

パラセタモール誘発性肝障害における酸化ストレスと DNA 断片化に対する漢方養生サプリメントの保護効果

Prof. F. Marotta, MD, PhD

【要約】

中毒量（1.5 g/kg 体重）および中毒量未満（150 mg/kg 体重）のパラセタモール投与によるスプレーグ-ドーリー（Sprague-Dawley）ラットの肝障害に対する田七杜仲精（DTS、（株）協通事業、東京、日本）1.5 g/kg 体重の肝保護効果を評価した。パラセタモールの投与により、血清総蛋白の低下とともに、血清アルカリフォスファターゼ（ALP）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）上昇し、その程度は中毒量投与群の方が高かった。この現象は、両パラセタモール投与群における肝臓のレドックス状態の低下[グルタチオン（GSH）、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPx）およびカタラーゼ（CAT）の減少、マロニルジアルデヒド（MDA）の増加]と並行していた。また、アデノシントリホスファターゼ（ATPase）とチオールの著減および DNA 断片化が肝組織に発生した。DTS 前処置群には、肝酵素異常および肝臓のレドックス状態低下の著しい軽減が認められた。さらに、DTS 群では、DNA 断片化ならびに肝組織の ATPase および蛋白質チオールの測定値低下が、パラセタモール単独投与の 2 群と比較して一部阻止された。DTS の詳細な作用機序を解明するにはさらに詳細な検討が必要であるが、活性酸素種の形成防止と関係し、それによって肝細胞の傷害を防止するとともに、おそらく肝臓の抗酸化酵素の合成に関与する遺伝子を調節することにより、著しい DNA 保護効果を発揮するものと思われる。

【緒言】

肝臓はあらゆる薬物や異物の代謝処理において中心的役割を担っているため、薬物誘発性肝障害は実質的にはすべての処方薬物治療における合併症である可能性がある。肝毒性を有する化学物質のほとんどは、主に脂質過酸化やその他の酸化的損傷により肝細胞を損傷するが、こうした事実は鎮痛剤や解熱剤として広く用いられているパラセタモールは治療量で用いられれば一般に安全と考えられ 1、代表的な小児に対する選択薬でもあるパラセタモールについても当てはめることができる。しかし、パラセタモールの肝毒性は欧米諸国で薬剤性肝不全の原因の第一位であり 2、急性過量または蓄積過量によって重度の肝障害を引き起こし、肝不全に進行する可能性がある。

提唱されている主な毒性機序には、Cyp2E1 による反応性代謝物である N-アセチル-p-ベンゾキノイミン（NAPQI）の代謝活性化、これが細胞内 GSH を枯渇させ、ついで重要な細胞内蛋白質や高分子と共有結合するという価値が含まれる 3,4。

専門誌掲載：

ついで起こる蛋白質（ミトコンドリア蛋白質）のアルキル化が、ミトコンドリア内での活性酸素種の形成を誘発する 6,7。これらの事象は主に、細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇、Bax と Bid のミトコンドリアの有害性転座、およびペルオキシ亜硝酸の形成をともなう細胞内 Ca^{2+} のホメオスタシス障害に基づくものである。

ここまでで発生したスーパーオキシドアニオンは不均化して分子酸素および過酸化水素となり、次に GPx により GSH 分子から電子を得て水に還元し、ミトコンドリアのグルタチオンジスルフィド

(GSSG) 濃度の著しい上昇をもたらす 6,7。実際、Heinloth ら 8 は実験用ラットに中毒量未満 (150 mg/kg 体重) のパラセタモールを投与しても組織学的に検出可能な実質的肝損傷は誘発されないと報告したが、その後最近になって、そのような場合でも GSH 量が 30% も著減するとともに、8-OH-dG DNA およびニトロクロシン蛋白質付加体が肝臓に著しく蓄積することが明らかになっている。

したがって、脂質過酸化は細胞傷害の主原因ではないように思われるものの 9、酸化物ストレスが依然として ATP の枯渇および膨張壊死による細胞死 12,13 をともなうミトコンドリア膜透過性遷移孔の攪乱と膜電位の異常 10,11 における決定的な現象であることには変わりがない。これにより、ビリルビンの解毒、ガラクトースのグルコース（ウリジン-5-リン酸誘導体）へのエピマー化、蛋白質やプロトンビンの合成、ALP などの酵素の処理、AST,ALT の放出などの主要な肝機能がさまざまな程度で阻害されるおそれがある。

さらに、パラセタモールの過量摂取は肝障害と同時に、核 DNA の明らかな断片化および核溶解をも誘発するおそれがあることが、*in vivo* および培養肝細胞において認められている 14-16。肝臓中に存在する主要なトリペプチド型の非酵素系生体内抗酸化物質の一つである GSH は、フリーラジカルの除去、膜蛋白質とチオール維持、および GPx の基質の維持を行っている。

著者らは最近、漢方養生サプリメントである田七杜仲精 (DTS) が GSH/GSSG のレドックス状態を良好に調節するほか、GSH 還元酵素の活性を高め、ミトコンドリアの SOD 画分を増加させることを明らかにした 17,18。このことから、薬物誘発性の副作用に対する自然な保護対策を見出すための統合的アプローチの視点に立ち、本研究では高用量のパラセタモールを投与されたラットに対し DTS が有意な肝保護作用を発揮するかどうかを検討した。

【材料と方法】

実験動物

本実験では、雌雄いずれかの成熟スプレーグ-ドーリーラット (150–180 g) を使用し、日照 (12/24 時間)、温度 (26 ± 1 °C) とともに標準的な管理条件下で飼育した。食餌用ペレットと水道水は自由に与えた。実験目的のためにラットを一晩絶食状態に置いたが、水分は自由に摂取できるようにした。動物実験手順はすべて、承認済みのプロトコルに則り、実験動物の適正な飼育と利用に関する指針に従って実施した。

漢方養生サプリメントの作製. DTS

専門誌掲載：

[田七人参、杜仲、高麗人参（重量比率 50%/25%/25%）, 協通事業、日本、東京)] は、国際標準化機構 ISO 9001 および 140001 の規格に則り、品質管理手続きのもとで、非遺伝子組み換え作物から生産加工されたものである。本剤は漢方養生研究所（日本、東京）から恵与されたものであり、中程度にサイズがそろった小さな顆粒状で口当たりが良く、容易に食餌に混ぜることができる。

実験法

ラットを各群 15 匹から成る 5 群に分けた。A 群は対照群とした。B 群（急性モデル）にはパラセタモール（シグマケミカル社、米国）懸濁液（1.5 g/kg 体重）を単回投与した。B-tx 群には、パラセタモール（1.5 g/kg 体重）の投与後に DTS（150 mg/kg）を投与した。C 群（中毒量未満モデル）にはパラセタモール（150 mg/kg/体重）を単回経口投与し、C-tx 群には同用量のパラセタモールお

よび DTS（150 mg/kg）を投与した。ラットは「急性中毒量」および「中毒量未満」の投与 24 時間後に屠殺した。

【生化学的評価】

実験期間終了後、ラットは 12 時間絶食させ、血液サンプルを後眼窩静脈叢穿刺により処置群および対照群から採取した。血清中 AST 活性および ALT 活性は分光光度法により測定し、ALP 活性については市販のキットを用いて比色定量を行った。血液サンプル採取後、ラットは頸椎脱臼により屠殺し、直ちに肝臓を摘出し、氷冷生理食塩水、ついで 0.15 mol/L トリス塩酸緩衝液で洗浄後、水分を拭き取り計量した。GPx 活性は分光光度法により 340 nm で測定し、1 分間あたり 1 mol GSH を変換する酵素量を 1 活性単位とした。GSH 還元酵素活性については、分光光度法により 340 nm で測定し、既報の方法に従い 19、1 分間あたり 1 mol の GSSG を還元する酵素量を 1 活性単位とした。SOD 活性は 560 nm でニトロテトラゾリウムブルーの還元抑制率として測定し、標準条件下でニトロテトラゾリウムブルーの還元を 50% 阻害する蛋白質量を 1 活性単位とした 20。CAT 活性は、H₂O₂ のモル吸光係数を 43.6 M⁻¹ cm⁻¹ として H₂O₂ 利用速度を測定し、240 nm 算出した。1 分間あたり 1 mol の H₂O₂ を利用する酵素量を 1 活性単位とした 21。マロニルジアルデヒド（MDA）の測定。肝臓中の MDA は分光光度法により測定し、チオバルビツール酸濃度は MDA-TBA 複合体の吸収係数を 1.56 x 10⁵ cm⁻¹ M⁻¹ として計算し、nmol/mL 単位で表した 22。酵素から放出されるリンの量は、総 ATPase 活性の定量的測定により計算した 23。組織蛋白チオールは、Sedlack と Lindsay²⁴ の方法により、エルマン試薬（5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸；DTNB）を用いて測定した。本試薬はチオール基により還元されてチオール 1 mol あたり 1 mol の 2-ニトロ 5-メルカプト安息香酸が形成され、その最大吸光は 412 nm である。

DNA 断片化の評価

DNA 断片化はジフェニルアミン（DPA）分光光度法により測定した 25。断片化されていないインタクトな DNA を断片化した DNA から遠沈により分離し、DPA を用いて沈殿させ定量した。

専門誌掲載：

分離時の酸化副生物の生成を最小限に抑えるため、2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシド（最終濃度 20 mM）をすべての溶液に添加し、全操作は氷上で行った。簡単にいえば、肝細胞[リン酸緩衝生理食塩水（PBS） 1 mL 中に 1×10^6 個]を 1.5 mL 遠心分離管（B 管）に入れて遠心分離（200 g、4 °C、10 分）し、細胞ペレットを得た。上清を新しい遠心分離管（S 管）に移し、得られたペレット（B 管）を TTE（Tris Triton EDTA）緩衝液（pH 7.4）（TE 緩衝液に 0.2% Triton X-100 を添加したもの）1 mL 中に懸濁し、20,000 g（4 °C、10 分）で遠心分離した。得られた上清を新しい管（T 管）に移し、ペレットは TTE 緩衝液に再び懸濁した。TCA（25%トリクロロ酢酸 1 mL）を T 管、B 管、S 管に添加し、ボルテックスで攪拌した。これらの管は 4 °C で一晩静置後、20,000 g（4 °C、10 分）で遠心分離した。上清を廃棄し、ペレットに 5% TCA 160 μ l を添加して加水分解後、90 °C、15 分間加熱した。ついで、新たに調製した DPA 320 L を添加、37 °C、4 時間インキュベートし発色させた。溶液の発色濃度は ELISA リーダーにより 600 nm で測定した。DNA 断片化率は次の計算式により計算した：DNA 断片化率（%）= $S + T / S + T + B \times 100$ 。また、既報の方法 22 に従い、アガロースゲル電気泳動法によっても DNA 断片化を測定した。

【統計解析】

データは、適合する場合には平均値間比較のため Duncan によるポストホックテストを用いる ANOVA(分散分析)により、 $p \leq 0.05$ として解析した。データが正規分布状態でない場合には、Kruskal-Wallis 検定（ノンパラメトリックなバリエーション分析）、ついで、Dunn の多重比較検定を行った。統計的に $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

血清生化学と肝組織生化学

パラセタモールによる肝毒性作用の程度は、循環血中放出された ALP、AST、ALT などの細胞質酵素のレベルにより評価した。正常群、パラセタモール傷害群、DTS 投与群の血清トランスアミナーゼおよび総蛋白の濃度を表 I に示す。対照群と比較して、パラセタモール投与群の AST、ALT、ALP の濃度は有意に上昇したのに対し、蛋白量は有意に減少した。これらの特徴は、中毒量群対中毒量未満群（ $p < 0.01$ ）においてより顕著であった。DTS 投与により AST、ALT、ALP 濃度が低下し、B-tx 群は蛋白量が増加（ $p < 0.01$ ）したのに対し、C-tx 群ではこれらのパラメータが正常値（ $p < 0.05$ ）となった。表 II は、パラセタモール中毒量投与群および中毒量未満投与群において DTS の投与が肝臓の MDA、GSH、SOD、CAT、GPx に及ぼした影響を示す。中毒量、中毒量未満いずれのパラセタモール投与量の場合も、GSH、SOD、CAT、GPx の有意な減少をもたらすとともに、MDA を増加させた（ $p < 0.01$ ；B 群 vs C 群： $p < 0.05$ ）。DTS を投与した 2 群では、いずれも非酵素系および酵素系抗酸化物質の濃度が DTS 非投与群より高いこ

専門誌掲載：

とが認められ、MDA の生成量は有意に減少 ($p < 0.05$) していた。特に、C-tx 群では、DTS 投与により上記のレドックス状態を示すパラメータがすべて完全に回復した ($p < 0.001$)。

肝組織 ATPase および蛋白チオール

対照群および処置群における肝組織中の総 ATPase および組織蛋白チオールの各濃度を図 1 に示す。パラセタモールを投与した B 群および C 群には、対照群と比較して総 ATPase 濃度の有意な低下 ($p < 0.01$) が認められた。B-tx 群および C-tx 群では、パラセタモールのみを投与した各群と比較して、総 ATPase 活性の低下および組織蛋白チオールの減少が有意に防止された。パラセタモール投与群は、いずれの用量群でも、対照群と比較して組織中カルシウム濃度の上昇が認められた (g/mg 蛋白：B 群： 18.2 ± 0.9 ；C 群： 16.2 ± 0.6 vs A 群： 10.2 ± 0.4 , $p < 0.01$ 、データは示していない)。DTS 投与群では、この異常が防止された ($p < 0.05$)。

DNA 断片化の評価

中毒量あるいは中毒量未満用量のパラセタモールを投与した B 群および C 群の DNA 断片化の重症度は著明に上昇しており、その上昇は同程度であった (対照群と比較して $p < 0.05$ 、図 2)。DTS で前処置した B-tx 群および C-tx 群では、パラセタモールのみを投与した群と比較して、DNA の急性断片化の顕著な低下 ($p < 0.01$) が認められ、ゲル電気泳動解析によっても同様の結果が認められた。

考察 パラセタモールは鎮痛剤や解熱剤として広く用いられている。しかし、不慮または故意による高用量の摂取により、高い発症率と死亡率を示す急性肝細胞壊死が引き起こされることが少なくない 26,27。パラセタモールの毒性はチトクローム P450 を介していることが一般に認められてお

り、チトクローム P450 により、かなりの毒性をもつ代謝物である N-アセチル-p-ベンゾキノニン (NAPQI) が生成し、この代謝物の解毒により、本研究の中毒量未満投与群でも認められたような肝臓中 GSH が激減すると考えられる。また、NAPQI が蛋白質のシステイン残基と共有結合することにより、3-(システイン-S-yl)パラセタモール付加体が生成する。このため、GSH の前駆体としての N-アセチル-システインがパラセタモールによる急性肝障害の標準治療として最も広く受入れられている 28。マウス培養肝細胞を用いた研究では、2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン・ジアセテートの蛍光増加により測定された酸化ストレスが GSSG/GSH 比の早期の上昇により 6、細胞傷害の数時間も前に起きていることが示された 7。経時的モニタリングは本研究の範囲外であったが、興味深いことに、パラセタモールの投与量にかかわらず、肝組織のレドックスバランスの悪化が顕著な特徴であった。DTS の投与により GSH の減少は著しく抑制されたが、詳細なメカニズムについては今後の研究が待たれる。

上記のようにレドックスバランスが悪化している間は、ミトコンドリアがアセトアミノフェン毒性の最初の標的であり 29、過酸化化合物ペルオキシ亜硝酸などのオキシダント、 Ca^{2+} 、 Pi がミトコンドリア透過性遷移 (MPT) が誘起される。これにより、ミトコンドリア内膜透過性の急激な亢進、酸化的リン酸化の脱共役、およびミトコンドリア内イオンと中間代謝産物の放出が引き

専門誌掲載：

起こされ、ミトコンドリアが損傷される 30。この現象はアポトーシスの中心的イベントであり、MPT は細胞自身がストレスを増加させるという細胞生物学上致死的なイベントである。

本研究では、パラセタモールにより損傷されたラット肝臓の酵素的・非酵素的抗酸化酵素の活性が、DTS の投与により有意に上昇、これにより組織中の MDA 濃度が有意に低下し、肝細胞傷害のマーカーが減少することが認められた。さらに、パラセタモールの代謝またはその結果として生じるミトコンドリア損傷により活性酸素種が発生し、直接または間接的な酸化的 DNA 損傷を誘発することがあり、また、変異原性を有する可能性のある DNA の損傷は中毒量未満のパラセタモールによっても著しく蓄積することが認められている 31。

本報では、フリーラジカルにより損傷された DNA 産物の測定という問題には言及しなかったが、DNA 断片化は、Ray ら 32 の見解と同様に中毒量のみならず、中毒量未満のパラセタモールでも非常に顕著な特徴であることが明らかになり、他方、DTS はこのような現象を著しく軽減することが明らかになった。Knight ら 6 は、パラセタモールの過量摂取後にはミトコンドリアの酸化ストレスやベルオキシ亜硝酸の生成が起きるものの、脂質過酸化は主要な病態生理学的イベントではないことを示す説得力ある証拠を提示している。そうであるならば、脂溶性抗酸化物質がパラセタモールによる肝障害の軽減に無効である理由の説明がつく 33。これに対し、水溶性ラジカスカベンジャーおよび/またはレドックスのエピジェネティックな調節因子（DTS もそのようなものと考えられる）の方が、パラセタモール誘発性肝障害の進行を防止する治療薬として有望である可能性がある。実際に、本研究では DTS のサプリメント投与により、現実には生理的フリーラジカスカベンジャーである膜結合性 ATPase 活性と蛋白チオール的大幅な減少が顕著に防止された。また、本研究では、投与量にかかわらず、パラセタモール単独投与群に総 ATPase の著減を伴う細胞エネルギー代謝の大きな変化が認められたが、これは蛋白 SH 基の減少によるものである可能性がある。この減少は、パラセタモールの反応性代謝物による膜蛋白のアルキル化によるものである。特に、細胞膜内のカルシウム ATPase 活性は、細胞質カルシウム濃度を低く維持するために重要な調節因子であるが、その活性は、遊離スルフィドリル基の減少（アルキル化によるか、酸化によるかを問わない）により阻害される。これは、カルシウムの非生理的増加のミトコンドリアによる緩

衝が薬物により制限されると、カルシウムにより活性化される数多くの異化酵素が不適切に刺激されうるからである。このため、細胞内カルシウムの恒常性は細胞の生存能力にとって非常に重要であるが、このようにある種の毒物誘発性肝細胞傷害は Ca^{2+} の細胞内流入を引き起こし、一連の中毒イベントを生じさせて細胞死をもたらす。低濃度の NAPQI は、主にその酸化特性によってカルシウム放出を誘発し、ピリジヌクレオチドの加水分解をもたらすとともに、蛋白質モノ ADP リボシル化を促進するのに対し、高濃度では、蛋白質のアリール化も一つの要因である可能性があることが示唆されている。

本研究では肝組織中のすべての無機陽イオンを検討したわけではないが、中毒量未満のパラセタモール投与群にも肝組織中カルシウム濃度の上昇（60%以上）が認められ、この異常は DTS を投与すると防止された。このように全般的な保護効果が認められる理由は、抗アポトーシス性また

専門誌掲載：

は（水溶性の）抗酸化性を有する何らかの成分が含まれており 34-37、そのような成分によって、パラセタモールが投与されてもオリゴヌクレオソームサイズの DNA が過剰に集積することが妨げられるためである可能性がある。反応性代謝物の代謝活性化に対する直接の消滅作用のほか、抗酸化酵素の合成と DNA 修復に関与する遺伝子を調節するエピゲノミックな保護効果も生じている可能性が高く、この点については現在研究が進行中である。

また、本研究では検討できなかったため今後検討する必要がある点は、田七杜仲精（DTS）がパラセタモールから毒性代謝物 NAPQI への代謝を直接阻害するのかどうかを解明することであり、その際は、種差にも注意する必要がある。しかしながら、以上を総合すると、中毒量未満のパラセタモールであっても肝細胞に著しい損傷をもたらすおそれがあること、また、DTS のサブリメント投与は、長期に及ぶ薬物療法が必要とされる場合や、最も重要な場合としては、すでに多剤投与を受けている患者の場合に、臨床応用できる有望な統合的アプローチである可能性があることが、本研究のデータにより示された。

表 I. 中毒量（B 群：1.5 g/kg）と中毒量未満（C：150 mg/kg）のパラセタモール投与および DTS 併用投与（TX 群）後の血漿中肝酵素濃度 A 群：対照。B 群：《急性毒性》モデル。B-tx 群：《急性毒性》モデル+DTS 150 mg/kg。C 群：《中毒量未満》モデル。C-tx 群：《中毒量未満》モデル+DTS 150 mg/kg。* $p < 0.01$ （対照値と比較）** $p < 0.05$ （ベースライン値と比較）

表 II. 中毒量（B 群：1.5 g/kg）と中毒量未満（C：150 mg/kg）のパラセタモール投与および DTS 併用投与（TX 群）後の肝臓のレドックス状態 A 群：対照。B 群：《急性毒性》モデル。B-tx 群：《急性毒性》モデル+DTS 150 mg/kg。C 群：《中毒量未満》モデル。C-tx 群：《中毒量未満》モデル+DTS 150 mg/kg。GPx：グルタチオンペルオキシダーゼ。GSH：還元型グルタチオン。CAT：カタラーゼ。SOD：スーパーオキシドジスムターゼ。MDA：マロニルジアルデヒド。* $p < 0.01$ （対照値と比較）** $p < 0.05$ （ベースライン値と比較）

図 1. 中毒量と中毒量未満のパラセタモール投与時の総 ATPase および蛋白チオール：DTS の効果 A 群：対照。B 群：《急性毒性》モデル（1.5 g/kg）。B-tx 群：《急性毒性》モデル+DTS 150 mg/kg。C 群：《中毒量未満》モデル（150 mg/kg）。C-tx 群：《中毒量未満》モデル+DTS 150 mg/kg。* $p < 0.01$ （対照値と比較）** $p < 0.05$ （ベースライン値と比較）図 2. パラセタモールおよび DTS 投与後の DNA 断片化 A 群：対照。B 群：《急性毒性》モデル（1.5 g/kg）。B-tx 群：《急性毒性》モデル+DTS 150 mg/kg。C 群：《中毒量未満》モデル（150 mg/kg）。C-tx 群：《中毒量未満》モデル

ル+DTS 150 mg/kg。左図：パラセタモール投与後の DNA 断片化の電気泳動像。右図の計算に示すように、DTS 投与群は断片化が著しく軽減された。* $p < 0.01$ （対照値と比較）** $p < 0.05$ （ベースライン値と比較）