム群で 2 群間の分散の均一性を F 検定により行い、分散が均一の場合には Student の t 検定を、また分散が均一でない場合には Aspin-Welch 検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

結果

甲状腺におけるヨードの取り込みおよびヨードの有機化について表 8 に示す。クロバザム投与群では対照群と比較して甲状腺重量および甲状腺タンパク量が有意に増加しており、$Na^{125}I$ 投与後 20 時間における甲状腺に取り込まれた ^{125}I の量は対照群の 160%であり有意な増加を示した。しかしながら甲状腺重量当りの ^{125}I 摂取量は 110%で有意な差はなかった。クロバザム投与群のホモジネートおよび TCA 沈澱中のタンパクに結合分の ^{125}I 量はいずれも対照群の約 165%と有意な増加であったが，甲状腺重量で補正したヨードの有機化率では有意な差はなかった。

表 8　甲状腺へのヨード取込み量および有機化率

	Thyroid weight (mg)	Thyroid protein (mg/mg wet weight)	Total ^{125}I uptake [a)] (%)	Ratio of ^{125}I uptake (dpm/mg)	^{125}I in homogenate (dpm/0.1ml)	^{125}I in bound to protein (dpm/0.1ml)	TPB [b)] (%)
Control	13.8 ± 1.9 (100)	1.65 ± 0.22 (100)	7.5 ± 1.3 (100)	58001 ± 10090 (100)	155791 ± 25968 (100)	138840 ± 24199 (100)	89.0 ± 1.6 (100)
Clobazam 400 mg/kg	20.4 ± 3.7** (148)	2.20 ± 0.23** (133)	12.0 ± 2.1** (160)	63833 ± 9930 (110)	257638 ± 42355** (165)	230450 ± 38443** (166)	89.4 ± 0.8 (100)

Animals were treated intraperitoneally with 10 μci/kg of $Na^{125}I$ 4 hours after completion of 4-week treatment. Twenty hours after that, the rate of thyroidal ^{125}I uptake and organification were calculated based on the results obtained by measuring for radioactivity with the gamma-counter.

a: Percentage of administered ^{125}I

b:Thyroid protein binding of ^{125}I (TPB(%) = ^{125}I bound to protein / ^{125}I in homogenate × 100)

Data represent the mean ± SD for 10 rats per group.

Figure in parenthesis are expressed as the percent of control.

Significantly different (**; $p<0.01$) from each control based on Student's t-test.

第 4 節　甲状腺濾胞細胞過形成の機序検討(間接作用について)

材料および方法

1)　被験物質、投与方法および試験デザイン

被験物質および投与方法については第 2 章第 2 節材料および方法 1)を参照。

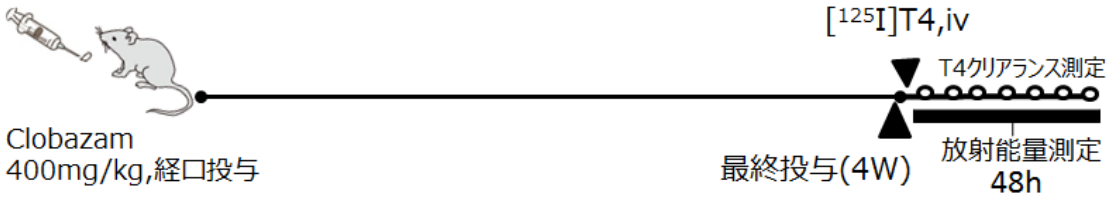

図 6　試験デザイン

2)　使用動物および群構成

使用動物および飼育条件については第 2 章第 2 節材料および方法 2)を参照。

表 9 群構成

Groups	Number of animals
	4week
Control	10
Clobazam 400 mg/kg	10

3)　血中 T4(thyroxine)クリアランスの測定

28 日間の投与 4 時間後に生理食塩水にて希釈した 5μCi/mL の[^{125}I]T4 (NEN® Life Science Products, Inc., USA)を 2 mL/kg(10μCi/kg)の容量で尾静脈へ投与した。^{125}I の再取り込みを防ぐために、投与 27-28 日の 2 日間対象動物に生理食塩水で希釈した 2.5mg/mL の NaI (WAKO Pure Chemical Industries Ltd., Japan)を 2 mL/kg(5 mg/kg)の容量で 1 日 2 回午前と午後に腹腔内に投与した。[^{125}I]T4 投与から 15 分、2, 4, 8, 12, 24, 36 および 48 時間後にラットの背側中足静脈から血液を約 200μL 採取した。血液は EDTA-2K と混和し、遠心分離(1,600 g, 4°C, 10 分間)して得られた血漿 100 μL 中の ^{125}I 濃度を γ カウンターにて 1 分間測定した。さらに、この血漿 100μL に 50 mmol/L リン酸緩衝液 0.2 mL および 10 w/v %トリクロロ酢酸

(TCA) 0.3 mL を添加して十分に撹拌後、遠心分離(1,600 g，4°C，10 分間)し、上清中の総放射能量をγカウンターにて 1 分間測定した。引き続き得られた沈澱を vortex mixing にてほぐし、 5 w/v % TCA 0.5 mL を添加して撹枠後、遠心分離(1,600 g，4°C，10 分間)し、上清を吸引除去して、沈澱中の放射能量をγカウンターにて 1 分間測定した。得られた cpm 値はそれぞれ計数効率および減衰の補正を行って dpm 値に換算しパラメータを算出した。消失半減期(t1/2)は[^{125}I]T4 投与 12~48 時間後の dpm 値を用い最小二乗法により求めた消失速度定数(ke)から算出した。血漿中濃度時間曲線下面積は測定時点(t)までの場合は台形法により(AUC_{0-t})以降は消失速度定数を用いて算出した($AUC_{0-\infty}$)。

4)　統計処理

各計数値について対照群とクロバザム群で 2 群間の分散の均一性を F 検定により行い、分散が均一の場合には Student の t 検定を、また分散が均一でない場合には Aspin-Welch 検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

結果

静脈内に投与した[^{125}I]T4 の血漿中クリアランスの測定結果を表 10 および図 7 に示す。血漿中の[^{125}I]T4 量は静脈内投与後 2 時間までは急速に減少し、それ以降は比較的緩やかな消失という 2 相性の変化を示した。クロバザム群の各時点の血漿中[^{125}I]T4 量は対照群に比べていずれも低値であり、[^{125}I]T4 投与 2，12，24，36 および 48 時間後の[^{125}I]T4 濃度ならびに血漿中濃度時間曲線下面積($AUC_{t\sim\infty}$)は有意な低下を示した。緩徐な消失を示した[^{125}I]T4 投与 12 時間以降の結果を用いて算出した[^{125}I]T4 の半減期(T1/2)は対照群が 16.4 時間に対して、クロバザム群では 14.7 時間であり、有意ではなかったもののクロバザム投与によりその短縮が認められた。

表 10　T4 の血漿中クリアランス(T1/2 および $AUC_{0\text{-}\infty}$)

Groups	T1/2 (h)	$AUC_{0\text{-}\infty}$ (dpm·h/mL)
Control	16.4	2944077
Clobazam 400 mg/kg	14.7	2434402**

Parameters (T1/2 and $AUC_{0\text{-}\infty}$) of plasma elimination of [^{125}I] T4 in rats treated with clobazam (400 mg/kg) or vehicle for 4 weeks.

Data represent the mean of 10 rats per group.

Significantly different (**; $p<0.01$) from control based on Student's t-test.

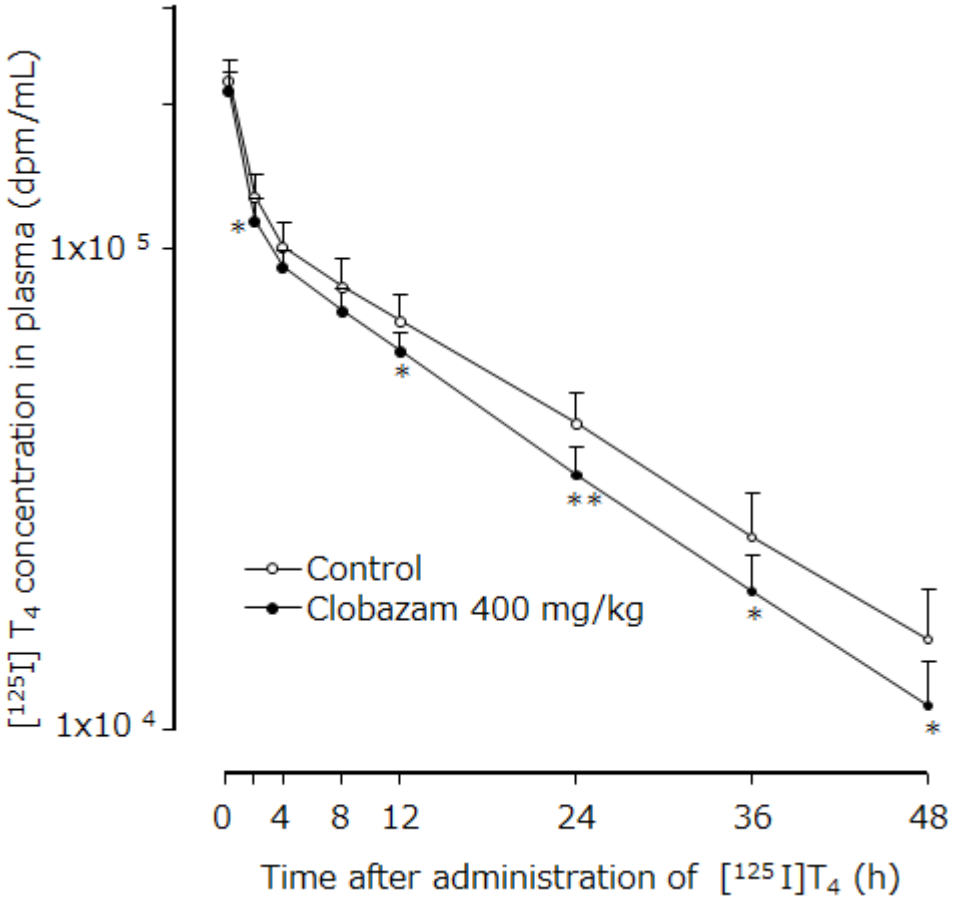

図 7　クロバザム投与後の T4 の血漿中クリアランス

Plasma elimination of [^{125}I] T4 in rats treated with clobazam (400 mg/kg) or vehicle for 4 weeks.

Data represent the mean ± SD of 10 rats per group.

Significantly different (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$) from control at a given time point, based on Student's t-test.

第 5 節　考察および小括

I.　　考察

クロバザムの 400mg/kg を 1 日 1 回 SD 系雄性ラットに最長 4 週間強制経口投与し、経時的に甲状腺の重量変化を測定するとともに光学顕微鏡を用いて病理組織学的に形態変化について検討した。その結果、投与 2 週の段階で有意な甲状腺重量の増加を認め、さらには 6/10 例に甲状腺濾胞細胞の過形成が確認された。このことよりクロバザムの 2 年間のがん原性試験でみられた甲状腺濾胞細胞腺腫の発生機序を検討するにあたり、発がん用量の 4 倍にあたるクロバザムの 400 mg/kg を 1 日 1 回最低 2 週間反復投与することで過形成をエンドポイントとした動物モデルが作製できることが明らかとなった。続いてクロバザムが甲状腺に対して直接的に甲状腺ホルモンの合成過程に影響を与えているかについて検討した。甲状腺における甲状腺ホルモンの生合成には、まず血中のヨードを能動的に甲状腺の濾胞細胞に取り込む必要がある。この過程においては NIS (sodium/iodide symporter)がその輸送に働いている [9)]。次に取り込まれたヨードは濾胞内でヨウ素となり濾胞細胞膜状に位置する TPO(thyroid peroxidase)の働きで Tg (thyroglobulin)と段階的に結合していく有機化のステップが起こり、この Tg 上での酸化反応により甲状腺ホルモン(T4 および T3; Triiodothyronine)がつくられる [10)]。直接的な甲状腺ホルモン合成においては、ヨードの取り込みおよび有機化がキーイベントであることから、それらに及ぼすクロバザムの影響を検討した。その結果、取り込まれたヨードの絶対量はクロバザム投与群で有意に多かったが、これは甲状腺自体が肥大していることによると考えられ、甲状腺重量で補正した取り込み率では有意な差はなかった。同様に甲状腺中ヨードの有機化率も影響はなかった。このことより、クロバザムの甲状腺腫瘍の形成に甲状腺ホルモンの合成阻害は関与していないことが明らかとなった。

次にクロバザムを投与したラットに放射能ラベルした T4([^{125}I]T4)を静脈内投与し、その消失をみることでクロバザム投与が甲状腺ホルモンのクリアランスを亢進するか否かを検討した。その結果、クロバザム投与群で[^{125}I]T4 の半減期の短縮、および血漿中[^{125}I]T4 濃度を縦軸に投与からの経過時間を横軸にとったグラフにおける血漿中濃度時間曲線下面積では有意な低値が確認され、このことはクロバザム投与により血漿の T4 の代謝あるいは排泄によるクリアランスの亢進を示唆するものであった。これらの結果はクロバザムによる甲状腺腫瘍の形成が先行研究で知られているような血漿中甲状腺ホルモンのクリアランスの亢進に基づく間接作用、すなわち血中甲状腺ホルモンの低下による下垂体および視床下部へのフィードバック機構を介し TSH 分泌の増加とそれに引き続く甲状腺濾胞細胞腫瘍の形成であることが裏付けられたと考えられた。

II.　小括

・甲状腺腫瘍形成の短期評価のエンドポイントとして、甲状腺の重量増加および甲状腺濾胞上皮の過形成を利用できることが確認された。
・クロバザムによる甲状腺過形成モデルの作製には最低 1 日 1 回 400 mg/kg の 2 週間の反復投与が必要であることが明らかとなった。
・クロバザムの甲状腺への直接阻害作用はないことが確認された。一方、クロバザム投与により甲状腺ホルモンのクリアランスの上昇が示され、クロバザムによる甲状腺腫瘍は間接作用によることが示された。

以上より、クロバザム投与による甲状腺過形成モデルが甲状腺ホルモンの代謝・排泄を中心とした甲状腺腫瘍機序の検討に妥当であることが示された。

第 3 章　クロバザムの肝臓に及ぼす影響について

第 1 節　緒言

第 2 章よりクロバザムはラットの甲状腺ホルモンのクリアランスを亢進させることが明らかとなった。甲状腺ホルモンのクリアランスは主に肝臓がその役割を果たしている。本章では肝臓に注目し､クロバザム投与による 1) 病理組織学的な影響を確認するとともに 2) 甲状腺ホルモン代謝に関与している酵素を調べる目的で、代謝酵素関連遺伝子に絞った DNA カスタムマイクロアレイを用いて、網羅的にその経時的遺伝子発現変動を確認した。さらに、クロバザム投与の初期(acute phase)および中・後期(sub-chronic phase)における代謝酵素遺伝子の発現の違いに注目し、その背景にある意義について細胞増殖、アポトーシスおよび酸化ストレスの観点から検討した。

第 2 節　クロバザム投与による肝臓の病理組織学的変化および代謝酵素関連遺伝子の発現変動について

材料および方法

1)　被験物質、投与方法および実験デザイン

被験物質および投与方法については第 2 章第 2 節材料および方法 1)を参照。投与期間は 4 週間とし、その後 2 週間の休薬期間を設定した。その間投与 1 日、3 日、7 日(1 週)、14 日(2 週)、28 日(4 週)および休薬 7 日(1 週)、休薬 14 日(2 週)に動物を剖検し、肝臓サンプルを採取した。

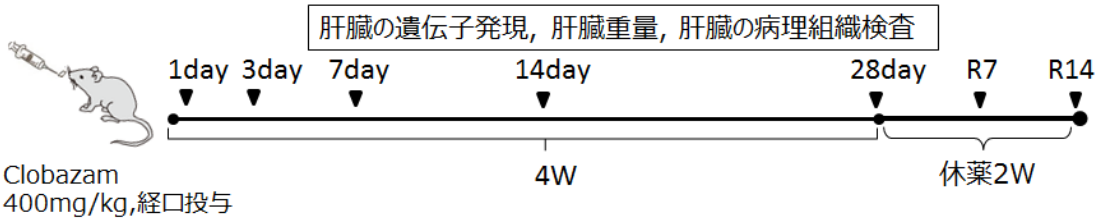

図 8　実験デザイン

2)　使用動物、飼育条件および群構成

使用動物および飼育条件については第 2 章第 2 節材料および方法 2)を参照。

表 11 群構成

Groups	Number of animals						
	1day	3day	7day	14day	28day	R7	R14
Control	6	6	6	6	6	6	6
Clobazam 400mg/kg	6	6	6	6	6	6	6

3) 肝臓の病理組織学的検査

重量測定後の肝臓(外側左葉)を 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン切片としたのちにヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を施して光学顕微鏡下で観察した。

4) 肝臓中のミクロゾームタンパクの測定

凍結保存していた肝臓に氷冷 1.15%KCl を加えてホモジナイザーにより 25%(w/v)肝ホモジネートを調製し、遠心分離(4°C, 9,000g, 20 分間)後の上清を超遠心分離(4°C, 105,000g, 60 分間)した。得られたペレット(ミクロゾーム)を 20 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)に懸濁し、使用まで-80°C の超低温冷凍庫に保存した。ミクロゾームタンパクの濃度は Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad Laboratories, Japan)を用いて測定した。

5) PAM Chip®を用いた薬物代謝酵素遺伝子の発現変動

各動物から分取した肝臓は QIAGEN RNAlater (QIAGEN K.K., Japan) に一晩浸し使用まで-20℃の冷凍庫内で保存した。トータル RNA は QIAGEN RNeasy minikit(QIAGEN K.K., Japan)を用いて抽出し、RNAase free 水 30 µL に溶解した。
遺伝子発現解析は Olympus 社にてカスタマイズされた DNA マイクロアレイ(PamChip®バージョン 1,0 および 3.1; Olympus Corpolation, Japan)を用いた。搭載遺伝子は cytochromeP450 の 13 分子種、GST(Glutathione S-transferase)の 7 分子種、UGT の 2 分子種、それぞれ 1 種の NADPH dehydrogenase および acetyltransferase である(表 12 参照)。フルオロクロム標識 cDNA の調製については、トータル RNA の 30 µg について RNA 蛍光標識化 Core Kit(TaKaRa およびフルオレセイン-12-dUTP ; NEN, Wellesley)を用いて逆転写および FITC 標識反応を実施した。試料は 5 分間 95℃で変性させ、6×SSPE を含む溶液と PamChip®マイクロアレイ上でハイブリダイゼーションし、シグナルの検出は 3D マイクロアレイシステム(FD10 : Olympus Corpolation, Japan)を用いて実施した。得られた蛍光画像は FD10 に統合されている遺伝子発現解析ソフトウェアで対照群との発現比に変換し、各遺伝子の発現は GAPDH で補正した。

表 12 PamChip®搭載遺伝子リスト
Gene list (PamChip® microarray)

Gene Name	Gene symbol (Abbreviation)	GenBanK accession number
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	**GAPDH a), b)**	NM_017008
actin, beta	**ACTB b)**	NM_031144
peptidylprolyl isomerase A	**CYCLP b)**	NM_017101
cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Cyp1a1	NM_012540
cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2	Cyp1a2	NM_012541
cytochrome P450 IIA1 (hepatic steroid hydroxylase IIA1) gene	Cyp2a1	NM_012692
cytochrome P-450b (phenobarbital-inducible) gene, exon 7	CYP2b1	L00318
cytochrome P450, subfamily IIC6	Cyp2c6	XM_215257
cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase)	Cyp2c11	NM_019184
cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 4	Cyp2d6	NM_138515
cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	Cyp2e1	NM_031543
cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 4	Cyp2f1	NM_019303
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 1	Cyp3a1	NM_173144
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 2	Cyp3a2	NM_153312
cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 22	Cyp4a1	NM_175837
cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1	Cyp4b1	NM_016999
glutathione-S-transferase, alpha type2	Gsta2	NM_017013
glutathione S-transferase, mu 2	Gstm2	NM_177426
glutathione S-transferase A3	Gsta3	NM_031509
glutathione S-transferase theta 1	Gstt1	NM_053293
glutathione S-transferase, pi 2	Gstp2	NM_138974
glutathione S-transferase, mu type 3	Gstm3	NM_031154
glutathione S-transferase, mu 5	Gstm5	NM_172038
*UDP-glucronosyl-transferase 2B	Ugt2b12	NM031980
*UDP-glucronosyl-transferase phenobarbital inducible type	Ugt2b2	M13506
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Nqo1	NM_017000
N-Acetyltransferase-2	Nat2	NM_053854
polyubiquitin	**POLYU b)**	NM_138895
bacteriophage λDNA	LAMD c)	---

a) Internal control used for normalization, b) Housekeeping genes indicated by bold letters, c) Negative control

6)　リアルタイム PCR による遺伝子発現変動の確認

トータル RNA の抽出は本章第 2 節材料および方法 5)を参照。
リアルタイム PCR は TaqMan プローブ(FAM 標識および TAMRA 色素)を用い、PAM Chip® アレイで長期間の高発現が確認された 4 遺伝子(Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp3a2, Ugt2b2)の発現レベルを定量した。さらに別途同用量のクロバザムを 2 週投与した肝臓試料(N=5)を用いて、追加で Ugt2b1, Ugt1a1, Ugt1A6 の遺伝子発現変動も確認した。各遺伝子のプライマーはアプライドバイオシステムズ Primer Express Software バージョン 2.0 を使用し設計した(表 13 参照)。増幅については、マニュアルに従い cDNA を作製後、TaqMan PCR マスターミックス(Applied Biosystems, USA)を使用した。増幅は 50°C, 2 分(uracil N-glycosylase incubation)、95°C, 15 秒(denaturation)、60°C, 60 秒および 95°C, 15 秒(denaturation /amplification)の一連の反応を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。各遺伝子の発現は GAPDH で補正した。

表 13　Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp3a2, Ugt1a1, Ugt1a6, Ugt2b1, Ugt2b2 遺伝子のプライマー

Target	GenBank Accession No.	Sequence
Cyp2b1	L00318.1	
Forward primer		5′-AAAGTCCAAAAGGAGGTTGATCAG-3′
Reverse primer		5′-CTGCATCAGTGTATGGCATTTTACT-3′
Probe		5′-TTCACACCGGCTACCAACCCTTGATG-3′
Cyp3a1	NM_013105.2	
Forward primer		5′-AGTCGTCCTGGTGCTCCTCTAC-3′
Reverse primer		5′-CCCAGGAATCCCCTGTTTCT-3′
Probe		5′-ATTTGGGACCCGCACACATGGACT-3′
Cyp3a2	NM_153312.2	
Forward primer		5′-AGGAGTTGGCAAGGTCTGTGA-3′
Reverse primer		5′-ATTAACAGAGACCACCAGATGTGGAT-3′
Probe		5′-ACCTTTGCTGATTCTCATGGGACCATCTC-3′
Ugt1a1	NM_012683.2	
Forward primer		5′-GAGGCTTTGGGCAGAATTCC-3′
Reverse primer		5′-TGCAAGGTTCGATGGTCTAGTTC-3′
Probe		5′- CAGACGGTCCTGTGGCGCTACACC -3′
Ugt1a6	NM_001039691.1	
Forward primer		5′- GGCTACCCCAAAACGATCTG -3′
Reverse primer		5′- ATACCATGGGAACCGGAGTGT -3′
Probe		5′- TCATCCAAAGGCTCGGGCGTTC -3′
Ugt2b1	NM_173295.1	
Forward primer		5′-CTGAAGCAGAGCCCTGAGAGA-3′
Reverse primer		5′-GGGAAGGCACTGGCATGA-3′
Probe		5′- TCTGCCAGCTGCTTCCAGAGGAACC -3′
Ugt2b2	NM_031533.3	
Forward primer		5′-CTCTCTGGATGTGATTGGATTCC-3′
Reverse primer		5′-AAGAATCGGTACATGAACAAGAGACA-3′
Probe		5′-TCACCTGTTTTGCAGTCATTGCAGCTCTTA-3′

Primers shown were created using Applied Biosystems Primer Express Software, version 2.0. Primers for GAPDH gene, the endogenous control, were purchased from Applied Biosystems.

7)　統計処理

各計数値について投与期間ごとの対照群とクロバザム群で 2 群間の分散の均一性を F 検定により行い、分散が均一の場合には Student の t 検定を、また分散が均一でない場合には Aspin-Welch 検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

結果

1) 肝臓の病理組織学的検査

肝臓の病理組織学的検査結果を表 14 に示す。クロバザム投与群で小葉中心性の肝細胞肥大が投与 3 日から投与 28 日まで観察され、投与期間に応じてその程度が slight から moderate へ増強した。さらに本変化は休薬することで速やかに消失した。

表 14　病理組織学的検査結果(クロバザム投与動物の肝臓)

Findings		Days						
		1	3	7	14	28	R7	R14
Liver Hypertrophy of centrilobular hepatocyte	1+[a)]	0	6	6	4	1	0	0
	2+[a)]	0	0	0	2	5	0	0

Animals were necropsied on the day after completion of each treatment regime. Specimens of the liver from each animal were stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic examination.

Data are shown in the number of clobazam treated animals with findings per 6 rats.

a) 1+: slight; 2+: moderate

2) 肝臓中のミクロゾームタンパクの測定

肝ミクロゾームタンパク量の経時的変化を図 9 に示す。
クロバザム投与群の肝重量当たりのミクロゾームタンパク量は投与 1 日では対照群とほぼ同じであった。投与 3 日では対照群よりやや高いものの有意ではなく、投与 7 日から 28 日までの sub-chronic phase では対照群に比べて有意な増加を示した。この sub-chronic phase でのミクロゾームタンパクの増加量は投与 7 日から 28 日までほとんど変わらなかった。一方、withdraw phase では対照群と同レベルであった。

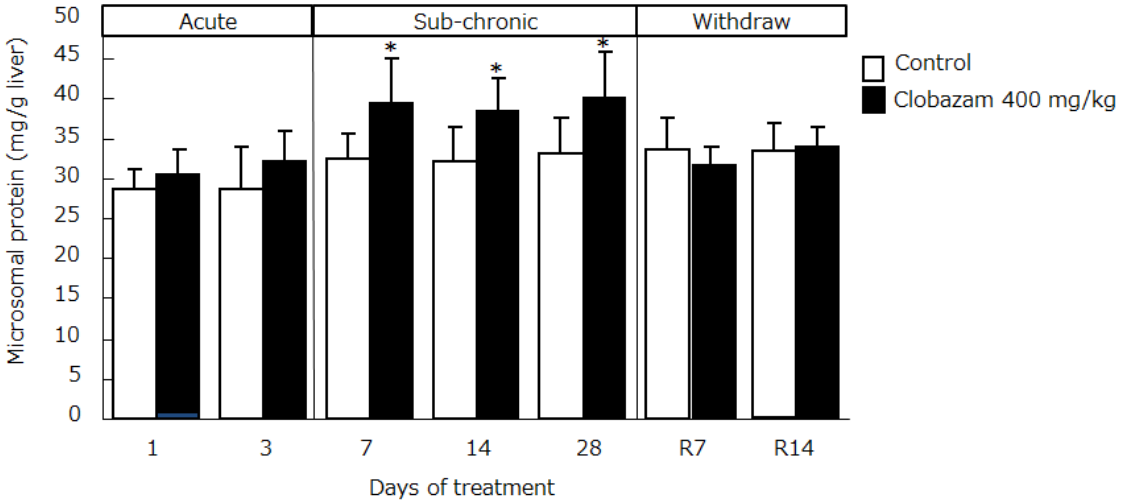

図 9 肝ミクロゾームタンパク量の経時変化

Hepatic microsomal protein contents of the liver in rats treated with clobazam (400 mg/kg).

Data represent the mean ± SD for 6 rats per group.

Significantly different (*; $p<0.05$) from control at a given time point, based on Student's t-test.

3) PAM Chip®を用いた薬物代謝酵素遺伝子の発現変動

PamChip®を用いた薬物代謝酵素関連遺伝子の網羅的な発現解析の結果を表 15 に示す。投与 3 日までの acute phase、特に投与 1 日では CYPs, GSTs, UGTs および NAT 等、多くの遺伝子の発現増加が確認された。投与 7 日以降の sub-chronic phase では acute phase から継続して 4 分子種 (Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp3a2,および Ugt2b2)の遺伝子の発現増加が確認された。一方、休薬で多くの代謝酵素の遺伝子発現は低下したが、継続して増加していた上記 4 遺伝子の発現低下は特に顕著であった。

表 15　代謝酵素遺伝子の網羅的解析結果

Gene symbol	Time (Days)						
	1	3	7	14	28	R7	R14
GAPDH	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ACTB	1.1	0.8	1.2	0.9	0.8	0.8	0.9
CYCLP	1.0	1.0	1.1	1	0.9	0.8	0.8
Cyp1a1	1.9	1.2	1.0	0.7	0.7	0.6	0.6
Cyp1a2	1.1	0.9	1.1	1.0	0.7	0.9	1.0
Cyp2a1	1.6	1.4	1.2	1.2	0.7	0.4	0.5
Cyp2b1	11.5	3.3	3	3.1	3.5	0.5	0.7
Cyp2c6	2.2	1.3	1.8	1.6	1.1	0.9	0.9
Cyp2c11	1.9	1.5	1.4	1.2	1.1	1.4	0.8
Cyp2d6	1.5	1.6	1.4	1.3	1.3	1.7	0.7
Cyp2e1	1.6	1.0	1.4	1.3	0.9	0.3	0.3
Cyp2f1	1.3	1.2	1.3	1.1	1.3	0.9	1.0
Cyp3a1	5.6	6.6	5	3.4	4.1	0.5	0.4
Cyp3a2	4.4	4.2	3.6	2	2.6	0.5	0.2
Cyp4a1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cyp4b1	1.2	1.3	1.3	1.3	0.7	1.4	0.6
Gsta2	3.3	2.5	1.7	1.5	1.5	0,9	0.7
Gstm2	3.6	2.1	1.1	1.1	0.9	1.2	1.0
Gsta3	1.7	1,5	1.8	1.3	1.1	0.7	0.6
Gstt1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Gstp2	1.6	1.5	1.3	1.1	0.8	1.2	0.7
Gstm3	2.5	2.3	1.8	1.8	1.8	1.2	0.9
Gstm5	1.9	2.6	1.7	1.7	1.6	1.2	0.7
Ugt2b12	1.2	0.8	1.3	0.7	0.9	1.0	1.1
Ugt2b2	11.8	6.9	5.4	4.3	5.3	0.6	0.5
Nqo1	1.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nat2	1.9	1.2	1.1	1.1	0.6	0.6	0.7
POLYU	1.2	1.1	1.2	1.0	0.9	1.0	0.6
LAMD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Data represent the mean mRNA expression ratio (clobazam/control).

：3.0≦,　：2.0≦,　：1.5≦,　：0.5≧

4)　リアルタイム RT-PCR による確認

リアルタイム RT-PCR における Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp3a2,および Ugt2b2 遺伝子の発現変動を図 10 に示す。これら 4 つの代謝酵素の mRNA はいずれも投与期間を通じて発現が増加しており、休薬とともに速やかに減少する変化を示した。このことは、マイクロアレイ解析の結果と一致していた。さらに別途クロバザム 2 週間投与後の肝臓サンプルを用いたリアルタイム RT-PCR の結果を図 11 に示す。その結果、投与 2 週の時点ではすでにクロバザムは Ugt1a1、Ugt1a6 および Ugt2b1 遺伝子についてもアップレギュレーションしていた。

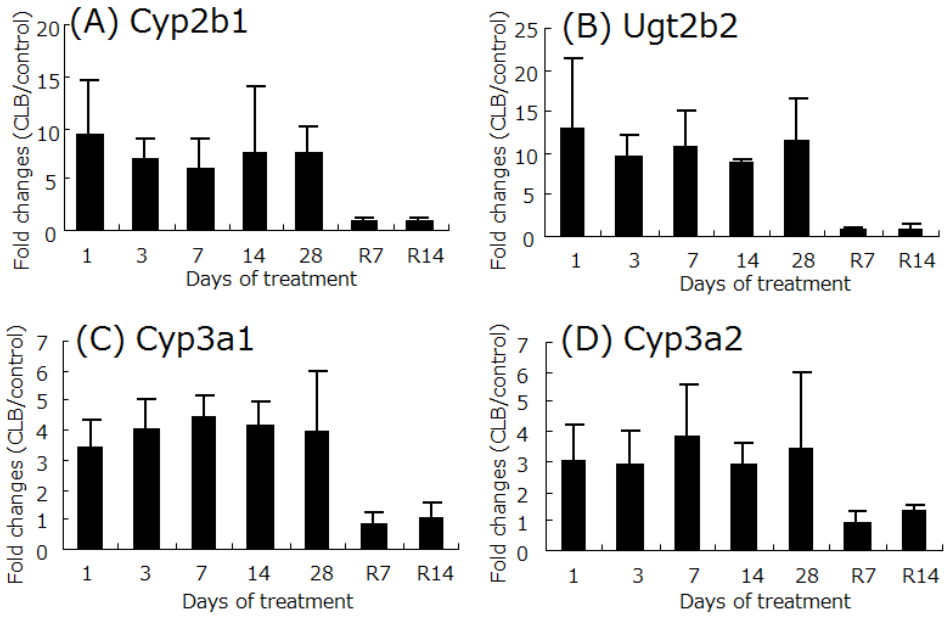

図 10　Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp3a2 および Ugt2b2 遺伝子の発現変動（タイムコース）

Time-course analysis of gene encoding Cyp2b1 (A), Ugt2b2 (B), Cyp3a1(C) and Cyp3a2 (D) of the liver in rats treated with clobazam (400 mg/kg) using real-time RT-PCR . The fold change of target mRNA is shown as a ratio of the control calculated with the following formula: Fold change of target mRNA=R sample /R control

R control = Mean value of (Target products at control /GAPDH products at control)

R sample = Target products /GAPDH products

Data represent the mean ± SD for 3 rats per group.

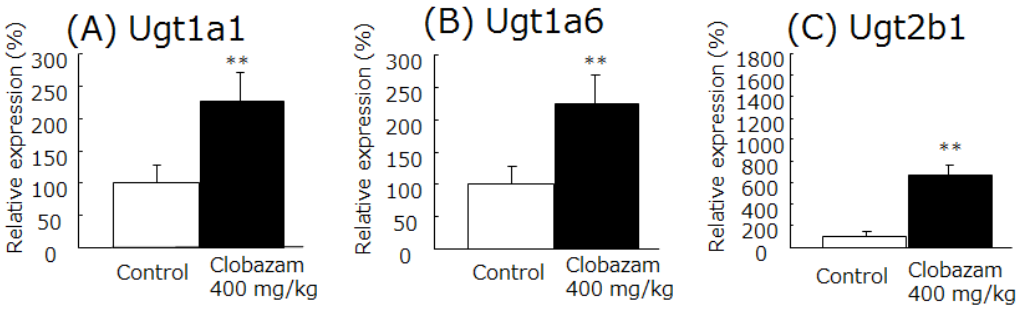

図 11　Ugt1a1, Ugt1a6 および Ugt2b1 遺伝子の発現変動（投与 2 週時点）

Result of real-time RT-PCR analysis of Ugt1a1, Ugt1a6, and Ugt2b1 of the liver in rats treated with clobazam (400 mg/kg) for 2 weeks. The fold change of target mRNA is shown as a ratio of the control calculated with the following formula: Fold change of target mRNA=R sample /R control

R control = Mean value of (Target products at control /GAPDH products at control)

R sample = Target products /GAPDH products

Data represent the mean ± SD for 5 rats per group.

Significantly different (**; $p<0.01$) from control based on Student's t-test.

第 3 節　クロバザム投与の acute phase および sub-chronic phase における肝細胞の増殖およびアポトーシスに関する検討

第 2 節の結果よりクロバザム投与により誘導されるミクロゾームタンパク量および代謝酵遺伝子の変動パターンに投与 3 日までの acute phase と投与 7 日から 28 日までの sub-chronic phase で明確な違いが観察された。この違いを精査する目的でクロバザム投与による肝臓における細胞増殖、アポトーシスおよび酸化ストレスについて検討した。

材料および方法

1)　被験物質、投与方法および実験デザイン

第 3 章　第 2 節 1)を参照。

2)　使用動物、飼育条件および群構成

第 3 章　第 2 節 2)を参照。

3)　細胞増殖活性の測定

各投与期間終了後にラットをエーテル麻酔下、放血し速やかに肝臓を摘出し、10%中性ホルマリン緩衝液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作製した。細胞増殖活性は、抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色法で評価した。免疫染色は切片を pH6.0 のクエン酸緩衝液の加熱により前処理し、3%過酸化水素水等で内因性ペルオキシダーゼの非特異反応をブロックした。その後、マウスモノクローナル抗ラット Ki-67 一次抗体(clone : MIB-5, Dako Japan Inc., Japan)を用いて一晩 4°C で反応させ、シンプルステインラット MAX-PO (NICHIREI CORPORATION, Japan)で酵素標識した後に、ジアミノベンジジン(DAB)にて発色させた。

4)　アポトーシス活性の測定

上記 3)と同様にアポトーシス活性についても肝臓のパラフィン切片を用いた TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)法による免疫染色法にて評価した。染色は ApopTag ペルオキシダーゼ　In Situ アポトーシス kit　S7100 (Chemicon Internathional, USA)を用いて、kit 付属のマニュアルに従い実施した。簡単に記載すると、肝臓切片を脱パラフィン処理した後、プロテアーゼ K にて除タンパクを行い、3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼの非特異反応をブロックした。TdT 酵素で 37°C,　60 分間反応した後に Wash buffer により反応を停止させ、ベルオキシダーゼ標識抗ジゴシゲニン結合抗体で 30 分間反応させた後、ジアミノベンジジン(DAB)にて発色させた。

5) 酸化ストレスの測定

酸化ストレスの指標には MDA (malondialdehyde)を選択し、その定量には MDA と TBA (Thiobarbituric acid)との反応により生成する反応生成物質 (TBARS)を測定する市販の kit (TBARS Assaykit, Cayman Chemical, USA)を用いた。方法は kit 付属のマニュアルの指示に従った。簡単に記載すると、25 mg の肝臓サンプルを 500 μM AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonylfluoride), 150 nM Aprotinin, 1 μM E-64 protease inhibitor, 0.5 mM EDTA, および 1 μM Leupeptin を含む RIPA 緩衝液で超音波処理し、得られた肝臓ホモジネートを遠心分離 (1,600 g, 4°C, 10 分間)した。得られた上清に TBA を含む付属の試薬を加え高温(90-100°C)条件下で 1 時間反応させ、生成する MDA-TBA の結合物質を付属の発色試薬を添加して発色させた後、530-540nm の吸収波長を測定した。

6) 統計処理

各計数値について対照群とクロバザム群で 2 群間の分散の均一性を F 検定により行い、分散が均一の場合には Student の t 検定を、また分散が均一でない場合には Aspin-Welch 検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

結果

1) 細胞増殖活性の測定

カウントした細胞(1000 個)を総細胞数とし、その内の Ki-67 陽性細胞の比率(Ki-67 labeling index)を図 12 に示した。

対照群と比較して、Ki-67 陽性細胞の数はクロバザム投与 1 日および投与 3 日の acute phase で有意に増加した。投与 7 日以降の sub-chronic および withdraw phase では対照群と同様に増殖活性はほとんど認められなかった。

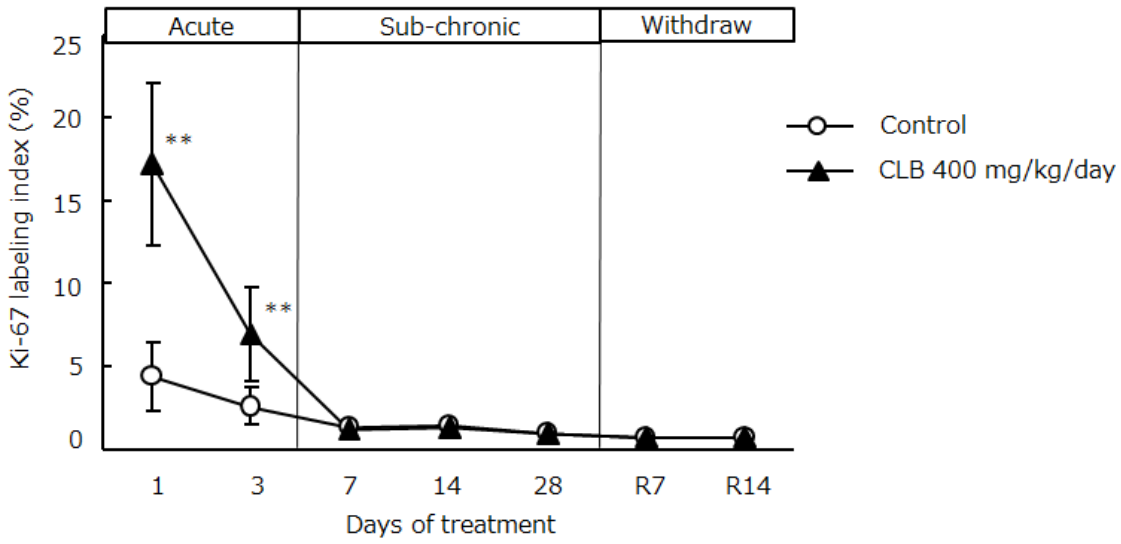

図 12 総細胞における Ki-67 陽性細胞の比率(Ki-67 labeling index)

Time course change of Ki-67 labeling index (%) in the liver. Ki-67 positive cells were detected by immunostaining. For Ki-67 labeling index, Ki-67-positive cells and total hepatocytes were scored in about 1,000 cells per liver. The labeling index (%) of individual rats was determined by taking the total number of Ki-67-positive cells divided by the total number of hepatocytes counted.

Data represent the mean ± SD for 6 rats per group.

Significantly different (**; $p<0.01$) from control at a given time point, based on Student's t-test.

2)　アポトーシス活性の測定

カウントした細胞(1000 個)を総細胞数とし、その内の TUNEL 陽性細胞の比率(Apoptotic labeling index)を図 13 に示した。対照群と比較して、TUNEL 陽性細胞の数はクロバザム投与 1 日および投与 3 日の acute phase で有意に増加し、その後投与 7 日で急激に減少し sub-chronic および withdraw phase を通して対照群と同様にアポトーシスはほとんど認められなかった。

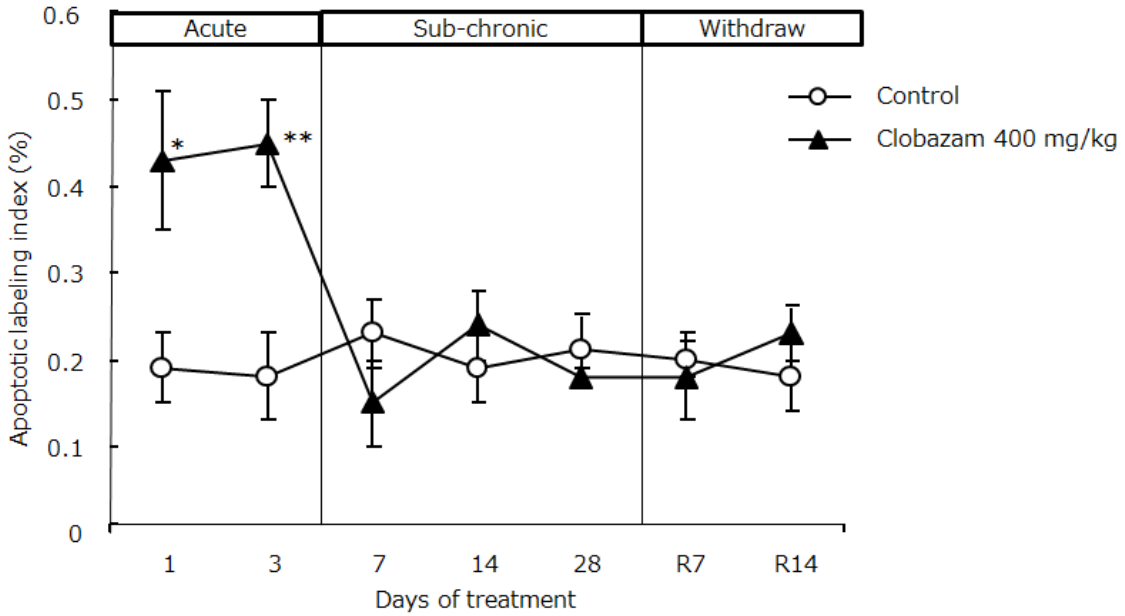

図 13　総細胞における TUNEL 陽性細胞の比率(Apoptotic labeling index)

Time course change of apoptotic index (%) in the liver. Apoptotic positive cells were detected by TUNEL immunostaining. For apoptotic labeling index, TUNEL-positive cells and total hepatocytes were scored in about 1,000 cells per liver. The labeling index (%) of individual rats was determined by taking the total number of TUNEL-positive cells divided by the total number of hepatocytes counted.

Data represent the mean ± SD for 6 rats per group.

Significantly different (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$) from control at a given time point, based on Student's t-test.

3) 酸化ストレスの測定

TBARS の形成量を図 14 に示した。
対照群と比較して、TBARS の形成量はクロバザム投与で投与 1 日で有意に増加した。投与 3 日以降では対照群と同等であった。

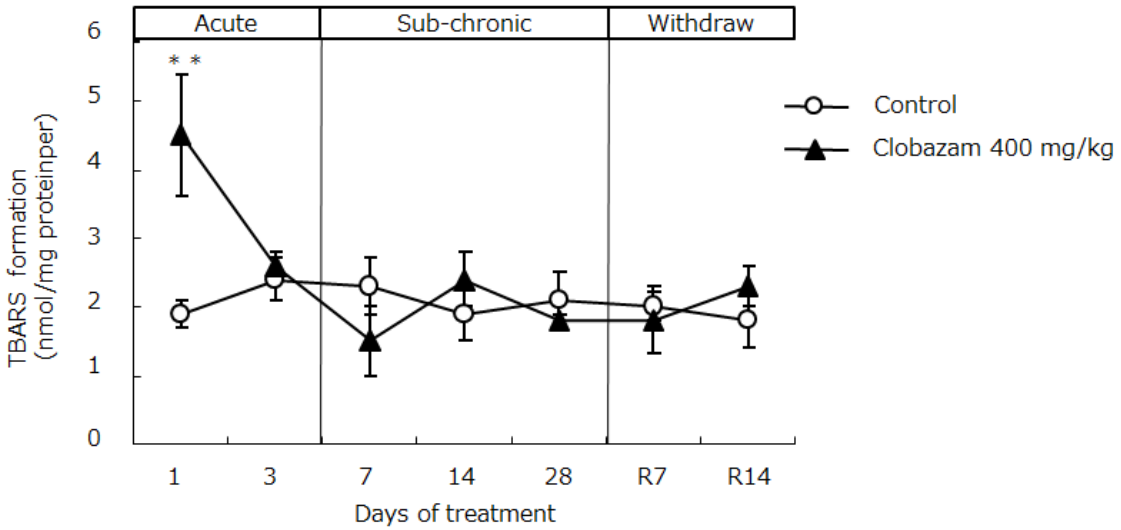

図 14 **酸化ストレス(TBARS 形成量)の経時的変化**

Time course change of TBARS formation in the liver.

Data represent the mean ± SD for 6 rats per group.

Significantly different (**; $p<0.01$) from control at a given time point, based on Student's t-test.

第 4 節　考察および小括

I.　　考察

甲状腺ホルモンのクリアランスは主には肝臓におけるグルクロン酸抱合や腎臓における脱ヨード反応に加え、脱アミノ酸や脱炭酸化などの側鎖の修飾による代謝が知られている。げっ歯類においては肝臓がその中心的な役割を果たしている。本章ではクロバザム投与による 1) 肝臓の病理組織学的な影響を確認するとともに 2) 甲状腺ホルモン代謝に関与している肝臓内酵素を調べる目的で、代謝酵素関連遺伝子に絞った DNA カスタムマイクロアレイを用いて、網羅的にその経時的遺伝子発現変動を確認した。さらにはそれら代謝酵素のタンパクレベルでの発現についてミクロゾームタンパク量の変化を基に検討した。

病理組織学的には投与 3 日から小葉中心性肝細胞肥大を認め、その程度は投与期間に依存して強くなっていた。これらの変化は休薬することで速やかに消失した。一般的に小葉中心性の肝細胞肥大は薬物代謝酵素の誘導によって起こることが知られており [11)]、ミクロゾームタンパク量の増加が意味する代謝酵素量の増加の結果と一致していた。PamChip®マイクロアレイを用いた薬物代謝酵素遺伝子の網羅的な変動解析では、CYPs、GSTs、UGTs および NAT といった多くの代謝酵素が投与 3 日までの acute phase、特に投与 1 日で発現増加を示した。投与 7 日以降では継続して Cyp2b1、Cyp3a1/2 および Ugt2b2 の 4 種の遺伝子の高発現がみられ、それらはいずれも休薬とともにダウンレギュレートされた。追加で実施したリアルタイム RT-PCR の結果からクロバザムは Ugt1a1/1a6 および Ugt2b1 も誘導することが確認された。このことは投与後期でも発現上昇が確認されたこれら 7 種の代謝酵素遺伝子は甲状腺ホルモンのクリアランスの上昇に直接あるいは間接的に関与していることを示唆している。CYP サブタイプについて、CYP2B および CYP3A はそれぞれ肝臓の核内受容体、CAR(constitutive androstane receptor)および PXR(pregnane X-receptor)による制御を受け [12)13)14)]、その多くはオーバーラップしていることが報告されている [15)]。また UGT1A は PXR による制御、UGT2B は CAR の制御を受けることが報告されている [16)]。このことはクロバザム投与により起こる最初のイベントは PXR および CAR の活性化であり、その後引き続き起こる代謝酵素(CYP2B, CYP3A, UGT1A および UGT2B)の誘導が甲状腺ホルモンのクリアランスの上昇に起因していると考えられた。

前述の如く薬物代謝酵素の網羅的な発現解析において、投与 3 日までの acute phase では多くの代謝酵素遺伝子を非特異的に誘導し、その後の sub-chronic phase では特異的な代謝酵遺伝子の誘導が起こるという現象が認められた。その現象の背景にある細胞内応答を精査する目的から、細胞増殖とアポトーシスならびに酸化ストレスの経時的変化について検討した。その結果、acute phase 特に投与 1 日において細胞増殖活性、アポトーシスおよび酸化ストレスのいずれもが増加しているという結果が得られた。アポトーシスは一般に異常細胞を除去することにおいて重要な役割を果たすプログラムされた細胞死であり [17)]、細胞増殖とアポトーシスの間のバランスは臓器の保護に重要であると考えられている [18)]。フェノバルビタール [19)]、ナフェノピン [20)]およびシプロテロンアセタート [21)]のようないくつかの化合物では上記バランスがくずれることでラットに肝腫瘍が発生することが報告されている。そのような薬剤は、細胞増殖を高める一方でアポトーシスを低下させることも報告されて

いる[22]。 一方、本試験におけるクロバザム投与では細胞増殖活性は acute phase のみで増加したもののアポトーシスも同様に増加し、上記のような肝腫瘍を引き起こす薬剤とは本質的に異なっていた。さらに急性期には TBARS の形成を指標にした酸化ストレスの誘導も確認された。これら一連の急性期での反応（酸化ストレス、アポトーシスおよび細胞増殖の活性化とともに非特異的な代謝酵素 mRNA の発現上昇）は興味深いことに投与 1 日ないしは 3 日までの acute phase で起こり、反復投与時の sub-chronic phase では一切観察されなかった。その一方でミクロゾームタンパクは mRNA の変化とは逆に投与 3 日までの acute phase では増加せず、投与 7 日以降の sub-chronic phase で有意に増加していた。これらのことから、図 15 の如くクロバザム投与後の acute と sub-chronic phase では以下のような細胞応答が起こっていたと推察された。

1) クロバザムの投与初期の acute phase では生体防御反応として大量のクロバザムの代謝するために多くの薬物代謝酵素を動員する必要があり、核内受容体(CAR および PXR)の活性化に続く多種の代謝酵素の誘導(mRNA の発現増加)とそのための細胞増殖が起こる。この段階では代謝に有利（効果的）な特異的代謝酵素だけでは不十分なので、非特異的に多くの代謝酵素を一斉に誘導していると考えられる。
2) 非特異的に上昇した薬物代謝酵素による様々な酸化代謝の過程でラジカルが発生し細胞に酸化的ストレスを引き起こす。
3) 発生した酸化ストレスによってアポトーシスが誘導されることで細胞増殖との間で均衡が保たれ、無秩序な増殖が防がれる。
4) その後投与を重ねた sub-chronic phase の段階ではミクロゾームタンパクの供給が充足されることで非特異的な多くの代謝酵素の誘導が不要となり、特異的な酵素のみの上昇が認められるようになる。

この一連の過程から、acute phase での変化は sub-chronic phase で十分に薬物代謝酵素(CYP2B, CYP3A, UGT1A, UGT2B)を利用できるようになるまでの細胞の防御反応（適応性変化）の一つとも考えられる。

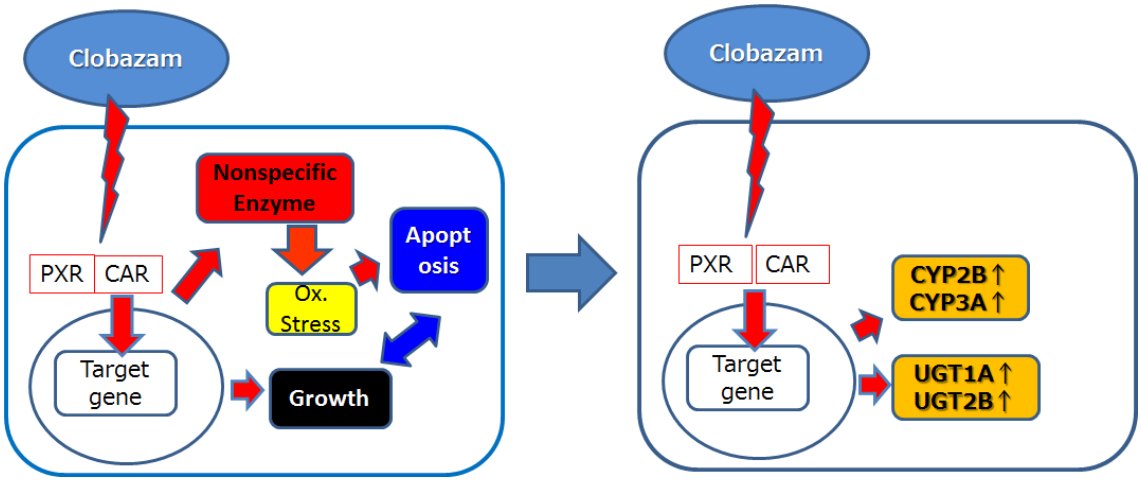

図 15　クロバザム投与の acute-phase および sub-chronic phase における細胞応答の違い

II. 小括

1. 肝臓の病理組織検査の結果、小葉中心性肝細胞肥大が確認されるとともに、Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp3a2, Ugt1a1, Ugt1a6,Ugt2b1 および Ugt2b2 の遺伝子の発現上昇が確認され、肝臓中 CAR および PXR の活性化が示唆された。
2. クロバザムの投与においては投与 3 日までの acute phase と 7 日以降の sub-chronic phase では異なる代謝酵素遺伝子の誘導パターンが認められた。すなわち、acute phase では非特異的に多種の代謝酵素の mRNA の誘導がみられたのに対し、sub-chronic phase では、限定した代謝酵素のみの継続的な誘導がみられた。一方、ミクロゾームタンパクにおいては mRNA の変化と異なり sub-chronic phase で有意な増加が確認された。
3. Acute phase では肝臓内で積極的な細胞増殖とアポトーシス、さらには酸化ストレスが生じており、これらの変化は sub-chronic phase では認められなかった。
4. 核内受容体（CAR および PXR）の活性化、代謝酵素誘導、細胞増殖、酸化ストレス、さらにはアポトーシスという一連の細胞内の反応は acute から sub-chronic へと移行する間の大量に投与された薬物を効果的に処理(代謝)するための生体の応急処置的な反応(適応性変化)と考えられた。

第 4 章　肝臓中トランスポーターの発現への影響

第 1 節　緒言

第 2 章により甲状腺ホルモンのクリアランスの上昇が甲状腺腫瘍の形成に関与していることが示唆された。また第 3 章によりクロバザムを投与された動物の肝臓ではいくつかの代謝酵素が強く誘導されていることがわかり、甲状腺ホルモンのクリアランスに肝臓中の代謝酵素の誘導が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、肝臓内の甲状腺ホルモンを効率よく代謝する上で甲状腺ホルモンの肝臓内外への輸送も重要であることから、肝臓における甲状腺ホルモンの取り込みに関与すると考えられている OATP1(organic anion-transporting polypeptide1)、OATP2、OATP4 および NTCP(Na+/taurocholate cotransporting polypeptide)および胆汁排泄に関与すると考えられる MRP2(multidrug resistance-associated protein 2)および BCRP(Breast Cancer Resistance Protein)の遺伝子発現変化を検討し、クロバザム投与により甲状腺ホルモンの代謝に最も寄与するトランスポーターの同定を試みた。

第 2 節　肝臓の甲状腺ホルモン取り込みおよび排出に関わるトランスポーターの発現

材料および方法

1)　被験物質、投与方法および実験デザイン

被験物質および投与方法については第 2 章第 2 節材料および方法 1)を参照。第 2 章の検討からクロバザムの甲状腺への影響は 1 日 1 回の 400 mg/kg の 2 週間投与で 4 週間と同様の傾向があることが明らかになったことから、本検討は 2 週間の反復経口投与で実施し、投与 2 週で動物を剖検し、肝臓サンプルを採取した。

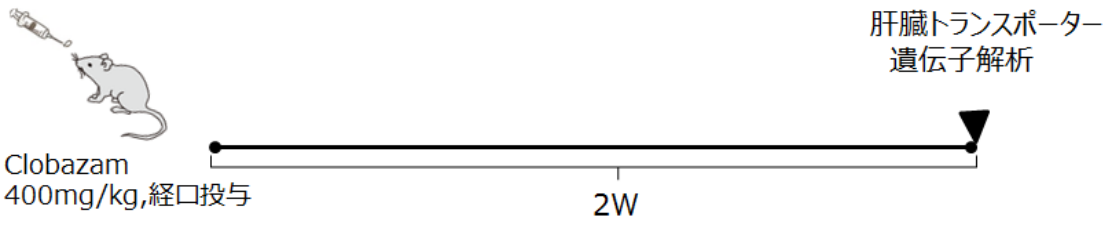

図 16　実験デザイン

2)　使用動物、飼育条件および群構成

第 2 章第 2 節材料および方法 1)を参照。

表 16　群構成

Group	Number of animals
	2week
Control	5
Clobazam 400 mg/kg	5

3)　リアルタイム RT-PCR による肝臓トランスポーターの遺伝子発現変動

第 3 章　第 2 節 7)を参照。

用いたプライマー配列を表 17 および表 18 に示す。

表 17　取込み型トランスポーター(Oatp1,Oatp2,Oatp4 および Ntcp)遺伝子プライマー

Target	GenBank Accession No.	Sequence
Oatp1	NM_017111.1	
Forward primer		5′-TGAGTTTTCTACTGCCCTGTTCAA-3′
Reverse primer		5′-TGAGGTCCTTAAAGAGAAGGTTCCT-3′
Probe		5′-AATGCACACTTCCCTTCCTCGGAATCC-3′
Oatp2	NM_131906.1	
Forward primer		5′-TTTGTGCTTTGGTTGATGATATGA-3′
Reverse primer		5′-ATGACTCCAGGGATGGAAGTTC-3′
Probe		5′-TTTCCTGCTCCAGCCACCATGCC-3′
Oatp4	NM_031650.2	
Forward primer		5′-GGTTGGAATCGCCAAGTTTG-3′
Reverse primer		5′-TTCACAGAGTAGAGGAAAATATAAGAACTGA-3′
Probe		5′-TTTTTCACCTCCTCAGTGGCCTATGCG-3′
Ntcp	NM_017047.1	
Forward primer		5′-CGTATCAGCCCCTTTCAATTTC-3′
Reverse primer		5′-GATGCTAAGCGCCTTGTCTGT-3′
Probe		5′-CGCCTGGCTTTGGCCACCG-3′

Primers shown were created using Applied Biosystems Primer Express Software, version 2.0. Primers for GAPDH gene, the endogenous control, were purchased from Applied Biosystems.

表 18　排出型トランスポーター(Mrp2 および Bcrp)遺伝子のプライマー

Target	GenBank Accession No.	Sequence
Bcrp	NM_181381.2	
Forward primer		5′-TGGCTTCTGGGAAACTCATGT-3′
Reverse primer		5′-ACAGTGGTAACCTGCTGATGCA-3′
Probe		5′-TCATGGCCCAGCACAGAAGGCC-3′
Mrp2	NM_012833.1	
Forward prime		5′- CTGGAGCTGGTTGGAAACTTG -3′
Reverse primer		5′-CGTCCCCGGTTAAGGTTTTT-3′
Probe		5′- CTTCTGTTCCGCCTTGCTGCTGGTTATTTA -3′

Primers shown were created using Applied Biosystems Primer Express Software, version 2.0. Primers for GAPDH gene, the endogenous control, were purchased from Applied Biosystems.

4)　統計処理

各計数値について対照群とクロバザム群で 2 群間の分散の均一性を F 検定により行い、分散が均一の場合には Student の t 検定を、また分散が均一でない場合には Aspin-Welch 検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

結果

1) 取り込み型トランスポーターの発現

Ntcp, Oatp1, Oatp2 および Oatp4 の 4 種の取り込み型トランスポーターについてリアルタイム RT-PCR による mRNA 発現変動の結果を図 17 に示す。各トランスポーターの発現量は対照群を 100%とした時の割合で示した。その結果、Ntcp, Oatp1 および Oatp4 はいずれも対照群との間に差はなかったが、Oatp2 のみ対照群の 2.5 倍以上の上昇を示した。

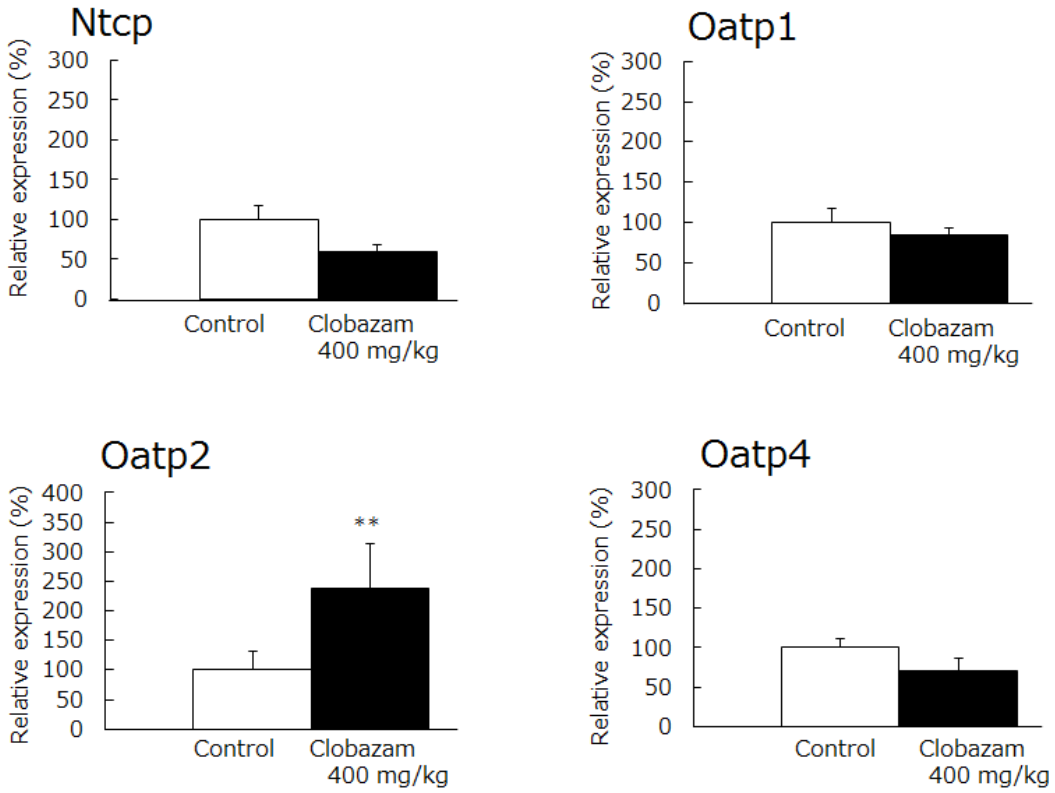

図 17　取り込み型トランスポーターの発現

Result of real-time RT-PCR analysis of Ntcp, Oatp1, Oatp2, and Oatp4 of the liver in rats treated with clobazam (400 mg/kg). The fold change of target mRNA is shown as a ratio of the control calculated with the following formula:

Fold change of target mRNA=R sample /R control

R control = Mean value of (Target products at control /GAPDH products at control)

R sample = Target products /GAPDH products

Data represent the mean ± SD for 5 rats per group.

Significantly different (**; $p<0.01$) from control based on Student's t-test.

2) 排泄型トランスポーターの発現

Mrp2 および Bcrp の 2 種の排泄型トランスポーターについてリアルタイム RT-PCR による mRNA 発現変動の結果を図 18 に示す。各トランスポーターの発現量は対照群を 100%とした時の割合で示した。その結果、Bcrp は対照群との間に差はなかったが、Mrp2 のみ対照群の 2.0 倍以上の上昇を示した。

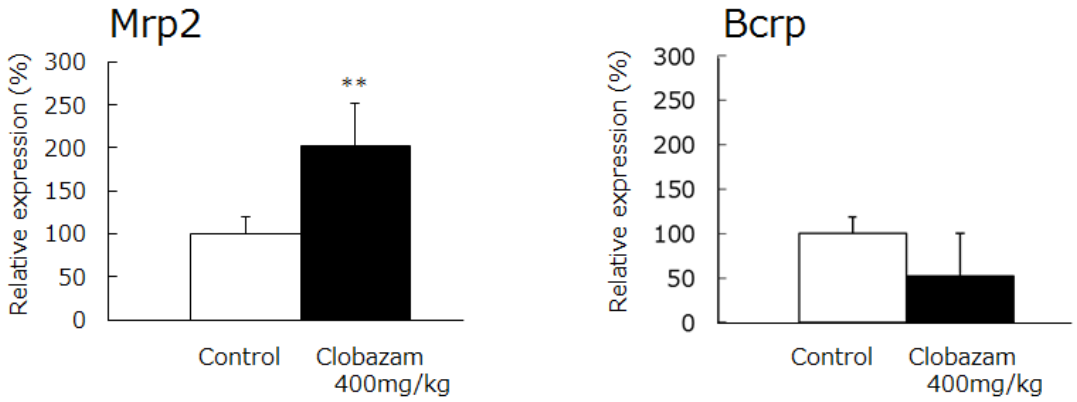

図 18　排泄型トランスポーターの発現

Result of real-time RT-PCR analysis of Mrp2 and Bcrp of the liver in rats treated with clobazam (400 mg/kg). The fold change of target mRNA is shown as a ratio of the control calculated with the following formula: Fold change of target mRNA=R sample /R control

R control = Mean value of (Target products at control /GAPDH products at control)

R sample = Target products /GAPDH products

Data represent the mean ± SD for 5 rats per group.

Significantly different (**; $p<0.01$) from control based on Student's t-test.

第 3 節　考察および小括

I　考察

現在までに甲状腺ホルモンを肝臓中へ輸送するトランスポーターとして OATPs [23)24)]および NTCP[25)]が報告されている。一方、UGT で抱合された甲状腺ホルモンはビリルビンと同様に MRP2[26)]で胆汁中に排泄されることが知られている。今回は同じく一部ビリルビンの排泄に関与するなど、その基質特異性で MRP2 とオーバーラップすることが知られている BCRP[27)]についても検討を加えた。遺伝子発現レベルではあるが、取り込み型トランスポーターについてはクロバザム投与により Oatp2 が有意に増加しその他取り込みトランスポーターに影響はなかった。一方排泄型トランスポーターについては Mrp2 が有意に上昇したものの Bcrp の発現に影響はなかった(図 19)。このことから甲状腺ホルモンの積極的な代謝に関与する分子として甲状腺ホルモンの肝臓への取り込みには OATP2 が、胆汁排泄には MRP2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

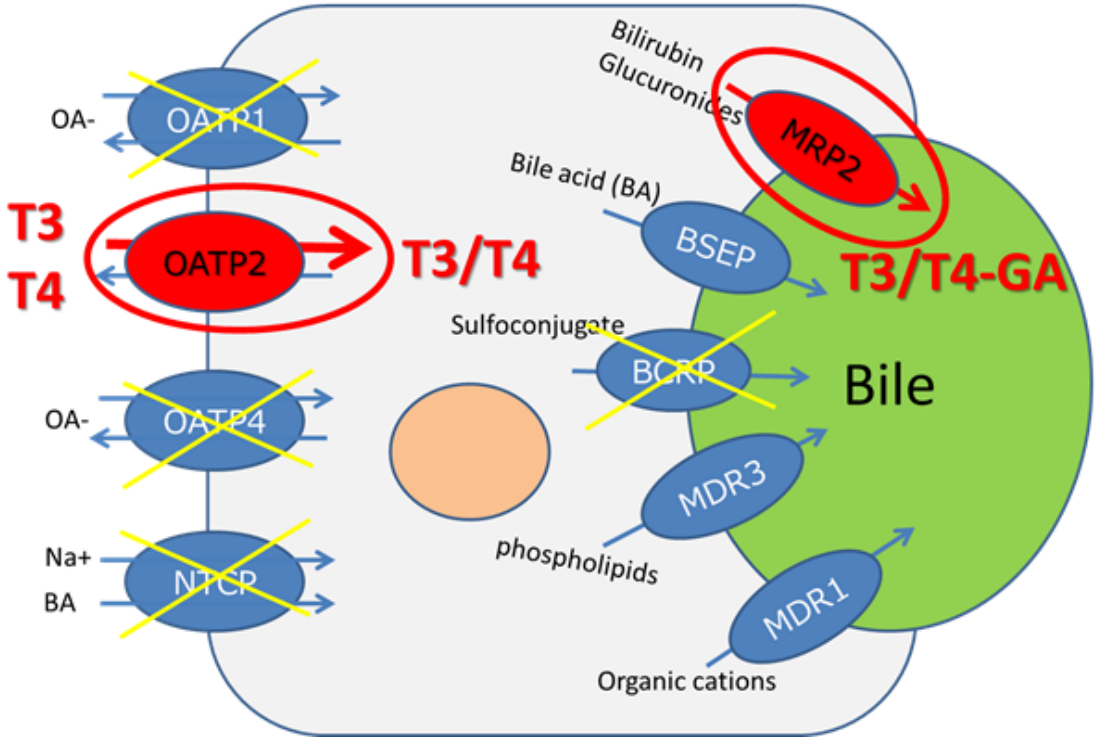

図 19　クロバザムによる肝臓中トランスポーターの発現模式図

II　小括

・クロバザム投与による肝臓中のトランスポーターの遺伝子発現変動の結果から、甲状腺ホルモンの肝臓への取り込みには Oatp2 が、胆汁排泄には Mrp2 がそれぞれ重要な役割を果たしていることが示唆された。

第 5 章　UGT および MRP2 のラット甲状腺腫瘍への直接的な寄与に関する検討

第 1 節　緒言

これまでの検討からクロバザムの甲状腺腫瘍の形成に甲状腺ホルモンの血中クリアランスの亢進が重要であり、それには薬物代謝酵素 CYP2B、CYP3A、UGT1A、UGT2B および取り込み型トランスポーターOATP2 並びに排泄トランスポーターMRP2 の関与が遺伝子の発現の結果から示唆さている。しかし、それら分子が実際に甲状腺腫瘍の形成にどの程度重要なのかは依然不明である。一方、UGT には UGT1A ファミリーと 2B ファミリーが存在し、T4 を主にグルクロン酸抱合し代謝するのは UGT1A との報告もある [28)]。そこで UGT1A1 欠損の Gunn ラットおよび MRP2 欠損の EHBR ラットにクロバザムを投与し、実際に甲状腺腫瘍(過形成)を起こすのかどうかを確認することで UGTs(UGT1A あるいは 2B)および MRP2 の甲状腺腫瘍形成への直接的な寄与を確認することを目的とした。

第 2 節　遺伝子欠損動物(Gunn および EHBR ラット)を用いた検討

材料および方法

1)　被験物質、投与方法および実験デザイン

第 4 章第 2 節材料および方法 1)を参照。

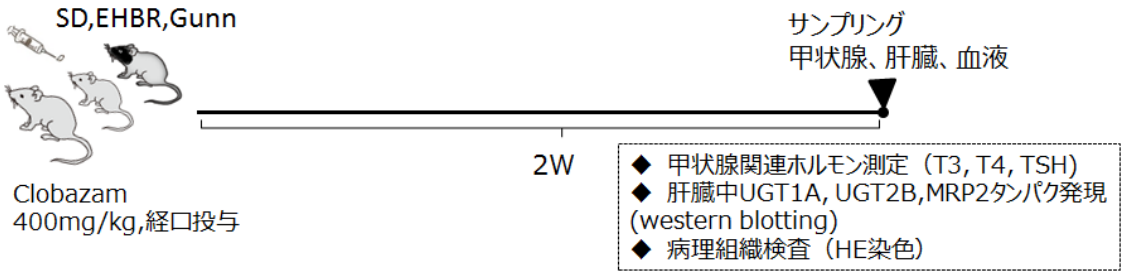

図 20　実験デザイン

2)　使用動物、飼育条件および群構成

動物の使用に関しては大日本住友製薬(株)の実験動物倫理委員会にて承認された。雄の Sprague-Dawley(SLC:SD)、Gunn/SLC-j および EHBR/Eis ラットを 4 週齢で購入し(Japan Slc Inc., Japan)、一週間の馴化後 5 週齢で投与を開始した。各系統の体重範囲は SD ラットで 157.5-196.8 g、EHBR ラットは 150.3-198.6 g および Gunn ラットは 101.1-129.4 g であった。飼育環境は第 4 章第 2 節材料および方法 2)を参照。

表 19　群構成

Group	Number of animals		
	2week		
	SD	EHBR	Gunn
Control	5	5	5
Clobazam 400 mg/kg	5	5	5

3)　血漿 TSH および甲状腺ホルモン測定

ラットの尾静脈より 5mL の血液を採取し、遠心分離(4°C, 1800 g, 10 分)によって血漿を分離し TSH、総 T4(Thyroxine)および総 T3(Triiodothyronine)濃度を測定した。血清 T3 および T4 濃度測定には免疫測定装置(ACCESS2; Beckman Coulter, USA)を使用し、540 nm で各標準品の発光をプロットすることによって、T3 または T4 の標準曲線から各試料中の T3 および T4 濃度を算出した。血清 TSH 濃度は市販の ELISAkit(Rodent TSH ELISA Test Kit(Endocrine Technologies Inc., Newark, USA)を使用し、450 nm での標準試料の吸光度をプロットすることによって標準曲線を作成し、各試料中の TSH 濃度を算出した。

4)　ウェスタンブロット

肝臓のサイトゾル中および膜のタンパク質はそれぞれメーカーのマニュアルに従って、ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit(Calbiochem, Japan)および ProteoExtract 膜貫通タンパク質抽出 Kit(Novagen, Japan)を使用し抽出した。タンパク質濃度は、ブラッドフォード色素法(Bio-Rad Laboratories Inc., Japan)によって決定した。10 μg のタンパク質を 4-12%NuPAGE Bis にロードし、80V で 2 時間電気泳動しタンパクを分離した。得られたゲルをニトロセルロース膜(Millipore, Japan)に転写し、0.02% Tween-20 を含む TBS と 5%脱脂粉乳と共にオーバーナイトでブロッキングした。その後ニトロセルロース膜を 0.1% Tween-20(TBS-T)を含む一次抗体と共に 22°C で 4 時間インキュベートした。使用した一次抗体は、次のとおり。 マウスモノクローナル抗 UGT1A 抗体(希釈 1：500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)、マウスモノクローナル抗 UGT2B 抗体(希釈 1：500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)およびマウスモノクローナル抗 MRP2(希釈 1：200；Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)。試料のゲルローディングは、anti-β-actin モノクローナル抗体(希釈 1 : 1000 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)による再プローブによって確認した。 引き続きニトロセルロース膜を TBS-T で洗浄し、室温で 1 時間の二次抗体(西洋ワサビペルオキシダーゼ共役抗マウス IgG)で反応させた。その後 ECL(GE Healthcare Life Sciences, Japan)でタンパク質バンドは可視化した後、Image J(Scion Corporation, National Institutes of Health, Bethesda, USA)の光学濃度計によってスキャンし分析した。比率変化はコントロール SD ラットの平均値によって補正した。

5) 肝臓および甲状腺重量の測定および病理組織学的検査

2 週間投与の翌日に動物をイソフルラン麻酔下で採血後、放血により安楽死させ解剖した。肝臓および甲状腺(右側)は採取後に重量を計り、その日の動物体重を基に相対臓器重量(g/100g BW または mg/100g BW)を算出した。各個体からの肝臓および甲状腺は 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、ヘマトキシリンとエオシン(HE)で染色し光学顕微鏡検査を実施した。これら HE 染色に加えて甲状腺では細胞増殖能をマウスモノクローナル抗ラット Ki-67 一次抗体(clone : MIB-5, Dako Japan Inc., Japan)の免疫組織化学染色を実施したが、細胞増殖は認められなかった(Data not shown)。

6) 統計解析

動物系統毎に対照群とクロバザム群で 2 群間の分散の均一性を F 検定により行い、分散が均一の場合には Student の t 検定を、また分散が均一でない場合には Aspin-Welch 検定を用いて対照群との比較を行った。いずれの場合も有意水準は 5%とした。

結果

1) 血漿 TSH および甲状腺ホルモン濃度

血漿中 TSH、Total T4 および Total T3 濃度を図 21 に示す。
血漿中 TSH 濃度について SD および Gunn ラットのクロバザム投与群は対照群に比べ有意に高く、それぞれ 440%および 197%であった。一方、EHBR ラットでは TSH 濃度の上昇は認められなかった。血漿中 Total T4 濃度について SD ラットのクロバザム投与群は対照群に比べ 87%と有意な低下を示した。同様に Gunn ラットのクロバザム投与群は対照群に比べ有意ではないものの 90% と低下傾向を示した。一方、EHBR ラットでは変動はなく、対照群と同等であった。血漿中 Total T3 濃度について Gunn ラットのクロバザム投与群は対照群の 87%にまで有意な低下を示したのに対し、SD 系および EHBR ラットでは対照群と同等であった。

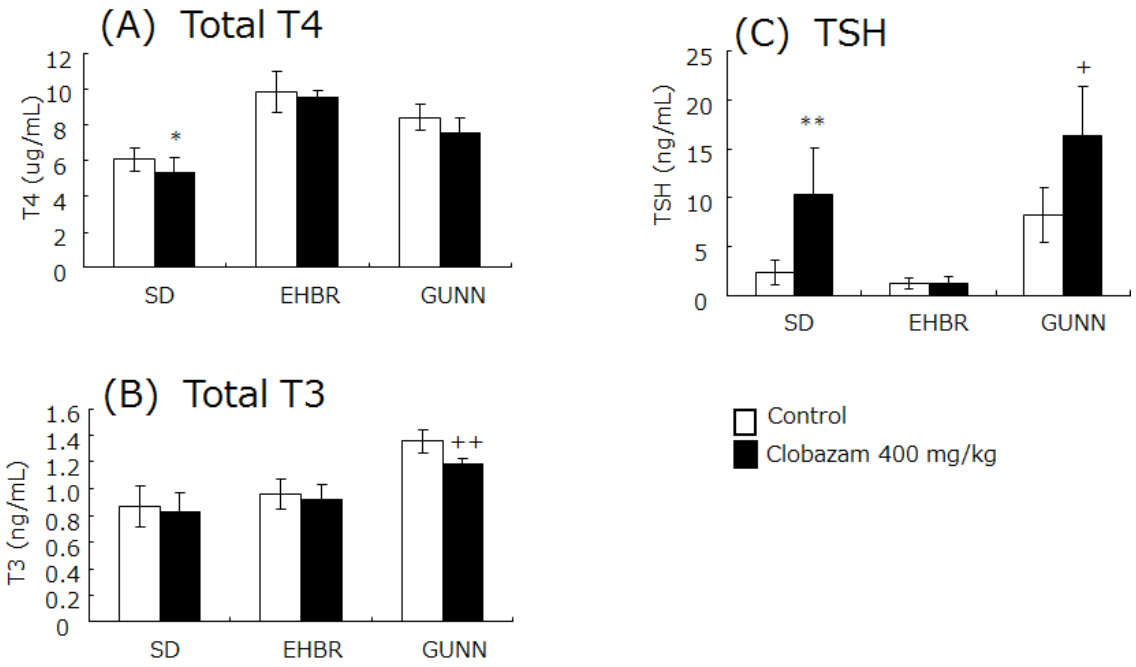

図 21　各動物系統における血漿中 TSH、Total T4 および Total T3 濃度

Plasma T4, free T4, T3 and TSH levels in rats treated with clobazam (400 mg/kg) or the vehicle for 2 weeks.

The parenthesis indicates as follows: (A) Total T4 levels, (B) total T3 levels, and (C) TSH levels. Data are mean ± SD values for 5 rats per group.

Significantly different (* or +; $p<0.05$, ** or ++; $p<0.01$) from each control based on Student's t-test.

2) UGT1A、UGT2B および MRP2 タンパクの発現変化

クロバザム投与による SD、Gunn および EHBR ラットにおける肝臓中 UGT1A、UGT2B および MRP2 タンパク質の発現変動を図 22 に示す。

UGT1A タンパクの発現に関しては、SD および EHBR ラットではそれぞれ約 12 および 4 倍の増加が確認された。Gunn ラットではタンパクの発現は認められなかった。

UGT2B タンパク発現に関しては、クロバザム投与でいずれの系統でも増加したが Gunn ラットでは 4 倍と最も顕著であった。

MRP2 タンパク発現に関しては、SD および Gunn ラットでは、クロバザム投与でそれぞれ約 3 および 2 倍増加した。EHBR ラットではタンパクの発現は認められなかった。

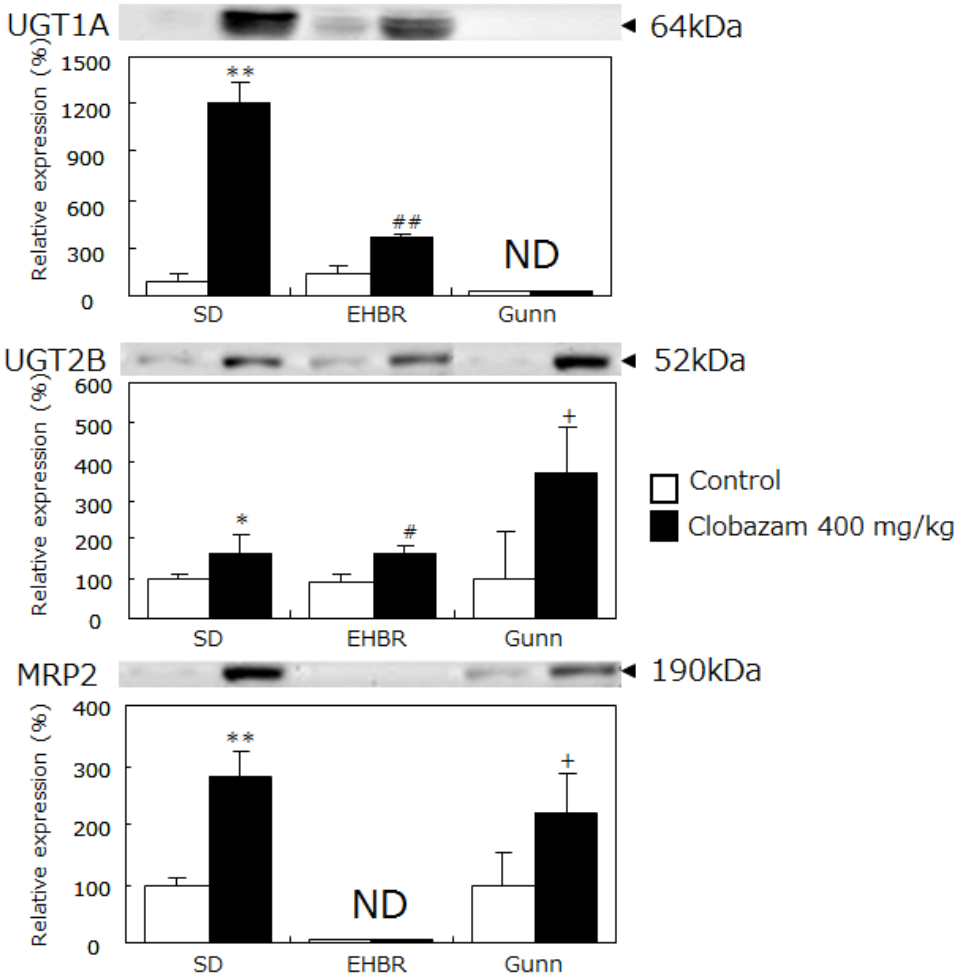

図 22　各動物系統における UGT1A、UGT2B および MRP2 タンパクの発現変化

Results of western blot analysis of UGT1A, UGT2B and MRP2 of the liver in rats treated with clobazam (400 mg/kg). The fold change of target protein is shown as a ratio of the control SD rats. Data represent the mean ± SD for 5 rats per group per strain.

Significantly different (* or # or +; $p<0.05$, ** or ##; $p<0.01$) from each control based on Student's t-test.

3) 肝臓および甲状腺重量

肝臓および甲状腺の重量および最終体重を表 20 に示す。

対照群と比較して、肝重量の有意な増加がクロバザム投与の SD、EHBR および Gunn 全ての系統のラットで認められ、それぞれの対照群との変化量は 131%、122%および 151%であった。一方、甲状腺重量については、対照群と比較してクロバザム投与群の SD ラットでは 120%と有意な増加を示し、同様に Gunn ラットでも 119%と有意ではないものの高値傾向を示した。EHBR ラットでは変化がなかった。

表 20　臓器重量(肝臓および甲状腺)変化

Group and dose		Final body weight g	Liver g%	Thyroid mg%
SD Rat				
	Control	233±15.0	3.43±0.167	5.6±1.49
	Clobazam 400 mg/kg	230±9.3	4.50±0.057** (131%)	6.7±0.41* (120%)
EHBR Rat				
	Control	239±10.9	4.10±0.095	5.0±0.95
	Clobazam 400 mg/kg	228±7.9	5.02±0.141** (122%)	4.9±1.12 (98%)
Gunn Rat				
	Control	148±5.6	3.33±0.080	8.4±0.66
	Clobazam 400 mg/kg	137±7.5*	5.04±0.155** (151%)	10.0±2.25 (119%)

Animals were weighed and necropsied on the day after completion of each treatment regime.

Data represent the mean ± SD of 5 rats per group per strain. The values in parentheses show the percentage of the control.

Significantly different (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$) from each control based on Student's t-test.

4) 肝臓および甲状腺の病理組織学変化

肝臓および甲状腺の病理組織学的検査所見を表 21 に、組織写真を図 23 および 24 に示す。クロバザム投与により SD、Gunn および EHBR 全ての系統のラットの肝臓で小葉中心性肝細胞肥大が認められた。一方、甲状腺濾胞細胞の過形成は SD および Gunn ラットのクロバザム群でのみ認められたが、EHBR ラットでは認められなかった。

表 21　各系統の病理組織学的検査結果(肝臓および甲状腺)

Findings	Number of animals with lesion/number of animals examined					
	SD		EHBR		Gunn	
	Control	Clobazam 400 mg/kg	Control	Clobazam 400 mg/kg	Control	Clobazam 400 mg/kg
Thyroid						
Small follicle	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	2/5
Hyperplasia of follicular cells	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	4/5
Liver						
Hypertrophy of centrilobular hepatocyte	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5

Animals were necropsied on the day after completion of each treatment regime. Specimens of the liver and thyroid from each animal were stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic examination.

Data are shown in the number of animals with findings per 5 rats per strain.

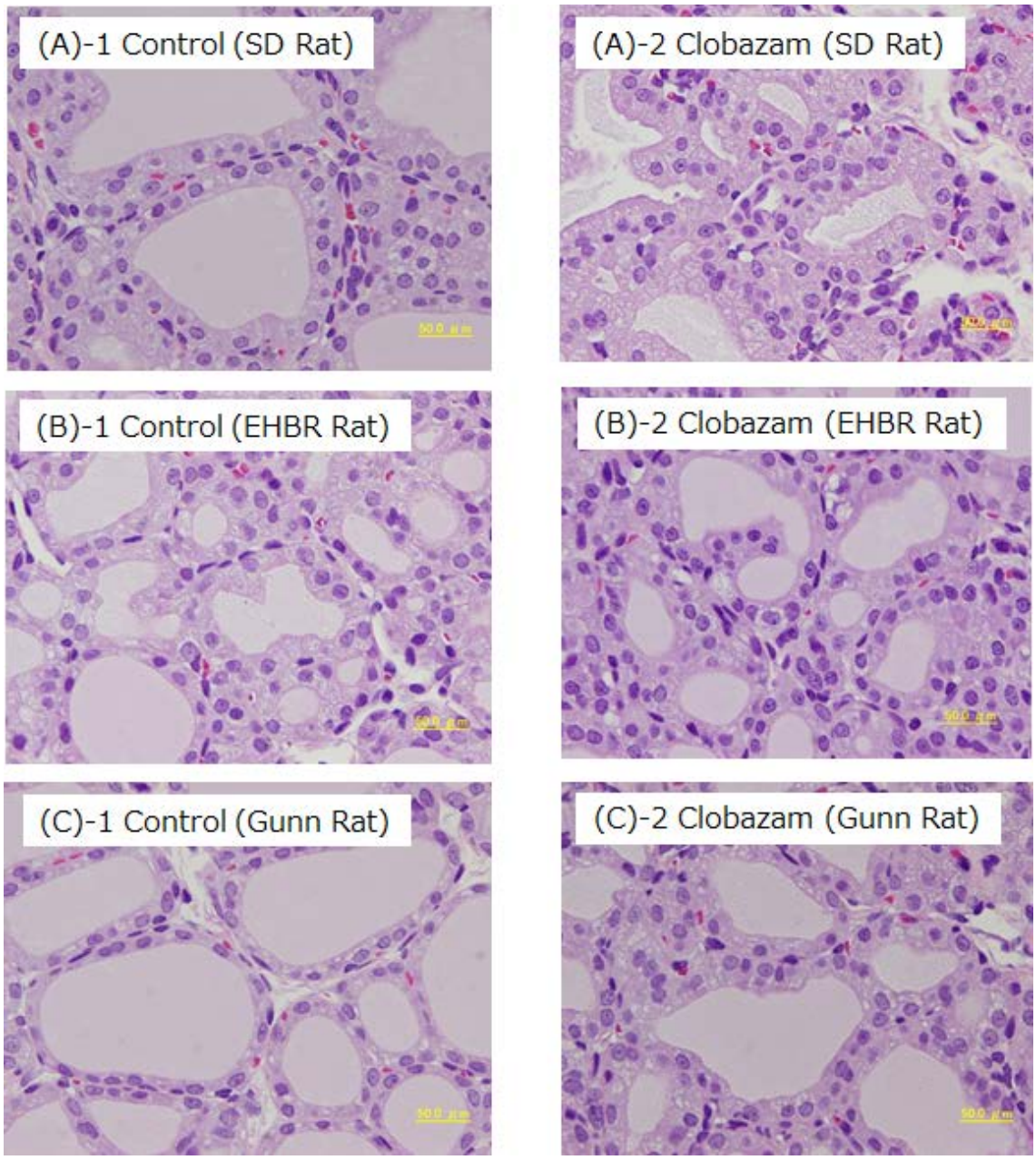

図 23　各系統の動物における甲状腺の形態変化（代表例の病理組織写真)

Photomicrographs of hematoxylin and eosin (HE) stained sections of the thyroid from control (left; A-1, B-1, C-1) and clobazam-treated (right; A-2, B-2, C-2) rats (representative animal with the finding of each group).

The (A) indicates the photomicrographs from SD rats (A-1 control, A-2 clobazam), (B) from EHBR rats (B-1 control, B-2 clobazam), and (C) from Gunn rats (C-1 control, C-2 clobazam). The yellow bar in the each photo is standard of length and indicates 50.0 micro-meters.

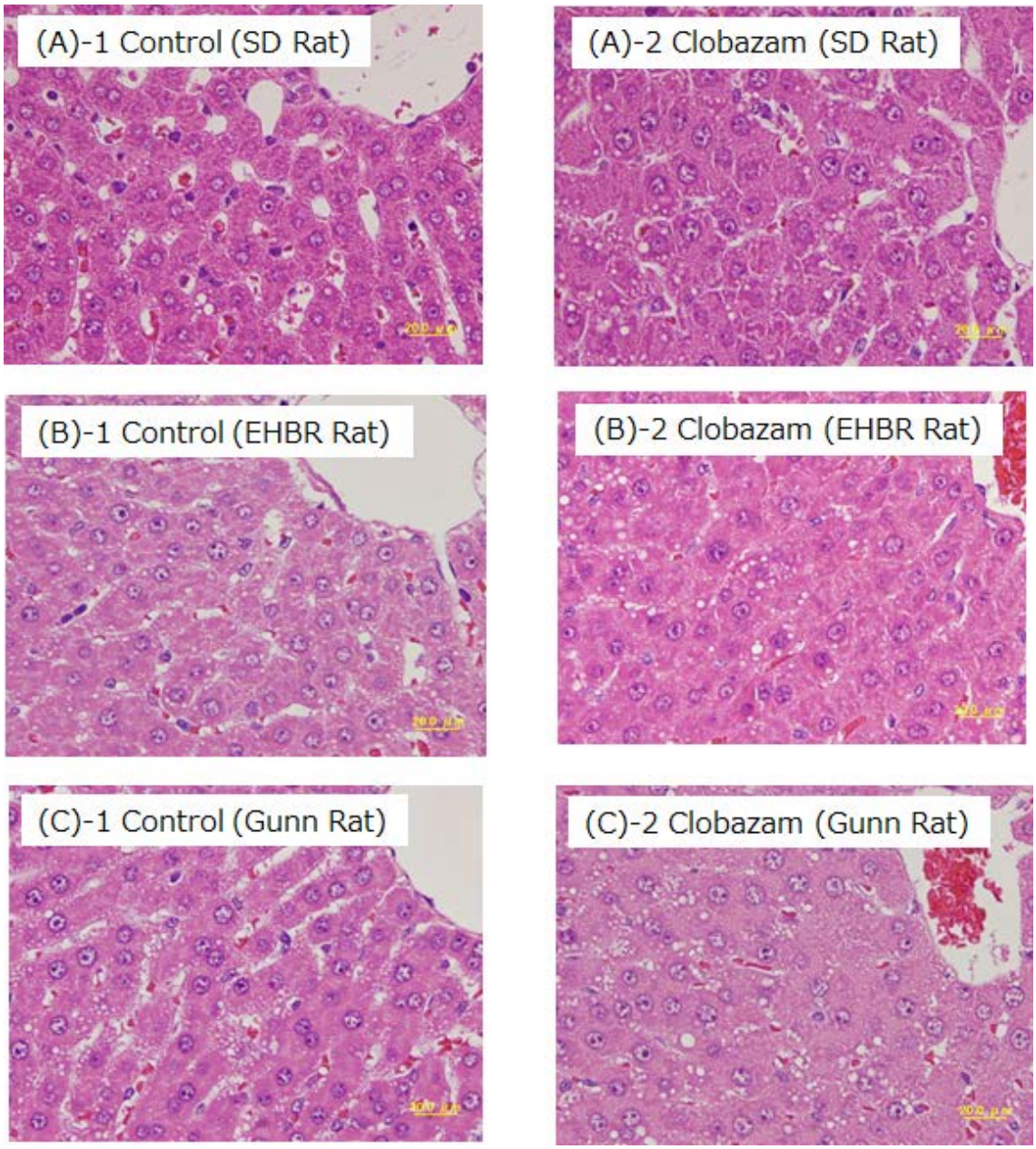

図 24　各系統の動物における肝臓の形態学的変化(代表例の病理組織写真)

Photomicrographs of hematoxylin and eosin (HE) stained sections of the liver from control (left; A-1, B-1, C-1) and clobazam-treated (right; A-2, B-2, C-2) rats (representative animal with the finding of each group).

The (A) indicates the photomicrographs from SD rats (A-1 control, A-2 clobazam), (B) from EHBR rats (B-1 control, B-2 clobazam), and (C) from Gunn rats (C-1 control, C-2 clobazam). The yellow bar in the each photo is standard of length and indicates 20.0 micro-meters.

第 3 節　考察および小括

I 考察

クロバザムによるラットの甲状腺腫瘍の形成に甲状腺ホルモンの血中クリアランスの上昇が重要であり、それには薬物代謝酵素 CYP2B、CYP3A、UGT1A、UGT2B および取り込み型トランスポーターOATP2 および排泄トランスポーターMRP2 の関与が重要であることを示してきた。本章では UGT1A1 欠損の Gunn ラットおよび MRP2 欠損の EHBR ラットにクロバザムを投与し、実際に甲状腺腫瘍(過形成)を起こすのかどうかを確認することで UGTs(UGT1A あるいは 2B)および MRP2 の甲状腺腫瘍形成への直接的な寄与を確認した。実験は上記ラットにクロバザムを 2 週間反復経口投与し、甲状腺関連ホルモン(T3, T4 および TSH)を測定するとともに UGT1A、UGT2B および MRP2 タンパクの発現を確認し、肝臓および甲状腺重量の測定および病理組織学的検査を実施した。実際のホルモン測定値においては系統毎で各ホルモンの Basal レベルに差があったが、別途実施した甲状腺機能の評価（TRH 刺激によるホルモン生成反応）で、いずれの系統の動物も甲状腺機能は正常であることが確認されている（大日本住友製薬(株)　社内資料）。本検討においては各系統の対照群とクロバザム投与群との差異で評価し、その結果 SD ラットと Gunn ラットではクロバザム投与による血中甲状腺ホルモン(T3 ないしは T4)の有意な減少と TSH の有意な上昇が認められた。さらに甲状腺重量の増加を伴った甲状腺ろ胞上皮の過形成が認められた。このことから、甲状腺上皮の過形成は TSH による甲状腺への過剰な刺激によることが示された。さらにウェスタンブロットによるタンパクの発現解析において、SD および EHBR ラットではクロバザム投与により UGT1A も UGT2B もその高発現が確認されたが、Gunn ラットでは UGT1A が発現していなかったのに対し、UGT2B の顕著な高発現が確認された。一方、血中甲状腺ホルモン(T3 および T4)の変化については、SD ラットと Gunn ラットの間で少し異なっていた。すなわち SD ラットでは T4 の方が T3 よりも低下していたのに対し、Gunn ラットでは T3 の方が T4 よりも低下する傾向にあった。T4 は UGT2B よりむしろ UGT1A によって専ら抱合されるのに対し、T3 は UGT2B でより抱合されることが報告されている [28)29)]。このことより今回の結果は Gunn ラットで強く誘導された UGT2B よって主に T3 が抱合を受け、効果的に抱合された T3 の胆汁中への排泄が亢進したものと考えられた。一方、EHBR ラットでは他の 2 つの系統とは違って、クロバザム投与により T3 および T4 の有意な減少は起こらず、生体にとって積極的に T3 ないしは T4 を補充する必要がないことから TSH の上昇も起こらなかった。さらに EHBR ラットでは甲状腺の病理像においても過形成を呈さず、このことは甲状腺腫瘍の形成に TSH の甲状腺への過剰刺激が重要という先行研究とは矛盾はないと考えられた。

ラットの UGT における基質特異性の堅牢性についてはこれまで知られていないが、今回の Gunn ラットの結果は甲状腺ホルモンのホメオスタシスの維持のために UGT2B が部分的に UGT1A の機能を補っていたことを示唆していた。一方 MRP2 については内因性基質(例えば、T3 および T4 とその抱合型代謝産物)の胆汁排泄担うことが知られており、代表的な酵素誘導剤である PB および PCN を投与されたラットにおいては MRP2 の高発現と甲状腺ホルモンの胆汁排泄の増加が相関することが報告されている [30)31)]。これらの報告からも酵素誘導

剤によるラットの甲状腺腫瘍形成における MRP2 の役割の重要性が理解できる。

各系統の動物における上記変化を基に甲状腺腫瘍形成における UGT1A や 2B、さらには MRP2 の役割を考えると、まず UGT1A を欠損している Gunn ラットでタンパクレベルでの UGT2B の発現と血漿中 T3 の低下が引き起こされ、甲状腺の過形成が誘発されていたということは、甲状腺ホルモンの代謝における UGT1A の機能を UGT2B が代償していたものと考えられた。一方、MRP2 を欠損した EHBR ラットにおいてはタンパクレベルでの UGT1A や UGT2B の発現上昇が確認されたにも関わらず甲状腺関連ホルモンや甲状腺の病理組織には変化が認められなかった。このことは抱合された甲状腺ホルモンの胆汁中への排泄を担う MRP2 が欠損することにより、効果的な甲状腺ホルモンの代謝排泄を困難にし、血中の甲状腺ホルモンの減少が起こらずに甲状腺への正の刺激となる TSH の上昇にまで至らなかったことによると考えられた。これらのことから MRP2 の発現がクロバザム投与による甲状腺ホルモンのクリアランスの律速となり、甲状腺腫瘍の形成において最も重要な因子であることが明らかになった。

II 小括

SD ラット、EHBR ラットおよび Gunn ラットのクロバザム投与後の甲状腺の病理組織変化、甲状腺関連ホルモン(T3、T4 および TSH)変化および UGT1A、UGT2B および MRP2 タンパクの発現変化を表 22 にまとめた。

・SD および Gunn ラットでは血中甲状腺ホルモンの減少および TSH の増加を伴った甲状腺への影響がみられた。

・UGT1A を欠損している Gunn ラットでは UGT2B の高発現が観察された。

・MRP2 を欠損した EHBR ラットでは UGT1A および UGT2B が誘導されているにも関わらず甲状腺関連ホルモンの変動を伴わずに甲状腺への影響はなかった。

上記の結果から UGT はそれぞれの分子種 1A および 2B が補完的に協働し甲状腺ホルモンの代謝を行うことが示唆された。また甲状腺腫瘍の形成には、MRP2 の発現が重要であることが示唆された。

表 22　SD ラット、EHBR ラットおよび Gunn ラットにおける変化のまとめ

	SD (Normal)	EHBR (*Mrp2*欠損)	Gunn (*Ugt 1a*欠損)
甲状腺過形成	＋	－	＋
T3/T4	－/↓	－/－	↓/－
TSH	＋	－	＋
UGT1A	↑↑↑	↑↑	－
UHT2B	↑	↑	↑↑↑
MRP2	↑↑	－	↑

第 6 章　総合考察および結論

本研究は抗てんかん薬クロバザムを非遺伝毒性甲状腺腫瘍誘発物質の代表として用い、甲状腺の代謝排泄にかかわる酵素やトランスポーターに注目し研究することで、非遺伝毒性の甲状腺腫瘍形成への重要な因子を明らかにすることを目的として検討を行った。まずクロバザムの短期投与により甲状腺濾胞腺腫の前段階である甲状腺濾胞細胞の過形成が起こることを示し、その機序として血中甲状腺ホルモンのクリアランスの増加が重要であることを明らかにすることで、本研究目的に合致した甲状腺過形成モデルの妥当性を示した(第 2 章)。続いてクロバザム投与後の肝臓の薬物代謝酵素の mRNA の発現変動より核内受容体 CAR および PXR の活性化に引き続く CYP2B、CYP3A および UGT の発現上昇が血中甲状腺ホルモンのクリアランスに重要な役割を果たしている可能性を見出した(第 3 章)。一方、肝臓内の甲状腺ホルモンの取り込みや排泄にも注目し、肝臓への取り込みおよび排泄型トランスポーターの mRNA の変化から OATP2 および MRP2 の発現上昇が血中甲状腺ホルモンのクリアランスに重要な役割を果たしている可能性を見出した(第 4 章)。第 5 章では Mrp2 を欠損した EHBR ラットおよび Ugt1A を欠損した Gunn ラットを用いて実際にラット甲状腺腫瘍形成における MRP2 および UGT1A の直接な寄与について検討した。その結果、Gunn ラットでは甲状腺濾胞細胞過形成が発現し、UGT はそのサブファミリーにおいて 1A と 2B が補完的に甲状腺ホルモンの代謝に関与していることを明らかにした。一方 EHBR ラットでは甲状腺濾胞細胞過形成が発現せず、血中甲状腺ホルモンの排泄に MRP2 の寄与が大きいことを明らかにした。上記一連の検討結果から図 25 に示すようなクロバザムによる甲状腺腫瘍形成機序が推定された。すなわち、クロバザム投与により肝臓中の核内受容体 CAR および PXR が活性化され、その下流遺伝子である Ugt1a、Ugt2b が誘導され、肝臓内の甲状腺ホルモンのグルクロン酸抱合が亢進、増加した抱合体は同様に発現誘導された MRP2 により積極的に胆汁中に排泄される。これら甲状腺ホルモンの肝臓内フローには OATP2 が重要な役割を果たし、血中からの甲状腺ホルモンの肝臓内への取り込みを担うことで効率的な甲状腺ホルモン取り込み—代謝—胆汁排泄のサイクルが形成するものと考えられた。クロバザムの慢性投与期間中は上記サイクルが継続することで生体内では血中で減少する甲状腺ホルモンを補うべく下垂体へのネガティブフィードバックが起こり過剰な TSH の継続的な放出が引き起こされる。この過剰な TSH の慢性刺激により甲状腺は機能肥大を起こし、病理学的には甲状腺濾胞細胞の過形成が観察される。一般的に過形成は腺腫(adenoma)、腺がん(carcinoma)へと進展する前段階の病理変化と考えられている [8)]。本研究により甲状腺ホルモン代謝におけるグルクロン酸抱合においては UGT1A と 2B が補完的にあるいは協調しながら代謝を進めるのに対し、抱合された甲状腺ホルモンの胆汁中への排泄には MRP2 が単独で働いている可能性が示唆され、MRP2 の発現の程度がラットにおける甲状腺の腫瘍形成において最も重要な役割を果たしている可能性が高いことを提唱できた。一方、ヒトとの種差について、MRP2 の基質となる物質の胆汁排泄率はラットが他の種に比較して最も高く、タンパク発現量においてもラットが最も多く、ヒトが最も低いことが報告されている [32)]。これらのことから MRP2 の生理学的な違いがラットとヒトとの甲状腺腫瘍形成における種差の大きな原因であると考えられた。

本研究によりラットにおける間接作用による甲状腺腫瘍形成における重要な因子の推定

に成功し、これは今後のヒトとラットの甲状腺発がんの種差を明らかにする上での重要な知見となると考えられ、今後の有望な医薬品創出への貢献が期待できるものである。

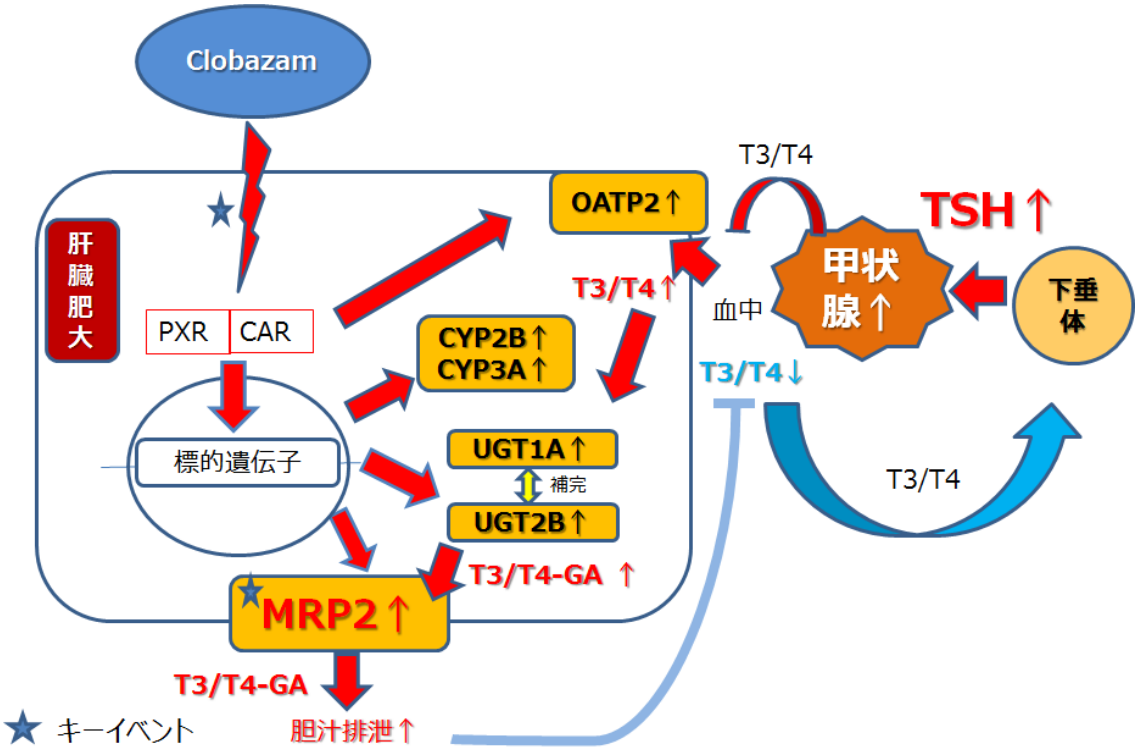

図 25　クロバザムによる甲状腺腫瘍発生のメカニズム(まとめ)
肝臓での核内受容体(CAR および PXR)の活性化と MRP2 の発現上昇がキーイベントである。

謝辞

本学位論文は、大日本住友製薬株式会社　研究本部　前臨床研究所において長期にわたり行われた研究をまとめたもので、本研究を遂行するにあたり非常に多くの方々から絶大なるご指導とご協力を頂いた。ここに記して心からの謝意を表する。

本論文をまとめるにあたり、終始あたたかいご指導とご教示を賜った大阪大学　大学院薬学研究科　生体機能分子化学分野教授　八木清仁先生に深甚なる謝意を表する。

論文の内容に関して有益なご助言を賜った大阪大学　大学院薬学研究科　細胞生理学分野教授　辻川和丈先生、大阪大学　大学院薬学研究科　神経薬理学分野教授　橋本均先生に謝意を表する。

本研究の動物実験、生化実験および病理実験において絶大なるご支援とご協力を頂いた大日本住友製薬(株)安全性第 1 および第 2 グループの皆様ならびに㈱LSI メディエンス森安眞津子氏に心から感謝する。

参考文献

1) 甲状腺癌 メルクマニュアル18版 日本語版

2) 光武範吏　日本甲状腺学会雑誌 Vol. 1 No. 2 pp.105-108, 2010

3) Hood A, Liu J, Klaassen CD., Effects of phenobarbital, pregnenolone-16alpha-carbonitrile, and propylthiouracil on thyroid follicular cell proliferation., Toxicol Sci., 50(1), pp.45-53, 1999

4) Capen, CC., Pathophysiology of chemical injury of the thyroid gland., Toxicol. Lett., 64-65, pp. 381–388,1992

5) Jahnke GD, Choksi NY, Moore JA, Shelby MD., Thyroid toxicants: assessing reproductive health effects. Environ Health Perspect., 112(3), pp.363-368, 2004

6) Dellarco VL, McGregor D, Berry SC, Cohen SM, Boobis AR., Thiazopyr and thyroid disruption: case study within the context of the 2006 IPCS Human Relevance Framework for analysis of a cancer mode of action., Crit Rev Toxicol., 36(10), pp.793-801, 2006

7) Principles for the testing and evaluation of drugs for carcinogenicity.
Report of a WHO scientifi c group. World Health Organ. Tech Rep Ser., 426, pp.5-26, 1969

8) 細田泰弘、イラスト病理学　第5版　文光堂

9) Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N., The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance., Endocr. Rev., 24 (1), pp.48–77, 2003

10) Mansourian AR., Metabolic pathways of tetraidothyronine and triidothyronine production by thyroid gland., Pak J Biol Sci., 14(1), pp.1-12, 2011

11) Owen NV, Griffing WJ, Hoffman DG, Gibson WR, Kiplinger GF.,
Dichlorophenobarbital-induced centrilobular hypertrophy of hepatocytes and enzyme induction in the rat., Vet Pathol., 12(1), pp.67-68. 1975

12) Diwan BA, Henneman JR, Nims RW, Rice JM., Tumor promotion by an anticonvulsant agent, phenytoin, in mouse liver: correlation with CYP2B induction., Carcinogenesis., 14 (11), pp.2227-2231, 1993

13) Staudinger J, Liu Y, Madan A, Habeebu S, Klaassen CD., Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor., Drug Metab Dispos. 29, pp.1467-1472, 2001

14) Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, Guzelian PS, Evans RM., Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. Genes Dev., 14, pp.3014-3023, 2000

15) Wei P, Zhang J, Dowhan DH, Han Y, Moore DD., Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response., Pharmacogenomics J., 2, pp.117-126, 2002

16) Meyer zu Schwabedissen HE, Kim RB, Hepatic OATP1B transporters and nuclear receptors PXR and CAR: interplay, regulation of drug disposition genes, and single nucleotide polymorphisms., Mol Pharm., 6, pp.1644-1661, 2009

17) Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Müllauer L, Taper H, Huber W, Bursch W, Schulte-Hermann R., Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression., Hepatology., 25, pp.906-12, 1997

18) Hasmall, S. C., Roberts, R. A., The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics. Pharmacol Ther., 82, pp.63-70, 1999

19) Berman JS, Hiley CR, Wilson AC., Comparison of the effects of the hypolipidaemic agents ICI53072 and clofibrate with those of phenobarbitone on liver size, blood flow and DNA content in the rat., Br J Pharmacol., 78, pp.533-541.

20) Moody DE, Rao MS, Reddy JK., Mitogenic effect in mouse liver induced by a hypolipidemic drug, nafenopin., Virchows Arch B Cell Pathol. 23, pp.291-296, 1977

21) Schulte-Hermann R, Hoffman V, Parzefall W, Kallenbach M, Gerhardt A, Schuppler J., Adaptive responses of rat liver to the gestagen and anti-androgen cyproterone acetate and other inducers. II. Induction of growth. Chem Biol Interact. 31, pp.287-300, 1980

22) Bursch W, Düsterberg B, Schulte-Hermann R., Growth, regression and cell death in rat liver as related to tissue levels of the hepatomitogen cyproterone acetate., Arch Toxicol., 59, pp.221-227, 1986

23) Abe T, Kakyo M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert SC, Matsuno S, Kondo H, Yawo H., Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2., J. Biol. Chem., 28, pp.22395-22401, 1998

24) Cattori V, Hagenbuch B, Hagenbuch N, Stieger B, Ha R, Winterhalter KE, Meier PJ., Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (rlst-1) in rat liver., FEBS Lett., 474, pp.242-245, 2000

25) Visser WE, Wong WS, van Mullem AA, Friesema EC, Geyer J, Visser TJ., Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family., Mol Cell Endocrinol., 315(1-2), pp.138-145, 2010

26) Johnson DR, Klaassen CD., Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways., Toxicol. Sci., 67, pp.182-189, 2002

27) Vlaming ML, Pala Z, van Esch A, Wagenaar E, de Waart DR, van de Wetering K, van der Kruijssen CM, Oude Elferink RP, van Tellingen O, Schinkel AH., Functionally overlapping roles of Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) in the elimination of methotrexate and its main toxic metabolite 7-hydroxymethotrexate in vivo., Clin Cancer Res., 15(9) , pp.3084-3093, 2009

28) Beetstra, J.B., Engelen J.G., Karels, P., Hoek, H.J., Jong, M., Docter, R., Krenning, E.P., Hennemann, G., Brouwer, A., Visser, T.J., Thyroxine and 3,3’, 5-triiodothyronine are glucuronidated in rat liver by different uridine diphosphate-glucuronyltransferases., Endocrinology 128, pp.741-746, 1991

29) Visser, T.J., Kaptein, E., Gijzel, A.L., de Herder, W.W., Ebner, T., Burchell, B., Glucuronidation of thyroid hormone by human bilirubin and phenol UDP-glucuronyltransferase isoenzymes., FEBS Lett. 324, pp.358-360, 1993

30) Johnson, D. R., Habeebu, S. S., and Klaassen, C. D., Increase in bile flow and biliary excretion of glutathione-derived sulfhydryls in rats by drug-metabolizing enzyme inducers is mediated by multidrug resistance protein 2., Toxicol Sci 66, pp.16-26, 2002

31) Keppler, D., Leier, I., and Jedlitschky, G., Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2., Biol Chem 378, pp.787-791, 1997

32) Li M1, Yuan H, Li N, Song G, Zheng Y, Baratta M, Hua F, Thurston A, Wang J, Lai Y., Identification of interspecies difference in efflux transporters of hepatocytes from dog, rat, monkey and human., Eur J Pharm Sci. 35, pp. 114-26, 2008