

ジフェニルエーテル系農薬による
薬物代謝酵素誘導の研究

Study on Induction of Drug Metabolizing Enzyme System
by Diphenyl Ether Pesticides

大山 徹

Tohru Ohyama

緒 言

肝ミクロソームに存在するチトクロムP-450群(以下P-450)は薬物代謝酵素系の末端酵素であり、生体にとり込まれた様々な薬物の代謝に関与している。肝ミクロソーム内のこの酵素群の量は種々の要因によって変動するが、特にある種の化学物質を投与された動物の肝ミクロソームでは、特定のP-450酵素群が誘導的に生成し、それらの酵素群の活性が著しく増加することが知られている。最近、塩化ジベンゾダイオキシソ^{1),2)} やPCB^{3),4)} のような有機塩素系化合物が発癌物質の活性化に関与するAryl Hydrocarbon Hydroxylase (以下AHH) 活性を特異的に誘導することが明らかになった。ジフェニルエーテル系農薬は塩素化したフェニル基を有し、構造的にはPCBと類似しているためにAHH活性を誘導する可能性が考えられた。一方、C57BL/6N(B6)マウスは遺伝的にAHH活性誘導に高い感受性を示し^{5),6)}このことはジフェニルエーテル系農薬によるAHH活性誘導、および誘導されるP-450の特徴を研究する上で有用である。

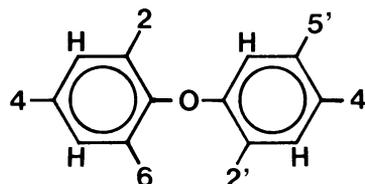
CNPはジフェニルエーテル系農薬の一つであり、水田等に広く使用されており、魚介類における汚染⁷⁾が問題となっている。しかしながらCNPはLD₅₀が10g/kg以上⁸⁾とかなり低い毒性であるが、肝ミクロソームの薬物代謝酵素系におよぼす影響に関して有用な情報は現在のところほとんどない。本研究において、CNPとその類縁化合物6種および比較のために3メチルコランソレン(以下3-MC)、フェノバルビタール(以下PB)およびDDT系化合物を用いて、B6マウスにおけるP-450と各種酵素活性の誘導パターンを解析し、フェニル基における塩素原子の置換の状態と酵素誘導効果との関係を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 試 薬

実験に供したCNPおよびその類縁化合物の化学構造と略号をTable 1に示す。CAP, PCNH₂, PCNO₂およ

Table 1. Structure of substitutions for the diphenyl ether compounds tested



Abbreviated name	2	4	6	2'	4'	5'
CNP	Cl	Cl	Cl	H	NO ₂	H
CAP	Cl	Cl	Cl	H	NHCOCH ₃	H
PCNH ₂	Cl	Cl	Cl	NH ₂	Cl	Cl
PCNO ₂	Cl	Cl	Cl	NO ₂	Cl	Cl
TCOH	Cl	Cl	H	OH	Cl	H
NIP	Cl	Cl	H	H	NO ₂	H
TCNO ₂	Cl	Cl	H	NO ₂	Cl	Cl

び7-エトキシレゾルフィン)は当研究所薬学部小川研究員の合成によるものである。CNP, NIP, DDT, DDE, ケルセン, クロロベンジレート, 3-MCおよびベンズピレンは和光純薬製を、メチルアミノアンチピリンと7-エトキシクマリンはAldrich社製を、NADPH, NADHおよびBSAはペーリンガー社製を使用した。その他の試薬はす

べて分析用特級を使用した。B6マウスは雄で体重が18~25gで日本動物センターより求めた。

2. ミクロソームの調製

酵素誘導の実験に供した各化合物はオリーブ油に溶解し、3日間連続してマウスの腹腔内に投与した。PBは生理食塩水に溶解し、同様に投与した。投与量は3-MCで200mg/kg、ジフェニルエーテル系化合物で100mg/kg、DDT系化合物で100mg/kgそしてPBで25mg/kgとした。コントロール実験は化合物を含まない同量のオリーブ油を用いた。

一群5匹のマウスの肝臓をブールして2倍容の0.15MKCl-0.01MEDTA (pH7.4) でホモジェナイズした。ミクロソーム画分は従来の方法⁹⁾により調製し、30%グリセリンを含む0.25Mリン酸緩衝液 (pH7.4) に懸濁し、実験に供するまで-85℃で保存した。

3. 酵素活性測定法

P-450含量はOmuraとSato¹⁰⁾の方法によって定量した。蛋白質の定量はLowryら¹¹⁾の方法に従った。酵素活性の測定はすべて37℃で行い、反応混液は0.3mgNADPH、0.3mgNADHおよび3mMMgCl₂を含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に蛋白量として1mgのミクロソーム画分を添加し、全量を1mlとした。

AHH活性¹²⁾、ビフェニル2位および4位水酸化活性¹³⁾、7-エトキシマリン脱エチル化活性¹⁴⁾の測定は各々引用した方法によって行った。パラニトロアニソール脱メチル化活性、N-メチルアニリン脱メチル化活性およびメチル

アミノアンチピリン脱メチル化活性は遊離生成するホルマリンをNash¹⁵⁾の方法に従って測定した。7-エトキシレゾルフィン脱エチル化活性は575nmの吸光度の増加を測定することによって求めた。アニリン4位水酸化活性はImaiら¹⁶⁾の方法に従って生成するパラアミノフェノールを比色定量することによって測定した。アセトアニリド4位水酸化活性、フェナセチン脱エチル化活性およびパラニトロフェネトール脱エチル化活性はGuentherらの方法¹⁷⁾を改良して高速液体クロマトグラフィーによって測定した。即ち、反応を1.25M塩化バリウム (0.5ml)と1M硫酸亜鉛 (0.5ml)を添加して停止させ、遠心によって沈澱を除いた上清の数μlを日立655型液体クロマトグラフに注入した。測定波長はパラニトロフェノールについては315nm、パラハイドロキシアセトアニリドについては247nmとし、カラム (4mm×250mm)はNucleosil 5C18を充てんし、移動相は60%および30%アセトニトリル水溶液を用いた。

実験結果

Table 2に7種のジフェニルエーテル系化合物、4種のDDT系化合物、3-MCおよびPBによる肝ミクロソームのP-450含量とAh遺伝子座に緊密に関与しているAHH活性とアセトアニリド水酸化活性¹⁸⁾誘導に対する影響を示す。

試験した化合物の中で、CNP、TCOH、NIPおよびTCNO₂についてAHH活性の増加が認められた。DD

Table 2. The effects of pretreatment of B6 mice with diphenyl ether compounds and DDT analogues on cytochrome P-450 content, AHH and acetanilide 4-hydroxylase activities.

Compounds	Cytochrome P-450 content (nmol/mg protein)	Aryl hydrocarbon hydroxylase (nmol/min/mg)	Acetanilide 4-hydroxylase (nmol/min/mg)
Control	0.69	0.64±0.04	2.26±0.18
CNP	1.18	1.65±0.15	5.82±0.26
CAP	0.75	0.48±0.06	2.60±0.15
PCNH ₂	0.78	0.84±0.02	3.93±0.57
PCNO ₂	0.81	0.72±0.05	2.43±0.30
TCOH	1.10	1.36±0.09	2.76±0.20
NIP	1.14	1.22±0.31	3.85±0.23
TCNO ₂	1.19	1.28±0.04	4.67±0.33
DDT	0.96	0.82±0.11	3.16±0.22
DDE	0.86	0.81±0.12	3.65±0.31
Kelthane	1.08	0.74±0.07	3.89±0.30
Chlorobenzilate	1.01	0.85±0.13	2.46±0.32
3-MC	1.49	4.78±0.65	14.06±1.00
PB	1.71	2.13±0.15	7.13±0.87

* Each value (mean ± S. D.) was based upon triplicate determinations.

T系化合物はA H H活性をほとんど誘導しなかった。又、アセトアニリド水酸化活性の増大がC N PとTCNO₂に認められた。ベンズピレンやアセトアニリドはチトクロムP₁-450¹⁸⁾の特異的な基質であるが、ジフェニルエーテル系化合物は全体的にみてP₁-450の良い誘導剤でないよう

に思われる。しかしながらC N Pはこれらの酵素活性をコントロールと比べて2倍以上に誘導し、P₁-450の中程度の誘導剤であった。

Table 3に、各化合物によるヒフェニルおよびアニリンの水酸化活性誘導に対する影響をまとめた。3-MCによ

Table 3. The effects of pretreatment of B6 mice with diphenyl ethers and DDT analogues on biphenyl 2- and 4-hydroxylase and aniline 4-hydroxylase activities.

Compounds	Biphenyl 2-hydroxylase (nmol/min/mg)	Biphenyl 4-hydroxylase (nmol/min/mg)	Aniline 4-hydroxylase (nmol/min/mg)
Control	0.60±0.03	1.94±0.06	0.67±0.04
CNP	1.66±0.13	3.38±0.19	1.10±0.05
CAP	0.53±0.02	1.74±0.05	0.71±0.09
PCNH ₂	1.30±0.09	2.61±0.09	0.62±0.01
PCNO ₂	0.76±0.05	2.52±0.40	0.90±0.06
TCOH	0.48±0.02	3.05±0.14	0.82±0.10
NIP	1.08±0.09	3.24±0.15	0.98±0.05
TCNO ₂	0.68±0.02	3.83±0.24	1.19±0.08
DDT	0.96±0.09	3.51±0.42	0.83±0.05
DDE	1.15±0.03	3.41±0.06	0.97±0.03
Kelthane	1.01±0.13	4.17±0.23	1.09±0.08
Chlorobenzilate	0.71±0.02	3.29±0.06	0.86±0.05
3-MC	3.08±0.23	4.68±0.15	1.06±0.14
PB	0.90±0.06	5.98±0.21	1.45±0.05

* Each value (mean ± S. D.) was based upon triplicate determinations.

Table 4. The effects of pretreatment of B6 mice with diphenyl ethers and DDT analogues on p-nitroanisole O-demethylase, N-methylaniline N-demethylase and methylaminoantipyrine N-demethylase activities.

Compounds	p-Nitroanisole O-demethylase * (nmol/min/mg)	N-Methylaniline N-demethylase * (nmol/min/mg)	Methylaminoantipyrine N-demethylase * (nmol/min/mg)
Control	3.59±0.61	5.36±0.17	7.37±0.55
CPN	8.58±0.25	11.58±0.23	14.21±0.05
CAP	9.45±1.01	9.01±0.44	7.93±1.15
PCNH ₂	12.87±0.87	10.28±0.78	8.80±0.60
PCNO ₂	10.26±0.78	9.30±0.70	8.37±0.40
TCOH	11.67±0.98	11.62±0.50	11.37±0.23
NIP	8.86±0.38	11.47±0.63	12.66±0.78
TCNO ₂	14.11±0.18	12.81±0.10	13.47±0.45
DDT	8.15±0.67	7.90±0.38	12.70±0.34
DDE	8.28±0.14	8.03±0.13	9.66±0.63
Kelthane	11.15±0.30	9.80±0.76	12.60±1.15
Chlorobenzilate	8.34±0.33	8.06±0.28	9.15±0.46
3-MC	10.70±0.40	9.66±0.54	10.83±0.45
PB	10.50±0.20	13.17±0.39	17.85±0.41

* Each vaue (mean ± S. D.) was based upon triplicate determinations.

って大いに誘導されるジフェニル2位水酸化活性はCNPとPCNH₂について活性の増大が観察された。一方、その他の化合物はこの酵素活性をほとんど誘導しなかった。ジフェニル4位水酸化活性とアニリン4位水酸化活性はジフェニルエーテル系化合物あるいはDDT系化合物によって増加しなかった。

パラニトロアニソール、Nメチルアニリンおよびメチルアミノアンチピリン脱メチル化活性におよぼす各化合物の影響をTable 4に示す。ここで示された結果は水酸化活性におけるものとはいくらか異っていた。即ち、用いたすべての化合物によってパラニトロアニソール脱メチル化活性の増大が認められた。ジフェニルエーテル系化合物の中でTCNO₂やPCNH₂のように二つのフェニル基の両パラ位に塩素原子が置換している化合物は、パラ位のみ塩素原子を置換しているCNPやNIPよりも大きな酵素誘導を

もたらした。又、DDT系化合物はこの酵素活性を2倍以上誘導した。

Nメチルアニリンとメチルアミノアンチピリンの脱メチル化活性に対して、いずれの化合物もコントロールと比較して約2倍誘導し、これらの活性の程度は3-MCあるいはPB処理のものとは差がなかった。

Table 5に各化合物による脱エチル化活性に対する影響を示す。3-MCやPBによって大いに誘導される7-エトキシクマリン脱エチル化活性はCNPとTCNO₂によって2倍以上増大した。パラニトロフェネトールとフェナセチンの脱エチル化活性の増加はCNP、NIP、TCNO₂およびケルセンについて見出された。7-エトキシレゾルフィン脱エチル化活性に関して、3-MCのように顕著な増大はいずれの化合物についても認められなかった。

Table 5. The effects of pretreatment of B6 mice with diphenyl ethers and DDT analogues on O-deethylase activities of 7-ethoxycoumarin, p-nitrophenetole, phenacetine and 7-ethoxyresorufin.

Compounds	7-Ethoxycoumarin O-deethylase (nmol/min/mg)*	p-Nitrophenetole O-deethylase (nmol/min/mg)*	Phenacetine O-deethylase (nmol/min/mg)*	7-Ethoxyresorufin O-deethylase (nmol/min/mg)*
Control	1.88±0.24	4.50±0.82	1.89±0.15	6.4±0.7
CNP	4.72±0.30	10.40±0.35	4.54±0.20	15.1±0.9
CAP	2.38±0.06	6.37±0.38	1.84±0.07	7.5±0.0
PCNH ₂	2.04±0.08	9.43±0.57	2.92±0.10	12.6±1.8
PCNO ₂	2.74±0.15	6.53±0.06	2.30±0.09	3.0±0.0
TCOH	2.29±0.10	5.40±0.26	2.42±0.05	2.0±0.8
NIP	4.29±0.22	9.15±0.19	3.58±0.19	4.5±0.0
TCNO ₂	5.85±0.05	8.37±0.06	4.49±0.10	4.5±0.0
DDT	4.16±0.26	7.17±0.25	2.87±0.09	7.5±1.5
DDE	3.55±0.15	7.87±0.15	2.97±0.05	11.0±0.8
Kelthane	4.03±1.00	8.13±0.21	3.89±0.42	11.6±1.5
Chlorobenzilate	3.98±0.15	5.50±0.10	2.64±0.31	8.0±0.8
3-MC	10.01±0.92	20.95±0.58	8.20±0.72	66.8±3.1
PB	13.43±0.75	11.50±0.36	5.40±0.11	11.0±0.9

* Each value (mean ± S. D.) was based upon triplicate determinations.

考 察

ジフェニルエーテル系化合物の肝ミクロソーム酵素活性に対する影響についての報告は現在までほとんどない。しかしながら、本研究の結果はB6マウスにこれらの化合物を投与することによって広範囲にわたってミクロソームの酵素活性が誘導されることを示した。特にパラニトロアニソール脱メチル化活性は顕著に増加し、塩素化ジフェニルエーテル系化合物によって誘導される特徴的な活性であっ

た。ここでフェニル基における塩素原子の置換位置がこの酵素誘導に重要な役割を果たしていた。即ち、2つのフェニル基の両パラ位が塩素原子に置換された化合物の方が、CNPやNIPのように片方のパラ位のみが塩素原子に占有されているものより大きな誘導効果を引き起こしたからである。これと類似の現象がPCBを用いた実験¹⁹⁾において認められている。それによるとPCBの両方のパラ位が塩素化される方が、オルト位の塩素化されるよりもはるかに大きい誘導効果をもたらすことが示された。又、Ecobicon

とComeau²⁰⁾はPCBの純品を用い、パラニトロアニソール脱メチル化活性とアニリン水酸化活性の誘導にとってパラ位の塩素化が最も重要な因子であることを見出した。しかしながら、本研究においてジフェニルエーテル系化合物はB6マウスにおいてアニリン水酸化活性の誘導剤にはならなかった。

DDT系化合物も炭素によって2つのフェニル基が結合しているが、Johnstoneらは¹⁹⁾両方のパラ位が塩素化されている時(P, P'-DDT)の方が、オルト位とパラ位が塩素化されている時(O, P'-DDT)よりも大きな誘導効果をもたらされることを報告した。このようにパラニトロアニソール脱メチル化活性はジフェニルエーテル系化合物やDDT系化合物による酵素誘導の指標になり得ると言える。これまで多くの有機塩素系農薬がPB型であると分類されてきたが、²¹⁾PBによる酵素誘導の型とジフェニルエーテル系化合物やDDT系化合物のパターンとは異っていることが今回の報告で明らかになった。

Ah遺伝子座はチトクロムP₁-450(AHH), P-448(アセトアニリド水酸化酵素)および少くともあと20種の酵素活性の誘導に関与していることは良く知られている。²²⁾試験した化合物の中で、CNPがAHH活性、アセトアニリド水酸化活性およびフェニル2位水酸化活性の比較的中程度の誘導剤であった。この結果はCNPがある実験条件下で3-MC型の誘導剤となり得ることを示している。Goldsteinら²³⁾はPCBの誘導実験から、AHH活性の誘導には2つのフェニル基の平面性が重要であることを報告した。又、2, 3, 7, 8テトラクロロダイオキシンや2, 3, 7, 8テトラクロロジベンゾフランによるAHH誘導効果が3, 4, 5, 3', 4', 5'ヘキサクロロビフェニルの誘導効果と同一であることも報告されている。²⁴⁾これらの化合物はどれも2つのフェニル基が対称的に塩素化された平面構造を有している。CNPの場合、1つのフェニル基が塩素化されているだけであるが、もう1つのフェニル基のオルト位に置換基が存在しないために、2つのフェニル基が平面的な構造を有する可能性がある。CNPがAHH活性を誘導するという事実はこの酵素誘導に平面性が必要であるということと一致する。一方、DDT系化合物は2つのフェニル基の間の炭素結合と α 炭素における置換基のために平面構造を有することはないように思われる。事実、DDT系化合物ではAHH活性を誘導しなかった。

結 語

7種のジフェニルエーテル系化合物が遺伝的にAHH活性誘導に感受性の高いB6マウスに投与され、チトクロムP-450と12種の酵素活性誘導におよぼす影響が検討され

た。同時に比較のために、3-MC, PBおよび4種のDDT系化合物が使用された。CNPとTCOHはコントロールと比較して2倍以上のAHH活性を誘導した。しかし他の化合物はほとんどAHH活性を誘導しなかった。パラニトロアニソール脱メチル化活性はジフェニルエーテル系化合物とDDT系化合物によって特異的に誘導された。2つのフェニル基における両パラ位の塩素化がこの酵素活性誘導に重要であることが示された。

文 献

- 1) Poland, A. & Glover, E.: *Mol. Pharmacol.*, **9**, 736 (1973)
- 2) Poland, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 4936 (1976)
- 3) Litterst, C. L. et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **23**, 112 (1972)
- 4) Poland, A. & Glover, E.: *Mol. Pharmacol.*, **13**, 924 (1977)
- 5) Poland, A. & Glover, E.: *ibid.*, **11**, 389 (1975)
- 6) Nebert, D. W. & Gielen, J. E.: *Fedn. Proc.*, **31**, 1315 (1972)
- 7) Yamagishi, T. & Akiyama, K.: *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, **10**, 629 (1981)
- 8) Nakao, A.: *Fukuoka Med. J.*, **66**, 123 (1973)
- 9) Atlas, S. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 4712 (1977)
- 10) Omura, T. & Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964)
- 11) Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 12) Nebert, D. W.: *Methods in Enzymology*, **L11**, 226 (1978)
- 13) Atlas, S. A. & Nebert, D. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 496 (1976)
- 14) Ullrich, V. & Weber, P.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 1171 (1972)
- 15) Nash, T.: *Biochem. J.*, **55**, 416 (1953)
- 16) Imai, Y. et al.: *J. Biochem.*, **60**, 417 (1966)
- 17) Guenther, T. M. et al.: *Analyt. Biochem.*, **96**, 201 (1979)
- 18) Negishi, M. & Nebert, D. W.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 11015 (1977)
- 19) Johnstone, G. J. et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **28**, 94 (1974)
- 20) Ecobicon, D. J. & Comeau, A. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **33**, 94 (1975)
- 21) Conney, A. H.: *Pharmac. Rev.*, **19**, 317 (1967)
- 22) Nebert, D. W. & Jensen, N. M.: *Crit. Rev. Biochem.*,

- 6, 401 (1978)
- 23) Goldstein, J. A. et al. : Toxicol. Appl. Pharmacol.,
46, 633 (1978)
- 24) Poland, A. & Glover, E. : Mol. Pharmacol., 10,
349 (1974)

欧 文 要 约

With seven chlorinated diphenyl ether pesticides, four DDT analogues, 3-methylcholanthrene and phenobarbital, the induction pattern of hepatic microsomal cytochrome P-450 and associated 12 monooxygenase activities were analyzed by the use of genetically aromatic hydrocarbon "responsive" C57BL/6N (B6) mice.

Treatment of B6 mice with 2,4,6-trichloro-p-nitrophenol (CNP) and 2,4-dichloro-p-chloro-2'-hydroxyphenol (TCOH) caused induction of aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity more than twice as compared with control mice.

But other compounds tested induced a little or no AHH activity.

The activity of p-nitroanisole O-demethylase was commonly induced in microsomes from B6 mice treated with seven diphenyl ether compounds and four DDT analogues.

The chlorination of both p and p' positions on biphenyl rings was important for the induction of p-nitroanisole O-demethylase activity.