

学 位 論 文 題 名

薬物代謝酵素の変動と化学物質の毒性発現に関する研究

学位論文内容の要旨

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)は多環芳香族炭化水素の一つであり、極めて強い代謝活性化型発癌性物質である。DMBAはマウスやラットに単回の経口投与や静脈内投与によって乳ガンや白血病を引き起こす事が知られている。一方、Sudan IIIは主として化粧品に使用されるアゾ色素であるが、本色素の前処置がDMBA発癌を抑制することが報告されている。Sudan IIIが448nmに吸収極大を有するCytochrome P450 (CYP)の誘導剤であることから、化学物質の毒性発現に及ぼす酵素誘導の影響を検討する目的で、代謝活性化型発癌性物質としてDMBAを、酵素誘導剤としてSudan IIIを用いて表題の研究を行った。

先ず、ラットでのSudan IIIの発癌抑制作用をより簡便なマウスを用いるMicronucleus assayによって再現することを目的に実験を行った。Micronucleus assayは骨髓での染色体異常を検出する短期*in vivo*遺伝毒性試験法であり、血液塗抹標本を蛍光顕微鏡下に観察して小核出現頻度を求めた。Sudan IIIを1, 3, 5日間前処置したC57BL/6 (B6)マウスにDMBAを40 mg/kg投与して前処置開始前、DMBA投与前および投与後24, 48, 72, 96, 120, 144時間後の小核出現頻度を検討した。

その結果、DMBAを投与した全ての群で投与前に比し有意な小核出現

頻度の増加が認められたが、3および5日間のSudan IIIの前処置によってこの小核出現頻度の増加は有意に抑制された。したがって、ラットで報告されたSudan IIIの発癌抑制作用をマウスを用いた簡便なスクリーニング系で再現することができた。

次に、Sudan III前処置による薬物代謝酵素の誘導がDMBAの代謝活性化に及ぼす影響を検討した。SD系ラットにSudan IIIを40mg/kg、5日間投与して肝ミクロソームを調製し、3-methylcholanthrene (3-MC)およびphenobarbital sodium (PB)で酵素誘導した肝ミクロソームと酵素活性および代謝活性化能を比較検討した。代謝活性化能は細菌の復帰突然変異を指標にDMBA活性代謝物の生成を測定して比較した(Ames assay)。

肝ミクロソームの λ maxの変化や7-Ethoxycoumarin O-dealkylase活性の上昇、そしてWestern blotting解析の結果から、Sudan IIIは3-MCと同様、CYP1Aを誘導することが明らかとなった。Ames assayではSudan IIIと3-MCはDMBAを低用量から強く代謝活性化したのに対し、対照群およびPBではDMBAが高用量の時にのみ代謝活性化を亢進した。これらのことから、Sudan IIIおよび3-MCで誘導されたCYP1Aは高いアフィニティーでDMBAを活性化するP450分子種であることが示唆された。しかし、Sudan IIIが高いアフィニティーでDMBAを活性化するCYP1Aを強く誘導することは発癌抑制とは明らかに矛盾する事実であった。そこで、多環芳香族炭化水素の解毒への関与が考えられているUDP glucuronosyl transferase (UDPGT)とglutathione S-transferase (GST)に着目した。これらの酵素活性を測定した結果、Sudan IIIは代謝活性化に作用するCYP1Aだけでなく両抱合酵素を誘導

することが示された。これら酵素の補酵素をAmes assayに応用すると代謝活性化の増強は対照群と同じレベルにまで抑制された。抱合酵素が作動する本実験系はより*in vivo*に近い系と言える。これらのことより、CYP1Aにより生成されたDMBAの活性代謝物は抱合酵素により速やかに解毒されるものと考えられた。その結果、*in vivo*においては生成された活性代謝物の半減期や濃度が低下し生体内高分子との反応や発癌が抑制されたものと推察された。

この仮説を検証し、CYP1A誘導の役割をさらに検討する目的で、CYP1Aの誘導を支配するAhレセプターに差のある2系統のマウスを用いてDMBAの遺伝毒性とSudan IIIの作用のマウス系統差を検討した。D2マウスは3-MCに対するCYP1A誘導能を欠く系統のマウスでAh-nonresponsive strainと呼ばれており、これに対しB6マウスはAh-responsive strainと呼ばれている。

両系統のマウスにDMBAを10, 20および40 mg/kg投与し、投与後24, 48, 72, 96, 120および144時間後に小核出現頻度を観察した。その結果、いずれの系統のマウスにおいても用量に相関した明らかな小核出現頻度の増加が認められ、DMBAの小核誘発性にマウス系統差は認められなかった。しかし、マウスをSudan IIIで前処置(80mg/kg, 5days)すると、B6マウスでは小核出現頻度の増加は有意に抑制されたが、D2マウスでは何ら変化は観察されず、Sudan IIIのDMBA誘発小核抑制作用にはB6マウスとD2マウスの間にマウス系統差が存在することが明らかとなった。

Sudan IIIの両系統のマウスにおける肝薬物代謝酵素系への影響を見ると、Sudan IIIは主にCYP1Aを誘導するとともに多くの酵素活性を増

加させた。その誘導はB6マウスの方がD2マウスよりも強く認められた。しかし、この酵素誘導はラットでの実験と同様にAmes assayでDMBAの代謝活性化を著しく増強し、マウスにおいても*in vivo*と*in vitro*で明らかな矛盾が認められた。この矛盾はラットの場合と同じ手法によって解決することができた。すなわち、Sudan IIIは両系統のマウスのGSTを誘導し、GSH存在下のAmes assayでは増強された代謝活性化は両系統のマウスにおいて対照群とほぼ同じレベルに抑制された。

これらの結果は、先に推論したSudan IIIの発癌抑制メカニズムをB6マウスで間接的ではあるが立証したものと思われる。また、Sudan III前処置D2マウスでもGSHにより代謝活性化の増強が抑制されたことから、Sudan IIIにより誘導されたGSTの活性レベルはD2マウスにおいても解毒に関しては十分であったことが明らかとなった。さらに、D2マウスでSudan IIIの*in vivo*遺伝毒性抑制作用が認められなかったことを考え併せると、発癌抑制には強いCYP1Aの誘導が重要であると思われた。

以上の結果は、同時にCYP1Aの誘導を支配しているAhレセプターがSudan IIIの発癌抑制には重要な役割を演じていることを示唆している。近年の報告によるとAhレセプターはCYP1Aの誘導だけでなく、他の遺伝子の発現調節や胎児の発育、恒常性の維持など複雑な機能を有していることが明らかにされつつある。

したがって、DMBAとSudan IIIの相互作用をさらに解明していくためには、代謝活性化と解毒のバランスに加えてAhレセプターに対する親和性やAhレセプターの機能、リガンドの生体内運命などを検討することが必要と思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	藤田正一
副査	教授	中里幸和
副査	教授	高島郁夫
副査	助教授	数坂昭夫

学位論文題名

薬物代謝酵素の変動と化学物質の毒性発現に関する研究

発癌性多環芳香族炭化水素のうちでも最も発癌性が高い7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)による発癌はSudan III前投与により抑制されるが、その機構は明かにされていない。発癌抑制には、遺伝子毒性の回避、プロモーションの抑制、免疫機構の強化による癌細胞の除去など、様々な機構が考えられる。畠山氏はSudan IIIによるDMBA発癌抑制が遺伝子毒性の抑制によることをマウスを用いた小核試験法により明らかにした。

次に、Sudan IIIはDMBAの代謝的活性化を触媒するCYP1A1を誘導すること、このため、Sudan III処理ラットの肝臓S-9はDMBAの変異原性を顕著に増強することを明らかにした。しかし、これは発癌抑制とは矛盾する結果である。一方、活性中間代謝物の解毒にあづかるグルクロン酸抱合と、グルタチオン抱合の活性もSudan IIIによって顕著に誘導された。そこで、これらの酵素の補因子(UDPGA, GSH)を添加した、より生体に近い系で試験すると、変異原性の顕著な抑制が起り、コントロールレベルと同等となった。これらのことから、CYP1A1により生成されたDMBAの活性代謝物は、抱合酵素により速やかに解毒されたものと考えられた。

このことを検証するため、Sudan IIIでCYP1A1の誘導がかかる系統(B6)とかからない系統(D2)のマウスを使って、両系統をSudan III処理した後、DMBAを投与して小核の出現頻度を調べたところ、誘導がかかるB6マウスではSudan III処理で小核の出現が顕著に抑制されたが、誘導のかからないD2マウスでは抑制されないことが明らかになった。従って、DMBA遺伝子毒性の抑制にはCYP1A1および抱合酵素の誘導が必要であることが明らかになった。

以上のように、畠山氏はSudan IIIによるDMBAの化学発癌の抑制が遺伝子毒性の抑制によること、また、その抑制は代謝酵素系の誘導によるDMBAの消失の促進によることを明らかにした。さらに、癌原物質の代謝的活性化を行うCYP1A1の誘導は生体にとつ

て危険と考えられているが、抱合酵素の誘導が同時に起る場合、必ずしも危険とはいえず、むしろ生体防御の反応と言えることを明らかにした。これらのことは、薬物代謝酵素系の活性の変動に伴う薬毒物の生体に対する影響の変化、あるいは薬物相互作用を考察する上で極めて示唆に富んだ知見といえる。よって、審査員一同は畠山茂樹氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。