



Title	肝チトクロームP-450による異物の代謝活性化
Author(s)	三浦, 敏明
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 3, 1-14
Issue Date	1990-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37519
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_1-14.pdf



肝チトクローム P-450 による異物の代謝活性化

三浦 敏明

Metabolic Activation of Xenobiotics by Hepatic Cytochrome P-450 Enzymes

Toshiaki Miura

Abstract

Cytochrome P-450 enzymes play a central role in the oxidative metabolisms of numerous xenobiotics such as drugs, pesticides, food additives and environmental pollutants as well as endogenous substrates such as steroids and fatty acids. They are widely distributed in many mammalian tissues, but are present in the highest concentration in liver microsomes. Extensive studies in many animal species indicate that there are multiple forms of cytochrome P-450 in liver microsomes, which differ in their structure, substrate specificity or response to various types of inducers.

These enzymes were originally thought to function principally in detoxication of lipophilic compounds but now are also known to participate in the activation of many compounds to reactive metabolites that initiate toxic and carcinogenic events.

This review describes the activations of xenobiotics such as promutagens and procarcinogens by cytochrome P-450 enzymes in liver microsomes from rats and humans.

要 旨

チトクローム P-450 はステロイドや脂肪酸などの内因性物質のみならず、薬物、農薬、食品添加物、環境汚染物質などの異物の酸化的代謝において中心的役割を担っている酵素である。チトクローム P-450 は多くの哺乳動物の各組織に広く分布しているが、特に肝ミクロゾームには高濃度に存在している。多くの動物種を対象としたこれ迄の広範な研究から、肝ミクロゾームには構造や基質特異性あるいは誘導剤に対する感受性の異なる多種類のチトクローム P-450 分子種が存在することが明らかにされている。これらの酵素の役割は主として脂溶性化

合物の解毒であると考えられていたが、現在では、多くの化合物を反応性の高い代謝物に活性化し、それらの毒性や発癌性の発現にも関与していることが知られている。本総説ではラットおよびヒト肝ミクロゾームに存在するチトクローム P-450 による異物の代謝活性化について解説する。

はじめに

生体は外来性異物 (Xenobiotics) の侵入に対して多彩な防御機構を備えている。その代表例は免疫系であり、巧妙な仕組みで細菌、ウイルス、蛋白質などの高分子量異物を処理している。それでは医薬品、農薬、食品添加物、環境汚染

物質など、私達の身の回りに数多く存在する低分子量異物の侵入に対し生体はどのように対処しているであろうか？これらの異物に対する主要な防御系として機能しているのが薬物代謝酵素系である^{1,2)}。体内に取り込まれた異物の多くはこの酵素系による代謝で解毒化され体外に排泄される。このような異物の代謝において中心的な役割を担っている酵素がチトクローム P-450 である。しかし最近になってチトクローム P-450 をはじめとする薬物代謝酵素系によって逆に活性化され、より毒性の高い代謝物に変化する異物も存在することがわかってきた^{3,4)}。たとえば発癌物質には、それ自体には発癌性はないが、薬物代謝酵素によって活性化されてはじめて発癌性を示すものの方がむしろ多い⁵⁾。

本稿では薬物代謝酵素としてのチトクローム P-450 の性質について解説するとともに、それ

が異物の代謝活性化にどのように関与しているかを、いくつかの例を挙げて紹介する。

1. 肝の薬物代謝酵素系

生体内に侵入した異物の中にはそのままの形で尿へ排泄されるものもあるが、大部分は体内で代謝を受け、より水溶性の高い化合物に変換されてから尿や胆汁を経由して排泄される。体内に蓄積されやすい脂溶性異物を排泄するためには特にこのような代謝が必要とされる。

異物代謝の主役は肝臓であるが、小腸、肺、腎、皮膚、脳などの臓器も異物代謝能を有しており、胎児にとっては胎盤での代謝も重要である。また、腸内細菌も異物の代謝に関与する場合がある。表 1 には代表的な薬物代謝酵素の細胞内局在を示した。これらの酵素は細胞質（上清）やミトコンドリアなどにも存在するが、主

表 1 薬物代謝酵素の細胞内局在

薬物代謝酵素	細胞画分
cytochrome P-450	microsomes
NADPH-cytochrome P-450 reductase	microsomes
alcohol dehydrogenase	cytosol
aldehyde dehydrogenase	cytosol
carboxyesterase, amidase	microsomes, cytosol etc
epoxide hydrolase	microsomes, cytosol
UDP-glucuronyltransferase	microsomes
sulfotransferase	cytosol
glutathione S-transferase	cytosol, etc
N-acetyltransferase	cytosol

としてミクロゾームに局在する。ミクロゾーム（細胞内で小胞体膜として存在していたもの）が脂溶性異物の代謝に深く関与していることは、それが多量の脂質を含みりポ蛋白質の膜であることから理解できる。

これらの酵素による代謝反応は一般に第一相反応と第二相反応に分類される。第一相反応では水酸基、アミノ基、カルボキシル基などの極性官能基が導入（あるいは暴露）される。ついで、これらの代謝物は抱合酵素と呼ばれる一連

の酵素によってグルクロン酸、硫酸、アミノ酸あるいはグルタチオンなどと結合（抱合）して水溶性がさらに高められ、尿や胆汁に容易に排泄されることになる。これが第二相反応である。もともと極性官能基を有する異物は第一相反応を受けず、直接第二相反応で抱合体に変化することもある。

前述したように異物代謝の主役は肝臓であり、肝臓での第一相反応において中心的な役割を担っているのがミクロゾームのチトクローム

P-450 である。

2. 酵素としてのチトクローム P-450 の特徴

チトクローム P-450 (以下 P-450 と略す) は分子量が 48000–56000 で、活性中心にプロトポルフィリン IX (図 1) を有するヘム酵素である。

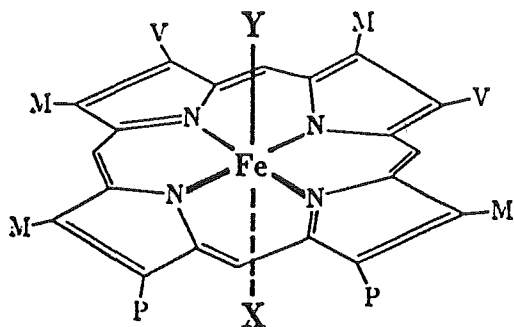


図 1 鉄-プロトポルフィリン IX の構造
M: メチル基, V: ビニル基, P: プロピオン酸基

しかし他のチトクロームやペルオキシダーゼなどのヘム酵素とは異なり、アポ蛋白質中のシステイン残基のチオレート (S^-) が第 5 配位子として鉄イオンに配位しているのが P-450 の特徴である。そのため、一酸化炭素が結合した還元型の P-450 は 450 nm という長波長域にソーレー吸収帯を示す。これがこのヘム酵素の名前の由来である。

生体内にはこのような P-450 が多種類存在し、肝ミクロゾーム以外にも広く分布している。たとえば、黄体ホルモン、副腎皮質ホルモン、男性ホルモン、女性ホルモンなどのステロイドホルモンはコレステロールから生合成されるが、これらの生合成には副腎に存在する一連の P-450 群が関与している。活性型ビタミン D の生合成には 25-水酸化酵素や 1α -水酸化酵素が必要であるが、これらはそれぞれ肝ミトコンドリアおよび腎に存在する P-450 である。しかし肝ミクロゾームに存在する P-450 はこれらの P-450 とは著しい性質の違いがあり、以下の

ような特徴を有している。

(1) 分子多様性 (Multiplicity)

肝には多種類の P-450 分子種が存在し、ミクロゾーム全蛋白量の 5% 以上を占めている。すでに蛋白質として単離されている肝ミクロゾームの P-450 分子種は、ラットで 20 種類以上、ヒトでは 10 種類以上に及んでいる。また P-450 の DNA レベルでの研究も進んでおり、肝ミクロゾームの P-450 cDNA も多数単離されている^{6,7)}。それらの中には、いまだ蛋白としての存在が確認されていない P-450 に対応する cDNA も含まれていることから、更に多くの P-450 分子種が肝ミクロゾームに存在していることになる。これまでに精製された P-450 分子種の命名法は研究者により異なっているため、どれとどれが同一のものを判断するのは容易ではない。いまだに統一的な名称は与えられていないが、最近になって各 P-450 の cDNA の塩基配列を基に、いくつかの遺伝子ファミリーへの分類が試みられている^{6,7)}。

(2) 広い基質特異性 (Broad substrate specificity)

酵素の特徴の一つは高い基質特異性と反応特異性である。このような特徴は、前述した副腎や肝ミトコンドリアの P-450 にも当てはまるが、肝ミクロゾームの P-450 には当てはまらない場合が多い。すなわち肝ミクロゾームの P-450 分子種の多くが複数の反応を(たとえば水酸化とエポキシ化反応)触媒するし、いろいろな化学構造を有する広範な化合物を基質とする。しかも、複数の分子種が同一の反応を触媒することも多い。たとえば、アニリンの *p*-水酸化やアミノピリンの *N*-脱メチル化反応を触媒する P-450 分子種が複数存在する。P-450 以外の薬物代謝酵素にも同様に認められているこのような分子多様性と広い基質特異性は、それらが低分子量異物に対する防御系として機能する上で合目的である。つまり、各種の薬物代謝酵素は、それらの基質特異性や反応特異性がルー

ズである多種類の分子種から構成されているため、生体がそれ迄経験したことのない新しい合成物質も含めた何百万種類もある低分子量異物を代謝できることになる。それゆえ P-450 をはじめとする薬物代謝酵素系は動物が進化する過程で、外来性の低分子量異物を体外に排泄するために発達した機能と考えられている。

(3) 外来性異物による誘導 (Inducibility by foreign compounds)

飲酒が習慣になっている人では肝ミクロゾーム P-450 中の特定の分子種が増量している。これはエタノールが誘導剤 (inducer) として働き、特定の P-450 分子種の生合成を誘導 (酵素誘導) するためである⁸⁾。外来性の異物にはこのような作用を有するものが多い。睡眠薬であるフェノバタール (PB) や多環芳香族化合物のメチルコラントレン (MC) はその代表例であり、動物に投与すると、それぞれ、PB 型および MC 型と呼ばれる複数の P-450 分子種を誘導する。これらの P-450 は互いにアポ蛋白質の構造が異なっており、その機能にも相違が認められている。環境汚染物質として有名になったポリ塩化ビフェニル (PCB) は主として MC 型を誘導するが、PB 型の分子種も誘導することが知られている。

一方、誘導とは逆に、特定の P-450 分子種の含量を低下させる異物もある。このような例として、最近著者らは、数種のマクロライド系抗生物質が雄ラット肝ミクロゾーム中の主 P-450 分子種である P-450-male という分子種を減少させることを見い出している⁹⁾。また誘導とは直接関係ないが、異物の中には、投与後肝に残留することによって肝ミクロゾーム P-450 の阻害作用を示すものもある。

複数の薬物を同時にあるいは前後して投与した時に、それらの単独投与の場合と比較すると、個々の薬物の薬効や毒性が増強されたり減弱されることがある。このような薬物相互作用が現われる主たる原因の一つとして、併用 (または

前投与) した薬物による P-450 の誘導、減少あるいは阻害を挙げることができる。

(4) 性差, 種差, 系統差 (Sex-, strain- and species difference)

薬物の薬効や副作用に性差や種差があることは良く知られていた事実である。薬効や副作用の発現には種々の要因が関係しているが、薬物代謝もその一つである。薬物代謝酵素の含量や種類が性、系統、種の間で異なれば、薬効や副作用の性差、系統差あるいは種差が現われる可能性が大きい。

ラットでは肝ミクロゾームの薬物代謝能が雌雄で異なり、一般に雄の方が雌よりも代謝能が高い。肝ミクロゾーム P-450 総含量が雌よりも雄で高い事実がこの性差の一因となっているが、これだけで性差は説明できない。近年、薬物代謝の性差を分子レベルで解明する研究が進み、ラットについては肝ミクロゾーム P-450 の主分子種の構造と機能が雌雄間で異なることが鎌滝らによって明らかにされた。すなわち、雌雄ラット肝ミクロゾームより主成分として単離され、それぞれ P-450-female および P-450-male と命名された P-450 分子種は互いに類似した構造であるが同一ではなく、それらの機能も異なっている¹⁰⁻¹¹⁾。たとえば P-450-male は男性ホルモンの一つであるテストステロンの 2 α -および 16 α -水酸化を触媒するが、P-450-female にはこのような活性は認められない。このような薬物代謝の性差はラット以外では、一部の系統のマウスについても認められていたが、他の動物種については明確にされていなかった。しかし、最近著者らはハムスターの肝ミクロゾームの薬物代謝能にも性差が存在することを明らかにしている¹³⁾。

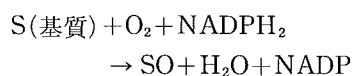
系統差や動物種差についての分子レベルの研究も進んでいる。例えば著者らは、前述した雄ラット肝ミクロゾームの P-450-male の抗体を調製し、この抗体と反応する P-450 分子種、すなわち P-450-male と免疫化学的に類似した P

-450 分子種が他の動物種にも存在するか否かを調べた。その結果、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、ヒトの肝ミクロゾームにもこの抗体と反応する P-450 分子種が存在することを確認するとともに¹⁴⁾、イヌ¹⁵⁾、サル¹⁶⁾、ヒト¹⁷⁾の肝ミクロゾームから対応する P-450 分子種を単離した。これらの分子種の N-末端アミノ酸配列 (約 25 残基程度) は P-450-male のそれと 75% 以上の相同性を有しているものの、薬物代謝能やステロイドの水酸化酵素活性は P-450-male と異なる点が多かった。したがって、種間を越えて構造の類似した P-450 分子種が存在するものの、その機能は必ずしも同じではない。

新薬開発のための前臨床試験では実験動物を用いた薬効評価や毒性試験が積み重ねられ、その結果に基づいてヒトへの適用が検討される。動物実験の結果からヒトでの薬効や有害性の予測が容易にできれば、有効で安全な新薬がもっと効率よく誕生することになるが、その予測はいまだ容易ではない¹⁸⁾。薬物代謝の種差もその一因になっている。

3. チトクローム P-450 が触媒する反応サイクル

P-450 による異物の酸化的代謝には、分子状酸素の他に NADPH および NADPH-P-450 還元酵素を必要とする。これらの因子の共存下で P-450 は脂肪族および芳香族化合物の水酸化、オレフィンのエポキシ化、脱アルキル化、N-水酸化や S-酸化などの多彩な酸化反応を触媒する (表 2)。しかし、これらの酸化反応は基本的には次式で示した一原子酸素添加反応と表わすことができる。



例えばエーテル類の O-脱アルキル化反応の場合でも実際には次式のように一原子酸素添加反

表 2 チトクローム P-450 が触媒する反応

(1) C-水酸化	(9) 脱硫化
(2) N-酸化	(10) S-酸化
(3) N-脱アルキル化	(11) 脱ハロゲン化
(4) O-脱アルキル化	(12) アゾ基還元
(5) S-脱アルキル化	(13) ニトロ基還元
(6) エポキシ化	(14) ヒドロキシアミン還元
(7) 過酸化	(15) エポキシド還元
(8) 脱アミノ化	(16) N-オキシド還元

応 (水酸化反応) が進行し、その結果生成した代謝物が非酵素的な反応で二次的にアルコールへ変化する。

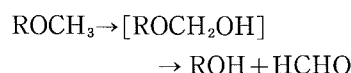


図 2 には P-450 によって触媒される一原子酸素添加反応の反応サイクルを水酸化反応を例として示した。このサイクルでは最初に酸化型 P-450 (P-450⁺⁺⁺) に基質である RH が結合する。酸化型 P-450 は基質と結合するとより還元され易くなり、一電子を NADPH より受けとって還元型 P-450-基質複合体 (P-450⁺⁺-RH) に変化する。この電子伝達系に必要なのが NADPH-チトクローム P-450 還元酵素と呼ばれるフラビン蛋白質 (fp₂) である。詳しい解説は成書にゆずるが¹⁾、肝ミクロゾーム P-450 に対するこのような電子伝達系は副腎や肝ミトコンドリアの P-450 に対する電子伝達系とは明らかに異なっている。

次のステップでは還元型 P-450-基質複合体に酸素分子が結合し、酸素化型中間体が生じる (O₂-P-450⁺⁺-RH)。そしてこの中間体に 2 番目の電子が導入されることによって酸素分子の O-O 結合は開裂し、酸素原子の一つは基質に添加され (水酸化反応)、もう一方は水に還元される。これで 1 サイクルが完了し、酸化型の P-450 が復生する。2 番目の電子の導入は 1 番目の場合と同様に fp₂ を経由して NADPH から供与されるが、ある場合にはチトクローム b₅ を経由

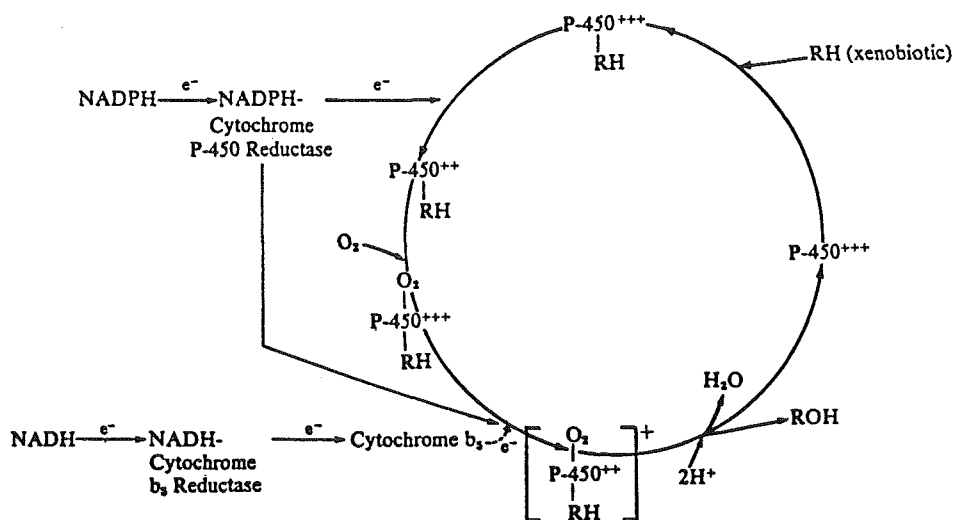


図2 チトクロームP-450の触媒サイクル

して NADH から伝達されることもある。どちらの電子伝達系が利用されるかは P-450 分子種や基質の種類によって異なると考えられている。

特別な条件、例えば嫌気的な条件の下で、P-450 はニトロ基、アゾ基、N-オキシド、ハロゲン化アルキルの還元も触媒することができる(表2)。これらの還元反応は図2の反応サイクル中の還元型 P-450-基質複合体 (P-450⁺⁺-RH) がサイクルからはずれ横道にそれた結果として起きる反応と考えられる。

4. ラット肝チトクローム P-450 による異物の代謝活性化

薬物代謝酵素系が広範囲な異物の水溶性を増すことによって、それらを体外に排泄するために発達した系である以上、体内に進入した異物はこれらの酵素系によって解毒されるのみならず、逆に活性化されても不思議ではない。肝ミクロゾームの P-450 はこの代謝活性化でも中心的な役割を演じている。

P-450 による代謝で生じる活性化代謝物としては求電子性代謝物 (electrophile) と遊離基 (free radical) を挙げることができる。前者は

窒素、イオウ、酸素などの電子密度の高い原子に対して高い反応性を示すので、蛋白質や核酸などの生体高分子と反応して安定な共有結合 (covalent bond) を形成する。蛋白質が活性代謝物と結合すれば、その機能が阻害されるため細胞障害につながり、核酸と活性代謝物の結合は発癌の引金になる。

一方フリーラジカルは、生体高分子との共有結合生成にもあずかるが、ラジカル連鎖反応や活性酸素生成の引き金として作用し、脂質をはじめとする各種の生体分子の切断、架橋、分解を引き起こす。このような活性代謝物と生体分子の反応は異物代謝の主役である肝臓でもっとも起こり易いため、薬物などの異物が原因となる臓器障害の発症頻度は肝臓でもっとも高くなっている。ただし、生体には活性代謝物に対する防御系 (消去系) も備わっているので、実際に毒性が発現するか否かは、活性代謝物の生成速度と消去速度のバランスによる。以下ラット肝ミクロゾームのチトクローム P-450 による異物の代謝活性化を中心に具体例を紹介する。

(1) 求電子性活性代謝物

ジクロロメタンをはじめとする 1, 1-ジハロアルカン類は P-450 によって水酸化されると、

引き続きハロゲン化水素が脱離し、酸ハライドに変化する(図3)。これは強力なアシル化剤

であり、生体高分子を容易にアシル化する。このような反応はクロロホルムでも起こり、高毒

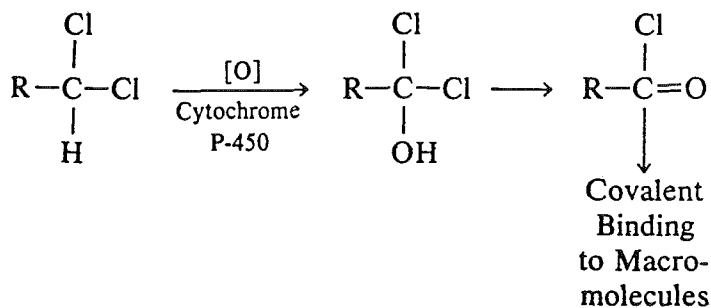


図3 1,1-ジクロロアルカンの活性化

性のホスゲンが生成する。

求電子性代謝物の1つであるエポキシドはDNA中のグアニン塩基と反応して共有結合(covalent bond)を形成する。二重結合を有するオレフィン類や多環式芳香族炭化水素の変異原性、発癌性は、それらがP-450によってエポキシドに代謝活性化されることに起因してい

る。

一方、エポキシドの解毒に関与する代謝反応は、エポキシド加水分解酵素によるジオールへの変換反応と、グルタチオン転移酵素によるグルタチオン抱合である。例えば、代表的な変異原物質であるベンゾ[a]ピレンは図4の様な経路で代謝活性化および解毒が行なわれる。ベンゾ

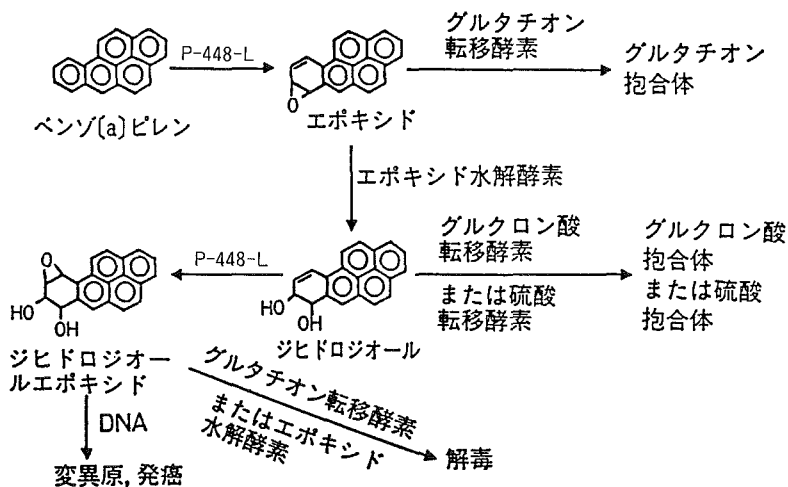


図4 ベンゾ[a]ピレンの代謝経路

[a]ピレンは最初に、MCやPCBによって誘導されるP-448-L(P-450c)と呼ばれるP-450分子種によってエポキシドに代謝活性化される。このエポキシドはグルタチオン抱合によっても解毒化されるが、エポキシド加水分解酵素によ

りジヒドロジオールにも変換する。ジヒドロジオール自体は不活性であるが、もう一度P-448-Lによって代謝されると再び活性化されジヒドロジオールエポキシドに変化する。最初に生成するエポキシドに比較し、このジヒドロ

ジオールエポキシドはエポキシド水解酵素の作用を受けにくく、かつ DNA に対する反応性が高い。したがって、これがベンゾ [a] ピレンの最終活性代謝物であり、変異原性、発癌性の直接の原因物質である¹⁹⁾。このようにベンゾ [a] ピレンの場合は、本来はエポキシドの解毒酵素であるはずのエポキシド水解酵素が毒性発現に一役買っていることになる。

同様にエポキシドに代謝活性化される異物には、肝障害や肝癌の原因になる塩化ビニルモノマーやプロモベンゼン、カビ毒であり強力な肝癌誘発剤であるアフラトキシン B₁ など多数のものが知られている。アフラトキシン B₁ の活性化は前述の P-450-male によって触媒される²⁰⁾。

N-水酸化も薬物の代謝活性化の重要な反応である。N-水酸化体自体の求電子性はあまり高

くないが、N-水酸基が硫酸やグルクロン酸で抱合されると求電子性は高まる。この代表的な例は、解熱鎮痛剤としては繁用されているアセトアミノフェンである。アセトアミノフェンの大部分はフェノール性水酸基がグルクロン酸抱合や硫酸抱合されて解毒化されるが、一部は図 5 に示すように P-450 によって N-水酸化され、ついでグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けると活性な求電子代謝物である N-アセチルベンゾキノニンイミンに変化する²¹⁾。グルタチオンはこの活性代謝物と反応することによって解毒作用を示すが、アセトアミノフェンが過剰に投与されてグルタチオンが枯渇すると、活性代謝物は蛋白質と反応するようになり肝障害を引き起こす。アセトアミノフェンの代謝活性化機構としてフリーラジカル機構 (図 5) も提唱されているが^{22,23)}、この点については後述する。

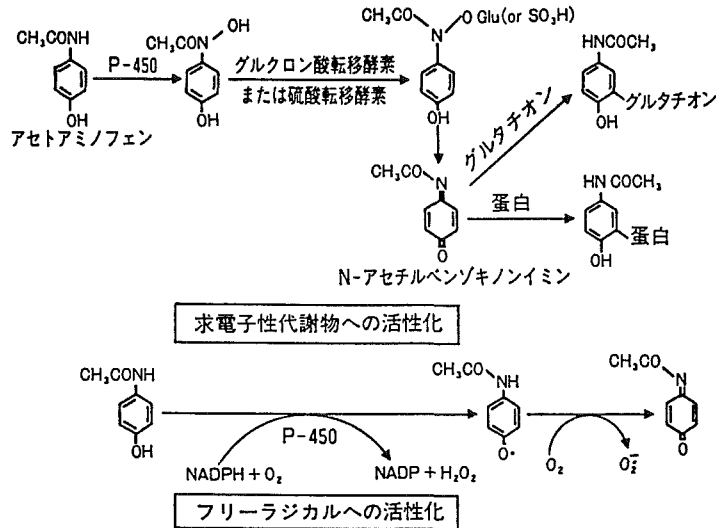


図 5 アセトアミノフェンの代謝活性化

同様に N-水酸化によって活性化される薬物は多数知られている。2-アセチルアミノフルオレンやジメチルアミノアゾベンゼンの高い変異原性や発癌性にも N-水酸化が関与している。図 6 には加熱食品中の代表的な蛋白質分解物の構造を示した。いずれも強力な変異原物質であり、

それらの N-水酸化は主として P-448-H (P-450 d) とよばれる分子種によって触媒される。例えば Trp-P-2 は P-448-H によって N-水酸化された後、アシル転移酵素による O-アシル化を受けて活性化され、DNA 中のグアニン残基と反応して共有結合を形成する (図 7)²⁴⁾。Trp

-P-2 をはじめとする蛋白質加熱分解物はこのように代謝活性化されて変異原性を示す。

N-水酸化体はニトロ化合物の還元によっても生成するので、多環芳香族ニトロ化合物や AF-2 などの変異原物質の代謝活性化の第一歩は P-450 や P-450 還元酵素による還元である。

同じく変異原物質・癌原物質としてよく知られているニトロソアミン類も P-450 によって

活性化される。図 8 にはジメチルニトロソアミンの代謝活性化の例を示した。ジメチルニトロソアミンは P-450 によって脱アルキル化された後メチルカチオンに変化する²⁵⁾。メチルカチオンは強力なアルキル化剤として作用し、核酸や蛋白質と反応する。このようなニトロソアミン類の脱アルキル化を触媒するのは P-450 j と呼ばれる分子種であり、エタノールによって誘

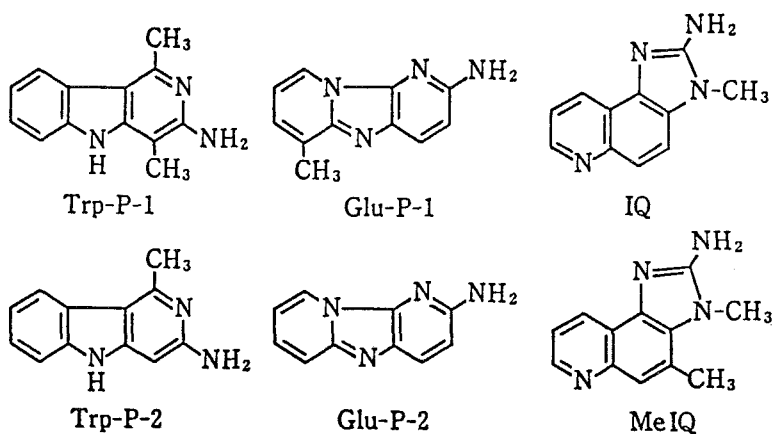


図 6 加熱食品由来の変異原の構造

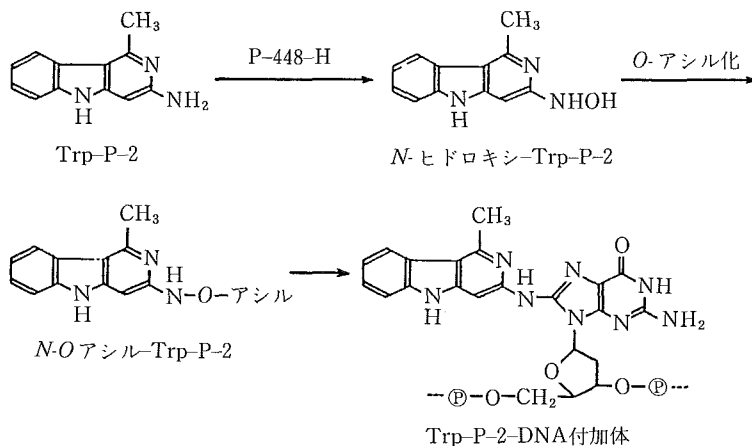


図 7 Trp-P-2 の代謝活性化経路

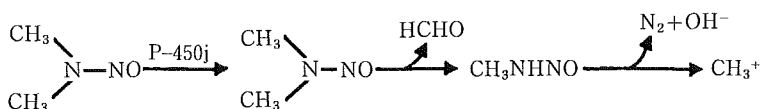


図 8 ジメチルニトロソアミンの代謝活性化

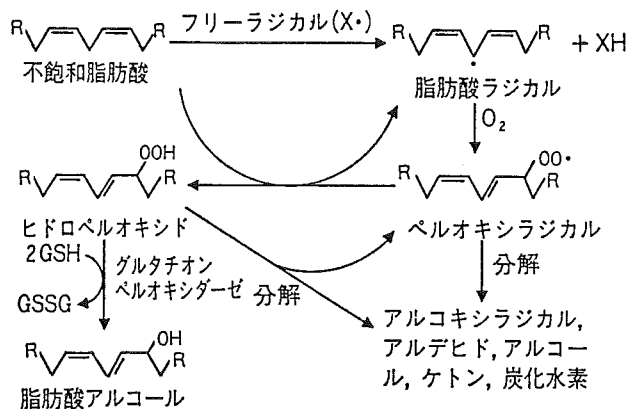
導されることが知られている²⁶⁾。

脱アルキル化が代謝活性化に関与する特異な例として、エリスロマイシンやオレアンドマイシンなどの14員環マクロライド系抗生物質を挙げることができる。これらの抗生物質をラットに投与すると肝ミクロゾーム中のP-450 pと呼ばれる分子種の含量が著しく増加する^{9,27)}。しかも、これらの抗生物質はそれ自身が誘導したP-450 pによってN-脱メチル化(マクロライド系抗生物質のほとんどがジメチルアミノ糖を有している)され、ニトロソ体に変性化される。このニトロソ体はP-450 pの活性中心であるポルフィリン鉄に配位することによってP-450 p

を不活性化する。このような一連の反応の進行がマクロライド系抗生物質による肝障害の一因と考えられている²⁷⁾。このP-450 pはプレグネノロンカルボニトリル(PCN)や、合成副腎皮質ホルモンであるデキサメサゾンの投与によっても誘導される。

(2) フリーラジカルへの代謝活性化

異物が一電子酸化あるいは還元されるとフリーラジカルが生成する。細胞内で発生したフリーラジカルは生体高分子とも反応するし、脂質過酸化の開始剤としても作用する。脂質過酸化反応(図9)の進行は生体膜の損傷につながり、また、その過程で生成するペルオキシラジ

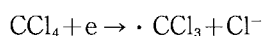


GSH：還元型グルタチオン，GSSG：酸化型グルタチオン

図9 脂質過酸化反応

カル、ヒドロペルオキシド、アルコキシラジカル、アルデヒドなどの活性種は細胞成分に多大なダメージを与える。ただし、細胞側にはラジカル種や脂質過酸化反応に対する防御機構としてビタミンE、グルタチオン、グルタチオンペルオキシダーゼなどが用意されている。

動物に実験的肝障害を引き起こす目的でよく用いられている四塩化炭素(CCl_4)はP-450あるいはP-450還元酵素によってトリクロロメチルラジカル($\cdot CCl_3$)に活性化される。



同様な代謝活性化はクロロホルムをはじめとするハロゲン化アルキルの場合にも認められている。吸入麻酔薬として繁用されているハロタン($CF_3CHBrCl$)は希に肝炎を誘発するが、これも類似の機構で代謝活性化される²⁸⁾。

イプロニアジド、イソニアジド、ヒドラジンなどのヒドラジノ基を含む医薬品は肝障害性が高いほうである。イプロニアジドについて、その代謝活性化機構(図10)が詳しく調べられ

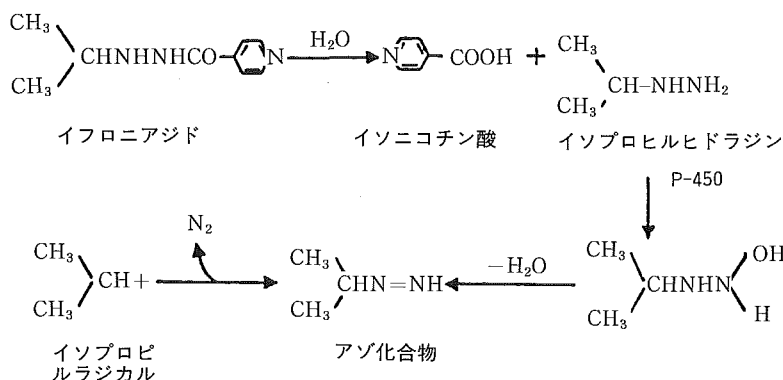


図10 イプロニアジドの代謝活性化

ている。すなわち、イプロニアジドは加水分解によってイソプロピルヒドラジンに変化した後、P-450によるN-水酸化で活性化され、脱水してアルキルアゾ化合物に変化する。そしてこのアゾ化合物からイソプロピルラジカルが生成し、これが最終的な毒性物質として働くと推定されている^{29,30)}。

分子状酸素が一電子還元されるとスーパーオキシドアニオン (O_2^-) が生成する。 O_2^- 自体の反応性は高くはないが、 O_2^- が酵素的、非酵素的あるいは金属イオンの作用により分解すると、より活性な酸素種であるヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロペルオキシラジカル ($\cdot\text{OOH}$) などが生成し、種々の細胞成分が酸化傷害を受ける。 O_2^- は各種の酸化酵素が関与する正常な代謝過程でも生成するし、薬物の代謝活性化の副産物としても生成する。そして生体は、 O_2^- に対してはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、過酸化水素に対するカタラーゼあるいはグルタチオンペルオキシダーゼ、ヒドロキシラジカルに対する各種の抗酸化剤を防御機構として備えている。

O_2 生成に対する P-450 の関与としてはその NADPH オキシダーゼ作用を挙げることができる。すなわち前出の反応サイクル (図2) 上での酸化型中間体 ($\text{O}_2\text{-P-450}^{++}\text{-RH}$) が2番目の電子を受け取る前に解離すると、酸化型 P

-450-基質複合体が復生するとともに O_2^- が生成する。そして O_2^- は非酵素的な反応で H_2O_2 と O_2 に不均化する。結局、これらの反応は、形式的には NADPH が酸素で酸化されて過酸化水素を生成する反応である。したがって、P-450 は NADPH オキシダーゼ活性を示すことになり、これらの反応が肝ミクロゾームの NADPH オキシダーゼ活性の主経路となっている。

以上、薬物の代謝活性化を求電子性代謝物への活性化と、フリーラジカルへの活性化に分けて論じてきたが、両者の区別が容易でないことも多い。例えば前述したように、アセトアミノフェンについては求電子性代謝物への活性化で説明したが、フリーラジカルへの活性化機構 (図5) も提唱されている^{22,23)}。すなわち、アセトアミノフェンはN-水酸化ではなく、P-450による水素原子の引き抜きによって活性化されること、その際に過酸化水素が生成すること、および活性代謝物であるアセトアミノフェンラジカルによる酸素の還元で O_2^- も生成することが推定されている。事実、アセトアミノフェンの存在下で肝ミクロゾームの脂質過酸化が進行することが認められている²³⁾。

ラット肝チトクローム P-450 による異物の代謝活性化の例はまだ多数あるが、ここではその代表例を紹介した。また、P-450 以外の代謝酵素による活性化も知られているが、紙面の都合

上省略した。

5. ヒト肝チトクローム P-450 による異物の代謝活性化³¹⁾

動物肝 P-450 の研究に比較すると、ヒト肝チトクローム P-450 の研究は、その材料の特殊性から著しく遅れていた。しかしこの数年の間に、遺伝子レベルの研究も含め、ヒト肝 P-450 の研究は急速に進展している。すでに 10 種類程度の P-450 分子種がヒト肝ミクロゾームより単離され、それらの異物代謝における役割、特に、変異原や癌原物質の代謝活性化などの毒性学的役割が次第に明らかになってきた。ここではそれらの中から、主分子種である P-450_{NF}、P-450_{PA} および P-450_j について紹介する。

(1) P-450_{NF}

この分子種はカルシウムチャンネルブロッカーであるニフェジピン (nifedipine) の酸化を触媒する事から P-450_{NF} と呼ばれている³⁶⁾。ラット肝 P-450_P (P-450_{PCN}) と免疫化学的に類似しており、cDNA から決定された蛋白質の一次構造も高い相同性を有している。また、バルビタール、デキサメサゾン、エリスロマイシンなどの投与によって誘導される点も P-450_P と同様である。P-450_{NF} はニフェジピンの酸化のみならず、多彩な反応を触媒する。例えば、テストステロン、プロゲステロン、コルチゾールなどのステロイドホルモンの 6 β -水酸化、女性ホルモンであるエストロゲンの芳香環の水酸化、エリスロマイシンの N-脱メチル化などである。

種々の変異原・癌原物質の代謝活性化にも主分子種である P-450_{NF} が深く関与していることは注目に値する。すなわち、この分子種によってアフラトキシン B₁ と G₁、6-アミノクリセン、ベンゾ (a) ピレン-7, 8-ジヒドロジオールなどが活性化される³²⁾。ラットでは、アフラトキシン B₁ は P-450_{NF} と構造類似の P-450_P ではなく、P-450_{male} によって活性化される。し

たがって、構造が類似していてもその機能は種間で異なることもある。

ヒト肝ミクロゾームからは P-450_{NF} と同一かあるいは類似した蛋白質やその cDNA がいくつか単離されている。北田らがヒト胎児肝より精製した P-450_{HFLa} もその一つであり、構造や機能の面で P-450_{NF} と類似してはいるものの、明らかに異なる分子種である³³⁾。この P-450_{HFLa} は胎児-胎盤系におけるエストリオール生合成の重要な過程であるデヒドロエピアンドロステロン-3-サルフェートの 16 α -水酸化反応を触媒する³⁴⁾。これは胎児肝の重要な機能の一つである。

(2) P-450_{PA}

解熱鎮痛薬であるフェナセチンの O-脱エチル化反応を触媒する事から P-450_{PA} と命名されており、ラット肝の P-448-H (P-450 d) に対応する分子種と考えられている。喫煙者ではフェナセチンのクリアランスが増大していることが知られていたが、それはこの分子種が喫煙によって誘導されるためである。フェナセチンの O-脱エチル化反応の他にも多様な反応が P-450_{PA} によって触媒される。特にラットの P-448-H との類似性から予想されていたように、P-450_{PA} は 4-アミノビフェニル、2-アセチルアミノフルオレン、2-アミノアントラセン、2-アミノフルオレンや蛋白加熱分解物である Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MIQx, Trp-P-2 などの癌原物質の代謝活性化に深く関与している³²⁾。

(3) P-450_j

その cDNA がラット肝 P-450_j の cDNA と 75% の相同性を示す分子種であり、ラットの場合と同様に P-450_j (又は P-450_{ALC}) と呼ばれている。この分子種はエタノール、アセトン、イソニアジドなどにより誘導され、アルコール常飲者の肝ミクロゾーム中の含量は増加しているとされている。P-450_j はアニリン、エタノール、アセトアミノフェノンなどの酸化を触媒する

が、特に重要なのは、*N*, *N*-ジメチルニトロソアミンなどのニトロソアミン類の*N*-脱メチル化酵素活性が高く、これらの変異原・癌原物質を高率よく活性化することである³⁵⁾。

おわりに

本稿では肝ミクロゾームに存在するチトクローム P-450 分子種による異物の代謝活性化を強調して述べた。生体には活性代謝物の消去系も備わっているため、代謝活性化が実際にヒトにおける毒性の発現にどの程度かわっているかを現時点で評価するのは容易ではない。しかし、このような代謝活性化機構に関する研究は異物による毒性発現の予測やその防止、あるいは化学物質の安全性評価法の進歩につながるものであり、今後一層の発展が期待されている。

文 献

- 1) 佐藤 了, 大村恒雄編: 薬物代謝の酵素系, 1988, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 2) 加藤隆一, 鎌滝哲也編: 薬物代謝の比較生化学, 1983, 清至書院, 東京.
- 3) Ed. by C. D. Klaassen, M. O. Amdur and J. Doull: Toxicology, 1986, Macmillan Publishing Co., New York
- 4) 三浦敏明, 鎌滝哲也: 薬物代謝活性化と肝障害, 医学のあゆみ, 136, 1097-1162, 1986.
- 5) Ed. by P. Politzer and F. J. Martin: Chemical carcinogens, 1988, Elsevier, Amsterdam.
- 6) F. J. Gonzalez: The molecular biology of cytochrome P-450s, Pharmacol. Rev., 40, 243-288, 1989.
- 7) D. W. Nebert, M. Adesnik, M. J. Coon, et al: The P-450 gene subfamily—Recommended nomenclature, DNA, 6, 1-11, 1987.
- 8) S. A. Wrighton, P. E. Thomas, D. T. Molowa, et al: Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase, Biochemistry, 25, 6731-6735, 1986.
- 9) T. Miura, M. Iwasaki, H. Ohi, et al: Decrease in a constitutive form of cytochrome P-450 by macrolide antibiotics, J. Antimicro-
- bial. Chemotherapy, 24, 551-559, 1989.
- 10) T. Kamataki, K. Maeda, Y. Yamazoe, et al: Evidence for the involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in the occurrence of sex-related differences of drug metabolism in the rats, Life Sciences, 31, 2603-2610, 1982.
- 11) T. Kamataki, K. Maeda, Y. Yamazoe, et al: Sex difference of cytochrome P-450 in the rats: purification, characterization and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats, Arch. Biochem. Biophys., 225, 758-770, 1983.
- 12) 鎌滝哲也, 三浦敏明: P-450 と発癌, 免疫薬理, 5, 143-146, 1987.
- 13) Miura, M. Komori, M. Iwasaki, et al: Sex-related difference in the oxidative metabolism of testosterone and erythromycin by hamster liver microsomes, FEBS Letters, 231, 183-186, 1988.
- 14) T. Miura, H. Shimada, H. Ohi, et al: Interspecies homology of cytochrome P-450: Inhibition by anti-P-450-male antibodies of testosterone hydroxylases in liver microsomes from various animal species including man, Japan. J. Pharmacol., 49, 365-374, 1989.
- 15) K. Komori, H. Shimada, T. Miura, et al: Interspecies homology of liver microsomal cytochrome P-450: a form of dog cytochrome P-450 (P-450-D1) cross-reactive with antibodies to rat P-450-male, Biochem. Pharmacol., 38, 235-240, 1989.
- 16) H. Ohi, S. Toratani, M. Komori, et al: A form of monkey cytochrome P-450, P-450-MK1, immunochemically cross-reactive with antibodies to rat P-450-male, Biochem. Pharmacol., 38, 361-365, 1989.
- 17) M. Komori, T. Hashizume, H. Ohi, et al: Cytochrome P-450 in human liver microsomes: high-performance liquid chromatographic isolation of three forms and their characterization, J. Biochem., 104, 912-916, 1988.

- 18) 鎌滝哲也, 三浦敏明: 薬物代謝からのアプローチ, “医薬品有害作用の予測” 北川晴雄監修, 34-46, 1986, R & Dプランニング, 東京.
- 19) O. Pelkonen and D. W. Nebert: Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiological role in carcinogenesis, *Pharmacol. Rev.*, 34, 189-222, 1982.
- 20) K. Ishii, K. Maeda, T. Kamataki, et al: Mutagenic activation of aflatoxin B₁ by purified cytochrome P-450, *Mut. Res.*, 174, 85-88, 1986.
- 21) J. A. Holme, D. C. Dahlin, S. D. Nelson, et al: Cytotoxic effects of *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine, a common arylating intermediate of paracetamol and *N*-hydroxy-paracetamol, *Biochem. Pharmacol.*, 33, 401-406, 1984.
- 22) S. D. Nelson, D. C. Dahlin, E. J. Rauckman, et al: Peroxidase-mediated formation of reactive metabolites of acetaminophen, *Mol. Pharmacol.*, 20, 195-199, 1981.
- 23) G. M. Rosen, W. V. Singletary, E. J. Rauckmann, et al: Acetaminophen hepatotoxicity, an alternative mechanism, *Biochem. Pharmacol.*, 32, 2053-2059, 1983.
- 24) L. D. Gruenke, K. Konopka, D. R. Koop, et al: Characterization of halothane oxidation by hepatic microsomes and purified cytochrome P-450 using a gas chromatographic mass spectrometric assay, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 246, 454-459, 1988.
- 25) P. E. Thomas, S. Bandiera, D. E. Ryan, et al: Regulation of cytochrome P-450j, a high-affinity *N*-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic microsomes, *Biochemistry*, 26, 2280-2289, 1987.
- 26) D. E. Ryan, L. Ramanathan, S. Iida, et al: Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid, *J. Biol. Chem.*, 260, 6385-6393, 1985.
- 27) D. Pessayre, D. Larrey, C. Funck-Brentano, et al: Drug interactions and hepatitis produced by some macrolide antibiotics, *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 16, Suppl. A, 181-194, 1985.
- 28) Y. Yamazoe, T. Kamataki and R. Kato: Species difference in *N*-hydroxylation of Trp-P-2 in relation to mutagenic activation, *Cancer Res.*, 41, 4518-4522, 1981.
- 29) J. R. Mitchell, H. J. Zimmerman, K. G. Ishak, et al: Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology and probable pathogenesis, *Ann. Intern. Med.*, 84, 181-192, 1976.
- 30) S. D. Nelson, J. R. Mitchell, D. R. Snodgrass, et al: Hepatotoxicity and metabolism of iproniazid and isopropylhydrazine, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 206, 574-585, 1978.
- 31) F. P. Guengerich: Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29, 241-264, 1989.
- 32) T. Shimada, M. Iwasaki, M. V. Martin, et al: Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by *umu* gene response in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK 1002, *Cancer Res.*, 49, 3218-3228, 1989.
- 33) M. Kitada, T. Kamataki, K. Itahashi, et al: Purification and properties of cytochrome P-450 from homogenates of human fetal liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, 241, 275-280, 1985.
- 34) M. Kitada, T. Kamataki, K. Itahashi, et al: P-450HFLa, a form of cytochrome P-450 purified from human fetal livers, is the 16 α -hydroxylase of dehydroepiandrosterone 3-sulfate, *J. Biol. Chem.*, 262, 13534-13537, 1987.
- 35) J.-S. H. Yoo, F. P. Guengerich and C.-S. Yang: Metabolism of *N*-nitrosodialkylamines in human liver microsomes, *Cancer Res.*, 48, 1499-1504, 1988.