<原 著>

α -naphthylisothiocyanate による実験的肝内胆汁 うっ滞の発生機序に関する研究

高橋 裕*

要 旨： α -naphthylisothiocyanate (ANIT) の肝内胆汁うっ滞発現機序を Sprague-Dawley ラット (SDR), ならびにその突然変異種である Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR) を用い in vivo で検討した。SDR に ANIT を経口投与すると肝内胆汁うっ滞を生じるが、投与後早期に肝総グルタチオン (GSH) 濃度は一過性に減少した。フェノバルビタール前処置にて肝総 GSH 濃度を増加させた SDR では、ANIT による胆汁うっ滞がより強くみられた。GSH 抱合体の胆汁排泄障害が知られている EHBR に ANIT を投与しても、胆汁うっ滞は生じなかった。GSH 抱合体として胆汁中に排泄される bromosulphophthalein (BSP) と ANIT とを同時に持続静注すると、BSP の胆汁排泄低下がみられた。これらの現象から、ANIT は GSH 抱合体として胆汁中に排泄され、胆汁うっ滞を引き起こすことが示唆された。

索引用語： α -naphthylisothiocyanate (ANIT) グルタチオン 胆汁うっ滞
Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR)

緒 言

α -naphthylisothiocyanate (ANIT) は、ラットに容量依存性に中毒性の肝内胆汁うっ滞を引き起こすことから肝内胆汁うっ滞モデルの作製に広く使用されている。投与約12時間後から胆汁流量は減少し、組織学的に胆管上皮の壊死、細胆管増生、門脈域周囲に軽度の肝細胞障害を認めることなどを特徴としている¹⁾。しかし、その毒性の発現機序に関してはいまだ不明な点が多い。

福本ら²⁾は ANIT 投与後、肝細胞小胞体チトクローム P450 が低下すること、フェノバルビタール前処置にて、肝細胞小胞体チトクローム P450 を誘導すると ANIT の肝障害が悪化することを報告し、ANIT の毒性発現過程で、肝細胞小胞体におけるチトクローム P450 の関与を唱えている。しかし、チトクローム P450 系で生物学的に活性化され、肝障害を引き起こす薬剤による肝組織病変の多くは、中心静脈周囲の肝細胞壊死を特徴とし³⁾ ANIT による肝障害の肝組織像とは異なる。

最近 Carpenter ら⁴⁾は、分離肝細胞に ANIT を加えると、肝細胞から総グルタチオン (GSH) の放出が起

こり、肝細胞内の総 GSH は減少することを報告した。さらに、in vitro で GSH-ANIT 抱合体と思われる合成体の形成が可能であること、その抱合体の結合は非常に可逆的である事を見いだしたと報告した。この ANIT が肝細胞で GSH 抱合をうけ胆汁中に排泄されるという説は、今まで不明であった ANIT 起因性の肝内胆汁うっ滞の機序をかなり説明できると思われる。そこで今回、実際に in vivo でもそのような現象が起きているかどうかを Sprague-Dawley rat (SDR) で検討した。また、GSH 抱合体の胆汁排泄が障害されている SDR の変異種である Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR) を用い同様に検討し、SDR の成績と比較した。

実験材料および実験方法

実験動物：SDR および EHBR とも、雄性、体重250 g 前後を用いた。実験前は12時間の断食を行い、実験の間は室温25°Cとしラットの体温を一定に保った。各々の実験でラットは3から5匹を用いた。

尚、EHBR はエーザイ株式会社川島工園より供与して頂いた。

実験方法

実験1：ANIT による肝内胆汁うっ滞の検討

(1) ANIT の投与

ANIT は、エーテル浅麻酔下のラットに経口的に

Yutaka TAKAHASHI*

*東邦大学第2内科

<受付日1996年6月4日>

PE50チューブを胃内に挿入し、100mg (540 μ mol)/kg 体重をサラダ油1mlに溶解し一回投与した。ANIT 投与の実験は以下の三群で行った。

1) フェノバルビタール前処置 SDR 群: ANIT 投与に先立ち、100mg/kg 体重の10%フェノバルビタールを SDR に3日間連日腹腔内に投与した。

2) 非前処置 SDR 群: フェノバルビタール非投与の SDR

3) EHBR 群: フェノバルビタール非投与の EHBR

(2) 肝 GSH の測定

肝総 GSH の測定は、非前処置 SDR 群およびフェノバルビタール前処置 SDR 群に行った。各々 ANIT 投与前、投与6, 12, 24, 72時間後に肝を摘出し、門脈から0.25M 塩化ナトリウムおよび0.25M sucrose を含む、pH 7.4の磷酸緩衝食水 (PBS) で肝臓を洗浄した。上記洗浄液と同じバッファーを用い25%ホモジネートを作製、6万 G, 60分間の超遠心後、上清をグリオキサラーゼ法⁵⁾にて測定した。

(3) 胆汁流量の測定

胆汁流量の測定は、3群に行った。各々 ANIT 投与前、投与6, 12, 24, 72時間後に、総胆管に PE10チューブをカニュレーションし、胆汁を20分間全て採取し測定した。

(4) 血液生化学検査

3群に対し、ANIT 投与前、投与6, 12, 24, 72時間後に開腹後、腹部大動脈から採血し、肝胆道系酵素: alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP), glutamate pyruvate transaminase (GPT), 総胆汁酸、血清ビリルビン値を測定した。ALP は GSCC 準拠法、 γ -GTP および GPT は IFCC 準拠法、総胆汁酸は、3 α -HSD, Δ 4DH による酵素法、血清ビリルビン値は、アルカリアゾビリルビン法にて測定した。

(5) 肝組織像

肝組織像の光学顕微鏡観察は、非前処置 SDR 群および EHBR 群で行った。ANIT 投与72時間後に肝を摘出しホルマリン固定後の組織切片から hematoxylin & eosin (H & E) 染色標本作製した。

実験2: BSP の胆汁排泄へ及ぼす ANIT の影響

SDR を、ペントバルビタール麻酔下に開腹し、総胆管に PE10チューブをカニュレーションした。その後、大腿静脈から生理食塩水を持続注入し、胆汁流量の安定した後、BSP 0.7 μ mol/min/kg の持続静注を120

分間行った。この間、胆汁は全量採取し、10分毎に流量および BSP 濃度を測定した。BSP の胆汁排泄は、投与開始10分後から急速に増加し、40から50分以後はプラトーとなり最大排泄率 (Tm) に達した。次に、BSP 持続静注開始後60分後から70分後にかけて、ANIT 50 mg (270 μ mol)/kg 体重を加熱溶解した静注用脂肪乳剤 (イントラリピット) 1ml を10分間、BSP と同時に持続静注した。同様に、イントラリピット1ml 単独の持続静注も行い対照とした。上記のごとく10分毎に胆汁を採取し流量および BSP 濃度を測定した。

統計処理: 同時期における群間の検討には、Student t 検定を用いた。また、同群の経時的な検討には Scheffe の検定を用いた。いずれも危険率5%未満を有意とした。

成 績

(1) 肝総 GSH 濃度の変化 (Fig. 1)

ANIT 投与前肝総 GSH 濃度は、フェノバルビタール非前処置 SDR 群の $4.62 \pm 0.51 \mu\text{mol/g-liver}$ に比べ、フェノバルビタール前処置群では $6.87 \pm 0.71 \mu\text{mol/g-liver}$ と増加 ($p < 0.05$) した。これに ANIT を投与すると、非前処置群では、投与6時間後に有意 ($p < 0.05$) に減少し、12時間後に回復、その後増加し

Fig. 1 Changes in the concentration of glutathione (GSH) in the liver homogenate after oral administration of α -naphthylisothiocyanate (ANIT), 100mg (540 μ mol)/Kg B.W., in Sprague-Dawley rats (SDR) with (—●—) or without (—○—) the pretreatment of phenobarbital. Each value represents the mean $\pm$ SD. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ compared with the basal levels before the administration of ANIT. ** $p < 0.05$ compared with the levels of non-pretreated SDR.

た。フェノバルビタール前処置群でも、投与6時間後に減少し、その後増加した。

(2) 胆汁流量の変化 (Fig. 2)

ANIT 投与前胆汁流量は、フェノバルビタール前処置群で $0.49 \pm 0.09 \text{ ml/20min}$ 、フェノバルビタール非処置群で $0.55 \pm 0.04 \text{ ml/20min}$ と、両群に有意差はなかった。EHBR 群は、 $0.167 \pm 0.07 \text{ ml/20min}$ と非処置群に比し有意 ($p < 0.01$) に減少していた。ANIT 投与後の胆汁流量の変化は、非処置の SDR では、投与前平均 $0.55 \pm 0.04 \text{ ml/20分}$ 、投与24時間後 $0.04 \pm 0.003 \text{ ml/20分}$ と有意 ($p < 0.01$) な減少であった。一方、前処置群では ANIT 投与前 $0.49 \pm 0.09 \text{ ml/20分}$ から12時間後には、すでに $0.004 \pm 0.002 \text{ ml/20分}$ と、有意 ($p < 0.01$) に減少し、両群とも72時間後には回復の傾向がうかがえた。しかし、EHBR 群では、ANIT 投与後の胆汁流量の減少は認められなかった。

(3) 血液生化学検査、肝組織像の変化

a) 血液生化学検査：ANIT 投与前の血清中の肝胆道系酵素 (ALP, γ -GTP, GPT), および総胆汁酸濃度は、各群に有意差を認めなかったが、ANIT 投与後、フェノバルビタール前処置群では非処置群に比べより早期から上昇した。すなわち、GPT は12時間後、 γ -GTP は12時間後、総胆汁酸も12時間後より著明に上昇した。しかし、EHBR ではこのような所見は認められなかった (Table)。

b) 肝組織像：フェノバルビタール非前処置 SDR ならびに EHBR 群の ANIT 投与72時間後の肝組織像

Fig. 2 Changes in bile flow (ml/20min) after the oral administration of ANIT, 100mg (540 μ mol)/Kg B.W., in SDR with (—●—) or without (—○—) the pretreatment of phenobarbital, and in Eisai hyperbilirubiniuria rats (EHBR —◇—). Each value represents the mean $\pm$ SD. * $p < 0.01$ compared with the value basal levels before the administration of ANIT. * $p < 0.01$ compared with the levels in the non-pretreated SDR.

は、SDR では胆管の壊死、細胆管の増生、門脈域周囲に軽度の肝細胞障害を認めるが、EHBR においては、このような所見は認められなかった (Fig. 3)。

Table Changes in serum levels of GPT, ALP, γ -GTP, and bile acids after the administration of ANIT in SDR with or without pretreatment of phenobarbital and in EHBR. Each value represents the mean $\pm$ SD.

		0	6	12	24	72 hours
GPT (U/L)	SDR	77 $\pm$ 20	147 $\pm$ 114	91 $\pm$ 8	537 $\pm$ 185	983 $\pm$ 293*
	SDR+PB	135 $\pm$ 54	453 $\pm$ 14	873 $\pm$ 100*	1,379 $\pm$ 327*	447 $\pm$ 100
	EHBR	111 $\pm$ 57	44 $\pm$ 11	n.d.	97 $\pm$ 14	230 $\pm$ 3
ALP (U/L)	SDR	791 $\pm$ 156	650 $\pm$ 72	808 $\pm$ 60	1,150 $\pm$ 356	1,882 $\pm$ 283*
	SDR+PB	571 $\pm$ 69	453 $\pm$ 14	1,330 $\pm$ 262	1,365 $\pm$ 477	1,299 $\pm$ 358
	EHBR	539 $\pm$ 11	531 $\pm$ 75	n.d.	612 $\pm$ 69	707 $\pm$ 98
γ -GTP (U/L)	SDR	0.7 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.9	5.0 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 2.2	1.8 $\pm$ 14.3
	SDR+PB	0.3 $\pm$ 0.5	4.3 $\pm$ 3.4	6.7 $\pm$ 0.5**	5.5 $\pm$ 1.1	3.0 $\pm$ 1.6
	EHBR	0.5 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.5	n.d.	0.8 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 1.2
Bile Acids (μ M)	SDR	20 $\pm$ 10	10 $\pm$ 7	637 $\pm$ 426	790 $\pm$ 296	438 $\pm$ 99
	SDR+PB	22 $\pm$ 7	414 $\pm$ 283	765 $\pm$ 145**	803 $\pm$ 247*	573 $\pm$ 31
	EHBR	52 $\pm$ 5	23 $\pm$ 14	n.d.	62 $\pm$ 38	142 $\pm$ 59

** $p < 0.05$, * $p < 0.01$ vs 0 hour

Fig. 3 Histological findings of the liver 3 days after the oral administration of ANIT, 100mg (540 μ mol)/B.W., obtained from SDR (left) and EHBR (right). Degenerative changes of the bile ducts and cholangiolar proliferations (arrows) were observed in the liver of SDR, while those findings were not observed in the EHBR. (HE, $\times 200$).

(4) 血清総ビリルビン値の変化 (Fig. 4)

フェノバルビタール前処置群は非処置群に比べ投与

24時間後の早期から血清総ビリルビン値の有意 ($p < 0.05$) な上昇を認めた。EHBR では、投与前から 2.2 ± 0.3 mg/dl と黄疸を認めるものの、ANIT 投与6時間

Fig. 4 Changes in serum levels of bilirubin after the oral administration of ANIT, 100mg (540 μ mol)/Kg B.W., in SDR with (—●—) or without (—○—) the pretreatment of phenobarbital and in EHBR (—◇—). Each value represents the mean $\pm$ SD. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$ compared with the basal levels before the administration of ANIT. ** $p < 0.05$ compared with the levels in the non-pretreated SDR.

Fig. 5 Effect of co-infusion of ANIT, 50mg (270 μ mol)/Kg B.W. (—●—), on excretion of BSP into the bile during continuous intravenous infusion of BSP in the SDR. —○—: control (intralipid without ANIT). Each value represents the mean $\pm$ SD. ** $p < 0.05$ compared with the levels in the non-infusion of ANIT.

後には $3.9 \pm 1.1 \text{ mg/dl}$ と有意($p < 0.01$)に上昇し、投与72時間後では $13.8 \pm 0.37 \text{ mg/dl}$ と、SDRと同様の高値を示した。尚、いずれの時点でも直接型ビリルビンが総ビリルビンの約90%を示した。

(5) 胆汁中 BSP 濃度の変化 (Fig. 5)

BSPの胆汁排泄がTmに達した後、10分間ANITを同時に持続静注すると、その後胆汁中BSP濃度は徐々に低下し、20分後には有意($p < 0.05$)な排泄低下を示した。尚、イントラリピット単独投与では、BSPの排泄低下は認めなかった。

考 案

薬剤性肝障害においては、高度の肝内胆汁うっ滞をきたすが肝細胞障害は非常に軽微である例がある。このような肝内胆汁うっ滞の機序に関してはいまだ十分解明されていない。古くから肝内胆汁うっ滞モデル動物の作製に用いられているANITの毒性、すなわち肝内胆汁うっ滞の発現機序に関しても同様に不明な点が多い。本研究は、この点に関しin vivoの実験で、ANITが肝細胞内でGSH抱合を受け胆汁中に排泄される可能性を指摘した。

Hirotaら⁹⁾は閉塞性黄疸ラットを用いた実験で、胆汁うっ滞時には経時的に肝GSHは増加すると報告している。しかし本研究では、SDRにANITを経口投与すると、胆汁うっ滞がまだみられない早期、すなわち投与6時間後に肝総GSHの一過性の低下がみられた。したがって、この一過性の肝GSH濃度の低下は、胆汁うっ滞の結果として生じたとは考えられず、ANITによる肝GSHの減少、即ちANITとGSHとの直接的な関係を示唆するものと思われる。Carpenterら⁴⁾は、ラットの分離肝細胞にANIT処理し、細胞障害を伴わないGSHの細胞内から培養液中への移行を認めたと報告している。したがって、今回の肝GSH濃度の低下の原因は、GSHの合成障害ではなく、GSHが消費されるためあるいは細胞外に分泌されるためと推察される。

今回の実験で、フェノバルビタール前処置群で、胆汁流量の低下、血清ビリルビン値の上昇、血清肝・胆道系酵素の上昇などが、非前処置SDR群の場合に比し、より早期からより強く出現した。フェノバルビタール前投与にてANITによる肝内胆汁うっ滞がより強くなる事実は以前から指摘されている⁷⁾。フェノバルビタールはチトクロームP450系の酵素の誘導剤であること⁸⁾から、ANITは肝チトクロームP450で生物学的活性を受け、毒性を発揮するものと考えられている。

アセトアミノフェンに代表される、チトクロームP450系で生物学的に活性化され肝障害を引き起こす薬剤による肝組織病変の多くは、中心静脈周囲の肝細胞壊死を特徴としている³⁾。一方、ANITによる肝障害の肝組織像は、今回の実験でもみられたごとく、胆管の壊死、細胆管の増生が主体であり、肝細胞障害は門脈域周囲に軽度認められるのみである。このことから、フェノバルビタールによるANIT肝内胆汁うっ滞の増強は、チトクロームP450系酵素の誘導のみでは説明できないと思われる。

一方、フェノバルビタールは、P450系酵素のみならずグルタチオン-S-トランスフェラーゼやGSHを誘導することも知られている⁸⁾。実際、今回の実験においても、フェノバルビタール前処置SDRの肝GSH濃度は、非前処置SDRの値に比し約1.5倍増加していた。ANITが肝細胞内でGSH抱合を受け胆汁中に排泄されるという仮定から考えれば、フェノバルビタールによる肝GSHの増加が、ANITあるいはANITのP450代謝産物による肝細胞障害を防御し、一方で胆管細胞障害すなわち胆汁うっ滞を増悪させている可能性が考えられる。実際、グルタチオン合成酵素である γ -glutamylcysteine synthetaseを阻害するbuthionine sulfoximineを前投与し肝GSHを低下させると、ANITによる胆汁うっ滞が軽度になるという事実も報告されている⁹⁾。

BSPは肝細胞でGSH抱合を受け、大部分がBSP-SGとして胆汁中へ排泄される。今回、このBSPとANITとの同時静注を試みた。その結果、ANIT静注と一致してBSPの胆汁排泄の低下が観察された。このことは、BSP-SGの胆汁排泄がANITにより障害を受けることを示していると考えられる。尚、ANITは脂溶性であるためイントラリピットを溶解液剤とした。このようなANITの投与法は調べ得た限りでは報告されていないので、本剤の胆汁中へのBSP排泄への影響も考慮しなければならない。そのため、同じ条件下でイントラリピットをみの同時静注を試みた。その結果、BSPの胆汁中への排泄は低下せず、本剤の影響は否定してよいと思われる。

ANITと類似した構造式を持つbenzyl, allyl isothiocyanateは、GSH抱合を受けることがin vitroで明らかにされている¹⁰⁾。今回の実験から得られたin vivoにおける、(1) ANITによる肝GSH濃度の一過性の低下、(2) フェノバルビタール前投与による肝GSHの増加ならびに胆汁うっ滞の増強、(3) ANIT同時静

注による BSP-SG の胆汁排泄低下は、いずれも直接的な証明ではないが、in vivo でも ANIT が GSH 抱合を受け GSH-ANIT 抱合体として胆汁中に排泄される可能性を支持するものである。

EHBR は、SDR の突然変異種であり、ヒトにおける Dubin-Johnson 症候群に類似したモデルと考えられている¹¹⁾。このモデル動物では、ビリルビン、BSP など種々の有機陰イオンをはじめ、GSH および GSH 抱合体ならびに一部の胆汁酸などの胆汁中への排泄障害が明らかにされており、その原因として、canalicular multi-specific organic anion transporter (cMOAT) の障害が考えられてきた¹²⁻¹⁴⁾。最近、Ito らは、EHBR における cMOAT の欠損を遺伝子学的に証明している¹⁵⁾。その EHBR に ANIT を投与したところ、直接型ビリルビンの血中増加はみられたが、胆汁うっ滞、すなわち胆汁流量の減少は全く認められず、また肝・胆道系酵素の血中増加もみられず、肝組織像においても、SDR でみられた胆管障害が認められなかった。これらの成績から、EHBR においては ANIT またはその代謝物が胆汁中へ排泄されていないと推察される。一方 SDR では、放射標識を用いた実験で胆汁中に ANIT が排泄されることが証明されている¹⁶⁾。これらより、ANIT は GSH 抱合を受け胆汁中に排泄されたのち、胆汁うっ滞を引き起こすものと思われる。

EHBR では、ANIT 投与後に、SDR と同程度の高直接型ビリルビン血症が生じたが、これは前述のごとく肝・胆道系酵素および胆汁酸の血中増加も、組織学的な胆管細胞障害も伴わず、SDR における胆汁うっ滞と異なる機序によるものと思われる。EHBR で障害されている cMOAT で、抱合型ビリルビンと ANIT の胆汁排泄抱合体、すなわち GSH-ANIT 抱合体とが競合的に関係しあい、その結果、抱合型ビリルビンの類洞側への efflux が増加したものと考えられる。

本研究では、ANIT の肝内胆汁うっ滞の発生機序として、ANIT が肝内で GSH 抱合を受け胆汁中に排泄され、そこで細胆管障害を引き起こすことが示唆された。そもそも GSH 抱合は、肝における解毒機能の一つとして生体防御に重要な役割を担っている。したがって、ANIT に関してはこの GSH 抱合がむしろ毒性の発現に関与するということが奇異にも感じられる。しかし bleomycine や necarziostatine など、その GSH 抱合体がより強い毒性を有する物質も報告されており¹⁷⁾、GSH-ANIT 抱合体が胆管上皮細胞に対し障害性に働く可能性も考えられる。また、胆汁中に排泄さ

れた GSH 抱合体は、胆管、小腸、腎の上皮組織で γ -GTP などの酵素の働きにより cysteinylglycine-抱合体、さらに cysteine-抱合体を経てメルカプツール酸として尿中に排泄される。したがって、GSH-ANIT 抱合体が胆汁中に排泄されると仮定した場合、それは胆汁中で cysteinylglycine-ANIT 抱合体あるいは cysteine-ANIT 抱合体に代謝されるものと思われる。GSH 抱合体が γ -GTP などにより、腎毒性を有する cysteine-抱合体に代謝されることも報告されており¹⁸⁾、cysteinylglycine-ANIT あるいは cysteine-ANIT の抱合体が、胆管上皮細胞に対し障害性を有する可能性も考えられる。また、Carpenter ら⁴⁾が in vitro で作成した GSH-ANIT 抱合体と思われる結合体は、非常に可逆的であり、高濃度の GSH の存在下でのみ結合を維持できたと報告されている。ラットの胆汁中 GSH の濃度に関しては、 γ -GTP 阻害剤使用下では肝細胞中の GSH 濃度とほぼ同程度であったと報告されている¹⁹⁾が、一方、生理的条件下では肝細胞中の GSH 濃度の約 3 分の 1 で 2mM 前後であったとの報告もみられる²⁰⁾。ANIT あるいはその P450 代謝産物が、肝細胞内では GSH 抱合を受けるため毒性を発現しないが、胆汁中においては GSH の濃度差あるいはそれ以外の理由で脱抱合を受け、遊離した ANIT が胆管上皮細胞の障害を引き起こす可能性も否定できないと思われる。

結 語

in vivo の実験で以下の結果を得た。

1) SDR に ANIT を投与すると一過性の肝 GSH 濃度の低下がみられた。2) フェノバルビタール前処置にて肝総 GSH 濃度を増加させた SDR では、ANIT による胆汁うっ滞がより強くみられた。3) EHBR に ANIT を投与しても、胆汁うっ滞は生じなかった。4) BSP と ANIT とを同時持続静注すると、BSP の胆汁排泄低下がみられた。

以上から、ANIT は GSH 抱合体として胆汁中に排泄され、胆汁うっ滞を引き起こすことが示唆された。

謝辞：本稿を終るにあたり、御校閲を賜りました東邦大学第 2 内科学教室職員 庄教授に深謝いたします。また、直接ご指導いただきました住野泰清助教授および山室 渡講師に感謝いたします。

文 献

- 1) Desmet VJ, Krstulovic B, Damme B: Histochemical study of rat liver in alphanaphthylisothiocyanate (ANIT) induced cholestasis. Am

- J Pathol 52: 401—421, 1968
- 2) 福本陽平, 沖田 極, 竹本忠良, 他: α -naphthylisothiocyanate による実験的胆汁うっ滞の発現と肝細胞小胞体中および核中の cytochrome P-450 の変動. 肝臓 22: 552—558, 1981
 - 3) Dahlin DC, Miwa GT, Nelson SD, et al: N-acetyl-p-benzoquinone imine: A cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. Proc Natl Acad Sci (USA) 81: 1327—1331, 1984
 - 4) Carpenter L, Marchand DH, Reed DJ: Involvement of glutathione in 1-naphthylisothiocyanate (ANIT) metabolism and toxicity to isolated hepatocytes. Biochem Pharmacol 42: 2171—2180, 1991
 - 5) Williams CH Jr: In: The Enzymes (ed. Boyer PD), XIII, p90, Academic Press, New York (1976)
 - 6) Hirota M, Sugi K, Inoue M: Dynamic aspects of glutathione metabolism in obstructive jaundice. J Gastroenterol 29: 588—592, 1994
 - 7) Roberts RJ, Plaa GL: Potentiation and inhibition of α -naphthylisothiocyanate induced hyperbilirubinemia and cholestasis. J Pharmacol Exp Therap 150: 499—506, 1965
 - 8) Kaplowitz N, Kuhlenkamp J, Reeve LJ, et al: Effect of salicylates and phenobarbital on hepatic glutathione in the rat. J Pharmacol Exp Therap 212: 240—245, 1980
 - 9) Dahm LJ, Roth RA: Protection against α -naphthylisothiocyanate induced liver injury by decreased hepatic non-protein sulfhydryl content. Biochem Pharmacol 42: 1181—1189, 1991
 - 10) Bruggeman IM, Temmink JHM, Bladeren PJ: Glutathione- and cysteine-mediated cytotoxicity of allyl and benzyl isothiocyanate. Toxicol Appl Pharmacol 83: 349—359, 1986
 - 11) Mikami T, Tagaya S, Ohgoh T, et al: The character of a new mutant in rats with hyperbilirubinuria syndrome. Congenital Anom 26: 250—251, 1986
 - 12) Takikawa H, Sano N, Tagaya O, et al: Biliary excretion of bile acid conjugates in a hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rat. Hepatology 14: 352—360, 1991
 - 13) Kurisu H, Kamisaka K, Tagaya O, et al: Organic anion transport study in mutant rats with autosomal recessive conjugated hyperbilirubinemia. Life Sci 49: 1003—1011, 1991
 - 14) Oude Elferink RPJ, Ottenhoff R, Jansen PLM, et al: Hepatobiliary transport of glutathione and glutathione conjugate in rats with hereditary hyperbilirubinemia. J Clin Invest 84: 476—483, 1989
 - 15) Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, et al: Expression of a putative ATP-binding cassette region, homologous to that in multidrug resistance-associated protein (MRP), is hereditarily defective in Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR). Int Hepatol Commun 4: 291—298, 1996
 - 16) Capizzo F, Robert J: Disposition of the hepatotoxin α -naphthylisothiocyanate (ANIT) in the rat. Toxicol Appl Pharmacol 17: 262—271, 1970
 - 17) Igwe OJ: Commentary. Biologically active intermediates generated by the reduced glutathione conjugation pathway. Toxicological implications. Biochem Pharmacol 18: 2987—2994, 1986
 - 18) Monks TJ, Lau SS: Commentary: Renal transport processes and glutathione and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. Drug Metab Dispos 15: 437—441, 1987
 - 19) Lu CS, Kuhlenkamp J, Sun WM, et al: Alterations in glutathione homeostasis in mutant Eisai hyperbilirubinemic rats. Hepatology 24: 253—258, 1996
 - 20) Lauterburg BH, Smith CV, Hughes H, et al: Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat regulation and response to oxidative stress. J Clin Invest 73: 124—133, 1984

Experimental analysis of the mechanisms of alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis in rats

Yutaka TAKAHASHI*

To clarify the precise mechanism of intrahepatic cholestasis by alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT), ANIT was administered (540 μ mol/kg) to Sprague-Dawley rats (SDR) and Eisai hyperbilirubinuria rat (EHBR). EHBR is known as a model animal of Dubin-Johnson syndrome, characterized by the impaired glutathione (GSH) and GSH-conjugated transport via bile canalicular membranes. In SDR, the concentration of GSH in the liver tissue transiently decreased at 6 hours after oral administration of ANIT, followed by intrahepatic cholestasis. Moreover, pretreatment with phenobarbital enhanced the ANIT-induced cholestasis. On the other hand, ANIT did not cause cholestasis in EHBR, indicating impaired excretion of ANIT metabolites. In addition, the biliary excretion of sulfobromophthalein decreased when ANIT was co-infused. These results strongly suggest that ANIT may be excreted into the bile as a GSH conjugated form, and that GSH-conjugated ANIT or its deconjugates may cause cholestasis.

* Second Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine (Tokyo)