

# テトラクロロエチレン, 四塩化炭素およびフェノバルビタール前投与のラット肝ミクロソーム薬物代謝酵素におよぼす影響

著者	石田 彰男
雑誌名	熊本大学教育学部紀要 自然科学
巻	44
ページ	207-212
発行年	1995-12-15
その他の言語のタイトル	The Effects of Tetrachloroethylene, Carbon Tetrachloride and Phenobarbital Pretreatment on Liver Microsomal Drug Metabolizing Enzymes in the Rat
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/2312">http://hdl.handle.net/2298/2312</a>

テトラクロロエチレン, 四塩化炭素  
およびフェノバルビタール前投与の  
ラット肝ミクロゾーム薬物代謝酵素におよぼす影響

石田 彰 男

The Effects of Tetrachloroethylene, Carbon Tetrachloride and  
Phenobarbital Pretreatment on Liver Microsomal Drug  
Metabolizing Enzymes in the Rat

Akio ISHIDA

(Received September 4, 1995)

Pretreatment of rats with phenobarbital resulted in increases in microsomal aminopyrine and 7-pentoxoresorufin dealkylase activity and cytochrome P-450 level per amount of protein in livers. Pretreatment of rats with tetrachloroethylene resulted in an increase of 7-pentoxoresorufin dealkylase activity, but aminopyrin dealkylase activity per amount of protein was decreased. Carbontetrachloride showed no effect. But phenobarbital decreased 7-pentoxoresorufin dealkylase activity per amount of cytochrome P-450, and tetrachloroethylene increased this activity. The CO-difference spectra of liver microsomes showed absorption maxima at 450, 452 and 453 nm with phenobarbital, tetrachloroethylene and carbon tetrachloride, respectively.

These results suggest that tetrachloroethylene may possess the different properties which phenobarbital exhibits in inducing microsomal drug metabolizing enzymes.

**Key words :** Tetrachloroethylene, Carbon Tetrachloride, Cytochrome P-450

I. 緒 言

テトラクロロエチレン (TECE) は工業用溶剤, ドライクリーニング等各種産業に使用されており, 近年トリクロロエチレン (TCE) と共に廃棄や漏出により地下水や大気中等から検出され環境汚染物質として注目されている. TECE は四塩化炭素 (CTC) や TCE 等を代表とする低分子有機塩素系化合物と同様に物質代謝特に脂質の代謝障害作用があると共に肝臓や腎臓の組織障害を引き起こす強力な毒性の発現を示すことが知られている. この CTC や TCE は肝臓の細胞内ミクロゾームのチトクローム P-450 (P-450) により代謝されその毒性の発現や脂質代謝障害は主に薬物代謝酵素系により産生する中間代謝物のフリーラジカルによると言われている<sup>1,2)</sup>. またこの CTC や TCE はチトクローム P-450・2E1 を誘導する物質でそのファミリーの基質であるとされておりフェノバルビタール (PB) で誘導されるチトクローム P-450・2B1 と異なっていると示唆されているが TECE の P-450 はまだ明らかにされていない<sup>3)</sup>.

そこで本研究では TECE の毒性発現機構を究明する為の一環としてラット肝薬物代謝酵素に及ぼす影響について PB, CTC と共に比較検討した.

## II. 実験材料, 試薬および方法

### 動 物

実験には 200~250g のウィスター系雄ラットを用い, スチール製のケージに薬物処置群毎に 2~3 匹ずつ分けて入れ日本農産工業株式会社製のラボMRストック(マウス, ラット用)の固形飼料と水を与え飼育した。

### 試 薬

NADP, NADH とブドウ糖 6 リン酸 (G6P) はベーリンガー・マンハイムまたブドウ糖 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH), 7-ペントキシレゾルフィン (7-PR) はシグマ化学薬品から購入し使用した。アミノピリン (4-ジメチルアミノアンチピリン, AP) は半井テスク株式会社から購入した。

他の一般試薬は市販品特級を使用した。

### 機 器

超遠心分離機は日立 55P-72 型, 分光光度計は日立 124 型ダブルビーム分光光度計 (積分球付属), 恒温振盪器は太洋科学工業パーソナル DX 型を使用した。

### 薬物処置

TECE は 1,000 また 1,500mg/Kg, CTC は 4,000mg/Kg を 1 日 1 回 5 日間経口投与し PB は 40mg/Kg を 1 日 1 回 3 日間腹腔内投与し薬物の最終投与後 24 時間絶食させ屠殺した。肝臓はマイクロゾームを調製するため 50ml の 1.15%KCl で環流し切除した。

### マイクロゾームの調製

1.15%KCl で環流した肝臓の結合組織を除き細断し重量の 3 倍量の 1.15%KCl を加えテフロンガラスホモジナイザーで磨砕した。そのホモジナイズを冷却遠心分離機で  $9,000 \times g$ , 30 分間遠心し細胞膜, 核, ミトコンドリア等を除いた上清を超遠心分離機で  $105,000 \times g$ , 60 分間遠心しマイクロゾーム分画を得た<sup>4)</sup>。

### 酵素反応

AP また 7-PR 脱メチル化酵素活性の測定は生成するホルムアルデヒド量を測定した<sup>5)</sup>。反応液はトリス塩酸緩衝液 (pH: 7.4) を  $100 \mu\text{mole}$ , AP 又は 7-PR の基質を  $10 \mu\text{mole}$ , セミカルバジドを  $10 \mu\text{mole}$ , G6P を  $10 \mu\text{mole}$ , NADP を  $1 \mu\text{mole}$ , G6PDH を 2unit, 塩化マグネシウムを  $10 \mu\text{mole}$  それにマイクロゾームを 0.5ml 入れ全量を 2.0ml にした標準的な反応組成液で行った<sup>6)</sup>。その液を  $37.5^\circ\text{C}$  で 15 分間恒温器で振盪した後 1.0ml の 20%硫酸亜鉛を加えた後飽和水酸化バリウムを 1.0ml 加え反応を停止した。その液を  $3,000 \times g$  で 15 分間遠心し上清を 2.0ml 取りナッシュの試薬を 1.0ml 加え  $60^\circ\text{C}$  で 30 分間振盪後 415nm の吸光度を測定しホルムアルデヒド量を算出した。P-450 量は 大村, 佐藤の方法<sup>7)</sup> により  $100 \mu\text{mol}$  リン酸緩衝液 (pH: 7.4) に 0.5ml のマイクロゾームを入れ全量を 3.0ml にした混液をハイドロサルファイトナトリウムで還元した後試料側に一酸化炭素を暴露して 450nm と 490nm の吸光度差を測定し吸光係数を  $91 \text{nM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  で算出した<sup>8)</sup>。蛋白量はビ

ューレット及びローリーの方法により測定した<sup>9,10)</sup>。

### III. 結果及び考察

#### 1) P-450 量

未処置及び PB, CTC, TECE を前処置したラット肝ミクロゾームの P-450 量を蛋白質量で比較した結果を図 1 に示す。PB は P-450 量を増加させる代表的な薬物であり未処置群に比べ約 3 倍の増加を示した。しかし CTC 群の P-450 量は未処置群に比べ優位な差は認められなかった。TECE 群の P-450 量は 1000mg/Kg 投与群で未処置群との差異は見られなかったが 1500mg/Kg 投与群においては著しい減少が認められた。

PB は H. V. Gelvojn 等<sup>11,12)</sup> が指摘しているようにここには示していないが P-450 量の増加を示すが肝臓の肥大も起こり組織内の蛋白合成が盛んになり全ての蛋白の増加も考えられるが P-450 量の増加の割合が大きい事が考えられる。一方 TECE はむしろその毒性の発現により著しく臓器の萎縮が見られ他の蛋白も減少するがミクロゾームの P-450 量の減少の割合が大きい事が見られた。

#### 2) 一酸化炭素結合差スペクトル

未処置及び PB, CTC, TECE を前処置したラット肝ミクロゾームと一酸化炭素を結合させた差スペクトルを測定した結果を図 2 に示した。未処置と PB 処置では 450nm に最大の吸収を示したが CTC 及び TECE 処置の差スペクトルは幾分

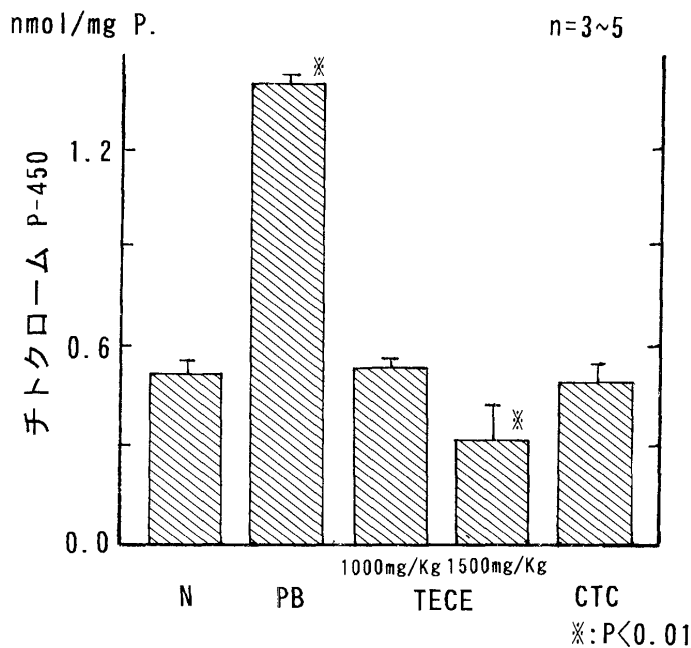


図 1 肝ミクロゾームのチトクローム P-450

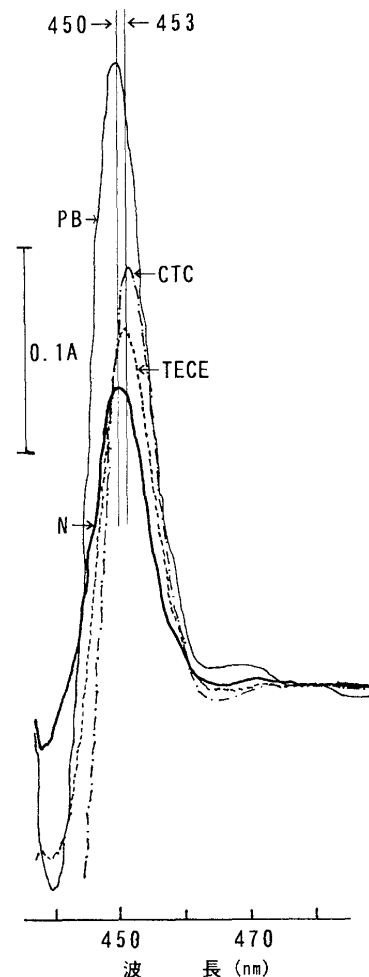


図 2 肝ミクロゾームの一酸化炭素結合差スペクトル  
 蛋白量: N, 1.0mg PB, 0.8mg  
 TECE, 1.2mg CTC, 1.3mg

長波長側にシフトし CTC は 453nm, TECE は 452nm に最大の吸収を示した. 3-メチルコラントレン (3MC) や 3, 4-ベンゾピレン (3, 4-BP) 処置の肝マイクロゾームの差スペクトルは PB 処置のものとの吸収は異なり 448nm に最大吸収を示しこのチトクロームは PB により誘導された P-450 とそれぞれ異なったヘム蛋白であると言われているが<sup>13)</sup>CTC や TECE の処置により得られたマイクロゾームの差スペクトルは未処置及び PB 処置のものとは異なり更には 3MC や 3, 4-BP 処置のものとは異なる吸収を示した事はこのヘム蛋白が何れの P-450 とも異なっているのではないかと考えられる.

### 3) AP 及び 7-PR の脱アルキル化酵素活性

未処置及び PB, CTC, TECE 処置群のマイクロゾームで AP と 7-PR を基質として酵素反応を行い生成したホルムアルデヒド量を測定し蛋白量に対しての脱アルキル化活性を測定した (表 1).

表 1 ミクロゾームの AP 及び 7-PR の脱アルキル化活性

	Mean±SD from 3~5 rats	
	AP	7-PR
Normal	0.38±0.07	0.16±0.05
PB	0.64±0.08*	0.22±0.01***
TECE 1000mg/Kg	0.40±0.01	0.23±0.03
1500mg/Kg	0.25±0.04*	0.23±0.01**
CTC	0.28±0.03	0.20±0.00

nmol/mg P./min.

\*: P<0.01, \*\*: P<0.025, \*\*\*: P<0.05

AP の脱アルキル化活性では未処置群に対して PB 処置群は約 1.7 倍の活性の増加があり優位な差が見られた. 一方 CTC 処置群では優位な差は見られなかった. しかし TECE 処置群は 1000mg/Kg 投与群については優位な差は示さなかったが 1500mg/Kg 投与群で未処置群の約 2/3 とかなりの減少が見られた. 7-PR の脱アルキル化活性でも AP の場合と同様に PB 処置群で未処置群に比較し優位な増加を示したが TECE の 1500mg/Kg 投与群でも増加を示した. CTC においても同様な結果を示したが優位な差は見られなかった. これ等のことは前にも述べているように PB 処置によりマイクロゾームの酵素蛋白の増加が起こることにより差異が生じたと考えられる. しかしこの AP および 7-PR は P-450 により代謝される事が指摘されているので<sup>14)</sup>次に P-450 に対してのアルキル化活性の変動を比較検討した.

### 4) P-450 に対する AP 及び 7-PR の脱アルキル化酵素比活性 (表 2)

PB 処置により AP の脱アルキル化酵素活性は表 1 に示すように未処置群に比較して著しく増加する傾向が見られたが P-450 に対する比活性はやや減少するものの差異は認められなかった. また TECE の 1500mg/Kg 投与群では活性は著しく減少していたが P-450 に対する比活性においては未処置群に対して差は認められなかった. 一方 7-PR で蛋白量に対する酵素活性においては PB 処置群では未処置群に対して増加していたが P-450 に対する比活性で比較するとむしろ逆

表2 ミクロゾームのチトクローム P-450 に対する AP 及び 7-PR の脱アルキル化活性

	Mean±SD from 3~5 rats	
	AP	7-PR
Normal	0.75±0.12	0.31±0.12
PB	0.46±0.14	0.15±0.06 <sup>**</sup>
TECE 1000mg/Kg	0.75±0.01	0.43±0.06
1500mg/Kg	0.80±0.36	0.74±0.15 <sup>*</sup>
CTC	0.57±0.06	0.41±0.01

nmol/mg P./min./P-450  
\*:P<0.025, \*\*:P<0.05

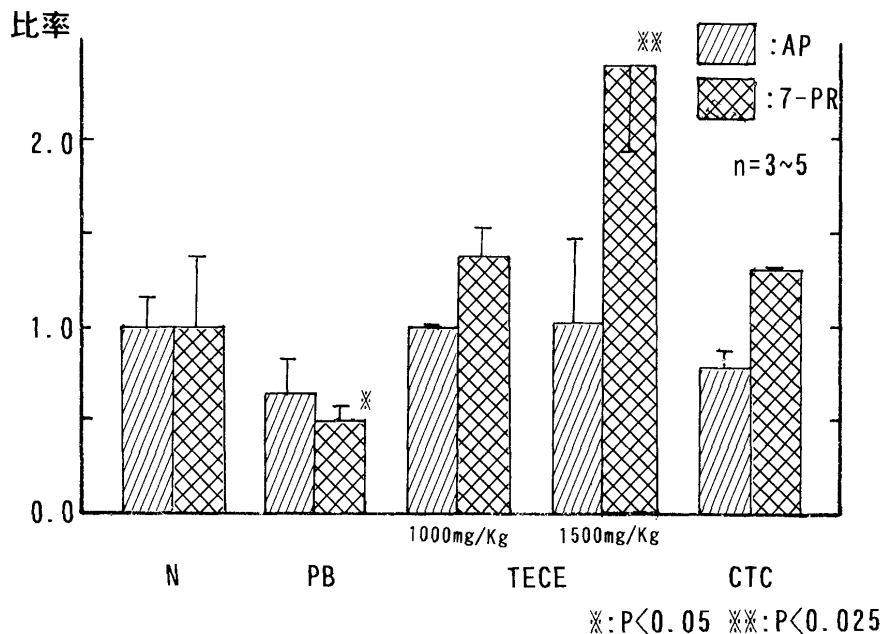


図3 ミクロゾームの P-450 に対する AP 及び 7-PR の脱アルキル化活性の比率 (N=1)

に著しい減少が認められた。TECE 処置群については 1000mg/Kg, 1500mg/Kg 投与群共に増加を示し特に 1500mg/Kg 投与群では約 2 倍強の優位な増加が見られた。CTC においても同様な結果を示した。これらの結果を未処置群に対する比率で表した (図 3)。

PB 処置群で蛋白量に対する AP 及び 7-PR の脱アルキル化活性は優位な増加を示したが P-450 に対する比活性で AP では少しの減少が見られたが優位な差はなくまた 7-PR では約 1/2 以下でむしろ著しい減少が認められた。一方 TECE 群で蛋白量に対する AP の活性では 1500mg/Kg 投与群で優位な減少が見られたが P-450 に対する比活性は未処置群と差異を示さなかった。P-450 に対する 7-PR の活性では 1000mg/Kg 投与群と CTC 投与群でも幾分増加の傾向が見られたが TECE の 1500mg/Kg 投与群で未処置群の 2.4 倍とかなり大きい優位な増加が認められた。

APの脱アルキル化反応は側鎖のメチル基の脱メチル化反応であり7-PRの側鎖のアルキル基の反応と異なった酵素反応であろうと示唆されている事<sup>15)</sup>を考えるとAPと7-PRに対するPBとTECEの反応態度からPBにより誘導されたP-450とTECEにより生じるP-450とは異なった種類のものであろうと考えられる。

#### IV. 結 語

チトクロームP-450は現在数多くの種類が見つけられているがテトラクロロエチレンにより生じるP-450はまだ明らかにされていない。本研究ではアミノピリンと7-ペントキシレゾルフィンを経質としての酵素反応及び分光学的性質によりその性質を検討した。その結果、テトラクロロエチレンで生じるP-450と四塩化炭素により生じるものとの差異はまだ明らかに出来なかったがテトラクロロエチレンを前処置したマイクロゾームで7-ペントキシレゾルフィンを基質とした時の脱アルキル化活性は著しく増加するにもかかわらずフェノバルビタールを前処置したものでは逆に減少し更にマイクロゾームと一酸化炭素結合の差スペクトルで最大吸収がそれぞれ452nmと450nmと違いがあること等酵素反応態度、性質等に著しい違いがありそれぞれ異なったP-450種であることが明らかになった。しかし今後さらに免疫学的性質等についても検討しこれらの酵素の性質について明らかにする必要があると考える。

#### 参 考 文 献

- 1) B. Kalyanaraman : Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**, 1065-1072 (1979)
- 2) 大柳善彦 : スーパーオキシドと医学, 共立出版, 100-101 (1981)
- 3) F. P. Guengerich, D. H. Kim, M. Iwasaki : Chem. Res. Toxicol., **4**, 168-172 (1991)
- 4) Maki, Y. : Kumamoto Medical J., **21**, 169-178 (1968)
- 5) Nash, I. : Biochem. J., **55**, 416-421 (1965)
- 6) Nakayama, H. : The Kumamoto Medical J., **31**, 89-97 (1978)
- 7) Omura, T. and Sato, R. : J. Biol. Chem., **239**, 2379-2378 (1964)
- 8) Fujita, T., Shoeman, D. W. and Mannering, G. J. : J. Biol. Chem., **248**, 2192-2201 (1973)
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : J. Biol. Chem., **193**, 265-268 (1951)
- 10) Layne, E. : Methods in Enzymology : **Vol III**, 450-451 (1957), New York : Academic Press.
- 11) D. W. Nebert and H. V. Gelboin : Microsomes and Drug Oxidation, 495-498, Academic Press, New York (1969)
- 12) 吉田博, 田中正三 : 生化学的薬理学, 朝倉書店, 45-46 (1971)
- 13) 佐藤 了 : 薬物代謝 — 肝小胞体を中心として, 講談社サイエンティフィック, 60-65 (1973)
- 14) M. D. Burke and R. T. Mayer : Chem. Biol. Interact., **45**, 243-248 (1983)
- 15) M. D. Burke and R. T. Mayer : Biochem. Pharmacol., **34**, 3337-3345 (1985)