

## SulfanilamideおよびPhenacetinの毒性発現機構に関する研究

繪柳, 玲子

<https://doi.org/10.11501/3054257>

---

出版情報 : 九州大学, 1990, 薬学博士, 論文博士  
バージョン :  
権利関係 :

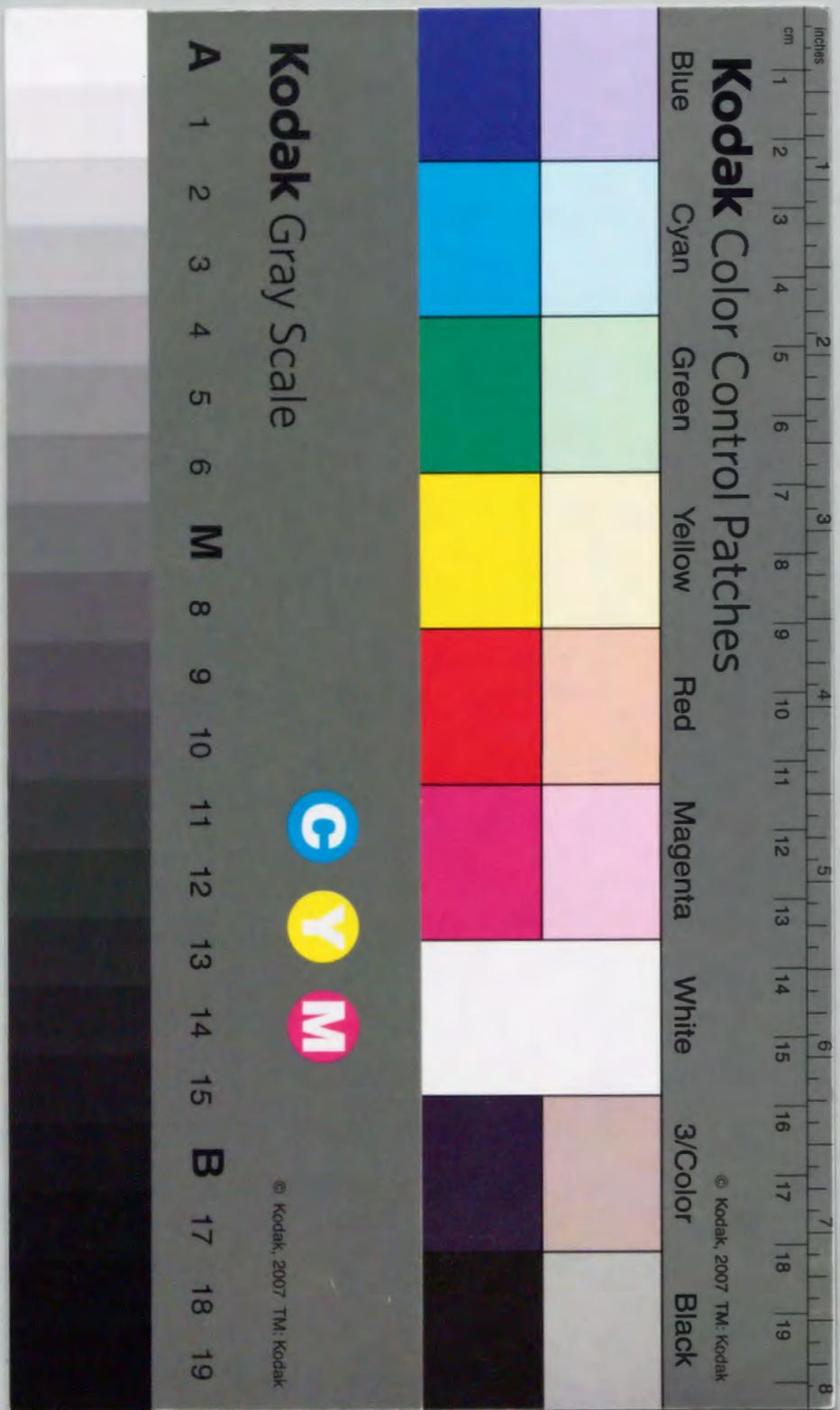


①

SulfanilamideおよびPhenacetinの  
毒性発現機構に関する研究

繪 柳 玲 子

( 1 9 9 1 )



目 次

第 I 章	緒言	1
第 II 章	Sulfanilamide 皮膚アレルギーの発現機序	
1.	Sulfanilamide の体内分布	
1-1	概要	4
1-2	Sulfanilamide の体内分布	4
2.	Sulfanilamide の代謝	
2-1	概要	6
2-2	In vivo 代謝	6
2-3	In vitro 代謝	7
2-3-1	ラット肝および腎ミクロソームによるN <sup>4</sup> -水酸化反応	8
2-3-2	ラット肝ミクロソームによる3位-水酸化反応	10
2-3-3	N <sup>4</sup> -AcetylsulfanilamideのN-水酸化反応と 4-hydroxylaminobenzenesulfonamide (4-HABSA) のアセチル化	12
2-3-4	4-HABSA から4-nitrosobenzenesulfonamide (4-NSBSA) への変換	13
2-3-5	Sulfanilamide の皮膚における代謝	14
3.	Sulfanilamide 代謝物および関連化合物による皮膚反応	
3-1	概要	15
3-2	皮膚反応の条件検討	15
3-3	皮膚反応の結果	16
3-4	Dose response curve	17
4.	4-Hydroxylaminobenzenesulfonamide (4-HABSA) の血中抗体産生能	
4-1	概要	17
4-2	4-HABSA 単独感作	18
4-3	4-HABSA-BSA 結合体感作	19
5.	Sulfanilamide および代謝物のタンパク結合性	
5-1	概要	20
5-2	4-HABSA のタンパク結合性	20
5-3	4-Nitrosobenzenesulfonamide (4-NSBSA) の BSAとの結合	22
5-4	Sulfanilamide, 4-HABSAおよび4-NSBSA 投与による 肝および腎の GSH量の低下	22

5-5	3-Hydroxysulfanilamide (3-OH·SA) と glutathione (GSH) との結合	
5-5-1	概要	23
5-5-2	3-OH·SA-GSH 結合体の構造決定	23
5-5-3	Horseradish peroxidase および ミクロゾームによる 3-OH·SA と GSH との結合反応	26
6.	考察	27
第三章 Phenacetin と sulfanilamide の腎毒作用機序		
1.	Phenacetin の代謝	
1-1	概要	30
1-2	Phenacetin の N-水酸化反応	30
1-3	p-Aminophenol の in vitro 生成	31
2.	Phenacetin と sulfanilamide および それらの関連化合物による腎毒作用	
2-1	概要	32
2-2	薬物の N-水酸化反応と腎障害	33
2-3	p-Aminophenol および aniline 誘導体と腎障害	34
3.	3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl (PenCB) による sulfanilamide と phenacetin の腎毒作用増強	
3-1	概要	36
3-2	薬物代謝酵素誘導剤前処理の腎毒性への影響	36
3-3	p-Aminophenol 生成における薬物代謝酵素誘導剤前処理の影響	38
4.	p-Aminophenol と GSH および cysteine (CYS) との結合	
4-1	概要	39
4-2	p-Aminophenol 投与による肝および腎の GSH 量の低下	39
4-3	p-Aminophenol と GSH および CYS 結合体の構造決定	40
4-4	Horseradish peroxidase/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による p-aminophenol と GSH との結合反応	46
4-5	Microsomes/cumenehydroperoxide, butylhydroperoxide による p-aminophenol と GSH および CYS との結合反応	46
5.	考察	48
	謝辞	50

( 実験の部 )

1)	実験材料	51
2)	メトヘモグロビンの定量法	53
3)	動物の前処理と肝臓および腎臓 9000×g 上清ならびにミクロゾームの調製	53
4)	Cytochrome P-450 含量の測定とタンパク質の定量	54
5)	Sulfanilamide N-水酸化活性の測定	54
6)	Sulfanilamide 3 位-水酸化活性の測定	55
7)	N <sup>4</sup> -Acetylsulfanilamide N-水酸化活性の測定	55
8)	4-HABSA の 4-NSBSA への酸化反応	55
9)	モルモット皮膚反応	56
10)	血中抗体の検討	56
11)	UDP-グルクロン酸転移酵素活性の測定	57
12)	硫酸抱合酵素活性の測定と BSA との結合実験	57
13)	4-HABSA および 4-NSBSA と BSA との結合	58
14)	生体内 GSH の定量法	59
15)	3-OH·SA -GSH 結合体の酵素合成, 精製および同定	
16)	Horseradish peroxidase/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による 3-OH·SA と GSH との結合反応	59
17)	Microsomes/butylhydroperoxide による 3-OH·SA と GSH との結合反応	59
18)	Phenacetin N-水酸化活性の測定	60
19)	Phenacetin の代謝活性	60
a.	Phenacetin 脱エチル化活性	
b.	Phenacetin 脱アセチル化活性	
c.	p-Phenetidine 脱エチル化活性	
d.	Acetaminophen 脱アセチル化活性	
20)	腎毒性指標の検討	61
21)	Horseradish peroxidase/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> による p-aminophenol と GSH との結合反応	62
22)	Microsomes/cumenehydroperoxide, butylhydroperoxide による p-aminophenol と GSH および CYS との結合反応	62
23)	p-Aminophenol と GSH および CYS との結合体の酵素合成, 精製および同定	62
	機器	63
	文献	64-68

本論文で使用する薬物名および試薬名の略語表

N <sup>1</sup> -ASA	N <sup>1</sup> -acetylaminobenzenesulfanilamide
N <sup>4</sup> -ASA	N <sup>4</sup> -acetylaminobenzenesulfanilamide
4-AHABSA	4-N-acetylhydroxylaminobenzenesulfonamide
4,4'-AZBDSA	4,4'-azobenzenedisulfonamide
4,4'-AZOBDSA	4,4'-azoxybenzenedisulfonamide
N <sup>1</sup> ,N <sup>4</sup> -DASA	N <sup>1</sup> ,N <sup>4</sup> -diacetylaminobenzenesulfanilamide
4-DAHABSA	4-N-diacetylhydroxylaminobenzenesulfonamide
SA-COCH <sub>2</sub> OH	4-N-glycoloylaminobenzenesulfonamide
SA-COOH	4-N-glyoxaloylaminobenzenesulfonamide
4,4'-HAZBDSA	4,4'-hydrazobenzenedisulfonamide
4-HABSA	4-hydroxylaminobenzenesulfanilamide
2-OH·SA	2-hydroxysulfanilamide
3-OH·SA	3-hydroxysulfanilamide
4-NSBSA	4-Nitrosobenzenesulfonamide
N-OH·2AAF	N-hydroxy-2-acetylaminofluorene
N-OH·PH	N-hydroxyphenacetin
ASP	aspartic acid
CYS	cysteine
GSH	glutathione, reduced form
GSSG	glutathione, oxidized form
HIS	histidine
LYS	lysine
TYR	tyrosine
BSA	bovine serum albumin
BGG	bovine γ-globulin
RS	rabbit serum
SRBC	sheep red blood cell
3-MC	3-methylcholanthrene
PB	phenobarbital
PenCB	3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl

## 第I章 緒言

一般に有機化合物は、摂取されると生体内で代謝をうけ、母化合物より極性の高い代謝物として尿および糞中に排泄される。このような極性化反応は多くの場合解毒反応と考えられていたが、近年、逆に母化合物より有毒な物質に変換することも知られてきた<sup>1-3</sup>。母化合物よりも反応性に富む代謝物は、生理的条件下でさえ容易に生体高分子と反応し共有結合を形成する。その結果、組織の壊死やアレルギー反応が生じたり、またDNAの損傷によりガンや奇形が発現することが明らかになってきた<sup>4-6</sup>。すなわち、発ガン物質であるacetylaminofluoreneはN-水酸化とそれに続く硫酸抱合, benzo(a)pyreneはエポキシ化反応, cycasinは加水分解反応, 4-nitroquinoline N-oxideは還元反応とアシル抱合, dimethylbenzanthraceneは水酸化反応とそれに続く硫酸抱合などによって活性化されている。また, nitrosobenzene, 4-nitrosobiphenyl, 2-nitrosofluoreneなどのarylnitroso化合物もhydroxylamineと同様、活性代謝物であることが報告されている<sup>7-9</sup>。従って、医薬品を含む化学物質はその生体内代謝を抜きにして毒作用を論ずることは出来ない。著者は、この様な見地から薬物代謝を基盤として sulfanilamide によるアレルギー反応および phenacetin と sulfanilamideによる腎障害の発現機序の研究を行なった。

薬剤アレルギーという概念の基礎ができたのは免疫化学の発達によるもので Landsteiner ら<sup>10-12</sup> によって研究された人工抗原の構造活性相関の研究結果に負うところが大きい。彼らは、p-aminobenzene arsenic acid をジアゾ化反応で結合させたタンパクで質で、ウサギを免疫すると p-aminobenzene arsenic acid に対する抗体が生産されること、また、2,4-dinitrochlorobenzene などの接触性皮膚炎を起こす化学物質自体が直接モルモットを感作することを報告した。すなわち、低分子化合物が抗原化するためには何らかの生体内反応が起り、その結果、生体高分子と共有結合することが必須であることを明らかにした。薬剤アレルギーの発現機序については、薬剤の生体内代謝が、複雑かつ不明な点が多かったため、これまでほとんどの薬剤でタンパクとの結合のメカニズムが判明していない。1960年代以降、ペニシリンアレルギーにおける抗原性の分析が、Levin<sup>13</sup>, Eisen<sup>14</sup>, 真下<sup>15</sup>, 堀内ら<sup>16</sup>, によって進められた。ペニシリンアレルギーにおける主な抗原は代謝過程で生じた penicilloic acid 残基とタンパクの  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> 基とのアミド結合であると提唱されている。その他の薬剤については、ピラゾロン系解熱鎮痛剤であるアンチピリン, アミノピリンについて、大城<sup>17</sup>,

占野ら<sup>18</sup>の報告があり、バルビツレートについては、Spector<sup>19</sup>, Chung<sup>20</sup>, 佐藤ら<sup>21</sup>の報告がある。しかしいずれの場合も、生体内での結合様式、抗原構造あるいはそれに基づく抗原認識の問題については不明な点が多く残されている。

一方、サルファ剤アレルギーについては、これまで N<sup>4</sup>-アミノ基の水酸化体である 4-hydroxylaminobenzenesulfonamide (4-HABSA) にモルモット皮膚感作力のあることが Schwartz-Speck ら<sup>22</sup>によって見出された。その後の研究で、4-HABSA に焦点を当てたものが報告されているが<sup>23-25</sup>、用いた本物質が不安定性のためか確固たる結論には至っていない。Fries ら<sup>26</sup>によって明らかにされた sulfanilamide の新代謝経路として N<sup>4</sup>-アミノ基のアセチル化後の酸化経路があるが、この酸化過程の中間体としてアルデヒドの生成が示唆される。Fig. 1 にアレルギー発現との関連においてその代謝経路を網羅した。この図で、タンパク質との結合が考えられる代謝物あるいは予想物質を \* で示したが、4-HABSA とともにこのアルデヒド体以外に、ニトロソ体、キノンイミン体も、サルファ剤におけるハプテンとしての役割を有しているかどうか、今後さらに研究が必要である。

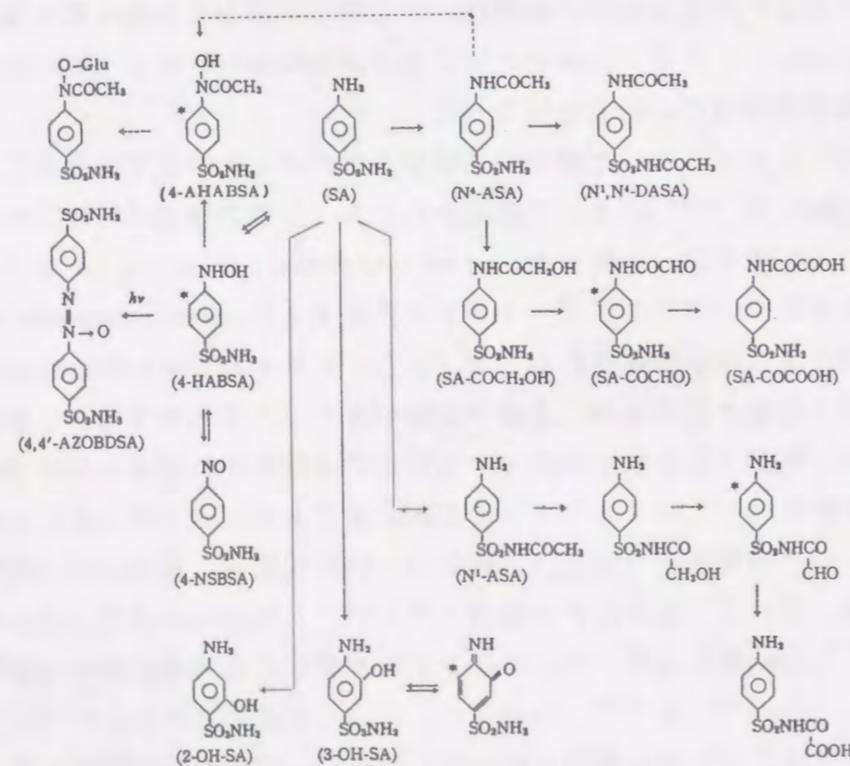


Fig. 1 Metabolic Pathways of Sulfanilamide (SA) and Possibility of Protein Binding

—— known pathway, ..... unknown pathway  
\* compounds with possibility of protein binding

一方、薬物による腎障害については、近年薬物の種類の増加と大量投与の傾向により年々増加の傾向にある。腎臓は血流量が多く、しかも本来が排泄器官であるため高濃度の薬剤にさらされ他の臓器よりも薬剤の直接毒性を受けやすい。解熱鎮痛剤である phenacetin は、腎乳頭部壊死や間質性腎炎を起こすことから、ここ数十年間に腎障害に関して多くの報告が出されてきた<sup>27-30</sup>。Phenacetin の代謝については、Fig. 2 に示す様な代謝経路が示されているが、いずれの代謝物が腎障害における直接的な原因物質であるか未だ決定的な解明には至っていない。さらに sulfanilamide による腎障害については、間質性腎炎や糸球体腎炎など免疫学的機序が報告<sup>31, 32</sup>されており、アレルギー反応との共通性が予想される。そこで、phenacetin および sulfanilamide の腎毒性発現機序を生体内代謝との関連において解明することを試みた。

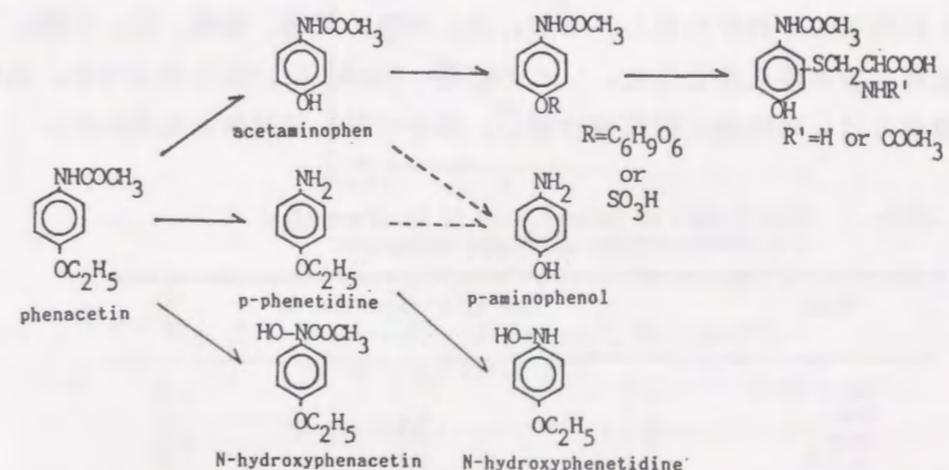


Fig. 2 Metabolic Pathways of Phenacetin

—— known metabolic pathway  
----- unknown metabolic pathway

1 Sulfanilamideの体内分布

1-1 概要

生体内に取り込まれた薬物は、血液を介して全身に分布し、主として肝臓の薬物代謝酵素によって代謝を受ける。その結果、極性が増し、腎臓から尿中へ排泄される。薬物の毒性、安全性を調べるためには、薬物の吸収、分布、代謝、排泄の状態を知ることが必要である。そこで、sulfanilamideのアレルギー発現機序を調べるために体内分布、代謝、排泄について詳細に検討した。

1-2 Sulfanilamide の体内分布

ラットにおけるsulfanilamideの生体内分布を調べるために実験の部(1)に記載した長瀬らの方法<sup>33</sup>に従い<sup>35</sup>S-sulfanilamideを合成した。0.152 μCi/mgのspecific radioactivityを有する<sup>35</sup>S-sulfanilamideをラットに1群2匹としてそれぞれに100 mg/kgを腹腔内に投与した。1群は1時間後、2群は2時間後、3群は4時間後にそれぞれ殺し、血液、尿、肺臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、肝臓、皮膚の放射能を測定した。その結果、Table 1に示したように、放射能は、血液中では1時間後に最高値に達し、尿中では4時間後も増加した。

Table 1 Distribution of Radioactivity in Rat Organ after i.p. Administration of <sup>35</sup>S-Sulfanilamide

Organ	Time after injection (h)		
	1	2	4
Whole blood	21.9	13.3	7.9
Heart	7.2	8.2	1.7
Lung	3.1	3.2	2.0
Spleen	3.4	3.6	1.6
Kidney	5.3	12.4	7.4
Stomach	2.8	2.5	1.4
Intestine	0.4	2.0	2.4
Liver	6.5	7.5	5.6
Urine	11.1	19.4	50.2
Feces	0	1.7	1.4
Skin *	23.4	19.7	8.0

Each value represents mean of 2 experiments.

The dose of <sup>35</sup>S-sulfanilamide was 135,000 (cpm/mg) and the total recovery was 89.2 %.

\* The surface area of rat skin was calculated by using Meeh's formula as follows:  $A(m^2) = K \cdot W^{2/3}$ ,  $K$  (Meeh's constant=0.091),  $W$  (body weight, kg). The weight of the skin was calculated by the experimental results (2.0 cm<sup>2</sup> of skin = 1.0 g).

投与後各臓器の分布は、1-3時間で最高濃度を示し、肝臓、腎臓、皮膚に高濃度に検出された。とくに注目すべきことは、皮膚への分布が投与後1-2時間では肝臓の2.5-3.0倍と高いことであった。ここで皮膚の重量はMeehの式<sup>34</sup>より算出した。このような皮膚への<sup>35</sup>S-sulfanilamideの高濃度の分布は薬疹の発現部位が皮膚であること、また光線過敏症との関連性より興味をもたれた (Fig. 3)。

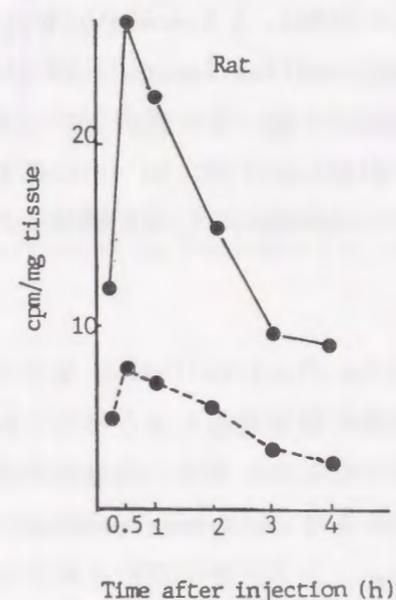


Fig. 3 Comparison of Radioactivity of <sup>35</sup>S in skin and liver

—, in skin ; ..... , in liver

2. Sulfanilamideの代謝

2-1 概要

Sulfanilamideの代謝については既に多くの研究があり<sup>26, 35, 36</sup> Fig. 1に示すような代謝経路が考えられている。代謝中間体の存在については、未だ不明な点が多く、同定するために予想される代謝物あるいは関連化合物を文献にしたがい合成し、Fig. 1に示すように略記した<sup>37-43</sup>。これら合成品の機器分析の結果は、実験の部(1)のTable 2に記載した。まず、活性代謝物と指摘されて

いる4-HABSAの血液中あるいは尿中排泄の有無を確認することを目的として、ラットにおける $^{35}\text{S}$ -sulfanilamideの代謝を再検討した。その結果、これまでの報告のごとく主代謝経路は、アセチル抱合で $\text{N}^4$ -acetylsulfanilamide( $\text{N}^4$ -ASA),  $\text{N}^1$ -acetylsulfanilamide( $\text{N}^1$ -ASA)の排泄にはマウス, ラット, モルモット, ウサギで種差が認められた(データは示していない)。4-HABSAについてはRosenthalら<sup>23</sup>が、ラット, イヌ, ヒトの尿中代謝物としてわずかではあるが定性的にジアゾ反応により検出できたと報告している。しかし、ウサギでは検出できなかったと述べており不明確な点が多い。Williamsら<sup>36</sup>もまた200mg/bodyの用量で投与したウサギにおいて4-HABSA, 4-N-acetylhydroxylaminobenzene-sulfonamide(4-AHABSA), 2-hydroxysulfanilamide(2-OH-SA)およびp-aminophenolを検出しようとしたが不成功に終わったと報告している。そこで著者らは、in vivo, in vitroにおいて4-HABSAの生成、in vitroにおいて3-hydroxysulfanilamide(3-OH-SA)および4-AHABSAの生成を検討した。

## 2-2 In vivo 代謝

1 mmol/kgあるいは2 mmol/kgのsulfanilamideをラットに腹腔内投与し、実験の部(2)記載のごとく経時的に眼穿刺法により採血しEvelyn-Malloy法<sup>44</sup>によりメトヘモグロビンの定量を行なったところ、投与後30分にメトヘモグロビンの増加が見られ、血中に4-HABSAあるいは4-nitrosobenzensulfonamide(4-NSBSA)の存在が示唆された。一方、4-HABSAを投与したときは、30分後に高濃度のメトヘモグロビンを検出した(Fig. 4)。さらに、sulfanilamide 2 mmol/kgをラットに腹腔内投与しメトヘモグロビンの生成が最大となる30分後にヘパリン存在下で採血し、直ちにGSHを添加後酢酸エチルエステル(AcOEt)で抽出し、実験の部(5)記載のHPLCの条件で測定した結果、標品の4-HABSAと一致する物質が検出された。その生成量は血液1 ml当たり1.125 nmol 4-HABSAであった。しかし、4-NSBSAは抽出条件、HPLCの測定条件など種々検討したが、検出することができず、また血液に4-NSBSAを添加して回収実験を試みたが回収できなかった。そこで血液を血清と血球に分離し4-NSBSAの回収実験を再度行なったところ、4-NSBSAは血球によって4-HABSAに還元されることがHPLCの結果から判明した。

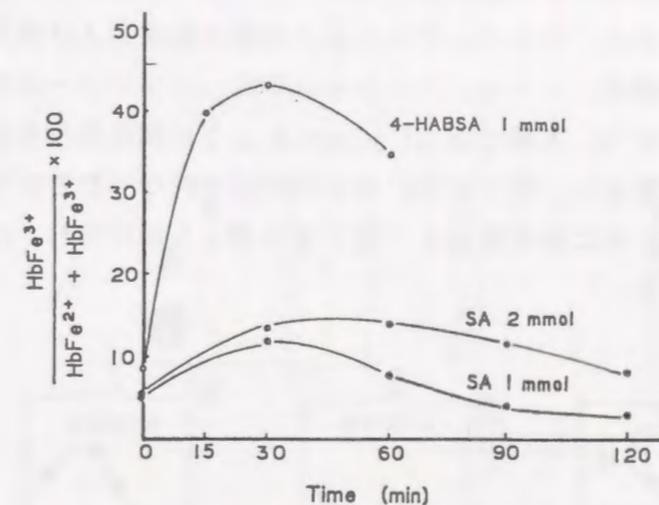


Fig. 4 Ferrihaemoglobin Formation in the Blood after i.p. Injection of Sulfanilamide(SA) and 4-HABSA to Rats

## 2-3 In vitro 代謝

Sulfanilamideのin vitro代謝については、Thauerら<sup>23</sup>が、ラット肝ミクロゾームのNADPH生成系でsulfanilamideから4-HABSAの生成をnitroso体として薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した。さらに、同じ系に赤血球を加えるとメトヘモグロビン化することにより、4-HABSAの生成を間接的に証明している。そこで、著者は直接的に4-HABSAの生成を証明するために、いくつかの分析方法を検討した。ガスクロマトグラフィー(GLC)では、サルファ剤が不揮発性で気化しにくく、加熱によって分解しやすいこと。TMS化などの誘導体にする場合、そのアルカリ性のために、分解しやすいことなどの理由で、微量の4-HABSAを検出することは不可能であった。そこで、液体クロマトグラフィー(HPLC)による測定条件を検討した結果、窒素気流下で迅速に操作を行えば、微量の4-HABSAも検出可能であることが分かった。そこで、HPLC法を用いてラット肝、腎、皮膚ミクロゾーム、モルモット肝、皮膚ミクロゾームおよびマウス肝、皮膚ミクロゾームにおけるsulfanilamideから4-HABSAの生成を酵素化学的に検討した。

2-3-1 ラット肝および腎ミクロゾームによる N<sup>4</sup>-水酸化反応<sup>45</sup>

酵素源として用いるラット肝および腎のミクロゾームを実験の部(3) 記載のごとく調製した<sup>46</sup>。また、インキュベーション混液の組成および操作法については sulfanilamide の濃度、インキュベーション時間、ミクロゾームのタンパク量など種々検討し (Fig. 5) 実験の部(5) に示したように測定条件を決定した。抽出物は窒素気流下で濃縮し、直ちに TLC および HPLC を行なったところ、Fig. 6 および Fig. 7 に示される様に合成標品と一致するスポットが得られ、retention time も標品と一致した。

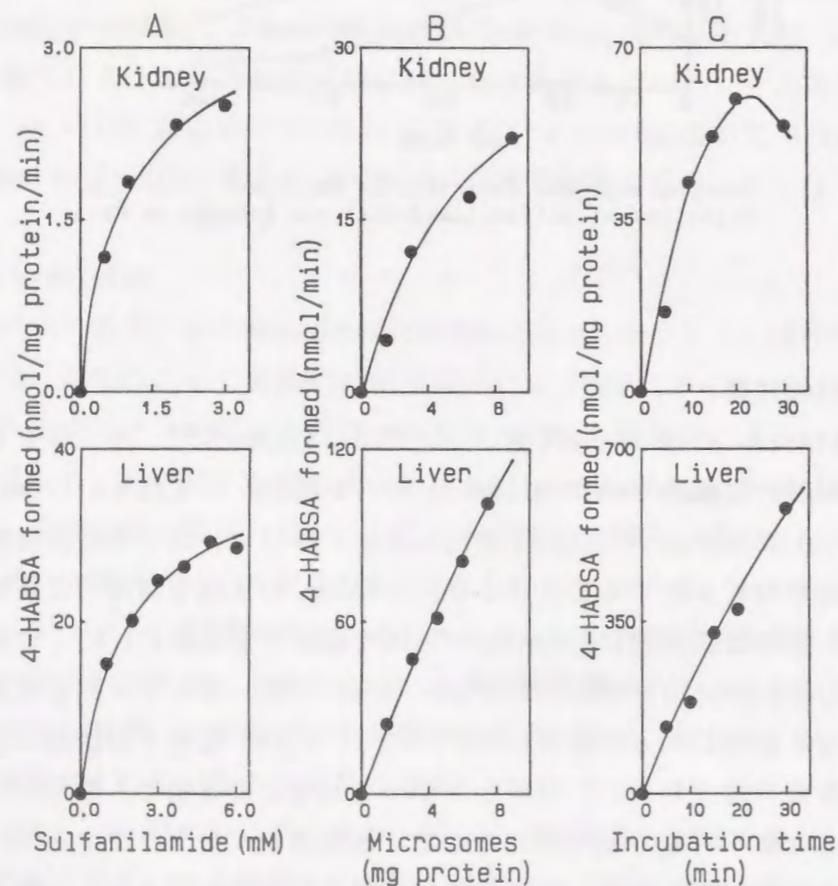


Fig. 5 Effects of the Concentration of Sulfanilamide and Liver or Kidney Microsomal Protein and Incubation Time on the Formation of 4-HABSA

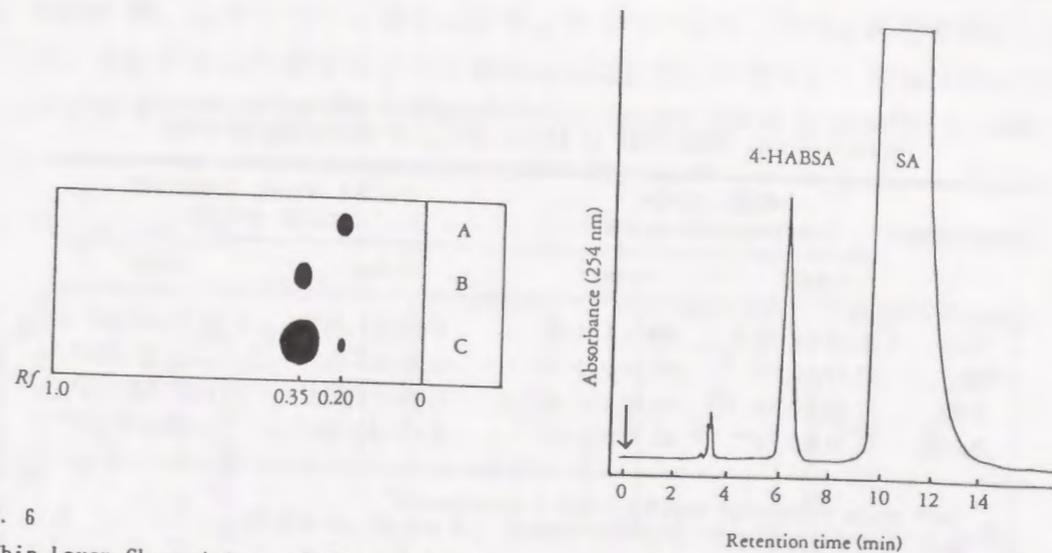


Fig. 6 Thin Layer Chromatogram of Extract from Incubation Mixture (Liver Microsomes)

A: synthetic 4-HABSA,  
B: sulfanilamide,  
C: extract from incubation mixture.

Fig. 7 High Performance Liquid Chromatogram of Extract from Incubation Mixture

Sulfanilamide N-水酸化反応の至適条件のもとで、ラット肝と腎ミクロゾームにおける sulfanilamide N-水酸化活性の  $K_m$  値と  $V_{max}$  値を Lineweaver-Burk plot より求めた。その結果、肝では  $K_m$  値が 1.54 mM,  $V_{max}$  値が 36.63 nmol/mg protein/min で、腎では  $K_m$  値が 0.83 mM,  $V_{max}$  値が 3.17 nmol/mg protein/min であった。腎と肝ミクロゾームで  $K_m$  値を比較すると、腎の方が肝ミクロゾームより sulfanilamide に対しより高い親和性を有していることが判明した。

また、数種の薬物代謝酵素誘導剤を実験の部(3) 記載の方法で前処理したラット肝ミクロゾームの cytochrome P-450 量を実験の部(4) に記載した大村らの方法<sup>47</sup> で、また 4-HABSA 生成量を前述の HPLC により求めた。その結果を Table 3 に示している。すなわち、肝においては control と比較して P-448 型の誘導剤である 3-methylcholanthrene (3-MC) および 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) によって、P-450 (448) が増加し、同時に 4-HABSA 生成量が顕著に増加した。一方、腎においては PenCB によってのみ P-450 (448) が増加し、4-HABSA の生成量も増加した。しかし、P-450 型の誘導剤である phenobarbital (PB) によっては、肝、腎いずれも 4-HABSA 生成量は増加しなかった。

Table 3 Effects of Various Inducers on Sulfanilamide N<sup>4</sup>-Hydroxylase Activity and Content of Cyt. P-450(448) in Kidney and Liver Microsomes of Rats

Pretreatment	4-HABSA formed (nmol/mg protein/min)		Content of cyt. P-450(448) (nmol/mg protein)	
	Kidney	Liver	Kidney	Liver
None	1.10±0.18	19.91± 4.43	0.090±0.017	0.711±0.061
PB	0.77±0.12*	20.75± 1.76	0.041±0.013*	1.140±0.293*
3-MC	0.82±0.50	42.96±10.96*	0.052±0.014*	1.479±0.178**
PenCB	3.91±0.15**	40.73± 5.59*	0.197±0.042*	1.699±0.111**

Each value represents mean±S.D. of 4 experiments.  
Significantly different from the control (\* p<0.05, \*\* p<0.001).

### 2-3-2 ラット肝ミクロゾームによる 3位-水酸化反応

3-OH-SA はウサギやヒトの尿中において検出され<sup>35</sup>、アルカリ側のpHでタンパク質と容易に反応する。得られた結合体はウサギにハプテン特異的抗体を生成させる事が報告されている<sup>47</sup>。そこでラット肝ミクロゾームによる sulfanilamide の 3 位水酸化活性を実験の部(6)に従って測定し、N-水酸化活性と比較した。生成した3-OH-SA と4-HABSA はHPLCで Fig. 8の様に分離溶出されるので、それぞれのピーク面積より検量線を作成し3-OH-SA と4-HABSA を夫々分離定量した。

Fig. 8 HPLC Elution Pattern of the 4-HABSA, 3-OH-SA and sulfanilamide

peaks: 1, 4-HABSA,  
2, 3-OH-SA,  
3, sulfanilamide

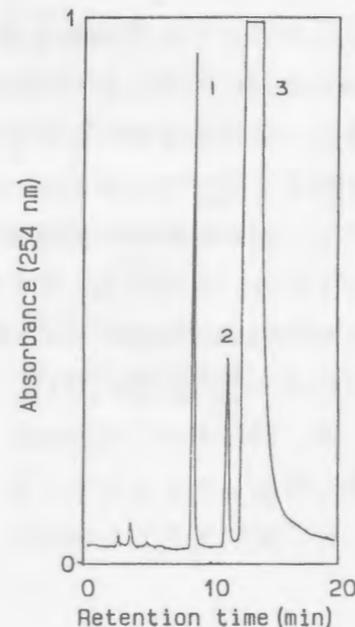


Fig. 9 に示したように、3-OH-SAと4-HABSA 生成に及ぼす sulfanilamide の濃度、NADPH 量、ミクロゾーム量およびインキュベーション時間の影響を検討したところ、それぞれの生成量はすべてのfactorに比例して増加し、至適pHはいずれも7.4であった。

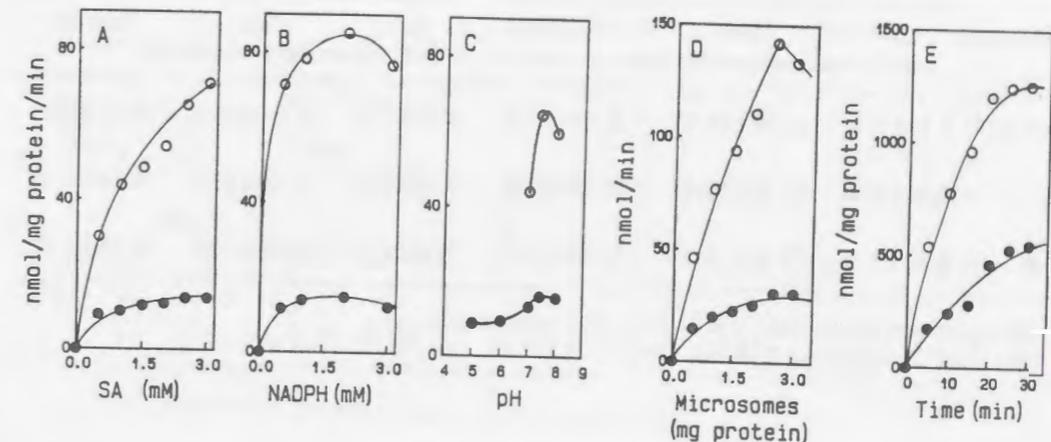


Fig. 9 Effects of the Concentration of Sulfanilamide(SA), NADPH and Liver Microsomal Protein and pH, Incubation Time on the Formation of the 4-HABSA and 3-OH-SA

Each point represents the mean of 2 experiments.  
○: 4-HABSA, ●: 3-OH-SA

また、実験の部(3)記載の方法で前処理したラット肝ミクロゾームを用いて sulfanilamide のN-水酸化活性と3位水酸化活性に及ぼす薬物代謝酵素誘導剤の影響を調べた。その結果を Table 4 に示した。N-hydroxyl 体である4-HABSA は3-MCで誘導され Vmax 値はcontrol の約 1.6倍を示したが、PBでは誘導されなかった。一方、ベンゼン環の hydroxyl 体である 3-OH-SAは 3-MC、PBのいずれによっても誘導され、それぞれ control の 1.6, 2.0 倍のVmax値を示した。このことは sulfanilamideの N-水酸化を触媒する酵素とベンゼン環の水酸化を触媒する酵素が異なることを示している。また、sulfanilamide の代謝により4-HABSA と3-OH-SA は同時に生成され、その生成比はおおよそ 5:1の割合であった。

Table 4 Effects of Inducers on 4-HABSA and 3-OH-SA Formation from Sulfanilamide in liver Microsomes of Rats

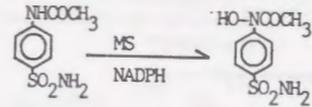
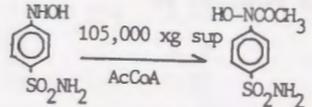
Pretreatment	4-HABSA formed			3-OH-SA formed		
	Km (mM)	Vmax (nmol/mg protein/min)	Vmax/Km	Km (mM)	Vmax (nmol/mg protein/min)	Vmax/Km
Control	2.10±0.31	45.79±10.98	21.64±2.68	0.90±0.17	7.44±1.12	8.33±0.29
PB	2.46±0.69	58.21±11.24	24.20±3.68	0.62±0.07	11.99±0.86**	19.52±3.70**
3-MC	2.28±0.24	73.66±8.89*	32.69±4.44*	0.80±0.10	14.71±1.38***	18.59±1.23***

Each value represents mean ±S.D. of 3 or 4 experiments. Significantly different from the control (\* P<0.02, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001).

### 2-3-3 N<sup>4</sup>-Acetylsulfanilamide のN-水酸化反応と 4-hydroxylamino-benzenesulfonamide(4-HABSA)のアセチル化

Acetylaminofluoreneは肝臓ガンを作る発ガン物質として知られているが<sup>49</sup>, その構造的関連性より4-HABSAのアセチル体である4-AHABSAについてもそのタンパク結合性が指摘されてきた。しかしながらその生体内生成については Williams<sup>36</sup>やFriesら<sup>26</sup>が検討してきたが、いまだ不明のままである。そこで、sulfanilamideの主代謝物であるN<sup>4</sup>-ASAからのN-水酸化反応と4-HABSAからのアセチル化反応について何れの反応によって4-AHABSAが生成するか酵素学的に検討した。肝ミクロゾームおよび105,000×g上清の調製法は実験の部(3)に記載した方法で行なった。インキュベーション混液の組成およびHPLCによる測定条件も実験の部(7)に記載した。その結果、Table 5に示したように、4-AHABSAのin vitro生成はVmax/Km値について比較すると、PenCB誘導の場合、N<sup>4</sup>-ASAからのN-水酸化反応の方が4-HABSAのアセチル化より肝、腎ともに数十倍と高いことから、生理的条件下では前者の反応経路で進行すると考えられる。

Table 5 Comparison of Two Metabolic Pathways for the Formation of 4-AHABSA

Metabolic pathway	Pretreatment	Km (mM)		Vmax (nmol/mg protein/min)		Vmax/Km	
		Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney
	Control	5.05	5.41	5.10	1.06	1.01	0.20
	PenCB	5.10	3.23	166.67	5.30	32.68	1.64
	Control	0.17	N.D.	0.02	N.D.	0.13	—
	PenCB	0.18	0.29	0.07	0.01	0.40	0.04

Each value represents mean of 2-4 experiments.

### 2-3-4 4-HABSA から 4-nitrosobenzenesulfonamide(4-NSBSA) への変換

実験の部(8)に記載した方法でNADPH存在下と非存在下における4-NSBSAと4-HABSAの変化をHPLCで追跡した。その結果、Fig.10に示したように4-HABSAはNADPH存在下では60分まで安定であり、非存在下では不安定でそれと同時に4-NSBSAが自動酸化で生成された。

一方、4-NSBSAはNADPH存在下では急速に4-HABSAに還元され、非存在下では安定であった。この様に4-HABSAから4-NSBSAへの酸化は非酵素的に生成することが判明した。

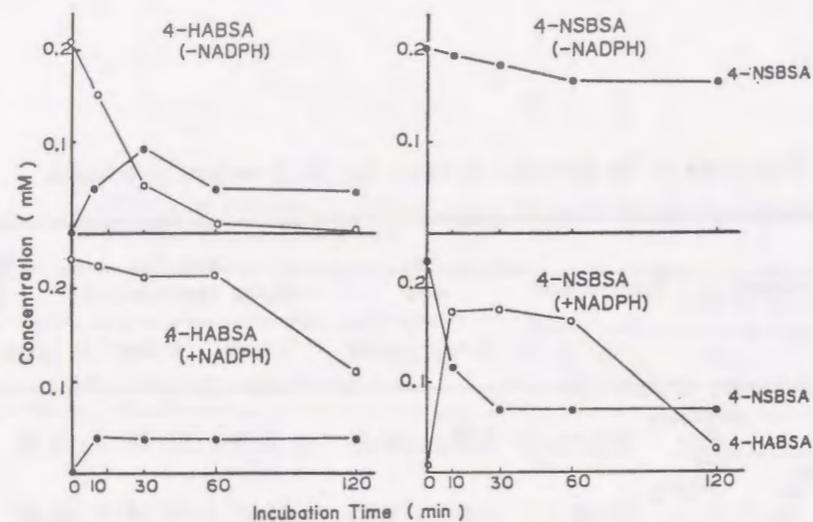


Fig. 10 HPLC Analysis of Non-Enzymatic Conversion Products of 4-HABSA or 4-NSBSA

### 2-3-5 Sulfanilamide の皮膚における代謝<sup>50</sup>

皮膚はアレルギー発現部位であるにもかかわらず、肝臓やその他の臓器と比較して皮膚における代謝研究はほとんど行なわれていない。そこで sulfanilamide の皮膚における代謝をモルモット、ラット、マウスで調べ、肝臓における代謝活性と比較検討した。まず、皮膚と肝臓における sulfanilamide の  $N^4$ -水酸化活性を実験の部 (5) 記載の方法で測定し、その結果を Table 6 に示した。皮膚ではモルモットのみ活性が認められ、 $V_{max}/K_m$  値は 27.29 であった。肝臓ではラットの  $V_{max}/K_m$  値が最も高く 12.91 で、モルモットの場合 2.23 であり、皮膚の方が高い値を示した。

Table 6 Species Differences in the  $N^4$ -Hydroxylase Activity of Sulfanilamide in Liver and Skin Microsomes

Species	Liver			Skin		
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol/mg protein/min)	$V_{max}/K_m$	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol/mg protein/min)	$V_{max}/K_m$
Guinea pig	2.30	5.12	2.23	0.06	1.58	27.29
Rat	1.40	18.12	12.91	N.D.	N.D.	—
Mouse	8.16	14.97	1.83	N.D.	N.D.	—

Each value represents mean of 2 experiments.  
N.D. : not detected

一方、皮膚と肝臓における sulfanilamide の  $N^4$ -アセチル化活性を調べ、その  $K_m$  値と  $V_{max}$  値を Table 7 に示した。  $V_{max}/K_m$  値について比較すると、皮膚ではモルモットが、肝臓ではラットが最も高い値を示し、それぞれ 0.23, 10.44 であった。以上の結果、皮膚は肝臓と同じく代謝活性化反応と解毒反応の両方を有していること、  $N^4$ -水酸化反応では皮膚の方が肝臓よりも  $V_{max}/K_m$  値が高いこと、また、いずれの反応も種差があることなどが判明した。

Table 7 Species Differences in the  $N^4$ -Acetylase Activity of Sulfanilamide in Liver and Skin 105,000×g Supernatant

Species	Liver			Skin		
	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol/mg protein/min)	$V_{max}/K_m$	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (nmol/mg protein/min)	$V_{max}/K_m$
Guinea pig	1.55	1.30	0.84	0.05	0.01	0.23
Rat	0.18	1.92	10.44	0.22	0.01	0.06
Mouse	11.00	2.21	0.20	0.29	0.01	0.05

Each value represents mean of 2 or 3 experiments.

### 3. Sulfanilamide 代謝物および関連化合物による皮膚反応<sup>51, 52</sup>

#### 3-1 概要

低分子の薬物が抗原化するためには生体内でタンパク質などの高分子と共有結合する必要がある。dinitrofluorobenzene や picrylchloride などの結合力の強いものは薬物そのままの形で容易にタンパクと結合して完全抗原となり全身感作をきたすが<sup>53, 54</sup>、このように反応性に富んだものは常用薬剤ではあり得ない。低分子薬剤の過敏症の大部分を占めるものは薬剤そのものではなく、その体内代謝物によるものと思われる。そこで、sulfanilamide の場合も 14 種の代謝物および関連化合物の抗原性の有無をモルモットにおける皮膚反応によって検討することを目的とした。

#### 3-2 皮膚反応の条件検討

従来、Schwarz-Speck<sup>22</sup> および村田ら<sup>55</sup> は光アレルギーの観点から sulfanilamide のアレルギーには紫外線が必要不可欠と考え、4-HABSA あるいは sulfanilamide と紫外線照射による感作を行なっているが、著者らは sulfanilamide の *in vivo* および *in vitro* 代謝で sulfanilamide から 4-HABSA の生成を

証明したので、紫外線照射は行わず、sulfanilamide ならびに 4-HABSA 単独で感作を行なった。すなわち、実験の部(9) 記載の方法に従い動物をA,B,C の3群に分け、A群は 1% sulfanilamide 生理食塩水溶液、B群は 1% 4-HABSA 生理食塩水溶液、C 群は生理食塩水のみで感作を行なった。3 週間の休止期の後、生理食塩水を対照として各代謝物の 1% 生理食塩水溶液で誘発を行なった。誘発試験の結果は、24時間後の皮膚反応を観察し発赤の直径で5 段階に分類判定した。

### 3-3 皮膚反応の結果

Table 8 に示すように、A 群 (sulfanilamide 感作群) B群 (4-HABSA 感作群) を比較すると、B 群の方がやや反応が強い傾向が見られた。

Table 8 Elicitation of Skin Reaction by Sulfanilamide(SA) and Related Compounds in the Guinea Pigs Sensitized to SA or 4-HABSA in the Absence of Ultraviolet irradiation

Compounds used for skin test	Group A (SA)					Group B (4-HABSA)				
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Saline control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±
4-HABSA	±	+	+	+	+	++	++	++	++	+
N <sup>1</sup> -ASA	-	-	-	±	-	±	-	-	-	-
N <sup>4</sup> -ASA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N <sup>1</sup> ,N <sup>4</sup> -DASA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-COCH <sub>2</sub> OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA-COOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-OH-SA	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
3-OH-SA	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
4-AHABSA	±	±	-	±	±	-	±	±	±	±
4-DAHABSA	-	±	±	-	±	±	+	±	±	-
4-NSBSA	++	++	+	+	++	++	++	+	++	+
4,4'-AZBDSA	++	+	±	+	+	+	±	+	+	+
4,4'-AZOBDSA	++	++	++	++	+	+	++	++	++	+
4,4'-HAZBDSA			-	±	+			+	-	+

誘発物質のうち、sulfanilamide, 4-HABSA, 3-OH-SA, 4-NSBSA, 4,4'-azoxybenzenedisulfonamide(4,4'-AZOBDSA), および 4,4'-azobenzenedisulfonamide(4,4'-AZBDSA) は80 %以上の陽性を示した。これに対し 4-AHABSA, 4-N-di-acetylhydroxylaminobenzenesulfonamide(4-DAHABSA)の2 種のacetyl体は60- 80 % の擬陽性を示し、その他の代謝物はすべて陰性であった。C 群においては4-NSBSA で20 %擬陽性が認められた他はすべて陰性であった。

### 3-4 Dose response curve

次に高率に陽性を示した 4-HABSA, 4-NSBSA, 4,4'-AZOBDSA について Dose responseを調べた結果、Fig. 11 に示すように濃度 (%)と発赤の大きさ (mm) との間に直線関係が認められた。このことより、皮膚反応がこれら薬物に由来することが判明した。

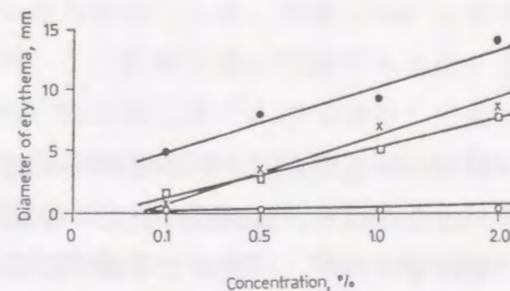


Fig. 11

Dose Response Curve of Sulfanilamide, 4-HABSA, 4-NSBSA and 4,4'-AZOBDSA.

Each point represents mean of 3 or 4 experiments.  
 ○, sulfanilamide; □, 4-HABSA; ●, 4-NSBSA; ×, 4,4'-AZOBDSA.



Fig. 12 Elicitation of Skin Reactions by Sulfanilamide(SA), 4-HABSA and 4-NSBSA in Guinea Pigs Sensitized With SA

4,4'-AZOBDSAはこれまでsulfanilamide の代謝物として検出されてはいないが、4-HABSA 感作モルモットで4-NSBSA および4,4'-AZOBDSAにより陽性反応を示したことは皮膚における還元的開裂が考えられ、この過程でのタンパク結合および抗原化も示唆された。一方、4-HABSA と4-NSBSA を比較すると、4-NSBSA の方がより強い皮膚反応を示した (Fig. 12)。

### 4. 4-Hydroxylaminobenzenesulfonamide (4-HABSA) の血中抗体産生能<sup>56</sup>

#### 4-1 概要

一般に低分子量の化学物質は単独で、ヒトにおいて薬物アレルギー反応を生ずる。動物実験においては薬剤単独感作の例として、penicillin<sup>57</sup>, tetracyclin<sup>58</sup>, chloramphenicol<sup>59</sup>などが知られているのみである。そこで、感作の方法としてタンパク質のような高分子化合物と共有結合させたもので抗体を

産生させる方法が行なわれている。すなわち人工抗原を作る方法としてジアゾ化や酸クロリド化などの化学的処理を行ない、タンパク質と結合させる方法が用いられている<sup>60</sup>。しかし、ジアゾ化や酸クロリド化は生体内では起こり得ない。そこで、sulfanilamide についてもアゾ化合物による感作を行わず、代謝物による単独感作を試みた。すなわちモルモット皮膚反応の結果からもハプテンとして最も可能性の高い4-HABSA について、4-HABSA 単独および生理的条件下で結合させた 4-HABSA-タンパク結合体を用いてウサギ血中抗体の産生の有無を検討することを目的とした。

#### 4-2 4-HABSA 単独感作

実験の部(10)記載の方法に従い、10%4-HABSA生理食塩液と等量の Freund's complete adjuvant で週一回、計13回ウサギに免疫した。毎週感作前に耳静脈より採血し、Ring test<sup>61</sup>、Ouchterlony法<sup>61</sup>を行なったが、12週までの感作によっても血中抗体は検出されなかった。さらに高感度の感作赤血球凝集反応 (passive hemagglutination ; PHA)<sup>62, 63</sup> により抗体の力価を測定した結果、Table 9 に示すように、4-HABSA 単独感作の場合は、8-10倍希釈まで陽性を示した。用いた3種の抗原すなわち4-HABSA-BSA 結合体、4-HABSA-RS結合体、4-HABSA 単独により反応に若干の差はあるが、ほぼ同様の結果が得られた。4-HABSA直接感作血球で反応が陽性に出たことは、被検血清中に4-HABSA に対する抗体が存在していることを示唆した。

Table 9 Passive Hemagglutination Patterns of the Serum Sensitized with 4-HABSA

Rabbit antiserum	Tanned SRBC sensitized with	Serum dilution							
		2	4	6	8	10	20	40	80
No. 1	4-HABSA-BSA	++	++	++	++	++	-	-	-
	4-HABSA-RS	++	++	++	++	++	-	-	-
	4-HABSA	++	++	+	+	±	-	-	-
	none	-	-	-	-	-	-	-	-
No. 2	4-HABSA-BSA	++	++	++	++	-	-	-	-
	4-HABSA-RS	++	++	++	++	-	-	-	-
	4-HABSA	++	+	+	+	-	-	-	-
	none	-	-	-	-	-	-	-	-

The readings were graded as follows:

- ++, a reaction with less folding or tightly agglutination;
- +, a reaction with a diffuse granular appearance;
- ±, a reaction with a slightly diffuse granular appearance;
- , a negative reaction with the appearance of a doughnut or ring.

#### 4-3 4-HABSA-BSA 結合体感作

実験の部(10)記載の方法で調製した4-HABSA-BSA 結合体(10 mg/ml)と同量の Freund's complete adjuvant で週一回、計4回免疫した。一週目より Ring test で陽性を示し、4週目で32倍希釈まで陽性を示した。しかし、Ouchterlony 法では、4-HABSA-BSA 結合体に対する沈降線は認められなかった。さらに高感度の PHA 反応を行なった。その結果を Table 10 にまとめた。抗原として4-HABSA-BSA 結合体を用いたところ、かなり高力価を示したが、担体である BSA に対しても高力価を示した。担体を BGG に変えたものでは、力価は低いながらも明らかに陽性を示した。被検血清に担体である BSA を添加し抗 BSA 抗体を除いた場合、すなわち BSA 吸収抗血清では60-240倍と力価は低いながらも陽性を示した。なお、この場合 BSA 吸収抗血清に BSA を抗原として感作した血球で反応させると陰性であるから、BSA に対する抗体はすべて除去されていることを示し、BSA 吸収抗血清の PHA 反応の結果は、ハプテンである4-HABSA に対する抗体のみであると判定した。

Table 10 Passive Hemagglutination Tests with Rabbit Antiserum to 4-HABSA-BSA Conjugate

Antigens	Antisera			
	Rabbit No. 3		Rabbit No. 4	
	Before absorption with BSA	After absorption with BSA	Before absorption with BSA	After absorption with BSA
BSA	4000	<15	16000	<15
4-HABSA-BSA	16000	60	32000	240
4-HABSA-BGG	40	15	160	60

以上、4-HABSA-BSA 結合体で感作すると抗体は、4-HABSA 単独で感作したよりも PHA 反応において高い力価を示した。弱いながらも 4-HABSA 単独で血中抗体が産生することが証明されたことは、前述のモルモット皮膚反応で 4-HABSA で陽性に出た結果からと同様に、sulfanilamide 代謝過程で生成すると思われる4-HABSA がアレルギー発現機序に関与していることを示唆している。本実験では、sulfanilamide 代謝物の中で、4-HABSA のみを検討したが、他の代謝物、あるいは関連化合物の中で、特に皮膚反応において100%陽性を示した3-OH-SA、4-NSBSA および 4,4'-AZOBDSA の血中抗体産生についても検討の余地が残っている。

## 5. Sulfanilamide および代謝物のタンパク結合性

### 5-1 概要

Sulfanilamide のN-水酸化体である4-HABSA はモルモット皮膚反応陽性で血中抗体産生能も認められたので、4-HABSA のタンパク結合性について検討を行った。しかし、この項で述べるように非酵素的にはBSA と結合しなかった。そこで活性化にはさらに硫酸抱合、グルクロン酸抱合が必要なのか、あるいはまた nitroso体 (4-NSBSA) への酸化が必要なのか否かについて検討を加えた。さらに *in vivo* におけるタンパク結合性の指標として生体成分であるグルタチオン (GSH) との結合性を4-HABSA, 4-NSBSA で比較検討した。一方、3-OH-SA はキノンイミンを経由してタンパク質と結合すると指摘されてきたが、その結合体についての報告はないので、3-OH-SA と GSH との反応を検討し、その結合体の構造を追求した。

### 5-2 4-HABSA のタンパク結合性

10 $\mu$ M 4-HABSAと 0.1 $\mu$ M BSAをリン酸 buffer (pH 4.0, 7.0, 10.0) 中で 37 $^{\circ}$ C 24時間振盪下インキュベートした。凍結乾燥後実験 (12) と同じ方法でアミノ酸分析を行なった。常法<sup>64</sup>に従い合成したdinitrophenyl (DNP)-BSA結合体を同様の方法で加水分解しアミノ酸分析したものを対照とした。その結果をTable 11に示した。対照として用いたDNP-BSA はtyrosine (TYR), lysine (LYS), histidine (HYS) の減少が認められたが、4-HABSA はcontrol BSA と比較していずれのアミノ酸の減少も認められなかった (ただし、pH 10 の場合TYR が少し減少した)。

そこで、4-HABSA がBSA と結合するためには硫酸抱合あるいはグルクロン酸抱合などの活性化が必要か否かを検討した。実験の部 (11) に記載した方法で4-HABSA のグルクロン酸抱合活性を調べたが4-HABSA はグルクロン酸抱合を受けなかった。そこで次に実験の部 (12) 記載の方法に従い硫酸抱合活性の測定とBSA 結合実験を行なった。その結果Table 12に示したように、N-hydroxy-2-acetylaminofluorene (N-OH-2AAF) および N-hydroxy-phenacetin (N-OH-PH) を硫酸受容体として用いた場合にはp-nitrophenol が遊離し硫酸抱合活性が認められた。

一方、4-AHABSAでは N-OH-2AAFの約 1/3.5の弱い活性が認められたが、4-HABSA では全く活性は認められなかった。またBSA との結合実験では、N-OH-2AAF, N-OH-PH においては tyrosine (TYR) と lysine (LYS) が減少したが、4-HABSA, 4-AHABSAではこれらのアミノ酸の減少は認められなかった。従って、既に報告さ

れているように、N-OH-2AAFおよびN-OH-PH の活性化には硫酸抱合酵素の関与が示されたが<sup>65</sup>、4-HABSA の活性化には硫酸抱合は関与しないことが示された。

Table 11 Binding of 4-HABSA to BSA

Amino acids	Control	BSA + 4-HABSA			DNP-BSA
		pH 4.0	pH 7.4	pH 10.0	
ASP	45	44	44	44	43
THR	26	25	24	27	27
SER	22	21	17	21	23
GLU	63	62	67	64	61
GLY	15	15	15	15	15
ALA	38	38	39	39	38
VAL	29	28	31	30	25
MET	6	4	8	4	8
ILE	11	10	13	10	11
LEU	50	45	52	47	46
TYR	16	16	15	10	10
PHE	21	19	24	20	19
LYS	49	47	46	48	33
HIS	14	13	14	13	5
ARG	19	20	21	19	18

Each value represents molar ratio value to 15 moles of glycine in BSA.

Table 12 Relationship between Sulfotransferase Activity and Covalent Binding of N-hydroxy Compounds to BSA

Substrate	p-Nitrophenol released	Amino acids (mol/BSA) *	
	(nmol/mg protein/min)	TYR	LYS
None	—	16	61
N-OH-2AAF	0.500	13	60
N-OH-PH	0.457	10	60
4-AHABSA	0.143	16	61
4-HABSA	—	16	61

Each value represents mean of 2 experiments.  
\* Amino acid is calculated as molar ratio value to 53 moles of aspartic acid in BSA. — ; not detected

### 5-3 4-Nitrosobenzenesulfonamide (4-NABSA) のBSA との結合

実験の部 (13) に記載したように4-HABSA, 4-NSBSA を一定量のBSA とともにインキュベーションした後、そのBSA のアミノ酸分析を行なった。その結果を Table 13に示した。また、アミノ酸分析の一例を実験の部 (10) に示した。ASPを 53.0 mol/BSAとして算出するとcontrol (基質を含まない), 4-HABSA, 4-NSBSA を加えた系ではLYS はそれぞれ  $60.2 \pm 1.3$ ,  $59.6 \pm 3.4$ ,  $54.6 \pm 0.6$  mol/BSA であった。以上の結果、4-HABSA は非酵素的にはBSA と結合しないが、4-NSBSA はBSA の1 mol あたり約 5 molの LYSと結合していることが判明した。

Table 13 Binding of 4-HABSA and 4-NSBSA to BSA

Substrate	Amino acids ( mol/BSA )	
	ASP	LYS
None	53.0	$60.2 \pm 1.3$
4-HABSA	53.0	$59.6 \pm 3.4$
4-NSBSA	53.0	$54.6 \pm 0.6$ *

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 5 experiments.  
Significantly different from the control ( \*  $p < 0.001$  ).

### 5-4 Sulfanilamide, 4-HABSAおよび4-NSBSA 投与による肝および腎の

#### GSH量の低下

実験の部 (14) に記載したようにEllman法<sup>66</sup>を用い control (saline), sulfanilamide, 4-HABSA, 4-NSBSA 投与群のそれぞれの肝臓と腎臓中のGSH 量を測定しTable 14に示した。4-HABSA, 4-NSBSA 投与群ではcontrol 群と比較し、肝臓、腎臓中のGSH 量の減少が認められ、特に4-NSBSA でその減少は顕著であった。この結果から、4-HABSA, 4-NSBSAにGSH との結合性があり、両者の比較では4-NSBSA の方が強いことが示された。4-HABSA は肝臓、腎臓、皮膚マイクロゾームにおいてsulfanilamide から生成することを既に明らかにしておりin vivo においても血液中から検出されている。4-NSBSA は代謝物として未だ検出されてい

い。しかし、4-HABSA から4-NSBSA への酸化はFig. 10 に示すように in vitro では非酵素的に生成するので生体内でも4-HABSA から4-NSBSA への酸化が起りGSH と同様に生体高分子に結合しハプテンとなるものと考えられる。

Table 14 GSH Content in Liver and Kidney of Rats after i.p. Injection of Sulfanilamide, 4-HABSA and 4-NSBSA

Pretreatment	GSH content ( $\mu$ mol/g wet weight )	
	Liver	Kidney
None	$8.69 \pm 0.38$	$5.47 \pm 0.57$
Sulfanilamide	$7.76 \pm 0.98$	$5.25 \pm 0.28$
4-HABSA	$7.20 \pm 0.92$	$5.01 \pm 0.05$
4-NSBSA	$6.17 \pm 0.50$ **	$4.27 \pm 0.28$ *

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 4 rats.  
Significantly different from the control ( \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  ).

### 5-5 3-Hydroxysulfanilamide (3-OH·SA) と glutathione (GSH) との結合

#### 5-5-1 概要

3-OH·SA はsulfanilamide を投与したウサギおよびヒトの尿中に検出された。3-OH·SA はアルカリ側のpHでタンパクと容易に結合し、得られた結合体はハプテン特異的抗体を生成させることができると報告されている。しかしながら、3-OH·SA のタンパク質との結合部位はキノンイミンを経由し、水酸基のオルト位であろうと推定されるが実証されてはいない。そこで、タンパク質の構成成分であるアミノ酸のモデル化合物としてGSH を用い、結合体の酵素的合成を行ないその結合様式を検討した。また、horseradish peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> およびラット肝マイクロゾーム/butylhydroperoxide による3-OH·SA-GSH 結合体の生成反応を酵素化学的に検討した。

#### 5-5-2 3-OH·SA-GSH 結合体の構造決定

実験の部 (15) 記載の方法と同様の方法で大量に酵素反応を行ない反応液を凍結乾燥後、分取カラムと分析カラムを使ってHPLCで結合体の単離精製を行なった。そのHPLCの溶出パターンをFig. 13に示したが、新たに検出された 9分のピー

クが結合体と考えられた。UV吸収スペクトルを測定した結果 (Fig. 14)、3-OH-SA-GSH 結合体は320 nmに極大吸収スペクトルを示した。これは3-OH-SA の 290 nm の吸収スペクトルがGSH との結合により長波長シフトしたものと考えられる。次に、FAB-massスペクトルの結果をFig. 15に示した。[M+H]<sup>+</sup>が494, [M+Na]<sup>+</sup>が516 に検出されたことより、分子量は3-OH-SA (MW=188)とGSH (MW=307)が1:1 で結合した分子量を支持した。さらに、3-OH-SA とGSH の結合部位を明らかにするため <sup>1</sup>H-NMRを測定した (Fig. 16)。標品のGSH および酸化型GSH (GSSG) の<sup>1</sup>H-NMR測定結果より 2.00-4.68 ppmのピークはGSH に由来するプロトンであると考えられる。一方、6.90-7.52 ppm に3-OH-SA に由来するプロトンピークが検出された。3-OH-SA とGSH の結合部位は、結合定数J<sub>HZ</sub> の実測値より2個のプロトンはともに8 ppm であり、互いにオルトカップリングしている事が判明した。従って、3-OH-SA は水酸基の隣、すなわち -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>基の隣のカーボンとGSH のSH基を介して結合している事が明らかとなった。

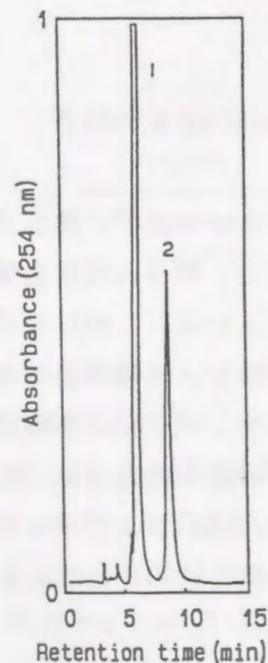


Fig. 13

HPLC Elution Pattern of the 3-OH-SA and 3-OH-SA-GSH Conjugate

peaks: 1, 3-OH-SA;  
2, 3-OH-SA-GSH

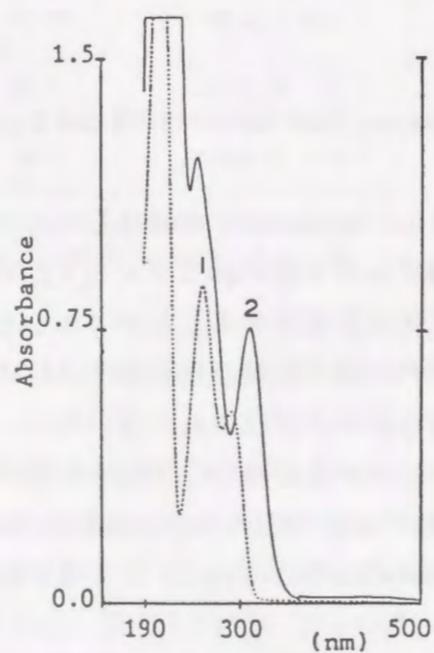


Fig. 14

U.V. Spectra of the 3-OH-SA and 3-OH-SA-GSH Conjugate

1, 3-OH-SA ; 2, 3-OH-SA-GSH

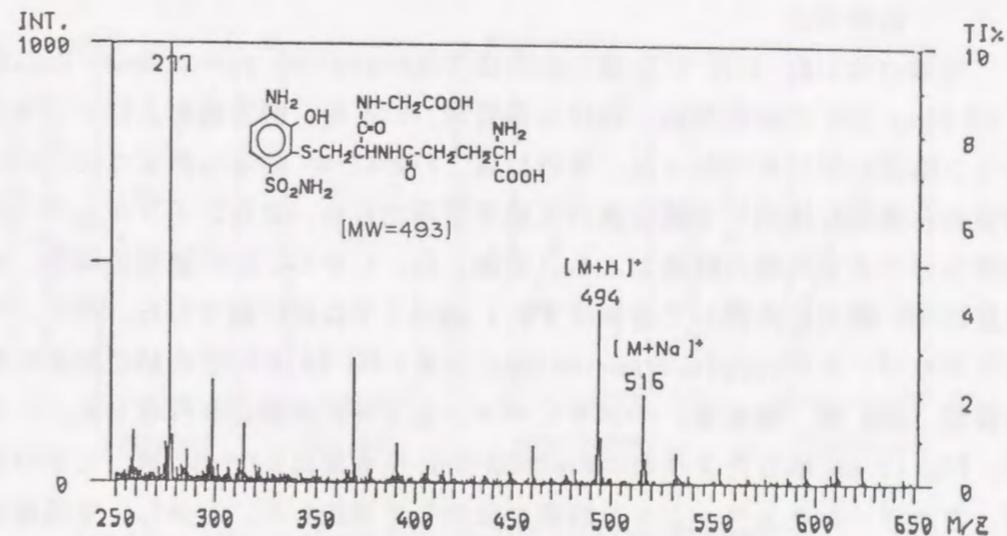


Fig. 15 FAB-mass Spectrum of the Reaction Product Isolated in Peak 2 of the HPLC

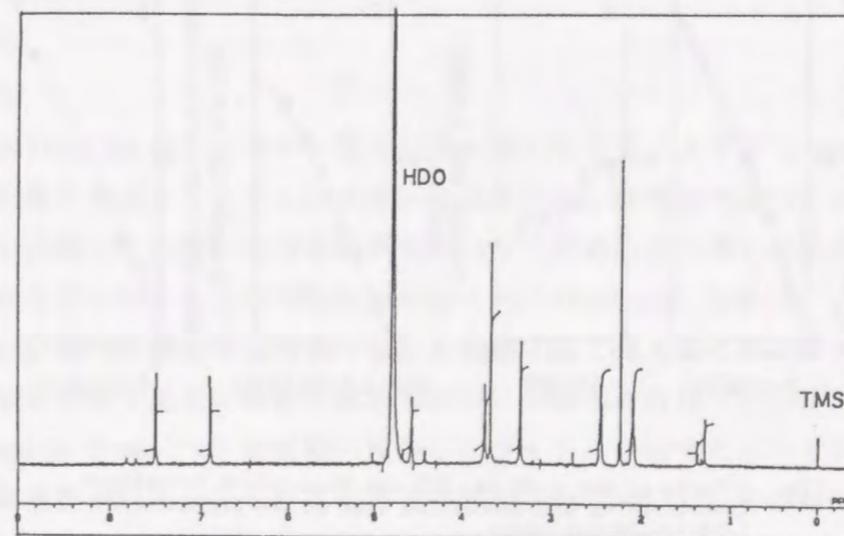


Fig. 16 <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of the Reaction Product Isolated in Peak 2 of the HPLC

5-5-3 Horseradish peroxidaseおよびミクロゾームによる 3-OH-SAとGSH との結合反応

実験の部(16),(17)に記載した方法でhorseradish peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による3-OH-SAとGSHの結合反応における基質量, GSH量, 酵素量およびインキュベーション時間の検討を行なった。その結果、Fig. 17-aに示したように、3-OH-SA, 酵素の各濃度に比例して結合体の生成量は増加した。また、インキュベーション時間も15分まで時間の経過とともに増加した。しかし、GSH濃度の場合、その生成量はGSH濃度に比例して増加せず0.1 mM以上では逆に減少した。次に、ラット肝ミクロゾーム/butylhydroperoxideによる3-OH-SAとGSHの結合反応における基質量, GSH量, 酵素量, インキュベーション時間の検討を行なった。その結果、Fig. 17-bに示したように、3-OH-SA-GSH生成量は3-OH-SA量, ミクロゾーム量, およびインキュベーション時間に比例して増加した。しかし、生成量はGSH濃度に比例して増加せず0.1 mM以上では一定であった。

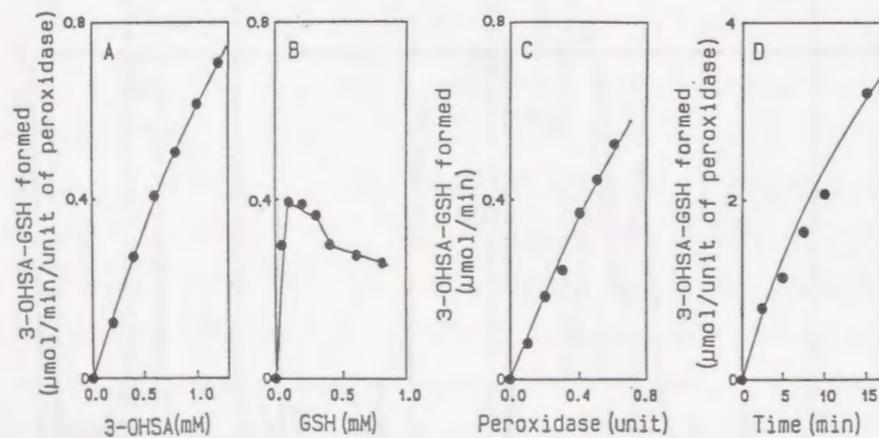


Fig. 17a Effects of the 3-OH-SA, GSH and Horseradish Peroxidase Concentration and Incubation Time on the Formation of 3-OH-SA-GSH Conjugate

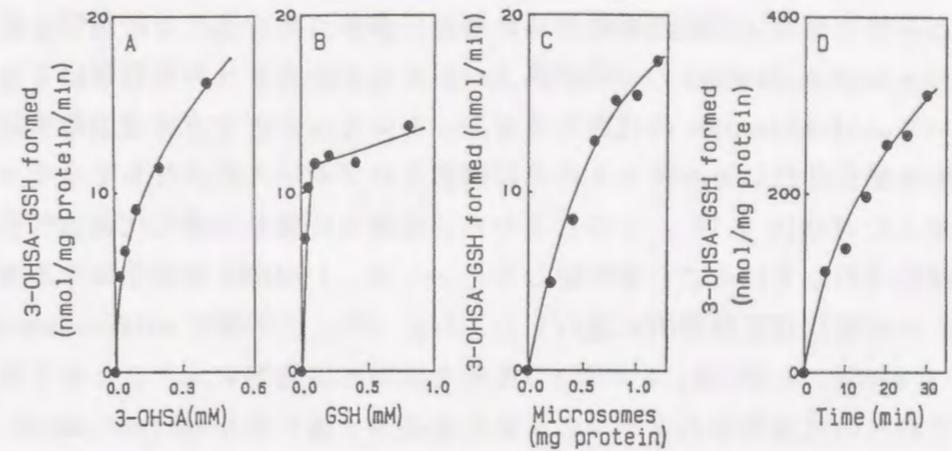


Fig. 17b Effects of the 3-OH-SA, GSH and Liver Microsomal Protein Concentration and Incubation Time on the Formation of 3-OH-SA-GSH Conjugate

以上の結果、3-OH-SAはin vitroにおいて酵素反応によってGSHと結合することが明らかになった。

6. 考察

Sulfanilamideのアレルギー発現機序を調べるためにまず<sup>35</sup>S-sulfanilamideの生体内分布をラット、~~ウサギ~~、~~モルモット~~、~~マウス~~で調べたところ、他の臓器と比較して皮膚への分布が顕著であり、薬疹の発現部位が主として皮膚である事からアレルギーとの関連性が示唆された(Table 1, Fig. 3)。

Sulfanilamideの活性代謝物であると指摘されているにもかかわらずその生体内生成が不明確であるN-水酸化体(4-HABSA)の検出を行なった。その結果、sulfanilamide 2 mmol/kgを腹腔内投与したラットの血液中において30分から60分に最高濃度13%のメトヘモグロビンが検出され(Fig. 4)、その4-HABSAの生成量は1.125 nmol/ml血液であった。次に、薬物代謝酵素誘導剤前処理したラットの肝および腎ミクロゾームを用い、sulfanilamideのin vitro代謝を検討した。その結果、N-水酸化反応(4-HABSAの生成)は、肝では3-MCとPenCBで、腎ではPenCBのみによって強く誘導された(Table 3)。一方、水酸化反応

(3-OH·SAの生成)は肝ミクロゾームにおいてPBと3-MCの両方によって誘導された (Table 4)。従って、誘導後のN-水酸化反応は3-MC誘導性P-450 に依存し、3位水酸化反応は3-MCおよびPB誘導性の両P-450 に依存していることが判明した。また  $^{35}\text{S}$ -sulfanilamide の分布が高く、しかもアレルギーの発現部位である皮膚においてsulfanilamide の代謝をラット、モルモット、マウスで比較検討した結果、N-水酸化活性はモルモットのみを検出されアセチル化活性もモルモットで一番高かった (Table 6,7)。このことから、皮膚は肝臓と同様に代謝活性化反応と解毒反応を有していることが判明した。一方、4-HABSA の酸化体である4-NSBSA への酸化は非酵素的に進行した (Fig. 10)。この様にsulfanilamide の代謝で 4-HABSA, 3-OH·SA, 4-NSBSAの生成を初めて定量的に示すことができた。次に、これらの代謝物のハプテンの可能性を追求するためにsulfanilamide あるいは4-HABSA で感作したモルモット皮膚におけるsulfanilamide の代謝物および関連化合物による皮膚反応の誘発試験を行なった。その結果、sulfanilamide, 3-OH·SA, 4-HABSA, 4-NSBSA, アゾキシ体 (4,4'-AZOBDSA), アゾ体 (4,4'-AZBDSA) で強陽性を示し、アセチル体である4-AHABSA, 4-DAHABSA で擬陽性を示した。とくに、dose response curve では4-NSBSA がもっとも強い反応を示した (Table 8, Fig. 11, 12)。さらに、高感度の感作赤血球凝集反応を用いて4-HABSA 単独あるいは4-HABSA-BSA 結合体感作で得られたウサギの血清中に4-HABSA に対する抗体を検出した (Table 9, 10)。そこで、4-HABSAのタンパク結合性をBSA を用いて検討した。非酵素的には明らかな結合性は認められなかった (Table 11)、グルクロン酸抱合や硫酸抱合による活性化系を検討したが、結合性は認められなかった (Table 12)。しかし酸化体である4-NSBSA の場合 LYSとの結合が示唆された (Table 13)。従って、4-HABSA と4-NSBSA は生体内で相互変換するので4-HABSA は 4-NSBSAの型でタンパクと結合すると考えられる。

一方、3-OH·SA のハプテン体の可能性を明らかにするために、アミノ酸のモデルとしてGSH を、一電子反応を触媒する酸化酵素のモデルとしてhorseradish peroxidaseを用いて3-OH·SA とGSH の結合体を酵素的に合成した。UV, TLC, HPLC, FAB-massおよび $^1\text{H}$ -NMR測定の結果、その結合体は1分子のGSH が3-OH·SA の水酸基のオルト位に結合していることが判明した (Fig. 15, 16)。さらに生体内で peroxidase 作用を有するミクロゾーム (P-450) を用い、3-OH·SA とGSHの結合反応を検討した結果、in vitroでも進行することが判明した (Fig. 17b)。

以上、1) sulfanilamideのin vivo 代謝, 2) in vitro代謝, 3) sulfanilamide

代謝物によるモルモット皮膚反応, 4) 4-HABSAによるウサギ血中抗体産生能, 5) 4-HABSAと 4-NSBSAのタンパク結合性および 6) 3-OH·SAと GSHの in vitro 生成反応などについて総合的に検討した結果、sulfanilamide アレルギーにおいてハプテン体と考えられる代謝物は4-HABSA, 4-NSBSA, 3-OH·SA などであり、複数のハプテン体が存在するものと考えられる。

1. phenacetinの代謝

1-1 概要

解熱鎮痛剤であるphenacetinは欧米では古くから使用されてきたが、腎乳頭部壊死や間質性腎炎を起こすため、その慢性毒性が問題化されてきた<sup>26-28</sup>。phenacetinの代謝については、既に多くの報告がある<sup>68, 69</sup>。Fig. 2に示すように主代謝物は脱エチル体であるacetaminophenで、これがグルクロン酸抱合あるいは硫酸抱合を受け尿中に排泄される。そのほかに微量代謝物としてN-hydroxyphenacetinあるいはp-phenetidineなどが報告されているが、phenacetinの副作用の一つであるメトヘモグロビン血症はこのp-phenetidineのN-hydroxyl体であるといわれている<sup>70</sup>。現在、phenacetinのactive metaboliteはN-hydroxyphenacetin, phenacetin-3,4-epoxide, N-acetyl-p-benzoquinoneimineであるという報告もある<sup>71, 72</sup>。また、p-aminophenolについては以前から腎毒性物質として知られているが、phenacetinあるいはacetaminophenの代謝物であるか否かについては確定的ではない<sup>73-75</sup>。そこで、phenacetinのin vitro代謝についてHPLCを用いて酵素化学的に検討を行ない、さらにそれらの代謝物について腎毒作用の有無を検討した。

1-2 PhenacetinのN-水酸化反応

PhenacetinのN-水酸化活性と腎障害との相関性を調べるために、まずN-hydroxyphenacetinをCalderら<sup>69</sup>の方法で合成し、各種の薬物代謝酵素誘導剤前処理ラット肝、腎ミクロゾームにおけるN-hydroxyl体の生成量とP-450量とを比較検討した。薬物代謝酵素誘導剤前処理ラット肝、腎ミクロゾームの調製およびP-450量の測定は、sulfanilamideの場合と同様に行なった。HPLC法によるphenacetin N-水酸化活性の測定は実験の部(18)に記載した方法で行なった。その結果を示したのがTable 15である。肝臓のN-水酸化活性はcontrolと比較すると3-MCで10倍、PenCBで約18倍と増加し腎臓でも3-MCで約2.5倍、PenCBで9倍の活性の増加を示した。これと平行してcyt. P-450(448)量も約1.5倍から3倍と増加した。これに反し、PBでは肝のP-450量は増加するが、活性の方はcontrolと同程度で全く誘導されていなかった。この事からphenacetinのN-水酸化は肝臓、腎臓ともにP-448依存性の反応であることが判明した。

Table 15 Effects of Various Inducers on Phenacetin N-Hydroxylase Activity and Content of Cyt. P-450(448) in Kidney and Liver Microsomes of Rats

Pretreatment	N-OH-Phenacetin formed (nmol/mg protein/min)		Content of cyt. P-450(448) (nmol/mg protein)	
	Kidney	Liver	Kidney	Liver
None	0.025±0.004	0.054±0.008	0.06±0.01	0.72 ±0.13
PB	0.021±0.004	0.055±0.005	0.05±0.01	1.75 ±0.23 **
3-MC	0.061±0.004 **	0.520±0.010 **	0.09±0.01 *	2.01 ±0.26 **
PenCB	0.220±0.012 **	0.947±0.137 **	0.15±0.03 *	1.87 ±0.13 **

Each value represents mean±S.D. of 3 or 5 experiments. Significantly different from the control (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

1-3 p-Aminophenolのin vitro生成

p-Aminophenolの強い腎毒性が、phenacetinの腎障害と関連あるか否かを調べるために、phenacetinからp-aminophenolの生成を9000×g上清あるいはミクロゾームを用いたin vitro実験で検討した。しかし、その生成量が微量のためか、不安定性のためか、あるいはタンパク質との結合のためか、この実験条件では検出し得なかった。そこでPenCB前処理したラット肝臓ミクロゾームあるいは9000×g上清によりphenacetinからacetaminophenを経由する反応(I)→(IV)とphenacetinからp-phenetidineを経由する反応(II)→(III)の2つの反応について酵素化学的に検討を加えた。実験の部(19)に記載した各反応のインキュベーション混液の組成およびHPLC測定条件を用い、それぞれの生成量を測定した。ラット肝ミクロゾームあるいは9000×g上清によるphenacetinの各代謝経路のKm値とVmax値をTable 16にまとめて示した。第一段階の反応であるphenacetinの脱エチル化(I)とphenacetinの脱アセチル化(II)を比較した場合、(I)のVmax/Km値は(II)のVmax/Km値の11倍であることから、(I)の反応が一番進行しやすいことが分かった。このことは他の文献<sup>69</sup>とも一致した。次に第二段階の反応であるphenetidineの脱エチル化(III)とacetaminophenの脱アセチル化(IV)を比較した場合、(III)のVmax/Km値は(IV)の224倍と大きいことから(III)の反応が進行しやすい事が示された。しかし、p-aminophenolの生成は、第一段階の反応に規制されるので、(I)→(IV)の反応で進行すると考えられる。

Table 16 Comparison of Km and Vmax on the Metabolic Pathways of Phenacetin in Rat Liver Microsomes or 9000 Xg Supernatant

Metabolic pathway	Km (mM)	Vmax (nmol/mg protein/min)	Vmax/Km
I Phenacetin → Acetaminophen <sup>a)</sup>	0.182	74.07	407
II Phenacetin → p-Phenetidine <sup>a)</sup>	0.357	13.33	37
III p-Phenetidine → p-Aminophenol <sup>a)</sup>	0.115	258	2243
IV Acetaminophen → p-Aminophenol <sup>b)</sup>	16.67	160	10
V Phenacetin → N-Hydroxyphenacetin <sup>a)</sup>	0.694	0.93	1

Each Value represents mean of 2 experiments. The reactions were performed in liver microsomes<sup>a)</sup> or 9000 xg supernatant<sup>b)</sup>.

## 2. PhenacetinとSulfanilamide およびそれらの関連化合物の腎毒作用

### 2-1 概要

著者らは、phenacetin と sulfanilamideの腎障害の発現機序において分子構造と腎毒性の関係を調べるためにそれぞれの代謝物のうちとくにN-hydroxyl体に焦点を当てるとともにFig. 18 に示したように、両方の化合物の共通の骨格であるaniline 関連化合物について総合的に検討を加えた。phenacetinの誘導体については、Calder ら<sup>7a)</sup>がp-aminophenol を含む16種の化合物をラットに静脈注射し、腎障害の有無を光学顕微鏡で観察し、毒性の程度と構造との関係を調べた。その結果、p-aminophenol の場合、パラアミノ基と水酸基の位置が腎毒性に関係あり、オルト、メタの位置では毒性は低かった。さらに彼らは、aminophenol, catecholおよびquinolによる腎毒性を観察し、近位尿細管壊死の程度と酸化還元電位との関係を調べ、quinolと同程度の酸化還元電位を有する代謝物を生ずる化合物に腎毒性が見られる事を報告した<sup>7b)</sup>。

腎毒作用の指標として、従来より尿タンパク、血清尿素窒素 (BUN)、馬尿酸によるクリアランスの測定が行なわれてきたが、これに加えて腎臓に局在する酵素 N-acetylglucosaminidase (NAG) およびalkaline phosphatase (ALP) の尿中排泄量を測定することにより、腎障害の程度を知る指標となりうるか否かを検討した。

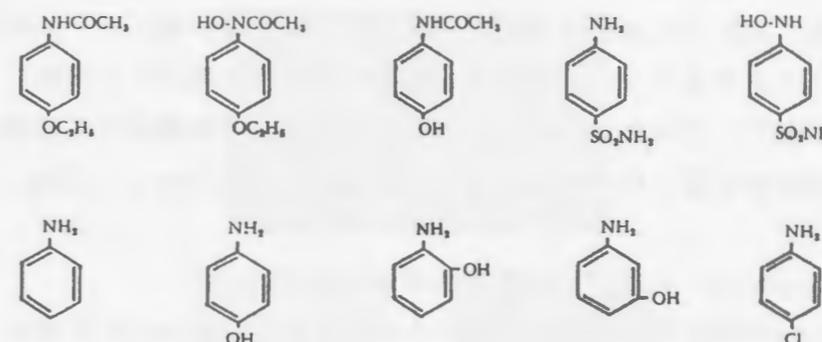


Fig.18 Aniline and Its Derivatives Used for Renal Toxicity Test

### 2-2 薬物のN-水酸化反応と腎障害

薬物による腎障害の場合にも、薬剤アレルギーと同様に薬物の代謝活性化が必要であり、sulfanilamide およびphenacetin 腎障害においてもその代謝物の重要性が示唆される。そこで、それぞれのN-hydroxyl体による腎障害の程度を腎毒性の指標を用いて比較検討した。腎毒性の指標としては、実験の部 (20) に記載したように、尿中タンパク、BUN、尿中酵素活性および組織学的方法を用いた。Table 17は、薬物投与前を対照 (100%) として24時間後の変化率を%で表わしたものである。

Table 17 Effects of Drugs on Urinary Protein Content, Urinary NAG Activity and BUN Level in Rats

Drug	Route of administration	Dose (mmol/kg)	Number of animals	% control ± S.D.		
				Urinary Protein	Urinary NAG	BUN
Sulfanilamide	i. p.	1.0×1	3	99 ± 6	136 ± 55	105 ± 7
		1.0×2	4	61 ± 7	136 ± 40	121 ± 34
		2.0×1	4	79 ± 17	152 ± 45	127 ± 21
4-Hydroxyl-aminobenzene sulfonamide	i. p.	1.0×1	5	270 ± 170	371 ± 257	164 ± 16 *
		1.0×2	4	288 ± 78 *	1500 ± 936 *	238 ± 189 *
		2.0×1	4	267 ± 50 *	582 ± 265 *	157 ± 27 *
Phenacetin	Oral	1.1×2	3	105 ± 22	165 ± 45	107 ± 10
		2.1×1	5	214 ± 72	151 ± 31	113 ± 11
N-Hydroxyphenacetin	Oral	1.0×1	5	98 ± 15	118 ± 15	118 ± 12
		2.1×1	3	153 ± 17	95 ± 17	122 ± 21
		i. p.	3	269 ± 51 *	248 ± 74 *	183 ± 22 *

Control values of urinary protein, urinary NAG activity and BUN are as follows; 48.01 ± 7.24 mg/24 h, 45.57 ± 10.94 nmol of 4-methylumbelliferone liberated/mg creatinine/h, 14.16 ± 2.45 mg/dl serum. Each value represents % control ± S.D. \* Significant increase (p < 0.05).

両薬物のN-水酸化体において、投与量、投与方法による差はあるが、尿タンパク、尿中NAG活性、BUN共に顕著な増加が認められた。組織学的には、4-HABSAの場合、Fig.19-Cに示すように、48時間後の腎の切断像は対照(B)と比較して髄質に極度の萎縮が起り、空洞化が認められた。またこの時の腎臓切片の組織学的所見は乳頭部の壊死が顕著で核の消失および細胞の崩壊が見られた。(Fig. 19-A)。

### 2-3 p-Aminophenol および aniline誘導体と腎障害

phenacetinの活性代謝物と考えられたN-hydroxyphenacetinにおいて近位尿細管の軽度の壊死が認められたが、Fig. 20-Eに見られるようにp-aminophenolの方が低濃度でしかも強度であった。酵素組織化学において、腎近位尿細管に局在するN-acetylglucosaminidase(NAG)の酵素染色を対照(Fig. 20-F)と比較したところ、対照はNAGの分布が均一であるのに対し、p-aminophenol投与の場合(Fig. 20-G)、細胞壊死のため(左下部分)NAG酵素が減少し染色がまばらとなった。一方、p-aminophenol投与後の尿中タンパク、BUN、尿中酵素(NAG, ALP)活性の経時的変化を調べたところ、Fig. 21に示すように、いずれの場合においても投与24時間後に著しい増加が認められ、組織学的変化とよく一致した。

p-aminophenolのオルト、メタ異性体は、同一条件では何らの変化も認められなかった。この点Calderらと同じ結果が得られた。p-chloroanilineの場合はいずれの腎毒性指標にも変化は認められなかったが、肉眼的には腹水の異常増加があり、他の臓器障害が考えられ、パラ位の置換基によって腎臓との親和性が異なることを示した。

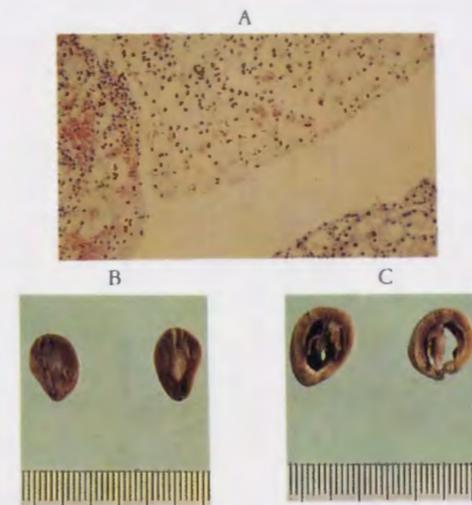


Fig. 19 Renal Papillary Necrosis

- A, Animals were killed 24 h after administration of 4-HABSA (2 mmol/kg, i.p.) and sections of kidney were stained with hematoxylin and eosin(H. & E., ×100).
- B, Control rat kidney
- C, Kidney showing a big cavity resulting from severe contraction of medulla

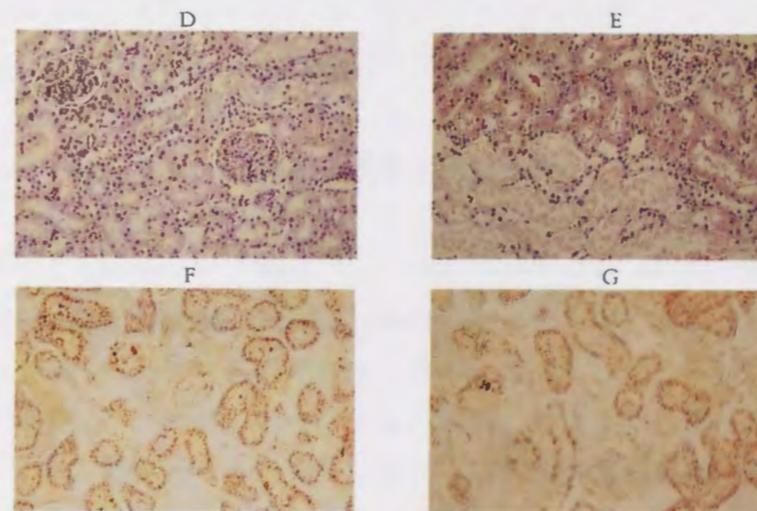


Fig. 20 Renal Necrosis of the Proximal Convolved Tubules

- D, Control rat(H. & E., ×100).
- E, Animals were killed 24 h after administration of p-aminophenol(1 mmol/kg, i.p.) and sections of kidney were stained with hematoxylin and eosin(H. & E., ×100).
- F, Sections of kidney of control rat were incubated at 37 °C for 30 min in the solution of 0.5 mM naphthol AS-BI N-acetyl-β-D-glucosaminide and hexazonium pararosaniline (×100).
- G, Animals were killed 6 h after administration of p-aminophenol(1 mmol/kg, i.p.) and sections of kidney were stained histochemically with the same method as the control (×100)

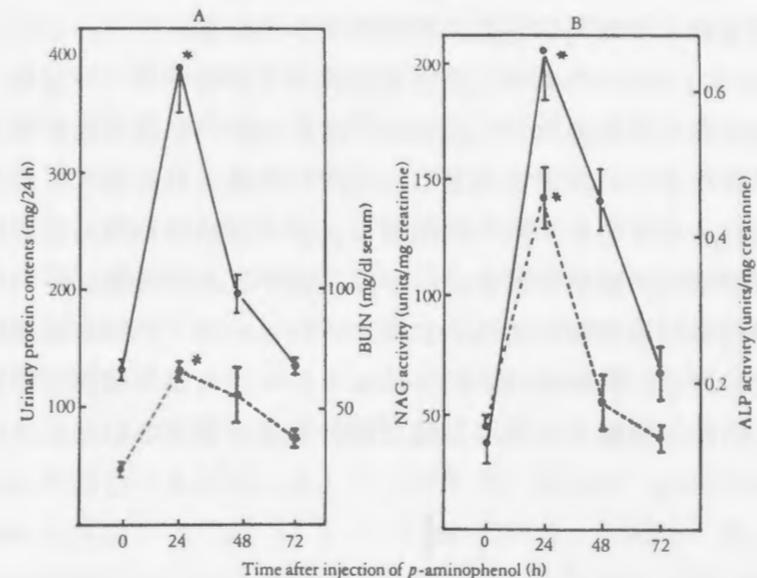


Fig. 21 Effect of p-Aminophenol on Urinary Protein, Urinary Enzyme Activities and BUN in Rats

(A) urinary protein (●—●), BUN (●---●); (B) urinary NAG activity (●—●), urinary alkaline phosphatase activity (●---●) were determined at various intervals after i.p. administration of p-aminophenol (1 mmol/kg). Each point represents mean ± S.E. of 3 experiments. \*Significantly different from the value at 0 time ( $p < 0.05$ ).

### 3. 3,4,5,3',4'-Pentachlorobiphenyl (PenCB) による

#### sulfanilamideとphenacetinの腎毒作用増強<sup>67</sup>

##### 3-1 概要

前章で述べた phenacetin および sulfanilamide の in vitro 代謝研究において、両薬物の N-水酸化活性が 3-methylcholanthrene (3-MC) および 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) 前処理により著しく増大し、この時 P-448 含量も増加することが判明した。PenCB については、P-448 型の薬物代謝酵素誘導剤であり<sup>77,78</sup> それ自身の毒性として肝脂質の増加、胸腺、脾臓の萎縮、さらに軽度ではあるが副腎や腎臓の萎縮をもたらす事が知られている<sup>79</sup>。PenCB の酵素誘導と毒性との関係については、現在のところ統一的な知見は得られていない。典型的な cyt. P-450 誘導剤である phenobarbital (PB) では肝臓では誘導されるが腎臓では誘導されない。しかるに、前項で示したように PenCB は腎臓の cyt. P-450 (448) を誘導し、かつ sulfanilamide と phenacetin の N-水酸化活性を増加させた。そこで、phenacetin および sulfanilamide によって惹起される腎障害における PenCB 前処理の影響を調べた。

### 3-2 薬物代謝酵素誘導剤前処理の腎毒作用への影響

PenCB, 3-MC, PB の各薬物代謝酵素誘導剤で実験の部 (3)記載の方法に従ってラットを前処理した後、sulfanilamide を2 mmol/Kg 投与した場合の24時間後のBUN および尿中タンパク量を測定した。その結果、Fig. 22 に示されるようにPenCB 前処理によってのみ、BUN の顕著な上昇が認められた。この時、組織学的にも近位尿細管壊死が観察された。しかし、尿中タンパク量については、薬物代謝酵素誘導剤前処理の影響は認められなかった。一方、phenacetin投与の場合にも、PenCB 前処理で、3 mmol/Kg 投与によりBUN の有意な増加が認められた (Fig.23)。この時、組織学的にも近位尿細管壊死が観察された。

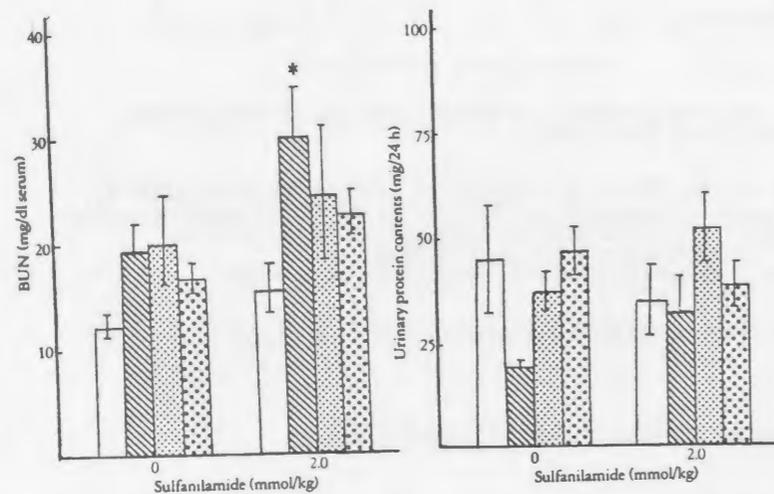


Fig. 22 Effects of Pretreatment with Various Inducers on Kidney Damage Produced by Sulfanilamide

Urinary protein and BUN at 24 h after sulfanilamide(2 mmol/kg) treatment were determined by the methods of Lowry and the urease-indophenol method, respectively. Each value represents mean±S.D. of 4 or 6 experiments. \* Significantly different from the control (P<0.05). □ untreated, ▨ PenCB, ▩ 3-MC, ▪ PB.

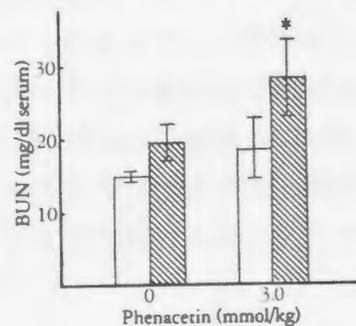


Fig. 23 Effects of Pretreatment with PenCB on Kidney Damage by Phenacetin

BUN were determined at 24 h after phenacetin (3 mmol/kg, i.p.) treatment by the urease-indophenol method. Each value represents mean±S.D. of 4 experiments. \* Significantly different from the control (P<0.05). □ untreated, ▨ PenCB.

### 3-3 p-Aminophenol 生成における薬物代謝酵素誘導剤前処理の影響

in vivo においても、PenCB 前処理により phenacetin, sulfanilamideともにBUN の有意な増加が認められ、組織学的にも近位尿細管壊死を生じたことはPenCB 前処理による薬物代謝酵素の誘導、とくにN-水酸化活性の増大によりN-hydroxyl体の生成量が増加したことが腎毒性の増強と関係あることを示唆している。一方、phenacetin についてはN-hydroxyl体の他にp-aminophenol の関与も考えられており<sup>73-75</sup>, phenacetinから p-aminophenolの代謝経路におけるPenCB 前処理の影響を検討した。p-aminophenol は前章で述べたようにphenacetinから次の2つの経路を通して生成された。一つはphenacetinからacetaminophen を経由する反応 (I) → (IV) で、他方は phenacetin から p-phenetidine を経由する反応 (II) → (III) である。反応 I, II, IIIは肝、腎ともにNADPH を補酵素としてミクロゾームで進行した。反応 (IV) は肝、腎ともにミクロゾームでは進行せず、9000×g 上清酵素により進行した。Table 18 に示したように肝ミクロゾームにおいてはI, II, IIIの反応の比活性はPenCB 前処理によりそれぞれ controlの15, 3, 10倍と増加した。一方、腎ミクロゾームにおいても、反応 I, III, IVは PenCB前処理によりそれぞれcontrolの約19, 6, 3倍に増加した。これらの結果は明らかにPenCB 前処理によってp-aminophenolの生成量が増加する事を示しており、これによる腎障害の増大が示唆された。

Table 18 Effects of PenCB Pretreatment on the Metabolic Pathways of Phenacetin in Liver Microsomes or 9000 ×g Supernatant

Metabolic pathway	Control (nmol/mg protein/min)		PenCB (nmol/mg protein/min)	
	Liver	Kidney	Liver	kidney
I Phenacetin → Acetaminophen <sup>a)</sup>	13.13	1.13	195.22	21.78
II Phenacetin → p-Phenetidine <sup>a)</sup>	3.73	0.28	11.72	0.33
III p-Phenetidine → p-Aminophenol <sup>a)</sup>	49.60	13.60	503.20	76.40
IV Acetaminophen → p-Aminophenol <sup>b)</sup>	51.60	20.40	72.80	56.00

Each value represents mean of 2 experiments. The reactions were performed in liver microsomes<sup>a)</sup> or 9000 xg supernatant<sup>b)</sup>.

#### 4. p-Aminophenol と GSH および cysteine (CYS) との結合<sup>80</sup>

##### 4-1 概要

p-aminophenol は以前から腎毒性物質として知られているが、phenacetin あるいはacetaminophen の代謝物であるか否かは明らかではなかった。Calderら<sup>69, 73</sup>、あるいは著者らの研究<sup>67</sup>により phenacetin あるいはacetaminophen の代謝物であることが in vitro 代謝研究より明らかにされた。

そこで、p-aminophenol のタンパク結合性を調べるために、モデル過酸化酵素としてhorseradish peroxidaseを、またアミノ酸のモデルとしてGSH あるいはCYS を用い、結合体の酵素的合成を行ない、その結合様式を検討した。

##### 4-2 p-Aminophenol投与による肝および腎のGSH 量の低下

実験の部(14)に記載した Ellman 法<sup>66</sup>を用いて sulfanilamide の場合と同様の方法でp-aminophenol 投与後の肝臓および腎臓中のGSH 量を測定した。その結果、Table 19に示したようにcontrol 群(何も投与しない)に比較して腎臓中のGSH 量が減少した。このことは、p-aminophenol が生体内のGSH と結合するというを示している。またこのことを裏づけるデータとしてp-aminophenol-GSH結合体をラットに投与した場合、腎障害の指標であるBUN は全く増加せず control値を示した (Table 20)。

Table 19 Glutathione(GSH) Content of Liver and Kidney of Rats following i.p. Injection of p-Aminophenol

Drug	GSH content ( $\mu\text{mol/g}$ wet weight )	
	Liver	Kidney
None	$8.7 \pm 0.4$	$5.5 \pm 0.6$
p-Aminophenol	$6.9 \pm 1.3$	$4.1 \pm 0.4 *$

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of 3 rats.  
Significantly different from the control ( \*  $P < 0.05$  ).

Table 20 Effects of p-Aminophenol and p-Aminophenol-GSH Conjugate on Rat Blood Urea Nitrogen (BUN).

Treatment	Dose ( $\text{mmol/kg}$ )	Number of animals	BUN ( $\text{mg/dl}$ serum )
Saline	—	12	$21 \pm 2$
p-Aminophenol	1.0	7	$39 \pm 4 **$
p-Aminophenol-GSH	1.0	5	$21 \pm 3$

Each value represents mean  $\pm$  S.D. of rats (5-12).  
Significantly different from the control ( \*\*  $P < 0.001$  ).

##### 4-3 p-Aminophenol と GSHおよびCYS 結合体の構造決定

p-aminophenol の GSH結合体を得るために、実験の部(23)記載の方法に従い酵素的に合成した。反応混液のHPLCを行なった結果、Fig. 24 に示したように4分にp-aminophenol、7分、9分、13分に未知物質が検出され、これら3つのピークはGSH, p-aminophenol, horseradish peroxidase がない場合には生成しなかった。この内、ピーク3(9分)とピーク4(13分)をそれぞれ分析カラムを用いてHPLCで単離精製した。

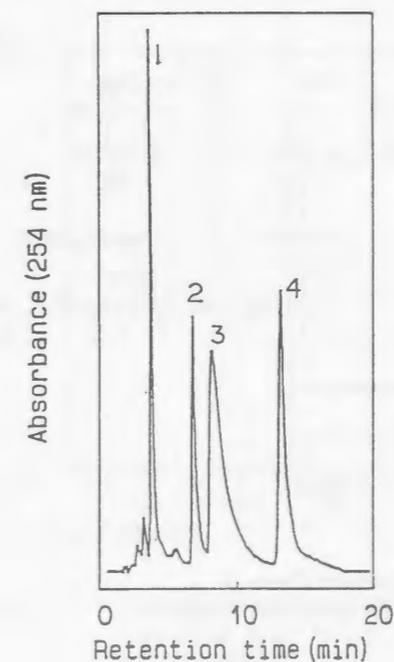


Fig. 24 HPLC Elution Pattern of the p-Aminophenol/GSH Reaction Mixture after Incubation with Horseradish Peroxidase

peaks: 1, PAP ;  
2, 3 and 4, unknown.

FAB-massスペクトル測定の結果、ピーク 3は  $[M-H]^-$  1023の分子イオンピークを示した (Fig. 25)。さらに  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル測定の結果、7.05 ppmにただ 1本のピークが得られ、GSH 3 分子結合体であることが明らかになった (Fig. 26)。しかし、GSH の結合部位については、決定できなかった。

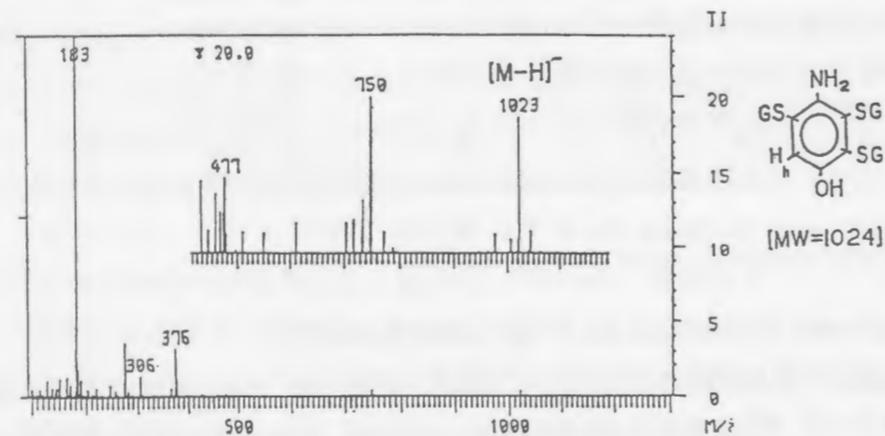


Fig. 25 FAB-Mass Spectrum of the Reaction Product (Peak 3) Isolated from the p-Aminophenol/GSH Reaction Mixture by the HPLC.

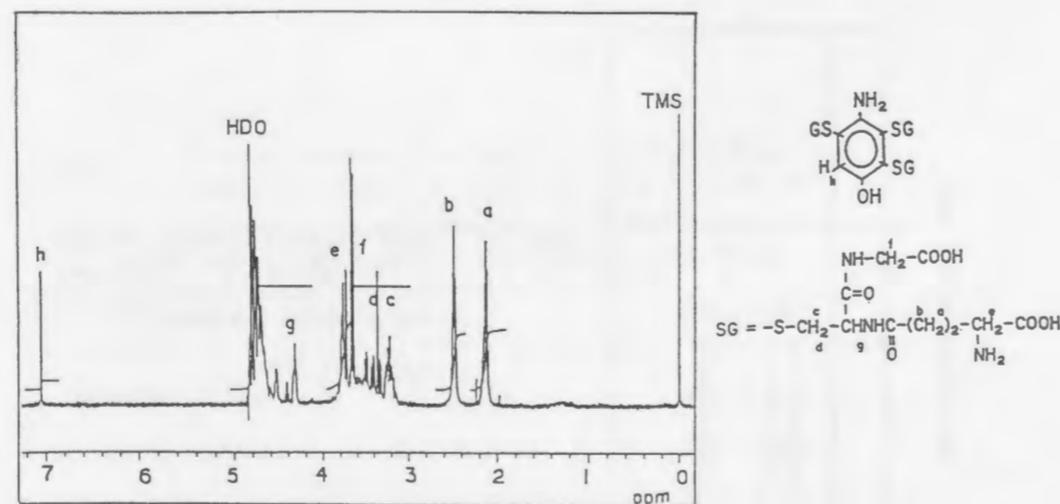


Fig. 26  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of the Reaction Product (Peak 3) Isolated from the p-Aminophenol/GSH Reaction Mixture by the HPLC

一方、ピーク 4 について、FAB-massスペクトルを測定したところ、 $[M+H]^+$  415,  $[M+Na]^+$  437,  $[M+K]^+$  453が検出され GSH 1 分子結合体であることが判明した (Fig. 27)。さらに、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル測定の結果 (Fig. 28A)、標品の GSH, p-aminophenolのNMR の結果と比較して、2.00から4.46 ppmのピークは GSH に由来し (Fig. 28B)、6.70から 6.89 ppm は p-aminophenolに由来することが分かった (Fig. 28C)。GSHの結合部位はp-aminophenol のベンゼン環のアミノ基に対し、オルト位 (I) あるいはメタ位 (II) の可能性が考えられた。(I) の場合、プロトン a, b, c の化学シフトの値をベンゼン環プロトンの化学シフトに対する置換基の影響に対する経験則からGSH の代わりにSCH<sub>3</sub>として計算すると、それぞれ 6.21, 6.29, 6.37 ppmであった。実測した化学シフトは高磁場から低磁場に a, b, c の順序であった。一方、(II) の場合、a', b', c' は 6.35, 6.15, 6.31となり、これらの順序は b', c', a' となった。さらに (I) の場合、6.70 ppmと6.78ppm のピークはプロトン-スピン結合定数がお互いにオルト ( $J_{ab}=8\text{Hz}$ ) であるので、6.70 ppmが a, 6.78 ppmが b と帰属された。また、6.70 ppmと 6.89 ppm はお互いにメタ位 ( $J_{ac}=3\text{Hz}$ ) であるので6.89 ppmは c と帰属された。しかし、(II) の場合ピーク a', b', c' はスピン-プロトン結合定数を適用することができなかった。従って、GSH は Fig. 28D に示されるように p-aminophenol のアミノ基のオルト位で結合している (I) と決定した。

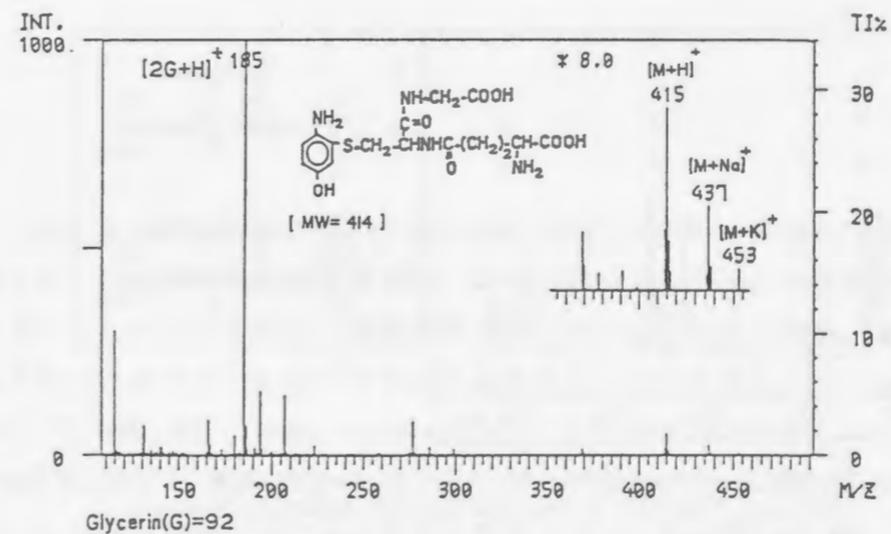


Fig. 27 FAB-Mass Spectrum of the Reaction Product (Peak 4) Isolated from the p-Aminophenol/GSH Reaction Mixture by the HPLC

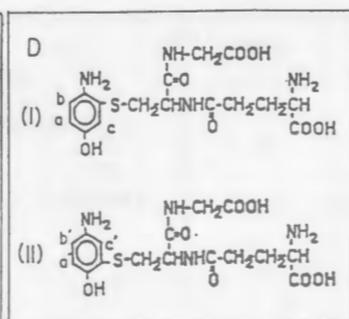
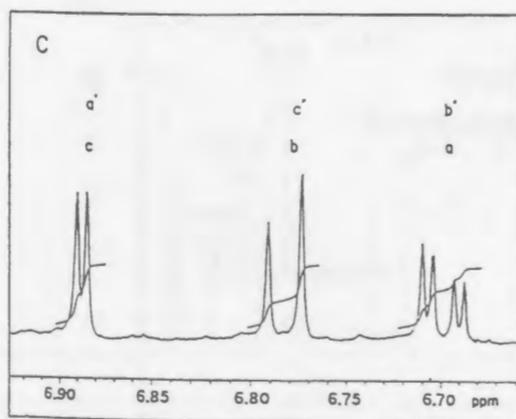
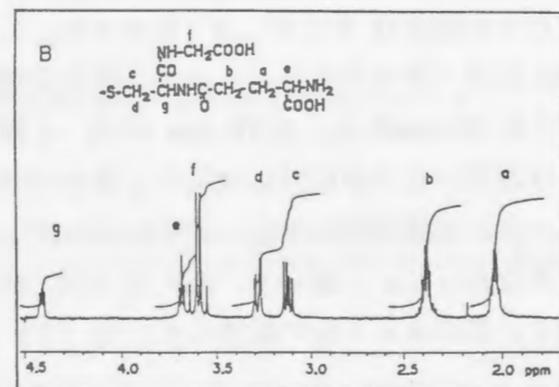
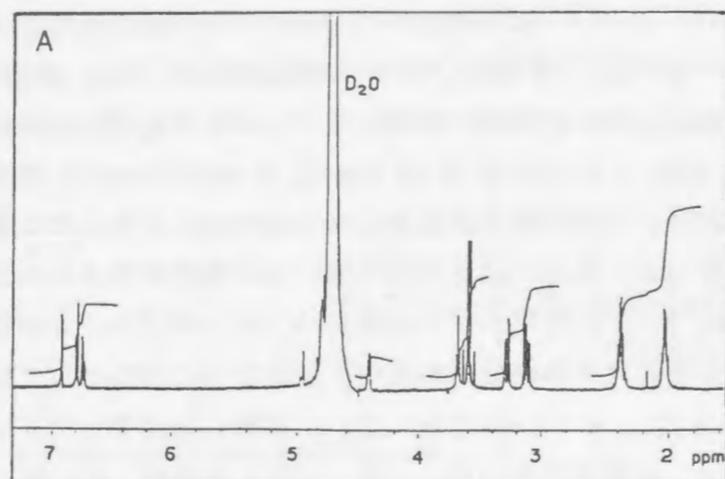


Fig. 28  $^1\text{H-NMR}$  Spectrum of the Reaction Product (Peak 4) Isolated from the p-Aminophenol/GSH Reaction Mixture by the HPLC

$^1\text{H-NMR}$  spectrum is shown separately as follows:  
 A) entire spectrum, B) the part responsible to GSH  
 C) the part responsible to p-aminophenol,  
 D) proposed structure of p-aminophenol-GSH conjugate.

またUV吸収スペクトル測定の結果、p-aminophenol はGSH との結合により長波長シフトを示し、3分子GSH 結合体、 $\text{PAP-(GSH)}_3$ の方が1分子結合体、 $(\text{PAP-GSH})$ よりもさらに長波長シフトを示した (Fig. 29)。

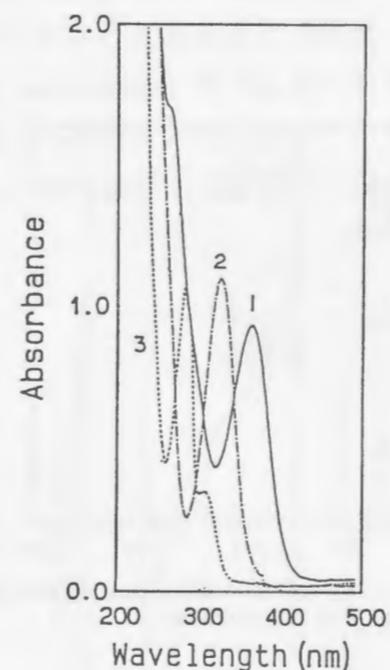


Fig. 29

U.V. Spectra of the p-Aminophenol/GSH Reaction Mixture after incubation with Horseradish Peroxidase

peak: 1,  $\text{PAP-(GSH)}_3$ ; 2,  $\text{PAP-GSH}$ ; 3,  $\text{PAP}$

一方、p-aminophenol とCYS 結合体についてもGSH と同様の方法で酵素的に合成した。Fig. 30 に示したように、HPLCにおいて5 分後に未知物質が検出されたので、このピークをHPLCで単離精製した。FAB-mass測定の結果、 $[\text{M}+\text{H}]^+ 229$ が検出されたことよりCYS は1 分子結合体であることが判明した ( Fig. 31) 。さらに  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果、p-aminophenol に由来する6.8 から7.1 ppm のピークはGSH 結合体と一致した。このことより、CYSもまたp-aminophenol のアミノ基のオルト位に結合していると考えられる ( Fig. 32) 。

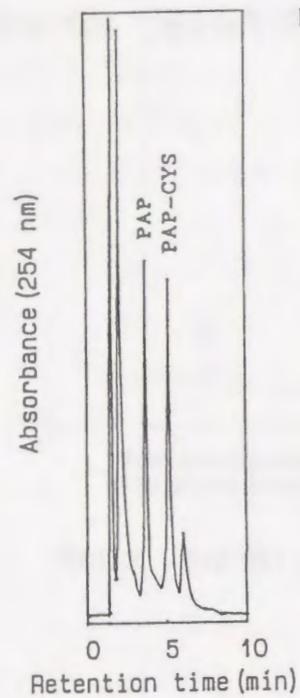


Fig. 30 HPLC Elution Pattern of the p-Aminophenol/CYS Reaction Mixture after Incubation with Horseradish Peroxidase

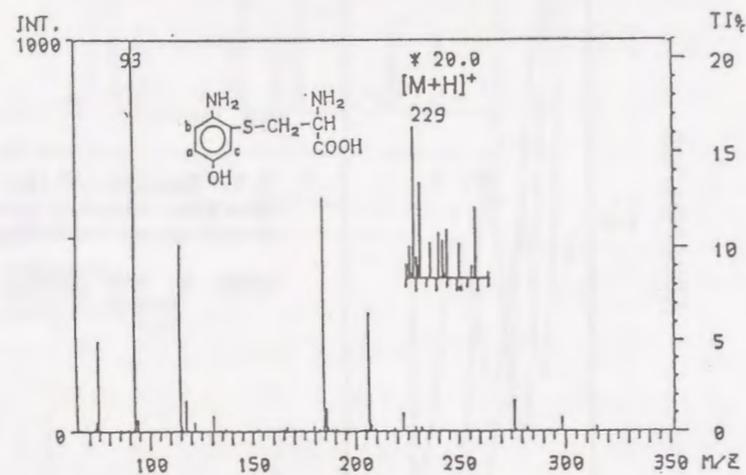


Fig. 31 FAB-Mass Spectrum of the Reaction Product (p-Aminophenol-CYS Conjugate)

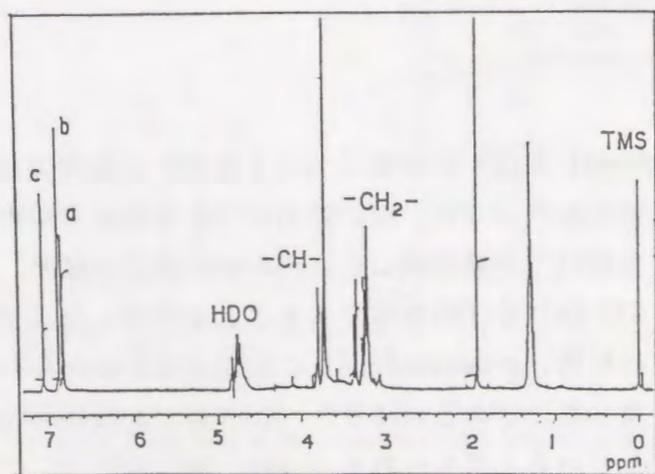


Fig. 32 <sup>1</sup>H-NMR Spectrum of the Reaction Product Isolated from the p-Aminophenol/CYS Reaction Mixture by the HPLC

#### 4-4 Horseradish peroxidase/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による p-aminophenol と GSH との結合反応

実験の部 (21) に記載された方法で p-aminophenol-GSHの結合反応を酵素的に検討した。すなわち p-aminophenol-GSH結合体生成に及ぼす p-aminophenol, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および horseradish peroxidase の影響を調べた。その結果、Fig. 33 に示したように結合体生成量は、p-aminophenol と peroxidase の濃度に比例した。p-aminophenol の K<sub>m</sub> 値を求めると 0.4 mM となった。しかしながら、結合体生成量は GSH 濃度には比例せず、0.1 mM 以上の GSH で一定であった。また H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は 0.4 mM で最高生成量を示した。

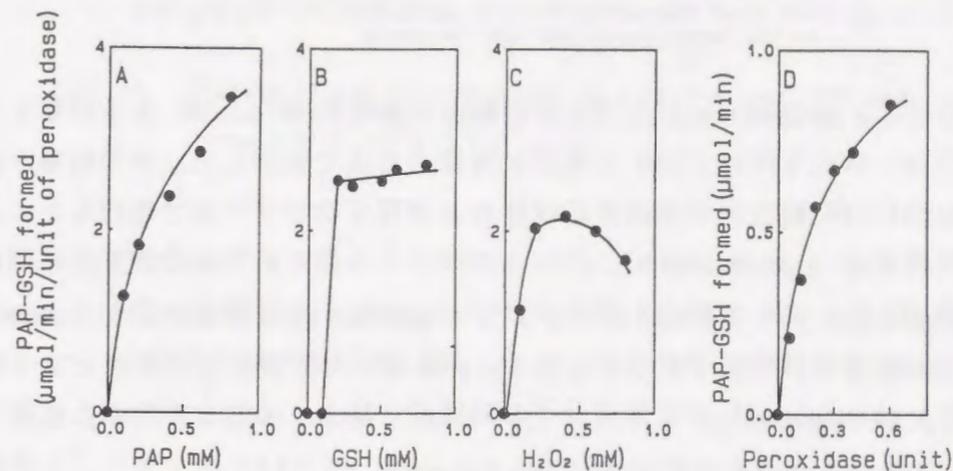


Fig. 33 Effects of the Concentration of p-Aminophenol, GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Horseradish Peroxidase on the Formation of PAP-GSH Conjugate

#### 4-5 Microsomes/cumenehydroperoxide, butylhydroperoxideによる p-aminophenol と GSH および CYS との結合反応

実験の部 (22) に記載された方法で、p-aminophenol-GSH 結合体生成に及ぼす p-aminophenol, GSH, 肝ミクロソーム濃度およびインキュベーション時間の影響を調べた (Fig. 34)。生成量は p-aminophenol, GSH 濃度に比例して増加した。この図から得られた Lineweaver-Burk plot より求めた K<sub>m</sub> 値はそれぞれ 0.4 mM, 0.77 mM であった。これらの結果は、p-aminophenol-GSH 結合体の生成がすべての因子の濃度に依存していることを示しており、この生成反応が肝ミクロソームによって進行することが明らかとなった。

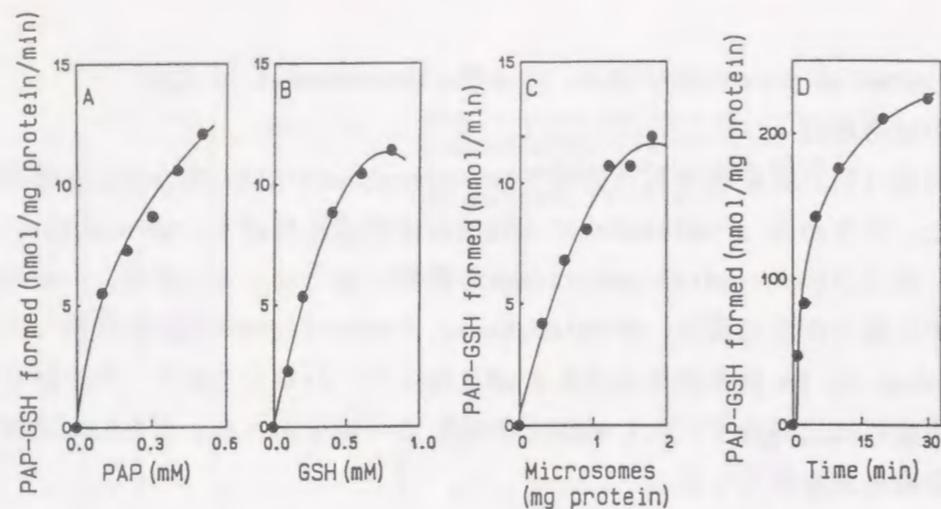


Fig. 34 Effects of the Concentration of p-Aminophenol, GSH and Liver Microsomal Protein and Incubation Time on the Formation of PAP-GSH Conjugate

さらに、p-aminophenol と CYS との結合反応を肝 (Fig. 35), および腎ミクロゾーム (Fig. 36), を用いて GSH の場合と同様の方法で検討した。その結果、p-aminophenol-CYS 結合体の生成反応は肝および腎ミクロゾームで進行した。そしてその生成量は p-aminophenol, CYS, ミクロゾームのそれぞれの濃度と時間に比例して増加した。GSH の場合、腎ミクロゾームではその生成量が少なく p-aminophenol-GSH 結合体は検出できなかったが、CYS 結合体が検出できたことより腎臓において p-aminophenol が生体高分子の SH 残基と結合することが判明した。

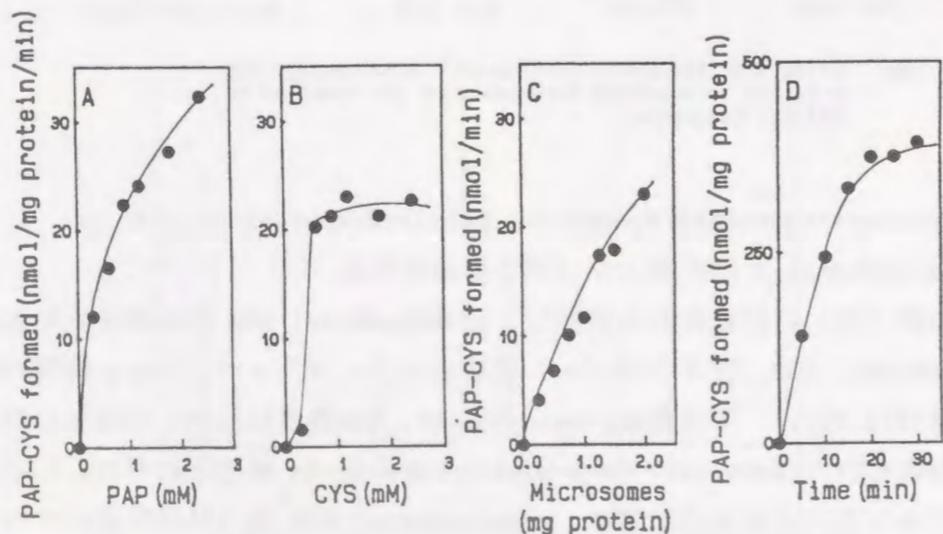


Fig. 35 Effects of the Concentration of p-Aminophenol, CYS and Liver Microsomal Protein and Incubation Time on the Formation of PAP-CYS Conjugate

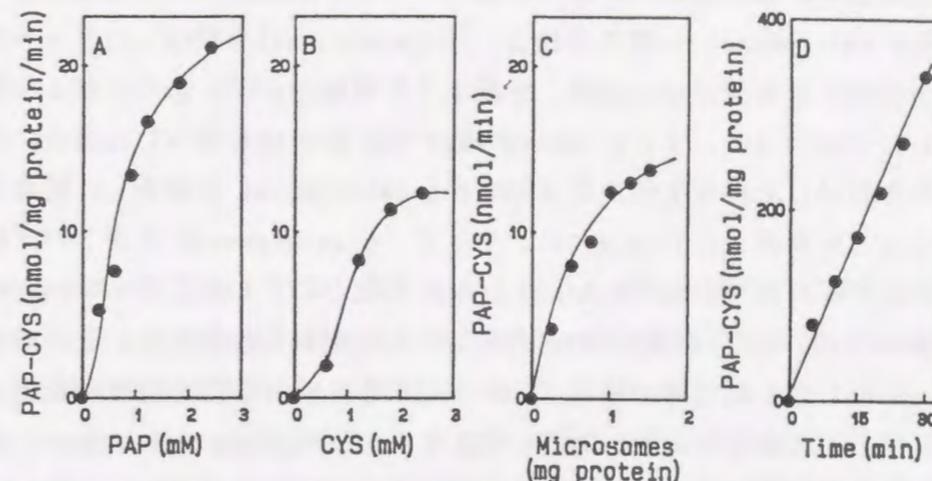


Fig. 36 Effects of the Concentration of p-Aminophenol, CYS and Kidney Microsomal Protein and Incubation Time on the Formation of PAP-CYS Conjugate

## 5. 考察

Phenacetin および sulfanilamide による腎毒作用をそれぞれの N-hydroxyl 体について、腎毒性指標を用いて比較検討した結果、それぞれの N-hydroxyl 体において顕著な腎障害が認められた (Table 17)。一方、p-aminophenol は以前から腎毒物質として知られていたが、phenacetin の代謝物であるか否かは不明であったので、phenacetin の代謝反応を酵素学的に検討することにより、phenacetin から p-aminophenol の生成を *in vitro* で証明した (Table 16)。これにより phenacetin 腎障害の原因物質の一つが p-aminophenol であることが判明した。

薬物代謝酵素前処理の腎毒作用への影響を検討した結果、control と比較して PenCB 前処理によって sulfanilamide, phenacetin とともに BUN の顕著な増加が認められ (Fig. 22, 23)、組織学的にも近位尿細管壊死が観察された。sulfanilamide の場合、腎臓についての *in vitro* 代謝実験においても PenCB によって 4-HABSA への N-水酸化反応が誘導され、腎毒性は 4-HABSA に依存することが判明した (Table 3)。一方、phenacetin の場合 PenCB によって N-hydroxy-phenacetin への N-水酸化 (Table 15)、および phenacetin  $\rightarrow$  p-phenetidine, p-phenetidine  $\rightarrow$  p-aminophenol の反応も誘導された (Table 18)。N-hydroxy-phenacetin と p-aminophenol の腎障害への関与を比較すると、*in vitro* 実験の結

果から、生成反応のVmax/ Km値は p-aminophenolの方が高く (Table 16)、実際の腎障害の程度もp-aminophenolの方が強いことからphenacetin腎障害に関与しているのはp-aminophenolと考えられる。p-Aminophenolを投与したラットの肝臓と腎臓中のGSH量を測定した結果、肝臓よりも腎臓中のGSH量の方がより強い減少を示した (Table 19)。またp-aminophenol-GSH 結合体を投与した場合、BUNの増加を示さないことから生体内ではGSHがp-aminophenolと結合し、解毒に関与していることが判明した (Table 20)。そこで、p-aminophenolのタンパク結合性を明らかにするためにp-aminophenolとGSHおよびCYSの結合体をhorseradish peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて酵素的に合成し、その構造を検討した。その結果、p-aminophenol-GSH 結合体の構造についてはGSH 3分子の場合はその結合部位は明らかにすることができなかつたが、GSH 1分子の場合にはp-aminophenolのアミノ基のオルト位にSH基を介して結合していることが判明した (Fig. 28D)。また、CYS 結合体の場合は、GSH 1分子結合体の場合と同じであった (Fig. 32)。さらに、in vitroにおける p-aminophenol-GSH結合体生成反応を酵素的に検討した結果、腎ではその生成量が少ないため検出できなかったが肝では検出できた。また、p-aminophenol-CYS 結合体の場合は腎ミクロゾームでも検出され、その結合体の生成量は肝の約1/2であった (Fig. 35, 36)。

従って、p-aminophenolは腎臓において生体高分子の求核的アミノ酸残基、たとえばシステイン、メチオニン、ヒスチジン、チロシン、リジンなどと結合し尿細管壊死を起こすものと考えられる。

## 謝辞

本稿を終るにあたり、本研究の機会を賜り、終始御指導、御鞭撻を賜った第一薬科大学衛生化学教室吉田和夫教授、重松秀成助教授、ならびに、北陸大学薬学部山本郁男教授に深甚なる謝意を表します。

また、論文の御校閲を賜りました九州大学吉村英敏教授に深謝します。

また、本研究を遂行するにあたり数々の援助を頂いた同教室の飯野信子および久成由紀子助手に深く感謝します。

さらに、本研究の完成までに熱心に実験に協力された数多くの特別実習生の方々に心より御礼申し上げます。

最後にFAB-Massスペクトルを測定して頂いた九州大学磯部隆一氏、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定して頂いた本学中央機器室後藤祐子助手に感謝致します。

Faint, illegible text on the left page, possibly bleed-through from the reverse side.

Faint, illegible text on the right page, possibly bleed-through from the reverse side.

## 実験の部

### (1) 実験材料

$^{35}\text{S}$ -Sulfanilamide は長瀬らの方法<sup>33</sup>に従い、acetanilide を出発原料とし、 $^{35}\text{S}$ - $\text{H}_2\text{SO}_4$ と無水酢酸でスルホン化した。常法に従いスルホンアミドとし、脱アセチル化後目的とする $^{35}\text{S}$ -Sulfanilamide (SA)を得た。 $^{35}\text{S}$ -sulfanilamide の放射化学的純度は n-butanol飽和アンモニアおよび n-butanol-酢酸-水 (4 : 1 : 5)の2種類の溶媒系による paper chromatography (PPC) ならびに radiopaper chromatogram によって単一のピークを示すことから確認された。このもののspecific radioactivityは 0.152  $\mu\text{ci}/\text{mg}$  で2  $\pi$ -Gas flow counter ALKA FC-IE (係数効率 41 %) では135,000 cpm/mgであった。sulfanilamideは市販品 (和光純薬) 特級を水から再結晶してmp. 166-167 °Cのものを使用した。sulfanilamide の代謝物および関連化合物は常法あるいは文献記載の方法で合成し、再結晶法によって精製した。すなわち、N-acetylsulfanilamide ( $\text{N}^1$ -ASA)<sup>37</sup>  $\text{N}^4$ -acetylsulfanilamide ( $\text{N}^4$ -ASA)<sup>38</sup>,  $\text{N}^1, \text{N}^4$ -diacetylsulfanilamide ( $\text{N}^1\text{N}^4$ -DASA)<sup>37</sup>, 2-hydroxysulfanilamide (2-OH·SA)<sup>39</sup>, 3-hydroxysulfanilamide (3-OH·SA)<sup>39</sup>, 4-N-glycoloylaminobenzenesulfonamide (SAC $\text{OCH}_2\text{OH}$ )<sup>26</sup>, 4-N-glyoxaloylaminobenzenesulfonamide (SAC $\text{OCOOH}$ )<sup>26</sup>, 4-hydroxylaminobenzenesulfonamide (4-HABSA)<sup>40</sup>, 4-N-acetylhydroxylaminobenzenesulfonamide (4-AHABSA)<sup>41</sup>, 4-N-diacetylhydroxylaminobenzenesulfonamide (4-DAHABSA)<sup>23</sup>, 4-Nitrosobenzenesulfonamide (4-NSBSA)<sup>42</sup>, 4,4'-azoxybenzenedisulfonamide (4,4'-AZOBDSA)<sup>43</sup>, 4,4'-azobenzenedisulfonamide (4,4'-AZBDSA)<sup>43</sup>, 4,4'-hydrazobenzenedisulfonamide (4,4'-HAZBDSA)<sup>42</sup> 以上14種の合成標品は、融点, 元素分析, 赤外線吸収スペクトル (IR), 紫外線吸収スペクトルによって構造を確認した。これらの機器測定結果のデータを一覧表にした (Table 2) 。phenacetinの代謝物および関連化合物のうち、N-hydroxyphenacetin は Calder et al. の方法<sup>56</sup>、N-hydroxyphenetidineは Corcoran et al.の方法<sup>72</sup>で合成した。Phenacetin, acetaminophen, p-phenetidine, p-aminophenol, o-aminophenol, m-aminophenol, aniline, p-chloroanilineは市販の特級品あるいは局方品を再結晶して用いた。タンパク質はウシ血清アルブミン (BSA, Fraction V, Armour社製), ウシγ-グロブリン (BGG, Fraction II, Armour社製), およびウサギ血清 (RS), メンヨウ血球 (Sheep Red Blood Cell, SRBCは) 日本バイ

Table 2 Physical Constants and Elemental Analysis of Synthetic Compounds

Compounds	mp (°C)	Recryst. Solvent	Appearance	UV EtOH $\lambda_{max}$ ( $\mu$ )	Formula	Anal. (%) C	Anal. (%) H	Calcd. Found. N
4-NBSA	179-180	50% EtOH	white -pale yellow needles	262	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	35.67 35.96	2.99 2.89	13.87 14.12
4-HABSA	140-141	AcOEt-Petro. ether (2:1)	white -pale yellow prisms	263	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	38.29 38.35	4.29 4.28	14.90 14.50
N'-ASA	182-184	H <sub>2</sub> O	white plates	270	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	44.86 45.03	4.67 4.51	13.08 13.12
N'-ASA	215-216	50% EtOH	white plates	258	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	44.86 45.02	4.67 4.84	13.08 12.84
N',N'-DASA	253-255	EtOH	white needles	262	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	46.88 46.55	4.69 4.19	10.94 10.75
SA-CO-CH <sub>2</sub> OH	210-212	MeOH	white needles	256	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	41.73 41.66	4.38 4.34	12.17 12.38
SA-CO-COOH	223-225	0.1M-HCl	white plates	268	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	39.34 39.26	3.28 3.53	11.48 11.70
2-OH-SA	149-150	EtOH-CCl <sub>4</sub>	white needles	253	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	38.30 38.25	4.26 4.25	14.89 14.59
3-OH-SA	163-164	EtOH-CCl <sub>4</sub>	white -pale-orange long needles	262 295	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	38.30 38.78	4.26 4.51	14.89 15.04
4-AHABSA	223-225	50% EtOH	white plates	267	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	41.73 41.52	4.38 4.25	12.17 12.00
4-DAHABSA	168-170	50% EtOH	white prisms	261	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	44.12 44.61	4.41 4.22	10.29 10.26
4-NSBSA	150 (decomp.)	50% EtOH	white -pale-green prisms	285 307	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	38.74 38.40	3.25 3.28	15.06 14.88
4,4'-AZOBDSA	289-290	30% Pyridine	orange-yellow needles	260 333	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	40.45 40.19	3.37 3.52	15.76 15.44
4,4'-AZBDSA	312-313	30% Pyridine	orange-red needles	230 325	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	42.35 42.06	3.53 3.53	16.47 16.59
4,4'-HAZBDSA	222-224	H <sub>2</sub> O (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	white -pale-pink needles	271	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> N <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	42.11 41.80	4.09 4.32	16.37 16.33

オテスト研究所製を用いた。薬物代謝酵素の誘導剤として用いた 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (PenCB) は Saeki et al. の方法<sup>79</sup>に従って合成した。また 3-methylcholanthrene (3-MC) は Sigma Chemical Co. Ltd. より、phenobarbital (PB) は第一製薬株式会社より購入した。酵素として用いた horseradish peroxidase (Type IV, 300 units/mg) および補酵素として用いた nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) は Sigma Chemical Co. Ltd. より、cumenehydroperoxide, butylhydroperoxide はキシダ化学より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は和光純薬より購入した。還元型グルタチオン (GSH), 酸化型グルタチオン (GSSG) は Sigma Chemical Co. Ltd. より、その他すべて試薬は市販の特級品を用いた。

## (2) メトヘモグロビンの定量

ラットに薬物を投与し、エーテル麻酔下、眼穿刺法により経時的にあらかじめヘパリン加工したスピッツに採血した。新鮮血 0.05 ml をとり以下 Evelyn-Malloy 法<sup>44</sup>に準じてメトヘモグロビン量を算出した。

## (3) 動物の前処理と肝臓および腎臓 9000 × g 上清、105,000 × g 上清ならびに肝臓、腎臓、皮膚ミクロゾームの調製法

動物は Wistar 系雄性ラット (体重 150-200 g) および Hartley 系雄性モルモット (体重 400-600 g) を用いた。PenCB は corn oil に溶かし、0.5 mg/1.0 ml/kg の投与量で 1 回腹腔内投与した。3-MC と PB はそれぞれ corn oil と saline に溶かし、20 mg/2.0 ml/kg と 80 mg/1.25 ml/kg の投与量で 1 日 1 回、3 日あるいは 4 日間連続的に腹腔内投与した。control は corn oil も saline も投与しなかった。PenCB 投与群は 5 日目に 3-MC と PB 投与群は最後の投与から 24 時間絶食後撲殺し、直ちに頸動脈より瀉血し開腹した。肝動脈よりカニューレを入れ生理食塩水で環流後、肝臓および腎臓を摘出した。9000 × g 上清を得る場合は等張 KCl の 4 倍量を加えてホモジナイズした。また、ミクロゾームを得る場合は 0.25 M sucrose-Tris-HCl buffer (20 mM pH 7.4) で 9 倍量としホモジナイズした。ここに得られたホモジネート混液を 9000 × g、15 分間冷凍遠心分離した。9000 × g 上清の場合にはこの上清を使用し、ミクロゾームの場合には、この上清をさらに 105,000 × g、60 分間超遠心機にかけた。次に上清を捨て、沈殿物に最初の半量となるように等張 KCl (1 mM EDTA を含む) を加えホモジネートし、再度 105,000 × g、60 分間超遠心機にかけた。分離後上清を除き、沈殿に最初の肝臓

および腎臓の重量と同量の0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) を加えホモジネートした。モルモット、ラット、マウスの皮膚のマイクロゾーム調製の場合は、動物用バリカンで刈毛、さらに除毛クリームで脱毛し、一夜放置後頸動脈より瀉血し皮膚の一部にハサミを入れ窒素ガスを通して筋肉と皮膚を切り離した。腹部と背部の皮膚を切り取り、ハサミで細切後重量の5倍量の等張 KClを加え、ポリトロンで30秒×4回ホモジナイズした。その後の操作は肝臓の場合と同様に行なった。また105,000×g上清酵素調製の場合、肝臓は重量の4倍、皮膚は3倍量の0.1 M phosphate buffer solution (pH 6.8)を加え、ポリトロンでホモジナイズ後、9000×g、15分間冷却遠心し、さらに上清を105,000×g、60分間超遠心分離し、その上清を酵素源とした。以上の酵素の調製はすべて4℃で行なった。

#### (4) Cytochrome P-450の測定とタンパク質の定量法

マイクロゾーム調製後直ちに二波長分光光度計を用いて Omura et al. の方法<sup>47</sup> に準じてcyto. P-450量を測定した。9000×g上清およびマイクロゾームの定量法はFolin-Lowry法<sup>46</sup>に従った。標準タンパク質としてBSAを用いその検量線よりタンパク質量を計算した。

#### (5) Sulfanilamide N-水酸化活性の測定

Sulfanilamide のN-水酸化活性の至適条件を種々検討した結果、肝あるいは腎マイクロゾーム (3 mg protein)、0.1 M Na, K-phosphate buffer (pH 7.4), 3 μmol NADPH, 3 μmol EDTA, 30 μmol MgCl<sub>2</sub>, 9 μmol SA と決定した。以上の組成を含む全量3 mlから構成される反応混液を37℃、20分間振盪下インキュベートし、反応は酢酸エチルエステル (AcOEt) 5 mlを加えることによって停止させ、sulfanilamide と反応生成物を AcOEt 5 ml で2回抽出した。AcOEt層を合わせ窒素気流下で蒸発乾固後、残留物をメタノール (MeOH) に溶解し、濾過後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の試料とした。HPLC の測定条件は、カラムに逆相型ラジアルバックC<sub>18</sub>を用い、0.1 M Na, K-phosphate buffer (pH 7.4) -MeOH (95:5, v/v) を溶媒として、1.0 ml/minの流速で、検出器の感度は0.01 - 0.02で行なった。in vivo の場合はカラムにTSK gel ODS-120Tを溶媒にH<sub>2</sub>O-MeOH (95:5, v/v)を用い測定した。4-HABSAの生成量は、ピークの高さを計測し標準曲線より求めた。標準曲線は4-HABSA の種々の濃度に対しピークの高さをプロットすることにより作られ、2.5 と100 nmolの間で直線性を示した。インキュベーション混

液からの4-HABSA の回収は約40%であった。HPLCの後、残った抽出物をシリカゲル 60F<sub>254</sub> (メルク社製) の薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分析した。展開溶媒はクロロホルム-アセトニトリル (7:3, v/v) で、検出試薬はエールリッヒとペンタシアノアンミンフェロアート試薬<sup>48</sup>を用いた。

#### (6) Sulfanilamide 3-位水酸化活性の測定

インキュベーションおよび抽出操作は sulfanilamide N-水酸化活性の測定と同じ条件で行なった。ただし、HPLCの測定条件を次のように変更した。すなわち、カラムに逆相型 Inertsil ODS-2 (5 μm, 4.6×250 mm, ガスクロ工業) を用い、50 mM Na, K-phosphate buffer (pH 8.0)/acetonitrile (98:2, v/v) を溶媒として、0.7 ml/minの流速で行なった。この測定条件下で4-HABSA, 3-OH-SA, sulfanilamide はそれぞれ9, 10, 13分に分離溶出するので、4-HABSAと3-OH-SAの生成量を別々に作成した回収検量線より求めた。

#### (7) N<sup>4</sup>-Acetylsulfanilamide N-水酸化活性の測定

インキュベーション混液は肝あるいは腎マイクロゾーム (3 mg protein), 0.1 M Na, K-phosphate buffer (pH 7.4), 3 μmol NADPH, 300 μmol NaF, 6 μmol N<sup>4</sup>-ASA を含む全量3 mlから構成された。37℃、好氣的条件下で反応後、AcOEt 5 ml で反応を停止させるとともに、未反応の基質と生成物の抽出を行なった。AcOEt層を合わせ窒素気流下で蒸発乾固後、残留物をMeOHに溶解しHPLCの試料とした。HPLCの測定条件はカラムがTSK gel ODS-120Tで溶媒はH<sub>2</sub>O-MeOH (8:2, v/v)の系で流速1.0 ml/minで行なった。4-AHABSAの生成量は、別に標品の4-AHABSAを用いて作成した検量線より求めた。インキュベーション混液からの4-AHABSAの回収率は約75%であった。(7)\* p 63 に追加

#### (8) 4-HABSA の4-NSBSA への酸化反応

0.5 mM 4-HABSAあるいは0.5 mM 4-NSBSA の0.1 M Na, K-phosphate buffer (pH 7.4) 溶液を37℃でインキュベートした。NADPH の存在下と非存在下で各時間毎に反応液にAcOEtを加え、未反応物および生成物を抽出し、窒素気流下で濃縮後HPLCにて4-HABSAと4-NSBSAを分離定量した。HPLCは分離カラムにRadial pak C<sub>18</sub> (Waters), 溶媒にH<sub>2</sub>O-MeOH (7:3, v/v), 流速1.0 ml/min, 検出波長254nmで測定した。

### (9) モルモット皮膚反応

a) 感作—Hartley系、雄性モルモット、300-600 gを1群5匹ずつA, B, Cの3群に分け、腹部を動物用バリカンで刈毛後、除毛剤で脱毛し、1日後A群に1% sulfanilamide生理食塩液、B群に1% 4-HABSA生理食塩液、C群に生理食塩水のみをそれぞれ0.1 mlずつ左右の腹部に6日間連続皮下注射し感作を行なった。

b) 誘発—3週間の休止期の後、3群のそれぞれにsulfanilamideを含む15種の化合物の1%生理食塩液(水に難溶のものは有機溶媒による局所作用を避けるため懸濁状態で使用した)を腹部に皮下注射し誘発試験を行なった。

c) 判定—誘発試験の結果は、24時間後の皮膚反応を観察し、発赤の直径で5段階に分類判定した。すなわち、-, 0-1.0 mm; ±, 1.0-2.0 mm; +, 2.0-5.0 mm; ++, 5.0-8.0 mm; +++, 8.0-15.0 mm。

### (10) 血中抗体の検討

a) 4-HABSA-タンパク結合体の調製—4-HABSA生理食塩液(10 mg/ml)をBGG-phosphate buffer (pH 7.4)溶液(60 mg/ml)または同量のウサギ血清(RS)とともに37°C, 24時間振盪下でインキュベートした。次いで上記bufferを用いて各反応溶液をVisking tubeに移入し、未反応の4-HABSAを除くために生理食塩水に対し3日間透析した。Folin-Lowry法により内液のタンパク量を求め10 mg/mlに調製した。この化合物の化学的性質については、透析法およびSephadex columnによるゲル濾過の結果より非可逆的結合が考えられるが、結合量および結合様式についてはいまだ不明である。

b) 感作—4-HABSAによる単独感作の場合、10% 4-HABSA生理食塩液を同量のFreund's complete adjuvant(Difco)と共に滅菌注射筒内で混和し、完全にエマルジョンとした。本感作物質1 mlをあらかじめ脱毛、消毒したウサギ(雄性、3-4 kg)の足趾および腹部、背部等全身の皮内に週一回、計13-14回投与した。また、4-HABSA-BSA結合体感作の場合、4-HABSA-BSA単独感作の場合と同様の方法で週一回、計4回皮下注射により感作を行なった。

c) 抗体の検索—毎週感作前に耳静脈より採血し、Ring testとOuchterlony法<sup>60</sup>で抗体産生を追跡した。さらに最終感作1週間後に心臓穿刺で全採血し、感作赤血球凝集反応(Passive hemagglutination, PHA)<sup>61, 62</sup>により抗体の力価を測定した。Ring testとOuchterlony法は常法通り、PHA反応はタン

ニン酸処理したメンヨウ血球(Tanned SRBC)を用いるBoyden法にしたがった。すなわち、Tanned SRBCを4-HABSA-BSA結合物あるいは4-HABSAと37°C, 30 minインキュベートし、赤血球に抗原をコーティングした。未結合抗原を吸引除去し洗浄後、安定化のために1%正常ウサギ血清(56°C, 30 minの非動化およびSRBCによる吸収を行なったもので)再懸濁し、血清濃度1.25%とした。被検血清はあらかじめ56°C, 30 min加熱し非動化後さらにSRBCで吸収し、上記の1%-正常ウサギ血清で段階的に希釈した。この被検血清0.5 mlに感作赤血球(1.25%)を0.1 ml加え、よく振り混ぜて室温2時間放置後、再度混和して4°Cで一夜放置後管底判定を行ない、最終陽性の希釈倍数をもって抗体価(力価)とした。

### (11) UDP-グルクロン酸転移酵素活性の測定

インキュベーション混液はTriton X-100を終濃度0.25%と成るように加えて可溶化したmicrosomesを酵素源として用い、1 mM UDPGA, 0.02-0.1 mM 4-HABSA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>を加え75 mM Tris-HCl buffer (pH 7.3)で全量1.0 mlとした。37°C, 20分間インキュベートし、6% TCAの添加で反応を停止し、遠心後上清の1 mlをacetyltransferase活性の測定法と同様、ジアゾカップリング法により未反応の4-HABSAを540 nmで比色定量した。UDPGAを加えないものをコントロールとしコントロールとの差によって結合量を算出した。なお標準品としてp-ニトロフェノールを用いた。

### (12) 硫酸転移酵素活性の測定とBSAとの結合

インキュベーション混液は、酵素源としてラット肝臓105,000×g上清(2 mg Protein), 硫酸基の供与体としてp-nitrophenylsulfate (1 mM), 受容体としてN-OH-2AAF, N-OH-PH, 4-AHABSAおよび4-HABSAの各0.5 mM, 補酵素として3',5'-adenosine diphosphate(20 mM)にTris-HCl buffer (pH 8.0), (100 mM)を加え、total volume 2.0 mlとした。31°C, 5分間プレインキュベートし、p-nitrophenolの遊離を405 nmの吸光度の増加を測定することにより求めた。covalent binding assayは上記インキュベーション混液に10 μMのBSAを加え、37°C, 15分間反応後、Sephadex LH-20のカラムにて精製し、BSA分画を凍結乾燥した。残渣を6 N HClに溶かし、110°C, 24時間真空中で加水分解した。加水分解物を減圧濃縮し1/100 N HClに溶解し、濾過後、濾液の一定量(10 μl)をオルトフタルアルデヒド(OPA)試薬によるポストラベリング法を用いてアミノ酸分析を行なっ

た。アミノ酸の定量は  $\beta$ -alanineを内標物質として加え、各アミノ酸標準物質のピーク面積より換算した。次の Fig. 37にアミノ酸分析の一例を示した。

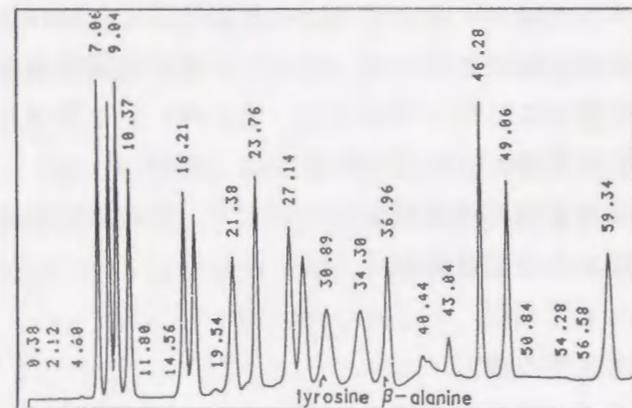


Fig. 37 HPLC Elution Pattern of Amino Acids

#### (13) 4-HABSA および 4-NSBSAと BSAとの結合

0.01 M BSAと4-HABSA あるいは4-NABSA のそれぞれ1 mMを 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 中 37 °C, 24時間振盪下インキュベートし、反応後のBSA 分画を(12)と同じ方法で加水分解しオルトフタルアルデヒド(OPA)法とニンヒドリン法によりBSA 分画のアミノ酸分析を行なった。

#### (14) 生体内 GSHの定量法

saline(control), sulfanilamide, 4-HABSA, 4-NSBSAの 1mmol/kg を Wistar 系雄性ラット(100-120 g)に腹腔内投与し、2時間後断頭し、直ちに肝臓と腎臓を摘出した。臓器重量の4.5倍量の0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)を加え、冷却下ポリトロンでホモジナイズした。ホモジネートの一定量に同量の4% sulfosalicylic acidを加え、再びポリトロンでホモジナイズした。冷却遠心後上清に Ellman's disulfide reagentを加え、412 nmの吸光度を測定し、GSH 量を求めた。

#### (15) 3-OH·SA とGSH 結合体の酵素合成、精製および同定

3-OH·SA-GSH 結合体を単離するために、実験の部(16)に記載したインキュベーション混液の100倍スケールで反応を行なった。すなわち、反応混液は、0.4 mM 3-OH·SA, 0.8 mM GSH, 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および150 units horseradish peroxidase からなり、0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.4) で全量300 mlとした。反応を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

の添加で開始し、30 °C, 10分間行なった後 AcOEt 300 ml の添加で停止した。水層は分離後、-50 °Cで凍結乾燥した。残渣を少量の水に溶かし、分取カラム  $\mu$ Bondasphere C<sub>18</sub>(5  $\mu$ -100 Å, 19×350 mm Waters)で 3-OH·SA-GSH結合体を分取し、精製を行った。構造解析はTLC, UV, FAB-mass スペクトルおよび <sup>1</sup>H-NMR スペクトルにより行なった。

a) TLC:プレートは逆相型シリカゲル RP-8F<sub>254</sub>S あるいは cellulose F (Merck E.C.)を、溶媒系は n-butanol- 酢酸-水(3:1:1)を用いて行なった。検出には UV (254 nm), ニンヒドリン試薬(0.3% acetone 溶液), 0.1 M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-酢酸(1:1, v/v)と 0.1 M AgNO<sub>3</sub>溶液から成るフェニルシステイン検出試薬を用いた。

b) <sup>1</sup>H-NMR:試料を重水(D, 99.96%)に溶かし内部標準物質として tetramethylsilane(TMS)を加え、室温で測定した。機種は JEOL GSX-500 FT-NMRスペクトロメーターを使用した。

c) FAB-mass:機種は JEOL JMA-3500 データーシステムを付けた JEOL JMS-DX300 二重収束質量分析計を使用した。

#### (16) Horseradish peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による3-OH·SA とGSH との結合反応

標準のインキュベーション混液は、全量 3 ml 中に 0.4 mM 3-OH·SA, 0.8 mM GSH, 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.6 units horseradish peroxidaseおよび 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.4)から構成された。反応は 25 °C, 5分間でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加によって開始し-50°Cで急速に冷却して停止された。ミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した反応液の一定量(10  $\mu$ l)をただちにHPLCで測定した。HPLCによる測定は、カラムに  $\mu$ Bondasphere C<sub>18</sub>(5 $\mu$ -100 Å, 3.9 × 150 mm Waters)を用い、溶媒に buffer(50mM Triethylamine を酢酸で pH 6.0 に調製したもの)-MeOH(98:2, v/v)を用いて行なった。また、流速は0.7 ml/minで、検出器の感度は 0.01-0.02で行なった。結合体の生成量は別個に求めた標準曲線より算出した。

#### (17) Microsomes/butylhydroperoxide による3-OH·SA とGSH との結合反応

標準のインキュベーション混液は、全量 1 ml 中に1 mgラット肝ミクロゾーム(1 mg protein), 0.4 mM 3-OH·SA, 0.8 mM GSH, 0.1 mM butylhydroperoxide および 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.4)から構成された。反応は butylhydroperoxideの添加で開始され、37°C, 20分間行なわれた。AcOEt 4 mlを加えて反応

を停止させ、5 分間振盪抽出し未反応の3-OH-SA を除去した。残存した水層をミリポアフィルターで濾過し、濾液の一定量(10  $\mu$ l) を実験の部(16)と同様の測定条件でHPLCを行なった。

#### (18) Phenacetin N- 水酸化活性の測定

インキュベーション混液は、肝臓、腎臓ミクロゾーム(6 mg protein), 0.1 M Na, K-phosphate buffer(pH 7.4), 6  $\mu$ mol NADPH, 300  $\mu$ mol KF, 9  $\mu$ mol KF を含み、全量3.0 mlから構成された。インキュベーションは、37  $^{\circ}$ Cで20分間好氣的条件下で行ない、AcOEt 5 mlによって停止させると同時に基質と生成物をAcOEtで抽出した。AcOEt層は窒素気流下で濃縮し、残渣をMeOH 100  $\mu$ l に溶かし、HPLCに注入した。カラムは順相ラジアルバックCNカラムで溶媒は1 mM FeCl<sub>3</sub>-1%酢酸-20% ジメチルスルホキサイドを含むMeOHを用いた。流速は1 ml/minで、検出は波長 546 nmで行なった。N-hydroxyphenacetin の生成量は標準曲線から、ピークの高さを測定することによって計算した。

#### (19) Phenacetinの代謝活性

a) Phenacetin 脱エチル化活性—インキュベーション混液は肝あるいは腎ミクロゾーム(6 mg protein)、0.1 M Na, K-phosphate buffer(pH7.4), 6  $\mu$ mol NADPH, 3  $\mu$ mol ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 30  $\mu$ mol MgCl<sub>2</sub>, 6  $\mu$ mol phenacetin を含む全量 3.0 ml から構成された。インキュベーションは37 $^{\circ}$ C, 20分間好氣的条件下で行ない、AcOEt 5 mlで反応停止と同時に抽出を行なった。AcOEt層は窒素気流下で濃縮し、残渣をMeOH 0.1 ml に溶かし、その10  $\mu$ lを HPLC 分析に用いた。カラムは Radial Pak C<sub>18</sub> を用い、溶媒は 0.1 M Na, K-phosphate buffer(pH 7.4) - MeOH (6:4, v/v) を流速 1 ml/min で溶出した。

b) Phenacetin 脱アセチル化活性—インキュベーション混液は、肝あるいは腎ミクロゾーム(6 mg protein), 0.1 M Na, K-phosphate buffer(pH7.4), 6  $\mu$ mol NADPH, 3  $\mu$ mol EDTA, 30  $\mu$ mol MgCl<sub>2</sub>, 6  $\mu$ mol phenacetinを含む全量3.0 mlから構成された。インキュベーションは、37 $^{\circ}$ C, 20分間好氣的条件下で行ない、1.0 N NaOH 0.1 ml と AcOEt 5.0 ml の添加で反応を停止させた。HPLC分析はphenacetin脱エチル化活性の測定に用いた場合と同じ溶媒で、ただし流速 2.0 ml/minで検出器の感度は 0.005で行なった。

c) p-Phenetidine脱エチル化活性—インキュベーション混液は、肝あるいは

腎ミクロゾーム(3 mg protein), 0.1 M Na, K-phosphate buffer(pH7.4), 3  $\mu$ mol NADPH, 3  $\mu$ mol EDTA, 3  $\mu$ mol p-phenetidine-HCl塩を含む全量3.0 mlから構成された。インキュベーションは、37 $^{\circ}$ C 20 分間好氣的条件下で行ない、20 % trichloroacetic acid の1 mlの添加で反応を停止させ、除タンパクを行なった。HPLCの分析のため、Carpenter らの方法<sup>83</sup>によって p-aminophenolを p-hydroxylbutyranilideに転換した。すなわち、上清 1 ml と2 mlの 0.1 M Na, K-phosphate buffer(pH7.4) の溶液に50  $\mu$ l の n-butyric anhydrideを加えた。その溶液を直ちに攪拌し、室温で 1時間放置した。反応液を前もって活性化し、洗浄した C<sub>18</sub> Sep Pak (Waters Associates Inc.) を通過させ、スピッツを 3-4 mlの水で2回ゆすぎ、その水はSep Pak を通過させた。p-hydroxybutyranilide を 4 ml の MeOH で溶出させ、溶媒を蒸発乾固後、残渣を 0.1 N NaOH と 0.1 ml の 1M 酢酸に溶解した。HPLCは MeOH -H<sub>2</sub>O(1:1, v/v)を 1 ml/min の流速でRadial Pak C<sub>18</sub>カラムを用いて行なった。

d) Acetaminophen脱アセチル化活性—インキュベーション混液は、肝あるいは腎 9000 xg上清の1ml、0.1 M Na, K-phosphate buffer(pH7.4), 30  $\mu$ mol MgCl<sub>2</sub>, 9  $\mu$ mol acetaminophen を含む全量3.0ml から構成された。インキュベーションは37  $^{\circ}$ C, 60分間好氣的条件下で行ない、20 % trichloroacetic acid 1 mlを加えて反応を停止させた。acetaminophenから生成した p-aminophenol を測定するために、butyryl 化とHPLC分析は p-phenetidineから p-aminophenol への脱アセチル化反応で用いられた方法と同じ方法で行なった。

#### (20) 腎毒性指標の検討

腎障害惹起の有無を調べるために、Wistar系雄性ラット(体重 150- 200 g)に薬物を 1-3 mmol/kg、腹腔内あるいは経口投与後、代謝ケージに入れ、24時間尿を集めた。尿中タンパク量は一部 Folin-Lowry法<sup>86</sup>で、一部燐タングステン酸で沈殿させた後、その沈殿物をアルカリで溶解しビュレット法<sup>84</sup>で測定した。尿中 creatinine はJaffe 反応<sup>85</sup>で、尿中酵素である N-acetylglucosaminidase (NAG) は蛍光法<sup>86</sup>で、alkaline phosphatase活性はKind-King 法<sup>87</sup>で測定した。一方、別にラットをエーテル麻酔下眼穿刺法により採血し、血清尿素窒素(BUN)をurease-indophenol 法<sup>88</sup>で測定した。さらに、腎障害の有無を光学顕微鏡を用いた組織学的方法とNAG 活性による酵素化学的方法は常法<sup>89, 90</sup>に従って検討した。

(21) Horseradish peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による p-aminophenolとGSH との結合反応

標準のインキュベーション混液は、全量 3 ml 中に 0.4 mM p-aminophenol, 0.8 mM GSH, 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.3 units horseradish peroxidase および 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) から構成された。反応は 25 °C、1 分間でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加によって開始し、-50°Cで急速に冷却して停止させた。以下、抽出操作およびHPLCの測定条件は実験の部(16)と同様の方法で行なった。結合体の生成量は別個に求めた標準曲線より算出した。

(22) Microsomes/cumenehydroperoxide, butylhydroperoxideによる p-aminophenol とGSH およびCYS と結合反応

標準のインキュベーション混液は、全量 1 ml 中に 1 mg ラット肝および腎ミクロゾーム (1 mg protein), 0.4 mM p-aminophenol, 0.8 mM GSH, 0.1 mM cumenehydroperoxide および 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4)から構成された。反応はcumenehydroperoxide の添加で開始され、37°C, 20分間行なわれた。AcOEt 4 mlを加えて反応を停止させ、5 分間振盪抽出し未反応の p-aminophenol を除去した。残存した水層をミリポアフィルターで濾過し、濾液の一定量(10 μl)をHPLCで分析した。なおp-aminophenol とCYS との結合体生成反応の場合、cumenehydroperoxideの代わりにbutylhydroperoxideを用いた以外は、GSH と同様に行なった。

(23) p-Aminophenol とGSH および CYSとの結合体の酵素合成、精製 および同定

p-aminophenol-GSH およびp-aminophenol-CYS結合体を単離するために実験の部(21)に記載したインキュベーション混液の 100倍スケールで反応を行なった。すなわち、反応混液は0.4 mM PAP, 0.8 mM GSH(あるいは0.8 mM CYS), 0.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および 300 units horseradish peroxidase からなり、0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4)で全量300 mlとし、反応をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の添加で開始し、30°C, 10分間行なった。以下、抽出操作およびHPLCによる測定は実験の部(15)と同様の方法で行なった。反応をAcOEt 300 mlの添加で停止し、水層は分離後、-50 °Cで凍結乾燥した。残渣を少量の水に溶かし、分取用カラム μBondasphere C<sub>18</sub>(5 μ-100 Å, 19×350 mm Waters)でp-aminophenol-GSH およびp-aminophenol-CYS結合体を分取

し、精製を行なった。構造解析は実験の部(15)と同様 TLC, UV, FAB-massスペクトルおよび <sup>1</sup>H-NMR スペクトルによって行なった。

(機器)

酵素標品の調製はトミー冷却遠心機 model PB-18 II およびベックマン L8M 分離用超遠心機を使用した。またHPLCはWaters液体クロマトグラフ(6000A 型ポンプ, 440 型検出器, U6K 注入器) および島津 SPD-6AVを使用した。アミノ酸分析はオルトフタルアルデヒド法に日立655 型(蛍光モニター付)液体クロマトグラフを、ニンヒドリン法にJEOL TLC 200A アミノ酸分析計を使用した。酵素タンパク量, 尿中タンパク量, クレアチニン量, BUN 量, アルカリフォスファターゼ活性, スルフォトランスフェラーゼ活性などは 日立 228分光光度計で測定した。分光蛍光光度計は日立 MPF-3型を使用した。組織学的検討は Nikon光学顕微鏡およびヤマトミクロトームを用いた。

(7)\* 一方、4-HABSA-アセチル化活性の測定の場合、インキュベーション混液は、肝あるいは腎 105,000×g 上清(4 mg protein), 0.5 mM acetyl CoA, 0.4 mM 4-HABSA, 0.1 M Na, K-phosphate buffer (pH 6.8)を含む全量1.0 mlから構成された。37°C, 20分間反応後 AcOEt 5 ml で反応を停止させた。以下の操作は(7)に記載したN<sup>4</sup>-Acetylsulfanilamide N-水酸化活性の測定と同一条件で4-HABSAの定量を行なった。

文 献

- 1 ) J.R. DeBaun, E.C. Miller and J.A. Miller: *Cancer Res.*, 30, 577, 1970.
- 2 ) C.M. King and B. Phillips: *Science*, 159, 1351, 1968.
- 3 ) I.B. Weinstein, A.M. Jeffery, K.W. Jennette, S.H. Blobstein, R.G. Harvey, C. Harris, H. Autrup, H. Kasai and K. Nakanishi: *Science*, 193, 592, 1976.
- 4 ) J.A. Miller and E.C. Miller: *Federation Proc.*, 35, 1316, 1976.
- 5 ) 多田 満彦: 4- ニトロキノリン1-オキシドの代謝と発癌, *代謝*, 14, 529, 1977.
- 6 ) T. Watabe, T. Ishizuka, M. Isobe and N. Ozawa: *Science*, 215, 403, 1982.
- 7 ) P. Eyer: *Chem.-Biol. Interact.*, 24, 227, 1979.
- 8 ) B. Dölle, W. Töpner and H.G. Neumann: *Xenobiotica*, 10, 527, 1980.
- 9 ) G.J. Mulder, L.E. Unruh, F.E. Evance, B. Ketterer and F.F. Kadluber: *Chem.-Biol. Interact.*, 39, 111, 1982.
- 10 ) K. Landsteiner and H. Lample: *Z. Immunitätsforsch.*, 26, 293, 1917.
- 11 ) K. Landsteiner and J. Jacobs: *J. Exp. Med.*, 64, 625, 1936.
- 12 ) 山村雄一, 石坂公成, 北川正保, 尾上 薫編集: "免疫化学", 朝倉書店, 東京, 1973, pp 334-365.
- 13 ) B.B. Levine and Z. Ovary: *J. Exp. Med.*, 114, 875, 1961.
- 14 ) H.N. Eisen and S. Belman: *J. Exp. Med.*, 98, 533, 1953.
- 15 ) 真下 啓明, 堀内 淑彦, 柴田 皓示: *日本臨床*, 28(8), 1578, 1965.
- 16 ) Y. Horiuchi and K. Shibata: *Int. Arch. Allergy*, 28(6), 306, 1965.
- 17 ) 大城 昌子: *アレルギー*, 19, 585, 1970.

- 18 ) H. Shimeno and H. Yoshimura: *Xenobiotica*, 2, 461, 1972.
- 19 ) S. Spector and E.J. Flynn: *Science*, 174, 1036, 1971.
- 20 ) A. Chung, S.Y. Kim, L.T. Cheng and A. Castro: *Experientia*, 29, 820, 1973.
- 21 ) H. Satoh, K. Kuroiwa and A. Hamada: *Biochem.*, 73, 1115, 1973.
- 22 ) K. Schwarz and M. Speck: *Dermatologica*, 114, 232, 1957.
- 23 ) P.K. Thauer, G. Stoffler and H. Uehleke: *Arch. Exp. Path. u. Pharmak.*, 252, 32, 1965.
- 24 ) S.M. Rosenthal and H. Bauer: *Pub. Health Reports*, 54, 1880, 1939.
- 25 ) L.E. Shinn, E.R. Main and R.R. Mellon: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 42, 736, 1939.
- 26 ) W. Fries, M. Kiese and W. Lenk: *Xenobiotica*, 1, 241, 1971.
- 27 ) L.F. Prescott: *The Lancet*, 17, 91, 1965.
- 28 ) K.G. Koutsaimanis and H.E. Wardener: *Br. Med. J.*, 4, 131, 1970.
- 29 ) T. Murray and M. Goldberg: *Am. Rev. Med.*, 26, 537, 1975.
- 30 ) W. Roob, R. Krammar and C. Moerth: *The Enzymes*, 21, 76, 1976.
- 31 ) R.H. Heptinstall: "Pathology of the Kidney", Vol. II, ed. by R.H. Heptinstall, Little, Brown and Company, Boston, 1974, pp.821-836.
- 32 ) J.R. Curtis: *Br. Med. J.*, 2, 242, 1977.
- 33 ) Y. Nagase, S. Baba and K. Kunihiro: *J. Hyg. Chem.(Japan)*, 12, 343, 1966.
- 34 ) 安田守雄著: "栄養学要綱", 医歯薬出版(株), 東京, 1969, p 148.
- 35 ) R.T. Williams: "Detoxication Mechanisms," Chapman and Hall, Ltd., London, 1959, pp.489-518.
- 36 ) R.T. Williams: *Biochem. J.*, 40, 219, 1946.
- 37 ) M.L. Crossley, E.H. Northey and M.E. Hultquist: *J. Am.Chem. Soc.*, 61, 2950, 1939.

- 38) E. Miller, H.J. Peck and M.L. Moore: *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 1198, 1939
- 39) W.V. Thorpe and R.T. Williams: *Biochem. J.*, 35, 61, 1941.
- 40) 山本 郁男, 絵柳 玲子, 藤田 賢一郎, 福永 正代, 立川 保子, 吉田 和夫: 第一薬科大学研究年報, 第 1号, 9, 1971.
- 41) H. Bauer and S.M. Rosenthal: *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 611, 1944.
- 42) R.T. Williams: *Biochem. J.*, 41, 1, 1947.
- 43) M.K. Seikel: *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 1214, 1940.
- 44) K.A. Evelyn and H.T. Malloy: *J. Biol. Chem.*, 126, 655, 1938.
- 45) R. Eyanagi, H. Shigematsu, K. Yoshida and H. Yoshimura: *J. Pharm. Dyn.*, 5, 853, 1982.
- 46) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- 47) T. Omura and R. Satoh: *J. Biol. Chem.*, 239, 2370, 1964.
- 48) M. Cirstea, M. Cirje, G.H. Suhaciu, G. Petec, A. Vacariu and M. Mihaileanu: *Rev. Roum. Morphol. Embryol. Physiol. Physiol.* 18, 175, 1982
- 49) E.C. Miller, J.A. Miller and A. Martmann: *Cancer Res.*, 21, 815, 1961.
- 50) 絵柳玲子, 久成由起子, 重松秀成, 吉田和夫: 皮膚, 31, 増刊第6号, 164, 1989.
- 51) I. Yamamoto and R. Eyanagi: *Int. Arch. Allergy and Appl. Immun.*, 54, 538, 1977.
- 52) 山本郁男, 絵柳玲子, 吉田和夫: 第 9回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム(熊本)講演要旨集, 1977, p 133 .
- 53) A. Grisk: "薬剤アレルギーの診断," W. ラープ, H. クライゾルゲ編, 青木 利彦訳, 岩崎学術出版社, 東京, 1973, pp 37-45.
- 54) 大島良雄, 岡林 篤, 小堀 辰治, 進藤 宙二編集: "臨床アレルギー学", 朝倉書店, 東京, 1967, pp 500-510.
- 55) 村田 仁: 日本皮膚科学会雑誌, 79, 357, 1967.
- 56) 絵柳 玲子, 吉田 和夫, 山本 郁男: 薬学雑誌, 99, 458, 1979.

- 57) A.L. De Weck and H.N. Eisen: *J. Exp. Med.*, 112, 1227, 1960.
- 58) J. T. Queny, C.D. Duckes and J.P. McGovern: *J. Allergy*, 36, 505, 1965.
- 59) T. Juji and T. Matsushashi: *Japan. J. Exp. Med.*, 39, 21, 1969.
- 60) 内貫 正治: "医化学実験法講座 4 免疫化学", 中山書店, 東京., 1972, pp 29-42.
- 61) 木村 一郎: "免疫学・アレルギー学実験法", 進藤 宙二監修, 文光堂, 東京, 1971, pp 249-272.
- 62) W.J. Herbert: "Handbook of Experimental Immunology", 2nd Ed. by D.M. Weir, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973, pp 20.1-20.20.
- 63) C.E. Arbesmann, N.R. Rose, S.Z. Kantor and R.B. Beed: *J. Allergy*, 31, 317, 1960.
- 64) H. Frankel-Conrat and R.R. Porter: *Biophys. Acta*, 9, 557, 1952.
- 65) G.J. Mulder, J.A. Hinson and J.M. Gillette: *Biochem. Pharmacol.*, 26, 189, 1977.
- 66) G.L. Ellman: *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70, 1959.
- 67) R. Eyanagi, H. Shigematsu, K. Yoshida and H. Yoshimura: *J. Pharmacobio- Dyn.*, 8, 95, 1985.
- 68) J.A. Hinson, S.D. Nelson and J.R. Gillette: *Mol. Pharmacol.*, 15, 419, 1987.
- 69) I.C. Calder, M.J. Creek, P.J. Williams, C.C. Funder, C.R. Green, K.N. Ham and J.D. Tange: *J. Med. Chem.*, 16, 499, 1973.
- 70) B.B. Brodie and J. Axelrod: *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 97, 58, 1949.
- 71) D.C. Dahlin and S.D. Nelson: *J. Med. Chem.*, 25, 885, 1982.
- 72) G.B. Corcoran, J.R. Mitchell, Y.N. Vaishnav and E.C. Horning: *Mol. Pharmacol.*, 18, 536, 1980.
- 73) I.C. Calder, C.C. Funder, C.R. Green, K.N. Ham and J.D. Tange: *Br. Med. J.*, 4, 518, 1971.

- 74) C.R. Green, K.N. Ham and J.D. Tange: *Br. Med. J.*, 1, 162, 1969.
- 75) C.A. Crowe, I.C. Calder, N.P. Madsen, C.C. Funder, C.R. Green, K.N. Ham and J.D. Tange: *Xenobiotica*, 7, 345, 1977.
- 76) I.C. Calder, P.J. Williams, R.A. Woods, C.C. Funder, C.R. Green, K.N. Ham and J.D. Tange: *Xenobiotica*, 5, 303, 1975.
- 77) H. Yoshimura, N. Ozawa and S. Saeki: *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 1215, 1978.
- 78) H. Yoshimura, S. Yoshihara, N. Ozawa and M. Miki: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 320, 179, 1979.
- 79) 吉原 新一, 吉村 英敏: "環境汚染物質と毒性 有機物質編", 化学の領域 増刊, 129号, 南江堂, 1980, pp 57-68.
- 80) R. Eyanagi, Y. Hisanari and H. Shigematsu, *Xenobiotica*, in press, 1991.
- 81) S. Saeki, S. Yoshihara, Y. Uchino and H. Yoshimura: *Fukuoka Acta, Med.*, 70, 85, 1979.
- 82) I. Yamamoto, R. Eyanagi, K. Yoshida and A. Yamamoto: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 21, 757, 1973.
- 83) H. M. Carpenter and G. H. Mudge: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 218, 161, 1981.
- 84) E.W. Rice: *Clin. Chem.*, 21(3), 398, 1975.
- 85) R.W. Bonsnes and H.E. Taussky: *J. Biol. Chem.*, 158, 581, 1945.
- 86) D.H. Leaback and P.G. Walker: *Biochem. J.*, 78, 151, 1961.
- 87) P.R.N. Kind and E.J. King: *J. Clin. Pathol.*, 7, 322, 1954.
- 88) L.K. Fawcett and E. Scott: *J. Clin. Pathol.*, 13, 156, 1960.
- 89) 三友 善夫, 高山 昇二郎: "臨床検査講座 12 病理学", 医歯薬出版, 東京, 1978, pp 157-296.
- 90) 武内 忠男, 清水 信夫, 小川 和郎: "酵素組織化学", 朝倉書店, 東京, 1967, pp 288-359.

