

博士論文

高脂肪食給餌マウスにおける
thioacetamide 誘発肝細胞壊死
減弱メカニズムの解析

白井 真人

目次

緒論.....	1
第一章 高脂肪食給餌マウスにおける thioacetamide 誘発肝細胞壊死の減弱.....	4
序.....	4
材料と方法.....	5
結果.....	11
考察.....	13
第二章 高脂肪食給餌マウスにおける thioacetamide 誘発肝細胞壊死減弱への肝臓 glutathione の関与.....	28
序.....	28
材料と方法.....	29
結果.....	35
考察.....	39
第三章 高脂肪食給餌マウスにおける thioacetamide 誘発肝細胞壊死減弱への肝臓 p38 mitogen-activated protein kinase の関与.....	57
序.....	57
材料と方法.....	59
結果.....	62
考察.....	64
総括.....	74
謝辞.....	77
参考文献.....	78

緒論

ヒトを含む動物が摂取した薬物は主に肝臓で代謝を受ける。多くの薬物は経口摂取後、消化管で吸収された後にまず肝臓へと運ばれ、肝細胞に豊富に含まれる薬物代謝酵素によって薬物代謝を受ける [1, 2]。肝臓は他にもエネルギー代謝、リポタンパク代謝、ビリルビン代謝、胆汁酸合成、タンパク合成・分泌、尿素合成、ビタミン貯蔵・代謝など多くの生体維持に必須の機能を発揮していることから、生体の恒常性維持に果たす役割は極めて大きい[1]。一方で、肝臓は薬物の毒性標的となりやすく、薬物誘発性肝毒性は医薬品の開発上大きな問題のひとつであり、販売中止の主要原因である[3]。そのため、薬物誘発性肝毒性の機序を解明し、開発候補化合物の肝毒性誘発ポテンシャルについての予測精度を上げることは、医薬品開発の成功確率向上のために必須である。

薬物誘発性肝毒性の機序の一つとして薬物代謝の関与が挙げられる。肝臓での薬物代謝は cytochrome P450 (CYP) などの酵素により加水分解、酸化、還元を行う第 I 相代謝反応と、糖や硫酸、glutathione (GSH) などにより抱合を行う第 II 相代謝反応に分けられる[4]。薬物代謝は有害な異物を無毒化するための生体防御機構であると考えられるが、薬物代謝により毒性の高い反応性代謝物が生成されることで肝毒性を発揮することがある[2]。例えば、肝毒性誘発薬剤として動物実験で多用される thioacetamide (TA) は肝臓中の CYP2E1 によってまず thioacetamide sulfoxide (TASO) に代謝され、その後と同じく CYP2E1 により反応性代謝物である thioacetamide disulfoxide (TASO₂) に変換される[5, 6]。TASO₂ は肝臓中のタンパク質などの生体高分子に共有結合することで[5-7]、酸化ストレスの増加、炎症、DNA 鎖の断裂などを起こし、最終的に肝細胞壊死を誘発する[8-10]。また、野生型のマウスと CYP2E1 ノックアウトマウスに同用量の TA を投与すると、野生型のマウスでは重篤な肝細胞壊死が誘発されるのに対してノックアウトマウスでは肝毒性が起らないことから、TA 誘発肝細胞壊死には CYP2E1 に

よる TA の代謝が必須であると考えられている[11]。TA と同じく汎用される肝毒性誘発薬剤 acetaminophen、carbon tetrachloride も肝臓の CYP により反応性代謝物に代謝されることで毒性を発揮する[12, 13]。このように薬物代謝による反応性代謝物生成は薬物誘発性肝毒性発現機序の一つであると考えられる。

細胞の機能障害や毒性には細胞内シグナル伝達の変化も関与していることが知られている[14]。その 1 例として p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) の関与が挙げられる。p38 MAPK は MAPK ファミリーに属するキナーゼで、細胞外の様々なストレスや刺激により Thr-Gly-Thr モチーフがリン酸化を受けることによって活性化される[15, 16]。p38 MAPK は炎症を始め、細胞容積の変化、アポトーシス、細胞増殖、細胞骨格の変化、糖新生など多くの細胞反応に関連している[16-19]。また、carbon tetrachloride や ethanol の単独投与あるいは lipopolysaccharide と D-galactosamine の併用投与によって肝臓の壊死が起こるが、この際にも p38 MAPK が活性化する[20-22]。さらに、ethanol と Fas アゴニスト作用を持つ抗体の併用投与、pyrazole と lipopolysaccharide の併用投与、あるいは虚血再還流による肝壊死が、p38 MAPK 阻害剤投与により減弱することも報告されている[23-25]。このように p38 MAPK は薬物誘発肝毒性に深く関与すると考えられる。

肝臓は肝毒性に対して様々な防御機構を持つが、その一つとして glutathione (GSH) による抗酸化作用が挙げられる[26, 27]。GSH は glutamate、cysteine および glycine から合成され、抗酸化作用を発揮した後は酸化型である glutathione disulfide へと変換される[26-28]。薬物投与後に発生する酸化ストレスは薬物誘発性肝毒性に深く関与することが知られており[8, 9, 12]、GSH による酸化ストレスの抑制が毒性発現の程度に影響すると考えられる。また、GSH は常に肝細胞内で合成されており、マウスの半減期は 145 分と比較的短い[29]。したがって、肝臓の GSH 量や合成・代謝の状態によって、薬物誘発性肝毒性に対する感受性が変わりうると考えられる。

以上のように、薬物誘発肝毒性の感受性に影響する因子は複数存在するが、これらは健常動物と病態モデル動物の間でその活性化や発現量が異なる可能性が想定される。例えば、非アル

コール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) モデル動物の肝臓では、CYP2E1 の発現亢進[30]、GSH 量の低下[31]、代償性肝細胞増殖の不全[32]などの異常を示すことも報告されている。このように健常動物と病態モデル動物では薬物誘発性肝毒性の感受性に差がある場合があると予想されるにも関わらず、製薬会社で行う薬物誘発性肝毒性評価は健常動物を用いて実施するのが一般的であり、病態モデル動物を用いて実験した報告は少ない。そこで、本研究では NAFLD の病態モデル動物である高脂肪食給餌マウス (HFD マウス) [33, 34]に着目して薬物誘発性肝毒性の実験を行った。

本研究の第一章では HFD マウスと比較対照のげっ歯類用標準飼料給餌マウス (ND マウス) に TA を単回投与し、肝臓の病理組織学的検索および総 GSH 量の測定を行った。次いで、第二章では HFD マウスと ND マウスに TA を単回投与し、肝臓の酸化ストレス測定と GSH 代謝物の metabolomics 解析を行った。また、HFD マウスに GSH 合成阻害薬である L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO) を処置した上で TA を投与し、肝細胞壊死と肝臓の酸化ストレスの程度について BSO 未処置 TA 投与 HFD マウスと比較した。さらに、第三章では HFD マウスと ND マウスに TA を単回投与し、肝臓の p38 MAPK の発現を検索した。加えて、ND マウスに p38 MAPK の特異的な阻害薬である SB203580 hydrochloride (SB) を TA と併用投与し、肝細胞壊死の程度について SB 未処置 TA 投与 ND マウスと比較した。

各章の結果から、HFD マウスでは ND マウスと比較して TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが明らかになり、また HFD マウスの肝臓では TA 投与後に GSH の合成が亢進して TA 誘発酸化ストレスが打ち消されること、および p38 MAPK が速やかに不活性化することが TA 誘発肝細胞壊死の減弱に寄与していることが示唆された。

第一章 高脂肪食給餌マウスにおける thioacetamide 誘発肝細胞壊 死の減弱

序

非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) は先進国において罹患率が高く[35]、アメリカ合衆国では成人の 3 人に 1 人が罹患しているという報告もある[36]。NAFLD は肝細胞内の異常なトリグリセリドの蓄積を特徴の一つとする疾患である[35]。NAFLD の病態モデル動物の肝臓では、cytochrome P450 (CYP) 2E1 の発現亢進[30]、glutathione (GSH) 量の低下[31]、代償性肝細胞増殖の不全[32]などの異常を示すことも報告されている。このように NAFLD モデル動物の肝臓では薬物誘発性肝毒性に対する反応が健常動物とは異なる可能性が示唆されているにもかかわらず、NAFLD モデル動物における薬物誘発性肝毒性の報告は少ない。そこで本章では、NAFLD モデル動物である高脂肪食給餌マウス (HFD マウス) [33, 34]に、肝毒性物質として広く実験に使用されている thioacetamide (TA) を投与し、その肝毒性について実験を行った。TA は肝臓において主に CYP2E1 によって thioacetamide sulfoxide (TASO)、そして反応性代謝物である thioacetamide disulfoxide (TASO₂) に代謝され、これが肝細胞を傷害するため小葉中心性壊死が起こる[5, 11, 37]。

本章では、TA 誘発肝細胞壊死の程度が HFD マウスでげっ歯類用標準飼料給餌マウス (ND マウス) と比較して変化するかを検索した。

材料と方法

動物

3 週齢の雄 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー（横浜）から購入した。マウスは室温 21~25℃、湿度 40~65%、照明 12 時間/日の環境下で飼育し、水道水を自由摂取させた。飼料はげっ歯類用標準飼料として CRF-1（オリエンタル酵母工業、東京）あるいは高脂肪食として 60 kcal%の脂肪を含有する High Fat Diet 32（日本クレア、東京）を自由摂取させた。体重は 2 週間に 1 回測定した。

本章で行った動物実験は第一三共株式会社実験動物委員会の倫理審査により承認されたものであり、動物の愛護及び管理に関する法律および第一三共株式会社の動物実験に関する標準操作手順書に準拠して行った。

TA 投与と採材

8 週間の給餌後、HFD マウスと ND マウスを毒性評価群と血漿中薬物濃度測定群に分けた。TA 投与マウスには生理食塩水に溶解した TA（和光純薬工業、大阪）を、TA 非投与マウスには媒体である生理食塩水を単回腹腔内投与した。TA の用量は、ND マウスを用いて社内で実施した予備的な実験で投与 8 時間後にごく軽度の肝細胞壊死、投与 24 および 48 時間後に重度の肝細胞壊死を誘発することから 50 mg/kg とした。毒性評価群については、TA 非投与マウスは投与 24 時間後に、TA 投与マウスは投与 8、24 および 48 時間後にジエチルエーテル（和光純薬工業）麻酔下の放血による安楽死処置後、剖検した。また、安楽死処置の際に、TA 非投与マウスからは血液化学検査用の血液を採取し、血漿サンプルを調整した。血漿中薬物濃度測定群については、TA 投与 5、15、30、60、120 および 180 分後にマウスの尾から採血し、血漿サン

プルを調整した。なお、薬物濃度測定用の採血後、全ての血漿中薬物濃度測定群のマウスにジエチルエーテル麻酔下の放血による安楽死処置を行った。

毒性評価群の全てのマウスから病理組織学的検査用に肝臓外側左葉と内側右左葉を採材し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。残りの肝臓は薬物代謝酵素および GSH の測定に使用するために、液体窒素で凍結し-80°C で保存した。

血液生化学的検査

TA 非投与マウスから採取した血漿サンプルについて、TBA-200FR（東芝メディカルシステムズ、栃木）を使用してグルコース（GLC）、総コレステロール（TCHO）およびトリグリセリド（TG）値を測定した。

病理組織学的検査

ホルマリン固定した肝臓サンプルを常法に従ってパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。TA 誘発肝細胞壊死は、病変の程度がごく軽度の場合は小葉中心静脈に隣接する肝細胞に限局しており、かつ病変がみられる小葉の数も少数である。肝細胞壊死が重度になると、病変が小葉中心域（zone 3）から小葉中間帯（zone 2）、そして小葉辺縁域（zone 1）まで広がり、小葉のほとんどを占めるようになる。これらの病変分布の特徴を踏まえ、TA 誘発肝細胞壊死を以下のようにグレーディングした。なお、変化が認められない場合は grade 0 とした。

grade 1: 壊死が zone 3 および zone 2 にとどまり、観察した 3 つの葉（外側左葉、内側右葉、内側左葉）において 5 つ未満の小葉でのみ観察される。

grade 2: 壊死が zone 3 および zone 2にとどまり、3つの葉において5つ以上の小葉に観察される。あるいは zone 1 まで達する壊死が3つの葉において5つ未満の小葉にのみ観察される。

grade 3: zone 1 まで達する壊死が3つの葉において5つ以上の小葉に観察される。1つの葉での壊死が占める割合は33%未満である。

grade 4: 1つの葉での壊死が占める割合は33%以上66%未満である。

grade 5: 1つの葉での壊死が占める割合は66%以上である。

また、肝細胞の脂肪化を確認する目的で、TA 非投与 HFD マウスのホルマリン固定された肝臓を O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン、東京）を用いて凍結包埋し、Oil Red O 染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。

免疫染色

TA 非投与マウスで CYP2E1 免疫染色を行った。免疫染色には Dako EnVision system（ダコ・ジャパン、東京）を用いた。抗原賦活化はオートクレーブ処理（121°C, 20 分）で行った。抗 CYP2E1 ウサギポリクローナル抗体（Chemicon International、Temecula、CA、USA）を一次抗体として用いた。発色には 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride（同仁化学研究所、熊本）を用いた。

TA および TASO の血漿中濃度測定

20 μ L の血漿を 100 μ L のメタノールと混和後に 4°C、20,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を回収した。高速液体クロマトグラフィー（HPLC、Waters、東京）を用いて、上清中の TA およびその代謝物である TASO を測定した。HPLC の条件は以下のとおりである。

カラム：L-column ODS (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm, 12 nm, Chemicals Evaluation and Research Institute, 東京)、カラム温度：25°C、移動相：50 mM 硫酸ナトリウムおよび 50 mM リン酸カリウムバッファー/アセトニトリル (97/3, v/v)、流速：0.85 ml/min
注入量：10 μL、UV 検出器波長：212 nm

なお、TASO が代謝されてできる反応性代謝物である TASO₂ は測定不能と判断し、評価は行わなかった。

肝臓のサイトゾルおよびミクロソーム画分調整

TA 非投与マウスの肝臓を 1.15% 塩化カリウム水溶液でホモジナイズし、4°C、9,000×g で 20 分間遠心分離した。上清をさらに 4°C、105,000×g で 60 分間遠心分離し、上清をサイトゾル画分、沈渣を 20% グリセロール加 1.15% 塩化カリウム水溶液で再懸濁したものをミクロソーム画分とした。なお、タンパク濃度測定については、Lowry らが報告した方法[38]に従い、牛血清アルブミンを標準とした。

Western blot 解析

glutathione S-transferase (GST) の解析には、サイトゾル画分をタンパク濃度が 2 mg/ml となるように 1.15% KCl で希釈して使用した。CYP2E1 の解析には、ミクロソーム画分をタンパク濃度が 3 mg/ml になるように 20% グリセロール加 1.15% 塩化カリウム水溶液で希釈した。それぞれの画分について、GST 解析用は 1 mg/ml、CYP2E1 解析用は 1.5 mg/ml になるように Tris-SDS beta-mercaptoethanol sample loading buffer (コスモ・バイオ、東京) で再度希釈した。サンプルは 95°C で 5 分間加温したのち、GST については 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル (EASY-GELL, フナコシ、東京) で、CYP2E1 については 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル (EASY-GELL, フナコシ、東京) を用いて電気泳動した。泳動条件はプレステインド SDS-

PAGE スタンダード (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) の泳動状況を参考に決定した。泳動後に Immobilon PVDF Transfer Membrane (第一化学薬品、東京) に転写した。転写した膜を以下の一次抗体、次いで二次抗体として biotin-labeled anti-rabbit IgG antibody (GE Healthcare、東京)、HRP 標識ストレプトアビジン (GE Healthcare)、および ECD Western blotting detection reagent (GE Healthcare) と順次反応させた。一次抗体には、抗 CYP2E1 抗体 (Chemicon International)、抗 GSTA1、GSTA2、GSTA3、GSTA4、GSTP1 抗体 (Proteintech Group、Chicago, IL、USA) および抗 GSTM1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA、USA) 抗体を用いた。

サイトゾル画分の GST 活性測定

過去の報告[39]を参考に、前述のサイトゾル画分と基質として 1-chloro-2,4,-dinitrobenzene (CDNB)、1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) あるいは ethacrynic acid (EA) (和光純薬) を用いた。それぞれの基質がグルタチオン抱合を受けると、抱合されたモル数に応じて基質特異的な波長の吸光度が変化するが、この変化を吸光度計で測定した。GST 活性は 1 分あたり 1 mg の肝臓タンパクによって抱合された基質のモル数で表した。

肝臓 GSH 測定

肝臓中の総 GSH 量と酸化型 GSH である glutathione disulfide (GSSG) の測定を Bioxytech GSH/GSSG-412 assay kit (OXIS International, Foster City, CA, USA) を用いメーカーの取扱説明書に従って行った。

統計学的方法

結果は平均値±標準偏差 (SD) で示した。結果については、まず *F* test で等分散性を確認し (有意水準 : 0.25)、その後に Student's *t*-test (等分散である場合) あるいは Aspin-Welch *t*-test

(等分散でない場合) で有意差検定を行った。これらの解析には Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft、Seattle、WA、USA) を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

結果

HFD マウスの体重、血液生化学値、剖検所見および肝臓の病理組織像

HFD マウスの体重は、給餌開始 2 週間後の 5 週齢時で ND マウスよりも有意に高値となり、8 週間後の 11 週齢時では ND マウスの 1.39 倍となった (Figure 1-1)。11 週齢時の血液生化学検査において、HFD マウスは ND マウスと比較して血漿中の GLC、TCHO が高値で TG が低値であった (Table 1-1)。剖検時の観察において、HFD マウスでは ND マウスと比較して腎臓周囲あるいは腸間膜の脂肪が増加しており、肝臓は黄色を呈していた。肝臓の病理組織学的検査では、HFD マウスで主に zone 3 の肝細胞の細胞質に Oil Red O 染色陽性の小型の脂肪滴が認められたが、その他の病変は観察されなかった (Figure 1-2-B、Table 1-2)。これらの結果から、8 週間の高脂肪食給餌は、雄 C57BL/6J マウスに肥満および脂肪肝を誘発することが分かった。

TA 投与マウスの肝臓の病理組織像

TA 投与 8 時間後において、肝細胞壊死が HFD マウスおよび ND マウスで観察されたが、その程度は軽度であった (Figure 1-2-C、1-2-D、Table 1-2)。TA 投与 24 時間後では、5 例中 3 例の ND マウスで広範な肝細胞壊死が認められ、1 例は剖検前に瀕死となったのに対し、HFD マウスでは肝細胞壊死は ND マウスより軽度で、瀕死および死亡は認められなかった (Figure 1-2-E、1-2-F、Table 1-2)。投与 24 時間後に認められた HFD マウスと ND マウスの肝細胞壊死の差は、投与 48 時間後も同様であった。また、TA 投与 8 時間後から 48 時間後において、肝細胞壊死に加えて肝細胞腫大が観察されたが、HFD マウスでは ND マウスと比べて腫大の程度が重度であった (Figure 1-2-C、1-2-D、1-2-E、1-2-F、1-2-G、1-2-H)。

CYP2E1 タンパクの発現

TA 非投与群の肝臓を用いて CYP2E1 の免疫染色および Western blot 解析を行ったところ、免疫染色では HFD マウスの肝臓で ND マウスよりも広い領域で CYP2E1 が発現し (Figure 1-3-A、1-3-B)、Western blot 解析では、HFD マウスの肝臓で ND マウスと比較して約 2 倍量の CYP2E1 タンパクが発現していることが明らかになった (Figure 1-4-A、1-4-B)。

GST タンパクの発現および活性

TA 非投与群の肝臓を用いて GST タンパクの発現および活性解析を行った。Western blot 解析により、GSTA1、GSTA2、GSTA3、GSTA4、GSTP1 および GSTM1 の肝臓におけるタンパク発現量を確認したところ、ほとんどの GST タンパクで HFD マウスの方が ND マウスと比較して少なかった (Figure 1-4-A、1-4-B)。また、GST 活性についても、HFD マウスでは ND マウスと比較して有意に低かった (Figure 1-5)。

総 GSH および GSSG 量

肝臓の総 GSH 量は、TA 投与 8 時間後において、HFD マウスで ND マウスと比較して有意に低値であった (Figure 1-6-A)。酸化型 GSH である GSSG については、TA 投与にかかわらず HFD マウスと ND マウスの間で差はみられなかった (Figure 1-6-B)。

TA および TASO の血漿中濃度

TA および TASO の血漿中濃度について HFD マウスと ND マウスとの間で統計解析はしていないものの明らかな差はみられなかった。いずれのマウスでも、TA の血漿中濃度は TA 投与 5 分後に、TASO の血漿中濃度は TA 投与 60 分後にそれぞれピークに達した (Figure 1-7)。

考察

HFD マウスは脂肪肝を起こすことが知られており、NAFLD のモデル動物としてしばしば使用されている[33, 34]。また、HFD マウスの肝臓では CYP2E1 の発現亢進[30]、GSH 量の低下[31]、代償性肝細胞増殖の不全[32]などの異常を示すことも報告されている。これらのことから、HFD マウスは肝臓 CYP2E1 により代謝されて肝毒性を発揮する化合物に対して感受性が高いと推測される。TA はそのような肝毒性物質であり、TA が肝毒性を発揮するためには、CYP2E1 によって TA から TASO に、そして TASO から TASO₂ に代謝される必要がある[5, 6, 11]。TASO₂ は反応性代謝物で、タンパク質などの生体高分子との共有結合[5, 7]、酸化ストレス発生と脂質過酸化[8, 10, 11]を起こすことが報告されている。また、CYP2E1 の誘導剤を前投与することで TA 誘発肝毒性が増悪し[37]、CYP2E1 欠損マウスでは TA は肝毒性を示さないことから、TA 誘発肝毒性発現における CYP2E1 の重要性が推定される[11]。

ところが、予想に反して ND マウスでは比較的重度の肝細胞壊死が発生したのに対し、HFD マウスでは壊死の程度が軽度だった。前述したとおり、TA 誘発肝毒性の発現には CYP2E1 が深く関与することから、もし HFD マウスで CYP2E1 の発現が低下するのであれば TA 誘発肝細胞壊死の減弱の一要因になると考えられた。しかしながら、肝臓の CYP2E1 タンパクの発現量は HFD マウスで ND マウスよりも多く、また CYP2E1 が発現している肝小葉内の領域も HFD マウスの方がより広範であった。したがって、CYP2E1 は HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死の減弱には関与していないと考えられた。

薬物への曝露は毒性を決定する要因の一つである。本章の実験では親水性化合物である TA を腹腔内投与したが、HFD マウスは内臓脂肪の増加による TA の吸収抑制や体重の増加による分布容積の増加などにより、TA あるいは TASO への曝露が低下した可能性が想定された。しかしながら、本章の結果、血漿 TA および TASO 濃度の推移について HFD マウスと ND マウス

の間で統計解析はしていないものの明らかな差は無かったことから、TA あるいは TASSO への曝露低下も HFD マウスの肝細胞壊死減弱の要因ではないと考えられた。

GST などの第 II 相代謝酵素は抱合反応による解毒に関与している。また、肝臓あるいは肝細胞中の GSH が TA 投与後に減少することが示唆されている[10, 40]。そこで、HFD マウスでは GST の変化によって TA の解毒能が増加し、肝細胞壊死減弱が起ったという可能性について検証した。その結果、HFD マウスでは ND マウスと比較して多くの GST 種でタンパク発現量が減少していることが明らかになった。さらに、3 つの異なる基質を用いた GST 活性解析の結果でも、HFD マウスは ND マウスより GST 活性が低かった。したがって、GST も HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死の減弱には関与していないと考えられた。

GSH は抱合反応に関与するだけでなく、酸化ストレスの抑制に重要な役割を果たしている[27, 41, 42]。一方、TA 投与により、肝臓の酸化ストレスが増加することが報告されており[8, 10, 11]、肝臓あるいは肝細胞中の GSH が TA 投与後に減少することも示唆されている[10, 40]。また、Stankova らは TA 曝露肝細胞において、細胞内の GSH 濃度が減少し、細胞外の GSSG 濃度が増加することを報告している[40]。本章の実験結果から、TA 投与 8 時間後に HFD マウスでは ND マウスと比較して総 GSH が有意に低値となったが、GSSG には変化が無かった。したがって、HFD マウスでは ND マウスよりも GSH によるスカベンジャー作用が亢進し、酸化ストレスが抑制されて TA 誘発肝細胞壊死が減弱するとともに、その過程でより多くの細胞内の GSH が GSSG として細胞外に排出されて肝臓から失われる可能性が考えられた。

HFD マウスでは、TA 投与による肝細胞壊死が減弱する代わりに肝細胞腫大が重度であった。TA 投与により HFD マウスで肝細胞腫大が起こることの生物学的意義や肝細胞腫大と壊死との関連については不明であるが、毒性病理学的見地からは HFD マウスで観察された TA 誘発肝細胞腫大は毒性変化であり、浸透圧調整の異常あるいは細胞内小器官の異常があると推測された。電子顕微鏡学的検査などを行うことで、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞腫大のよりの確な解釈が可能になると考えられる。

本章の実験結果から、HFD マウスでは ND マウスと比べて TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが明らかになった。また、その機序として GSH の関与が示唆された。NAFLD モデル動物における薬物誘発性肝毒性の研究は少ないため、更なる実験を行って HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱のメカニズムを明らかにする必要があると考えられた。

Table 1-1. Effects of high-fat diet feeding on blood chemistry

Diet	GLC (mg/dL)	TCHO (mg/dL)	TG (mg/dL)
ND	257.7 ± 37.54	92.7 ± 3.21	80.7 ± 18.56
HFD	358.3 ± 43.99 *	183.6 ± 6.65 **	25.8 ± 9.74 **

The number of mice was 4 in each diet group. *, **: $p < 0.05$ or $p < 0.01$ versus ND mice, respectively (Student's *t*-test). Modified with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.

Table 1-2. Histopathological scores of hepatocellular necrosis after TA administration

	hr after TA administration			
	Vehicle	8 hr	24 hr	48 hr
ND mice				
Number of mice	4	4	5 ^a	6
Incidence ^c	4, 0, 0, 0, 0	3, 1, 0, 0, 0, 0	0, 0, 2, 0, 0, 3 ^b	0, 0, 3, 2, 1, 0
Mean score	0.0 ± 0.00	0.3 ± 0.50	3.8 ± 1.64	2.7 ± 0.82
HFD mice				
Number of mice	4 ^d	4	6	6
Incidence ^c	4, 0, 0, 0, 0, 0	2, 2, 0, 0, 0, 0	0, 0, 4, 1, 1, 0	0, 0, 5, 1, 0, 0
Mean score	0.0 ± 0.00	0.5 ± 0.58	2.5 ± 0.84	2.2 ± 0.41

Vehicle: The mice necropsied at 24 hours (hr) after vehicle administration. 8 to 48 hr: The mice necropsied at 8 to 48 hr after TA administration, respectively. Mean score represents the mean of grades ± S.D. a: The number of the ND mice was 5 because of accidental death of one animal. b: One mouse showing severe necrosis (grade 5) was moribund at 24 hr after TA administration. c: The numbers show the number of the mice showing each grade of hepatocellular necrosis (0 to 5, from the left to the right). d: The livers of all the vehicle-treated HFD mice showed fatty change of hepatocytes. Modified with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. J Toxicol Pathol 26: 175-186, 2013.

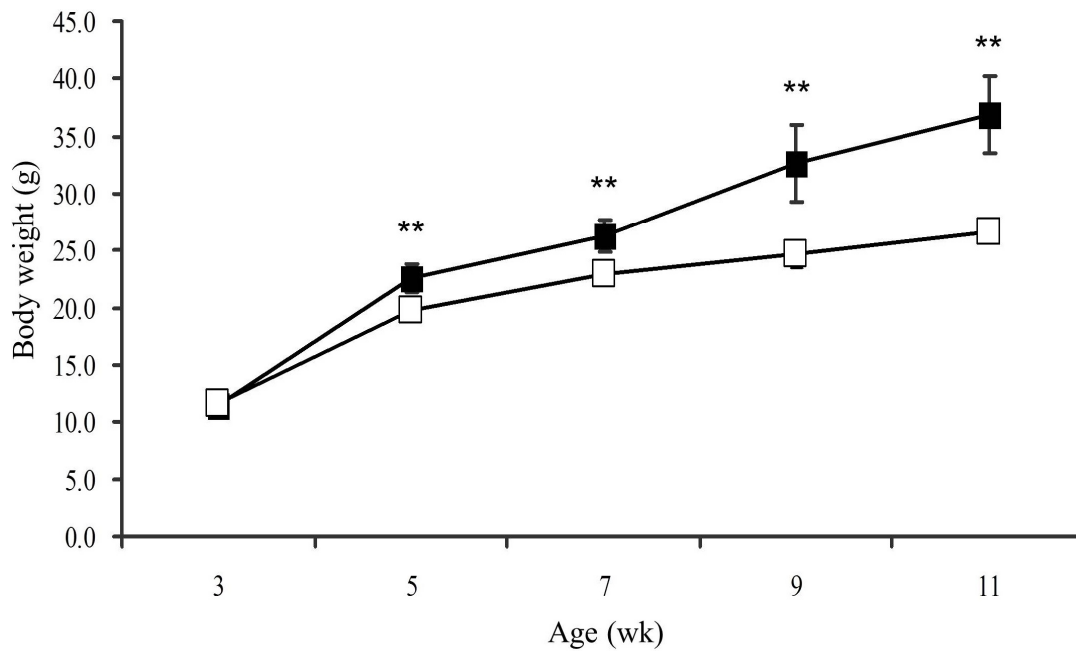
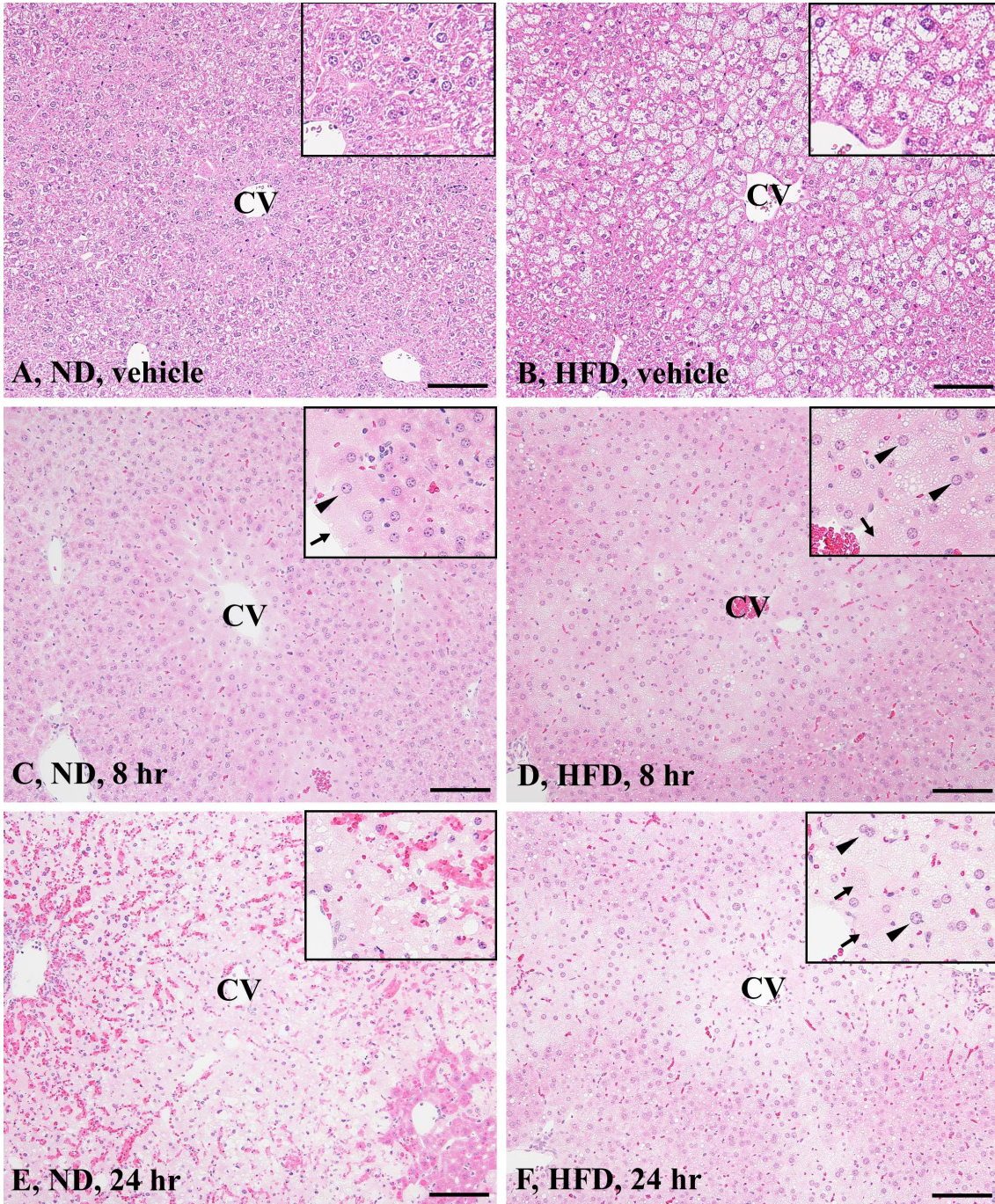


Figure 1-1. Body weights in the HFD mice and the ND mice. The number of the HFD mice was 34, 34, 30, 18 and 16 at 3, 5, 7, 9 and 11 weeks (wk) of age, respectively, and the number of the ND mice was 34, 34, 29, 16 and 16 at 3, 5, 7, 9 and 11 wk of age, respectively. Black squares show the mean body weights of the HFD mice, and white squares show those of the ND mice. ** $p < 0.01$ versus the weight of age-matched the ND mice (Aspin-Welch t -test). Reproduced with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.



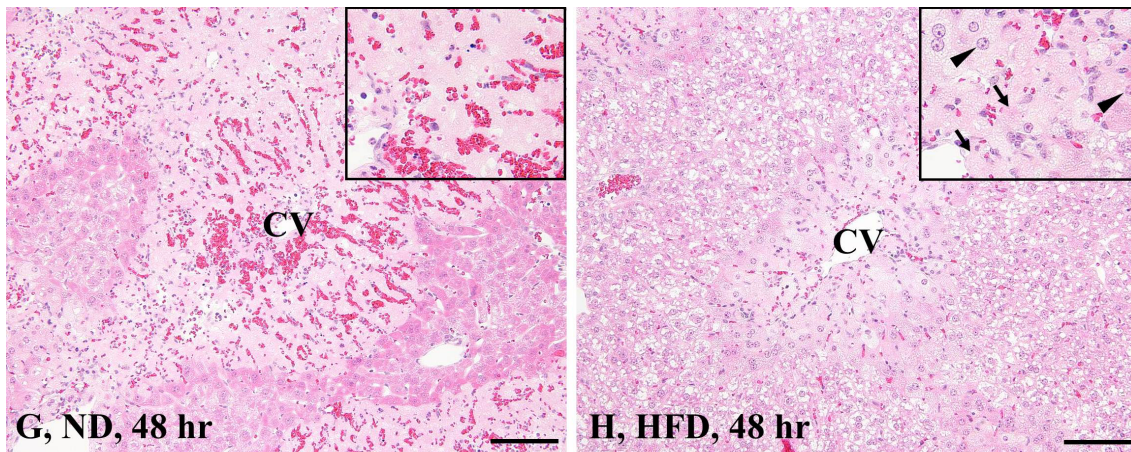


Figure 1-2. Typical hepatic histopathological lesions in the vehicle-treated mice and the mice necropsied at 8, 24 and 48 hr after TA administration. A: The liver of the vehicle-treated ND mouse. B: The liver of the vehicle-treated HFD mouse. C, E and G: The livers of the ND mice at 8, 24 and 48 hr after TA administration, respectively. D, F and H: The livers of the HFD mice at 8, 24 and 48 hr after TA administration, respectively. High power appearances around the central vein are shown in the inset in each figure. In comparison to the ND mice, the grade of hepatic necrosis was decreased in the HFD mice. Necrotic (arrows) and swollen (arrowheads) hepatocytes are indicated. CV: central vein, HE stain, bar = 200 μ m. Reproduced with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.

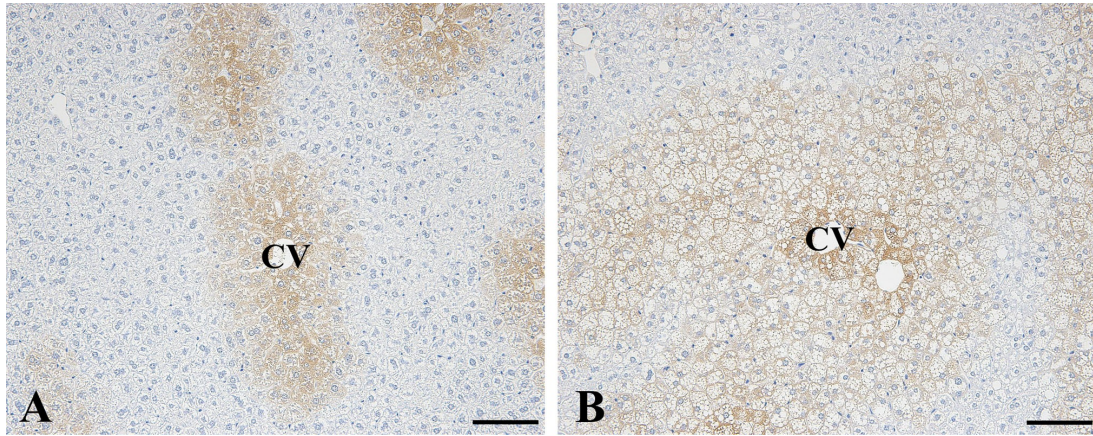


Figure 1-3. Immunohistochemistry for CYP2E1 in the livers of the vehicle-treated mice. A: The liver from the vehicle-treated ND mouse. B: The liver from the vehicle-treated HFD mouse. CYP2E1-positive hepatocytes are expanded more widely in the HFD mouse than the ND mice. CV: central vein, bar = 200 μ m. Reproduced with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.

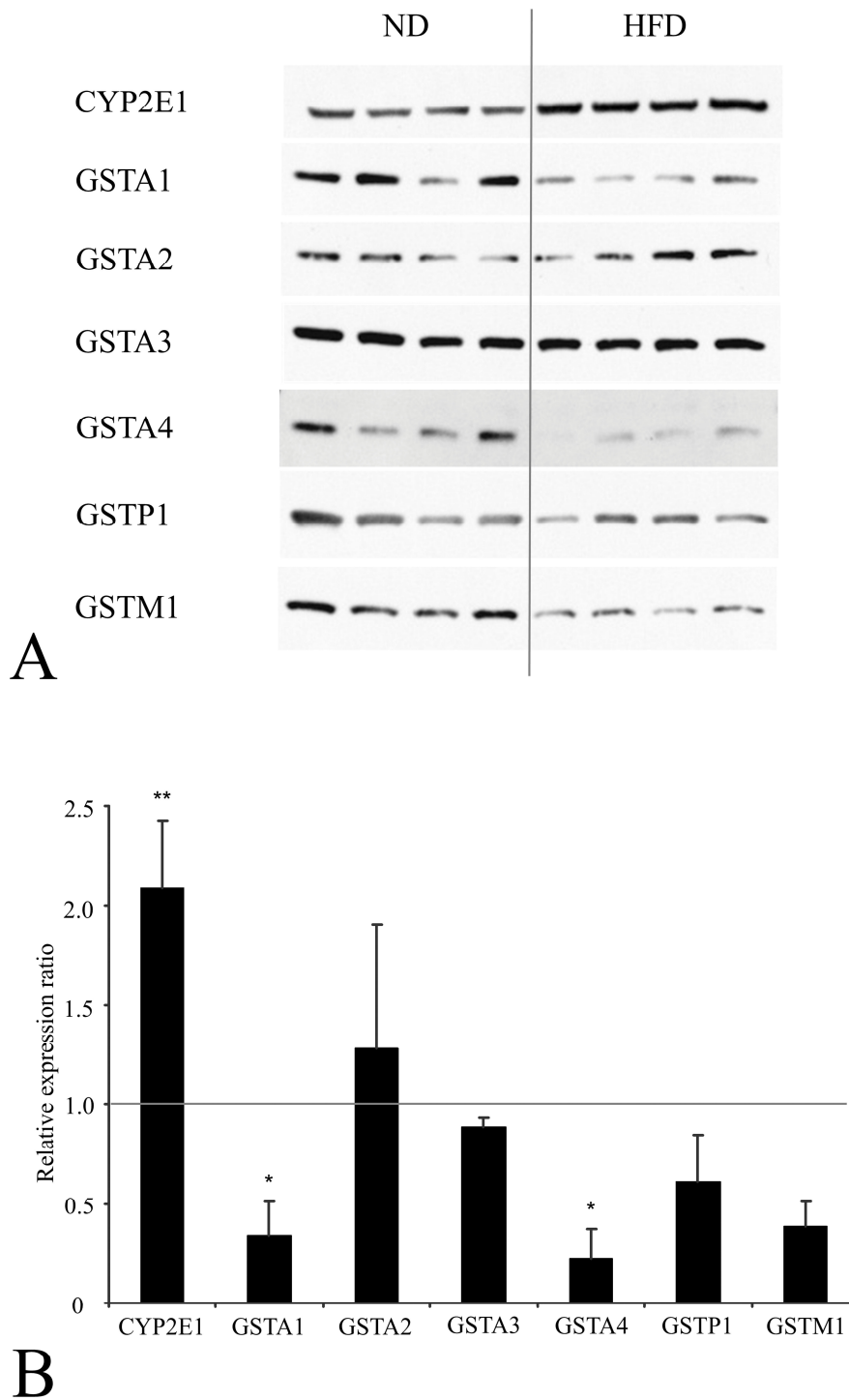


Figure 1-4. Western blotting for hepatic drug-metabolizing enzymes in the livers of the vehicle-treated mice. The number of the HFD mice (HFD) or the ND mice (ND) was 4, respectively. A: Western blotting for CYP2E1 and GSTs (GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA4, GSTP1 and GSTM1) in the livers of the HFD

and the ND mice. B: The relative expression of the drug-metabolizing enzymes in the HFD mice. Black columns show the relative expression ratios of the enzymes in the HFD mice to the ND mice. *, **: $p < 0.05$ or $p < 0.01$ versus the expression in the ND mice, respectively (Aspin-Welch *t*-test). Reproduced with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.

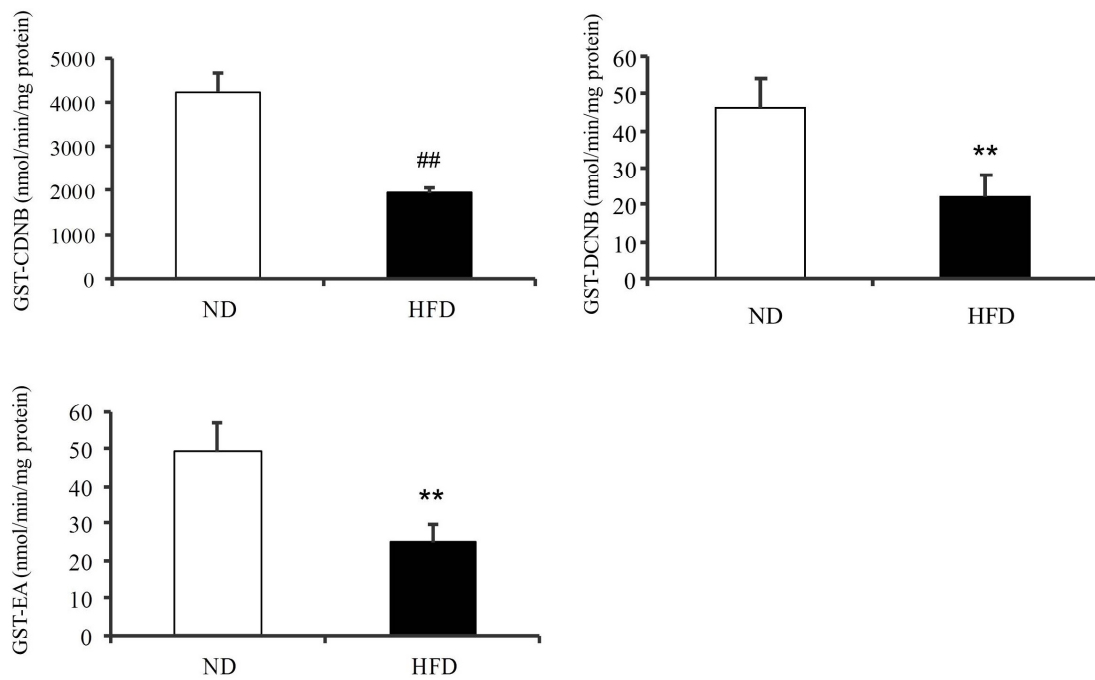
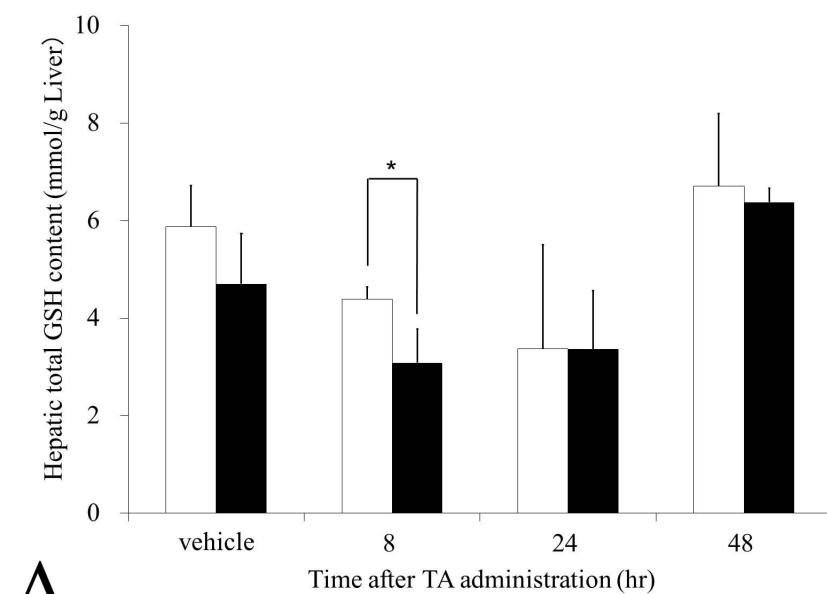
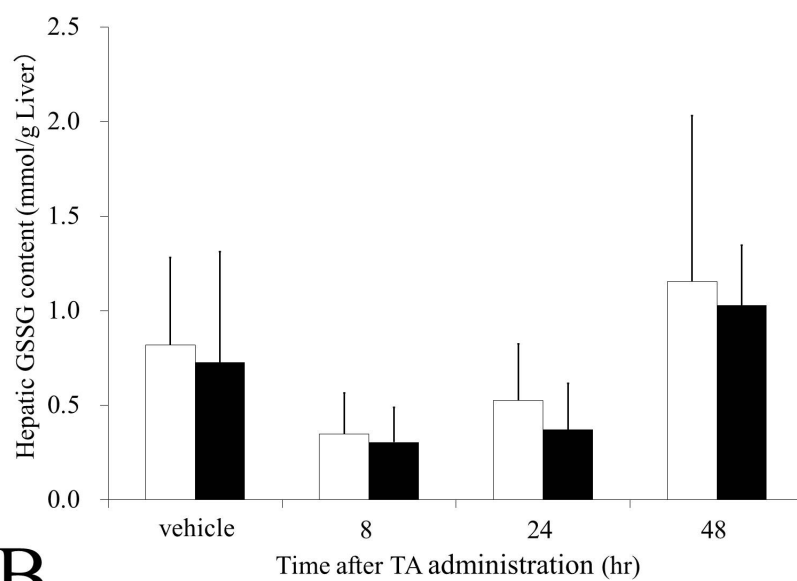


Figure 1-5. Hepatic GST activities toward CDNB (GST-CDNB), DCNB (GST-DCNB) and EA (GST-EA) in the livers of the vehicle-treated mice. The number of the HFD mice or the ND mice was 4, respectively. Black columns: GST activities of the HFD mice. White columns: GST activities of the ND mice. **: $p < 0.01$ versus the activity of the ND mice (Student's t -test). #: $p < 0.01$ versus the activity of the ND mice (Aspin-Welch t -test). Reproduced with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.



A



B

Figure 1-6. Hepatic total GSH and GSSG contents of the vehicle-treated mice (vehicle) and the mice necropsied at 8, 24 and 48 hr after TA administration. The numbers of the ND mice were 4 for vehicle, and 4, 5 and 6 for the mice at 8, 24 and 48 hr after administration, respectively. The numbers of the HFD mice were 4 for vehicle, and 4, 6 and 6 for the mice at 0, 8, 24 and 48 hr after administration, respectively. A: Hepatic total GSH content. B: Hepatic GSSG content. Black columns: the HFD mice. White columns:

the ND mice. *: $p < 0.05$ versus the content of the administration time point-matched ND mice (Aspin-Welch t -test). Modified with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.

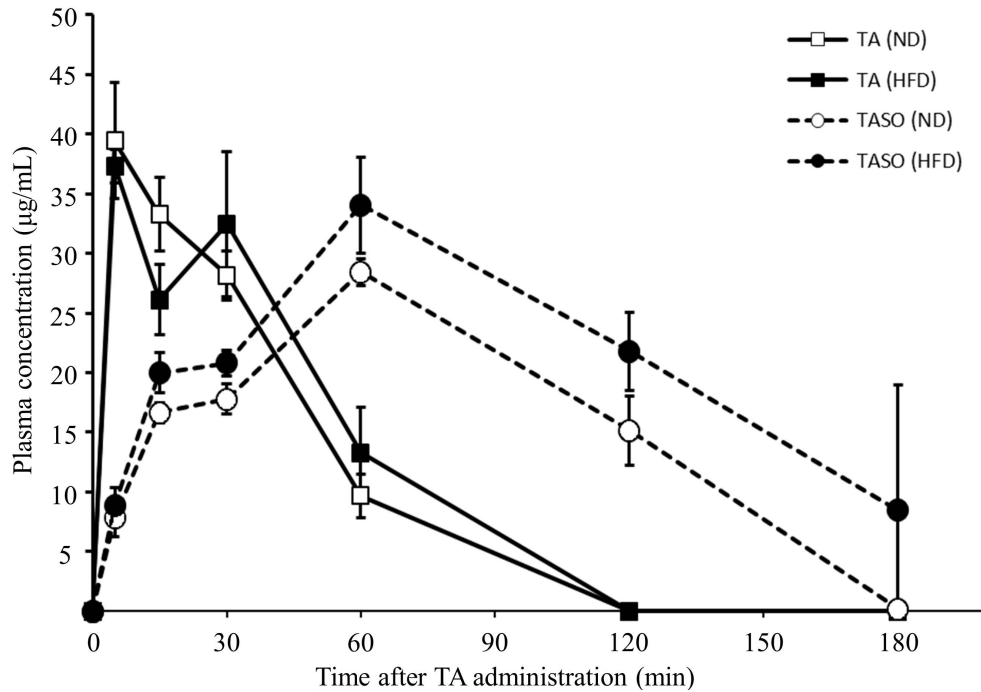


Figure 1-7. Plasma concentrations of TA and TASO at 5, 15, 30, 60, 120 and 180 minutes (min) after TA administration. The number of the HFD mice or the ND mice was 4, respectively. Black squares: TA in the HFD mice, white squares: TA in the ND mice, black circles: TASO in the HFD mice, white circles: TASO in the ND mice. Modified with permission of the Japanese Society of Toxicologic Pathology from Shirai, et al. Thioacetamide-induced Hepatocellular Necrosis Is Attenuated in Diet-induced Obese Mice. *J Toxicol Pathol* 26: 175-186, 2013.

第二章 高脂肪食給餌マウスにおける thioacetamide 誘発肝細胞壊死減弱への肝臓 glutathione の関与

序

第一章の結果から、非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) モデル動物である高脂肪食給餌マウス (HFD マウス) ではげっ歯類用標準飼料給餌マウス (ND マウス) と比較して肝毒性物質 thioacetamide (TA) 誘発肝細胞壊死が減弱することが明らかになった。また、その機序の一つとして、HFD マウスの肝臓 glutathione (GSH) による酸化ストレスの抑制が考えられた。しかしながら、マウスにおいて GSH が TA 誘発肝細胞壊死の抑制に重要であることを直接的に確かめた研究はこれまで報告がない。また、第一章では GSH 量や酸化ストレスの程度について評価しなかったため、上記の仮説を検証するためには追加の実験が必要と考えられた。

GSH は glutamate、cysteine および glycine から合成され、酸化型である glutathione disulfide (GSSG) へと変換されることでスカベンジャー作用を発揮する。GSH 合成の状態は、その合成と代謝に関わる物質[26-28, 43]を metabolomics 解析することにより評価が可能である[44]。一方、GSH 合成律速酵素の gamma-glutamylcysteine synthetase [27]の活性を特異的阻害薬である L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO) で阻害すると GSH 量を減少させることができる[45, 46]。したがって、GSH 代謝の metabolomics 解析と BSO 投与実験を行うことにより、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱に GSH が関与しているかを確かめることが可能である。

本章では、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱に肝臓 GSH が酸化ストレス抑制を介した機序により関与しているかを確かめる目的で、実験を行った。

材料と方法

実験デザイン

本章では後述する 3 つの実験を実施した。投与と剖検のタイミングについて Figure 2-1 に概略を示す。

実験 1 では、HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死を ND マウスと比較した。また、TA とその代謝物である thioacetamide-S-oxide (TASO) の血漿中濃度、肝臓酸化ストレスの測定、および肝臓 GSH 代謝の metabolomics 解析も実施した。実験 2 では、抗酸化剤 butylated hydroxyanisole (BHA) を投与された ND マウスの TA 誘発肝細胞壊死を、BHA 非投与 ND マウスと比較した。実験 3 では、GSH 合成阻害剤 BSO を投与された HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死、TA の血漿中濃度、肝臓 GSH 量、および酸化ストレスを BSO 非投与 HFD マウスと比較した。

動物

実験 1 および 3 では、3 週齢の雄 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー（横浜）から購入し、水道水および飼料を自由摂取させた。飼料はげっ歯類用標準飼料として CRF-1（オリエンタル酵母工業、東京）または高脂肪食として High Fat Diet 32（日本クレア、東京）を 8 週間与えた。8 週間の給餌後、11 週齢のマウスを毒性評価群と血漿中薬物濃度測定群に分けた。実験 2 では 9 週齢の雄 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバーから購入し、水道水および後述の粉末飼料を自由摂取させた。

本章で行った動物実験は第一三共株式会社実験動物委員会の倫理審査により承認されたものであり、動物の愛護及び管理に関する法律および第一三共株式会社の動物実験に関する標準操作手順書に準拠して行った。

TA 単独投与

11 週齢の ND および HFD マウスについて、TA 投与マウスには生理食塩水に溶解した TA (和光純薬工業、大阪) を、TA 非投与マウスには媒体である生理食塩水を単回腹腔内投与した。第一章の実験では TA を 50 mg/kg 投与したが、ND マウスで TA 誘発肝細胞壊死の程度に個体差が認められたため、TA の投与用量として投与 24 時間後において全ての ND マウスで重度の肝細胞壊死を誘発する 100 mg/kg を採用した。なお、予備的な実験から、ND マウスに TA を 100 mg/kg 投与すると投与 24 および 48 時間後の致死率が高いと予想されたことから、毒性評価群において ND マウスの個体数は HFD マウスの個体数の約 2 倍とした。TA 投与後、生存した毒性評価群のマウスは投与 3、8、24 および 48 時間後にイソフルラン (ファイザー、東京) 麻酔下の放血による安楽死処置後、剖検した。TA 非投与マウスは metabolomics 解析用には投与 8 および 24 時間後、後述するその他の検索用には投与 24 時間後にイソフルラン麻酔下の放血による安楽死処置後、剖検した。死亡したマウスについては、発見後に速やかに剖検した。血漿中薬物濃度測定群については、TA 投与 5、15、30、60、120、180 および 480 分後にイソフルラン麻酔下で腹大静脈から採血し、血漿サンプルを採取した。なお、薬物濃度測定用の採血後、全ての血漿中薬物濃度測定群のマウスにイソフルラン麻酔下の放血による安楽死処置を行った。

BHA と TA の併用投与

ND マウスの TA 誘発肝細胞壊死に抗酸化剤投与 BHA が与える影響を調べるため、9 週齢の雄 C57BL/6J マウスに、過去の報告[47]を参考に 0.75%BHA (シグマ アルドリッチ ジャパン、東京) 含有粉末げっ歯類用標準飼料 (Powdered CRF-1、オリエンタル酵母工業) を 14 日間給餌した。給餌開始から 13 日目に、TA 投与マウスには生理食塩水に溶解した 100 mg/kg の TA を、TA 非投与マウスには媒体である生理食塩水を単回腹腔内投与し、投与 24 時間後にイソフルラン麻酔下の放血による安楽死処置後、剖検した。

BSO と TA の併用投与

HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死に GSH 枯渇が与える影響を調べるため、11 週齢の HFD マウスに BSO と TA を併用投与した。TA 投与マウスには生理食塩水に溶解した 100 mg/kg の TA を、TA 非投与マウスには媒体である生理食塩水を単回腹腔内投与した。ただし、初回の BSO (シグマ アルドリッチ ジャパン) 投与 1 時間後 (TA あるいは生理食塩水投与 0 時間後とする) に剖検するマウスには TA あるいは生理食塩水投与は行わなかった。肝臓の GSH を減少させた過去の報告[45] を参考に、BSO 投与マウスには生理食塩水に溶解した 700 mg/kg の BSO を、BSO 非投与マウスには生理食塩水を腹腔内投与した。投与は 2 回行い、投与タイミングは TA あるいは生理食塩水投与 1 時間前および 5 時間後とした。ただし、TA あるいは生理食塩水投与 0 時間および 3 時間後に剖検するマウスには BSO あるいは生理食塩水を 1 回のみ投与した。以上の投与条件に基づき、毒性評価群を 4 つの群に分けた。すなわち 1) 生理食塩水のみ投与群 (vehicle/vehicle group)、2) BSO と生理食塩水の投与群 (BSO/vehicle group)、3) 生理食塩水と TA の投与群 (vehicle/TA group)、および 4) BSO と TA の投与群 (BSO/TA group) である。毒性評価群の全てのマウスは TA あるいは生理食塩水投与 0、3、8、24 および 48 時間後にイソフルラン麻酔下の放血による安楽死処置後、剖検した。血漿中薬物濃度測定群については、TA 投与 5、15、30、60、120 および 180 分後に上記と同様の方法で血漿サンプルを採取した。

病理組織学的検索

毒性評価群の全てのマウスについて、イソフルラン麻酔下放血による安楽死処置後、肝臓の外側左葉および内側右左葉の一部を採材し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。また、TA 非投与マウスの外側左葉の一部をグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムで固定した。さらに、生存個体については肝臓の一部を液体窒素で凍結後に-80°C で保存し、後述の解析に使用した。

ホルマリン固定パラフィン包埋肝臓ブロックから HE 染色標本を作製し、TA 誘発肝細胞壊死について第一章と同様の基準で評価した。グルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウム固定した肝臓サンプルは Poly/Bed 812 (Polysciences, Warrington, PA, USA) に包埋後、トルイジンブルー染色標本を作製し、肝細胞脂肪化の程度を評価した。

酸化ストレスの測定

酸化ストレスはチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) による脂質過酸化程度を測定することで評価した。TBARS は前述の肝臓凍結サンプルを用い、TBARS assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した。

肝臓 GSH 代謝の metabolomics 解析

肝臓 GSH 代謝を検索する目的で、Metabolon 社 (Durham, NC, USA) に前述の肝臓凍結サンプルを送付し、metabolomics 解析を委託した。肝臓凍結サンプルは肝細胞壊死の grade の平均値が同程度になるようにし、1 タイムポイントあたり 5 例分の肝臓を解析した。解析した個体の肝細胞壊死の grade は以下のとおりである。

TA 非投与 HFD マウスおよび ND マウス (投与 8 および 24 時間後) : 全て grade 0

TA 投与 HFD マウス (投与 8 時間後) : grade 0 が 2 例、grade 1 が 3 例

TA 投与 ND マウス (投与 8 時間後) : grade 0 が 4 例、grade 1 が 1 例

TA 投与 HFD マウス (投与 24 時間後) : grade 2 が 3 例、grade 3 が 2 例

TA 投与 ND マウス (投与 24 時間後) : grade 4 が 5 例

metabolomics 解析の方法や解析プラットフォームの詳細については以前の報告と同様である[44, 48]。サンプル調整は、MicroLab STAR® システム (Hamilton Company, UT, USA) により行い、

超高速液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計 (UHPLC/MS/MS)、UHPLC/MS/MS、ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて代謝物を測定した。代謝物の同定は、試料注入から検出器で検出されるまでの時間であるリテンションタイム、分子量、分子が分解されることでできた分子の断片であるインソースフラグメント、MS/MS スペクトルといった分子に特有の情報を計測し、既知である標準物質の情報と比較することで同定した。同定された代謝物のうち、GSH 代謝に関連する代謝物について解析を行った。

TA および TASO の血漿中濃度測定

血漿中薬物濃度測定群の動物から採取した血漿サンプルを用い、第一章と同様の方法で測定した。実験 1 では TA および TASO、実験 3 では TA の測定を行った。

肝臓 GSH および GSSG の測定

前述の凍結肝臓サンプル中の総 GSH と GSSG 量を Bioxytech GSH: GSSG-412 assay kit (OXIS International, Foster City, CA, USA) を用いて測定した。肝臓の GSH 量については、総 GSH 量と GSSG 量から算出した。

統計学的方法

結果は平均値±標準偏差 (SD) で示した。酸化ストレス測定および GSH 測定では、まず *F* test で等分散性を確認し (有意水準: 0.25)、その後に Student's *t*-test (等分散である場合) あるいは Aspin-Welch *t*-test (等分散でない場合) による有意差検定を行った。これらの解析には Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, WA, USA) を用いた。酸化ストレス測定については、*t*-test に加えて 5 群間のパラメトリック Dunnett's test による有意差検定を SAS Drug Development 2.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。TA 誘発肝細胞壊死のグレードと頻度は、コモン・ゲートウェイ・インタフェースプログラム ([http://aoki2.si.gunma-](http://aoki2.si.gunma)

u.ac.jp/exact/utest/getpar.html) を使用し Mann-Whitney U test によって行った。metabolomics 解析の結果については、外れ値によってデータのばらつきが増加するのを抑える目的で値を対数変換し、Array Studio (Omicsoft, Cary, NC, USA) あるいは“R” (<http://cran.r-project.org/>) で Three-way ANOVA を実施し、False discovery rate (FDR) についても q -value によって評価して $q < 0.05$ である代謝物のみ p 値による評価を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意と判断した。

結果

病理組織学的検査（実験 1）

TA 非投与 HFD マウスでは、全ての個体で肝細胞脂肪化が観察されたが、その他の病変は観察されなかった（Table 2-1）。TA 投与 ND マウスは 31 例中 13 例が投与 24 から 48 時間後の間に死亡した（Table 2-1）。死亡した ND マウスは全て grade 4 か 5 の重度の肝細胞壊死を呈した。生存 ND マウスの肝細胞壊死は TA 投与 8 時間後では軽度であったが、24 あるいは 48 時間後では重度であった（Figure 2-2-A、Table 2-1）。これに対し、TA 投与 HFD マウスに死亡例はなく、ND マウスと比較すると肝細胞壊死の程度も軽度であった（Figure 2-2-B、Table 2-1）。なお、第一章と同様、TA 投与 8 時間後から 48 時間後において、HFD マウスでは ND マウスと比べて重度の肝細胞腫大が観察された（Figure 2-2-A、Figure 2-2-B）。

TA および TASO の血漿中濃度（実験 1）

TA および TASO の血漿中濃度については、HFD マウスと ND マウスとの間で統計解析はしていないものの明らかな差はみられなかった。いずれのマウスでも、TA の血漿中濃度は TA 投与 5 分後に、TASO の血漿中濃度は投与 60 分後にそれぞれピークに達した。投与 480 分後には TA も TASO も血漿から検出されなくなった（Figure 2-3）。

TA 投与による肝臓酸化ストレス（実験 1）

肝臓の酸化ストレスマーカーである肝臓 TBARS 量については、TA 非投与の場合、HFD マウスと ND マウスの間に差は認められなかった（Figure 2-4）。TA 投与 ND マウスの肝臓 TBARS 量は、肝細胞壊死が重度になる投与 24 および 48 時間後において、TA 非投与 ND マウスと比較してほぼ倍に増加した。これに対し、TA 投与 HFD マウスの肝臓 TBARS 量は投与 24 および 48

時間後においても TA 非投与 HFD マウスと比較して増加しなかった。なお、TA 投与 48 時間後では、TA 投与 HFD マウスの肝臓 TBARS 量は TA 非投与 HFD マウスと比較して有意に減少したが、この減少の意義は不明であった。

GSH 代謝の metabolomics 解析 (実験 1)

Table 2-2 に肝臓 GSH 代謝の metabolomics 解析結果を、Figure 2-5 に GSH 代謝経路[26-28, 43] と、TA 投与 8 および 24 時間後の代謝物量の変化を示す。

TA 投与 8 時間後では、cysteinyl-glycine が HFD マウスおよび ND マウスで減少したのに対し、GSH、cysteine および taurine は HFD マウスでのみ減少した。ophtalmate、5-oxoproline および glutamate は HFD マウスでのみ増加した。gamma-glutamylaminoacid は HFD マウスでのみ量が変化した。TA 投与 24 時間後では、GSH、glycine および gamma-glutamylaminoacid が HFD マウスと ND マウスで減少したのに対し、GSSG の増加と ophtalmate、5-oxoproline、cysteine、cysteinyl-glycine および cystathionine の減少が ND マウスでのみ認められた。ophtalmate、2-aminobutyrate、5-oxoproline および glutamate の増加と、taurine および hypotaurine の減少が HFD マウスで観察された。

ND マウスの TA 誘発肝細胞壊死に抗酸化剤 BHA 投与が与える影響 (実験 2)

前述のとおり、ND マウスに TA を投与すると投与 24 時間後において死亡例が発生し、重度の TA 誘発肝細胞壊死がみられた。しかし、ND マウスに抗酸化剤 BHA を TA と併用投与したところ、TA 投与 24 時間後までに死亡する ND マウスはなくなり、TA 誘発肝細胞壊死も有意に減弱した (Table 2-3)。

HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死に GSH 合成阻害剤 BSO 投与が与える影響（実験 3）

HFD マウスに GSH 合成阻害剤 BSO と TA を併用投与したところ、TA のみの投与では死亡する HFD マウスはいなかったが、BSO 併用投与により TA 投与 24 から 48 時間後の間に、25 例中 2 例が死亡した（Table 2-4）。BSO 併用投与により投与 24 時間後の TA 誘発肝細胞壊死には増悪傾向が、48 時間後の TA 誘発肝細胞壊死には有意な増悪が認められた。なお、HFD マウスに BSO のみを投与した場合には、肝臓に変化は認められなかった。

HFD マウスの肝臓 GSH 量および血漿中 TA 濃度に BSO 投与が与える影響（実験 3）

vehicle（生理食塩水）投与 3 および 8 時間後において、BSO/vehicle 群の肝臓 GSH 量は vehicle/vehicle 群と比較して有意に低値であった（Figure 2-6）。また、実験 1 の metabolomics 解析結果（Table 2-2、Figure 2-5）と同様、TA 投与 8 および 24 時間後において、vehicle/TA 群の肝臓 GSH 量は vehicle/vehicle 群と比較して有意に低かった。また、TA 投与 3 から 48 時間後において、BSO/TA 群の肝臓 GSH 量は BSO/vehicle 群と比較して有意に低値であった。さらに、TA 投与 3、8 および 48 時間後においても、BSO/TA 群の肝臓 GSH 量は vehicle/TA 群と比較して有意に低かった。

一方、血漿中 TA 濃度は、BSO/TA 群と vehicle/TA 群でほぼ同様の濃度推移を示したことから、BSO の併用投与は TA の全身曝露に影響しないと考えられた（Figure 2-7）。

HFD マウスの TA 投与による肝臓酸化ストレス（TBARS 量）に BSO 投与が与える影響（実験 3）

TA あるいは vehicle（生理食塩水）投与 24 および 48 時間後において、BSO/vehicle 群と vehicle/vehicle 群あるいは vehicle/TA 群と vehicle/vehicle 群の肝臓 TBARS 量を比較したが、有意な差はみられなかった（Figure 2-8）。一方、投与 24 および 48 時間後において、BSO/TA 群の

肝臓 TBARS 量は BSO/vehicle 群と比較して有意に高値を示した。また、投与 24 時間後において、BSO/TA 群の肝臓 TBARS 量は vehicle/TA 群と比較して有意に高値を示した。

なお、投与 8 時間後において、vehicle/TA 群の肝臓 TBARS 量は vehicle/vehicle 群と比較して有意に高値を示した。しかしながら、投与 8 時間後の vehicle/TA 群における TA 誘発肝細胞壊死は軽度であること、vehicle/TA 群と BSO/TA 群の間に肝臓 TBARS 量および肝細胞壊死について有意な差が認められなかったことから、この TBARS 量の高値は毒性学的意義が低いものと考えた。

考察

第一章では、HFD マウスにおいて TA 誘発肝細胞壊死が減弱することを明らかにした。本章では、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死の減弱に、GSH による酸化ストレス抑制の寄与を確かめるための実験を行った。

本章の実験では、ND マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死の個体差を抑える目的で TA の投与用量を 100 mg/kg としたが、TA 誘発肝細胞壊死の程度や血漿中の TA および TASO 濃度は TA の投与用量が 50 mg/kg であった第一章と同様であった。すなわち、HFD マウスでは ND マウスと比較して TA 誘発肝細胞壊死が有意に減弱した。また、HFD マウスと ND マウスの間で TA および TASO の血漿中濃度に統計解析はしていないものの明らかな差は認められなかった。したがって、TA の投与量を 100 mg/kg としても HFD マウスでは TA 誘発肝細胞壊死は減弱すること、またその機序は TA あるいは TASO の血漿中濃度低下によるものではないことが示された。

TA 投与による酸化ストレスを TBARS 量によって評価したところ、TA 投与 24 および 48 時間後において、ND マウスの肝臓 TBARS 量は TA 非投与 ND マウスあるいは TA 投与 HFD マウスと比較して高値であった。TA 投与 24 および 48 時間後は ND マウスにおいて 31 例中 29 例で grade 4 あるいは 5 といった重篤な TA 誘発肝細胞壊死が観察されるタイムポイントであり、これは TBARS 量が増加するタイムポイントと一致した。一方、TA 誘発肝細胞壊死が減弱した HFD マウスでは、TA 投与後でも肝臓 TBARS 量は増加しなかった。さらに、TA 投与後に肝臓の酸化ストレスが増加する ND マウスに抗酸化剤 BHA[49, 50]を併用投与すると、TA 誘発肝細胞壊死が減弱した。これらの結果から、TA 投与による肝臓酸化ストレスの増加がマウスにおける TA 誘発肝細胞壊死の要因の一つであり、HFD マウスでは TA 投与による酸化ストレスが何らかの機序で抑制され、TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが示唆された。

GSH は生体内の主要な抗酸化物質として知られ[27, 41, 42]、マウスの肝臓では細胞内で常に合成・代謝されており、その半減期は 145 分である[29]。そこで、GSH の合成・代謝について検索する目的で肝臓の metabolomics 解析を行ったところ、TA 投与 8 時間後では、HFD マウスにおいて GSH 代謝に関与する多数の代謝物でその量に変動することが分かった。例えば、ophtalmate と GSH は共に gamma glutamylcysteine synthetase と glutathione synthetase によって合成される[28]ため GSH 合成の指標となるが、ophtalmate は HFD マウスでのみ増加した。また、cysteine は GSH を構成するアミノ酸の一つ[26, 43]であり、GSH の合成を律速する[51]が、TA 投与 HFD マウスでのみ減少した。これらの結果から、HFD マウスでは TA 投与によって GSH の合成が亢進すると考えられた。細胞外に存在する GSH は不安定なアミノ酸である cysteine を貯蔵する働きをしており、gamma-glutamyltranspeptidase により cysteinyl-glycine へと代謝され、さらに分解されて細胞に glycine とともに cysteine が供給される[26, 27, 51]。TA 投与 HFD マウスでは cysteinyl-glycine は減少したが、GSH が代謝される際に cysteinyl-glycine とともにできる gamma-glutamylaminoacid[26, 27]のうち、1つは増加、2つは変動が無く、減少していたものは 1つだけだった。さらに、gamma-glutamylaminoacid が代謝されて生成される 5-oxoproline および glutamate[26]は HFD マウスでのみ増加した。これらの結果から、HFD マウスでは TA 投与後に細胞外で GSH の代謝が亢進することにより、細胞内へ cysteine をはじめとする GSH 構成アミノ酸の供給が ND マウスと比べて増加していることが示唆された。以上をまとめると、TA 投与 8 時間後において、HFD マウスでは GSH 合成・代謝が亢進していると考えられた。さらに、HFD マウスでのみ、TA 投与 8 時間後において taurine の減少がみられた。taurine は GSH と同様に cysteine から合成される[43]が、cysteine 濃度が低い場合、GSH 合成が taurine 合成よりも優先されることが報告されている[52]。したがって、taurine が減少した HFD マウスでは、cysteine を選択的に GSH 合成に使用したと推測された。一方、ND マウスでは TA 投与 8 時間後において、ophtalmate、gamma-glutamylaminoacids、5-oxoproline、glutamate、cysteine および taurine は変化しなかったことから、GSH 合成や細胞外の GSH 代謝は亢進しておらず、cysteine も GSH

合成に優先的には使用されていないと考えられた。投与 24 時間後における HFD マウスの肝臓代謝物の変動は投与 8 時間後の HFD マウスのそれと同様の傾向を示したことから、HFD マウスでは投与 8 時間後と同様に GSH 合成・代謝が亢進していると考えられた。一方、ND マウスでは投与 24 時間後において opthalmate の減少が認められたことから GSH 合成の低下が示唆され、さらに 5-oxoproline や細胞外 GSH 以外の cysteine の供給源である cystathionine [43]も減少したことから、cysteine の供給も減少していると考えられた。また、hypotaurine や taurine に変化は無かったことから、cysteine は GSH 合成に優先的に使用されていないと考えられた。したがって、投与 24 時間後において、ND マウスの肝臓では GSH 合成、細胞外の GSH 代謝、cysteine 供給が低下、減少し、かつ GSH の優先的合成も起こらないことが示唆された。以上の metabolomics 解析結果から、HFD マウスの肝臓における GSH 合成・代謝は ND マウスと比較して亢進していると考えられた。

肝臓の GSH 合成・代謝は TA 投与 HFD マウスで亢進していると考えられたにもかかわらず、TA 投与 8 および 24 時間後の肝臓 GSH 量は HFD マウスで減少した。この矛盾した結果を説明するため、HFD マウスでの肝臓 GSH の減少は GSH が酸化ストレスを抑制するために使用されたためという仮説を立てた。この仮説を検証する目的で、GSH 合成阻害剤である BSO[45, 46] を HFD マウスへ投与することにより TA 投与後の肝臓酸化ストレスが増加するか、および TA 誘発肝細胞壊死が増悪するかを検索した。まず、BSO 投与による肝臓 GSH 量の変化をしらべたところ、BSO は HFD マウスの肝臓 GSH 量を減少させる作用があることが確かめられた。また、BSO は TA 投与後の HFD マウスの肝臓酸化ストレスを有意に増加させ、TA 誘発肝細胞壊死も増悪させた。以上の結果から、HFD マウスの肝臓では合成・代謝が亢進する GSH の働きで酸化ストレスが抑制されることで、TA 誘発肝細胞壊死が减弱していることが強く示唆された。

細胞内の GSH はスカベンジャー作用を発揮した後に、自身は酸化型である GSSG に変換される[26, 27]が、本章の metabolomics 解析では TA 投与 24 時間後に ND マウスでのみ肝臓の GSSG

が増加した。GSSG は細胞毒性物質であり、能動的に細胞外へと排出されることが知られている[27, 53, 54]。したがって、HFD マウスの肝臓では TA 投与後の GSSG の増加抑制が TA 誘発肝細胞壊死減弱に寄与している可能性が考えられた。この可能性について検証するためには更なる実験が必要と考えられる。

本章の結果から、TA 非投与の場合、HFD マウスと ND マウスの間では肝臓の酸化ストレスや GSH 量に差が無かったことから、肝臓における GSH 合成、GSH の消費、酸化ストレスのバランスは高脂肪食給餌のみでは変化しないと推測された。一方、TA を投与されるとこのバランスが変化し、その結果 HFD マウスと ND マウスで TA 誘発肝細胞壊死の程度に差が生じたと考えられた。本章の結果からは TA 投与後に HFD マウスと ND マウスとの間で GSH 合成、GSH の消費、酸化ストレスのバランスの変化に差が生じる原因は明らかになっていないことから、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱における GSH の関与をより詳細に明らかにするためには、更なる検索が必要と考えられた。

以上、本章の結果から、HFD マウスの肝臓では TA 投与後に GSH 合成・代謝が亢進し、GSH の働きで TA 誘発酸化ストレスが除去されることが TA 誘発肝細胞壊死の減弱と深くかかわっていることが示唆された。しかし、HFD マウスでは TA 投与により酸化ストレスが増加しないにもかかわらず肝細胞壊死が起こることから、酸化ストレス以外の機序がマウスにおける TA 誘発肝細胞壊死に関与していることは明らかであるとともに、それらが HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱に関与している可能性が考えられた。したがって、HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死減弱の機序をより正しく理解するためには、酸化ストレス以外の機序についても更なる検索を行う必要があると考えられた。

Table 2-1. Lethality and histopathological scores of hepatocellular necrosis after TA administration

	hr after TA administration				
	Vehicle	3 hr	8 hr	24 hr	48 hr
ND mice					
Number of mice ^a	6 (0)	6 (0)	6 (0)	19 (9)	12 (4)
Incidence ^b	6, 0, 0, 0, 0	6, 0, 0, 0, 0	5, 1, 0, 0, 0	0, 0, 0, 1, 11, 7	0, 0, 0, 1, 2, 9
Mean score	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.2 ± 0.41	4.3 ± 0.58	4.7 ± 0.65
HFD mice					
Number of mice ^a	6 (0) ^c	6 (0)	6 (0)	8 (0)	6 (0)
Incidence ^b	6, 0, 0, 0, 0	6, 0, 0, 0, 0	3, 3, 0, 0, 0	0, 0, 5, 2, 1, 0	0, 0, 1, 3, 2, 0
Mean score	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.5 ± 0.55	2.5 ± 0.76^{**}	3.2 ± 0.75^{**}

Vehicle: The mice necropsied at 24 hours (hr) after vehicle administration. 3 to 48 hr: The mice necropsied at 3 to 48 hr after TA administration, respectively. Mean score represents the mean of grades ± S.D. a: The values in parentheses show the number of dead mice.

b: The numbers show the number of the mice showing each grade of hepatocellular necrosis (0 to 5, from the left to the right). c: The livers of all the vehicle-treated HFD mice showed fatty change of hepatocytes. ^{**}: $p < 0.01$ for comparison versus the ND mice (Mann-Whitney U test). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. J Toxicol Sci 40: 509-521, 2015.

Table 2-2. Changes of hepatic metabolites related to glutathione metabolism after TA administration

	KEGG	HMDB	8 hr				24 hr			
			ND		HFD		ND		HFD	
			Vehicle	TA	Vehicle	TA	Vehicle	TA	Vehicle	TA
Glutathione	C00051	HMDB00125	1.2654	0.7948	0.9547	0.2158**	1.4505	0.1413**	1.4746	0.0690**
Glutathione disulfide	C00127	HMDB03337	1.2612	1.5505	1.0289	1.0188	1.0439	1.7200**	0.7604	0.7466
2-aminobutyrate	C02261	HMDB00650	1.2228	1.3474	0.6671	0.8998	1.4701	1.2816	0.7851	3.4077**
Ophthalmate		HMDB05765	1.5660	1.8858	0.5630	1.1334**	2.2533	0.8035**	1.0174	4.2293**
Gamma-glutamylvaline		HMDB11172	1.7219	1.7969	0.8736	1.3433*	1.7476	0.4576**	1.4965	1.2494
Gamma-glutamylleucine		HMDB11171	1.4110	1.2567	1.1111	1.0369	1.2510	0.5254**	1.5562	0.9136**
Gamma-glutamylglutamate			1.3583	1.5947	0.9890	1.2070	1.0818	0.8067**	0.6587	0.7698
Gamma-glutamyltyrosine			1.3496	1.3205	0.9626	0.6544*	0.9921	1.0532	0.9291	0.7026*
5-oxoproline	C01879	HMDB00267	1.0666	1.1730	0.8698	1.3403**	1.2134	0.9408**	0.9323	1.8150**
Glutamate	C00025	HMDB03339	0.8792	1.3695	0.6578	1.9243**	1.5414	1.3378	0.8561	6.2284**
Cysteine	C00097	HMDB00574	1.1578	0.8390	1.2728	0.5225**	1.0728	0.5274**	1.2619	0.9978
Cysteinyglycine	C01419	HMDB00078	1.3519	0.7326*	0.8872	0.5702*	1.0241	0.5535**	1.0378	1.7244
Glycine	C00037	HMDB00123	1.4823	1.4380	0.9784	0.7510	1.4649	0.6031**	0.9017	0.6493*
Cystathionine	C02291	HMDB00099	1.2005	1.0451	1.0670	0.8442	1.1013	0.5947**	0.9511	0.6805
Hypotaurine	C00519	HMDB00965	2.2075	3.4176	0.8986	0.5556	1.6164	1.4545	0.6596	0.2827**
Taurine	C00245	HMDB00251	0.9993	1.0219	1.3407	0.6637**	0.7993	0.9126	1.1504	0.2803**

8 hr and 24 hr: The mice necropsied at 8 or 24 hr after vehicle or TA administration, respectively (n=5). ND: the ND mice, HFD: the HFD mice. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, HMDB: Human Metabolome Database. Each value was re-scaled to have median equal to 1. *, **, p < 0.05 or p < 0.01 versus time-matched vehicle-treated group, respectively (three-way ANOVA). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. J Toxicol Sci 40: 509-521, 2015.

Table 2-3. The effect of BHA administration on TA-induced hepatocellular necrosis in the ND mice

	hr after TA administration	
	Vehicle	24 hr
ND mice without BHA treatment ^a		
Number of mice ^b	6 (0)	19 (9)
Incidence ^c	6, 0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 1, 11, 7
Mean score	0.0 ± 0.00	4.3 ± 0.58
ND mice with BHA treatment		
ND/BHA: Number of mice ^b	3 (0)	4 (0)
Incidence ^c	3, 0, 0, 0, 0, 0	0, 1, 3, 0, 0, 0
Mean score	0.0 ± 0.00	1.8 ± 0.50 ^{**}

Vehicle and 24 hr: The mice necropsied at 24 hr after vehicle or TA administration, respectively. BHA: butylated hydroxyanisole. Mean score represents the mean of grades ± S.D. a: The data are derived from Table 2-1. b: The values in parentheses show the number of dead mice. c: The numbers show the number of the mice showing each grade of hepatocellular necrosis (0 to 5, from the left to the right). ^{**}: $p < 0.01$ versus the ND mice without BHA treatment (Mann-Whitney U test). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

Table 2-4. The effect of BSO administration on TA-induced hepatocellular necrosis in the HFD mice

	hr after TA administration				
	0 hr	3 hr	8 hr	24 hr	48 hr
vehicle/vehicle mice					
Number of mice ^a	5 (0)	4 (0)	4 (0)	5 (0)	4 (0)
Incidence ^b	5, 0, 0, 0, 0	4, 0, 0, 0, 0	4, 0, 0, 0, 0	5, 0, 0, 0, 0	4, 0, 0, 0, 0
Mean score	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
BSO/vehicle mice					
Number of mice ^a	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)
Incidence ^b	5, 0, 0, 0, 0	5, 0, 0, 0, 0	5, 0, 0, 0, 0	5, 0, 0, 0, 0	5, 0, 0, 0, 0
Mean score	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
vehicle/TA mice					
Number of mice ^a	N/A ^c	5 (0)	5 (0)	8 (0)	7 (0)
Incidence ^b		5, 0, 0, 0, 0	0, 4, 1, 0, 0, 0	0, 0, 5, 3, 0, 0	0, 0, 2, 4, 1, 0
Mean score		0.0 ± 0.00	1.2 ± 0.45	2.4 ± 0.52	2.9 ± 0.69
BSO/TA mice					
Number of mice ^a	N/A ^c	5 (0)	5 (0)	12 (0)	13 (2)
Incidence ^b		5, 0, 0, 0, 0, 0	1, 4, 0, 0, 0, 0	0, 0, 4, 3, 4, 1	0, 0, 0, 3, 5, 5
Mean score		0.0 ± 0.00	0.8 ± 0.45	3.2 ± 1.03	4.2 ± 0.80 ^{**}

0 hr: The mice necropsied at 1 hour after single dosing of BSO or vehicle without TA dosing. 3 to 48 hr: The mice necropsied at 3 to 48 hr after TA administration, respectively. vehicle/vehicle group: group treated only with vehicle, BSO/vehicle group: group treated with BSO and vehicle, vehicle/TA group: group treated with vehicle and TA, BSO/TA group: group treated with BSO and TA. Mean score represents the mean of grades ± S.D. a: The values in parentheses show the number of dead mice. b: The numbers show the number of the mice showing each grade of hepatocellular necrosis (0 to 5, from the left to the right). c: Not applicable because the mice necropsied at 0 hr were not treated with TA. **: $p < 0.01$ versus the score of the time point matched vehicle/TA group (Mann-Whitney U test). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

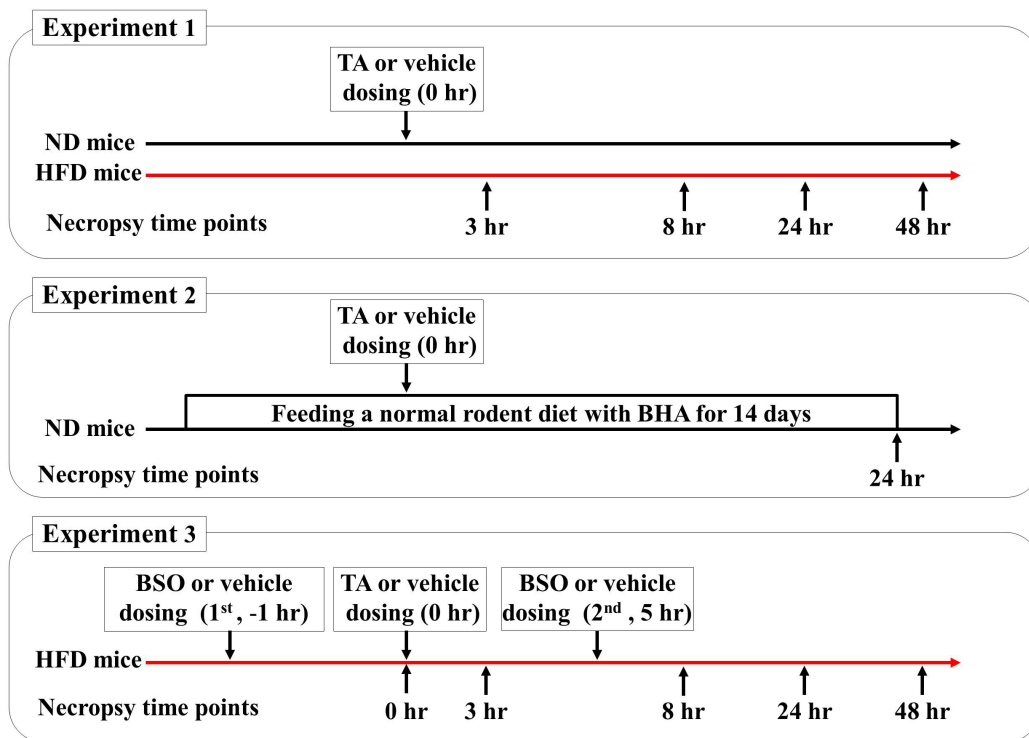


Figure 2-1. Schematic diagram of experiments 1 to 3. Each diagram outlines the timing of TA, BHA and BSO treatments and necropsies. hr: hours. Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

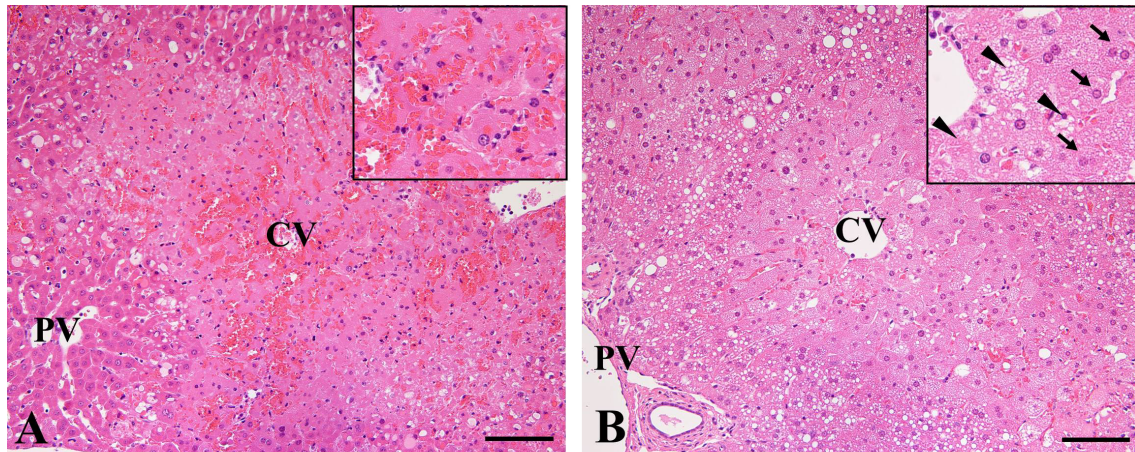


Figure 2-2. Histopathological appearance of typical hepatic lesions at 24 hr after TA administration. A: The liver of the TA-treated ND mouse. B: The liver of the TA-treated HFD mouse. High power appearances around the central vein are shown in the inset in each figure. Necrotic (arrows) and swollen (arrowheads) hepatocytes are shown. In comparison to the ND mice, the grade of hepatic necrosis was decreased in the HFD mice. CV: central vein, PV: periportal vein; HE stain; Bar = 100 μ m. Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

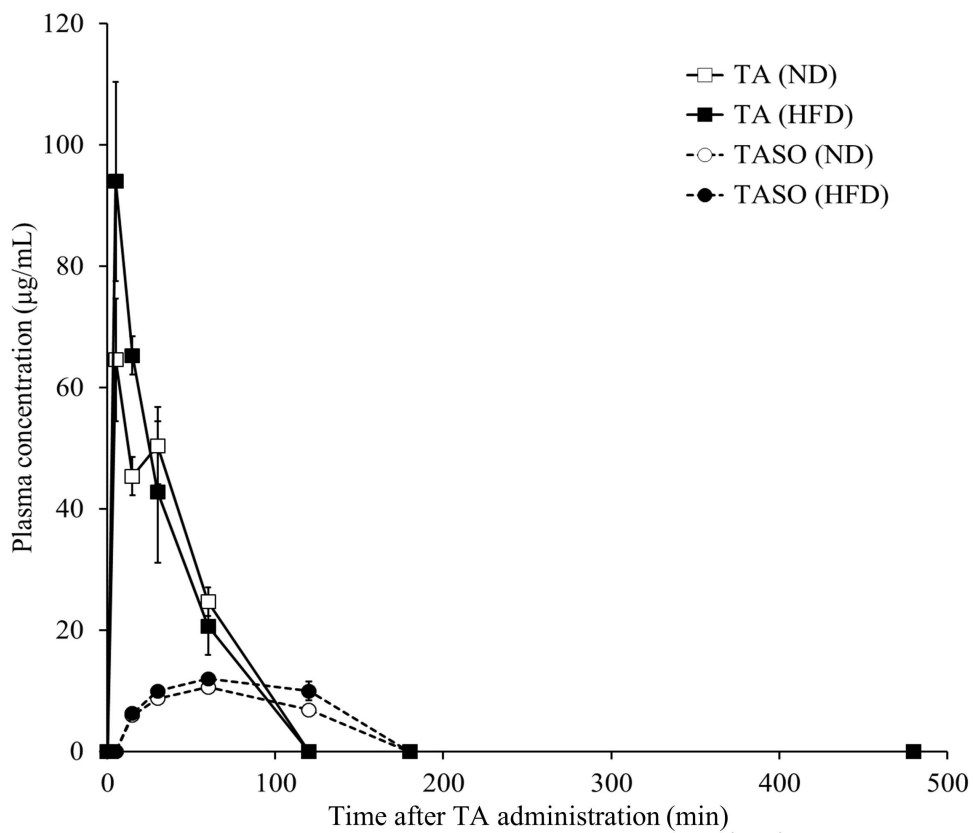


Figure 2-3. Plasma concentrations of TA and TASO after a single dosing of TA. For each diet type, the number of mice at each time point was 4 at 5 and 15 min after TA administration, and was 5 at 30, 60, 120, 180 and 480 minutes (min) after TA administration. Black squares: TA concentration in the HFD mice, white squares: TA concentration in the ND mice, black circles: TASO concentration in the HFD mice, white circles: TASO concentration in the ND mice. Values are expressed as the mean \pm S.D. Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

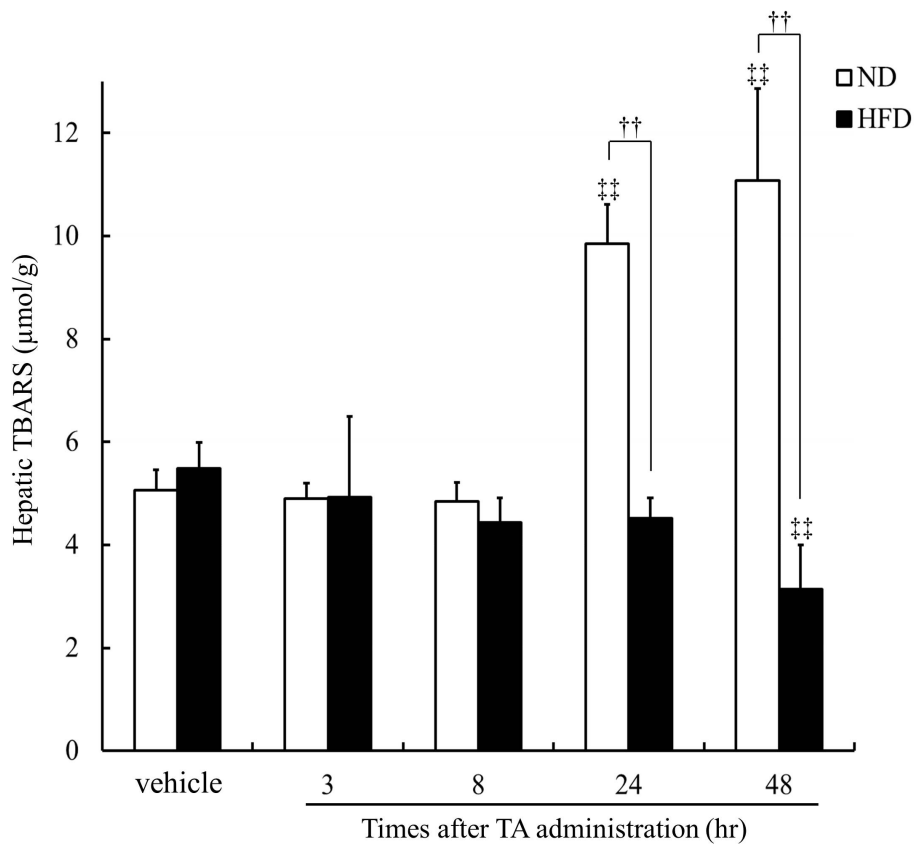


Figure 2-4. Hepatic TBARS contents of vehicle-treated mice necropsied at 24 hr after treatment (vehicle) and those of mice necropsied at 3, 8, 24 and 48 hr after TA dosing. The number of mice per group was 5. Values are expressed as the mean \pm S.D. Black columns: the HFD mice, white columns: the ND mice. ††: $p < 0.01$ between the ND and the HFD groups (Aspin-Welch t test). †††: $p < 0.01$ compared to the vehicle-treated group (vehicle) (parametric Dunnett's test). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

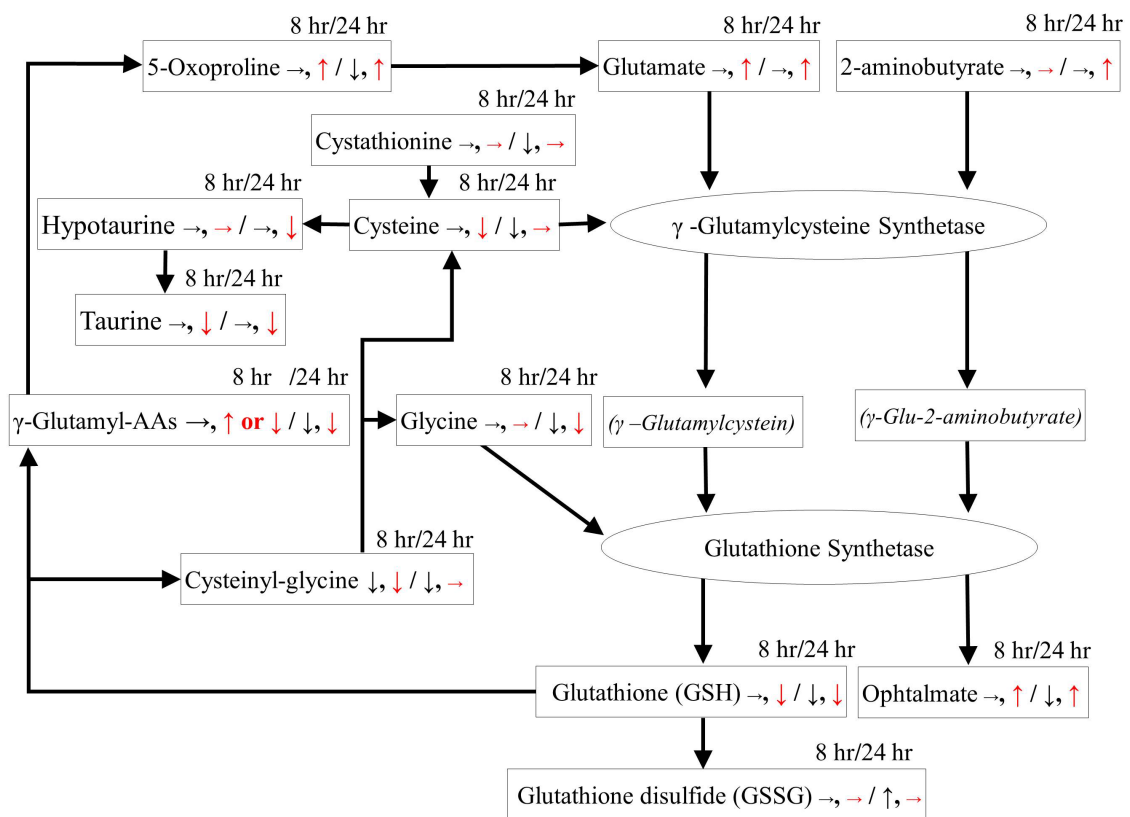


Figure 2-5. Changes of metabolites involved in the glutathione metabolism at 8 and 24 hr after TA administration. Metabolites are represented by squares, and enzymes are represented by circles. Metabolites written in the roman type were investigated in this study, and those written in the italic type were not investigated. The up-arrows, down-arrows, and horizontal arrows show that the values of the metabolites in the livers of TA-treated mice increased, decreased or did not change compared to those of time- and diet-matched vehicle-treated mice, respectively. Black arrows represent the changes in the ND mice. Red arrows represent the changes in the HFD mice. Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

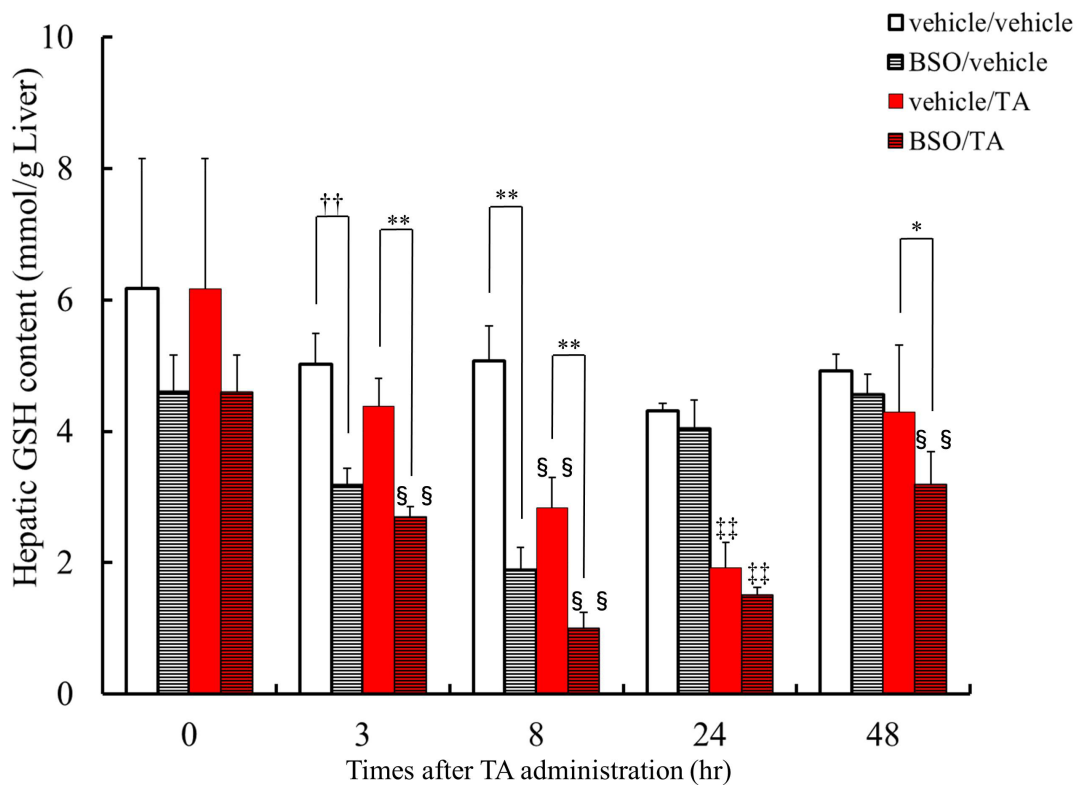


Figure 2-6. Hepatic GSH content of mice necropsied at 0, 3, 8, 24 and 48 hr after vehicle or TA dosing.

All mice were treated with vehicle or BSO, hence, there were 4 groups (vehicle/vehicle group, BSO/vehicle group, vehicle/TA group and BSO/TA group). The number of mice per group (n) was 5 except for the vehicle/TA groups necropsied at 3, 8 and 48 hr (n = 4), and the BSO/TA group necropsied at 48 hr after administration of TA (n = 6). At 0 hr after vehicle or TA dosing, the data of the vehicle/TA group and the BSO/TA group was the same as that of the vehicle/vehicle group and the BSO/vehicle group, respectively, because TA or vehicle were not actually dosed at this time point. Values are expressed as the mean \pm S.D. White columns: the vehicle/vehicle group, black shaded columns: the BSO/vehicle group, red columns: the vehicle/TA group, and dark red columns: the BSO/TA group. *, **: $p < 0.05$ and $p < 0.01$ between the vehicle/vehicle and the BSO/vehicle groups, or between the vehicle/TA and the BSO/TA groups (Student's *t*-test), respectively. ††: $p < 0.01$ between the vehicle/vehicle and the BSO/vehicle groups (Aspin-Welch *t*-test). §§: $p < 0.01$ between the vehicle/vehicle

and the vehicle/TA groups, or between the BSO/vehicle and the BSO/TA groups (Student's *t*-test). ^{††}: *p* < 0.01 between the vehicle/vehicle and the vehicle/TA groups, or between the BSO/vehicle and the BSO/TA groups (Aspin-Welch *t*-test). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

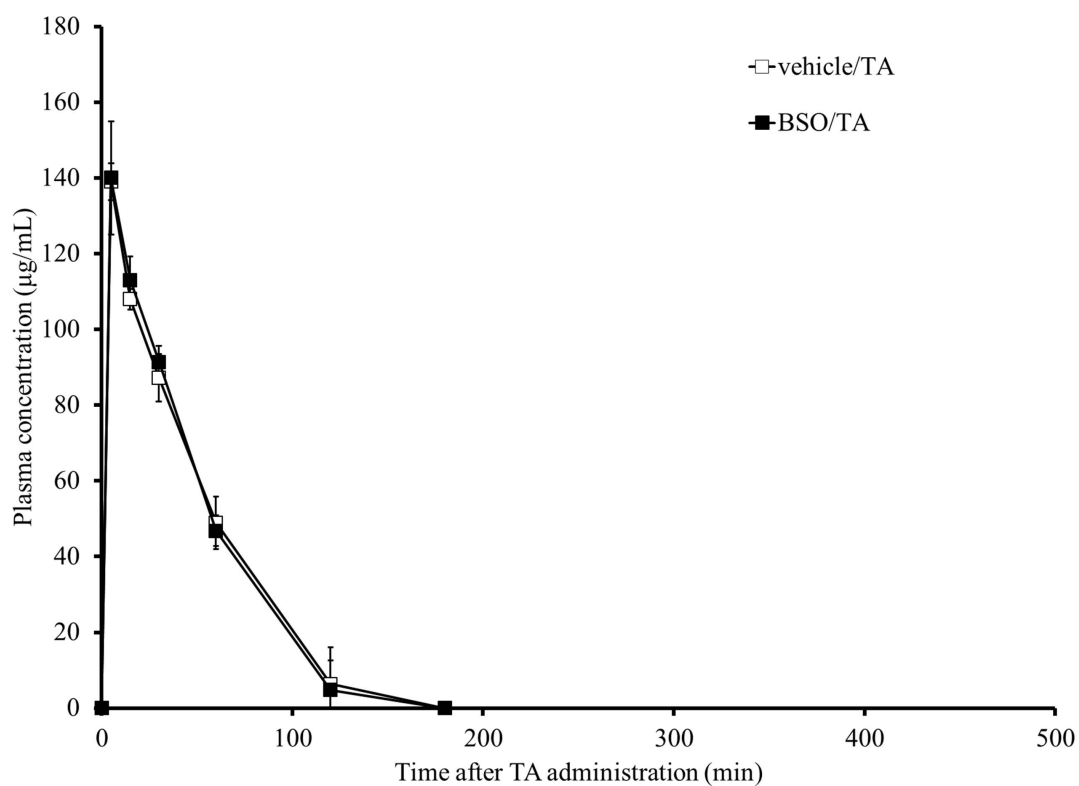


Figure 2-7. Plasma concentrations of TA after a single dosing of TA. All the mice were treated with vehicle or BSO, hence, there were 2 groups (vehicle/TA group and BSO/TA group). The number of mice per each group was 4. White squares: TA concentration in the vehicle/TA group, black squares: TA concentration in the BSO/TA group. Values are expressed as the mean \pm S.D.

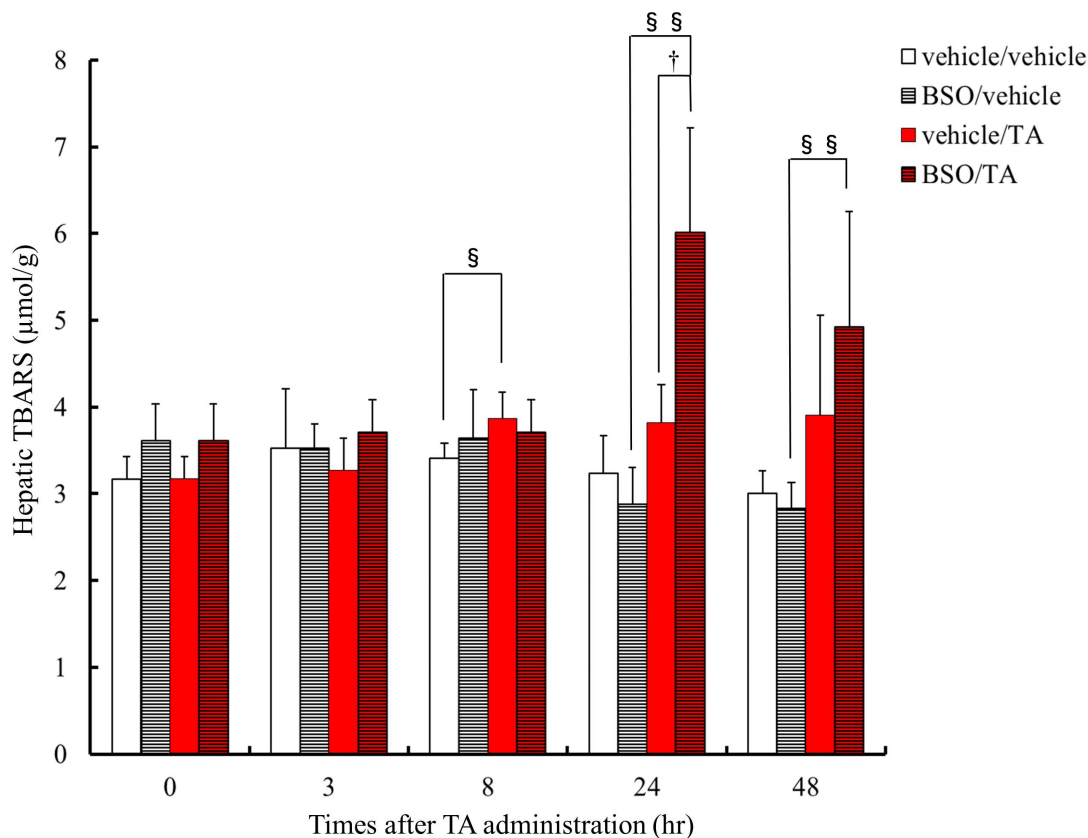


Figure 2-8. Hepatic TBARS content of mice necropsied at 0, 3, 8, 24 and 48 hr after TA administration.

All the mice were treated with vehicle or BSO, hence, there were 4 groups (vehicle/vehicle group,

BSO/vehicle group, vehicle/TA group and BSO/TA group). The number (n) of mice per group was 5

except for the vehicle/TA group necropsied at 3, 8 and 48 hr (n = 4), and the BSO/TA group necropsied at

48 hr (n = 6). At 0 hr after vehicle or TA dosing, the data of the vehicle/TA group and the BSO/TA group

the same as that of the vehicle/vehicle group and the BSO/vehicle group, respectively, because TA or

vehicle were not actually dosed at this time point. Values are expressed as the mean ± S.D. White

columns: the vehicle/vehicle group, black shaded columns: the BSO/vehicle group, red columns: the

vehicle/TA group, and dark red columns: the BSO/TA group. †: $p < 0.05$ between the vehicle/TA and the

BSO/TA groups (Aspin-Welch t -test). §, §§: $p < 0.05$ and $p < 0.01$ between the vehicle/vehicle and the

vehicle/TA groups, or between the BSO/vehicle and the BSO/TA groups (Student's t -test), respectively.

Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Hepatic glutathione

contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis due to suppression of oxidative stress in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 40: 509-521, 2015.

第三章 高脂肪食給餌マウスにおける thioacetamide 誘発肝細胞壊死減弱への肝臓 p38 mitogen-activated protein kinase の関与

序

第二章までの結果から、非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) のモデル動物である高脂肪食給餌マウス (HFD マウス) [33, 34]では、げっ歯類用標準飼料給餌マウス (ND マウス) と比較して肝毒性物質 thioacetamide (TA) 誘発肝細胞壊死が減弱すること、および HFD マウスの肝臓では TA 投与後に glutathione (GSH) の合成・代謝が亢進することで TA 誘発酸化ストレスの増加が抑制されることが TA 誘発肝細胞壊死減弱に寄与していることが示された。しかし、HFD マウスでは TA 投与により酸化ストレスが増加しないにもかかわらず肝細胞壊死が起こることから、酸化ストレス以外の機序が TA 誘発肝細胞壊死に関与していることは明らかであるとともに、それらが HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱に関与している可能性が考えられた。

p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) は成長因子や環境刺激などに応答して活性化するキナーゼである [16]。また、carbon tetrachloride や ethanol の単独投与あるいは lipopolysaccharide と D-galactosamine の併用投与によって肝臓の壊死が起こるが、この際にも p38 MAPK が活性化する [20-22]。さらに、ethanol と Fas アゴニスト作用を持つ抗体の併用投与、pyrazole と lipopolysaccharide の併用投与、あるいは虚血再還流による肝壊死が、p38 MAPK 阻害剤投与により減弱することも報告されている [23-25]。このように p38 MAPK は薬物誘発肝毒性に深く関与すると考えられることから、酸化ストレス以外の TA 誘発肝細胞壊死減弱機序に関与する候補分子と考えられた。

本章では、p38 MAPK が HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱に寄与しているかを確認した。

材料と方法

実験デザイン

本章では後述する 2 つの実験を実施した。投与と剖検のタイミングについて Figure 3-1 に概略を示す。

実験 1 では、第二章の実験 1 の凍結肝臓サンプルのうち、投与 3、8 および 24 時間後に剖検した動物から採取したものを使用し、HFD マウスと ND マウスにおける肝臓 p38 MAPK およびリン酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK) の Western blot 解析を実施した。また、第二章で実施した metabolomics 解析で同定された代謝物のうち、炎症性脂質メディエーターについてさらなる解析を行った。実験 2 では p38 MAPK inhibitor SB203580 (SB) と TA を併用投与した ND マウスの TA 誘発肝細胞壊死について、SB 非投与 ND マウスのそれと比較した。

動物

実験 2 では、8 週齢の雄 C57BL/6J マウスを日本チャールス・リバー（横浜）から購入し、水道水およびげっ歯類用標準飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業、東京）を自由摂取させた。3 週間の給餌後、11 週齢のマウスに後述の投与を行った。

本章で行った動物実験は第一三共株式会社実験動物委員会の倫理審査により承認されたものであり、動物の愛護及び管理に関する法律および第一三共株式会社の動物実験に関する標準操作手順書に準拠して行った。

p38 MAPK の Western blot 解析

活性型である p-p38 MAPK[15, 16]および総 p38 MAPK (p-p38 MAPK と非リン酸化 p38 MAPK の合計) の Western blot 解析を行うために、核および細胞質画分抽出キット (NE-PER、Thermo

Fisher Scientific、Rockford、IL、USA) を用いて肝臓凍結サンプルのサイトゾル画分を調整した。サイトゾル画分はタンパク濃度が 10 mg/ml になるようにリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、その後 Tris-SDS beta-mercaptoethanol sample loading buffer (コスモ・バイオ、東京) でさらに 5 mg/ml に希釈した。サンプルは 95 °C で 5 分間加熱し、10 µl (タンパク量として 50 µg) を 10% ポリアクリルアミドゲル (フナコシ、東京) で電気泳動し、泳動後にブロッキング装置 (Horizeblot、アトー、東京) を用いて Immobilon® polyvinylidene difluoride membrane (Millipore、Billerica、MA、USA) に転写した。なお、泳動条件はプレステインド SDS-PAGE スタンダード (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) の泳動状況を参考に決定した。転写した膜は enhanced chemiluminescence blocking agent (GE Healthcare、Buckinghamshire、UK) でブロッキングし、抗ヒト p-p38 MAPK (Thy 180/Tyr 182、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA) あるいは抗ヒト p38 MAPK (Cell Signaling Technology) を一次抗体として反応させた。二次抗体として biotin-labeled anti-rabbit IgG antibody (GE Healthcare) と反応させ、さらに streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (GE Healthcare) と反応させた後、ECL Western blotting detection reagent (GE Healthcare) で処理し、インスタントフィルム (富士フィルム、東京) で撮影した。バンドを AE-6961 (アトー) を用いてスキャンし、画像解析装置 (CS Analyzer、アトー) で数値化した。結果は各タイムポイントにおける TA 非投与 ND マウスの発現量に対するパーセントで表した。

TA 及び SB 投与

TA 投与マウスには生理食塩水に溶解した 100 mg/kg の TA (和光純薬工業、大阪) を、TA 非投与マウスには生理食塩水を単回腹腔内投与した。肝臓 p38 MAPK の機能を抑制する目的で、過去の報告[55-57]を参考に、SB 投与マウスには生理食塩水に懸濁した 75 mg/kg の選択的 p38 MAPK 阻害剤 SB (Cayman Chemical、Ann Arbor、MI、USA) を腹腔内投与した。SB 非投与マウスには生理食塩水を腹腔内投与した。投与は 2 回行い、TA あるいは生理食塩水投与 1.5 時間

前および 6 時間後とした。以上の投与条件に基づき、4 つの群、すなわち生理食塩水のみ投与群 (vehicle/vehicle group)、SB と生理食塩水投与群 (SB/vehicle group)、生理食塩水と TA 投与群 (vehicle/TA group)、そして SB と TA 投与群 (SB/TA group) に分けた。全てのマウスは TA あるいは生理食塩水投与 24 時間後にイソフルラン (ファイザー、東京) 麻酔下の放血による安楽死処置後に剖検した。

病理組織学的検査

肝臓の外側左葉と内側右左葉の一部を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、HE 染色標本を作製した。TA 誘発肝細胞壊死については第一章と同様の基準で評価した。

統計学的方法

結果は平均値±標準偏差 (SD) で示した。Western blot 解析では、まず *F* test で等分散性を確認し (有意水準 : 0.25)、その後に Student's *t*-test (等分散である場合) あるいは Aspin-Welch *t*-test (等分散でない場合) による有意差検定を行った。これらの解析には Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft、Seattle、WA、USA) を用いた。metabolomics 解析の結果については、外れ値によってばらつきが増加するのを抑える目的で、データを対数変換し、Array Studio (Omicsoft、Cary、NC、USA) あるいは“R” (<http://cran.r-project.org/>) で Three-way ANOVA を実施し、False discovery rate (FDR) についても *q*-value によって評価して $q < 0.05$ である代謝物のみ *p* 値による評価を行った。TA 誘発肝細胞壊死のグレードと頻度は、コモン・ゲートウェイ・インタフェースプログラム (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/utest/getpar.html>) を使用し Mann-Whitney *U* test によって行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意と判断した。

結果

p-p38 MAPK および総 p38 MAPK の発現（実験 1）

TA 投与 3 時間後では、HFD、ND マウスともに p-p38 MAPK の発現が認められた。TA 投与 8 時間後においては、HFD マウスでは p-p38 MAPK がほぼ消失したのに対し、ND マウスでは発現が認められた（Figure 3-2）。TA 投与 24 時間後では、HFD マウスおよび ND マウスで p-p38 MAPK の発現が消失した。各バンドを数値化して比較したところ、投与 8 時間後においては、TA 投与 HFD マウスでは TA 非投与 HFD マウスあるいは TA 投与 ND マウスと比較して p-p38 MAPK の発現量が有意に低かったのに対し、TA 投与 ND マウスと TA 非投与 ND マウスの間では差はなかった（Figure 3-3-A）。投与 24 時間後では、TA 投与 HFD マウスおよび ND マウスで p-p38 MAPK の発現は認められなかった。また、全てのタイムポイントにおいて、TA 非投与 HFD マウスと ND マウスの間に p-p38 MAPK あるいは総 p38 MAPK の発現量に差は認められなかった（Figure 3-3-A、3-3-B）。

なお、総 p38 MAPK の発現は、TA 投与 3 時間後に ND マウスでは TA 非投与 ND マウスと比較して有意に低く、HFD マウスでは TA 非投与 HFD マウスと比較して有意に高かった。この変動の理由は明らかではないが、同タイムポイントにおける p-p38 MAPK に変化が無いため、p38 MAPK 活性には影響しない生物学的意義の低い変化と考えた。

肝臓炎症性脂質メディエーターの metabolomics 解析（実験 1）

Table 3-1 に炎症性脂質メディエーターとして報告されている不飽和脂質とその代謝物[58-66]についての metabolomics 解析結果を示す。

投与 24 時間後では、TA 投与 HFD マウスおよび ND マウスにおいて TA 非投与マウスと比較して 12-HETE が有意に高かった。さらに、TA 投与 ND マウスでは、TA 非投与 ND マウスと比

較して 12-HEPE および 15-HETE が有意な高値、eicosapentaenoate、linoleate および arachidonate が有意に低値となり、eicosapentaenoate/linoleate 比および eicosapentaenoate/arachidonate 比は統計解析はしていないものの明らかに低値となった。これに対し、TA 投与 HFD マウスではそのような変化は観察されなかった。

なお、TA 投与 8 時間後に 12-HETE が HFD マウスでのみ増加した。しかし、この増加の程度は、TA 投与 24 時間後の HFD マウスおよび ND マウスの 12-HETE の増加の程度と比べて軽度であり、また TA 投与 8 時間後に HFD マウスで他に変動した炎症性脂質メディエーターはなかった。したがって、この TA 投与 8 時間後の HFD マウスにおける 12-HETE の増加は炎症反応の活性化を意味しないものと考えた。

ND マウスの TA 誘発肝細胞壊死に p38 MAPK 阻害剤 SB 投与が与える影響（実験 2）

TA 誘発肝細胞壊死の発生に p38 MAPK が関与しているかを検索する目的で、ND マウスに選択的 p38 MAPK 阻害剤 SB と TA を併用投与した。TA 投与 24 時間後において、TA 単独投与マウスでは 9 例中 3 例が死亡したが、SB と TA の併用投与マウスでは死亡例はなかった（Table 3-2）。TA 単独投与マウスと SB と TA の併用投与マウスの両方で TA 誘発肝細胞壊死が観察されたが、壊死の程度は SB と TA の併用投与マウスで有意に軽度であった（Figure 3-4、Table 3-2）。

考察

第一章および第二章の結果から、HFD マウスでは TA 誘発肝細胞壊死が減弱すること、その機序として GSH による酸化ストレス抑制が考えられることを示した。本章では、p38 MAPK が HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱に寄与しているかを確かめる実験を行った。

Western blot 解析の結果、TA 投与 HFD マウスでは TA 非投与 HFD マウスと比較して投与 8 および 24 時間後で p-p38 MAPK の発現量が有意に低かった。一方、TA 投与 ND マウスでは TA 非投与 ND マウスと比較して投与 24 時間後でのみ p-p38 MAPK の発現量が低値だった。p38 MAPK は MAPK ファミリーに属するキナーゼで、リン酸化されることで活性化される[15, 16] ことから、p-p38 MAPK の発現量減少は p38 MAPK の不活性化を意味する。また、p38 MAPK と肝細胞壊死の関与については、これまでに複数報告されている。例えば、carbon tetrachloride 投与、ethanol 投与あるいは lipopolysaccharide と D-galactosamine の併用投与によって肝臓の壊死が起こるが、この際に p38 MAPK が活性化する[20-22]。ethanol と Fas アゴニスト作用を持つ抗体の併用投与、pyrazole と lipopolysaccharide の併用投与あるいは虚血再還流によって誘発した肝壊死が、p38 MAPK 阻害剤の投与により減弱することも報告されている[23-25]。これらのことから、HFD マウスでは TA 投与後に速やかに p38 MAPK が不活性化することが、TA 誘発肝細胞壊死の減弱に寄与していると考えられた。

p38 MAPK は炎症を制御しており、p38 MAPK 阻害剤投与により炎症反応が抑制される[16, 68]。HFD マウスにおいて、TA 投与後の p-p38 MAPK タンパクの迅速な発現減少と一致して炎症反応も低下することを確認する目的で、肝臓の炎症性脂質メディエーター[58-66]について metabolomics 解析を行った。TA 投与 24 時間後では、TA 投与 HFD マウスでは TA 非投与 HFD マウスと比較して 12-HETE のみが有意に高かったのに対し、TA 投与 ND マウスでは TA 非投与 ND マウスと比較して 12-HETE、15-HETE および 12-HEPE が有意に高く omega-3

polyunsaturated fatty acid の eicosapentaenoate と omega-6 polyunsaturated fatty acid の linoleate および arachidonate[58, 67]が有意に低かった。また、eicosapentaenoate などの omega-3 polyunsaturated fatty acid は炎症抑制、linoleate および arachidonate などの omega-6 polyunsaturated fatty acid は炎症促進に働くこと[65, 66]から、omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acid 比の減少が炎症性マーカーとなりうることが報告されている[63, 64]。今回も、omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acid 比は統計解析はしていないものの TA 投与 ND マウスでのみ明らかに低くなった。以上のことから、HFD マウスでは TA 投与後に炎症性脂質メディエーターの増加が抑制されており、TA 投与後の p-p38 MAPK タンパクの迅速な減少と一致して炎症反応が低下していることが示された。

これまでにマウスの TA 誘発肝細胞壊死における p38 MAPK の寄与について直接的に確認した報告はない。そこで、本章では ND マウスに選択的 p38 MAPK 阻害剤である SB を併用投与し、TA 誘発肝細胞壊死が減弱するかを調べた。その結果、投与 24 時間後において、TA 単独投与マウスでは死亡例が発生し、重度の TA 誘発肝細胞壊死が認められたのに対し、TA・SB 併用投与マウスでは死亡例は無く、また TA 誘発肝細胞壊死も減弱した。したがって、肝臓の p38 MAPK はマウスの TA 誘発肝細胞壊死に関与していることが明らかになり、HFD マウスにおける TA 投与後の速やかな p38 MAPK 活性の減少が TA 誘発肝細胞壊死減弱の機序の一つであることが示された。

本章の結果から、TA 非投与 HFD マウスと ND マウスで肝臓の p-p38 MAPK 発現量及び総 p38 MAPK 発現量に差が無かったことから、肝臓における p38 MAPK の発現および活性は高脂肪食給餌のみでは変わらないと推測された。一方、TA 投与により p38 MAPK の活性が変化し、その結果として HFD マウスでは TA 誘発肝細胞壊死が減弱したと考えられた。HFD マウスと ND マウスで TA 投与後に p38 MAPK の活性に差が生じる原因は本章の結果からは明らかになっていないことから、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死減弱における p38 MAPK の関与をより詳細に明らかにするためには、更なる検索が必要と考えられた。

以上、本章の結果から、HFD マウスの肝臓では TA 投与後に速やかに p38 MAPK の活性が減少することで、TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが示唆された。

Table 3-1. Changes of hepatic pro-inflammatory lipid mediators after TA administration

	KEGG	HMDB	8 hr				24 hr			
			ND		HFD		ND		HFD	
			Vehicle	TA	Vehicle	TA	Vehicle	TA	Vehicle	TA
Eicosapentaenoate (20:5n3)			4.4733	4.4790	0.5043	0.3287	7.1776	1.1081*	0.5694	0.6777
Linoleate (18:2n6)			0.8808	1.0202	0.9648	0.8172	1.2018	0.6707**	1.0004	1.1970
Arachidonate (20:4n6)			0.8244	0.9639	2.0286	1.5333	0.7994	0.4497**	1.9545	1.7596
5-HETE			1.3093	1.0107	0.5728	0.5633	1.5248	2.7212	0.8697	0.9554
12-HETE		HMDB06111	0.9185	1.3386	0.4028	0.9371**	0.8294	6.7603**	0.5735	3.8228**
15-HETE	C04742	HMDB02110	0.9736	0.9003	0.7659	0.6818	1.1193	2.7601*	0.8332	1.2954
12-HEPE		HMDB10202	1.3675	1.5867	0.6441	0.7395	1.6396	5.2847**	0.6714	0.8476
Eicosapentaenoate/linoleate ratio			5.0787	4.3903	0.5227	0.4022	5.9724	1.6522	0.5692	0.5662
Eicosapentaenoate/arachidonate ratio			5.4261	4.6467	0.2486	0.2144	8.9787	2.4641	0.2913	0.3851

8 hr and 24 hr: The mice necropsied at 8 or 24 hr after vehicle or TA administration, respectively (n=5). ND: the ND mice, HFD: the HFD mice. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, HMDB: Human Metabolome Database. Each value was re-scaled to have median equal to 1. *, **, *p* < 0.05 or *p* < 0.01 versus time-matched vehicle-treated group, respectively (three-way ANOVA). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Decreased hepatic phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis in diet-induced obese mice. J Toxicol Sci 41: 245-253, 2016.

Table 3-2. The effect of SB administration on TA-induced hepatocellular necrosis at 24 hr after dosing in the ND mice

	vehicle/vehicle	SB/vehicle	vehicle/TA	SB/TA
Number of mice ^a	6 (0)	6 (0)	9 (3)	9 (0)
Incidence ^b	6, 0, 0, 0, 0, 0	6, 0, 0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0, 6, 3	0, 0, 2, 5, 1, 1
Mean score	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	4.3 ± 0.50	3.1 ± 0.93^{**}

vehicle/vehicle group: group treated only with vehicle, SB/vehicle group: group treated with SB and vehicle, vehicle/TA group: group treated with vehicle and TA, SB/TA group: group treated with SB and TA. Mean score represents the mean of grades ± S.D. a: The values in parentheses show the number of dead mice. b: The numbers show the number of the mice showing each grade of hepatocellular necrosis (0 to 5, from the left to the right). ^{**} : $p < 0.01$ for comparison versus the score of vehicle/TA group (Mann-Whitney U test). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Decreased hepatic phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis in diet-induced obese mice. J Toxicol Sci 41: 245-253, 2016.

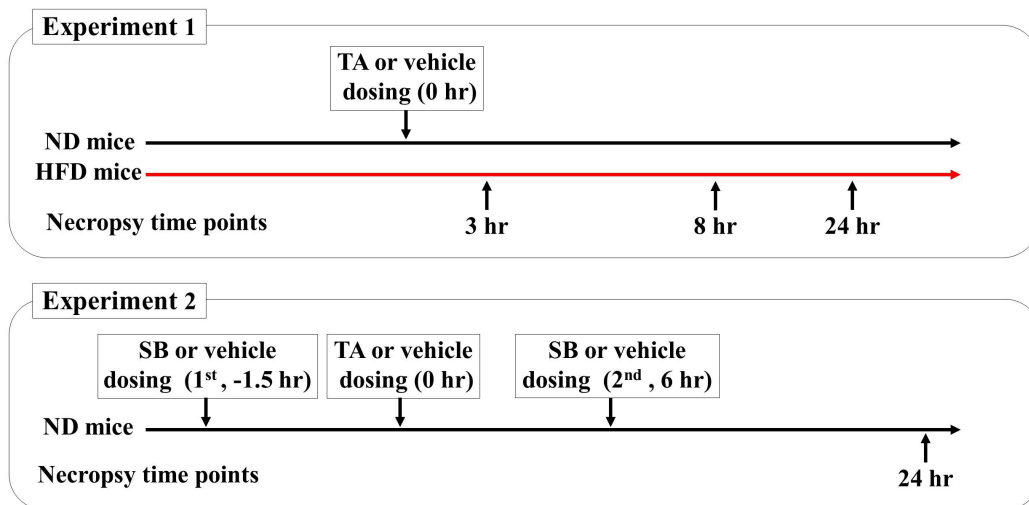


Figure 3-1. Schematic diagram of experiments 1 and 2. Each diagram outlines the timing of TA and SB treatments and necropsies. hr: hours. Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Decreased hepatic phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 41: 245-253, 2016.

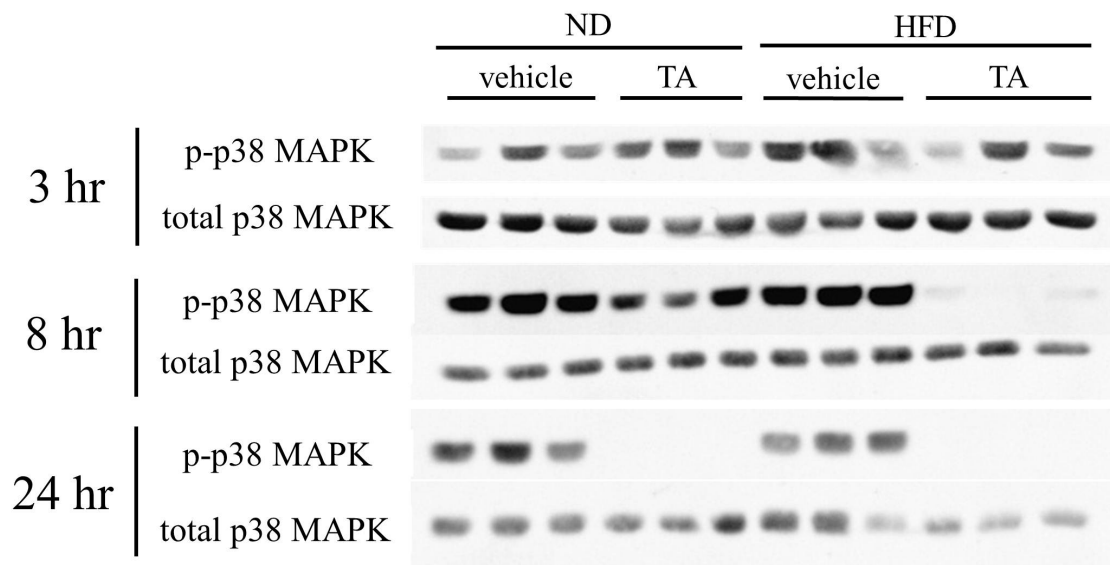


Figure 3-2. Western blots of hepatic p-p38 MAPK and total p38 MAPK in the livers of the vehicle- and TA-treated mice. The number of the HFD mice (HFD) or the ND mice (ND) was 3 at each time point. Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Decreased hepatic phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 41: 245-253, 2016.

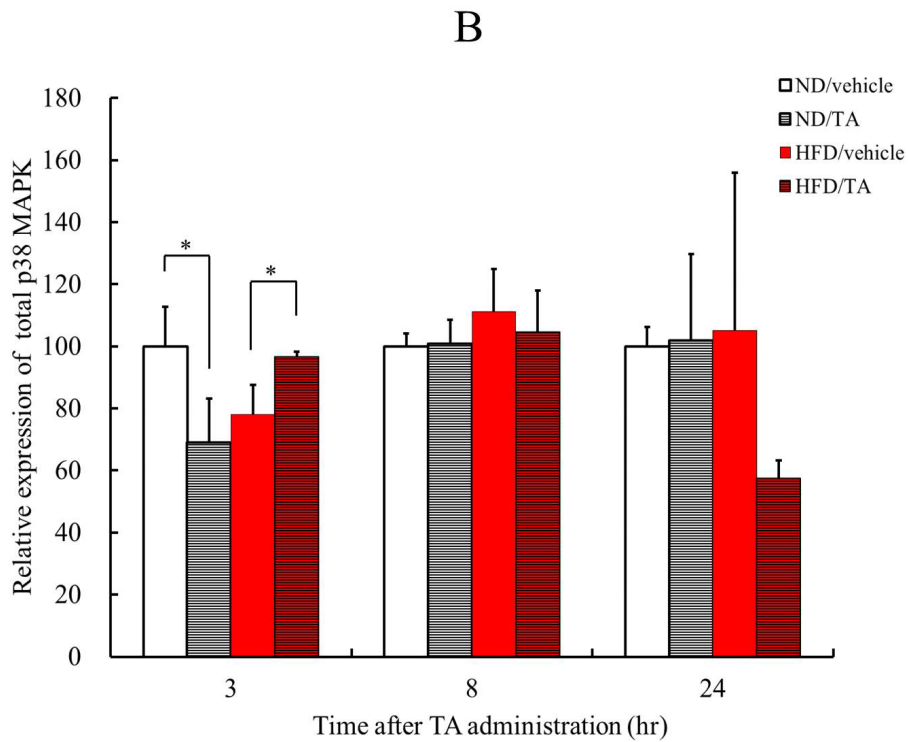
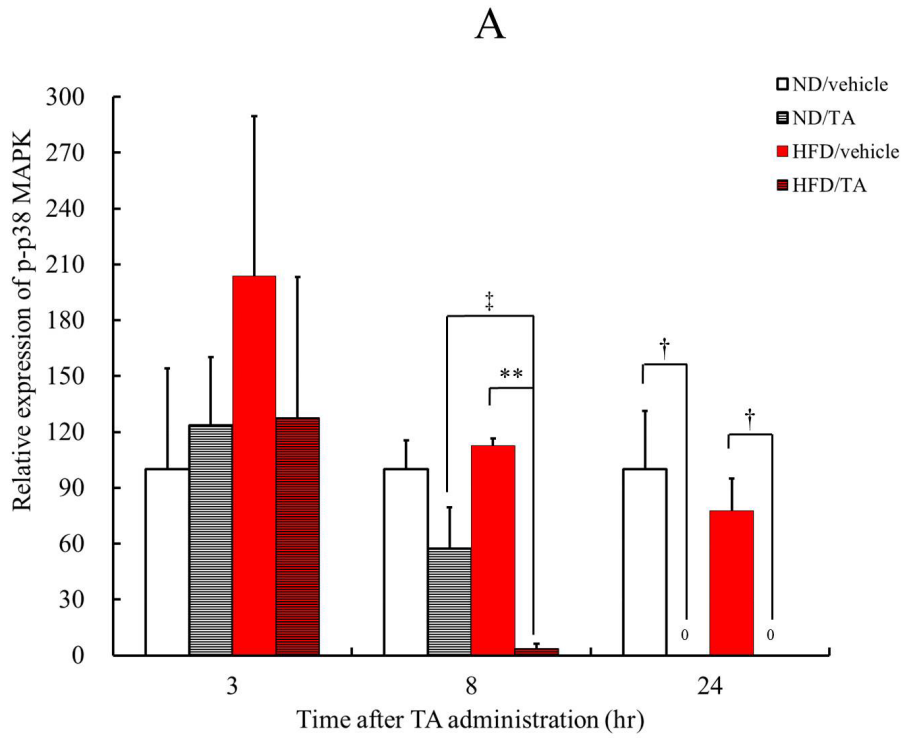


Figure 3-3. The relative protein expressions of p-p38 MAPK (A) and total p38 MAPK (B). The expressions of these proteins were measured by densitometry analysis using the results of Figure 3-2 and the expressions were expressed as percentages of the value of the vehicle-treated ND mice at each time

point. The number of the HFD mice or the ND mice was 3 at each time point. White columns: the vehicle-treated ND mice, black shaded columns: the TA-dosed ND mice, red columns: the vehicle-treated HFD mice, and dark red columns: the TA-dosed HFD mice. *, **: $p < 0.05$ and $p < 0.01$ between the vehicle-treated ND mice and the TA-dosed ND mice, or between the vehicle-treated HFD mice and the TA-dosed HFD mice (Student's t -test), respectively. †: $p < 0.05$ between the vehicle-treated ND mice and the TA-dosed ND mice, or between the vehicle-treated HFD mice and the TA-dosed HFD mice (Aspin-Welch t -test). ‡: $p < 0.05$ between the TA-dosed ND mice and the TA-dosed HFD mice (Aspin-Welch t -test). Modified with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Decreased hepatic phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 41: 245-253, 2016.

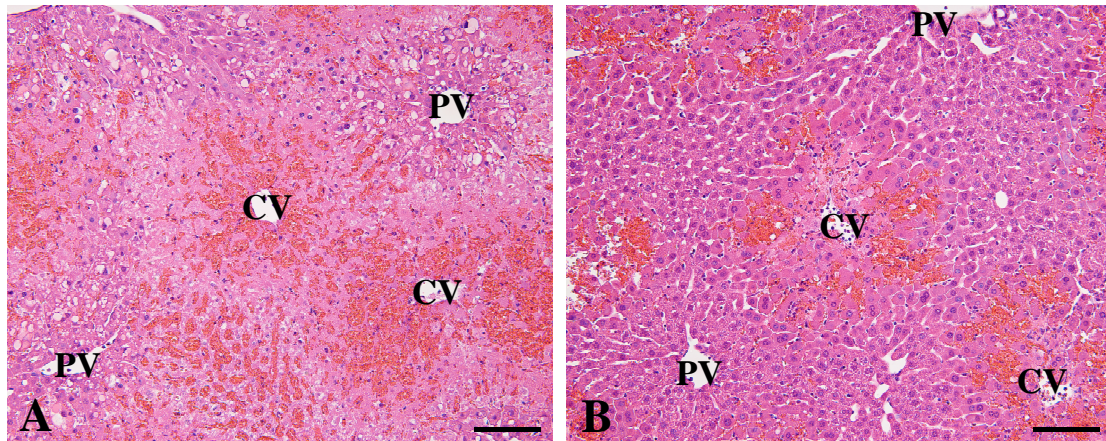


Figure 3-4. Histopathological appearance of typical hepatic lesions at 24 hr after TA administration in the ND mouse. A: The liver of the mouse given TA and vehicle. B: The liver of the mouse given TA and SB. The grade of hepatocellular necrosis was decreased by SB administration. CV: central vein, PV: periportal vein; HE stain; Bar = 100 μ m. Reproduced with permission of The Japanese Society of Toxicology from Shirai, et al. Decreased hepatic phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase contributes to attenuation of thioacetamide-induced hepatic necrosis in diet-induced obese mice. *J Toxicol Sci* 41: 245-253, 2016.

総括

本研究では HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死の減弱メカニズムについて実験し、以下のような成果を得た。

第一章では、HFD マウスは ND マウスと比較して TA 誘発肝毒性が変化するかを確認することを目的として、HFD マウスおよび ND マウスに TA を単回腹腔内投与し、各種検索を行った。その結果、HFD マウス、ND マウスともに TA 投与 24 および 48 時間後に肝細胞壊死が起こるが、HFD マウスでは ND マウスと比較して壊死が軽度であることが示された。しかし、TA およびその代謝物 TASO の血漿中濃度については HFD マウスと ND マウスの間で明らかな差はなかった。また、TA が肝毒性を発揮するために必要な代謝酵素である CYP2E1 の発現量は ND マウスよりも HFD マウスの肝臓の方が有意に高かった。したがって、HFD マウスにおける TA 誘発肝細胞壊死の減弱は、TA や TASO への曝露量や肝臓の薬物代謝酵素の発現量の差によるものではないことが示唆された。一方、肝臓中の GSH 抱合に関与する酵素である GST の量および活性は HFD マウスで ND マウスより低いものの、総 GSH 量は HFD マウスで TA 投与 8 時間後に有意に低値であった。このことから、HFD マウスでは TA 投与後に抗酸化作用など GSH 抱合以外の機序による GSH の消費が示唆された。以上の結果から、NAFLD のモデル動物である HFD マウスでは TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが明らかになり、その機序に GSH が寄与している可能性が示唆された。

第二章では、HFD マウスの TA 誘発肝細胞壊死減弱における GSH の役割を解明する目的で、各種検索を行った。その結果、投与 24 および 48 時間後に TA 投与 ND マウスでは TA 非投与 ND マウスと比較して肝臓の酸化ストレスマーカーが有意に増加したのに対し、HFD マウスでは投与 48 時間後まで増加はみられなかった。また、TA 投与により肝臓酸化ストレスが増加する ND マウスに抗酸化剤 BHA を併用投与すると、TA 誘発肝細胞壊死が有意に減弱することも

確認された。以上のことから、マウスの TA 誘発肝細胞壊死に酸化ストレスが関与していること、HFD マウスでは TA 投与後の酸化ストレスが抑制されることが分かった。また、metabolomics 解析の結果、TA 投与 HFD マウスの肝臓では TA 非投与 HFD マウスと比較して投与 8 および 24 時間後に GSH 量の減少と GSH の合成亢進を示唆する ophthalmate や 5-oxoproline の増加などの GSH 関連代謝物量の変動がみられた。これに対し、TA 投与 ND マウスの肝臓では GSH 関連代謝物量の変動が認められたものの、その変動は GSH 合成の亢進を示すものではなかった。この結果は、HFD マウスの肝臓では ND マウスと比較して TA 投与後の GSH 合成と消費が亢進することを示している。さらに、HFD マウスに BSO を投与して肝臓 GSH を減少させると、TA 誘発肝細胞壊死および肝酸化ストレスが増加することも明らかになった。以上のことから、HFD マウスの肝臓では TA 投与後に GSH 合成とその消費が亢進することにより TA 誘発酸化ストレスが打ち消され、その結果として TA 誘発肝細胞壊死が減弱することが示唆された。

第三章では、薬物誘発性肝毒性への関与が報告されている肝臓の p38 MAPK に着目して実験を行った。その結果、ND マウスでは投与 24 時間後でのみ活性型である p-p38 MAPK が減少したのに対し、HFD マウスでは TA 投与 8 時間後から p-p38 MAPK が減少した。p38 MAPK が炎症を制御することに着目し、炎症性脂質メディエーターの metabolomics 解析を行った結果、TA 投与 HFD マウスの肝臓では TA 非投与 HFD マウスと比較して投与 24 時間後に 12-HETE のみが増加した。これに対し、TA 投与 ND マウスでは TA 非投与 ND マウスと比較して 12-HETE、15-HETE および 12-HEPE の増加と omega-3/omega-6 polyunsaturated fatty acid 比の減少がみられた。これらの結果から HFD マウスの肝臓では TA 投与後 p-p38 MAPK タンパクが速やかに減少し、それと一致して炎症反応も低下することが示された。さらに、TA 投与後の p-p38 MAPK 減少が遅い ND マウスに p38 MAPK 阻害剤である SB を併用投与すると TA 誘発肝細胞壊死が減弱したことから、p38 MAPK は TA 誘発肝細胞壊死に関与していることも明らかになった。以上

のことから、HFD マウスにおける TA 投与後の速やかな肝臓 p38 MAPK の不活性化が TA 誘発肝細胞壊死の減弱に寄与していると考えられた。

本研究の結果から、NAFLD の病態モデル動物である HFD マウスでは ND マウスと比較して TA 誘発肝細胞壊死の程度が低いことが明らかになった。また、その機序として、HFD マウスの肝臓では TA 投与後に GSH の合成が亢進して TA 誘発酸化ストレスが打ち消されること、および TA 誘発肝細胞壊死に関与する p38 MAPK が速やかに不活性化することが考えられた。医薬品の前臨床試験において薬物誘発性肝毒性は健常動物を用いて評価されるのが一般的であり、多くの化合物は肝毒性のポテンシャルを有すると判断されてその開発が中止される。しかし、本研究の結果から、病態生理学的により患者に近いと考えられる病態モデル動物で評価した場合、そのような化合物の一部で肝毒性ポテンシャルが減弱する可能性があることが示唆される。患者に有効性と安全性が優れた新薬を一刻も早く提供するためには、患者における医薬品開発候補化合物の肝毒性ポテンシャルを過小評価してはならないことは言うまでもないが、同時に過大評価することで優れた薬効を示す化合物の開発を中止することも避けなければならない。本研究で得られた成果は罹患状態では健常状態と比較して薬物誘発性肝毒性の程度が変化しうることを示すものであり、患者における医薬品開発候補化合物の肝毒性ポテンシャルの予測精度を上げるために病態モデル動物を用いた薬物誘発性肝毒性評価が有用である可能性を示すものである。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始暖かいご指導とご教示を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医病理学研究室 中山 裕之 教授に深く敬意を表し感謝します。

また、本研究の機会を与えていただくとともに温かいご理解とご鞭撻を賜りました第一三共株式会社 眞鍋 淳 博士、三分一所 厚司 博士、高崎 涉 博士、森 和彦 博士、寺西 宗広 博士、甲斐 清徳 博士に厚く御礼申し上げるとともに、貴重なご助言、ご援助を頂きました第一三共株式会社 矢本 敬 博士に深く感謝いたします。さらに、本研究の実施にあたり実験にご協力いただきました第一三共株式会社 荒川 真悟 博士、三井田 宏明 博士、松山 拓矢 氏、木下 順三 博士、牧野 俊彦 博士、松岡 美帆 氏、袴田 志野 氏、杉浦 智美 氏、本多 久美 氏を始めとする第一三共株式会社 安全性研究所員の皆様、元三共株式会社 佐藤 隆之 氏、原 公子 氏、鈴木 洋子 氏、八木 昌恵 氏に感謝の意を表します。

参考文献

1. 渡邊 稔之, 眞鍋 淳. 「6.13 肝毒性」. 日本トキシコロジー学会教育委員会編. 『新版トキシコロジー』. 朝倉書店, 2009;281-283, ISBN978-4-254-34025-9
2. Gunawan B, Kaplowitz N. Clinical perspectives on xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*, 2004;36:301-312
3. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*, 2005;4:489-499
4. 小澤 正吾, 山添 康. 「3.4 代謝反応」. 日本トキシコロジー学会教育委員会編. 『新版トキシコロジー』. 朝倉書店, 2009;29-47, ISBN978-4-254-34025-9
5. Chilakapati J, Shankar K, Korrapati MC, Hill RA, Mehendale HM. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos*, 2005;33:1877-1885
6. Chilakapati J, Korrapati MC, Hill RA, Warbritton A, Latendresse JR, Mehendale HM. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide. *Toxicology*, 2007;230:105-116
7. Dyroff MC, Neal RA. Studies of the mechanism of metabolism of thioacetamide s-oxide by rat liver microsomes. *Mol Pharmacol*, 1983;23:219-227
8. Pallottini V, Martini C, Bassi AM, Romano P, Nanni G, Trentalance A. Rat HMGCoA reductase activation in thioacetamide-induced liver injury is related to an increased reactive oxygen species content. *J Hepatol*, 2006;44:368-374
9. Yogalakshmi B, Viswanathan P, Anuradha CV. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 2010;268:204-212
10. Sanz N, Díez-Fernández C, Andrés D, Cascales M. Hepatotoxicity and aging: endogenous

antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta*, 2002;1587:12-20

11. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Wongpoomchai R, Chusiri Y, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008;228:295-300
12. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*, 2003;31:1499-1506
13. Li XX, Zheng QC, Wang Y, Zhang HX. Theoretical insights into the reductive metabolism of CCl₄ by cytochrome P450 enzymes and the CCl₄-dependent suicidal inactivation of P450. *Dalton Trans*, 2014;43:14833-14840
14. 和久井 信. 「2.3 第3段階（細胞の機能障害と毒性）」. 日本トキシコロジー学会教育委員会編. 『新版トキシコロジー』. 朝倉書店, 2009;13-15, ISBN978-4-254-34025-9
15. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2007;1773:1358-1375
16. Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2003;2:717-726
17. vom Dahl S, Schliess F, Graf D, Häussinger D. Role of p38 (MAPK) in cell volume regulation of perfused rat liver. *Cell Physiol Biochem*, 2001;11:285-294
18. Feranchak AP, Berl T, Capasso J, Wojtaszek PA, Han J, Fitz JG. p38 MAP kinase modulates liver cell volume through inhibition of membrane Na⁺ permeability. *J Clin Invest*, 2001;108:1495-1504
19. Cao W, Collins QF, Becker TC, Robidoux J, Lupo EG Jr, Xiong Y, Daniel KW, Floering L, Collins S. p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*, 2005;280:42731-42737
20. Iida C, Fujii K, Koga E, Washino Y, Kitamura Y, Ichi I, Abe K, Matsura T, Kojo S. Effect of

alpha-tocopherol on carbon tetrachloride intoxication in the rat liver. *Arch Toxicol*, 2009;83:477-483

21. Zhang L, Li HZ, Gong X, Luo FL, Wang B, Hu N, Wang CD, Zhang Z, Wan JY. Protective effects of Asiaticoside on acute liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in mice. *Phytomedicine*, 2010;17:811-819
22. Aroor AR, James TT, Jackson DE, Shukla SD. Differential changes in MAP kinases, histone modifications, and liver injury in rats acutely treated with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010;34:1543-1551
23. Wu D, Cederbaum A. Cytochrome P4502E1 sensitizes to tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through activation of mitogen-activated protein kinases in mice. *Hepatology*, 2008;47:1005-1017
24. Wang X, Lu Y, Xie B, Cederbaum AI. Chronic ethanol feeding potentiates Fas Jo2-induced hepatotoxicity: role of CYP2E1 and TNF-alpha and activation of JNK and P38 MAP kinase. *Free Radic Biol Med*, 2009;47:518-528
25. Lv KY, Yu XY, Bai YS, Zhu SH, Tang HT, Ben DF, Xiao SC, Wang GY, Ma B, Xia ZF. Role of inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in liver dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation. *J Surg Res*, 2012;178:827-832
26. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 2004;134:489-492
27. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*, 1999;13:1169-1183
28. Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem*, 2006;281:16768-16776

29. Sekura R, Meister A. Glutathione turnover in the kidney; considerations relating to the gamma-glutamyl cycle and the transport of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974;71:2969-2972
30. Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-USmar VM, Bailey SM. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J*, 2009;417:183-193
31. Lin CC, Yin MC. Effects of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diet. *Br J Nutr*, 2008;99:37-43
32. DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R, Lambris JD. A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology*, 2005;42:1148-1157
33. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, 2012;18:2300-2308
34. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci*, 2013;14:21240-21257
35. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, 2011;332:1519-1523
36. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 2006;43:S99-S112
37. Wang T, Shankar K, Ronis MJ, Mehendale HM. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000;294:473-479
38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951;193:265-275
39. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in

mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 1974;249:7130-7139

40. Staňková P, Kučera O, Lotková H, Roušar T, Endlicher R, Cervinková Z. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro. *Toxicol In Vitro*, 2010;24:2097-2103
41. Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*, 1996;48:439-446
42. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med*, 2009;30:29-41
43. Kim SK, Seo JM, Jung YS, Kwak HE, Kim YC. Alterations in hepatic metabolism of sulfur-containing amino acids induced by ethanol in rats. *Amino Acids*, 2003;24:103-110
44. Agudo-Barriuso M, Lahoz A, Nadal-Nicolás FM, Sobrado-Calvo P, Piquer-Gil M, Díaz-Llopis M, Vidal-Sanz M, Mullor JL. Metabolomic changes in the rat retina after optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013;54:4249-4259
45. Shimizu S, Atsumi R, Itokawa K, Iwasaki M, Aoki T, Ono C, Izumi T, Sudo K, Okazaki O. Metabolism-dependent hepatotoxicity of amodiaquine in glutathione-depleted mice. *Arch Toxicol*, 2009;83:701-707
46. Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S, Shibaya Y, Watanabe M, Igarashi I, Tanaka K, Totsuka S, Takasaki W, Manabe S. A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R) -sulfoximine. *J Toxicol Sci*, 2003;28:455-469
47. Banerjee S, Welsch CW, Rao AR. Modulatory influence of camphor on the activities of hepatic carcinogen metabolizing enzymes and the levels of hepatic and extrahepatic reduced glutathione in mice. *Cancer Lett*, 1995;88:163-169
48. Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological

systems. *Anal Chem*, 2009;81:6656-6667

49. Nair S, Xu C, Shen G, Hebbar V, Gopalakrishnan A, Hu R, Jain MR, Lin W, Keum YS, Liew C, Chan JY, Kong AN. Pharmacogenomics of phenolic antioxidant butylated hydroxyanisole (BHA) in the small intestine and liver of Nrf2 knockout and C57BL/6J mice. *Pharm Res*, 2006;23:2621-2637
50. Yuan X, Xu C, Pan Z, Keum YS, Kim JH, Shen G, Yu S, Oo KT, Ma J, Kong AN. Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Mol Carcinog*, 2006;45:841-850
51. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul*, 2000;36:95-116
52. Stipanuk MH, Coloso RM, Garcia RA, Banks MF. Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J Nutr*, 1992;122:420-427
53. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J*, 2003;17:64-66
54. Walther UI, Czermak A, Mückter H, Walther SC, Fichtl B. Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines. *Arch Toxicol*, 2003;77:131-137
55. Tibbles LA, Spurrell JC, Bowen GP, Liu Q, Lam M, Zaiss AK, Robbins SM, Hollenberg MD, Wickham TJ, Muruve DA. Activation of p38 and ERK signaling during adenovirus vector cell entry lead to expression of the C-X-C chemokine IP-10. *J Virol*, 2002;76:1559-1568
56. Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol*, 2004;24:3057-3067
57. Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, Lee JC, Adams JL, Griswold DE. Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal

- models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996;279:1453-1461
- 58.** Tam VC. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections. *Semin Immunol*, 2013;25:240-248
- 59.** Cunningham FM, Woollard PM, Camp RD. Proinflammatory properties of unsaturated fatty acids and their monohydroxy metabolites. *Prostaglandins*, 1985;30:497-509
- 60.** Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*, 2009;91:791-795
- 61.** Pilkington SM, Rhodes LE, Al-Aasswad NM, Massey KA, Nicolaou A. Impact of EPA ingestion on COX- and LOX-mediated eicosanoid synthesis in skin with and without a pro-inflammatory UVR challenge--report of a randomised controlled study in humans. *Mol Nutr Food Res*, 2014;58:580-590
- 62.** Strassburg K, Huijbrechts AM, Kortekaas KA, Lindeman JH, Pedersen TL, Dane A, Berger R, Brenkman A, Hankemeier T, van Duynhoven J, Kalkhoven E, Newman JW, Vreeken RJ. Quantitative profiling of oxylipins through comprehensive LC-MS/MS analysis: application in cardiac surgery. *Anal Bioanal Chem*, 2012;404:1413-1426
- 63.** Elabdeen HR, Mustafa M, Szklenar M, Rühl R, Ali R, Bolstad AI. Ratio of pro-resolving and pro-inflammatory lipid mediator precursors as potential markers for aggressive periodontitis. *PLoS One*, 2013;8:e70838
- 64.** Kalogeropoulos N, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Rousinou G, Toutouza M, Stefanadis C. Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clin Chim Acta*, 2010;411:584-591
- 65.** Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their

lipid mediators: towards an understanding of resolvin and protectin formation. *Prostaglandins*

Other Lipid Mediat, 2012;97:73-82

66. Fritsche KL. The science of fatty acids and inflammation. *Adv Nutr*, 2015;6:293S-301S
67. Chen HW, Lii CK, Ko JJ, Wang ST, Hsu JD. Regulatory effects of dietary n-3 and n-6 lipids on plasma and hepatic lipid levels, liver cell number and microsomal protein content in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1996;55:329-335
68. Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*, 2000;47:185-201