トロンボキサン A_2 (TxA_2) のマウス実験的肝障害における意義

島沢 司・青木源典・永井博式・江田昭英^{*1)}、笠原正男^{*2)}

The role of thromboxane A_2 in experimental liver injury in mice Experimental liver injury models were produced by the injection of anti-basic liver protein (BLP) antibody into DBA/2 mice, by the injection of bacterial LPS into *Corynebacterium parvum*-pretreated ddY mice, and by the injection of CCl_4 into ddY mice. In all models, extensive liver cell damage was estimated by the elevation of glutamate transaminase (GOT and GPT) activity and confirmed by significant histopathological changes of liver. Moreover, significant elevation of TxB_2 in the liver was observed in all models.

Administration of OKY-046, a selective TxA_2 synthetase inhibitor, ONO-3708, TxA_2 receptor antagonist, and indomethacin, cyclooxygenase inhibitor, suppressed the elevation of GOT and GPT levels and histopathological changes in almost liver injury models. In addition, when U-46619, a stable TxA_2 mimetic compound, was injected into mice, clear elevation of GOT and GPT was observed. These evidences suggest that TxA_2 play an important role for the onset of liver injury disease in mice.

Tsukasa Shimazawa・Motonori Aoki・Hiroichi Nagai・Akihide Koda^{*1)}, Masao Kasahara^{*2)}

^{*1)} Department of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University

^{*2)} Department of Pathology, Fujita Gakuen, Hoken Eisei University

key words: thromboxane A_2 , experimental liver injury, OKY-046, ONO-3708, U-46619

トロンボキサン A_2 (TxA_2) は、強力な血小板凝集作用および血管平滑筋、気道平滑筋収縮作用¹⁾ も有するアラキドン酸の cyclooxygenase 系産物の一つである。しかし、 TxA_2 は生物学的半減期が短く、種々の疾患における病理学的役割は心疾患以外あまり知られていない。すなわち、心血管系において TxA_2 とプロスタグランジン I_2 (PGI_2) の産生のバランス保持が重要なことが報告され、狭心症などにおいては TxA_2 の産生過剰が発症の原因である²⁾ とされている。

しかし、これまでに消化器系の疾患、特に肝障害における TxA_2 の意義についての報告は少なく、Zipser ら³⁾、Parelton ら⁴⁾ が肝腎症候群における TxA_2 の意義を報告しているにすぎない。本研究では、 TxA_2 合成酵素阻害薬の OKY-046, TxA_2 拮抗薬の ONO-3708, および cyclooxygenase 阻害薬の indomethacin, さらに TxA_2 の安定な類似化合物の U-46619 を用いて、 TxA_2 のマウス実験的肝障害における意義について検討を行ったので報告する。

方 法

(1) 実験的肝障害の惹起方法

本研究では、これまでに報告した^{5,6)} 以下の3種の肝障害モデルを用いた。すなわち、抗 basic liver protein

(BLP) 抗体による肝障害 *Corynebacterium parvum* (C. parvum) と bacterial lipopolysaccharide (LPS) による肝障害および CCl_4 による肝障害である。肝障害の程度は、血中トランスアミナーゼの変動および肝の組織学的所見を指標として評価した。

(2) 肝中の TxA_2 の定量法

TxA_2 は生体内半減期が約30秒と短いので、その最終代謝産物である TxB_2 量をラジオイムノアッセイ法により測定した。

方法の概略は以下のとおりである。

すなわち、マウスをエーテル麻酔下で致死させ、ヘパリン (5 unit/ml) および indomethacin (10^{-7} M) を含む生理食塩水にて肝臓を灌流し、摘出してその1gを同上の生理食塩水 5 ml 中でホモジネートして、その上清を凍結保存する。上清から William⁷⁾ の方法に従って TxB_2 を抽出し、Amersham の thromboxane B_2 [3H] assay system を用いて測定した。

成 績

(1) 薬物の影響

OKY-046, ONO-3708, および indomethacin の各肝障害に及ぼす影響について検討した。その成績を表1〜4に示す。なお、薬物は抗 BLP 抗体および CCl_4 による肝障害の場合には、障害惹起1時間前および2時間後に投与した。また、LPS により肝障害の場合には反応惹起1時間前後にそれぞれ投与した。

*1) 岐阜薬科大学薬理学教室

*2) 藤田学園保健衛生大学病理学教室

表 1 effect of OKY-046 on liver injury in mice

dose (mg/kg)	transaminase activity (Karmen unit)			
	n	GOT	n	GPT
liver injury induced by anti-BLP antibody				
normal	10	62.5	10	23.5
control	12	205.8	12	159.2
OKY-046 50	11	114.5	11	57.8
liver injury induced by C. parvum and LPS				
normal	10	42.7	10	19.8
control	10	327.9	9	141.7
OKY-046 50	8	138.3	9	66.2
liver injury induced by CCl ₄				
normal	7	42.3	7	25.3
control	7	1749.5	7	1835.8
OKY-046 50	7	867.4	7	935.1

OKY-046 was administered i.v before and after the eliciting liver injury respectively. Each value represents mean of transaminase activity.

表 2 effect of ONO-3708 on liver injury in mice

dose (mg/kg)	transaminase activity (Karmen unit)			
	n	GOT	n	GPT
liver injury induced by anti-BLP antibody				
normal	6	36.7	6	16.6
control	7	276.9	7	353.7
ONO-3708 1.0	6	102.1	7	265.3
2.0	7	109.1	7	157.4
liver injury induced by C. parvum and LPS				
normal	7	39.4	7	25.5
control	8	335.9	8	222.1
ONO-3708 1.0	8	154.9	7	102.2
2.0	8	166.2	7	117.6
liver injury induced by CCl ₄				
normal	5	47.7	5	18.1
control	6	1119.8	5	1088.3
ONO-3708 1.0	6	458.4	5	310.9
2.0	6	174.2	6	308.7

ONO-3708 was administered i.p before and after the eliciting liver injury respectively. Each value represents mean of transaminase activity.

すなわち, TxA₂ 合成酵素阻害薬の OKY-046 は 10 および 50 mg/kg を静脈内投与によりいずれの肝障害における血中トランスアミナーゼの上昇も抑制した。ま

表 3 effect of indomethacin (Indo) liver injury in mice

dose (mg/kg)	transaminase activity (Karmen unit)			
	n	GOT	n	GPT
liver injury induced by anti-BLP antibody				
normal	6	27.2	6	9.2
control	7	384.1	7	215.5
Indo 5	7	231.1	7	157.4
liver injury induced by C. parvum and LPS				
normal	7	72.8	7	47.1
control	10	430.2	9	317.9
Indo 5	10	482.7	10	363.4
liver injury induced by CCl ₄				
normal	5	47.7	5	18.1
control	6	1119.8	5	1088.3
Indo 5	6	188.4	6	634.2

Indomethacin was administered i.v before and after the eliciting liver injury respectively. Each value represents mean of transaminase activity.

表 4 effect of prostaglandin I₂ (PGI₂) on liver injury induced by LPS in ddY mice pre-treated with C. parvum

dose (μg/kg)	GOT activity		GPT activity	
	n	(Karmen unit)	n	(Karmen unit)
normal	6	66.9	6	42.8
control	7	254.4	6	247.2
PGI ₂ 10	8	179.9	8	168.8
100	6	119.8	6	178.9

PGI₂ was administered i.v 1 hour before and after the injection of LPS. Each value represents mean of transaminase activity.

た, 組織学的所見においても抑制の傾向を示した。

また, TxA₂ 拮抗薬の ONO-3708 も腹腔内投与によりいずれの肝障害モデルに対しても, 血中トランスアミナーゼの上昇および組織学的変化を抑制した。

しかし, cyclooxygenase 阻害薬である indomethacin の静脈内投与では, 抗 BLP 抗体および CCl₄ による肝障害における血中トランスアミナーゼの上昇を抑制したが, C. parvum と LPS による肝障害にはほとんど影響を及ぼさなかった。また, 組織学的所見においても同様の傾向が認められた。

以上のように, indomethacin は C. parvum と LPS による肝障害を抑制せず, OKY-046 では抑制されたので, OKY-046 の抑制作用機序には TxA₂ の産生抑制

表 5 effect of U-46619 on serum transaminase activities in ddY mice

time after the injection of U-46619(hrs)	transaminase activity (Karmen unit)			
	n	control	n	U-46619
GOT activity				
0	5	50.1	5	50.1
1	5	51.4	5	182.4
3	5	52.6	5	301.1
6	5	50.6	5	312.1
12	5	52.8	5	149.5
24	5	66.0	5	57.2
GPT activity				
0	5	34.5	5	34.5
1	5	34.3	5	88.9
3	5	34.6	5	111.2
6	5	34.5	5	130.1
12	5	34.0	4	83.5
24	5	32.2	5	40.9

U-46619 was injected i.v at a dose of 50 μ g/kg. Each value represents mean of transaminase activity.

表 6 concentration of thromboxane B₂ in the supernatant of the liver homogenate

liver injury	thromboxane B ₂ (ng)/ liver(g)			
	n	normal mice	n	liver injury mice
① RGG+a-BLP	6	0.779	9	2.242
② C.P+LPS	6	1.025	6	10.008
③ CCl ₄	6	1.613	6	3.231

Liver were taken from normal and liver injury mice ① 6 hours, ② 1 hour, ③ 6 hours after eliciting liver injury respectively.

によるものではなく、TxA₂ 合成酵素阻害による PGI₂ 産生増加⁶⁾ の関与が示唆される。そこで、PGI₂ の影響について検討した。表 4 に示すように、PGI₂ の 1, 10 および 100 μ g/kg の静脈内投与により血中トランスアミナーゼの上昇は有意に抑制された(表 4)。このことから C. parvum と LPS による肝障害の発症あるいは進展には TxA₂ と PGI₂ のアンバランスが関与しているものと思われる。

(2) メディエーター投与による影響

TxA₂ は生物学的半減期が約 30 秒と短く、静脈内投与による影響を検討することは困難であるため、TxA₂ の安定な類似化合物である U-46619 を用いて影響を検討した。表 5 は U-46619 の 50 μ g/kg を ddY 系マウスに静脈内投与した場合の血中トランスアミナーゼの経時的変動を示す(表 5)。すなわち、U-46619 投与 3～6 時間後において血中トランスアミナーゼの上昇はほぼピークに達し、12 時間後まで有意に高値を示した。しか

し、24 時間後にはほぼ正常に回復した。また、組織学的所見においてもわずかではあるが、肝細胞壊死および血栓形成が認められた。

(3) 肝臓中の TxA₂ 量

TxA₂ は生物学的半減期が短いため、その最終代謝産物である TxB₂ を測定した。表 6 に 3 種の肝障害マウスの肝ホモジネート上清中の TxB₂ 量を示す(表 6)。いずれの肝障害マウスでも、正常マウスに比して TxB₂ が増加した。

考 察

以上の成績より、OKY-046 および ONO-3708 は本実験で用いたいずれの肝障害モデルに対しても抑制作用を示した。indomethacin は、抗 BLP 抗体による肝障害および CCl₄ による肝障害を有意に抑制したが、C. parvum と LPS による肝障害には影響を及ぼさなかった。この理由についてはいまだ不明であるが、C. parvum と LPS による肝障害には OKY-046 が有効性を示し、indomethacin が無効であるので OKY-046 の抑制作用には、TxA₂ 合成酵素の阻害による PGI₂ 量の増加が関与することが示唆された。

そこで、PGI₂ の LPS による肝障害に及ぼす影響を検討したところ、PGI₂ は明らかな抑制作用を示した。したがって、OKY-046 の肝障害治療効果には、PGI₂ 産生の促進という escape mechanism が含まれるものと思われる。

さらに、肝ホモジネート上清中の TxB₂ 量を測定した結果、いずれの肝障害マウスにおいても正常マウスに比して TxB₂ 量は有意に上昇した。このことから、肝障害マウスの肝中では TxA₂ 量が増加しているものと思われる。さらに、これらに加えて、TxA₂ の安定な類似化合物である U-46619 の静脈内注射により、肝障害類似の症状が惹起された。

以上のことより、① TxA₂ 産生阻害薬(OKY-046)がマウスの肝障害症状を軽減する、② TxA₂ 拮抗薬(ONO-3708)も同様にマウスにおける肝障害を軽減する、③ TxA₂ 類似化合物(U-46619)は、マウスに肝障害類似の病態を惹起する、④ 肝障害マウスの肝中の TxA₂ 量は障害により増加している、という①～④の結論が得られる。

このように TxA₂ はある病態におけるメディエーターがその意義を示すために必要な 4 条件、すなわち、① そのメディエーターの産生阻害薬によりその病態が軽減される、② そのメディエーターの拮抗薬により、その病態が軽減される、③ そのメディエーターと類似の化合物により病態が再現される、④ そのメディエーターが病変部位に存在する、という条件のいずれも満たしている。

したがって、 TxA_2 は本研究で用いたマウスの実験モデルにおいては、発症あるいは進展に重要な役割を果たしていることは明らかである。

周知のとおり、 TxA_2 は強い血管収縮作用および血小板凝集作用を有している物質であり、多くの病態において血管作動性物質として重要な役割を果たしていることが報告されている。すなわち、肺静脈血栓症⁹⁾、呼吸困難症⁹⁾、敗血症¹⁰⁾あるいは進行性腎炎¹¹⁾など、脈管および呼吸器系疾患において研究がなされてきた。しかし、今回のように肝障害における TxA_2 についての報告には接しない。

ただし、U-46619 の実験でみられたように、U-46619 は明らかに肝炎類似の症状を惹起するが、その程度は非常に弱く、 TxA_2 のみが肝障害の発症、進展に関与しているとはいいいがたい。また、 TxA_2 の産生細胞については、肝実質細胞¹²⁾およびクッパー細胞¹³⁾などが報告されているが、筆者らは、その報告を裏づけるような実験は行っていない。また、 TxA_2 が肝細胞に直接作用して障害しているのか、あるいは血小板凝集作用あるいは血管収縮作用による間接的な障害なのかは、本実験では明らかにされていない。今後、培養肝細胞を用いてこれらの点について検討していく予定である。

また、本研究で用いた薬物、すなわち OKY-046¹⁴⁾ および ONO-3708¹⁵⁾ の作用についてはいくつかの報告がある。筆者らの教室では、モルモットの実験的喘息に対して抑制作用を示しており¹⁶⁾、さらに、マウスの抗腎抗体による腎炎や MRL/l マウスにおける自己免疫性腎炎に対しての抑制作用も明らかにした¹⁷⁾。また、本研究で示されたように、肝障害においても強い抑制作用を示すので、この方面への有用性も明らかとなった。

以上を総括してみると、 TxA_2 産生阻害薬および拮抗薬はマウスの実験的肝障害に対して抑制作用を示し、 TxA_2 の安定な類似化合物である U-46619 は肝障害類

似の症状を惹起し、さらに、肝障害時に肝中の TxB_2 量は増加することから、マウスの肝障害において TxA_2 は重要な役割を果たしていることは明らかであり、さらに、OKY-046 および ONO-3708 の肝障害治療薬としての応用が期待される。

文 献

- 1) Hamberg, M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 345-349, 1974.
- 2) Szczeklik, A. et al.: Acta Biol. Med. Ger. 37: 741-742, 1978.
- 3) Zipser, R.D. et al.: Gastroenterology 84: 697-703, 1983.
- 4) Parelton, G. et al.: Gastroenterol. Clin. Biol. 9: 290-297, 1985.
- 5) Nagai, H. et al.: Japan J. Pharmacol. 46: 247-254, 1988.
- 6) 氏家新生・他：応用薬理 29: 659-685, 1985.
- 7) William, S.: Methods in Enzymology 86: 467-477, 1982.
- 8) Utsunomiya et al.: J. Clin. Invest. 70: 361-368, 1982.
- 9) Heffer, J.E. et al.: J. Clin. Invest. 71: 351-357, 1983.
- 10) Cook, J.A. et al.: J. Clin. Invest. 65: 225-230, 1980.
- 11) Purkerson, M.L. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 193-197, 1985.
- 12) Spdarics, Z. et al.: Prost. Leuk. Med. 16: 379-388, 1984.
- 13) 戸田剛太郎・他：医学のあゆみ 143: 432-435, 1987.
- 14) Nakagawa, T. et al.: Int. Archs Allergy Appl. Immun. 82: 539-540, 1987.
- 15) 近藤規元：医学のあゆみ 143: 355-359, 1987.
- 16) Nagai, H. et al.: Prost. Leuk. Med. 30: 111-121, 1987.
- 17) (未発表)