

Effectiveness of tolvaptan monotherapy and low-dose
furosemide/tolvaptan combination therapy for hepatoprotection and
diuresis in a rat cirrhotic model

(肝硬変ラットにおいて、トルバプタン単独治療および低用量フロセミド/トルバ
プタン併用治療は肝保護、利尿に対してより高い効果がある)

氏名 田邊 規和

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用分子生命科学系専攻 消化器内科学分野

平成29年6月

目次

1. 要旨	1
2. 緒言	1
3. 方法	2
(1) 動物	2
(2) 薬剤投与	2
(3) 血液測定	2
(4) 組織学および免疫組織化学的検査	2
(5) Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)	3
(6) トルバプタンの抗酸化作用評価	3
(7) 統計解析	3
4. 結果	4
(1) 生存率, 尿量への効果	4
(2) 代謝パラメータへの効果	4
(3) 血液化学分析	4
(4) 組織学および免疫組織学的解析	4
(5) 肝線維化に関連した遺伝子発現への効果	4
(6) トルバプタンの抗酸化作用	5
5. 考察	5
6. 結語	7
7. 謝辞	7
8. 参考文献	7

1. 要旨

【背景・目的】非代償性肝硬変症に伴う腹水の薬物治療として、古くからスピロノラクトンやフロセミドなどが用いられてきたが、これらを併用しても治療効果に乏しい難治性腹水に対して、バソプレシン-V2 受容体拮抗剤であるトルバプタンの併用投与が日本において認可された。循環器領域で、単独およびフロセミド併用投与により、心筋リモデリングにおける線維化抑制効果を示したことが報告されており、肝硬変ラットモデルにおいても肝線維化抑制効果を含めた有用性がないか検討した。【方法】我々は Choline-deficient L-amino-acid-defined(CDAA) diet + Diethylnitrosamine (DEN) で誘発される肝線維化モデルを使用した。フロセミド低用量群(15mg/kg/日)、フロセミド高用量群(100mg/kg/日)、トルバプタン単独群 (10mg/kg/日)、フロセミド低用量+トルバプタン併用群と非投与群 (コントロール群) の 5 群に分けた。利尿効果、肝線維化について評価した。【結果】トルバプタン単独およびフロセミド併用投与群でコントロール群、フロセミド低用量群と比較して有意に尿量の増加を認めた。また、トルバプタン単独およびフロセミド低用量の併用投与で肝線維化抑制効果および肝保護作用を認めた。トルバプタンの肝保護作用の機序として、抗酸化作用が示唆された。【結論】本実験でトルバプタン単独投与およびフロセミド低用量/トルバプタン併用投与は肝保護、利尿に対してより高い効果があることが示唆された。

2. 緒言

肝硬変患者では肝機能低下の臨床症状として肝性浮腫がしばしば認められ、腹水・下腿浮腫に伴う自他覚症状を特徴とする。肝性浮腫に関連した持続的な自他覚症状は QOL の低下をもたらす¹⁾。非代償性肝硬変に伴う腹水の薬物治療としては、古くからスピロノラクトンやフロセミドなどが用いられてきた²⁾。しかし、これらを併用しても治療効果に乏しい症例が存在し、しばしば難治性腹水として治療に苦慮することを経験する³⁾。バソプレシン-V2 受容体拮抗剤であるトルバプタンはこれまで低ナトリウム血症、抗利尿ホルモン不適合分泌症候群による二次性の低ナトリウム血症、心不全による体液貯留で使用可能であったが⁴⁾、我々は肝性浮腫・腹水改善効果を論文報告し⁵⁾、これらエビデンスを含めて 2013 年 9 月には日本で肝硬変症に合併する難治性腹水に対する治療薬としても使用可能となった。トルバプタンは、Na 排泄を伴わずに利尿作用を示すことから、既存の利尿薬で効果不十分な肝硬変における体液貯留に対する併用治療薬として期待されている。

トルバプタンを使用した基礎実験としては、循環器領域で、急性および慢性心筋梗塞モデルラットに対して、トルバプタン単独およびフロセミド併用投与を行い、心筋リモデリングにおける線維化抑制効果を示したことが報告されている⁶⁾⁷⁾。V2 受容体の存在しない心筋⁸⁾で線維化抑制効果が報告されており、興味深い。

心筋同様に肝臓にも V2 受容体は存在せず⁹⁾、肝硬変ラットモデルにおいてトルバプ

タン単独およびフロセミド併用投与が肝線維化抑制効果を含めた有用性がないか検討した。

3. 方法

(1) 動物

動物飼育は山口大学医学部の動物倫理要項に従って行った。

6週齢のオスのWistar系ラット(140-160g)を日本SLC(Shizuoka, Japan)で購入し、山口大学医学部の動物実験施設で制御された温度下(25℃)と照明(12時間照明、12時間消灯)下の部屋で飼育した。ラットは粉末状のCholine-deficient L-amino-acid-defined(CDAA) diet (Dyets Inc.; Bethlehem, PA, USA; product numbers 518753, 518754)投与下に、Diethylnitrosamine (DEN) (Sigma N0756) 10mg/kg/週を16週間腹腔内投与した。

(2) 薬剤投与

全ての実験は16週間で行った。薬剤はフロセミド(Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd., Toyama, Japan)とトルバプタン(Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。ラットをフロセミド低用量群(15mg/kg/日, F15群)、フロセミド高用量群(100mg/kg/日, F100群)、トルバプタン単独群(10mg/kg/日, T10群)フロセミド低用量群+トルバプタン併用群(F15+T10, F15T10群)と非投与群(C群)の5群(n=7)に分け、薬剤をCDAA食に混ぜて16週間継続投与した。飲水は自由飲水とした。それぞれの群の尿量を薬剤投与後4時間後に測定した。

(3) 血液測定

血清サンプルはラットを屠殺し、腹腔動脈より採取した。血清総蛋白、アルブミン、ビリルビン、AST、ALT、LDH、クレアチニン、尿素窒素、ナトリウム、カリウム、クロールを測定した。

(4) 組織学および免疫組織化学的検査

全ラット肝右葉の切片(3mm厚)を4%パラホルムアルデヒドで24時間固定し、パラフィン包埋した。切片は肝線維化評価目的にシリウスレッド染色を行った。活性化星細胞を同定するため α -SMA抗体、酸化ストレス評価目的に8OHdG抗体でそれぞれ免疫染色を行い、以下のアビチン・ビオチン・ペルオキシダーゼ法で評価した⁹⁾。

3 μ m厚の組織切片をキシレン内で脱パラフィンし、アルコールと水で再水和した。10mMのクエン酸バッファ(pH6.0)中で95℃で6分間、マイクロ波で抗原賦活化を行い、室温で30分間、0.3%過酸化水素含有メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼをブロックした。ウサギ血清(Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA)で20分間、非特異性反応のブロッキングを行った。切片は湿潤箱内でウサギ抗 α -smooth muscle actin(α -SMA)ポリクローナル抗体(1:50)(ab7817; Abcam; Cambridge, MA, USA)および抗8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)抗体(1:10)(N45.1; JaICA,

Shizuoka, Japan)を使用し、一晚 4°Cで一次抗体反応を行った。phosphate-buffered saline (PBS) で3回洗浄し、切片は1時間室温でビオチン化二次抗体と反応させた。結合した抗体は、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシターゼ (ABC) 法を用いて検出した(Vector Laboratories)。

肝切片のシリウスレッド染色陽性領域、 α -SMA 陽性領域は Keyence BIOREVO BZ9000 microscope (Osaka, Japan) と Provis microscope (Olympus; Tokyo, Japan) equipped with a charge-coupled device (CCD) camera で定量化し、MetaMorph software (Universal Imaging Corporation; Downingtown, PA)を使ったコンピュータアシストイメージ解析を使用した。シリウスレッド染色陽性、 α -SMA 陽性領域は試料の総面積の割合で表示した。8-OHdG 陽性細胞数は Keyence BIOREVO BZ9000 microscope を使用してそれぞれの切片でカウントした。

(5) Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)

定量 real time PCR による α -SMA, collagen I, tumor growth factor beta1 (TGF- β 1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) mRNA の発現を real-time PCR で評価した。

それぞれのプライマーのリストは以下である。

Rat α -SMA: sense (5'-AGAACACGGCATCATCACCAAC-3'), antisense (5'-GCACAGCCTGAATAGCCACATAC-3');

Rat collagen I : sense (5'-AGCGGTGAAGAAGGAAAGAGAGG-3'), antisense (5'-CAATAGGACCAGAAGGACCAGCA-3');

Rat TGF- β 1 primers: sense (5'-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'), antisense (5'-TGCGCCTGCAGAGATTCAAG-3');

Rat TIMP-1: sense (5'-CTGCAGGCAGTGATGTGCAA-3'), antisense (5'-ACAGGTTTCCGGTTCGCCTAC-3');

Rat GAPDH: sense (5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'), antisense (5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3')。

(6) トルバプタンの抗酸化作用評価

トルバプタンは Dimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解した。HepaRG は KAC Co., Ltd. で購入した。コラーゲンコーティングされた 96well プレートに 1well あたり 1×10^4 cell で播種し、トルバプタンを 0-80 μ M の濃度で含む培地 (Maintenance and Metabolism Medium) で培養した。24 時間後、培養培地を交換し、tert-butyl hydroperoxide (tert-BHP)濃度 150 μ M を加えて酸化ストレス負荷下で培養した。24 時間後、MTS assay を行った。MTS assay は CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, USA)を使用した。

(7) 統計解析

統計学的有意差は生化学的および組織学的結果のために Student's *t* test または分散

分析 (ANOVA) で検討した。また、生存解析のために log-rank test で検討した。結果は平均±標準偏差で表示し、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

4. 結果

(1) 生存率, 尿量への効果

Fig.1 は 16 週間の各群の生存率を示している。F100 群では利尿剤投与 16 週までに 85.7% (n=6/7) が死亡したが、F15T10 群を含めた他の 3 群では死亡は認めなかった ($p<0.01$)。

また、薬剤投与 4 時間後の尿量は C 群と比較して、他の 3 群では有意に増加を示した。また F15 群と比較して、T10 群、F100 群及び F15T10 群の尿量は有意に増加を示し ($p<0.01$)、3 群間では同等の利尿効果であった (Table 1)。

(2) 代謝パラメータへの効果

16 週後の代謝パラメータ値を Table 1 に示す。体重はすべての群で同等であったが、肝重量は薬剤を投与した群で有意に減少を示した。腎重量は T10 群で有意に減少を示した。F100 群については、死亡数が多くサンプル回収が困難であった。F100 群では死亡率が明らかに高いため、以後の検討は F100 群を除いた群で検討した。

(3) 血液化学分析

Table 1 に 16 週間後の肝機能の血清生物学的マーカーを示す。電解質の値は有意差を示さなかった。C 群よりトルバプタン投与群 (T10 群、F15T10 群) でアルブミン値は有意に上昇し、AST 値は有意に低下した。C 群と比較して、T10 群でクレアチニン値が有意に低下した。さらに、F15 群、T10 群、F15T10 群群で総ビリルビン値は有意に低下し、ALT 値は低下傾向を示した。

しかし、F100 群は 7 週で著明に血清クレアチニン $1.30\pm 0.37\text{mg/dl}$ と上昇し、16 週まで生存したサンプル (n=1) でも 2.2mg/dl と著明な上昇を認めた。

(4) 組織学および免疫組織学的解析

16 週間後に、肝臓の組織学および免疫組織学的検査ですべての群において肝線維化を示した。C 群と比較して利尿剤投与群はシリウスレッド染色陽性領域が有意に低かった。利尿剤投与群間で有意差は認めなかったが、F15T10 群で陽性域がより低かったが有意差は認めなかった (Fig.2)。

α -SMA 染色は CDAA 食+DEN を与えられたラットの肝内活性化星細胞の著しい増殖を示した。C 群と比較して、利尿剤投与群は有意に α -SMA 陽性領域の減少を示した。利尿剤投与群間では有意差は認めなかった (Fig.3)。

DNA 損傷の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG 染色陽性細胞数は利尿剤投与群で有意に減少した (Fig.4)。

(5) 肝線維化に関連した遺伝子発現への効果

16 週間後に肝臓の collagen I, TGF- β 1, TIMP-1, α -SMA の mRNA 発現を解析

した。いずれの発現も利尿剤投与群で有意に発現が抑制された(Fig.5)。

(6) トルバプタンの抗酸化作用

トルバプタンの酸化ストレスに対する効果を評価するために、ヒト肝細胞様形態を呈し、ヒト肝細胞の各機能を保持、発現していると報告されている HepaRG を使用した¹⁰⁾¹¹⁾。

tert-BHP 150 μ M に 24 時間 HepaRG を暴露することで、約 40%の細胞が細胞死した。tert-BHP のみ投与した群と比較して、トルバプタン 0.1-5 μ M を投与した群では、有意に細胞死が抑制された。10 μ M 以上では有意差は認めなかった(Fig.6)。

5. 考察

肝硬変が進行し、非代償性となると肝性浮腫が出現する。従来、アルドステロン拮抗薬およびループ利尿薬などが用いられてきたが、これらを増量、併用しても十分な効果が得られない症例がある⁹⁾。また、利尿薬の増量や併用により血中の電解質バランスが崩れたり、腎機能が低下したりするという懸念がある¹²⁾。フロセミド投与による腎障害については、肝硬変による腹水患者で血清クレアチニン濃度と BUN 濃度の有意な上昇や糸球体濾過量の有意な低下が報告されている¹³⁾¹⁴⁾。また、フロセミドは血中でアルブミンと結合することで尿細管腔に分泌され作用点に運ばれるため、低アルブミン血症に伴う作用不全の問題もある。腎障害や低 Na 血症は、肝硬変患者の予後不良因子であり¹⁵⁾¹⁶⁾、近年、肝硬変における腎機能保護の重要性が認識されている。

バソプレシン-V2 受容体拮抗剤であるトルバプタンは、ナトリウム排泄を伴わない水利尿作用を示すことから、日本において、既存の利尿薬で効果不十分な肝硬変における体液貯留に対する併用治療薬として期待され、治験が行われた²⁾。トルバプタンは血清アルブミン値に関係なくその効果を発揮し、低アルブミン血症例においても有意な体重減少が認められている¹⁷⁾。トルバプタンは水利尿により血管内 Na 濃度が上昇し、血管外の水分が血管内に移行し、血管内の水分を維持するため、腎血流の低下を防ぎ、腎機能障害を防ぐことが考えられる。トルバプタンの腎保護作用については、終末期心不全ラットモデルで長期トルバプタン治療による酸化ストレスに関連した腎障害や糸球体硬化、間質線維化の改善効果が報告されている¹⁸⁾。

これらの背景をもとに、V2 受容体が存在しない肝臓⁸⁾で、肝硬変ラットモデルにおいてトルバプタン単独およびフロセミド併用投与の有用性を検討した。

本研究で、我々は CDAA 栄養ラットを使用した。CDAA 食は肝線維化に繋がる ROS 関連肝細胞障害を引き起こす¹⁹⁾。C 型肝炎および nonalcoholic steatohepatitis (NASH) の病態進展においても酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。C 型肝炎では ROS 産生が亢進していることが報告されている²⁰⁾。また、NASH では酸化ストレスが炎症や線維化反応の原因となる炎症サイトカインの産生の引き金となることが報告されている²¹⁾。

トルバプタンの線維化抑制に関する基礎実験として、急性および慢性心筋梗塞モデルラットで、トルバプタンの心筋リモデリングにおける線維化抑制効果の報告がある²⁷⁾。V2受容体の存在しない心筋で線維化抑制効果を示している。トルバプタンの投与によりTGF- β 1やcollagen I mRNAの発現の抑制や抗炎症作用を示した。本研究で、フロセミド低用量、トルバプタンおよびこれらの併用投与により、 α -SMA, collagen I, TGF- β 1 およびTIMP-1 mRNAの発現の低下と α -SMA陽性活性化肝星細胞の減少を認め、肝臓においても線維化抑制効果を認めた。また、血液化学分析でトルバプタン投与およびフロセミド低用量/トルバプタン併用投与で有意なアルブミンの上昇およびASTの低下を認め、肝保護作用を認めた。また、フロセミド低用量投与も含めて、ALT、総ビリルビンの低下傾向を認めた。肝重量の有意な低下は、肝内脂肪量に差はなく、CDAA食+DENによる肝障害に対する肝保護作用を反映していると考えた。

また、トルバプタン、フロセミド低用量、フロセミド低用量/トルバプタン併用投与で、肝臓内でDNA酸化ストレス障害の程度を反映する8-OHdG陽性細胞の減少を認めた。トルバプタンの線維化抑制効果については、HepaRGを用いて、tert-BHPによる酸化ストレス負荷下でのトルバプタンの抗酸化作用が示された。肝保護作用の機序として、トルバプタンの抗酸化作用が示唆された。肝細胞に対してトルバプタンの抗酸化作用を評価した研究は我々が知る限り、初めての検討である。

フロセミドの線維化抑制効果については、フロセミドは血清レニン活性を増加するため²²⁾、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)が賦活化され、これまでの報告²³⁾からは肝線維化を亢進する可能性が示唆され、矛盾する結果となっている。しかし、10mg/kg/日の投与ではフロセミドによる血清レニン活性の増加はなく²²⁾、本研究の低用量投与ではRAASを活性化させなかった可能性が考えられた。また、フロセミドの抗酸化作用、肝保護作用の報告があり²⁴⁾²⁵⁾、フロセミド低用量ではそれらの効果が得られる可能性が考えられた。

常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)に対しても、臨床でトルバプタン投与が行われているが、我々の研究でトルバプタンの肝保護作用を示した一方で、ADPKDでは重篤な肝障害の報告がされている。このことを裏付けるために、HepG2細胞に対して、トルバプタン濃度20 μ M以上で投与を行い、肝障害が引き起こされたと報告されている²⁶⁾。本研究の結果では抗酸化作用を認めた濃度は0.1-5 μ Mであり、10 μ M以上の濃度では抗酸化作用を認めていない。日本で肝硬変症に合併する難治性腹水に対するトルバプタンの臨床投与量上限は7.5mg/日とされている。薬物動態学的研究ではトルバプタン7.5mg/日投与での平均治療C_{max}は約0.3 μ Mと報告されており²⁷⁾、本研究で抗酸化作用を認めた濃度の範囲内にある。ADPKDに対しては60-120mg/日の投与となっており、7.5mg/日程度であれば、肝障害の危険性は低く、むしろ肝保護作用が得られる可能性が示唆された。

腎機能についてはフロセミド低用量、トルバプタン、フロセミド低用量/トルバプタ

ン併用投与で、非投与群と比較して、悪化を認めなかった。トルバプタン投与群では、血清クレアチニンの有意な低下を認め、以前の論文で報告されているように¹⁷⁾、トルバプタンの腎保護作用の可能性が示唆された。

利尿剤投与の本来の目的である尿量については、利尿剤非投与群と比較して、利尿剤投与群では有意に増加を示した。またフロセミド低用量群と比較して、トルバプタン単独、フロセミド高用量、フロセミド低用量/トルバプタン併用投与で尿量はさらに有意に増加を示した。しかし、フロセミド高用量を投与すると、早期から著明に腎機能障害を認め、死亡率も高かった。フロセミド低用量投与では腎障害は認めなかったが、十分な尿量が得られなかった。一方、トルバプタン、フロセミド低用量/トルバプタン併用投与では腎障害を認めず、十分な尿量が得られた。

本研究で、肝保護の点からはトルバプタン単独投与、フロセミド低用量/トルバプタン併用投与だけでなく、フロセミド低用量投与でも同等の効果が示された。しかし、尿量の点で、フロセミド低用量投与では十分な量が得られなかった。

トルバプタンが認可されるまでは、肝硬変症による体液貯留に対して、スピロノラクトンやフロセミドが効果に乏しければ、増量するしかなかった。現在、日本では既存の利尿薬にトルバプタンを併用投与することになっている。その併用投与のタイミングとして、本実験の結果から、フロセミドを増量していくのではなく、フロセミド低用量の早期段階からトルバプタンを併用していくことが重要であることが示唆された。また、今後のさらなる検討が必要であるが、トルバプタン単独投与の有用性も高い可能性があることが示唆された。

6. 結語

本研究でトルバプタン単独投与およびフロセミド低用量/トルバプタン併用投与は肝保護、利尿に対してより高い効果があることが示唆された。

7. 謝辞

我々は、技術補佐員である山田磨理子、藤本五百子、大田久美江、黒瀬弘美、望月里紗の支援に感謝する。

8. 参考文献

- 1) Solà E, Watson H, Graupera I, Turón F, Barreto R, Rodríguez E, Pavesi M, et al. Factors related to quality of life in patients with cirrhosis and ascites: relevance of serum sodium concentration and leg edema. *J Hepatol* 2012;57:1199-1206.
- 2) Runyon BA. Historical aspects of treatment of patients with cirrhosis and ascites. *Semin Liver Dis* 1997;17:163-173.
- 3) Wong F. Management of ascites in cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*

2012;27:11-20.

4) Zmily HD, Daifallah S, Ghali JK. Tolvaptan, hyponatremia, and heart failure. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2011;4:57-71.

5) Sakaida I, Kawazoe S, Kajimura K, Saito T, Okuse C, Takaguchi K, Okada M, et al. Tolvaptan for improvement of hepatic edema: A phase 3, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatol Res* 2014;44:73-82.

6) Yamazaki T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamashita N, Fujiki H, Osada-Oka M, Shiota M, et al. Tolvaptan improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in rats. *Circ Heart Fail* 2012;5:794-802.

7) Yamazaki T, Nakamura Y, Shiota M, Osada-Oka M, Fujiki H, Hanatani A, Shimada K, et al. Tolvaptan attenuates left ventricular fibrosis after acute myocardial infarction in rats. *J Pharmacol Sci* 2013;123:58-66.

8) Ferguson JW, Therapondos G, Newby DE, Hayes PC. Therapeutic role of vasopressin receptor antagonism in patients with liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2003;105:1-8.

9) Saeki I, Terai S, Fujisawa K, Takami T, Yamamoto N, Matsumoto T, Hirose Y, et al. Bortezomib induces tumor-specific cell death and growth inhibition in hepatocellular carcinoma and improves liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2013;48:738-750.

10) Parent R, Marion MJ, Furio L, Tre'po C, Petit MA. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 2004;126:1147-1156.

11) Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *HEPATOLOGY* 2007;45:957-967.

12) Cárdenas A, Arroyo V. Refractory ascites. *Dig Dis* 2005;23:30-38.

13) Bernardi M, De Palma R, Trevisani F, Santini C, Servadei D, Gasbarrini G. Comparative pharmacodynamics of furosemide and muzolimine in cirrhosis. Study on renal sodium and potassium handling and renin-aldosterone axis. *Z Kardiol* 1985;74 Suppl 2:129-134.

14) Ginés P, Arroyo V, Quintero E, Planas R, Bory F, Cabrera J, Rimola A, et al. Comparison of paracentesis and diuretics in the treatment of cirrhotics with tense ascites. Results of a randomized study. *Gastroenterology* 1987;93:234-241.

15) Fede G, D'Amico G, Arvaniti V, Tsochatzis E, Germani G, Georgiadis D, Morabito A, et al. Renal failure and cirrhosis: a systematic review of mortality and prognosis. *J Hepatol* 2012;56:810-818.

- 16) Iwasa M, Ishihara T, Hasegawa H, Takei Y. Cirrhosis-related hyponatremia and the role of tolvaptan. *Hepatol Res* 2015;45:E163-165.
- 17) Sakaida I, Nakajima K, Okita K, Hori M, Izumi T, Sakurai M, Shibasaki Y, et al. Can serum albumin level affect the pharmacological action of tolvaptan in patients with liver cirrhosis? A post hoc analysis of previous clinical trials in Japan. *J Gastroenterol* 2015;50:1047-1053.
- 18) Ishikawa M, Kobayashi N, Sugiyama F, Onoda S, Ishimitsu T. Renoprotective effect of vasopressin v2 receptor antagonist tolvaptan in Dahl rats with end-stage heart failure. *Int Heart J* 2013;54:98-106.
- 19) Sakaida I, Hironaka K, Uchida K, Okita K. Iron chelator deferoxamine reduces preneoplastic lesions in liver induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:560-569.
- 20) Valgimigli L, Valgimigli M, Gaiani S, Pedulli GF, Bolondi L. Measurement of oxidative stress in human liver by EPR spin-probe technique. *Free Radic Res* 2000;33:167-178.
- 21) Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012;52:59-69.
- 22) Hirano T, Yamamura Y, Nakamura S, Onogawa T, Mori T. Effects of the V(2)-receptor antagonist OPC-41061 and the loop diuretic furosemide alone and in combination in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:288-294.
- 23) Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, et al. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-750.
- 24) Lahet JJ, Lenfant F, Courderot-Masuyer C, Ecartot-Laubriet E, Vergely C, Durnet-Archeray MJ, Freysz M, et al. In vivo and in vitro antioxidant properties of furosemide. *Life Sci* 2003;73:1075-1082.
- 25) Kang MY, Tsuchiya M, Packer L, Manabe M. In vitro study on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998;42:4-12.
- 26) Wu Y, Beland FA, Chen S, Liu F, Guo L, Fang JL. Mechanisms of tolvaptan-induced toxicity in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2015;95:324-336.
- 27) Sakaida I, Yanase M, Kobayashi Y, Yasutake T, Okada M, Okita K, Group ACP. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolvaptan in patients with liver cirrhosis with insufficient response to conventional diuretics: a multicentre, double-blind, parallel-group, phase III study. *J Int Med Res* 2012;40:2381-2393.

Table 1. 16 週終了時の特徴

	C (n=7)	F15 (n=7)	T10 (n=7)	F15T10 (n=7)	F100 (n=7)
Body weight (g)	273.4±7.7	267.5±18.5	271.7±18.5	273.0±17.4	
Liver weight (g)	23.8±0.3	19.5±1.6**	20.1±1.6**	19.1±1.7**	
Kidney weight (g)	2.0±0.1	1.9±0.2	1.8±0.1*	1.9±0.2	
Urine volume (ml/kg/4hr)	4.5±1.7	11.0±2.2**	24.0±3.2**	28.0±6.2**	26.5±5.9**
Serum					
T.Bil (mg/dl)	0.40±0.11	0.23±0.15**	0.28±0.15**	0.25±0.16**	
AST (IU/l)	389.8±32.4	360.7±57.9	335.0±20.1**	293.7±44.5**	
ALT (IU/l)	400.5±68.9	383.1±126.7	384.6±26.2	335.1±79.7	
LDH(IU/l)	2103±175	2090±777	1793±311	1844±713	
CRE (mg/dl)	0.33±0.05	0.37±0.07	0.27±0.02*	0.36±0.09	
BUN (mg/dl)	16.3±3.7	15.9±1.7	17.5±2.3	20.4±2.1*	
Na (mEq/l)	143.2±0.7	143.9±0.7	144.1±1.5	143.7±1.0	
K (mEq/l)	4.7±0.4	4.8±0.5	4.8±0.5	4.5±0.4	
Cl (mEq/l)	102.0±1.8	102.7±1.3	101.7±1.1	101.6±1.0	

Data are means±SD. * $P < 0.05$ vs. C group. ** $P < 0.01$ vs. C group.

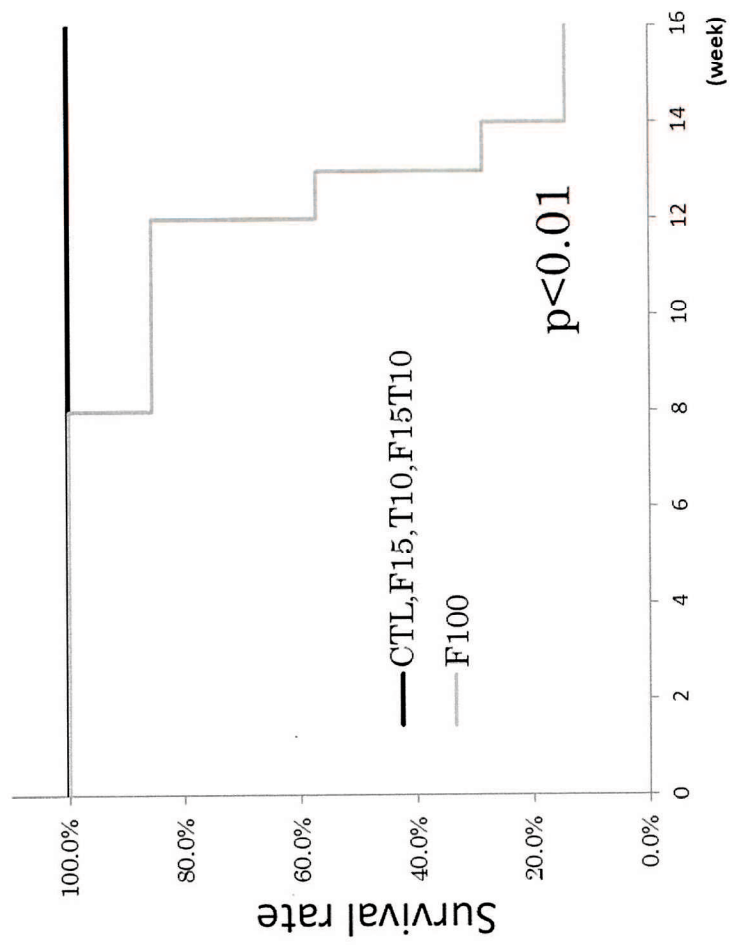


Fig.1 各群の生存率解析。Log-rank 解析。

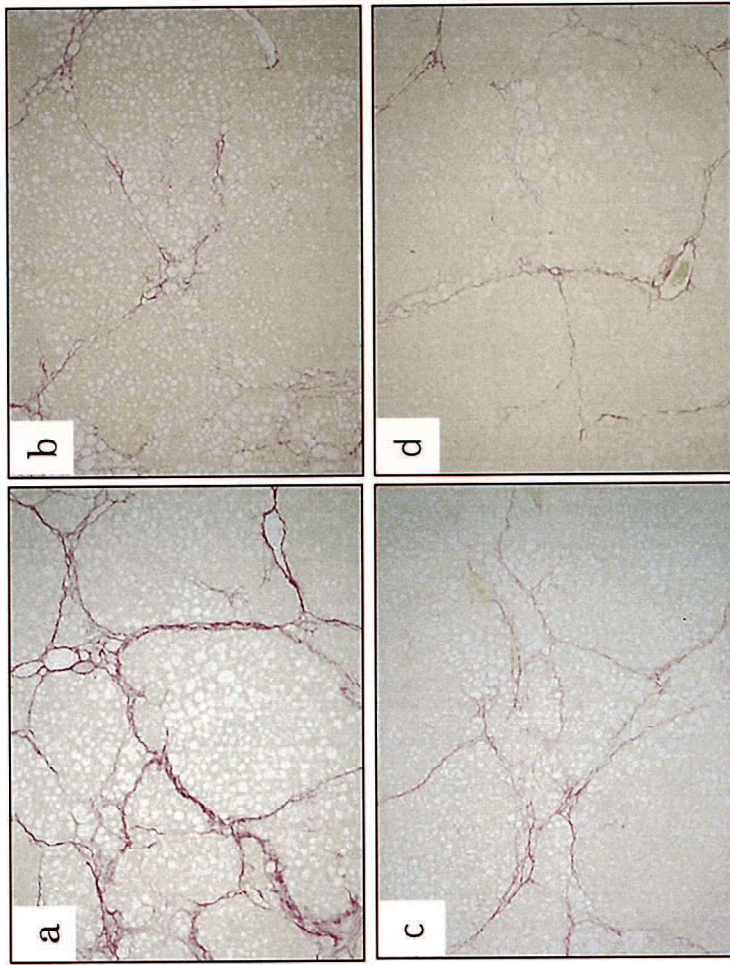
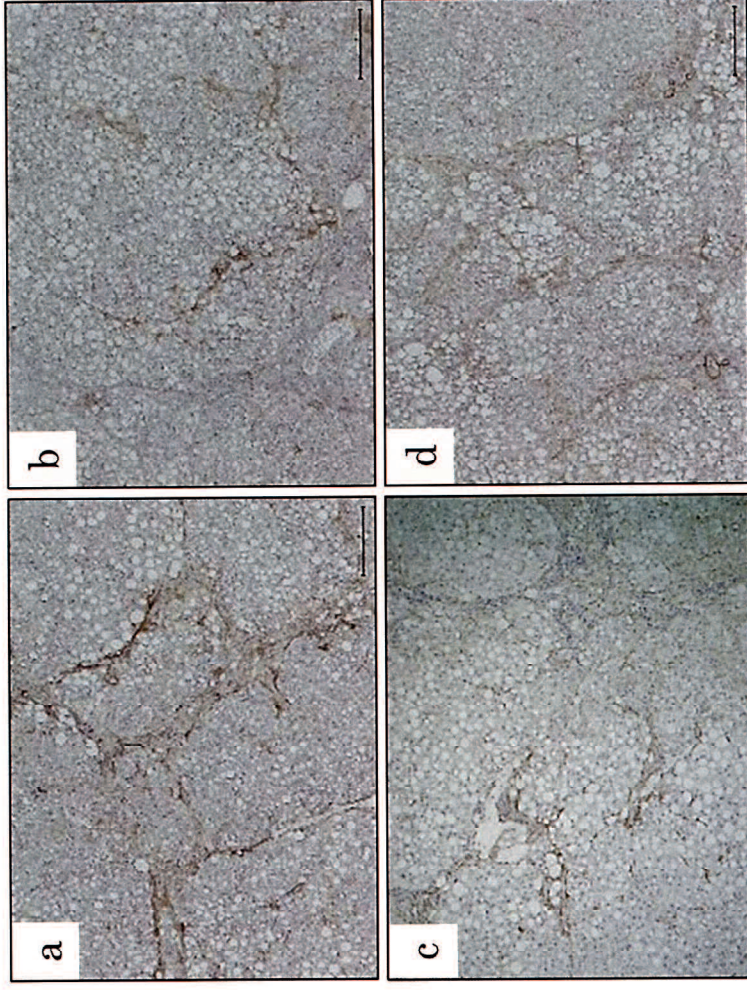


Fig.2 肝線維化の組織学的分析。シリウスレッド染色したパラフィン包埋ラット肝臓切片(倍率 40×)。(a) Choline-deficient L-amino acid (CDAA)+DEN のみの治療群, (b) CDAA + DEN+ 15mg/kg/日 furosemide 治療群, (c) CDAA+ DEN+ 10mg/kg/日トルバブタン治療群, (d) CDAA + DEN+ 15mg/kg/日 furosemide+ 10mg/kg/日トルバブタン治療群, (e) シリウスレッド陽性領域の画像解析。データは平均±標準偏差。 **p<0.01 vs CDAA+ DEN 群。



e

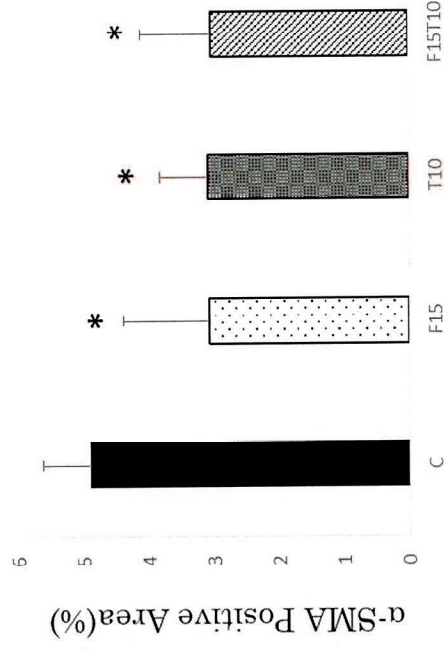


Fig.3 肝線維化における alpha-smooth muscle actin (α -SMA) 発現の免疫組織化学的解析. パラフィン包埋ラット肝臓切片は α -SMA で免疫染色した (倍率 40 \times). (a) Choline-deficient L-amino acid (CDAA) + DEN のみの治療群, (b) CDAA + DEN + 15mg/kg/日 furosemide 治療群, (c) CDAA + DEN + 10mg/kg/日 トルバプタン治療群, (d) CDAA + DEN + 15mg/kg/日 furosemide + 10mg/kg/日 トルバプタン治療群, (e) α -SMA 陽性領域の画像解析. データは平均 \pm 標準偏差. * $p < 0.05$ vs CDAA + DEN 群.

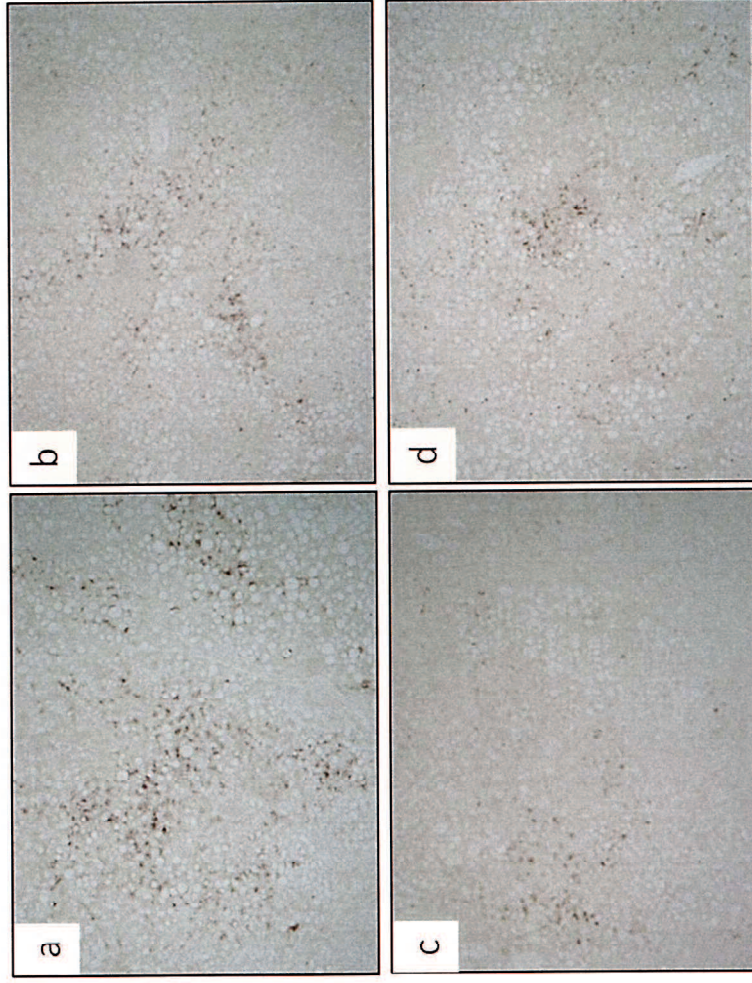


Fig.4 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 発現の免疫組織化学的解析。パラフィン包埋ラット肝臓切片は8-OHdGで免疫染色した(倍率40×)。(a) Choline-deficient L-amino acid (CDAA)+DENのみの治療群, (b) CDAA + DEN+ 15mg/kg/日 furosemide 治療群, (c) CDAA+ DEN+ 10mg/kg/日 トルブタミド治療群, (d) CDAA + DEN+ 15mg/kg/日 furosemide+ 10mg/kg/日 トルブタミド治療群, (e) 8-OHdG 陽性細胞数の画像解析。

データは平均±標準偏差。** $p < 0.01$ vs CDAA+ DEN 群。

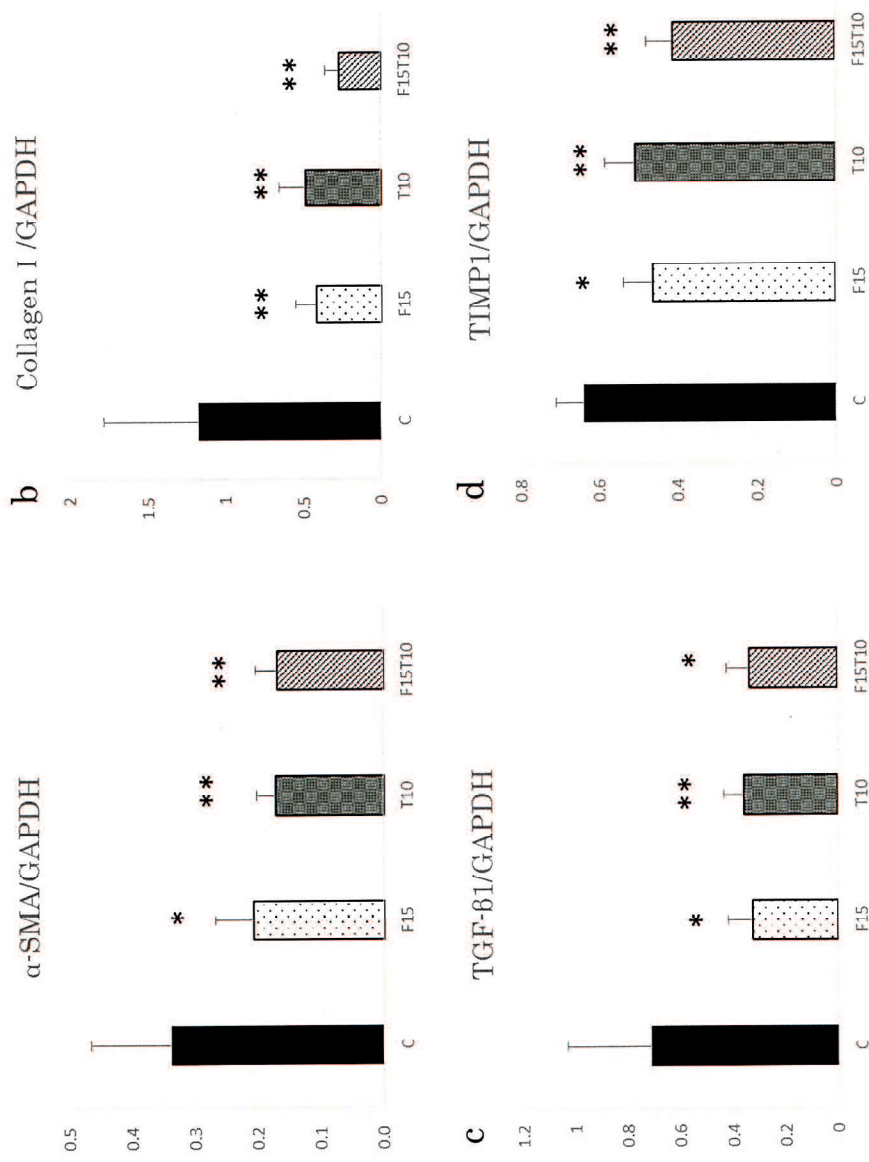


Fig.5 Real-time quantitative PCR 解析。(a) alpha-smooth muscle actin (α -SMA), (b) type I procollagen(Col I), (c) tumor growth factor beta (TGF- β 1), (d) tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)。データは平均 \pm 標準偏差。* p < 0.05, ** p <0.01 vs CDAA+ DEN 群。

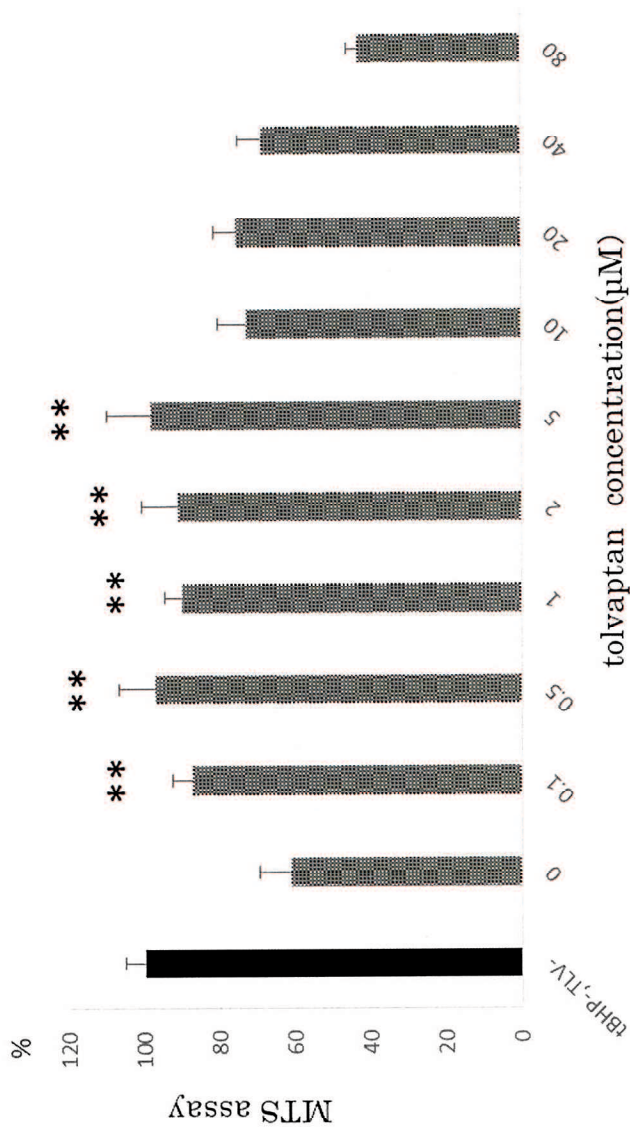


Fig.6 トルバプタンは tert-BHP による酸化ストレスに対して抗酸化作用を示した。HepaRG における MTS assay。薬剤投与なしの HepaRG の生存率を 100%とした。
 tert-BHP 単独投与で約 40%が細胞死。トルバプタン濃度は 0-80μM で投与。
 データは平均±標準偏差。 ** $p < 0.01$ vs tolvaaptan 0μM.