



Title	環境発癌性物質の代謝的活性化におけるチトクロームP-450酸素の役割に関する研究
Author(s)	山崎, 浩史
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3088032
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

環境活性物質の代謝的活性化におけるチトクローム
P-450酵素の役割に関する研究

山 嶋 浩 史

目 次

緒 論	1
-----------	---

第1章 発癌性ニトロソプロパノールアミン誘導体の変異原性発現

に関する各種動物及びヒト肝チトクロームP-450酵素	6
第1節 緒 言	6
第2節 材料及び実験方法	7
第3節 結 果	9
第4節 考 察	19

第2章 発癌性ニトロジアルキルアミン類の代謝的活性化における

ラット肝チトクロームP4502E1酵素の役割	23
第1節 緒 言	23
第2節 材料及び実験方法	24
第3節 結 果	28
第4節 考 察	37

第3章 肝癌誘発物質3-methoxy-4-aminoazobenzeneのラットとヒト

の種々のP-450酵素による活性化	42
第1節 緒 言	42
第2節 材料及び実験方法	42
第3節 結 果	44
第4節 考 察	54

第4章 直接変異原物質furylfuramideのラットとヒトのP4501A酵素による不活性化	58
第1節 緒 言	58
第2節 材料及び実験方法	59
第3節 結 果	60
第4節 考 察	69
総括及び結論	73
第1節 総 括	73
第2節 結 論	78
謝 辞	81
引用文献	82

緒 論

疫学の成果からヒトの癌の大部分は環境中に存在する化学物質にその原因があると考えられるようになった。環境因子のなかでも食品・タバコなど経口的、経気道的に摂取する発癌性化学物質の占める割合は80%以上であるといわれている¹⁾。発癌性物質の多くは自身では不活性な物質であり、生体内で代謝的に活性化されることが知られている^{2, 3)}。本来酵素は生体を守るための機能即ち、解毒的反応により深く関わるはずであるが、しばしば代謝過程で不安定な中間代謝物の生成がみられ、これらの代謝物が、タンパク質やDNA等を攻撃することにより毒作用・発癌性を発揮することが観察されている^{4, 5)}。この活性化には、チトクロームP-450酵素(P-450)が重要な働きを示すことが明らかになってきている⁶⁾。このような化学物質による発癌の機構を明らかにすることは発癌の予防に寄与し、癌研究の重要な一端を占める⁷⁾。

近年、発癌性物質の代謝的活性化に関するP-450酵素に関して重要な発見がなされている。すなわち、P-450酵素には多くの分子種が存在すること^{8, 9)}、発癌性物質の代謝的活性化においてそれぞれ特異的P-450分子種が関与すること¹⁰⁻¹²⁾、更に発癌性物質が生体内でそれ自身を活性化するP-450分子種を誘導すること^{13, 14)}等が報告されている。最近の分子生物学的研究から、P-450酵素は共通の祖先から分岐したスーパーファミリーを形成しており、それぞれのP-450分子種は遺伝子の塩基配列の類似性から、ファミリーとサブ・ファミリーに分けられ命名されている¹⁵⁾。哺乳動物の肝臓には10種を越えるP-450分子種が存在し、動物種間で同一遺伝子ファミリーに属するP-450酵素の1次構造はかなり保存されており、このような構造上の相同性はある程度基質特異性にも反映されると考えられてきた。例えば、ベンツピレンに代表される多環芳香族炭化水素類及びアミノ酸熱分解物等の芳香族アミン類の活性化反応においては、P4501A1及び1A2酵素によるエポキシ化及びアミノ基の水酸化が重要であるといわれている⁶⁾。しかしながら、最近の研究では、発癌性物質の代謝的活性化及

び不活性化に関与するP-450分子種に実験動物とヒトとに種差が見られる例も示されている^{9, 16-18})。例を挙げると、aflatoxin B₁に代表される発癌性マイコトキシン類及びbenzo(a)pyrene-7, 8-diol等の活性化はラットでは主としてP4502C及び1A酵素に触媒されるが¹¹)、ヒトでは両化合物とともにP4503A酵素が活性化反応に関与する¹⁹)。このように、実験動物での結果が必ずしもヒトへの外挿につながらない場合が認められ、化学物質の毒性発現と生体内代謝の関係につきヒトでの詳細な検討が望まれている。したがって、環境中に存在する発癌性物質の代謝的活性化に関するP-450分子種を明らかにすることは発癌性物質の代謝的活性化機構を解明する上で重要なことと考えられる。他方、P-450酵素が触媒する反応は非常に多様であるにもかかわらず、広範な発癌性物質の活性化の研究が行われているのに対して、発癌性物質の代謝的不活性化におけるP-450酵素の役割はあまり調べられていない。

多数存在する発癌性物質のうちニトロソ化合物は代表的な化合物群のひとつであり、その特徴は環境中に広く存在し²⁰)、その発癌性は極めて強いことである。更にニトロソ化合物は生体内でも生成し得ることから、ヒトの癌との関連が強く疑われている²¹)。ニトロソアミン類は強力な発癌性物質でこれまでに調べられたすべての実験動物に癌を発生させる。また化学構造を変化させると魚類から靈長類にいたる広い動物種に対して投与部位から離れた多種多様な臓器に特異的に発癌させることも可能であり²²)、さらに種特異性を持つ²³)。発癌性ニトロソアミン類は化粧品²⁴)や食品中²⁵)に検出され、日常の食品から摂取している揮発性ニトロソ化合物の一日量は1-2 μgと推定され、その主な摂取源として海産保存食品・保存肉製品・酪農製品・ビール等が考えられている²⁰)。タバコには多種類のニトロソ化合物が含まれており、ヒトの癌との関連に関する詳しい研究が進行している^{26, 27})。また医薬品や食品に含まれるアミン類と唾液の硝酸に由来する亜硝酸が胃内で反応してニトロソアミン類を生成することも知られている²⁸)。発癌性ニトロソジアルキルアミン類(R' RCH₂N-NO)の多くは生体の代謝系で活性化されて究極的な発癌物質に変換される²⁹)。この代謝的活性化

ではニトロソ基に隣接する α 位炭素が水酸化される経路が主となると考えられている。 α -ヒドロキシ体は化学的に不安定でアルデヒドを放出して脱アルキル化が起こる。生じたアルキルジアゾヒドロキシド($\text{RCH}_2-\text{N}=\text{N}-\text{OH}$)は、活性種アルキルジアゾニウムイオン($\text{RCH}_2-\text{N}^+=\text{N}$)又は窒素分子が脱離して生じたアルキルカチオン(RCH_2^+)を経由して、DNAのアルキル化を引き起こし、癌化の引き金となる。しかしながら、ニトロソジアルキルアミン類はアルデヒド化合物の検出を指標にしてP-450酵素による代謝が調べられているが、これらの変異原性は検出され難いため、生物活性を指標とする活性化酵素の検討は十分に行われていない。このようにニトロソ化合物の発癌研究における位置づけは極めて重要であるが、これらの生物活性を発現する上で主要な活性化代謝を触媒する酵素並びに代謝的活性化経路については不明な点が多い。

プロパノールアミン類はゴム、洗剤、写真乳剤、化粧品及び医薬品の製造過程で広く使用されている。そのニトロソ化合物として、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)がこれらのアミン中に存在することが報告された³⁰⁾。BHP及び代謝関連化合物は、それらの標的臓器に関し著しい動物種差が認められている^{23, 31-45)}。すなわち、これらのニトロソプロパノールアミン類はハムスターに対しては脛^{23, 31-35)}、ラットに対しては主に肺^{23, 35-42)}に高頻度で癌を誘発する。小西ら^{41, 42)}は、BHPによるラットの発癌作用が、非喫煙者の末梢型肺癌の基礎的情報を与える有用な実験モデルであることを報告している。ヒトの肺癌は急増の一途であり、化学物質による肺癌発生機構を明らかにし、その予防法を確立することは重要な課題である。

多数知られている発癌性物質のなかでも、比較的初期にその強力な発癌性が動物実験により証明され⁴⁶⁾、現在もなお発癌機構の研究に広く使用されるものに、いくつかのアミノアゾ色素がある。これらの化合物の発癌作用の大きな特徴は、その発癌作用に動物種及び臓器特異性があることである。その代表的化合物であり、食品添加物バターアイエローとして使用されたこともあるN,N-dimethyl-4-aminoazobenzeneはラットに対して非常に強い肝癌誘発作

用を持つが⁴⁷⁾、マウス肝には弱い発癌性を示し、ハムスター、モルモット、ウサギ、ニワトリ等には全く発癌性を示さない⁴⁸⁾。更に、アミノアゾ色素の中には、雌より雄ラットに対して強い発癌作用を持つもの⁴⁹⁾や、生体に対してP-450酵素の誘導作用を持つもの⁵⁰⁻⁵²⁾がある。一部のアミノアゾ化合物の実験動物におけるP-450誘導能と発癌性との関係が議論されているが、アミノアゾ色素類のヒトにおける活性化については不明な点が多く、代謝的活性化機序についてはよくわかっていない。

発癌性物質の優れたプレスクリーニング法であるAmesらの開発した変異原性試験^{53, 54)}は、哺乳動物の代謝酵素系をサルモネラ菌の実験系に加えることにより代謝的活性化過程を考慮した変異原性の検出方法である。小田ら⁵⁵⁾は、DNA損傷によって発現が誘導されるumu遺伝子(SOS遺伝子のひとつ)を利用する突然変異原の検出方法であるumuテストを確立した。本法で検出するSOS反応の結果は発癌性物質の発癌性並びにAmes法の変異原性の結果と良好な相関関係を示している⁵⁶⁾。umuテストに用いる標準試験菌株はSalmonella typhimurium TA1535/pSK1002である。プラスミドpSK1002は、突然変異に関わるumuC遺伝子に転写・翻訳の開始部を欠くlacZ遺伝子を融合したumuC' lacZ遺伝子を持っており、形質転換法によってAmes法に用いられているサルモネラ菌TA1535に導入された。変異原物質によってSOS反応が誘発されると、umu遺伝子のプロモーター調節下にあるumuC' lacZ融合遺伝子が発現する。その産物であるUmuC' LacZ雑種タンパクは β -galactosidase活性を持つので、これをSOS反応の強さ即ち変異原性の強さの指標にすることが可能である。またアセチル転移酵素の遺伝子を持つプラスミドを更に導入した試験菌株も開発され、発癌性芳香族アミン類等のDNA損傷作用が高い感度をもって検出されている⁵⁷⁾。このumuテストは発癌性物質の代謝活性化機構を解明するのにも優れた方法として注目されている。一方、細菌のDNA障害ではなく、実際の哺乳動物肝細胞による代謝的活性化と標的臓器のひとつとなる肝細胞のDNA障害に起因する不定期DNA合成(UDS)を放射性チミジンの取り込み量として検出する肝細胞初代培養/DNA修復テスト⁵⁸⁾も開発されている。

以上のような観点から、本研究では、環境中の化学物質による発癌機構におけるP-450酵素の役割を明らかにし、ニトロソアミン類及びアミノアゾ色素の代謝的活性化における活性化酵素の動物種差の解明を目的として、発癌性物質の優れたプレスクリーニング法であるAmes法、肝細胞初代培養／DNA修復テスト又はumuテストを用いてDNA障害を指標に以下の諸研究を行った。一方、サルモネラ菌に対して強い直接変異原性を示し、発癌性の疑いから使用禁止となった食品添加物furylfuramide(AF-2)⁵⁹⁻⁶¹の生体内酵素による不活性化についてもあわせて検討した。

第1章では、標的臓器に動物種差の存在するニトロソプロパノールアミン誘導体の変異原性発現における条件検討を行い、各種動物及びヒトの酵素を用いた活性化について主にAmes法における変異原性活性を指標に検討した。

第2章では、ニトロソジアルキルアミン類の中でも強力な発癌性を示し、環境中から検出例も多いN-nitrosodimethylamine (NDMA)とN-nitrosodiethylamine (NDEA)の活性化代謝におけるラットP4502E1酵素の役割をumuテストを用いてDNA障害に伴う生物活性を指標に検討した。試験菌株には、アセチル転移酵素の遺伝子を持つプラスミドを新たに導入した菌株を用い、ニトロソジアルキルアミン類の代謝的活性化経路の推定を行い、新しい考え方を提示した。

第3章では、アミノアゾ化合物の中から、ラットに対して肝癌を誘発し、しかもP4501A2酵素を選択的に誘導する3-methoxy-4-aminoazobenzene (3-MeO-AAB)を取り上げ、ラットとヒト肝ミクロソームによる活性化をumuテストを用いて調べ、種々のP-450酵素による代謝活性化について検討した。

第4章では、発癌性物質のP-450酵素による不活性化の観点から、直接変異原物質furylfuramideのラット及びヒトの生体内酵素による代謝的不活性化をumuテストを用いて検討し、DNA障害を欠く代謝物の検索を行った。

第1章 発癌性ニトロソプロパノールアミン誘導体の変異原性発現に関する各種動物及びヒト肝チトクロームP-450酵素

第1節 緒 言

発癌試験の優れたプレスクリーニング法であるAmesらの開発した変異原性試験^{53, 54)}は、哺乳動物の代謝酵素系をサルモネラ菌の実験系に加えることにより更に代謝的活性化機構を解明するのにも優れた方法として注目されている。Fig. 1-1に今回用いたニトロソプロピルアミン誘導体の構造式と略号を示した。N-nitrosodipropylamine (DPN) の β 酸化体であるニトロソプロパノールアミン誘導体の発癌性はすでに明らかにされており、標的臓器特異性に著しい動物種差が知られている³¹⁻⁴⁵⁾。これらの変異原性については、ハムスター又はラットを用いて一部検討されているのみであり⁶²⁻⁷⁰⁾、しかも変異原性陰性とする報告もある⁶⁷⁻⁷⁰⁾。また他の動物種及びヒトについては全く検討されていない。しかも、いずれの場合

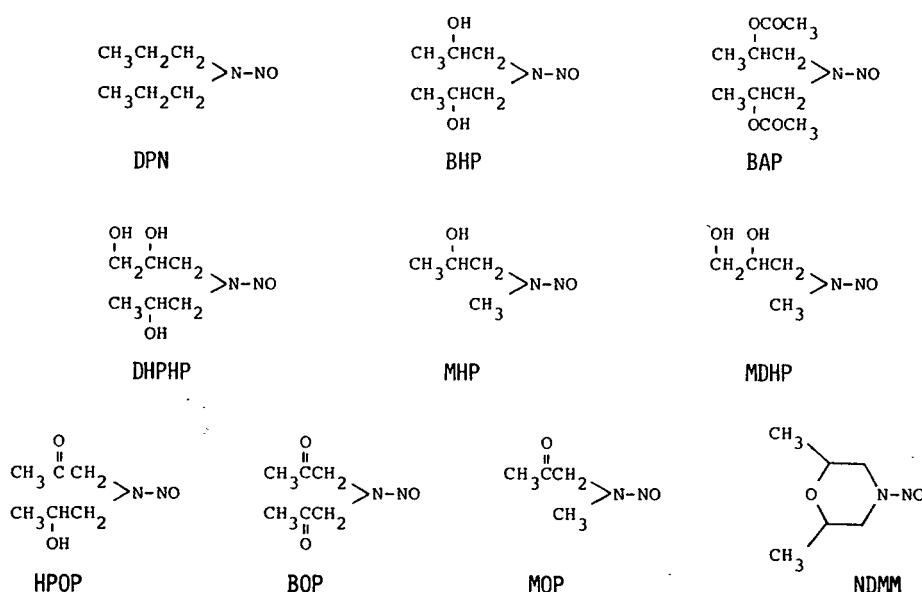


Fig. 1-1. Chemical Structures of N-Nitrosodipropylamine and its Oxidized Derivatives.

においても変異原性発現に関する代謝酵素系については明らかにされていない。そこで、9種のニトロソプロパノールアミン誘導体の発癌作用における動物種差の成因を代謝的活性化の観点から解明することを目的として、生物活性としてのDNA障害をAmes法又は肝細胞初代培養／DNA修復テストを用いて検出し、それらの活性を指標に代謝的活性化に関する薬物代謝酵素について検討した。さらにN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)については、発癌条件で投与した際のP-450酵素に及ぼす影響とその体内動態も調べた。

第2節 材料及び実験方法

化合物：N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA)及びDPN, N-nitrosodibutylamine (DBN)はそれぞれ和光純薬及び東京化成工業より購入した。[1-¹⁴C]BHP, BHP, N-nitroso(2-hydroxypropyl)(2-oxopropyl)amine (HPOP), N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP), N-nitrosomethyl(2-hydroxypropyl)amine (MHP), N-nitrosomethyl(2-oxopropyl)amine (MOP), N-nitrosobis(2-acetoxypropyl)amine (BAP), N-nitroso(2, 3-dihydroxypropyl)(2-hydroxypropyl)amine (DHPHP), N-nitrosomethyl(2, 3-dihydroxypropyl)amine (MDHP)及びN-nitroso-2, 6-dimethylmorpholine (NDMM)は森ら⁷¹⁾、Pourら³¹⁻³⁴⁾、及びLijinskyら³⁶⁻³⁹⁾の方法に準じて合成し、それらの純度はHPLCにより99%以上であった。glucose-6-phosphate、glucose-6-phosphate dehydrogenase及びNADP⁺はオリエンタル酵母より購入した。

動物及びヒト：雌雄Wistarラット(130-200g)、雄性ACIラット(200-250g)、雄性Syrian goldenハムスター(60-80g)、雄性ddyマウス(20-30g)、雄性日本白色ウサギ(2kg)、雄性アカゲザル(3.5kg)及び雌性カニクイザル(2.3kg)を用いた。ポリ塩化ビフェニル (PCB、6塩化体が主成分の混合物)は500 mg/kgを1回、またphenobarbital (PB)は80 mg/kg/day、3-

methylcholanthrene (MC) は 20 mg/kg/day を 3 日間連続して 腹腔内に投与した。BHP は 3 g/kg を 腹腔内に又は 0.2% 水溶液を 飲料水として ラットに投与した。男女のヒト肝のサンプルは、病 理学的な病変を持たない部位を 診断の目的又は 外科標本とするものから得た。

Salmonella／ミクロゾームテスト : Ames 法の液体インキュベーション法⁵⁴⁾ を用いた。試験 菌株は S. typhimurium TA100 を用い、常法により調製した肝、肺及び脾の 9,000g 上清 (S9) 、 NADPH 産生系とニトロソアミン水溶液を プレイン インキュベーションすることによって行った。 P-450 阻害剤は、 S9 混液に 1-10 mM metyrapone 又は 200 μM α-naphthoflavone を用いた。 一酸化炭素の影響は、一酸化炭素ガスを 1-2 分 反応混液中に通じて、その後 プレイン キュ ベートして調べた。

肝細胞初代培養／DNA修復テスト : Williams ら⁵⁸⁾ の方法に準じて、 ACI ラットから 単離した 肝細胞を カバースリップ 上に 定着させ、水に溶解した ニトロソアミンと [Me-³H]-thymidine と共に 20 時間 反応させた。反応終了後、洗浄した カバースリップ を 写真乳剤に漬け、 14 日後 に オートラジオグラム の核に取り込まれた 放射能に由来する 粒状の 黒像 (グレイン) を 顕微鏡 下に 計数した。

BHP の体内動態 : ラットの 血液、臓器及び糞の 放射能は、各試料を 試料燃焼装置 (ASC-113、 Aloka) で処理した後、 尿と胆汁の 放射能は 直接 シンチレーター に 溶解して 液体シンチレーション 計数装置 (LSC-651、 Aloka) を用いて 測定した。呼気中の ¹⁴CO₂ は エタノールアミン溶液 に曝気して 捕集した。代謝産物の検索は、 血漿、臓器 S9 及び 24 時間尿並びに それらの 酢酸エチル抽出物を HPLC 試料とした。抱合体の酵素水解は、 β-glucuronidase (Sigma, type VII) を用いて 37°C 、 24 時間 インキュベーションすることにより行った。HPLC は 日本分光 TRIROTOR-II を、カラムは Finepak SIL C₁₈ (4.6 x 250 mm, 日本分光) を、移動相は

acetonitrile-H₂O (3:7、system 1)又はacetonitrile (system 2)を用いた。

その他の試験方法：タンパク量はLowryら⁷²⁾、P-450含量は大村と佐藤⁷³⁾ 又はJohannesenとDepierre⁷⁴⁾及びaniline水酸化活性はGuengerich⁷⁵⁾の方法によって行った。

Table 1-1. Inhibitory Effects of Organic Solvents on the Mutagenicity of Carcinogenic N-Nitrosamines

	TA100 revertants/plate ^{a)}				
	Control	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl formamide	Acetone	95% Ethanol
NDMA	1046 (100)	57 (5)	0 (0)	5 (0)	3 (0)
NDEA	644 (100)	85 (13)	20 (3)	11 (2)	0 (0)
MHP	871 (100)	128 (15)	45 (5)	9 (1)	20 (2)
MOP	1126 (100)	68 (6)	0 (0)	30 (3)	0 (0)
MDHP	336 (100)	87 (26)	66 (20)	56 (17)	68 (20)
BHP	314 (100)	24 (8)	0 (0)	27 (9)	0 (0)
DHPHP	131 (100)	43 (33)	32 (24)	26 (20)	35 (27)
HPOP	797 (100)	403 (51)	279 (35)	302 (38)	293 (37)
BOP	413 (100)	240 (58)	176 (43)	198 (48)	234 (57)
BAP	1387 (100)	848 (61)	920 (66)	542 (39)	921 (66)
NDMM ^{b)}	904 (100)	209 (23)	0 (0)	2 (0)	49 (6)
DPN ^{b)}	618 (100)	323 (52)	—	—	—
DBN ^{b)}	290 (100)	151 (52)	—	—	—

a) The solvent (100 μ l) was added to the S9 mixture containing 10 mg of N-nitrosamine. The number of spontaneous revertants (130) was subtracted. Values in parentheses show the percentages of the control.

b) Comparison of activities of DPN (3.9 mg) and DBN (0.47 mg) dissolved in 100 μ l of dimethyl sulfoxide or in 25% dimethylsulfoxide (control).

第3節 結 果

1. Ames法と肝細胞初代培養/DNA修復テストの比較

NDMA, NDEA, プロピルアミン誘導体及びDBNの変異原性をAmes法で調べた。Table 1-1には、

試料溶媒として推奨されている5種の有機溶媒⁷⁶⁾と水を用いた結果を示した。予備試験の結果、一部を除き、基質濃度1-10mgとPCB処置ラット肝S9 50-150μlの範囲で用量依存性が認められたので、基質10mg、S9 150μlの条件で比較した。NDMA、NDEA、MHP、MOP、MDHP、BHP及びDHPHPは水を試料溶媒にすると明らかな変異原性を示したのに対し、dimethyl sulfoxide、dimethyl formamide、acetone、95% ethanol又はacetonitrile 100μl共存下では、変異原活性が消失した。HPOP、BOP、BAP及びNDMMの活性はこれらの有機溶媒によって34-92%の活性が阻害された。水に難溶性のDPNとDBNの活性もdimethyl sulfoxideの量を25μlに減らすことによっていずれも活性が約2倍になった。Table 1-2にDPNとそのβ酸化体の肝細胞初代培養／DNA修復試験の結果を示した。DHPHPを除く9種のニトロアミン誘導体は、陽性コントロールのNDEAと同様に、用量に依存して核あたりのUDS grain数が増加し、更に100個の細胞中、UDS陽性を示す細胞数も増加して、本試験においてDNA損傷性が陽性と判定された。これらのことから、発癌性が既に知られている9種すべての化合物の変異原性がAmes法において検出されたので、Ames法を用いて検討を続けた。

5種動物肝S9共存下の9種のニトロプロパノールアミン誘導体は、BHPとDHPHPを除く7種が陽性であり、その活性はいずれの場合も10mg用量まで直線的に増加した。HPOPは肝S9の非存在下でも約40%の活性を示した。Table 1-3に各種雄性動物とヒト肝及び肺ミクロソームのP-450含量を、Table 1-4に各肝及び肺S9によるaniline水酸化活性及びMHPの活性化の結果を示した。3検体のヒト肝のP-450含量及びaniline水酸化活性は未処置の各種動物のそれらの約1/5-1/10と低いものの、いずれもMHPを活性化した。ヒト肝によるその他のニトロプロパノールアミン誘導体の活性化は認められなかった。また肺S9存在下の変異原性のうち、これらによる活性化が認められたのは、MHPのPCB誘導した動物の肺S9存在下の変異原活性のみであった。脾S9による活性化はまったく認められなかった。

Table 1-2. Genotoxicity of N-Nitrosamines in Hepatocyte Primary Culture/DNA-repair Test

N-Nitrosamine	DNA repair ^{a)}	Dose (M)	UDS grains/nucleus ^{b)}	% of UDS-positive cells ^{c)}
DPN	+	10^{-3}	8.8 ± 5.8	62
		10^{-4}	2.9 ± 2.7	21
		10^{-5}	1.0 ± 1.5	4
BHP	+	5×10^{-3}	5.7 ± 3.7	46
		5×10^{-4}	2.4 ± 1.8	8
		5×10^{-5}	1.3 ± 1.4	3
HPOP	+	10^{-3}	73.9 ± 12.6	100
		10^{-4}	25.4 ± 9.2	98
		10^{-5}	3.3 ± 3.5	21
BOP	+	10^{-3}	toxic	
		10^{-4}	65.5 ± 15.0	100
		10^{-5}	17.9 ± 8.7	92
MHP	+	10^{-3}	12.7 ± 6.2	88
		10^{-4}	1.5 ± 2.3	10
		10^{-5}	0.1 ± 1.4	2
MOP	+	10^{-3}	73.9 ± 13.3	100
		10^{-4}	43.1 ± 19.5	95
		10^{-5}	10.9 ± 4.9	82
BAP	+	10^{-3}	14.2 ± 5.2	88
		10^{-4}	2.6 ± 2.8	15
		10^{-5}	-0.2 ± 1.2	0
NDMM	+	10^{-3}	7.9 ± 4.6	69
		10^{-4}	1.5 ± 2.6	7
		10^{-5}	-0.4 ± 1.4	0
DHPHP	-	2×10^{-3}	1.7 ± 1.6	5
		2×10^{-4}	1.3 ± 1.4	2
		2×10^{-5}	-0.2 ± 1.2	2
MDHP	+	5×10^{-3}	4.9 ± 3.3	40
		5×10^{-4}	1.4 ± 1.6	6
		5×10^{-5}	0.7 ± 1.4	0
NDEA	+	10^{-4}	17.7 ± 7.5	93
		10^{-5}	5.5 ± 3.8	49
		10^{-6}	1.9 ± 1.9	7
Water			-0.1 ± 1.4	0

a) +, induced DNA repair; -, failed DNA repair.

b) Mean \pm SD of triplicate coverslips.

c) Cells with net counts of at least 4 grains/nucleus.

Table 1-3. Cytochrome P-450 Contents in Liver and Lung Microsomes of Several Species of Animals and Human

Species	PCB treatment ^{a)}	P-450 content (nmoles/mg protein)	
		Liver	Lung
Rat	-	0.86	0.036 *
	+	1.84 **	0.071 *
Hamster	-	1.02	0.034
	+	1.83 *	0.075 *
Mouse	-	1.01	0.060
	+	1.09	0.125 *
Rabbit	-	0.96	0.041
Monkey	-	0.95	0.081
Human A		0.09	—
B		0.11	—
C		0.09	—
D		—	<0.012
E		—	<0.012
F		—	<0.012

a) Animals were pretreated with a single i.p. injection of 500 mg PCB per kg body weight.

Value represents means of three experiments; the standard deviations were <15 % of the mean values. Significantly different from the value for non-treated animal:
**p<0.01, *p<0.05.

Table 1-4. Monooxygenase Activities in Liver and Lung S9 of Several Species of Animals and Human

Species	PCB treatment ^{a)}	MHP Activation (TA100 revertants ^{b)} /plate)		Aniline p-hydroxylation (pmoles/mg S9 protein/min)	
		Liver	Lung	Liver	Lung
Rat	-	304	<130	49	7
	+	871 **	143	234 **	14
Hamster	-	734	<130	165	40
	+	1745 **	132	217 **	42
Mouse	-	554	<130	96	30
	+	861 *	218	173 **	32
Rabbit	-	529	<130	116	19
Monkey	-	440	<130	53	6
Human A		188	—	11	—
B		238	—	14	—
C		174	—	13	—
D		—	<130	—	0.3
E		—	<130	—	0.5
F		—	<130	—	0.3

a) Animals were pretreated with a single i.p. injection of 500 mg PCB per kg body weight.

b) Assay was carried out at the 10 mg dose level. The number of spontaneous revertants (130) was subtracted.

Value represents means of three experiments; the standard deviations were <15 % of the mean values. Significantly different from the value for non-treated animal:
**p<0.01, *p<0.05.

Table 1-5. Mutagenic Activities of N-Nitrosamines: Requirements for Enzymes and NADP+

Addition	TA100 revertants ^{a)} /plate								
	BHP	HPOP	BOP	MHP	MOP	BAP	NDMM	DHPHP	MDHP
Complete ^{b)} (control)	314(100)	797(100)	413(100)	871(100)	1126(100)	1149(100)	904(100)	132(100)	336(100)
- S9	33 (11)	137 (17)	13 (3)	54 (6)	K ^{c)}	4 (0)	49 (5)	30 (23)	37 (11)
+ cytosol instead of S9	96 (31)	157 (20)	192 (46)	121 (14)	125 (11)	115 (10)	90 (10)	38 (29)	75 (22)
+ microsomes instead of S9	125 (40)	331 (42)	184 (45)	487 (56)	430 (38)	609 (54)	521 (58)	50 (38)	126 (38)
+ microsomes and 0.25 units G-6-P DHase instead of S9	199 (63)	505 (63)	293 (71)	552 (63)	684 (61)	709 (62)	583 (64)	84 (64)	191 (57)
+ microsomes and cytosol instead of S9	272 (87)	701 (88)	388 (94)	787 (90)	1031 (92)	1028 (89)	773 (86)	117 (89)	288 (86)
+ heated S9 ^{d)} instead of S9	29 (9)	141 (18)	184 (45)	57 (6)	128 (11)	43 (4)	8 (1)	43 (33)	28 (8)
- NADP+	5 (2)	143 (18)	226 (55)	76 (8)	125 (11)	39 (3)	31 (2)	31 (23)	70 (21)

a) Assay was carried out at 10 mg dose. The number of spontaneous revertants (130) was subtracted. Values in parentheses show the percentage of the control.

b) Complete system contains liver S9 from PCB-treated rats and NADPH-generating system and phosphate buffer (pH 7.4).

c) K:killing.

d) S9 was preheated in a boiling water bath for 10 min.

Table 1-6. Effect of Inducers on Mutagenic Activities of N-Nitrosamines and Microsomal Cytochrome P-450 Content

Species	Inducers	TA100 revertants ^{a)} /plate								Microsomal cytochrome P-450 content (nmoles/ml)	
		BHP	HPOP	BOP	MHP	MOP	BAP	NDMM	DHPHP		
Rat	None	69 (22)	353 (44)	187 (45)	326 (37)	103 (9)	237 (21)	342 (38)	56 (42)	163 (49)	4.56 (24)
	MC	58 (19)	348 (44)	240 (58)	428 (49)	105 (9)	245 (21)	357 (39)	53 (40)	171 (51)	8.74 (47)
	PB	301 (96)	609 (76)	348 (84)	970(111)	788 (70)	862 (75)	643 (71)	147(111)	258 (77)	16.73 (89)
	PCB	314(100)	797(100)	413(100)	871(100)	1126(100)	1149(100)	904(100)	132(100)	336(100)	18.75(100)
Hamster	None	55 (19)	315 (36)	194 (56)	734 (42)	123 (70)	134 (40)	267 (18)	40 (31)	171 (50)	4.67 (23)
	MC	59 (20)	339 (39)	211 (61)	756 (43)	132 (76)	141 (43)	284 (20)	46 (35)	158 (46)	9.34 (45)
	PB	235 (80)	787 (90)	341 (99)	1794(103)	168 (97)	284 (86)	1427 (96)	142(108)	259 (75)	16.15 (79)
	PCB	293(100)	869(100)	346(100)	1745(100)	174(100)	331(100)	1486(100)	131(100)	345(100)	20.55(100)
Mouse	None	17 (13)	350 (75)	185 (71)	530 (62)	154 (24)	215 (55)	453 (63)	57 (43)	156 (51)	6.98 (62)
	MC	57 (43)	339 (72)	208 (79)	514 (60)	141 (22)	204 (52)	483 (67)	51 (39)	167 (54)	8.60 (76)
	PB	137(104)	425 (91)	269(103)	937(109)	610 (94)	310 (80)	640 (89)	130 (99)	234 (76)	10.41 (92)
	PCB	133(100)	468(100)	262(100)	861(100)	651(100)	389(100)	716(100)	131(100)	307(100)	11.32(100)

a) Assay was carried out at 10 mg dose. The number of spontaneous revertants (130) was subtracted. Values in parentheses show the percentages of the activity obtained with liver S9 from PCB-treated animals.

2. P-450誘導剤及び阻害剤の影響

Table 1-5にニトロソプロパノールアミン誘導体のPCB処置ラット肝S9、ミクロゾーム及び上清画分による活性化の結果を示した。上清のみを加えた場合のコロニー数は自然復帰変異数の約2倍以内であった。ミクロゾーム及びミクロゾームとglucose-6-phosphate dehydrogenaseを用いると、活性はそれぞれS9を用いた場合の40-60%及び60-70%の活性を示した。ミクロゾームと上清を合わせると、活性はS9の活性にはほぼ一致した。S9を水浴上で加熱処理すると活性化は阻害され、またこれらの活性化反応はNADP⁺を必要とした。したがって、活性化反応は主としてミクロゾームに局在し、補酵素としてNADP⁺を要求した。

雄性ラット、ハムスター及びマウス肝S9を用いたときのP-450誘導剤の影響をTable 1-6に示した。3種動物においてPCB又はPB処置することによって変異原活性は顕著に増加し、BHPとDHPHPも明らかな活性を示した。これに対して、MC処置ではいずれの場合も全く効果が認められなかった。

つぎにPCB処置動物を用いて、補酵素要求性とP-450阻害剤の影響を検討した(Table 1-7)。NADP⁺を反応混液から除くと、BOP(35-45%の減少)とHPOP以外の変異原活性はほぼ完全に消失した。一酸化炭素気相中でのプレインキュベーションも変異原活性を顕著に抑制した。metyrapone 1 mMをS9に添加すると、32-92%の阻害が認められ、PB誘導した3種動物においても同様であった。これに対して、 α -naphthoflavoneはPCB又はMC処置した動物のいずれの場合も阻害作用を示さなかった。また未誘導の5種動物及びヒト肝S9により活性化されたニトロソプロパノールアミン誘導体の変異原活性に対するNADP⁺の影響は、HPOPとMOPでは最高50%の阻害が、またBOPの場合は全く阻害作用が認められなかったことを除いて、同様の結果であった。さらに、ラットとサルでの変異原活性、P-450誘導剤と阻害剤の影響における性差は全く認められなかった。肝の場合と同様に、MHPのPCB処置肺S9による活性化は、NADP⁺を除くか、一酸化炭素気相中でインキュベーションするか、又はmetyraponeを添加することによって陰性となつたが、 α -naphthoflavoneの効果は見られなかった。

Table 1-7. Effects of NADP⁺ and Inhibitors on Mutagenicity of N-Nitrosamines with Liver S9 from PCB-treated rodents

N-Nitrosamines	Species	TA100 Revertants ^{a)} /plate				
		Control ^{b)}	-NADP ⁺	+Carbon monoxide	+Metyrapone	+ α -Naphthoflavone
BHP	rat	314 (100)	9 (3)	31 (10)	60 (19)	306 (97)
	hamster	293 (100)	18 (6)	85 (29)	67 (23)	301 (103)
	mouse	133 (100)	13 (10)	25 (19)	33 (25)	137 (103)
HPOP	rat	797 (100)	151 (19)	335 (42)	311 (39)	749 (94)
	hamster	869 (100)	165 (19)	365 (42)	365 (42)	817 (94)
	mouse	468 (100)	150 (32)	243 (52)	271 (58)	454 (97)
BOP	rat	413 (100)	189 (54)	191 (55)	181 (52)	369 (106)
	hamster	346 (100)	190 (55)	201 (58)	180 (52)	336 (97)
	mouse	262 (100)	170 (65)	186 (71)	170 (65)	246 (94)
MHP	rat	871 (100)	87 (10)	305 (35)	305 (35)	819 (94)
	hamster	1745 (100)	52 (3)	733 (42)	681 (39)	1744 (100)
	mouse	861 (100)	52 (6)	413 (48)	413 (48)	862 (100)
MOP	rat	1126 (100)	113 (10)	327 (29)	282 (25)	980 (87)
	hamster	174 (100)	71 (41)	78 (45)	84 (48)	184 (106)
	mouse	651 (100)	65 (10)	169 (26)	293 (45)	671 (103)
BAP	rat	1149 (100)	34 (3)	218 (19)	218 (19)	1218 (106)
	hamster	331 (100)	43 (13)	116 (35)	149 (45)	332 (100)
	mouse	389 (100)	51 (13)	169 (51)	187 (48)	377 (97)
NDMM	rat	904 (100)	27 (3)	316 (35)	289 (32)	931 (103)
	hamster	1486 (100)	45 (3)	52 (35)	476 (32)	1575 (106)
	mouse	716 (100)	72 (10)	344 (48)	322 (45)	737 (103)
DHPHP	rat	132 (100)	30 (23)	38 (29)	38 (29)	144 (109)
	hamster	131 (100)	30 (23)	29 (22)	25 (19)	144 (110)
	mouse	131 (100)	31 (23)	25 (19)	38 (29)	135 (103)
MDHP	rat	336 (101)	64 (19)	131 (39)	118 (35)	339 (101)
	hamster	345 (100)	58 (19)	98 (32)	109 (32)	352 (102)
	mouse	307 (100)	49 (16)	80 (26)	120 (39)	306 (100)

a) Assay was carried out at the 10 mg dose level. The number of spontaneous revertants (130) was subtracted. Values in parentheses show the percentage of the control.

b) Control system contained liver S9, NADPH-generating system and phosphate buffer (pH 7.4).

Table 1-8. Effect of the Pretreatment of Rats with BHP on Mixed Function Oxidase in Rat Liver S9

	Days after a single ip injection of BHP at a dose of 3 g/kg body weight				Duration of treatment with 0.2% BHP in drinking water ^a	
	Control	1	3	6	Control	6 Weeks
P-450 content ^b (nmoles/mg protein)	0.86±0.13	0.79±0.02	0.80±0.07	0.85±0.06	0.67±0.02	0.69±0.03
Aniline Hydroxylation ^c (pmoles/mg S9 protein/min)	49±2	51± 2	54± 3	52± 2	32± 3	38± 1
Mutagenic activity ^d (TA100 revertants/plate)						
BHP	27	15	25	24	35	27
DHPHP	31	33	32	37	31	30
HPOP	353 (100)	318 (90)	371 (105)	328 (93)	349 (100)	345 (99)
BOP	187 (100)	165 (88)	199 (106)	196 (105)	234 (100)	235 (100)
MHP	326 (100)	346 (106)	332 (102)	306 (94)	310 (100)	292 (94)
MOP	103 (100)	90 (87)	85 (83)	104 (101)	117 (100)	97 (83)
BAP	237 (100)	214 (90)	230 (97)	253 (107)	307 (100)	292 (95)
NDMM	342 (100)	323 (94)	356 (104)	321 (94)	373 (100)	371 (99)
MDHP	163 (100)	175 (107)	173 (106)	163 (100)	164 (100)	171 (104)

a) Rats were killed at 12 weeks of age.

b) Microsomal cytochrome P-450 content and c) aniline hydroxylase activity in S9 fraction. Values are means and SD for 3 experiments, except for the case of liver weight (individual errors).

d) An N-nitrosamine (10 mg) was preincubated with liver S9. The number of spontaneous revertants was subtracted. Values in parentheses show the percentage of the control.

3. BHPのラットのP-450酵素に対する影響と体内動態

ラットにBHPの発癌条件である3g/kgを腹腔内投与するか、飲料水に混ぜて6週間飼育して、その肝のP-450含量、aniline水酸化活性及び9種のニトロソプロパノールアミン誘導体の変異原活性に対する影響を検討したが(Table 1-8)、両投与経路によるBHP処置はこれらに対して全く効果を示さなかった。

発癌用量の $[1-^{14}\text{C}]$ BHPをラットに腹腔内投与すると、1時間後に血中濃度がピークを示し(生物学的半減期: 3.9h)、肺、肝、腎等の標的臓器に高い放射活性が分布した。しかし、投与24時間後にはこれらの放射活性はほとんど消失した。その時の尿、糞及び呼気中への排泄はそれぞれ投与量の90.8、5.5及び3.2%であり、胆汁排泄も認められた。そこで、尿、血液及び標的臓器中の代謝産物をHPLC法で検索した。Fig. 1-2には投与3時間後の血漿(A)とその酢酸エチル抽出物(B)の代謝産物のクロマトグラムを示した。放射活性ピークは6ピーク認められ、そのうち3ピークは標品のBHP (IV)、HPOP (V)及びMHP (VI)の保持時間と一致した。

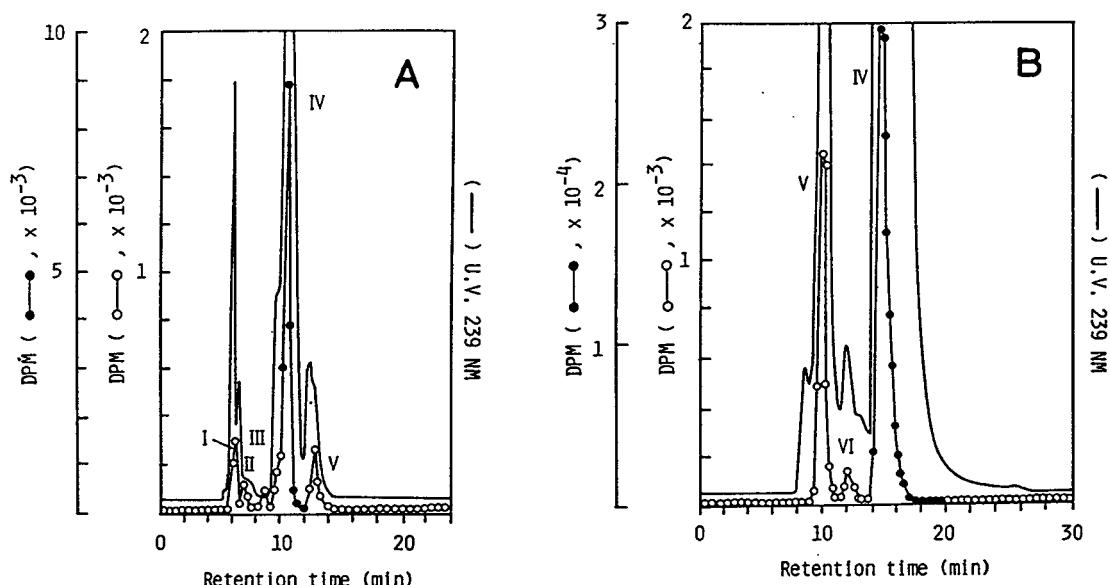


Fig. 1-2. HPLC Profiles of Metabolites in Plasma (A) of Rats Treated with $[1-^{14}\text{C}]$ BHP and Its Extracts (B). Mobile phase: A, system 1; B, system 2.

Table 1-9. Determination of BHP and Its Metabolite in plasma, tissue and urine by HPLC

Peak ^{a)}	% of total radioactivity				
	Plasma	Liver	Kidney	Lung	Urine
I	2.6	33.6	7.3	0.9	9.0
II	0.7	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
III	0.9	1.6	5.9	2.7	n. d.
IV	89.3	57.0	79.6	89.0	88.1
V	2.7	2.2	2.6	3.1	1.6
VI	0.17	0.09	0.17	0.15	0.03
VII	n. d.	n. d.	0.08	n. d.	n. d.
Total	96.4	94.5	95.6	95.9	98.7

a) Retention times of peaks IV, V, VI and VII correspond to those of BHP, HPOP, MHP and BOP, respectively, and peak I contains the glucuronides of BHP and HPOP.
n. d., not detected.

ピークIは抽出物(B)には認められることから、 β -グルクロニダーゼで加水分解後抽出したところ、BHP(ピークIの93.9%)、HPOP(3.9%)の2ピークが認められた。Table 1-9には肝、肺、腎及び24時間尿について同様に検討した結果をまとめた。BOP(VII)は腎においてのみ検出された。BHP、HPOPとこれらのグルクロン酸抱合体の尿、胆汁、糞中への排泄を経時的に検討したところ、いずれの場合も排泄放射能のほとんどがこれらにより証明された。

第4節 考 察

発癌性が既に証明されているニトロソプロパノールアミン誘導体のin vitroでの活性化を検討した。Ames法において、脂肪族及び環状ニトロアミンの変異原性を検出するには塩基置換型の試験菌株が適していること⁷⁷⁻⁷⁹⁾及びこれらの変異原性発現においても活性化能に動物種差があること⁸⁰⁾が知られている。本研究においては、塩基置換型TA100株に対して未処置の5種動物肝S9存在下において7種の化合物が活性化され、PCB又はPB誘導した各種動物

肝S9によって9種すべてのニトロソプロパノールアミン誘導体が明らかな変異原性を示した。Ames法で試料溶媒として推奨されているdimethyl sulfoxide等の有機溶媒は、ニトロソジアルキルアミン類の変異原性を顕著に阻害することが明らかとなつたことから(Table 1-1)、発癌性ニトロソプロパノールアミン誘導体の変異原性が検出されないとする報告⁶⁷⁻⁷⁰には実験条件に問題があつたことが示唆された。現在多くのニトロソアミンの存在が知られているが、肝細胞初代培養/DNA修復テストにおいてDNA損傷性を検討されている例は少ない⁸¹。ニトロソプロパノールアミン誘導体では、調べた9種のうち8種が誘導剤処置をしていないラットの肝細胞にDNA損傷性を示すことが判明した(Table 1-2)。

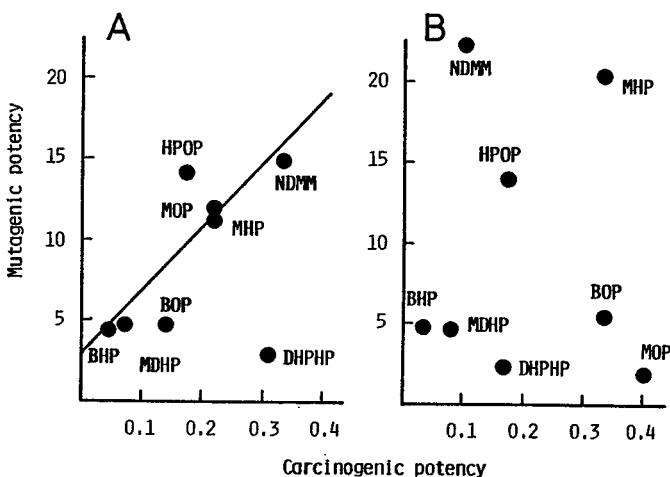


Fig. 1-3. The Relationship between Carcinogenic and Mutagenic Potencies in Rats (A) and Hamsters (B). Carcinogenic potency is expressed as the reciprocal of the dose tested (mmol/kg) that is expressed a tumor incidence of 50 % or greater by oral administration. Mutagenic potency is expressed as the number of revertants per μmol of N-nitrosamine, which was calculated from a 10-mg dose with PCB-induced S9.

ニトロソアミン類の変異原性発現においてはハムスター肝の活性化能が優れている^{82, 83}とされている。Fig. 1-3にLijinskyら^{23, 35-39}により発癌性の証明されている8種ニトロソプロパノールアミン誘導体のハムスターとラットにおける発癌活性と変異原活性との関係を図示した。発癌活性はLangenbachら⁶³の計算方法に従って、投与量の逆数で、変異原活性

はPCB処置動物肝S9存在下の10mg用量で表した。ハムスターの場合は発癌活性と変異原活性との間に相関性は認められなかった。Langenbachら⁶³⁾も4化合物についてサルモネラ菌TA1535を用いて同様に相関性の無いことを報告している。それに対して、ラットでは検出される活性もハムスターと同様に高く、DHPHPを除く7種化合物の変異原活性と発癌活性とに高い相関性が認められた($r=0.89$ 、 $p<0.05$)。これらの結果から、9種のニトロソプロパノールアミン誘導体の変異原性－発癌性相関においては動物種差の認められないことが判明した。さらにラット肝S9を用いるAmes法による試験系はこれらのニトロソプロパノールアミン誘導体の代謝的活性化を検討する上で優れていることが証明された。

発癌性物質の代謝的活性化に関与するP-450酵素の役割の研究の初期の段階においては、変異原性発現に関与する分子種は正常動物肝には少ない分子種であるMC誘導型のP4501A酵素とPB誘導型のP4502B酵素の2種類と考えられており、P4501A酵素によって活性化される例が多く報告されていた⁸⁴⁾。これらのニトロソプロパノールアミン誘導体の各種動物肝による活性化に関与する酵素はミクロゾームに局在するP-450酵素であり、そのなかでも、MC誘導型のP4501A酵素よりも、PB誘導型のP4502B酵素がいずれの動物においても主要な役割を果たすことが、Ames法において誘導剤と阻害剤を用いる実験から示唆された(Tables 1-6, 7)。さらに未誘導の動物やヒトにおいても阻害剤の影響から生体の内因性のP-450分子種の関与が推察された。またBHPが肝ミクロゾームのP-450酵素の誘導作用を持たないこと(Table 1-9)は、これらのニトロソアミン類は発癌過程における長期の摂取によっても誘導の必要としない常在成分であるP-450分子種によって活性化されること並びにBHPが単回投与によっても生体内で速やかに吸収、代謝及び排泄され、肺癌を高率に発生させることとの関連を強く示唆している。N-nitrosodiethanolamineの活性化にはalcohol dehydrogenaseの関与を示唆する報告もあるが⁸⁵⁾、これらのニトロソプロパノールアミン誘導体の活性化にP-450酵素の関与の大きいことは、これらのalcohol dehydrogenaseによる β 位の酸化よりも、P-450酵素による α 位のmonooxygenase反応の方が代謝的活性化経路として重要であることを示唆している。

ニトロソプロパノールアミンの肝外臓器S9による活性化では、MHPのPCB誘導動物の肺による活性化のみが認められた(Table 1-6)。MHP又はMOPはいくつかのニトロソプロパノールアミン誘導体の代謝物として検出されている⁸⁶⁻⁸⁹)。ニトロソプロピルアミン誘導体を投与したラット又はハムスターの標的臓器のDNA及びRNAの付加生成物の分析より、メチル化を引き起こす構造をした代謝物の生成が示唆されていること⁹⁰⁻⁹⁴)から、ニトロソプロパノールアミン誘導体の肺癌発生作用発現において、肝による代謝的活性化が必要であり、メチル誘導体MHPへ代謝が重要であることを示唆している。ニトロソプロパノールアミン誘導体による発癌性の標的臓器には動物種差の存在することが従来から指摘されていたが、代謝活性化酵素には、種差は認められず、P-450酵素によるこれらの活性化機構は類似することが考えられる。以上のように現在の段階では、癌発生の種差を説明する実験的根拠は得られていないが、一つの可能性として、肝臓において生成した中間代謝物の、標的臓器における反応の違いに起因することも考えられる。

第2章 発癌性ニトロソジアルキルアミン類の代謝的活性化における ラット肝チトクロームP4502E1酵素の役割

第1節 緒 言

N-nitrosodimethylamine (NDMA) 及び *N-nitrosodiethylamine* (NDEA) は環境中に存在する強力な発癌性物質であり、実験動物やヒトのP-450酵素によって代謝され、アルデヒドやアルコールが生成することが知られている^{5, 95)}。これらの代謝的活性化は、緒論でも述べたように、主に生体内で酵素的に α 位炭素の水酸化がおこり、非酵素的な脱アルキル化に続いて、反応性に富むアルキルジアゾヒドロキシドを経て、アルキルカチオンとなってDNA等と結合すると考えられている(Fig. 2-1)^{6, 29)}。このニトロソジアルキルアミン類が引き起こす発癌作用発現においては、最初に活性化反応を触媒する代謝酵素が最も重要と考えられており、反応に関与する酵素の解明を目的とした研究が多くなされてきた⁹⁶⁻⁹⁹⁾。しかしながら、分解生成物であるアルデヒド体を検出するニトロソジアルキルアミンの脱アルキル化反

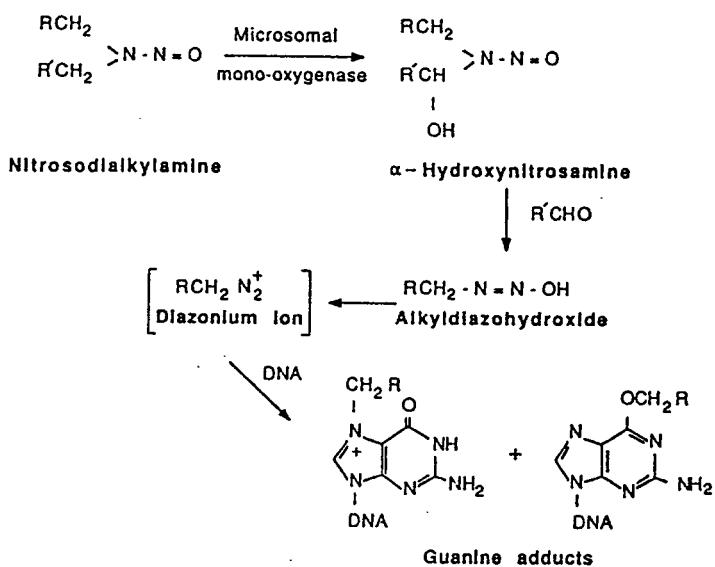


Fig. 2-1. Metabolic Activation of *N-nitrosodialkylamines*.

応についての研究は、ラット、ウサギ及びヒトの肝ミクロソームチトクロームP4502E1酵素を用いた報告が数多くあるが¹⁰⁰⁻¹⁰²)、ニトロソジアルキルアミン類のAmes法やその他の変異原性試験における生物活性が比較的弱いこともあり、これらが実際にP4502E1酵素によって活性化を受けてDNA障害を引き起こした直接的な証拠はほとんどない^{29, 96-101})。そこで、ラット肝ミクロソームP-450酵素のニトロソジアルキルアミンの活性化における役割をumuテストの新しい試験菌株*S. typhimurium* NM2009を用いて検討した。この菌株は、通常の*S. typhimurium* TA1535/pSK1002にO-acetyltransferaseの遺伝子を持つプラスミドを導入して作成されており⁵⁷)、すでに多くの研究から、ある種の発癌性芳香族アミン類のDNA障害の検出に優れた菌株であることが証明されている。なおDNA障害の強さはSOS反応の一部のumu遺伝子の発現量を β -galactosidase活性として求められる^{55, 56})。また α -ヒドロキシ体は非常に不安定であると考えられており、そのモデル化合物として酵素的加水分解で容易に α -ヒドロキシ体を生じる α -アセトキシ体についての研究²¹)が発表されているので、このモデル化合物を用いてニトロソジアルキルアミンの代謝的活性化機構の推定を行った。

第2節 材料及び実験方法

化合物：第1章で用いたニトロソアミン類のほか、Dr. Lisa A. Peterson (The American Health Foundation)より供与されたN-nitrosomethylacetoxymethylamine (NMAMA)を使用した。P-450阻害剤として用いたdiethyldithiocarbamateと4-methylpyrazoleは片山化学より購入し、2-diethylaminoethyl-2,2-diphenylvalerate (SKF-525A)はSmith, Klein, and French Laboratoriesより供与された。O-acetyltransferase阻害剤のpentachlorophenol及びacetylesteraseはそれぞれ片山化学及びSigma Chemical Co.より得た。

酵素と抗体の調製：雄性Sprague-Dawleyラット(日本クレア)を用いた。P-450誘導剤は以下

の条件で投与した。phenobarbital (PB) 80 mg/kg (ip, 0.9% NaCl)を5日間; β -naphthoflavone (BNF) 50 mg/kg (ip, オリブ油)を3日間; isosafrole 100 mg/kg (ip,

Table 2-1. Comparison of Rat and Human P-450 Enzymes

Rat P-450			Human P-450		
Nebert et al. ^{a)}	Trival name	Typical substrates	Nebert et al.	Trival name	Typical substrates
1A1	c, MC-5	benzo(a)pyrene	1A1	(P1, c)	benzo(a)pyrene
1A2	d, MC-1	arylamines	1A2	PA, P3, d	phenacetin
2A1	a, UT-F	testosterone			
2A2	a2, UT-4	ethoxycoumarin	2A6	2A6	coumarin
2B1	b, PB-4	7-ethoxycoumarin			
2B2	e, PB-5		2B6	(2B6, LM2)	7-ethoxycoumarin
2C6	k, PB-2	progesterone			
2C7	f		2C8	(mp-12)	
			2C9	human-2	tolbutamide
			2C10	MP	tolbutamide
2C11	h, UT-2	testosterone			
2C12	i, F-2				
2C13	g, UT-5	progesterone			
2D1	db1, UT-7	debrisoquine	2D6	DB, db1	debrisoquine
2E1	j, DM	nitrosamines	2E1	j, HLj	nitrosamines
3A1	pcn1	testosterone	3A3	HLP	
3A2	pcn2, PB-1	nifedipine	3A4	NF, pcn1	nifedipine
			3A5	pcn3	
			3A7	HFLa	
4A1	LA1	laurate			

a) Gene symbol from Nebert et al.¹⁵⁾

オリブ油)を3日間; dexamethasone 50 mg/kg (ip, オリブ油)を4日間; phenytoin 100 mg/kg (ip, オリブ油)を4日間; valproic acid 100 mg/kg (ip, オリブ油)を4日間; isoniazid 100 mg/kg (ip, オリブ油)を4日間; ポリ塩化ピフェニル (PCB、kanechlor 500) 500 mg/kg (ip, オリブ油)を1回。acetone及びethanolはそれぞれ5%(V/V)及び15%(V/V)水溶液を飲料水として6日間与え、別に絶食(3日間)群も設けた。肝ミクロソームはGuengerich⁷⁵⁾の方法に従って調製し、-80°Cに保存した。P-450酵素の精製¹⁰³⁾、命名¹⁵⁾及び抗体の調製¹⁰⁴⁾は常法により行った。ウサギ肝NADPH-P-450還元酵素及びチトクロームb₅はそれぞれYasukochiとMasters¹⁰⁵⁾及び谷口ら¹⁰⁶⁾の方法により精製した。Table 2-1に本研究で用いたラットの精製P-450酵素の慣用名とNebertらの遺伝子分類による命名並びに典型的な基質についてヒトP-450酵素と対比してまとめた。

NDMAとNDEAのP-450による代謝的活性化: NDMAとNDEAのラット肝P-450による活性化は通常の試験菌株S. typhimurium TA1535/pSK1002ではなく、この菌にO-acetyltransferase遺伝子を導入して新たに調製したS. typhimurium NM2009を用いた。Fig. 2-2にumuテストの実験方法の概略を示した。P-450酵素の酵素源^{11, 12)}として、菌培養液存在下に肝ミクロソームを最終濃度2 μg/mlとして用いた。精製P-450酵素を用いる再構成系では、ミクロソームの代わりに2 nM P-450、50 nM NADPH-P-450還元酵素 及び7.5 μM L-α-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC)を用い、チトクロームb₅の影響も調べた。NDMA又はNDEA 2 mMとともに2時間反応後、発現するβ-galactosidase活性をMiller¹⁰⁷⁾の方法に従って測定した。活性化された化合物によるumu遺伝子の誘導はunit(β-galactosidase activity)/min/mg protein(又はnmol P-450)で表した。NDMAの脱メチル化反応はNash¹⁰⁸⁾の方法により行った。

NMAMAのacetylesteraseによるSOS反応の誘導: NMAMAのacetylesteraseによる活性化はO-acetyltransferase の欠損株である S. typhimurium NM2000⁵⁷⁾を用い、S. typhimurium

Assay Method

Incubation mixture (final volume, 1.0 ml)

Liver microsomes -----	0.002	mg
or Reconstituted system		
P-450 -----	2	pmol
NADPH P-450 reductase ---	0.5	unit
phospholipid -----	5	μg
NADPH-generating system		
NADP ⁺ -----	0.125	μmol
glucose-6-phosphate-----	1.25	μmol
G-6-P dehydrogenase -----	0.25	unit
Potassium phosphate		
buffer (pH 7.4) -----	50	μmol
Substrate -----	2	μmol
S. typhimurium NM2009 (OD at 600nm, ~0.3)-----	0.75	ml

Incubate at 37° for 120 min

Terminate the reaction in ice-water bath

Measure the β -galactosidase activity and bacterial cell number (density at 600nm)

Calculation

$$\beta\text{-galactosidase activity} = \frac{1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550})}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t: reaction time (min), in this case t=15

v: dilution , in this case v=0.1

Specific gene expression by activated mutagens is:

umu units/min/mg protein or nmol P-450

Fig. 2-2. Assay Method of Activation of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrosodiethylamine to Products Genotoxic in Salmonella typhimurium NM2009

TA1535/pSK1002とS. typhimurium NM2009と三者で比較して調べた。標準的な反応条件は、菌培養液存在下に0.5 mM NMAMAとacetylesterase 0.01 mg/mlとした。2時間の反応の後、umu遺伝子の発現量を上記と同様に調べた。

第3節 結 果

1. NDMAとNDEAのラット肝ミクロソームによる活性化

NDMAとNDEAを未処置又はisoniazid処置したラット肝ミクロソームとNADPH産生系と試験菌株存在下にインキュベーションし、umu遺伝子の発現を調べた。NDMAとNDEAは代謝的活性化を受けてのみumu遺伝子発現を誘導した。(Fig. 2-2)。基質濃度は2 mMで飽和に達し、ミク

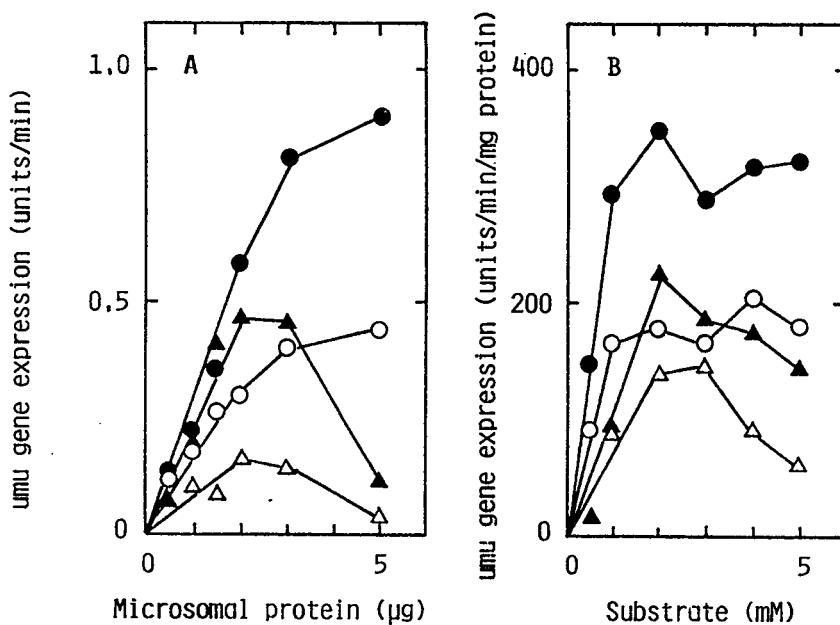


Fig. 2-2. Effects of Concentrations of Microsomal Protein (A) and Substrate (B) on the Metabolic Activation of NDMA (circles) and NDEA (triangles) by Liver Microsomes from Untreated Rats (open symbols) and from Rats treated with Isoniazid (closed symbols). The basic incubation mixture was used (see Materials and Methods): in A, the substrate concentration was 2 mM; in B, 2 μg of microsomal protein was used.

ロゾーム量は3μgまで活性化に上昇が見られた。しかし、NDEAの活性はミクロゾーム量が多いと低下した。そこで、以下の実験では、基質濃度を2 mM、ミクロゾーム量を2μgとした。またNDMAとNDEAの活性は未処置ラットよりもisoniazid処置ミクロゾームの方が高かった。見かけのNDMAの活性化のKm値はこれらのミクロゾームにおいて0.7-0.8 mMであった。

種々のP-450誘導剤で処置したラット肝ミクロゾームのP-450含量及びNDMAとNDEAの活性化並びにNDMAの脱メチル化及びアニリン水酸化をTable 2-2に示した。総P-450含量はPCB、PB、BNF、isosafroleで強く誘導され、またdexamethasone、ethanol、絶食、phenytoin及びvalproic acidによってもかなり誘導された。これらのミクロゾームのうち、NDMAの活性化はisoniazid、ethanol、acetone処置及び絶食ラットにおいて最も強く誘導された。またPB、

Table 2-2. Cytochrome P-450 Contents and Monooxygenase Activities in Liver Microsomes of rats^{a)}

Treatment of rats	P-450 (nmol/mg protein)	Activation		NDMA N-demethyl- ation ^{b)} (nmol/min/ mg protein)	Aniline p-hydroxy- lation ^{b)} (nmol/min/ mg protein)
		NDMA	NDEA		
Untreated	0.72	139	128	2.00	2.41
PB	1.46	185	128	2.00	4.77
BNF	1.16	83	89	2.84	4.28
Isosafrole	1.10	94	89	3.26	4.87
PCB	2.07	185	106	4.52	9.25
Dexamethasone	1.01	110	117	2.42	5.85
Isoniazid	0.79	278	161	6.20	8.56
Ethanol	0.96	280	183	3.36	6.30
Acetone	0.86	278	189	4.94	9.94
Starvation	1.03	333	200	4.52	7.04
Phenytoin	0.95	174	150	2.10	3.49
Valproic acid	0.95	67	133	1.89	2.90

a) Each value represents mean of measurements made with three rats; the standard deviations were <15 % of the mean values.

b) Monooxygenase activities were determined with 2 mM NDMA (N-demethylation) or 5 mM aniline (p-hydroxylation) with a protein concentration of 0.5 mg protein/ml.

PCB及びphenytoinによっても誘導されたが、BNF、isosafrole及びvalproic acidでは活性が低下した。isoniazid、ethanol、acetone処置及び絶食によってNDEAの活性化も誘導された。NDMA脱メチル化反応とaniline水酸化もisoniazid、ethanol、acetone処置及び絶食によって誘導された。PCB、isosafrole処置もNDMA脱メチル化活性を誘導し、PB、BNF、isosafrole、PCB及びphenytoinもaniline水酸化活性を誘導した。

種々のミクロゾームのこれらの活性間の相関性を調べた(Table 2-2)。肝ミクロゾームによるNDMAの活性化は、それぞれNDEAの活性化($r=0.87$)、NDMA脱メチル化($r=0.69$)及びaniline水酸化($r=0.68$)と相関性が認められた。種々ミクロゾームのNDMA脱メチル化活性とaniline水酸化($r=0.88$)の間にも良好な相関性が認められた。

Table 2-3. Correlations among P450 Contents and the Monooxygenase Activities in Liver Microsomes of Rats Treated with Various Chemicals

	Correlation coefficient (r)			
	NDMA activation	NDEA activation	NDMA N-demethylation	Aniline p-hydroxylation
P-450	-0.11	-0.42	0.05	0.30
NDMA activation		0.87	0.69	0.67
NDEA activation			0.43	0.40
NDMA N-demethylation				0.88

2. P-450抗体と阻害剤の影響

これらの誘導剤の結果は、NDMA脱メチル化やaniline水酸化反応と同様に、NDMAとNDEAの活性化反応にはラットP4502E1酵素が主要な役割を果たしていることを示唆している。このことをさらに確認する目的で、ラットP4502E1酵素の特異抗体の影響を調べた(Fig. 2-3)。ラットP4502E1抗体を含む血清を加えると、isoniazid処置肝ミクロゾームによるNDMAの活性化、NDMA脱メチル化及びaniline水酸化活性は殆ど完全に阻害された。未処置ミクロゾーム

ではP4502E1抗体の影響は弱かった。

P4502E1抗体はNDEAのisoniazid処置ミクロソームの活性化も阻害した(Table 2-3)。しかし、この抗体の阻害作用は未処置ラット肝ミクロソームでは弱かった。最近NDEAの活性化にP4502A酵素の関与を示唆する報告があるが¹⁰⁹⁾、P4502A1抗体は未処置ミクロソームの活性化に対して調べた条件において影響を及ぼさなかった。

4-methylpyrazoleとdiethyldithiocarbamateはラット、ウサギ及びヒトの肝ミクロソームP4502E1酵素が触媒する代謝反応の比較的選択性的な阻害剤である^{101, 110)}。これらのNDMAとNDEAの活性化代謝反応に対する影響を調べた(Fig. 2-4)。isoniazid処置ラットではNDMAの活性化と脱メチル化は4-methylpyrazole及びdiethyldithiocarbamateに顕著に阻害された。未処置ラットに対しては、阻害作用はいずれも50%以下であった。

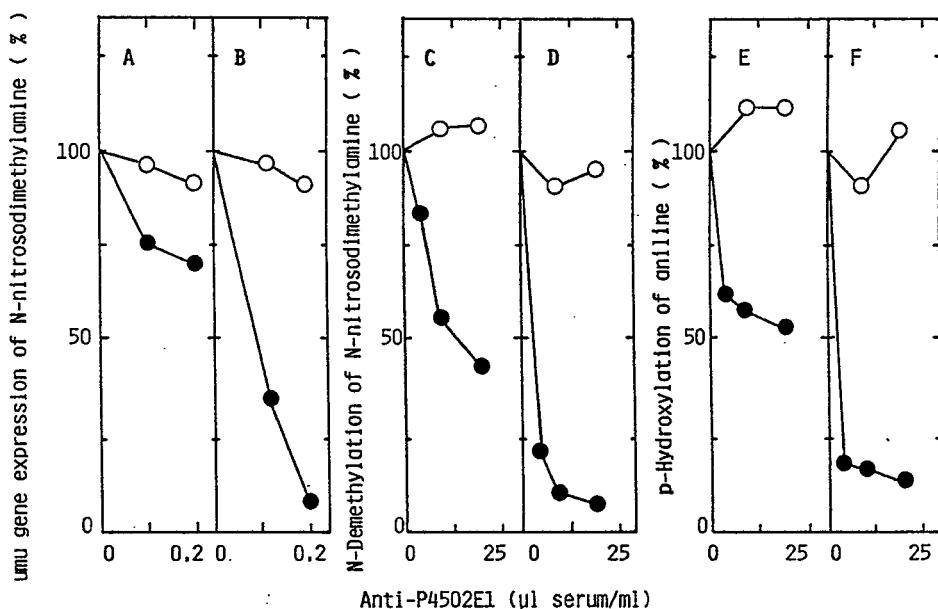


Fig. 2-3. Effects of Anti-P4502E1 on NDMA Activation, NDMA N-Demethylation, and Aniline p-Hydroxylation by Liver Microsomes from Untreated Rats (A, C, E) and from Rats Treated with Isoniazid (B, D, F). The control activities in the absence of antisera were given in Table 2-2. Incubations were done in the presence of preimmune sera (○) or anti-rat P4502E1 sera (●).

Table 2-4. Effects of Antibodies on the Activation of NDEA by Rat Liver Microsomes^{a)}

Serum	Activation of NDEA (μ mo units/min/mg protein)			
	Untreated rats (%)	Isoniazid treated rats (%)		
None	175±50 (100)	261±56 (100)		
Preimmune	180±41 (103)	244±40 (94)		
Anti P4502A1	195±20 (111)	—		
Anti P4502E1	129±32 (74)	11±6 (2)		

^{a)}Antibodies were added at a concentration of 0.2 μ l serum/ml of incubation mixture. Values represent means of duplicate determinations and S.D. (range).

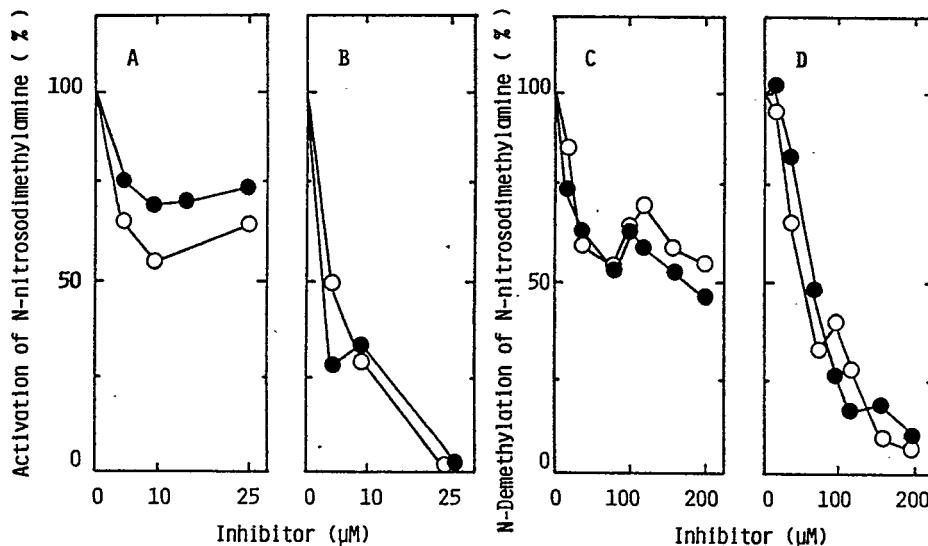


Fig. 2-4. Effects of 4-Methylpyrazole (○) and Diethyldithiocarbamate (●) on the Activation of NDMA and NDMA N-Demethylation by Liver Microsomes from Untreated Rats (A,C) and from Rats Treated with Isoniazid (B,D). The control activities in the absence of inhibitors are shown in Table 2-2.

NDMAとNDEAの活性化に対する種々のP-450阻害剤の影響をTable 2-4に示した。未処置ラットでは、SKF-525Aとpiperonyl butoxideは25 μM用量において弱い阻害作用を示した。isoniazid処置ラットによるNDMAの活性化はSKF-525Aによって約70%阻害されたが、この濃度において4-methylpyrazoleとdiethyldithiocarbamateによってNDMAの活性化が95%阻害された。NDEAもNDMAと同様に、肝ミクロソームによる活性化はdiethyldithiocarbamateによって顕著に阻害されたが、4-methylpyrazoleの阻害作用は弱かった。

Table 2-5. Effect of P-450 Inhibitors on the Activation of NDMA and NDEA by Rat Liver Microsomes

Inhibitors	Activation (μμμ units/min/mg protein)			
	NDMA		NDEA	
	Control rats (%)	Isoniazid-treated rats (%)	Control rats (%)	Isoniazid-treated rats (%)
None	152 (100)	250 (100)	122 (100)	218 (100)
Metyrapone	135 (89)	215 (86)	—	—
α-Naphthoflavone	175 (115)	295 (118)	—	—
SKF-525A	93 (61)	73 (29)	—	—
Piperonyl butoxide	70 (46)	143 (57)	—	—
4-Methylpyrazole	99 (65)	3 (1)	97 (81)	155 (71)
Diethyldithiocarbamate	114 (75)	6 (2)	56 (45)	8 (20)

Values represent means of duplicate determinations in the presence of 25 μM concentrations of P450 inhibitors.

2. 精製ラットP-450酵素による活性化の再構成

NDMAのP4502E1酵素による活性化の再構成をNADPH産生系の共存下NADPH-P-450還元酵素とDLPCを用いて行った(Fig 2-5)。活性は精製P4502E1酵素量に依存した。次に種々の精製P-450酵素2pmolを用いて再構成を行った(Table 2-5)。NDMAの活性化においてはP4502E1酵素が最も高い活性を示し、つづいてP4501A2, P4502B1及びP4501A1であった。他の分子種

(P4502A2とP4502C11)もNDMAの活性化を触媒したが、P4503A2酵素の活性は非常に低かった。NDEAの活性化もP4502E1とP4501A2が速やかに触媒し、ついでP4502B1、P4502D1及びP4501A1の順であった。

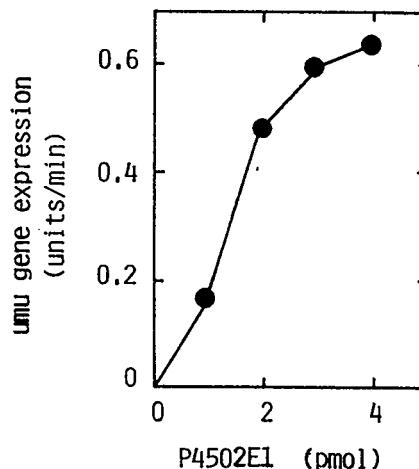


Fig. 2-5. Activation of NDMA by a Reconstituted System Containing Rat P4502E1.

Table 2-6. Metabolic Activation of NDMA and NDEA by Reconstituted Monooxygenase Systems Containing Various Forms of Rat P450

P-450	Activation (umu units/min/nmol P450)	
	NDMA	NDEA
1A1	126 ± 39	67 ± 19
1A2	182 ± 42	128 ± 42
2A2	62 ± 13	11 ± 6
2B1	140 ± 55	83 ± 24
2B2	175 ± 43	28 ± 10
2C11	91 ± 6	17 ± 5
2D1	94 ± 17	83 ± 31
2E1	217 ± 21	156 ± 22
3A2	21 ± 4	44 ± 20

Activation of NDMA and NDEA in the presence of *S. typhimurium* NM2009 was determined as described in Methods.

Table 2-7. Effects of Cytochrome b₅ (b₅) on the Activation of NDMA and NDEA by Reconstituted System Containing Rat P4502E1^a

Activation of NDMA and NDEA (umu units/min/nmol P450)					
	NDMA (%)		NDEA (%)		
Without b ₅	217 ± 23	-	167 ± 19	-	
With b ₅ (4 nM)	288 ± 19 (133)		233 ± 33 (140)		
b ₅ (8 nM)	326 ± 31 (151)		265 ± 26 (159)		

a) Rabbit liver cytochrome b₅ was added to a reconstituted system containing 2 nM P4502E1. Value represents mean of triplicate determinations and S.D.

Levinら¹¹¹と船江ら¹¹²はNDMAの脱メチル化反応においてラットP4502E1酵素の再構成系にチトクロームb₅を加えると活性の促進作用がみられることを報告している。そこでNDMAとNDEAの再構成系における活性化に対するチトクロームb₅の影響を調べた(Table 2-6)。両方の反応はチトクロームb₅を加えることによって活性が上昇した。促進効果が最大となったのはP-450とのモル比が4の条件であり、b₅量を増やすと活性は低下した。

4. NMAMAのacetylersterase加水分解によるSOS反応の誘導

NMAMAはニトロソジアルキルアミン類の活性化機構研究のためのモデル化合物であり²¹、acetylersteraseによって加水分解されてα-ヒドロキシ体となり、反応性に富むアルキルジアゾヒドロキシドが生じる。ニトロソジアルキルアミンの活性化がO-acetyltransferaseを導入した試験菌株で認められたので、NMAMAがエステル結合切断後にO-acetyltransferaseによって更に活性化されうるという仮説を検証するため、NMAMAのacetylersteraseによる活性化を調べた。試験菌株にはO-acetyltransferase欠損株であるS. typhimurium NM2000も用い

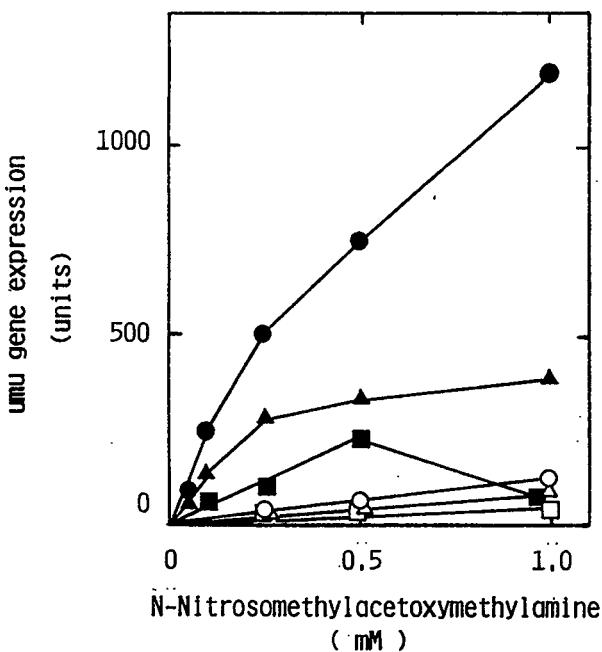


Fig. 2-6. Genotoxic Activation of NMAMA by Acetylesterase in *S. Typhimurium* NM2009 (○, ●), *S. Typhimurium* TA1535/pSK1002 (△, ▲) and *S. Typhimurium* NM2000 (□, ■). Incubations were carried out in the presence (●, ▲, ■) or absence (○, △, □) of 0.01 mg/ml of acetylesterase, and induced umu gene expression was determined. Data represent the umu units/ml of incubation mixture.

て、TA1535/pSK1002及びNM2009株と比較した(Fig. 2-6)。acetylesterase非存在下では、NMAMAは用いた菌株すべてに弱いSOS反応を誘導したが、acetylesterase 0.01mgを反応混液に加えるといずれも強い活性を示した。最も強い活性が得られたのは、予想どおりNM2009株であり、ついでTA1535/pSK1002株、NM2000株の順であった。pentachlorophenolは0-acetyltransferaseの阻害剤である¹¹³⁾。この阻害剤のacetylesteraseと試験菌株存在下でのNMAMAの活性化に対する影響を調べた(Fig. 2-7)。*S. typhimurium* NM2009株を用いる系では、pentachlorophenolを加えることにより、活性が約50%阻害された。それに対して、0-acetyltransferase欠損株(NM2000株)ではNMAMAの活性の阻害作用は認められなかった。

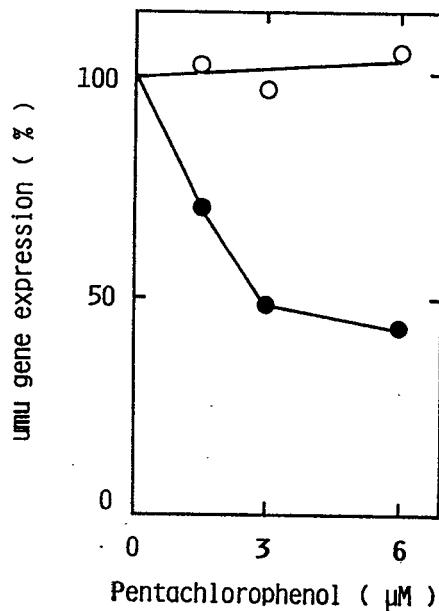


Fig. 2-7. Effects of Pentachlorophenol on the Activation of NMAMA by acetylesterase in *S. Typhimurium* NM2009 (●) and in *S. Typhimurium* NM2000 (○). Control incubations were done with 0.5 mM NMAMA and 0.01 mg/ml of acetylesterase in the presence of the tester strains; the activities in the absence of pentachlorophenol are given in Fig. 2-6.

第4節 考 察

強力な発癌性ニトロソジアルキルアミンのNDMAとNDEAの代謝的活性化におけるラットP-450酵素の役割を調べた。P-450酵素によって代謝された生成物のDNA損傷性を新しく開発された試験菌株*S. typhimurium* NM2009を用いて検出した。本菌株は*S. typhimurium* TA1535/pSK1002にO-acetyltransferase遺伝子を導入して調製された⁵⁷⁾ので、発癌性アリルアミン類やニトロアレン類等に非常に高感度である。今までに多くの種類のニトロソアミン類のSOS反応の誘導についてTA1535/pSK1002株又はNM2000株を用いて検討されてきたが、明らかな活性は検出されていなかった¹⁶⁾。本研究でのニトロソアミン類のSOS反応の誘導はア

セチル転移酵素活性が極めて高い検出系を利用したことによって認められた。NDMAとNDEAのumu活性は2-aminofluorene等の発癌性芳香族アミン程高くはないが、発癌性芳香族炭化水素のジヒドロジロール体の活性にほぼ相当している¹⁶⁾。ニトロソアミン類はサルモネラ菌の変異を引き起こし得るが、その生物活性は全般に弱いことが報告されている^{114, 115)}。実際に、このような系での低い変異原性の結果から、高率に代謝されるNDMAの脱メチル化反応はこの化合物の変異原性発現に関係しないと結論づける報告もあるが¹¹⁶⁾、その一方で、DNAのメチル化はNDMAの脱メチル化に関連していることが強く示唆されている¹¹⁷⁾。したがって、サルモネラ菌を用いた高感度の変異原性試験はニトロソジアルキルアミン類の活性化の研究において非常に有用性があることが判明した。

新しい*S. typhimurium* NM2009株がNDMAとNDEAの活性代謝物に高い感受性を示す原因是現在のところ不明である。ニトロソアミン類の代謝経路は、最初にP-450酵素によってアルキル基が水酸化され、アルキルジアゾヒドロキシドが生成し、引き続いて極めて反応性の高いジアゾニウムイオンを経て生体内の高分子と結合する^{6, 29)}(実際のカルボニウムイオンは溶液中ではほとんど単独で存在し得ない)¹¹⁸⁾。ニトロソアミン類の活性化にアセチル化反応が関与するという報告はないが、NDMAとNDEAが0-acetyltransferaseを過剰に発現させた菌株で高いSOS反応を誘導する機構のひとつには、アルキルジアゾヒドロキシドが0-acetyltransferaseによってアセチル化を受け、続いてアセチル基を失い、非常に反応性に富むジアゾニウムイオン、更にカルボニウムイオンとなると考えられる(Fig. 2-8)。この仮説を検証するために、acetylesteraseによって酵素的加水分解を受けて α -ヒドロキシ体に活性化され、アルキルジアゾヒドロキシドとなって、種々の系で変異原性を示すことが知られているモデル化合物NMAMA²¹⁾を用いて検討した。その結果、NMAMAはacetylesteraseによって活性化され、サルモネラ菌に対してSOS反応を誘導し、更に0-acetyltransferaseを過剰に発現させた*S. typhimurium* NM2009株を用いて検出された極めて高いSOS反応の活性は、0-acetyltransferaseの阻害剤pentachlorophenolによって約50%阻害された(Figs. 2-7, 8)。し

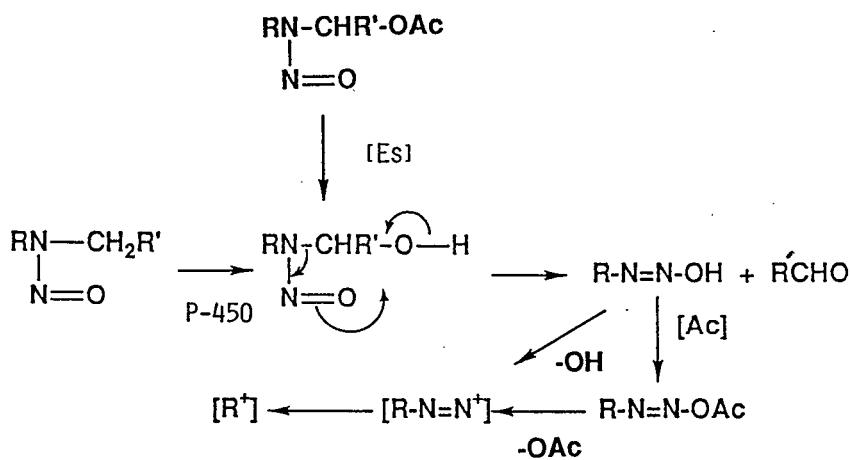


Fig. 2-8. Postulated Mechanism of Activation of *N*-Nitrosodialkylamine.
[Ac], 0-acetyltransferase; [Es], acetylesterase.

かし、0-acetyltransferase欠損株 *S. typhimurium* NM2000においてもNMAMAはSOS反応を誘導したことから、NMAMAの活性化反応においてアルキルジアゾヒドロキシドのアセチル化以外の代謝経路も否定できない。この反応中間体においては、水酸基よりもアセチル基を遊離することによって、アルキルジアゾヒドロキシドの分解をより促進するものと推察される。

本研究で得られた以下に述べる結果から、強力な発癌性物質NDMAとNDEAはラットP4502E1酵素によって *S. typhimurium* NM2009においてDNA障害を引き起こす代謝物に活性化されることが判明した。はじめに、両化合物は肝ミクロソームによって活性化され、これらの活性はラットをP4502E酵素の誘導剤であるisoniazid、ethanol、acetone及び絶食^{103, 119)}によって誘導された。NDMAは通常肝ミクロソームによってこの試験系においてNDEAよりも強く活性化され、このことは、過去のAmes/ミクロソームテストにおいて報告されている知見と一致した^{117, 120)}。2番目にNDMAとNDEAのisoniazid処理ラット肝ミクロソームによる活性化は、

ラットP4502E1抗体並びに4-methylpyrazoleやdiethyldithiocarbamate等のP4502E1酵素阻害剤によって阻害された。未処置のラットではP4502E1抗体とこれらの阻害剤によって部分的は阻害が認められたことは、ミクロゾーム中の他のP-450分子種もこれらの活性化反応を触媒しうることを支持している。最後に、精製P-450酵素を用いるNDMAとNDEAの再構成系において、P4502E1酵素が最も高い活性を示し、これらの活性はチトクロームb₅を加えることによって促進された。

本実験系におけるミクロゾームタンパク量と基質濃度は、今までに報告されたAmes法による変異原試験の条件^{114, 115, 117)}にくらべて極めて低い。反応混液中のミクロゾームタンパク量及び基質濃度の至適条件はそれぞれ2μg/ml及び2 mMであった(Fig. 2-2)。未処置及びisoniazid処置ラット肝ミクロゾームにおけるNDMAの活性化反応のみかけのK_m値は約0.8 mMであった。Yangのグループはラット肝ミクロゾームにおけるNDMA及びNDEAの脱アルキル化反応はそれぞれ15-20 μM及び40 μMのK_m値をもつP-450酵素が関与することを報告している^{96, 97)}。しかしながら、肝ミクロゾームによる活性化と脱アルキル化反応では反応条件が異なることが考えられる。

最近、ラットとヒトのP4502A酵素がNDMAの活性化には関与しないが、NDEAの活性化に関与するという知見がいくつかの研究室から報告された^{109, 120, 121)}。しかしながら、本研究では、NDEAの活性化に対してP4502A1抗体が阻害しないこと(Table 2-4)、並びに再構成系においてラットP4502A2酵素の活性が低かったこと(Table 2-6)から、NDEAの活性化反応においてはラットP4502A1又は2A2酵素の寄与は少ないことが示唆された。

結論として、本研究では、NDMAとNDEAはラット肝ミクロゾームのP4502E1によってDNA障害を引き起こす代謝物に活性化される直接的な証明を行った。本研究で用いたミクロゾームタンパク量は過去の報告と比較しても極めて低く、ニトロソジアルキルアミン類による化学発癌におけるP4502E1酵素の重要性が判明した。このサルモネラ菌の実験系は高い感受性を持ち、ニトロソアミン類の活性化研究に有用である。また、本研究の結果、ニトロソジアルキ

ルアミン類の活性化経路のひとつとして、反応中間体アルキルジアゾヒドロキシドがアセチル化を受けることによって更に反応性に富むジアゾニウムイオンを効率よく生成する経路が存在することがはじめて示唆された。

第3章 肝癌誘発物質3-methoxy-4-aminoazobenzeneのラットとヒトの種々のP-450酵素による活性化

第1節 緒 言

多くの発癌性物質は肝ミクロゾームチトクロームP-450酵素によって活性化され、発癌性、変異原性又はDNA損傷性を発揮する^{4, 5)}。発癌性物質の代謝的活性化においてはそれぞれ特異的P-450分子種が関与することが明らかにされている¹⁰⁻¹²⁾。例えば、ラット及びヒト肝ミクロゾームではP4501A1と1A2がいくつかの発癌性アリルアミンや芳香族炭化水素の代謝的活性化及びジニトロピレン類の不活性化において重要な役割をはたしている^{10, 16, 17)}。しかしながら、最近の研究では、発癌性物質の代謝的活性化に関与するP-450分子種に実験動物とヒトとの間で種差が見られる例も発見されており^{9, 16-18)}、ヒトではP4503A酵素と1A酵素の重要性が指摘されている。強肝癌誘発物質のアミノアゾ色素に分類される3-methoxy-4-aminoazobenzene (3-MeO-AAB) はP-450酵素によって活性化され、変異原性を発揮することが報告されている⁵¹⁾。出川らは^{51, 52)} 3-MeO-AABがラット肝ミクロゾームのP4501A2酵素を選択的かつ強力に誘導することも報告しており、3-MeO-AABは自ら誘導した特異的P-450分子種の基質となって活性化されうるものと考えられている。しかしながら、3-MeO-AABをはじめとして他のアミノアゾ色素の活性化に関与するP-450分子種はほとんど検討されておらず、ヒトでの知見は全くない。そこで、3-MeO-AABの活性化に関与するラットとヒトのP-450分子種について *S. typhimurium* TA1535/pSK1002を用いてSOS遺伝子発現を指標に検討した。

第2節 材料及び実験方法

化合物：3-MeO-AABは東北大学薬学部出川雅邦博士より供与された。

酵素と抗体の調製：ヒトの肝のサンプルは肝切除を受けた癌患者8人(HL-1、HL-2、HL-3、HL-4、HL-5、HL-6、HL-SM、HL-ST)及び事故死臓器提供者(HL-17、HL-28)より得た。ヒトと各種誘導剤処置したラットの肝ミクロゾームは第2章と同様に調製した。ラットとヒトのP-450分子種の精製と命名は常法により行った^{10, 11, 15, 100, 103, 104, 122, 123})。ヒトとラットのP-450酵素の命名法については第2章第2節に示した。ヒトのP4501A2はphenacetin脱エチル化活性を指標に精製されたP-450_{PA}である¹²²)。ヒトP4502E1はNDMAの脱メチル化反応やその他の多くの低分子化合物を代謝するP-450_jである¹⁰⁰)。ヒトP4503A4はnifedipine酸化活性を指標に精製され、cDNAクローンの発現によっても確認されたP-450_{NF}である^{123, 124})。日本人の肝臓からS-mephenytoin 4'-水酸化活性を指標に精製され、P450_{MP}と命名された酵素は2C酵素に分類され、遺伝的多型が存在することが知られているが、現在ヒトにおいて確認されているP4502C酵素の遺伝子である2C8、2C9、2C10との対応関係が未だ整理されていない^{125, 126})。そこで、本研究で用いたヒトのP4502C酵素はNebertらの命名法によらず、慣用名P450_{MP}を使うこととした。これらの酵素の特異抗体は、ウサギを用いて各精製P-450酵素の抗血清を得て、IgG画分を調製し、P-450抗体とした^{104, 123})。

3-MeO-AABの活性化：S. typhimurium TA1535/pSK1002を主に用い、第2章に準じて行った。すなわち、標準的条件は、菌培養液共存下にラット又はヒト肝ミクロゾームを最終濃度0.01mg/mlとした。再構成系ではミクロゾームの代わりに0.01μM P-450、0.05μM NADPH-P-450還元酵素及び7.5μM dilauroylphosphatidylcholine (DLPC)を用いた。また今岡らの再構成の条件¹²⁷)に準じて、DLPC溶液の代わりにDLPC、dioleoylphosphatidylcholine及びphosphatidylserine(1:1:1)のリン脂質の混合物10 μgを用い、さらにコール酸100μgとラットチトクロームb₅を最終濃度0.02μMとした条件でも再構成を行った。インキュベーションは10 mM 3-MeO-AABを120分間反応させた後、第2章と同様にβ-galactosidase活性を求めた。

その他の実験方法：benzo(a)pyrene水酸化活性及び7-ethoxyresorufin脱エチル化活性は NebertとGelboin¹²⁸⁾及びPohlとFouts¹²⁹⁾の方法に準じて測定した。aminopyrine、aniline、benzphetamine、NDMA、erythromycin、ethylmorphine及びpentoxysresorufinを基質として、ミクロゾームのモノオキシゲナーゼ活性を測定した^{75, 108, 129)}。ヒトとラット肝ミクロゾーム中のP-450分子種の定量はSDS-PAGE/免疫化学法(ウエスタンプロティング)によって行った。

第3節 結 果

1. ラット肝ミクロゾームによる3-MeO-AABの活性化

未処置及び種々の誘導剤処置ラット肝ミクロゾームと3-MeO-AABをNADPH産生系存在下にインキュベーションしてS. typhimurium TA1535/pSK1002におけるDNA障害を β -galactosidase活性として測定した。用いた種々の肝ミクロゾームはP-450含量及び各種モノオキシゲナーゼ活性を測定して特異的P-450分子種が誘導されていることを確認した(Table 3-1)。PBはpentoxysresorufin脱エチル化活性、aminopyrine及びbenzphetamine脱メチル化活性を最も強く誘導し、BNFはbenzo(a)pyrene水酸化活性と7-ethoxyresorufin脱エチル化活性を、並びにdexamethasoneはaminopyrine、erythromycin及びethylmorphine脱メチル化活性を強く誘導した。第2章に示したように、NDMA脱メチル化及びaniline水酸化活性は、isoniazid、ethanol、acetone及び絶食によって誘導された。phenytoinもbenzphetamineとethylmorphine脱メチル化を誘導した。

3-MeO-AABの未処置及びPB処置ラット肝ミクロゾームによる活性化におけるタンパク量と基質濃度の影響をFig. 3-1に示した。 $\mu\mu$ 遺伝子の誘導は、タンパク量が0.01mg/mlまで増加し、活性は基質濃度0.02mM以上では飽和した。

Table 3-1. Cytochrome P-450 Contents and Monooxygenase Activities in Liver Microsomes of Rats^{a)}

Treatment of rats	P-450 (nmol/ mg protein)	Monooxygenase activity (product nmol/min/mg protein)							
		Benzo(a)- pyrene	Ethoxy- resorufin	Pentoxy- resorfin	Benz- phetamine	Ethyl- morphine	Amino- pyrine	Erythro- mycin	NDMA
Untreated	0.62	7.41	27.1	0.065	4.93	4.73	6.59	0.81	1.89
PB	2.19	19.4	59.0	0.325	18.66	21.0	34.4	5.50	4.32
BNF	1.41	32.4	333	0.056	3.84	3.47	8.57	0.88	3.44
Dexamathasone	1.00	9.90	20.7	0.114	6.78	11.8	24.5	6.02	2.34
Isoniazid	1.04	3.27	20.3	0.048	6.24	5.78	9.08	2.62	4.04
Ethanol	1.08	5.65	45.1	0.074	5.50	5.32	9.15	2.73	4.25
Actone	1.10	8.60	35.8	0.119	6.78	5.11	10.9	1.68	4.80
Starvation	0.85	12.3	71.7	0.072	3.52	7.84	11.2	2.49	1.84
Phenytoin	1.10	10.5	60.2	0.263	12.42	11.6	16.8	2.07	1.93
Valproic acid	0.88	10.3	44.4	0.173	9.31	7.84	11.6	2.00	2.57
									4.03

a) Each value represents mean of measurements made with three rats; the standard deviations were <15 % of the mean values.

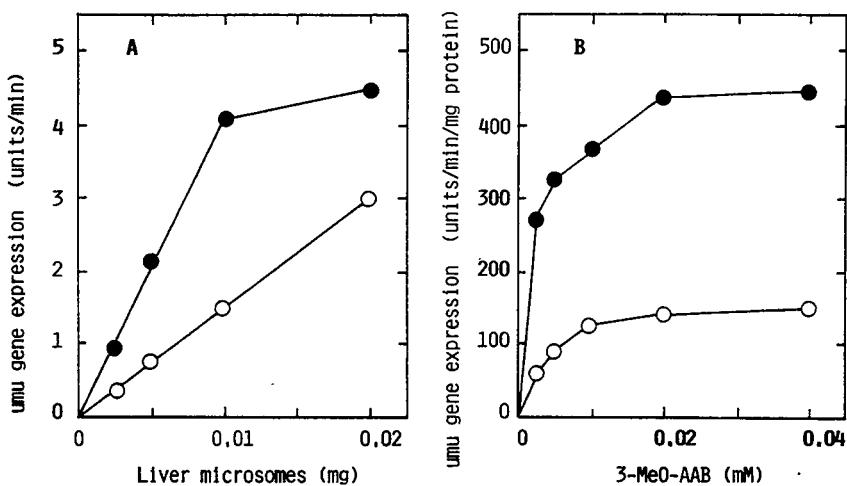


Fig. 3-1. Effects of concentrations of microsomal protein (A) and substrate (B) on the metabolic activation of 3-MeO-AAB by liver microsomes from untreated male rats (○) and from male rats treated with PB (●). The basic incubation mixture was used (see Materials and Methods): in A, the substrate concentration was 0.02 mM; in B, 0.01 mg of microsomal protein was used.

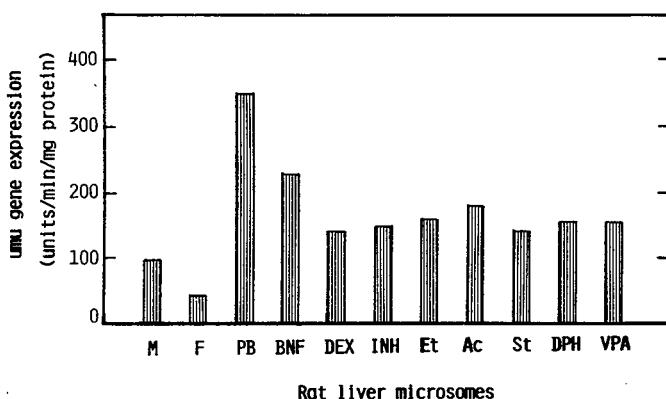


Fig. 3-2. Effects of pretreatment of rats with various P-450 inducers on the metabolic activation of 3-MeO-AAB by liver microsomes. Liver microsomes (0.01 mg) from untreated male and female rats and from male rats treated with various P-450 inducers were incubated with 0.01 mM 3-MeO-AAB. Results are shown as means of duplicate determinations from pooled microsomes of 3-6 individual rats. Standard derivations (for assay) in each value were less than 15 % of means. Abbreviations used in this figure; M, untreated male rats; F, untreated female rats; DEX, dexamethasone; INH, isoniazid; Et, rats treated with ethanol; Ac, rats treated with acetone; and St, rats starved for 3 days; DPH, phenytoin; VPA, valproic acid.

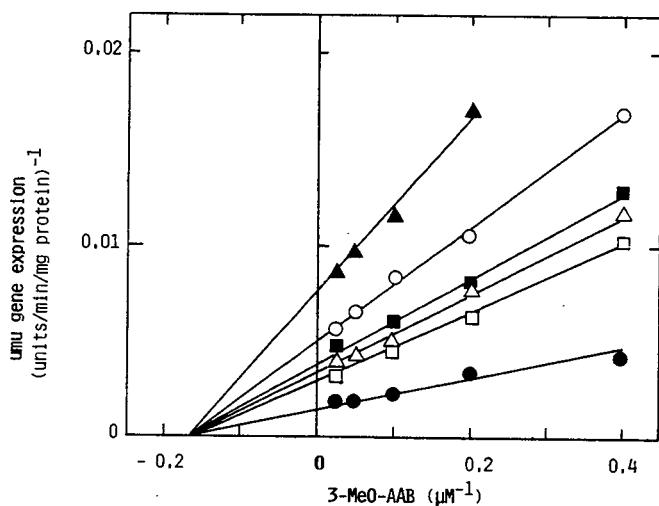


Fig. 3-3. Lineweaver-Burk Plots of the Bioactivation of 3-MeO-AAB by Liver Microsomes from Untreated Male Rats (○) or from Male Rats Treated with PB (●), BNF (△), Dexamethasone (▲), Isoniazid (■), or Phenytoin (□).

3-MeO-AABの活性化に対するP-450誘導剤の影響をFig. 3-2に示した。ラット肝ミクロゾームによる3-MeO-AABの活性化をPBが最も強く誘導し、次にBNFが高い活性を示した。その他の誘導剤処置によっても活性は誘導された。未処置では雄が雌よりも高い値を示した。肝ミクロゾームによる3-MeO-AABの活性化とそれぞれのP-450含量との間に相関関係が認められた($r=0.98$ 、 $p<0.01$)。見かけの K_m 値は各ミクロゾームにおいて約 $6.3 \mu M$ であった(Fig. 3-3)。

2. metyrapone、SKF-525A、 α -naphthoflavone及びP-450抗体の影響

ラット肝ミクロゾームによる3-MeO-AABの活性化に対するP-450酵素の変調剤の影響をFig. 3-4に示した。metyraponeとSKF-525Aは、PB、dexamethasone及びisoniazid処置ラットの活性化を少し阻害した。 α -naphthoflavoneはBNF処置ラットの活性化を強く阻害したが、dexamethasone処置ラットの活性化を促進した。ラット肝ミクロゾームの多くの分子種による3-MeO-AABの活性化を更に確認するために、ウサギから調製した精製P-450酵素の抗体の影

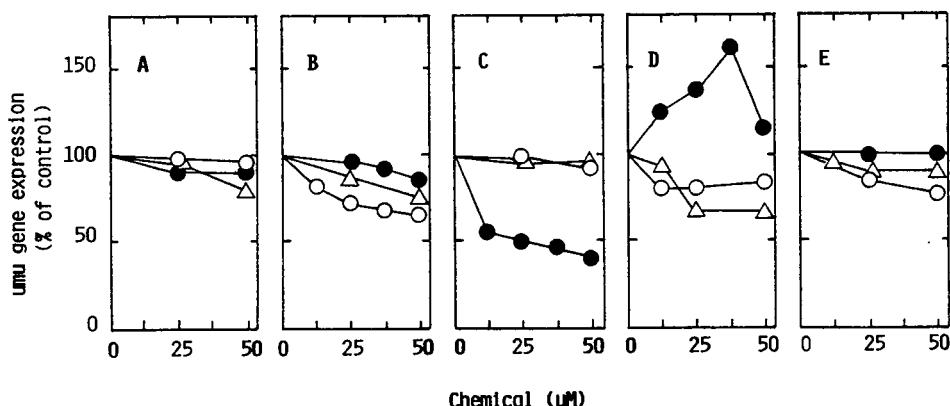


Fig. 3-4. Effects of Metyrapone (○), SKF 525-A (△), and α -naphthoflavone (●) on the Metabolic Activation of 3-MeO-AAB by Liver Microsomes of Untreated Rats (A) and Rats Treated with PB (B), BNF (C), Dexamethasone (D), or Isoniazid (E). The control activities in the absence of chemical modifiers were: untreated rats, 167 (umu) units/min/mg protein; PB-treated rats, 380 units/min/mg protein; BNF-treated rats, 283 units/min/mg protein; dexamethasone-treated rats, 160 units/min/mg protein, and isoniazid-treated rats, 212 units/min/mg protein.

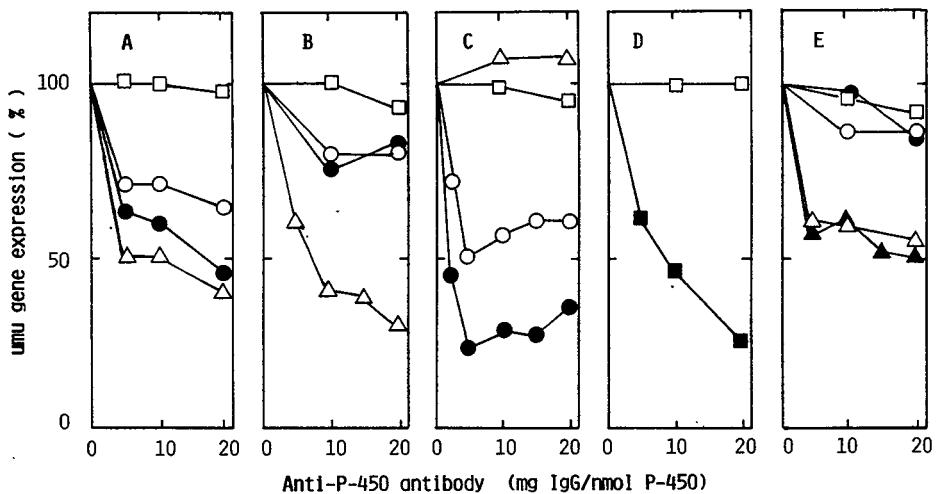


Fig. 3-5. Effects of Anti-P-450 (IgG) on the Bioactivation of 3-MeO-AAB by Liver Microsomes of Untreated Male Rats (A) and of Male Rats Treated with PB (B), BNF (C), Dexamethasone (D), or Isoniazid (E). Levels of uninhibited activities (without antibodies) are shown in legend to Fig. 3-4. Incubations were done in the presence of preimmune antibodies (□) or antibodies raised against rat P4501A1 (●), rat P4501A2 (○), rat P4502B1 (△), human P4503A4 (■), or human P4502E1 (▲).

響を調べた。典型的な分子種の含量が多いミクロゾームを用いて抗体の影響を検討したところ、抗ラットP4502B抗体は未処置、PB処置及びisoniazid処置ラットの活性を阻害したが、BNF処置ラットには影響を及ぼさなかった。それに対して、抗ラットP4501A1又は1A2抗体は未処置及びBNF処置ラットの活性化を阻害したが、PB処置又はisoniazid処置ラットの活性化に対する阻害作用は弱かった。また未処置ラットの活性化のP4502C11抗体による阻害も確認された。更に、抗ヒトP4503A抗体がdexamethasone処置ラットを、抗ヒトP4502E抗体がisoniazid処置ラットの活性化をそれぞれ阻害した。

Table 3-2. Metabolic Activation of 3-MeO-AAB by Reconstituted Monoxygenase System Containing Various Forms of Rat P-450.

Suggestive nomenclature according to Nebert et al.	Purified P-450 ^{a)}	umu gene expression (units/min/nmol P-450)
1A1	MC-5	167 ± 33
1A2	MC-1	105 ± 15
2A2	UT-4	27 ± 1
2B1	PB-4	144 ± 9
2B2	PB-5	133 ± 16
2C6	PB-2	59 ± 4
2C11	UT-2	37 ± 1
2C12	F-2	17 ± 13
2C13	UT-5	67 ± 2
2D1	UT-7	58 ± 14
2E1	DM	42 ± 2
3A2	PB-1	36 ± 1
	UT-1	47 ± 4
	UT-6	54 ± 9
	UT-8	30 ± 4

3-MeO-AAB metabolizing activity was reconstituted with rat P-450, NADPH-P-450 reductase, and DLPC in the presence of a tester strain *S. typhimurium* TA1535/pSK1002, and the induction of umu gene expression was determined as described in the Materials and methods. Values represent means of duplicate determinations ± S.D. (range).

a) Original nomenclature described by Imaoka et al.^{103,127)}

3. ラット精製P-450酵素による再構成

3-MeO-AABの活性化を精製ラットP-450酵素、NADPH-P-450還元酵素及びDLPCを用いてNADPH産生系共存下に再構成を行った。3-MeO-AABを活性化してSOS反応を誘導させるには、P-450酵素とNADPH-P-450還元酵素の両者が必要であった。DLPCを反応混液から除くと活性は約50%低下した。ラットの15種類のP-450酵素による再構成系での3-MeO-AABの活性化をTable 3-2に示した。P4501A1が最も高い活性を示し、ついでP4502B1、P4502B2、P4501A2の順であった。その他11種のP-450酵素もそれぞれ低いながらも3-MeO-AABを活性化した。

4. ヒト肝ミクロソームによる3-MeO-AABの活性化

ヒト肝ミクロソームも3-MeO-AABを活性化してSOS反応を誘発する代謝物に変換したが、それぞれの検体の活性化には大きな変動が見られた(Fig. 3-6)。ヒト肝ミクロソーム個々の3-MeO-AAB活性化と10検体のP-450含量には相関関係があった($r=0.91$ 、 $p<0.01$)。これらのヒト各個体の肝ミクロソームによる活性化の平均値(55±30 units/min/mg protein)は未処置の雌雄ラットの平均値(66±40 units/min/mg protein)に近い値であった。

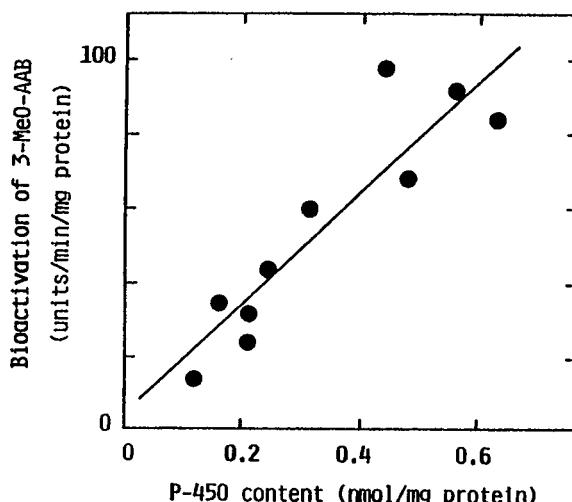


Fig. 3-6. Correlation between Specific P-450 Contents and 3-MeO-AAB Metabolizing Activities of Liver Microsomes from Individual Human Samples.

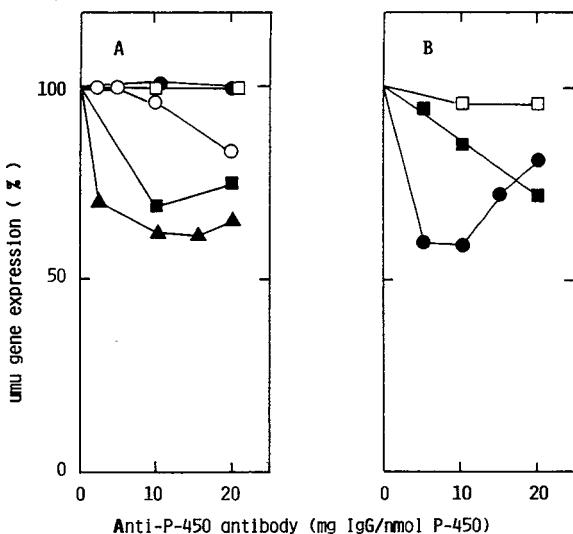


Fig. 3-7. Effects of Anti-P-450 IgG on the Metabolic Activation of 3-MeO-AAB by Liver Microsomes from Human Sample HL-28 (A) and HL-4 (B). Control activities without antibodies were; HL-28, 87 units/min/mg; and HL-4, 39 units/min/mg. Incubations were done in the presence of preimmune antibodies (□), and of antibodies raised against human P4501A2 (●), human P-450_{MP} (○), human P4502E1 (▲) and human P4503A4 (■).

ヒト肝ミクロソーム(HL-28、HL-4)による3-MeO-AABの活性化に対するヒトP4501A2、P450_{MP}、P4502E1及びP4503A4抗体の影響を調べた(Fig 3-7)。これらの抗体の特異性については確認がなされている¹⁶⁻¹⁹)。P4503A4及びP4502E1抗体はP-450含量の最も高いサンプルHL-28の活性化を30-40%阻害した。P450_{MP}抗体による阻害は約20%と低いが、IgG抗体量を40 mg/nmol P-450まで増やすと約40%の阻害が確認された。P4501A2酵素の含量が比較的高いサンプルHL-4を用いると、P4501A2抗体によって3-MeO-AABの活性化が阻害された。

5. ヒトとラットのP-450酵素を用いた再構成系における3-MeO-AABの活性化に対する脂質の影響

ヒトP-450酵素による3-MeO-AABの活性化をラットと同様にP-450酵素、NADPH-P-450還元酵素及びDLPCを用いて再構成系で調べた(Table 3-3)。ヒトではP4501A2が最も高い活性を示し、

ついでP450_{MP}、P4503Aの順であった。DLPCの代わりに3種の脂質の混合物とコレステロール酸を用いて再構成を行うと、ヒトP4503A4及びラットP4503A2による活性化が強く促進された。同様にヒトとラットの2C酵素では、約1.5倍の活性となったが、P4501A酵素では脂質を変えても活性値に変化はなかった。

Table 3-3. Effect of Lipid Component on the Reconstituted 3-MeO-AAB-metabolizing Activity in Monooxygenase System Containing Human and Rat P-450s

Lipids	Human P-450			Rat P-450		
	P4501A2	P4503A4	P-450 _{MP}	P4501A2	P4503A2	P4502C11
DLPC	104 (100)	24 (100)	31 (100)	105 (100)	33 (100)	36 (100)
Mixture	125 (120)	79 (329)	44 (142)	110 (105)	76 (230)	58 (161)

3-MeO-AAB metabolizing activity was reconstituted with three forms of human P-450 and three forms of rat P-450, NADPH-P-450 reductase, and DLPC or a phospholipid mixture as described in the Materials and methods. In the experiments with a phospholipid mixture, rat cytochrome b₅ (20 pmol) and 100 μg of sodium cholate were also included as described by Imaoka et al.¹²⁷. Values represent means of duplicate determinations.

6. P-450酵素による3-MeO-AABの活性化に対するα-Naphthoflavoneの活性促進効果

P4503A2又は3A4によって触媒される反応は、α-naphthoflavoneによって活性が促進されることが報告されている^{12, 16, 18, 19}。ヒト及びラット肝ミクロソームによる3-MeO-AABの活性化におけるP4503A酵素の役割を確認するため、ミクロソームと再構成系の両方で調べた(Fig. 3-8)。α-naphthoflavoneはヒト肝ミクロソーム及びP4503A4とP4503A2による活性化を約2倍に促進した。またP450_{MP}及びP4502C11による活性化も促進した。

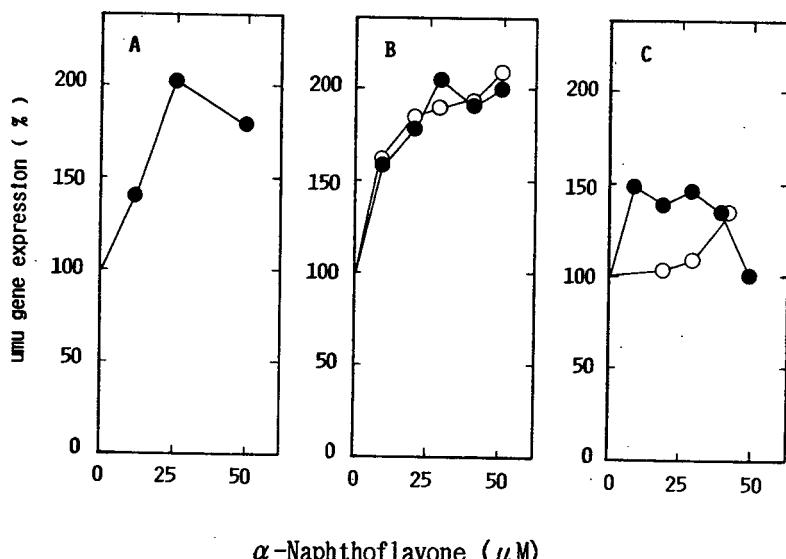


Fig. 3-8. Effects of α -Naphthoflavone on the Metabolic Activation of 3-MeO-AAB by Human Liver Microsomes (A), and by Reconstituted Systems Containing Human P-450s [B, P4503A4 (●) and P450_{MP} (○)], and Rat P-450s [C, P4503A2 (●) and P4502C11 (○)]. The control activities in the absence of α -naphthoflavone were 93 units/min/mg protein for liver microsomes and 26 units/min/nmol P-450 for P4503A4-system, 31 units/min/nmol P-450 for P450_{MP}-system, 33 units/min/nmol P-450 for P4503A2-system, and 36 units/min/nmol P-450 for P4502C11-system. The reconstitution was done with a lipid mixture and cytochrome b₅ as described in Materials and methods.

7. 3-MeO-AABのO-acetyltransferaseによるSOS反応の促進

芳香族アミン類の代謝的活性化経路としてアミノ基のN-水酸化、更にアセチル抱合が考えられている^{130, 131})。3-MeO-AABのP-450酵素による活性化反応において、アセチル転移酵素の関与を調べるために、第2章で用いた試験菌株O-acetyltransferase導入株S. typhimurium NM2009、欠損株NM2009株及びTA1535/pSK1002株と比較し、O-acetyltransferaseの阻害剤¹¹³) pentachlorophenolの影響を調べた(Table 3-4)。3-MeO-AABは肝ミクロソーム非存在下では、いずれの試験菌株においてもSOS反応を引き起こさなかった。3-MeO-AABはS. typhimurium NM2009を用いるとTA1535/pSK1002株を用いた場合の約3倍の高い活性を示したが、NM2009株では活性が著しく低下した。NM2009株を用いる系では、pentachlorophenolを

加えることにより、3-MeO-AABの活性化が約50%阻害された。それに対して、TA1535/pSK1002 株では17%の低下であり、欠損株(NM2000株)では活性の阻害作用は認められなかった。

Table 3-4. Genotoxic Activation of 3-MeO-AAB and Effects of Pentachlorophenol on 3-MeO-AAB Metabolizing Activity in *S. Typhimurium* NM2009, *S. Typhimurium* TA1535/pSK1002 and *S. Typhimurium* NM2000.

	Activation of 3-MeO-AAB (umu units/min/mg protein)		
	<i>S. typhimurium</i> NM2009 (%)	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002 (%)	<i>S. typhimurium</i> NM2000 (%)
Control	886 (100)	280 (100)	11 (100)
plus pentachloro-phenol (10 μM)	451 (51)	232 (83)	11 (100)

Control incubations were done with 2.5 μM 3-MeO-AAB and 0.005 mg/ml of liver microsomes from PB-treated rats, and induced umu gene expression was determined. Value represents mean of triplicate determinations; the standard deviations were <15 % of the mean values.

第4節 考察

強肝癌誘発物質3-MeO-AABのラット及びヒト肝ミクロゾームP-450酵素による活性化を調べた。DNA損傷性は*S. typhimurium* TA1535/pSK1002におけるSOS反応を指標にした。多くのアミノアゾ色素の代謝的活性化経路としてアミノ基のN-水酸化が考えられている(130, 131)。

以下に述べる結果から、3-MeO-AABはラット及びヒトの種々のP-450分子種によって活性化を触媒されることが明確になった。すなわち、(1)3-MeO-AABのラット肝ミクロゾームによる活性化は多くのP-450誘導剤によって増強された(Fig. 3-2)。(2)ラット及びヒトの種々の肝ミクロゾームの総P-450含量と3-MeO-AAB活性化能の間に良好な相関関係があった(Fig. 3-6)。(3)P-450の阻害剤又は促進剤であるmetyrapone、SKF-525A及びα-naphthoflavoneが予想どおり活性に影響を与えた(Fig. 3-4, 8)。(4)数種のP-450分子種の特異抗体がミクロゾー

想どおり活性に影響を与えた(Fig. 3-4, 8)。(4)数種のP-450分子種の特異抗体がミクロゾームによる3-MeO-AABの活性化を阻害した(Fig. 3-5, 7)。(5)3-MeO-AABの活性化はラット及びヒトの数種の精製P-450酵素を用いて再構成された(Table 3-2, 3)。

ラットにおいて3-MeO-AABの活性化に関与する主要な分子種は以下の結果から、P4501A1、1A2、2B1、2B2、2E1及び3A2であった。すなわち、再構成系において最も高い活性を示したのは、P4501A1で、ついでP4502B1、2B2及び1A2であり、それぞれの分子種の特異抗体が、PB又はBNF処置ラット肝ミクロゾームの活性化を阻害した。またラットP4502E1及びP4503A2の寄与は、isoniazid処置ラットの活性化をP4502E1抗体が阻害したこと、並びにdexamethasone処置ラット肝ミクロゾームとP4503A2による再構成系による活性化を α -naphthoflavoneが促進し、脂質の効果も認められることから示唆された。しかしながら、種々の典型的なP-450誘導剤処置ラット肝の総P-450含量と3-MeO-AABの活性化とが相関性を示したことから、その他の分子種の関与も否定できない。

ヒト肝ミクロゾーム中にも3-MeO-AABを活性化する分子種が存在した。ヒト肝ミクロゾームでは主要な分子種のひとつであるP4503Aが3-MeO-AABの活性化に関与することは、P4503A4酵素による再構成系における活性化、ヒト肝ミクロゾームの活性化に対するP4503A4抗体による阻害、並びに再構成の際の脂質組成^{12, 19, 127, 132)}に活性化が依存すること及び α -naphthoflavoneによるミクロゾームと再構成の両者の活性化の促進作用から判明した。P450_{MP}はもうひとつのヒト肝の主要分子種であるが、再構成系において3-MeO-AABがP450_{MP}によって活性化されたこと並びにP450_{MP}抗体がヒト肝ミクロゾームの3-MeO-AABの活性化を阻害したことから、3-MeO-AABの活性化に寄与するものと考えられる。P4503A酵素の特徴である再構成の脂質条件と α -naphthoflavoneによる促進作用が、P4503A酵素程の活性上昇ではないが、P450_{MP}においても認められた。P4502C酵素活性の促進機構については更に詳細な研究が必要である。ヒト肝ミクロゾームでは、P4501A2、2E1酵素は組成比の小さいP-450分子種であるが、多くの発癌性芳香族アミン類やニトロソアミン類の代謝に関与することが知

活性化を高率に触媒し、P4501A2抗体による阻害作用もヒト肝ミクロゾームHL-4による3-MeO-AABの活性化において認められた。P4502E1酵素の関与も抗体によるミクロゾーム阻害作用から示された。

3-MeO-AABの多くのP-450分子種による活性化は他の結果からも明きらかである。種々のラット肝ミクロゾームの活性化においてKm値が一致したことは(Fig. 3-3)、この活性化反応はある特定の分子種のみによって触媒されていないことを強く示唆している。タンパク量を増やしても活性の低下は認められず(Fig. 3-1)、 α -naphthoflavoneの促進作用もP4503A酵素の寄与と考えられ(Fig. 3-4, 7)、しかもP-450抗体を加えた場合にいずれも活性上昇が認められなかったこと(Fig. 3-5, 7)を考え合わせると、3-MeO-AABが多くの位置に水酸化反応を受けて、全体として活性化と不活性化のバランスが複雑になる可能性は考えにくい。6-nitrochryseneや3-amino-1, 4-dimethyl-5H-pyrido[4, 3-b]indoleの活性化においても反応に化如する関与する单一のP-450酵素の特定はされておらず¹⁶⁾、この場合は酵素の基質特異性の重なりよりも多段階にわたる活性化機構のためと考えられる。

出川ら⁵¹⁾は、酵素活性と免疫化学的検討から、3-MeO-AABがラット肝の選択的かつ強力なP4501A2の誘導剤であることを報告している。従来化学物質によって誘導された酵素は、その化合物自身を特異的に代謝して体外に排泄させるものと広く考えられてきた^{13, 14)}。3-MeO-AABが誘導能を持つP4501A2に加えて幅広いP-450分子種によって活性化されることは興味深い。出川らの予備実験では、3-MeO-AABは、PB又はMC処理ラット肝ミクロゾームによって代謝され、唯一直接変異原性を示すN-hydroxy-3-MeO-AABに変換されることが調べられている（未発表）。本研究においても、3-MeO-AABは0-acetyltransferase導入株においてSOS反応の誘導が顕著に誘導され、その高い活性化は0-acetyltransferase阻害剤により抑制されることが判明した(Table 3-4)。これらのことから、3-MeO-AABは種々のP-450酵素によって代謝的活性化を受けてN-水酸化体となり、サルモネラ菌体内でアセチル転移酵素によって更に活性化されていることが示唆された。この化学構造においておそらく同じ窒素原子が多

更に活性化されていることが示唆された。この化学構造においておそらく同じ窒素原子が多くのP-450酵素によって代謝される原因が問題となってくる。現在までに他のアミノアゾ色素についてはSOS反応の誘導は検出されていなかった¹⁶⁾。このことから、3-MeO-AABの反応機構としては、オルト位のメトキシル基が、アミニウムラジカルや他の正に電荷を帯びた中間体を安定化させ、立体障害のない条件で酸素添加反応を受け易くするために重要な役割をはたしているものと推測される。しかしながら、この機構については、現在わかっておらず、P-450酵素による外来性あるいは内因性の化合物の代謝における分子化学的な基礎を理解するため、今後この重要な問題を解決する研究が必要である。

第4章 直接変異原物質furylfuramideのラットとヒトのP4501A酵素による不活性化

第1節 緒 言

Furylfuramide(Fig. 4-1)は、日本において1964年から1974年まで保存料の目的で食品添加物として使用されていたが、いくつかの実験系で強い変異原性を示すことが報告されて使用禁止となった⁵⁹⁻⁶¹⁾。しかしながら、in vivoの実験では、ラット、マウス、イヌ及びサルでの長期投与実験においてfurylfuramide自体は発癌性物質でないことが示されている¹³³⁻¹³⁵⁾。furylfuramideが実際に発癌性を示すと結論づけるには、更に詳細な研究が必要であるが、薬物代謝酵素によるこの化合物の代謝がfurylfuramideの生物活性に大きく影響を与えるものと推測される。

Furylfuramideを含むニトロフラン誘導体は嫌気的に還元されて、核酸やタンパクに共有結合する代謝物に変換され、いくつかの実験系で変異原性を発現することが報告されている¹³⁶⁻¹³⁸⁾。MurthyとNajaria¹³⁹⁾はfurylfuramideをラット肝9,000g上清画分とインキュベーションすると変異原性が低下することを示している。この知見はニトロフラン誘導体が酸化的に薬物代謝酵素によって生物学的に不活性な形に代謝される可能性を示唆している。そこで、furylfuramideがラットとヒトの肝ミクロソームP-450酵素によって酸化的に不活性化される可能性についてumuテストを用いて検討した。

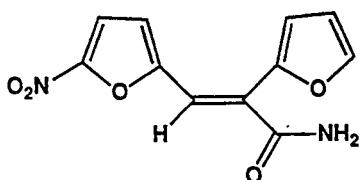


Fig. 4-1. Structure of Furylfuramide

第2節 材料及び実験方法

化合物：furylfuramideは和光純薬から購入した。

肝ミクロソームの調製とP-450酵素の精製：ヒトのサンプルは事故死臓器提供者(HL-99)を加え、第2、3章と同様にヒト及びSprague-Dawleyラット肝ミクロソームを調製した。ラットのP4501A1、1A及び2B1酵素の精製は常法に準じ^{10, 140})、またウサギ抗血清からP-450特異抗体を得た。それぞれのP-450含量及び酵素活性等の測定は第2、3章と同様に行った。

2-Amino-3, 4-dimethylimidazo[4, 5-f]quinoline (MeIQ)の代謝的活性化：MeIQの活性化は第3章第2節の3-MeO-AABの場合と同様に行い、S. typhimurium TA1535/pSK1002共存下に基質濃度を0.01mM、タンパク量はP-450として10pmol相当量の肝ミクロソームを用いて行った。

Furylfuramideの肝ミクロソームによる代謝的不活性化：100 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)、0.01–0.05 nmol P-450相当量の肝ミクロソーム、0.02 nmol furylfuramide及びNADPH産生系を用いて反応混液(0.25 ml)を調製した。37 °Cで反応後、100 °Cの水浴中で2分間加熱した。furylfuramide及び代謝産物のumu遺伝子の誘導は0.75 mlの菌懸濁液を加えて上記と同様に行った。

代謝産物をHPLCで分析する場合は、5 mlの反応混液とした。umu試験を行う至適条件の基質濃度は、代謝産物の検索の目的には低すぎるので基質濃度を上げて実験を行った。褐色ガラス試験管中で、50–100 μM furylfuramideを用い、反応停止には2倍量のCH₂Cl₂を加え、代謝物は2倍量のCH₂Cl₂で2回抽出した。HPLC分析の結果、水層には代謝物は残ってないなかつた。有機層を合わせ、室温にて窒素気流中で溶媒を留去した。残渣をCH₃OH(50 μl)に溶解させ、一部をZorbax octadecylsilyl(C-18)カラム(6.2x80 mm, Mac-Mod)に注入した。カラム

ムは22%CH₃OH水溶液で平衡化させたのち、はじめの5分は溶離液組成を変えず、5-35分においてCH₃OHを22%から100%まで直線的濃度勾配とした。溶離液は、Hewlett-Packard 1040Aダイオードアレイ分光光度計(200-550nm)を通過させ、40分間記録した。

第3節 結 果

1. ヒト肝ミクロソームによるfurylfuramideの不活性化

Furylfuramideを好気的に加熱処理又はそのままのヒト肝ミクロソーム(HL-5)とNADPH存在下にインキュベーションした。37 °Cで適当時間反応させた後、100 °Cで2分間加熱し、氷浴中で冷却した。furylfuramideとその代謝物が示すDNA損傷性をS. typhimurium TA1535/pSK1002を用いて調べた。Fig. 4-2に示したように、furylfuramideのDNA損傷性は、

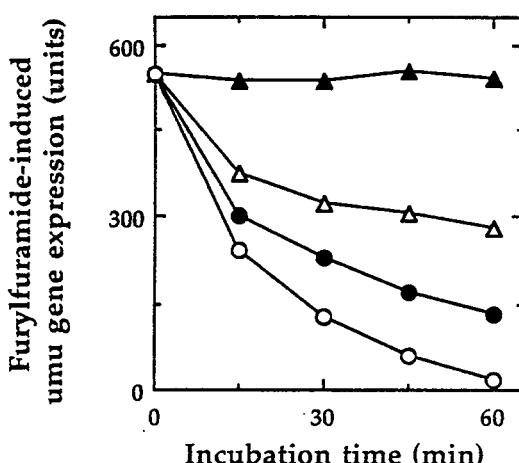


Fig. 4-2. Effect of Incubation Time on the Deactivation of Furylfuramide by Human Liver Microsomes (sample HL-5). Boiled microsomes (▲) or intact microsomes (△, 12.5 pmol of cytochrome P-450; ●, 25 pmol; ○, 50 pmol) were incubated with 20 pmol of furylfuramide in the presence of an NADPH-generating system. After incubating at 37 °C for a suitable periods of time, the reaction was terminated by boiling at 100 °C or 2 min. The genotoxic activity of furylfuramide and its metabolites was determined as described in Materials and methods.

反応時間及び加える肝ミクロソームのP-450量を増加させるにしたがって、減少した。それに対して、加熱処理した肝ミクロソームを加えて60分間インキュベーションしてもfurylfuramideの活性は変化しなかった。

Furylfuramideの肝ミクロソームによる不活性化における種々の基質濃度とP-450酵素量の与える影響をFig. 4-3に示した。furylfuramide自身は基質濃度に依存してumu遺伝子を発現させたが、肝ミクロソームによる代謝を受けるとその活性が低下した(Fig. 4-3A)。加熱処理した肝ミクロソームは調べたすべての基質濃度のfurylfuramideの活性に影響を及ぼさなかったが、未処理のヒト肝ミクロソームによって、いずれの基質濃度においても不活性化が認められた(Fig. 4-3B)。

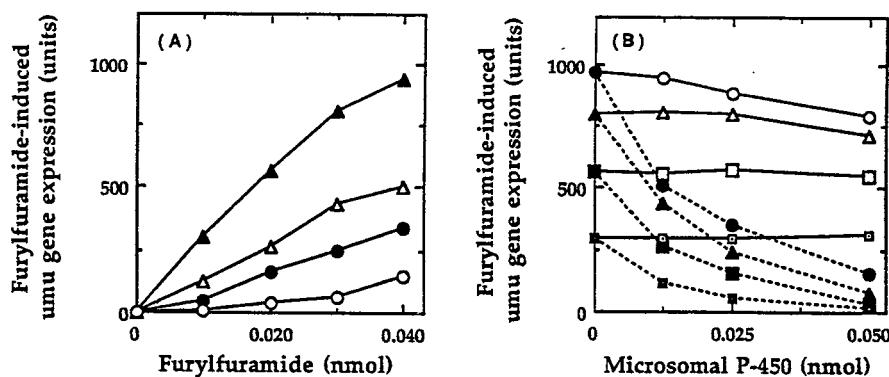


Fig. 4-3. Effects of Concentrations of Furylfuramide (A) and Cytochrome P-450 (B) on the Deactivation of Furylfuramide by Human Liver Microsomes (sample HL-5). The experimental conditions see legend to Fig. 4-1. In panel A, boiled microsomes (\blacktriangle) or intact microsomes (\triangle , 12.5 pmol of P-450; \bullet , 25 pmol of P-450; and \circ , 50 pmol of P-450) were included in the reaction mixture. In panel B, different concentrations of furylfuramide (\circ and \bullet , 40 pmol; \triangle and \blacktriangle , 30 pmol; \square and \blacksquare , 20 pmol; and \blacksquare and \bullet , 10 pmol of furylfuramide) were used. Open symbols, with boiled microsomes; closed symbols, with intact microsomes.

2. P-450酵素阻害剤の影響

これらの結果から、furylfuramideは不活性代謝物へ変換されてSOS反応の誘導が低下しているものと考えられる。肝ミクロソームによるfurylfuramideの酵素的不活性化反応機構を明らかにするため、P-450酵素の阻害剤の影響を調べた。空気を窒素又は80%一酸化炭素に置換すると、ヒト肝ミクロソームによる不活性化が阻害されたことから、この反応にはP-450酵素の関与が示唆された(Table 4-1)。さらに、 α -naphthoflavoneが不活性化を阻害したが、metyrapone及びSKF-525Aは作用しなかった。

Table 4-1. Effects of Carbon Monoxide, α -Naphthoflavone, Metyrapone, and SKF-525A on Cytochrome P-450-catalyzed Deactivation of Furylfuramide by Human Liver Microsomes

	Furylfuramide-induced genotoxicity (umu gene expression)	
	units	%
Boiled microsomes	574 ± 98	(100)
Intact microsomes	75 ± 14	13
under nitrogen	538 ± 101	94
under CO:O ₂ (8:2, v/v)	482 ± 101	84
plus α -naphthoflavone	537 ± 92	94
plus metyrapone	95 ± 9	17
plus SKF-525A	100 ± 34	17

Furylfuramide (20 pmol) was incubated either with boiled microsomes or intact microsomes (20 pmol of cytochrome P-450) from human liver (sample HL-5). When indicated, α -naphthoflavone, metyrapone, and SKF-525A were present at final concentrations of 12.5 μ M. After incubation at 37 °C for 60 min, the mixture was cooled in an ice-water bath, and then the genotoxic activity of the furylfuramide and its metabolites was determined in *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 as described in Materials and methods. Each value represents the mean of duplicate determinations ± S.D. (range). No decrease in genotoxicity was seen in the absence of the NADPH-generating system. α -Naphthoflavone did not exert a direct effect on the genotoxic expression and, in other experiments, has been shown to stimulate or inhibit certain cytochrome P-450-mediated reactions.

Table 4-2. Effects of Pretreatment of Rats with PB, MC, and Dexamethasone on Liver Microsomal Deactivation of Furylfuramide in Rats

	Furylfuramide-induced genotoxicity (umu gene expression)	
	units	%
Boiled microsomes		
Untreated rats	616 ± 79	(100)
Intact microsomes		
Untreated rats	542 ± 59	88
PB-treated rats	572 ± 101	93
MC-treated rats	134 ± 18	22
plus α -naphthoflavone	606 ± 85	98
Dexamethasone-treated rats	448 ± 78	73

Furylfuramide (20 pmol) was first incubated either with boiled microsomes or intact microsomes (30 pmol of P-450) from variously pretreated rats. For other details see the legend to Fig. 4-2.

ラット肝ミクロゾームによるfurylfuramideの不活性化に対するP-450誘導剤の影響をTable 4-2に示した。MC処置はラット肝ミクロゾームによる不活性化を増強した。ヒト肝ミクロゾームの場合と同様に、furylfuramideのMC処置ラットによる不活性化は α -naphthoflavoneによって顕著に阻害された。PB及びdexamethasone処置した場合の影響は顕著ではなかった。

3. P-450酵素の役割

以上の結果は、MC誘導性P-450酵素がfurylfuramideの肝ミクロゾームによる不活性化に関与することを示唆している。更に確認する目的で、ヒト及びラット肝ミクロゾームによるfurylfuramideの不活性化に対するラットP-450酵素特異抗体の影響を調べた(Table 3-3)。MC処置ラット肝ミクロゾームの不活性化に対しては、MC誘導性分子種(P4501A1, P4501A2)の両抗体が顕著に阻害したが、P4502B1抗体は作用しなかった。ヒト肝ミクロゾームに対して

Table 4-3. Effects of Antibodies against Rat Cytochrome P-450 Enzymes on the Deactivation of Furylfuramide in Human and Rat Liver Microsomes

Furylfuramide-induced genotoxicity (umu gene expression)					
	Rat microsomes		Human microsomes		
	units	%	units	%	
Boiled microsomes	608 ± 20	(100)	570 ± 56	(100)	
Intact microsomes	164 ± 15	27	116 ± 22	20	
plus preimmune	175 ± 22	29	141 ± 32	25	
plus anti-P4502B1	196 ± 19	32	153 ± 29	27	
plus anti-P4501A1	444 ± 19	73	197 ± 55	35	
plus anti-P4501A2	401 ± 32	66	410 ± 48	72	

Liver microsomes (30 pmol of P-450 from MC-treated rats or 20 pmol of P-450 from human sample HL-5) were first incubated with anti-P-450 IgG (0.4 mg of protein) at 25 °C for 15 min. Deactivation of furylfuramide by liver microsomal cytochrome P-450 was determined as described in Methods. Values represent means of duplicate determinations ± S.D. (range).

は、P4501A2抗体がラットと同様に阻害したが、P4501A1抗体はほとんど作用しなかった。

ヒト肝においては、ラットP4501A2に対応するヒトP4501A2 (phenacetin脱エチル酵素、P450_{PA})はヒトP4501A1(arylhydrocarbon水酸化酵素、P₁-450)よりも多く発現していることが報告されている¹⁶⁾。furylfuramideの不活性化にヒト肝P4501A2酵素が関与することを調べるために、用いたヒト7検体の酵素活性の相関を検討した。Fig. 4-4に示したように、furylfuramideの不活性化はラットP4501A2と免疫化学的に反応するタンパク量とよく相関した($r=0.99$)。7検体のこのタンパク量は、ヒト肝P4501A2によって触媒されることが知られている^{12, 16)}MeIQの代謝的活性化($r=0.89$)及びethoxyresorufin脱エチル化反応($r=0.96$)の間に良好な相関関係が認められた。またヒト肝ミクロソームによるfurylfuramideの不活性化はヒトP4501A2抗体によっても顕著に阻害されたことも(Fig. 4-5)上記の結果を支持している。

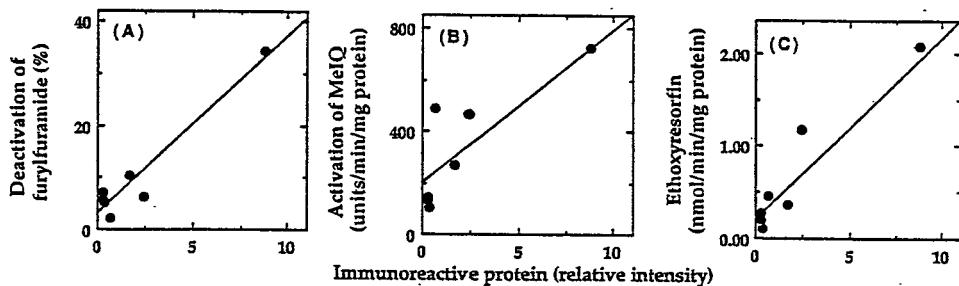


Fig. 4-4. Correlation between Amounts of Immunoreactive Protein Related to Rat P4501A2 versus the Activities of (A) Furylfuramide Deactivation, (B) Metabolic MeIQ Activation or (C) Ethoxresorfin 0-deethylation in Liver Microsomes from Seven Different Human Samples. In panel A, the furylfuramide-deactivating activity was expressed as percent decrease in genotoxic responses as compared to the activity of boiled microsomes.

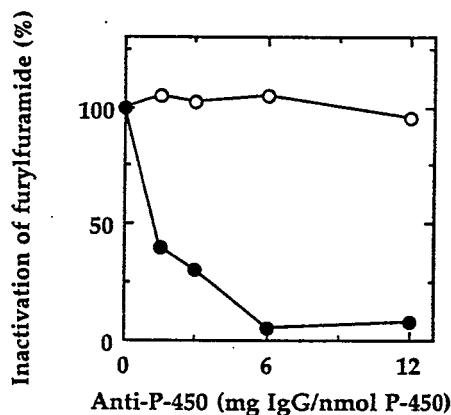


Fig. 4-5. Immunoinhibition of the Microsomal Inactivation of Furylfuramide. Furylfuramide was incubated with NADPH-fortified human liver microsomes (sample HL-99) in the general manner described under Materials and Methods in the presence of the indicated amounts of rabbit anti-human P4501A2 IgG (●) or preimmune IgG (○). The results are plotted as inactivation of furylfuramide, with the 100% value corresponding to 21% decrease in the genotoxic activity.

Furylfuramideの不活性化におけるP-450酵素の役割をさらに確認するために、精製P-450酵素、NADPH-P-450還元酵素及び脂質を用いて再構成系での検討を行った。驚いたことに、NADPH-P-450還元酵素自身がfurylfuramideの不活性化反応を強く触媒したため(Table 4-4)、P-450分子種の役割の証明はできなかった。

Table 4-4. Inactivation of Furylfuramide by NADPH-cytochrome P-450 Reductase in Reconstituted System

	Furylfuramide-induced genotoxicity (units)
Boiled system	606 ± 68 (100)
NADPH-P-450 reductase	178 ± 9 (29)

Furylfuramide (0.02 nmol) was incubated with a system containing 0.01 μM of NADPH-P-450 reductase and DLPC. Values represent means of duplicate determinations ± S.D. (range).

4. Furylfuramide代謝物の分析

Furylfuramideは速やかに代謝されてその生物活性を失った。Fig. 4-6には代謝物のクロマトグラムの一例を示した(230nmの吸収による)。酵素非存在下で調べたところ、出発物質ピークbには少量のピークf及びgが混在していた。NADPH-P-450還元酵素存在下では、基質は完全に消失し、215nmでの検出を行っても生成物はほとんど検出されなかった(NADPH-P-450還元酵素をごく少量にするピークaが痕跡程度検出された)。ヒト又はラット肝ミクロソームを用いると、ピークa、c、d及びeが検出され基質bのほとんどが代謝され消失した。

ミクロソームによる代謝物の紫外外部-可視スペクトルをFig. 4-7に示した。これらの生成物は同定されていないが、黄色の生成物aは主要代謝物であるので更に実験を続けた。生成物aのスペクトルは明らかにfurylfuramide (b)と異なったので、反応混液の吸収スペクトルを直接測定し(Cary 210、ベースライン補正モード)、スペクトルの一例をFig. 4-8に示した。酵素非存在下では、furylfuramideのスペクトルの変化は認められなかった。しかしながら、非常に少量のヒト又はラット肝ミクロソームもしくはウサギ肝NADPH-P-450還元酵素を加えるとスペクトルは直ちに2つの極大点をもつピークaに変化した。スペクトルの変化から新しい化合物の吸光係数を予測した。ヒト肝ミクロソーム存在下にfurylfuramide濃度が60 μM の場合、350pmol生成物/min/pmol P-450と推定された。NADPHをNADHに置き換えると、同じス

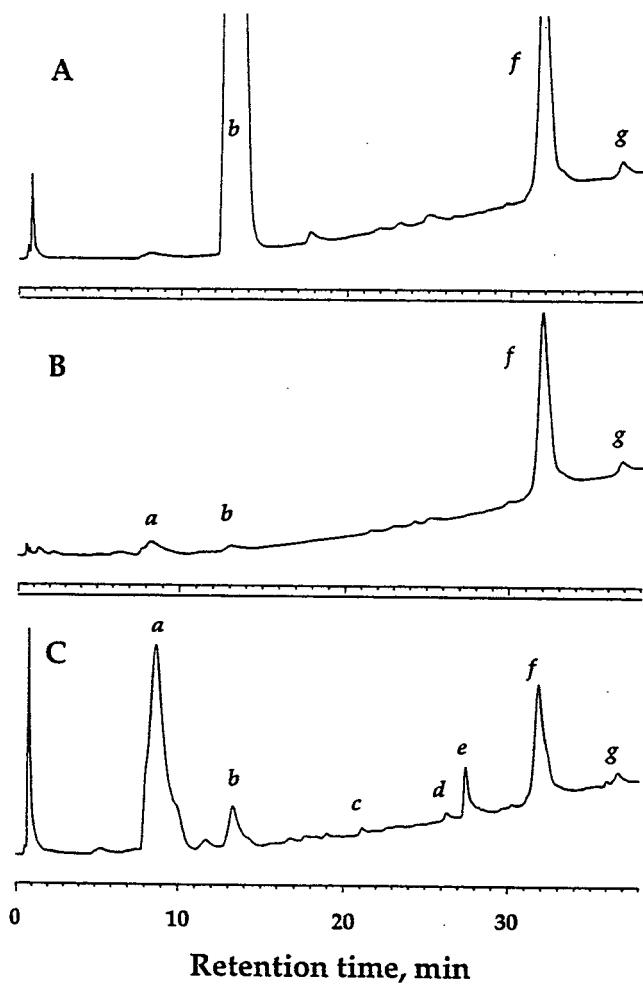


Fig. 4-6. HPLC of Furylfuramide Products Formed by Microsomal Enzymes. The peaks labeled with small letters are discussed in the text and some of the UV spectra are shown in Fig. 4-7. All incubations were carried out for 10 min in the presence of NADPH-generating system in 5 ml of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.7) at 37 °C. In each case 40% of the CH_2Cl_2 extract was chromatographed, and the full absorbance scale (230 nm) was 0.15. The individual chromatograms were derived from incubations with (A) NADPH only, (B) purified rabbit liver NADPH-cytochrome P-450 reductase (0.8 nmol), or (C) human liver microsomes (sample HL99, 2.0 nmol cytochrome P-450).

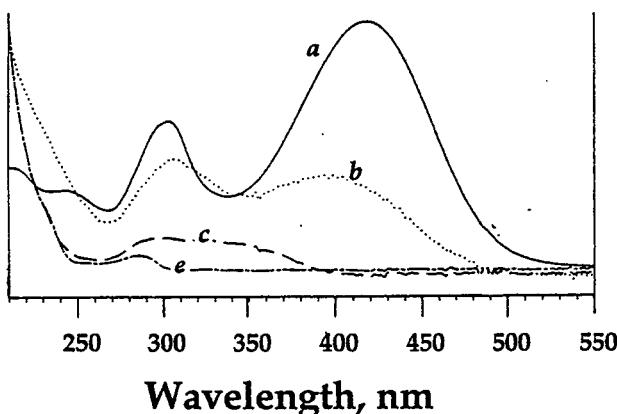


Fig. 4-7. UV-visible Spectra of Metabolites of Furylfuramide Formed by Human liver Microsomes. The spectra of several of the peaks eluted in part C of Fig. 4-6 were recorded using a diode array detector: peak a (—, t_R 8.9 min, full absorbance scale 0.27); peak b (...., t_R 13.0 min, full absorbance scale 0.18); peak c (—, t_R 21.2 min, full absorbance scale 0.052); peak e (._._., t_R 27.5 min, full absorbance scale 0.17) (absorbance scales are normalized for display).

ペクトル変化が見られたが、反応速度はNADPHの場合の約5%にすぎなかった。ウサギ肝NADPH-P-450還元酵素を用いた場合は、1900 pmol生成物/min/nmol reductaseと推定された。HPLCの結果、ピークa、bのみが390nm領域に吸収をもつことがわかったので、ピークaの減少をスペクトル分析によって求めた(415nmの吸収による)。この条件下でヒト肝ミクロソーム(HL-99)のピークaの分解速度は230nmol/min/nmol P-450であり、NADPH-P-450還元酵素による分解速度は790 pmol/min/pmol reductaseと推定された。Fig. 4-6Bにおいて、ピークaは生成してさらにNADPH-P-450還元酵素によって分解されているものと推定される。

NADPH-P-450還元酵素がピークaを還元によって生成することが示唆されたので、還元剤次亜塩素酸ナトリウムにより同じ生成物ができる可能性について調べた。予試験において、過剰の次亜塩素酸ナトリウムはfurylfuramideを10分以内に消失させたが、生成物はFig. 4-6の条件で、カラムに吸着されずに溶出し、短波長領域の紫外外部吸収が見られた。

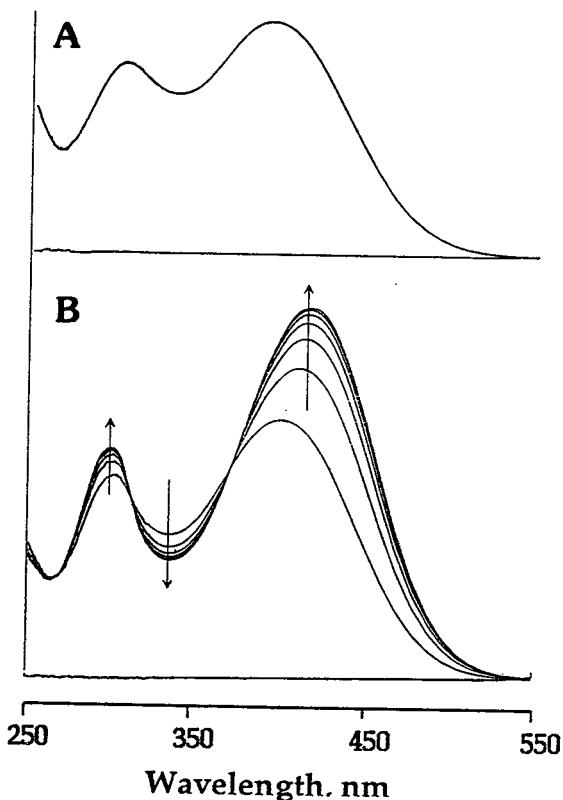


Fig. 4-8. Conversion of Furylfuramide to Metabolite a. Furylfuramide ($60 \mu\text{M}$ in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.7) was incubated at 37°C in the absence (part A) and presence (part B) of 38 nM rabbit liver NADPH-cytochrome P-450 reductase with an NADPH-generating system present in both cases. The absorbance scale was 0–0.2 and spectra were recorded every 100s.

第4節 考察

本研究においてはニトロフラン誘導体furylfuramideがヒト及びラットのP-450酵素による酸化的代謝によって生物活性が変化するか否かを調べた。以下に述べる結果から、ヒトP4501A2並びにMC誘導性ラットP4501A1及び1A2がfurylfuramideをS. typhimurium TA1535/pSK1002においてumu遺伝子を発現しない代謝物に変換することが明確となった。

第1に、furylfuramideは、ヒト及びラット肝ミクロゾームによって、反応時間、基質濃度及びP-450酵素量に依存して、好気的に不活性化された。第2に、ヒト及びラット肝ミクロゾームのfurylfuramide不活性化代謝は一酸化炭素及び α -naphthoflavoneによって阻害されたが、metyraponeとSKF-525Aには阻害されなかった。第3に、ラットMC誘導型P-450酵素の抗体がヒトとラットの肝ミクロゾームによる不活性化を阻害した。さらにヒトP4501A2抗体がヒト肝ミクロゾームのfurylfuramideの不活性化を顕著に阻害した。最後に、ヒト7検体中の免疫化学的に求めたP4501A2量がfurylfuramideの不活性化活性とよく相関した。このタンパク量はヒト肝ミクロゾームにおいてヒトP-450 1A2によって触媒されることが知られているMeIQの代謝的活性化並びにethoxyresorufin脱エチル化反応^{12, 16)}とも良好な相関関係があった。最近、ヒトP4501A2はいくつかの発癌性物質、すなわち、MeIQ、2-amino-3-methyl-imidazo[4, 5-f]quinoline、2-amino-3, 8-di-methylimidazo[4, 5-f]quinoline、3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4, 3-b]indole、2-amino-6-methyldipyrido[1, 2-a:3', 2'-d]imidazole、2-aminodipyrido[1, 2-a:3', 2'-d]imidazole、2-aminoanthracene、2-acetylaminofluorene、2-aminofluorene及び4-aminobiphenylの代謝的活性化に関与する主要なP-450分子種であることが報告された^{12, 16)}。この酵素は喫煙や焼け焦げを含む食品の摂取によって誘導されることが報告されている^{142, 143)}。本研究の結果は、ヒトP4501A2が発癌性物質の代謝的活性化ばかりでなく、furylfuramideのような変異原性物質の不活性化にも寄与することを示しており、大変興味深い。

P4501A1はラットではMCによって誘導される低スピニ型のP-450酵素で、発癌性芳香族炭化水素の活性化に寄与している^{4, 5)}。抗体による阻害実験から、MC処置ラットにおいてはP4501A2と同様に、P4501A1の関与も示唆された。用いたポリクローナル抗体はラットのこれらの分子種と互いに交差反応を示すため、P4501A1の反応への寄与の証明にはさらに詳細な研究が必要である。しかしながら、ヒトではP4501A1抗体は肝ミクロゾームによるfurylfuramideの不活性化の阻害作用が弱かった。P4501A2抗体がミクロゾームのfurylfuramide不

活性化反応を強く阻害したので、ヒト肝ミクロゾームにおいてはラットP4501A2²²⁾に対応するヒトP4501A2(phenacetin脱エチル化酵素)がfurylfuramideの不活性化反応を触媒する主要な酵素であることが示唆された。また実際に、ヒト肝ミクロゾームでは、P4501A1オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするmRNA量及びラットP4501A1と免疫化学的に反応するタンパク量も極めて低いレベルであることが報告されている^{146, 147)}。

NADPH-P-450還元酵素自体が脂質との再構成系において、furylfuramideを強く不活性化することを見いだした。しかし、前述のとおり、P4501A2抗体が著しくヒトとラット肝ミクロゾームによるfurylfuramideの不活化を阻害し、ヒト各検体によるこの不活性化がヒト肝ミクロゾームのP4501A2に触媒される酵素反応と良好な相関性を示したことから、furylfuramideの不活性化反応にはP-450酵素に依存した酸化反応が関与していることが示唆された。また本研究ではNADPH-P-450還元酵素とミクロゾームのP-450酸化反応との代謝反応の違いも明らかにした。

Furylfuramideの反応生成物については不明であり、現在この問題についての報告もなされていない。興味深いことは、主要代謝物が速やかに更に代謝されることである。その反応速度は少なくとも数百nmol/min/nmol P-450であり、P-450酵素のうちごく一部が機能すれば、反応速度はもっと高くなるであろう。NADPH-P-450還元酵素を用いた実験から、明らかに還元のみによってもfurylfuramideの不活性化が起こりことが明確になった。この過程で酸素が必要かどうかわからないが、多分ラジカル反応であると推測される。さらに不明なことは、還元酵素とP-450酵素の生成物が同じであるか否かである。少なくとも、Fig. 4-6に示した代謝物のひとつピークaは両システムにおいて生成するものと推察され(Fig. 4-7)、この化合物の生成が速いことから、両方において、はじめに生成するものと思われる。この化合物の構造は不明であるが、吸収スペクトルからニトロ基を保持していることが示唆される。DNA付加体の検討や試験菌株のニトロ還元酵素やアセチル転移酵素の役割が調べられていないので、この化合物自体が直接的なDNA損傷性を持つか否かはわからない。

ピークaの生成と分解速度から、ミクロゾーム中のNADPH-P-450還元酵素の寄与率を見積もることが可能である。ウサギとヒト肝のNADPH-P-450還元酵素の酵素活性は同様であり¹⁴⁸⁾、ヒト肝ミクロゾームにおける酵素活性100 nmol NADPH-チトクロームc還元/min/mg ヒト肝ミクロゾームタンパク¹⁴⁹⁾、分子量80,000^{105,148)}、酵素活性 5×10^4 nmol チトクロームc還元/min/mg NADPH-P-450還元酵素及び0.5nmol P-450/mgヒト肝ミクロゾームタンパク(実験値)の値から計算すると、ヒト肝ミクロゾームタンパク当たり約0.025 nmol NADPH-P-450還元酵素となり、ミクロゾーム中ではピークaの生成と分解のうち還元酵素による直接的な不活性化はP-450酵素の反応の約15-25%相当分にすぎない。このことは、本研究で証明したfurylfuramideの代謝的不活性化におけるP-450酵素の役割を支持している。

Furylfuramideの代謝研究から、ピークaのDNA損傷性における本当の役割が明らかになっていない。ラットに芳香族炭化水素を前処置すると、umuテストで調べた結果、肝ミクロゾームのfurylfuramideの代謝的不活性化が劇的に増強されるが、furylfuramideから生じるピークaの生成速度は変化しなかった(Pig. 4-7と同様にスペクトルから調べた)。更に、 α -naphthoflavone (0.1 mM)を加えてもヒト肝ミクロゾームによるfurylfuramideの変換速度は変化しなかったが、umuテストにおいてはこの阻害剤の影響は劇的であった。またヒト肝ミクロゾームで代謝させる際に α -naphthoflavone存在下と非存在下において、HPLCで代謝物を検索しても、415nmにおける吸収から速度論的解析を行っても、いずれも代謝反応にも差は認められなかった。このように、furylfuramideの不活性化反応機構については、解決すべき問題が残っている。

総括及び結論

第1節 総 括

ヒトの癌の原因の約80%以上は発癌性物質によるものと考えられている。それらの多くはそれ自身では不活性な物質であり、生体内で代謝的に活性化され、その発癌作用を発現することが知られている。この発癌性物質の代謝的活性化には、チトクロームP-450酵素が最も重要な働きを示すが、近年、このP-450酵素に関して重要な発見がなされている。すなわち、P-450酵素には多くの分子種が存在すること、発癌性物質の代謝的活性化においてはそれぞれ特異的P-450分子種が関与すること、並びに発癌性物質が生体内でそれ自体が基質となるP-450分子種を誘導すること等である。更に最近の研究成果では、発癌性物質の代謝的活性化又は不活性化に関与するP-450分子種に実験動物とヒトとに差異が見られる例も示されている。アフラトキシンB₁に代表される発癌性マイコトキシン類及びベンツピレン-7,8-ジオール等の活性化は、ラットではそれぞれP4502C及び1A酵素に触媒されるが、ヒトでは主として両者ともにP4503A酵素が活性化反応に関与する。このように、実験動物での結果が必ずしもヒトへの外挿につながらない場合が認められ、化学物質の毒性発現と生体内代謝の関係につきヒトでの詳細な検討が望まれている。したがって、環境中に存在する発癌性物質の代謝的活性化に関するヒト又は実験動物のP-450分子種を明らかにすることは癌研究の重要な一端を占めることと考えられる。

多数存在する発癌性物質のうち、ニトロソ化合物の特徴は、タバコ、化粧品及び食品等の環境中に広く存在すること、医薬品等に含まれるアミン類から生体内でニトロソアミン類が生成し得ること、並びにその強力な発癌性には種及び臓器特異性があることが挙げられる。しかしながら、なかでも強力な発癌性をもつニトロソジアルキルアミン類はP-450酵素によって脱アルキル化反応を受けることは知られているが、その変異原性は検出され難いため、

生物活性を指標とする活性化酵素の検討はなされていない。また発癌性物質のなかでも、比較的初期にその強力な発癌性が証明され、近年その一部に動物肝のP-450酵素の誘導作用が証明されたアミノアゾ色素がある。しかしながら、これらの発癌作用を発現する上で必要な活性化反応を触媒する酵素については不明な点が多く、代謝的活性化機構についてはよくわかつていない。そこで、本研究では、環境中の化学物質による発癌機構におけるP-450酵素の役割の解明を目的として、発癌性物質の優れたプレスクリーニング法であるAmes法、肝細胞初代培養／DNA修復テスト又はSOS遺伝子のひとつであるumu遺伝子の誘導を利用したumuテストを用いてDNA障害を指標に以下の諸研究を行った。

第1章では、標的臓器に動物種差が知られているニトロソプロパノールアミン類の各種動物及びヒトにおける活性化について主にAmes法における変異原性活性を指標に検討した。第2章では、ニトロソ化合物の中でも代表的なニトロソジメチル及びジエチルアミンのラットP4502E1酵素による活性化について、umuテストを用いてDNA障害に伴う生物活性を指標に検討した。試験菌株には、アセチル転移酵素の遺伝子を持つプラスミドを新たに導入した菌種を用い、ニトロソジアルキルアミン類の代謝経路の推定を行った。第3章では、バターエローとして食品添加物に使用されたこともあるアミノアゾ色素類の中から、ラットに対して肝癌を誘発し、しかもP4501A2酵素を選択的に誘導する3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼンを選び、この代謝的活性化におけるラット及びヒトの種々のP-450酵素について、umuテストを用いて研究を行った。第4章では、発癌性物質のP-450酵素による不活性化に焦点を変えて、保存料の目的で食品添加物に使用されていたが、発癌性の疑いから使用禁止となったニトロフラン化合物フリルフラミド(AF-2)の生体内酵素による不活性化についてもumuテストを用いて検討した。

ニトロソプロパノールアミン誘導体の一部は環境中に検出され、その実験動物に対する発癌作用は、ヒトの有用な肺癌あるいは膵癌モデルであることが知られている。これらの活性化機構をin vitroで検討した。肝細胞初代培養／DNA修復テストは、ラット肝細胞を用いて、

DNA障害が修復される際に行われる放射性チミジンの核への取り込みを利用してDNA損傷性を検出する方法であるが、本法においては、調べた9種のうち8種のニトロソプロパノールアミン誘導体が、ラットの正常肝細胞にDNA損傷性を示すことが判明した。Ames法においては、塩基置換型S. typhimurium TA100株に対して5種動物（ラット、ハムスター、マウス、ウサギ、サル）肝9,000g上清(S9)存在下において7種の化合物が活性化され、ポリ塩化ビフェニル(PCB)又はフェノバルビタール(PB)前処置した各種齧歯類肝S9によって9種すべてのニトロソプロパノールアミン誘導体が明らかな変異原性を示し、酵素誘導によってこれら活性も明らかに上昇した。ヒト肝S9によってはメチルプロパノール誘導体のみが活性化された。

これらの活性化反応は、補酵素としてNADPHを要求し、P-450酵素の阻害剤である一酸化炭素及びmetyraponeによって阻害されたが、メチルコランスレン(MC)の誘導作用及び α -naphthoflavoneの阻害作用が認められなかったことから、反応を触媒する酵素はミクロゾームに局在するP-450酵素であり、MC誘導型のP4501A酵素よりも、PB誘導型のP4502B酵素がいずれの動物においても主要な役割を果たすことが示唆された。さらに未誘導の動物やヒトにおいても同様にP-450阻害剤の影響が認められことから、内因性のP-450分子種の関与も推察された。またジプロパノール誘導体がラット肝ミクロゾームのP-450酵素の誘導作用を持たないことは、これらのニトロソアミン類は発癌過程における長期の摂取によっても誘導を必要としない常在成分であるP-450分子種によって活性化されること、並びにこのジプロパノール誘導体が一回投与によっても生体内で速やかに吸収、分布、代謝及び排泄され、肺癌を高率に発生させることとの関連を強く示唆している。

ニトロソプロパノールアミン誘導体の肝外臓器S9による活性化では、メチルプロパノール誘導体のPCB誘導動物の肺による活性化のみが認められた。ニトロソプロピルアミン誘導体を投与したラット又はハムスターの標的臓器のDNA及びRNAの付加生成物の分析より、メチル化を引き起こす構造をした代謝物の生成が示唆されていることから、ニトロソプロパノールアミン誘導体の肺癌発生作用発現において、肝のP-450酵素による代謝的活性化が必要で

あり、中間代謝物と考えられるメチル誘導体の生成が重要であることを示唆している。これらによる標的臓器には動物種差の存在することが従来から指摘されていたが、代謝活性化酵素には、種差は認められず、P-450酵素によるこれらの活性化機構は類似することが考えられる。以上のように現在の段階では、癌発生の種差を説明する実験的根拠は得られていないが、一つの可能性として、肝臓において生成した中間代謝物の、標的臓器における反応の違いによることも考えられる。

ラット肝ミクロソームP-450酵素のニトロソジアルキルアミンの活性化における役割を明らかにするため、最も代表的なニトロソジメチルアミンとニトロソジエチルアミンを取り上げ、umuテストの新しい試験菌株*S. typhimurium* NM2009を用いて検討した。この菌株は、通常の*S. typhimurium* TA1535/pSK1002にアセチル転移酵素の遺伝子を持つプラスミドを導入して作成されており、ある種の発癌性芳香族アミン類のDNA障害の検出に優れた菌株であることが証明されている。ニトロソジアルキルアミンの活性化はラットをP4502E1酵素の誘導剤であるイソニアジド、エタノール及びアセトン並びに絶食処置によって増強され、これらによる活性化はP4502E1特異抗体及びP4502E1阻害剤であるジエチルジチオカルバメート又は4-メチルピラゾールによって阻害された。精製P-450酵素の再構成系においてはP4502E1酵素による活性化が最も高く、P4502E1酵素反応の特徴であるチトクロームb₅の活性促進効果も認められた。今回の実験結果から、ニトロソジメチルアミンとニトロソジエチルアミンは、ラット肝P4502E1酵素によって活性化され、DNA障害を引き起こすことが示唆された。

ニトロソジアルキルアミンの活性中間体α-ヒドロキシ体は非常に不安定であると考えられるため、酵素的加水分解で容易にα-ヒドロキシ体を生じるα-アセトキシ体がニトロソアミンの代謝的活性化のモデル化合物として最近使われている。この化合物を用いてニトロソジアルキルアミンの代謝的活性化機構の推定を行った。このモデル化合物は、エステラーゼ共存下にアセチル転移酵素導入株での活性は極めて高く、またその活性化はアセチル転移酵素阻害剤ペンタクロロフェノールによって阻害された。それに対して、アセチル転移酵素欠

損株(*S. typhimurium* NM2000)での活性は導入株の場合の約30%と低く、阻害剤の影響も受けなかった。このことは、ニトロソジアルキルアミンのP-450酵素による活性化反応において、 α 炭素の水酸化によって生成する反応中間体アルキルジアゾヒドロキシドが、従来考えられていた非酵素的に分解されて生じるジアゾニウムイオンによる活性化に加えて、アセチル転移酵素によってその活性化がおこる経路も存在することが強く示唆された。以上の結果から、ニトロソアミン類による発癌作用の理解のためには、代謝の初発段階に活性化に関与するP-450酵素の量あるいは性質が重要であることを示唆している。

P-450酵素による発癌性物質の活性化反応は、それぞれの化合物に特異的な分子種によって触媒されており、また癌化の初期に物質自身が基質となりP-450酵素の生合成を促進し、誘導された分子種によって代謝的活性化を受けて発癌性を発揮すると考えられているものもある。3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼンはラットP4501A2の選択的誘導剤であるが、その代謝的活性化に関する酵素は報告されていなかった。そこで、ヒト及びラットのP-450酵素の活性化における役割を調べた。ラットでは種々の典型的なP-450誘導剤を前処置することによっていずれも活性が上昇し、PB処置が最も高い活性を示した。またラット及びヒトともに特定の分子種の含量が多いと考えられるミクロゾームの活性化に対しては、それぞれにP-450阻害剤、促進剤並びにP-450特異抗体の影響が予想どおりに認められた。またヒト及びラット肝の各ミクロゾームの3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼン活性化能と総P-450含量の間に良好な相関関係が認められた。精製P-450酵素の再構成系によっても、各P450分子種により程度の差は認められるものの、いずれも明らかな活性化が認められた。以上の結果から、3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼンの代謝的活性化はヒトとラットともに非常に幅広いP-450分子種(P4501A、2B、2C、2E、3A)により代謝的に活性化されることが明らかとなった。このことは、発癌性物質によって誘導された特異的タンパク以外の幅広い酵素によっても誘導剤自身が代謝されること示しており、更にP-450酵素の基質特異性の広さを示すこととなった。P-450酵素による反応に引き続いて作用するアセチル転移酵素を導入した先の試験菌株を用

いて調べたところ、活性が更に上昇し、他の芳香族アミン類と同様に、本化学物質がP-450による代謝反応に引き続いてアセチル抱合を経て究極発癌物質に変換されることが示唆された。

P-450酵素の広範な発癌性物質の活性化の研究に対して、不活性への関与についての報告はほとんど見あたらない。この点に注目して、直接変異原物質フリルフラミドのラット及びヒトのP-450酵素による代謝的不活性化を調べた。フリルフラミドは、ヒト及びラット肝ミクロソームによって代謝的に不活性化された。この不活性化反応は、P-450阻害剤である一酸化炭素及び α -naphthoflavone並びにP4501A抗体によって抑制された。ラットにP-450誘導剤を処置すると、MC処置によってのみ不活性化が促進された。ヒト肝各検体のフリルフラミド不活性化活性とP4501A2酵素量には良好な相関関係が認められた。再構成の検討時に、フリルフラミドがNADPH-P-450還元酵素によっても不活性化されることが明らかとなった。これらの酵素による代謝産物をHPLCで検索したところ、ミクロソームを用いると、4つの未知ピークが検出されたのに対し、NADPH-P-450還元酵素の場合は、基質がほとんど代謝され、1つの代謝物ピークaが痕跡程度検出されるのみであった。以上の結果をまとめると、この不活性化反応は主としてヒト及びラットP4501A酵素により触媒されDNA障害能を欠く代謝物に変換され、一部は異なるメカニズムでNADPH-P-450還元酵素によっても反応の進むことが示唆された。P4501A酵素は多くの発癌性芳香族化合物の代謝的活性化反応を効率よく触媒することが知られており、本研究の結果は、P4501A酵素の新しい側面を指摘することとなった。

第2節 結 論

近年ヒトを含む各種動物の肝ミクロソームを用いた研究から、環境中に存在する広範な発癌性物質の代謝的活性化に種々のP-450酵素が関与することが指摘されてきた。しかしながら、いくつかの物質の活性化機構には反応に関与する酵素の種類又は活性化への代謝経路に

不明な点が多い。環境中の様々な発癌性物質の癌発生機構の解明のためには、物質の生体内での代謝を理解することが重要であり、今回、従来十分に検討されていない数種の発癌性物質のラット及びヒトP-450酵素による代謝的活性化を調べ、以下の結論を得た。

1. ニトロソプロパノールアミン誘導体は実験動物に対して肺又は脾に癌を引き起こすが、各種臓器を酵素源とする Ames 試験を用いて検討したところ、主に肝のP-450酵素系においてのみ活性化されることが明らかとなった。このことは、ニトロソプロパノールアミン誘導体の癌発生過程において肝のP-450酵素の働きによって生成される中間代謝物の代謝が重要であることを示唆している。

2. ニトロソジメチルアミンとニトロソジエチルアミンの活性化をアセチル転移酵素を導入した試験菌株を用いる方法で調べたところ、両者ともラットP4502E1酵素により活性化されることが判明した。しかも、この活性化には反応中間体アルキルジアゾヒドロキシドの脱水反応以外に、アセチル化反応によっても活性化されることが示唆された。このことは、ニトロソジアルキルアミンの活性化機構の研究領域において新しい展開となることが考えられる。

3. 3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼンは、ラット及びヒトの幅広いP-450分子種により活性化されることが明らかとなった。3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼン自身はラットP4501A2の選択的な誘導作用を持つが、この結果は、発癌性物質によって誘導された特異的P-450酵素以外の幅広い分子種によっても3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼンが代謝されること示している。このように、3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼンにより誘導されるP-450以外にもこの物質自身が代謝され得るという興味深い知見が得られた。

4. フリルフラミドは強力な変異原性を示すが、動物実験における発癌性はほとんど報告されていない。そこで、この物質の生体での代謝を調べたところ、ヒト及びラットP4501A酵素によりDNA障害能を欠く代謝物に変換されること、そして、一部は異なる機構でNADPH-P-

P-450還元酵素によっても不活性化されることが示唆された。今回の結果は、強力な変異原性物質フリルフラミドが生体内酵素により、容易に不活性化されることを示唆している。

このように環境中の化学物質による発癌作用を解明するためには、実験動物及び特にヒトにおけるP-450酵素の役割に関する理解が必要であり、本研究の成果はP-450酵素の発癌性物質の代謝に関して新しい知見を加えることができた。

謝　　辞

本論文の作成に対して終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました大阪大学薬学部　近藤雅臣教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、常に暖い御助言と御便宜を賜った大阪府立公衆衛生研究所　小町喜男所長、同薬事指導部　田中涼一部長に深謝いたします。

本研究を行うにあたり、終始適切な御指導と御助力を賜りました大阪府立公衆衛生研究所　島田　力博士に心から感謝の意を表します。

実験について御助力と御助言を賜ったバンダービルト大学医学部　F. Peter Guengerich教授、大阪市立大学医学部　船江良彦教授、今岡　進博士、東北大学薬学部　出川雅邦博士並びに大阪府立公衆衛生研究所　小田美光博士に謹んで御礼申し上げます。

さらに本研究の遂行に際しまして御協力と御支持をいただきました大阪府立公衆衛生研究所の所員の方々、なかでも薬事指導部　横山　浩副部長をはじめ部員の方々に対して感謝いたします。また種々御便宜を図っていただきました大阪大学薬学部衛生化学講座の方々に厚く御礼申し上げます。

終わりになりましたが、本研究のスタートとなったニトロソアミン類の代謝と毒性について御指導を賜りました恩師、岐阜薬科大学　豊吉一美名誉教授、森　幸雄助教授ならびに放射化学研究施設の方々に対しましてここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

- 1) R. Doll, and R. Peto, *J. Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1191 (1981).
- 2) C. Heidelberger, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 79 (1975).
- 3) E.C. Miller, and J.A. Miller, "The Molecular Biology of Cancer", ed. by H. Busch, Academic Press, Inc., New York, 1974, pp. 377-402.
- 4) A.H. Conney, *Cancer Res.*, **42**, 4875 (1982).
- 5) F.P. Guengerich, *Cancer Res.*, **48**, 2946 (1988).
- 6) F.P. Guengerich, and T. Shimada, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 391 (1991).
- 7) E.C. Miller, and J.A. Miller, *Cancer*, **47**, 2327 (1981).
- 8) F.P. Guengerich, *Pharmac. Ther.*, **6**, 99 (1979).
- 9) A.Y.H. Lu, and S.B. West, *Pharm Rev.* **31**, 277 (1980).
- 10) T. Shimada, and S. Nakamura, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1979 (1987).
- 11) T. Shimada, S. Nakamura, S. Imaoka, and Y. Funae, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **91**, 13 (1987).
- 12) T. Shimada, and Y. Okuda, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 459 (1988).
- 13) P.G. Wislocki, G.T. Miwa, and A.Y.H. Lu, "Enzymatic Basis of Detoxication", ed. by W.B. Jakoby, Academic Press, New York, Vol. 1, 1980, pp. 135-182.
- 14) F.P. Guengerich, "Mammalian Cytochrome P-450", ed. by F.P. Guengerich, CRC Press, Boca Raton, FL, Vols. 1 and 2, 1987.
- 15) D.W. Nebert, D.R.A. Nelson, M.J. Coon, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, Y. Fujii-Kuriyama, F.J. Gonzalez, F.P. Guengerich, I.C. Gunsalus, E.F. Johnson, J.C. Loper, R. Sato, M.R. Waterman, and D.J. Waxman, *DNA Cell Biol.*, **10**, 1 (1991).

- 16) T. Shimada, M. Iwasaki, M.V. Martin, and F.P. Guengerich, *Cancer Res.*, **49**, 3218 (1989).
- 17) T. Shimada, and F.P. Guengerich, *Cancer Res.* **50**, 2036 (1990).
- 18) T. Shimada, M.V. Martin, D. Pruess-Schwartz, L.J. Marnett, and F.P. Guengerich, *Cancer Res.*, **49**, 6304 (1989).
- 19) T. Shimada, and F.P. Guengerich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 462 (1989).
- 20) A.R. Tricker, and R. Preussmann, *Mutat Res.*, **259**, 277 (1991).
- 21) R. Preussmann, and B.W. Stewart, "Chemical Carcinogens", ed. by C.E. Searle, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., Vol. 2, 1984, pp. 643-828.
- 22) H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovics and D. Schmahl, *Z. Krebsforsch.*, **69**, 103 (1967).
- 23) W. Lijinsky, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **108**, 46 (1984).
- 24) B. Spiegelhalder, and R. Preussmann, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **108**, 160 (1984).
- 25) R. Preussmann, and G. Einbrand, "Chemical Carcinogens", ed. by C.E. Searle, Amer. Chem. Soc., Washington, D.C., Vol. 2, 1984, pp. 829-868.
- 26) D. Hoffmann, and S.S. Hecht, *Cancer Res.*, **45**, 935 (1985).
- 27) T. Shimada, and F.P. Guengerich, *Cancer Res.*, **51**, in press (1991).
- 28) S.S. Hecht, and J.B. Morrison, *Cancer Res.*, **44**, 2873 (1984).
- 29) D.Y. Lai, and J.C. Arcos, *Life Sci.*, **27**, 2149 (1980).
- 30) P. Issenberg, E.E. Conrad, J.W. Nielsen, D.A. Klein, and E.C. Miller, "N-Nitroso Compounds : Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer", eds. by I.K. O'Neill, V.C. von Borstel, J. Miller, and H. Bartsch, IARC Scientific Publications, No. 57, International Agency for Research on

- Cancer, Lyon, 1984, pp. 43-50.
- 31) P. Pour, F.W. Kruger, J. Althoff, A. Cardesa, and U. Mohr, hamster. Am. J. Pathol., 76, 349 (1974)
- 32) P.M. Pour, and R.B. Wilson, "Tumors of the Pancreas", ed. by A.R. Moosa, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1980, pp. 37-158.
- 33) P. Pour, R. Gingell, R. Langenbach, D. Nagel, C. Grandjean, T. Lawson, and S. Salmasi, Cancer Res., 40, 3585 (1980).
- 34) P. Pour, J. Althoff, R. Gingell, R. Kupper, K. Kruger, and U. Mohr, Cancer Res., 36, 2877 (1976).
- 35) W. Lijinsky, "N-Nitroso Compounds : Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer", eds. by I.K. O'Neill, V.C. von Borstel, J. Miller, and H. Bartsch, IARC Scientific Publications, No. 57, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1984, pp. 617-626.
- 36) W. Lijinsky, J.E. Saavedra, and M.D. Reuber, Carcinogenesis, 5, 167 (1984).
- 37) W. Lijinsky, and M.D. Reuber, Cancer Lett., 22, 83 (1984).
- 38) W. Lijinsky, M.D. Reuber, J.E. Saavedra, and G.M. Singer, J. Natl. Cancer Inst., 70, 959 (1983).
- 39) W. Lijinsky, M.D. Reuber, and H.M. Reznik-Schuller, Cancer Lett., 16, 281 (1982).
- 40) P. Pour, S. Salmasi, R. Runge, R. Gingell, L. Wallcave, D. Nagel, and K. Stepan, J. Natl. Cancer Inst., 63, 181 (1979).
- 41) Y. Konishi, A. Denda, S. Takahashi, H. Maruyama, Y. Yokose, Y. Mori, M. Matsui, and K. Toyoshi, "N-Nitroso Compounds: Occurrence and Biological Effects", eds by H. Bartsch, I.K. O'Neill, M. Castegnaro, and M. Okada, IARC Scientific

Publications, No. 41, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1982,
pp. 611-618.

- 42) Y. Konishi, A. Denda, H. Kondo, and S. Takahashi, Gann, **67**, 773 (1976).
- 43) Y. Konishi, H. Kondo, S. Inui, A. Denda, T. Ikeda, and K. Kojima, Gann, **69**, 77 (1978).
- 44) U. Green, Y. Konishi, M.B. Ketkar, and J. Althoff, Cancer Lett., **9**, 257 (1980).
- 45) H. Kondo, T. Ikeda, Y. Yoshimura, H. Hoshimura, and Y. Konishi, Cancer Lett., **5**, 339 (1978).
- 46) R. Kinosita, Gann, **30**, 423 (1936).
- 47) J.A. Miller, and C.A. Baumann, Cancer Res., **5**, 227 (1945).
- 48) J.A. Miller, and E.C. Miller, Adv. Cancer Res., **1**, 399 (1953).
- 49) J.A. Miller, and E.C. Miller, J. Exp. Med., **87**, 139 (1948).
- 50) K. Kawajiri, H. Yonekawa, O. Gotoh, J. Watanabe, S. Igarashi, and Y. Tagashira, Cancer Res., **43**, 819 (1983).
- 51) M. Degawa, M. Kojima, T. Masuko, T. Hishinuma, and Y. Hashimoto, Biochem. Biophys. Res. Commun., **133**, 1072 (1985).
- 52) M. Degawa, M. Kojima, and Y. Hashimoto, Mutat. Res., **152**, 125 (1985).
- 53) B.N. Ames, J. McCann, and E. Yamasaki, Mutat. Res., **31**, 347 (1975).
- 54) D.M. Maron, and B.N. Ames, Mutat. Res., **113**, 172 (1983).
- 55) Y. Oda, S. Nakamura, I. Oki, T. Kato, and H. Shinagawa, Mutat. Res. **147**, 219 (1985).
- 56) S. Nakamura, Y. Oda, T. Shimada, I. Oki, and K. Sugimoto, Mutat Res., **192**, 239 (1987).

- 57) M. Watanabe, M. Ishidate Jr., and T. Nohmi, *Mutat. Res.*, **234**, 337 (1990).
- 58) G.M. Williams, M.F. Laspia, and V.C. Dunkel, *Mutat. Res.*, **97**, 357 (1982).
- 59) T. Ikeda, *Jap. J. Genetics.*, **48**, 301 (1973).
- 60) N. Nakamura, N. Suzuki, and S. Okada, *Mutat. Res.*, **46**, 355 (1977).
- 61) Y. Tajima, T. Kada, and A. Murakami, *Mutat. Res.*, **32**, 55 (1975).
- 62) R. Gingell, G. Brunk, D. Nagel, L. Wallcave, B. Walker, and P. Pour, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 157 (1980).
- 63) R. Langenbach, R. Gingell, C. Kuszynski, B. Walker, D. Nagel, and P. Pour, *Cancer Res.*, **40**, 3463 (1980).
- 64) D.G. Scarpelli, M.S. Rao, V. Subbarao, M. Beversluis, D.P. Gurka, and P.F. Hollenberg, *Cancer Res.*, **40**, 67 (1980).
- 65) P. Wislocki, and R. Gingell, *R. Mutat. Res.*, **77**, 215 (1980).
- 66) E. Zeiger, and A. Sheldon, *Mutat. Res.*, **57**, 1 (1978).
- 67) A. Camus, B. Bertram, F.K. Kruger, C. Malaveille, and H. Bartsch, *Z. Krebsforsch.*, **86**, 293 (1976).
- 68) W. Lijinsky, and A.W. Andrews, *Mutat. Res.*, **111**, 135 (1983).
- 69) T.K. Rao, J.A. Young, W. Lijinsky, and J.L. Epler, *Mutat. Res.*, **66**, 1 (1979).
- 70) W. Lijinsky, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **209B**, 141 (1986).
- 71) Y. Mori, T. Niwa, H. Takahashi, K. Toyoshi, A. Denda, S. Takahashi, and Y. Konishi, *Cancer Lett.*, **18**, 271 (1983).
- 72) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.L. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 73) T. Omura, and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
- 74) K.A.M. Johannessen, and J.W. Depierre, *Analyt. Biochem.*, **86**, 725 (1978).

- 75) F.P. Guengerich, "Principles and Methods of Toxicology", ed. by A.W. Hayes, Raven Press, New York, 1982, pp. 609-634.
- 76) D. Maron, J. Katzenellenbogen, and B.N. Ames, *Mutat. Res.*, **88**, 343 (1981).
- 77) C.E. Phillipson, and C. Ioannides, *Carcinogenesis*, **5**, 1091 (1984).
- 78) T. Yahagi, M. Nagao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, and M. Okada, *Mutat. Res.*, **48**, 121 (1977).
- 79) T.K. Rao, J.A. Young, W. Lijinsky, and J.L. Epler, *Mutat. Res.*, **57**, 127 (1978).
- 80) T.K. Rao, A.A. Hardigree, J.A. Young, W. Lijinsky, and J.L. Epler, *Mutat. Res.*, **56**, 131 (1977).
- 81) G.M. Williams, and M.F. Laspia, *Cancer Lett.*, **6**, 199 (1976).
- 82) A. Araki, M. Muramatsu, and T. Matsushima, *Gann*, **75**, 8 (1984).
- 83) R. Rainei, J.A. Poiley, A.W. Andrews, R.J. Pienta, and W. Lijinsky, *J. Natl. Cancer Inst.*, **67**, 1117 (1981).
- 84) Y. Tagashira, H. Yonekawa, J. Watanabe, E. Hara, J. Hayashi, O. Gotoh, and K. Kawajiri, "P-450 and Chemical Carcinogenesis" eds. by Y. Tagashira, and S. Omura, *GANN Monograph on Cancer Research No. 30*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1985, pp. 69-79.
- 85) E. Denkel, B.L. Pool, J.R. Schlehofer, G. Eisenbrand, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **111**, 149 (1986).
- 86) T.A. Lawson, A.S. Helgeson, C.J. Grandjean, L. Wallcave and D. Nagel, *Carcinogenesis*, **2** 845 (1981).
- 87) R. Gingell, L. Wallcave, D. Nagel, R. Kupper and P. Pour, *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 1175 (1976).

- 88) P. Pour, and T. Lawson, "N-Nitroso Compounds : Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer", eds. by I.K. O'Neill, V.C. von Borstel, J. Miller, and H. Bartsch, IARC Scientific Publications, No. 57, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1984, pp. 683-688.
- 89) B. Underwood, and W. Lijinsky, *Cancer Res.*, **42**, 54 (1982).
- 90) F.W. Kruger, *Z. Krebsforsch.*, **76**, 145 (1971).
- 91) F.W. Kruger, *Z. Krebsforsch.*, **79**, 90 (1973).
- 92) F.W. Kruger, and B. Bertram, *Z. Krebsforsch.*, **80**, 189 (1973).
- 93) W. Lijinsky, *Cancer Lett.*, **26**, 33 (1985).
- 94) T.A. Lawson, R. Gingell, D. Nagel, L.A. Hines, and A. Ross, *Cancer Lett.*, **11**, 251 (1981).
- 95) P.N. Magee, and J.M. Barnes, *Adv. Cancer Res.*, **10**, 163 (1967).
- 96) J-S.H. Yoo, H. Ishizaki, and C.S. Yang, *Carcinogenesis*, **11**, 2239 (1990).
- 97) J-S. Yoo, and C.S. Yang, *Cancer Res.*, **45**, 5569 (1985).
- 98) E. Hietanen, C. Malaveille, F.K. Friedman, S.S. Park, J.-C. Bereziat, G. Brun, H. Bartsch, and H.V. Gelboin, *Cancer Res.*, **46**, 524 (1986).
- 99) Z. Amelizad, K.E. Appel, F. Oesch, and A.G. Hildebrandt, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **144**, 380 (1988).
- 100) J-S.H. Yoo, F.P. Guengerich, and C.S. Yang, *Cancer Res.*, **48**, 1499 (1988).
- 101) F.P. Guengerich, D.-H. Kim, and M. Iwasaki, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 168 (1991).
- 102) P.E. Thomas, S. Bandiera, S.L. Maines, D.E. Ryan, and W. Levin, *Biochemistry*, **26**, 2280 (1987).
- 103) S. Imaoka, Y. Terano, and Y. Funae, *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 168 (1990).

- 104) T. Shimada, K.S. Misono, and F.P. Guengerich, *J. Biol. Chem.*, **261**, 909 (1986).
- 105) Y. Yasukochi, and B.S.S. Masters, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5337 (1976).
- 106) H. Taniguchi, Y. Imai, T. Iyanagi, and R. Sato, *Biochim. Biophys. Acta* **550**, 341 (1979).
- 107) J.H. Miller, "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, pp. 352-355.
- 108) T. Nash, *Biochem. J.*, **55**, 416 (1953).
- 109) C.L. Crespi, B.W. Penman, J.A.E. Leakey, M.P. Arlotto, A. Stark, A., A. Parkinson, T. Turner, D.T. Steimel, K. Rudo, R.L. Davies, and R. Langenbach, *Carcinogenesis*, **11**, 1293 (1990).
- 110) D.E. Feierman, and A.I. Cederbaum, *Biochem. J.*, **239**, 671 (1986).
- 111) W. Levin, P.E. Thomas, N. Oldfield, and D.E. Ryan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **248**, 158 (1986).
- 112) Y. Funae, S. Imaoka, and N. Shimojo, *Biochem. Int.*, **16**, 503 (1988).
- 113) K. Saito, A. Shinohara, T. Kamataki, and R. Kato, *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 286 (1985).
- 114) P. Czygan, H. Greim, A.J. Garro, F. Hutterer, F. Schaffner, H. Popper, O. Rosenthal, and D.Y. Cooper, *Cancer Res.*, **33**, 2983 (1973).
- 115) J.B. Guttenplan, F. Hutterer, and A.J. Garro, *Mutat. Res.*, **35**, 415 (1976).
- 116) H.A. Masson, C. Ioannides, and G.G. Gibson, *Toxicol. Lett.*, **17**, 131 (1983).
- 117) J. Hong, J. C.S. and Yang, *Carcinogenesis*, **6**, 1805 (1985).
- 118) M. Wiessler, and B.L. Pool, *Carcinogenesis*, **5**, 635 (1984).
- 119) D.R. Koop, and M.J. Coon, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **10**, 44S (1986).

- 120) C. L. Crespi, B. W. Penman, D. T. Steimel, H. V. Gelboin, and F. J. Gonzalez, Carcinogenesis, 12, 355 (1991).
- 121) T. Aoyama, F. J. Gonzalez, and H. V. Gelboin, Mol. Carcinogenesis, 1, 253 (1989).
- 122) L. M. Distlerath, P. E. B. Reilly, M. V. Martin, G. G. Davis, G. R. Wilkinson, and F. P. Guengerich, J. Biol. Chem., 260, 9057 (1985).
- 123) F. P. Guengerich, M. V. Martin, P. H. Beaune, P. Kremers, T. Wolff, and D. J. Waxman, J. Biol. Chem., 261, 5051 (1986).
- 124) W. R. Brian, M.-A. Sari, M. Iwasaki, T. Shimada, L. S. Kaminsky, and F. P. Guengerich, Biochemistry, 29, 11280 (1990).
- 125) C. Ged, D. R. Umbenhauer, T. W. Bellew, P. W. Bork, P. K. Srivastava, N. Shinriki, R. S. Lloyd, and F. P. Guengerich, Biochemistry, 27, 6929 (1988).
- 126) W. R. Brian, P. K. Srivastava, D. R. Umbenhauer, R. S. Lloyd, and F. P. Guengerich, Biochemistry, 28, 4993 (1989).
- 127) S. Imaoka, K. Enomoto, Y. Oda, A. Asada, M. Fujimori, T. Shimada, S. Fujita, F. P. Guengerich, and Y. Funae, J. Pharmacol. Exp. Ther., 255, 1385 (1990).
- 128) D. W. Nebert, and H. W. Gelboin, J. Biol. Chem., 243, 6242 (1968).
- 129) R. J. Pohl, and J. R. Fouts, Anal. Biochem., 107, 150 (1980).
- 130) F. F. Kadlubar, J. A. Miller, and E. C. Miller, Cancer Res., 36, 1196 (1976).
- 131) E. C. Miller, F. F. Kadlubar, J. A. Miller, H. C. Pitot, and N. R. Drinkwater, Cancer Res., 39, 3411 (1979).
- 132) S. Imaoka, Y. Terano, and Y. Funae, J. Biochem., 104, 481 (1988).
- 133) T. Yahagi, M. Nagao, K. Hara, T. Matsushima, T. Sugimura, and G. T. Bryan, Cancer Res., 34, 2266 (1974).

- 134) T. Miyaji, Tohoku J. Exp. Med., 103, 331 (1971).
- 135) E.K. Soares, and W. Sheridan, Mutat. Res., 31, 235 (1975).
- 136) H.S. Rosenkranz, and W.T. Speck, Biochem. Pharmacol., 25, 1555 (1976).
- 137) K. Tatsumi, S. Kitamura, and H. Yoshimura, Chem. Pharm. Bull., 25, 2498 (1977).
- 138) T. Kada, Ann. Rep. Natl. Inst. Genet., 24, 39 (1973).
- 139) M.S.S. Murthy, and K.B. Najaria, Mutat. Res., 77, 127 (1980).
- 140) S. Kuwahara, N. Harada, H. Yoshioka, T. Miyata, and T. Omura, J. Biochem., 95, 703 (1984).
- 141) G.A. Dannan, F.P. Guengerich, L.S. Kaminsky, and S.D. Aust, J. Biol. Chem., 258, 1282 (1983).
- 142) E.J. Pantuck, K. Hsiao, A. Maggiog, K. Nakamura, R. Kuntzman, and A.H. Conney, Clin. Pharmacol. Ther., 15, 9 (1974).
- 143) E.J. Pantuck, K. Hsiao, A.H. Conney, W.A. Garland, A. Kappas, K.E. Anderson, and A.P. Alvares, Science, 194, 1055 (1976).
- 144) F.P. Guengerich, G.A. Dannan, S.T. Wright, M.V. Martin, and L.S. Kaminsky, Biochemistry, 21, 6019 (1982).
- 145) D.E. Ryan, S. Iida, A.W. Wood, P.E. Thomas, C.S. Lieber, and W. Levin, J. Biol. Chem., 259, 1239 (1982).
- 146) S.A. Wrighton, C. Campanile, P.E. Thomas, S.L. Maines, P.B. Watkins, G. Parker, G. Mendez-Picon, M. Haniu, J.E. Shively, W. Levin, and P.S. Guzelian, Mol. Pharmacol., 29, 405 (1986).
- 147) T. Cresteil, A.K. Jaiswal, and H.C. Eisen, "Liver Cells and Drugs" ed. by A. Guillouzo, John Libbey Eurotext, London, 1988, pp. 51-58.

- 148) F.P. Guengerich, P. Wang, and P.S. Mason, Biochemistry, 20, 2379 (1981).
- 149) L.M. Distlerath, and F.P. Guengerich, "Mammalian Cytochrome P-450" ed. by F.P. Guengerich, Vol.1, Boca Raton, Florida, CRC Press, 1987, pp 133-198.