

アミノアゾ色素の代謝活性化と変異原性
並びに発癌性との相関性に関する研究

1983

木村 晃之

目 次

序 論	-----	1
第 1 章 アミノアゾ色素の代謝活性化速度と発癌性 の強さとの相関	-----	5
第 1 節 3'-Methyl-4-methylaminoazobenzene の N 位水酸化速度の測定及びその基礎的 条件の検討	-----	7
第 2 節 4-Methylaminoazobenzene 誘導体の合成	-----	21
第 3 節 アミノアゾ色素の代謝活性化速度と発癌 性の強さとの相関	-----	24
第 4 節 アミノアゾ色素の変異原性と発癌性との 相関	-----	32
第 2 章 3'-Methyl-4-methylaminoazobenzene の N 位水酸化に關与する酵素の同定	-----	37
第 1 節 Microsome での N 位水酸化酵素に對す る各種薬劑の影響	-----	39
第 2 節 部分精製した mixed function amine oxidase に對する阻害効果	-----	50

第3章	Mixed function amine oxidase の精製と	
	アミノアゾ色素の代謝	----- 59
第1節	Mixed function amine oxidase の精製	----- 60
第2節	Mixed function amine oxidase による	
	^{14}C -4-dimethylamino azobenzene	
	及び ^{14}C -4-methylaminoazobenzene	
	の代謝	----- 74
第4章	各種抗体によるN位水酸化及び変異原性に	
	対する影響	----- 87
第1節	N位水酸化活性に対する影響	----- 88
第2節	変異原性に対する影響	-----100
第5章	結 論	-----105
謝 辞		-----106
文 献		-----109

序 論

癌の原因としては、化学物質、ウイルス、放射線、日光等の存在が広く知られているが、疫学調査の結果、人間の癌の80%以上が化学物質に起因していると推定されている。

アミノアゾ色素は肝癌を誘発する事で有名な化合物であり、この色素の発癌性の研究は1906年のFischer¹⁾の研究までさかのぼらなければならぬ。彼はウサギの耳にスカーレットレッドを投与する事により、上皮細胞の異型性増殖を誘発させた。しかし、これは真の癌細胞ではなく、スカーレットレッドを除くと消失してしまつた。続いて1924年Schmidt²⁾はスカーレットレッドを経口投与し、肝臓の細胞の過形成を報告しているが、これも癌細胞ではなかつた。さらに1935年佐々木と吉田³⁾はスカーレットレッドの分子の一部である2', 3-dimethyl-4-aminoazobenzene (o-aminoazotoluene, OAT) の経口投与により肝癌の誘発に初めて成功した。1936年木下⁴⁾は4-dimethyl aminoazobenzene (DAB) がOATよりも強い発癌剤である事を示した。

DABのラットにおけるin vivoの代謝を尿中排泄で調べたところ、その大部分はアゾ基の還元的開裂により得られるp-フェニレンジアミン及びp-アミノフェノールの抱合体である⁵⁾。この代謝体は酸により加水分解を受け⁶⁾、これは後にN-アセチル誘導体と判明した^{7) 8)}。p-フェニレンジアミン及びp-アミノフェノールが尿中に排泄される事は、DABがN位脱メチル化、アゾ還元、ベンゼン環の水酸化が起っている事を示している。さらに少量のp-フェニレンジアミンのN-メチル誘

導体及びアニリンも検出される。これら3種類の反応の内、N位脱メチル化反応が一般には先行して起る⁹⁾。さらに微量の4'-hydroxy-4-methylaminoazobenzene (4'-OH-MAB)、及び4'-hydroxy-4-aminoazobenzene (4'-OH-AB)が尿中より検出された¹⁰⁾。一方、MuellerとMiller¹¹⁾は肝のホモジネートを用い、4'-hydroxy-4-dimethylaminoazobenzene (4'-OH-DAB)を検出した。これら代謝体のうちいずれが発癌に重要であるかが調べられた。DABの発癌性はリボフラビン^{12) 13)}や銅イオン^{14) 15)}の経口投与により抑制され、これは肝のアゾ還元酵素活性の上昇によると考えられた^{16) 17)}。これはさらに還元生成物であるp-フェニレンジアミンやp-アミノフェノールによる発癌実験により確かめられた¹⁸⁾。DABの活性型代謝産物の同定はMillerとMiller^{19) 20)}の実験によるところが大きい。彼等はDABを投与したラットから取り出した肝の蛋白質を酸性溶液に懸濁するとピンク色になり、アルカリ溶液では淡黄色になる事から、この蛋白質にはアゾ色素が結合している事を示し、発癌性における重要性を示した。この色素と蛋白質との結合体をアルカリ分解、もしくは、蛋白分解酵素で処理したところ、メチオニンまたはチロシンとアゾ色素のアミノ基のオルト位²¹⁾、またはアミノ基のメチル基²²⁾を介して結合している事がわかった。

アミノアゾ色素は蛋白質との結合が証明された最初の発癌剤である。蛋白質への結合によって癌化が起る機構についてはPitot-Heidelberger²³⁾のサーキット理論がある。これによると、Jacob-Monod²⁴⁾のスキームを基礎にして発癌剤のリプレッサーへの結合によって蛋白質の誘導ある

いは停止が不可逆的に起る事が合理的に説明できた。しかし、仮説としてこれが考えられるとしても、実際には発癌剤と蛋白質との結合と発癌との関係は明確ではない。一方、neoplastic transformation は somatic cell mutation によるという仮説を Bauer²⁵⁾ は提唱した。これは核酸の一次構造の変化をとともなうので、一般に neoplastic transformation が不可逆的である事実を説明しやすいという優位な点を持つ。さらに近年になり、微生物による mutation は発癌性と定性的に correlate する事から^{26) 27) 28)}、核酸との結合が重要であると考えられる様になってきた。しかしながら、DAB の結合の大部分は蛋白質であり、核酸との結合は 1963 年の Marroquin と Farber²⁹⁾ に待たなければならなかった。彼等は¹⁴C で標識された DAB を経口投与し、肝の RNA に放射活性がある事を示した。

2-Acetylaminofluorene 等のアミン類の活性化体が N 位水酸化体である事^{30) ~35)}、4-methylaminoazobenzene (MAB) には発癌性があるのに、4-aminoazobenzene (AB) には発癌性がない事から¹⁸⁾、MAB の N 位水酸化体が結合に関与すると考えられたが、合成は容易ではなかった。そこで Poirier 等³⁶⁾ は N-benzoyloxy-MAB が in vivo で発癌性のある代謝物に変化すると仮定して、この化合物を合成し、その発癌性を検討したところ、N-benzoyloxy-MAB は発癌性を有し、in vitro で蛋白質及び核酸に結合する事がわかった。これにより、in vivo では MAB の N 位水酸化で生成した N-hydroxy-MAB (N-OH-MAB) の硫酸等の抱合体がアミノアゾ色素の究極的な活性体であると考えられた。つづいて MAB の N 位水酸化体の合成が橋本等³⁷⁾、

Kadlubar 等³⁸⁾ 2つの group により可能となり、in vitro で N-OH-MAB が sulfotransferase により活性化を受ける事を証明し³⁹⁾、アミノアゾ色素の活性化経路を明らかにした。さらに近年になり、N-benzoyloxy-MAB の in vitro 及び MAB の in vivo の核酸との結合の詳細が研究され、guanine の 8 位及び N² とアミノアゾ色素のアミノ基及び 3 位での結合^{40) 41)}、及び adenosine の N⁶ とアミノアゾ色素の 3 位での結合⁴²⁾ が証明された。

以上述べたように、発癌実験から始ったアミノアゾ色素の活性化、生体高分子との反応機構はしだいに解明されつつあるが、アミノアゾ色素の発癌に関して、どのような因子がその強弱を決定しているのかについては不明のまま残されており、これを明らかにする事は化学発癌剤の活性化機構を知る上で重要と考えられる。これを調べるには、発癌性が定量的に比較されている一群の発癌剤が存在する必要があるが、この点に関し、アミノアゾ色素は発癌性の強さが定量的にわかっている多くの prime ring の誘導体が存在するため¹⁸⁾、活性化速度と発癌性の強さとの比較が容易である。

そこで本論文においては、代謝速度と発癌性との相関性を示す代謝経路を明らかにし、そこでの代謝活性化に関与する酵素の同定と定量を行った。さらに発癌性と変異原性との関係を代謝経路と関連して考えてみることにする。

第1章 アミノアゾ色素の代謝活性化速度と
発癌性の強さとの相関

第 1 章 アミノアゾ色素の代謝速度と発癌性の強さとの 相関

薬品がその薬理効果を表わす場合、その薬効を左右する因子として、吸収、代謝、排泄が考えられる。特に薬品の代謝が薬効の持続に重要な役割を持つ事は明らかである⁴³⁾。一方、発癌剤についても、その発癌性の強弱を決定する因子として、代謝は重要であると考えられる。

Benzo[a]pyrene (B(a)P)^{44) 45)}、aflatoxin B⁴⁶⁾、acetylaminofluorene^{47) 48)}、naphthylamine^{49) 50)}、DAB等多くの発癌剤が活性を発現するためには代謝活性化を受けなければならない。しかし、これら化合物は投与されたもののすべてが活性化されるわけではなく、代謝経路の大部分は不活性化に参与している事は良く知られている。

DABの代謝活性化経路は、DABのN位脱メチル化によるMABの生成、MABからのN位水酸化によるN-OH-MABの生成、N-OH-MABの硫酸抱合により活性化される一方、DAB、MABのprime ringの水酸化、azo還元、MABからのN位脱メチル化等、多くの不活性化経路が存在する。これら代謝経路の内、どの代謝経路が発癌性の強弱を決定しているかについてはまだ良くわかっていなかった。しかしながら、この活性化経路でできる生成体のうちN-OH-MABは極めて不安定な為に、microsomeを用いた実験系で検出された例はなかった。一方、acetylaminofluorene^{51) 52)}、naphthylamine⁵³⁾、4-nitroquinoline N-oxide⁵⁴⁾の様な発癌剤のN位水酸化体はfree radicalとして検出が可能であり、さらにB(a)Pの代謝体である6-

hydroxy - B(a)P⁵⁵⁾ のように不安定で通常行われる方法では検出困難な代謝体も free radical として ESR で検出可能である。これらの事から、MAB の場合も同様に free radical として検出されるのではないかと予想された。そこで microsome 系での free radical 生成を調べ、これによって N 位水酸化速度を定量して、発癌性との相関性を検討した。

第1節 3'-Methyl-4-methylaminoazobenzene のN位水酸化
速度の測定及びその基礎的条件の検討

M A B 及びその誘導体のN位水酸化速度は現在までmicrosome 系について直接測定された例はない。これはN-OH-M A B が極めて不安定なことによると考えられる。Kadlubar 等³⁸⁾はmicrosome 系については、N-OH-M A B の分解産物であるN-OH-A B を定量し、これより二級アミンのN位水酸化速度を求めた。しかしながらN-OH-A B は上記の経路のほか、M A B より酵素的に生成する別の経路がある。すなわちM A B のN位脱メチル化によるA B の生成と、ひき続き起るN位の水酸化の経路があり、その為、正確なM A B のN位水酸化速度の定量は不可能である。そこでまず種々の誘導体にも適用できるmicrosome 系でのN位水酸化速度の定量法を確立した。

〔方法〕 microsome の調整 Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重110~120g、5週令)に3-methylcholanthrene (MC) を20mg/kg、腹腔内に1回投与し、24時間絶食後、後頭部打撲により失神させ、頸静脈より瀉血した。瀉血後腹部を切開し下行大静脈より氷冷した1.15% KCl 溶液にて還流を行いよく血液を除いて肝を得た。これを1.15% KCl含有50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) でhomogenizeし、9,000gで20分間遠心分離した。遠心分離後その上清を105,000gで60分間超遠心分離を行い、その沈澱をさらに上記bufferで良く洗った後に-75℃で保存し、microsomeとして用いた。なおMCで誘導して得たmicrosomeは以後MC microsomeと

記す。蛋白定量はLowry等⁵⁶⁾の方法に従った。

Microsome よりの free radical 測定法 基質濃度は 10^{-4} Mとし、50 mlの50 mM Tris-HCl buffer (pH7.5)でmicrosome, NADPH, 3mM $MgCl_2$ と37℃で10分間加温した後、50 mlのbenzeneで2回抽出し、真空中で乾燥した。これを0.4 mlのbenzeneに溶解し、直径5 mmの石英試料管に入れ、日本電子製JES-3BX ESR spectrometerで測定した。定量はradicalのpeakとtroughの差を Mn^{2+} との比として求めた。これはシグナルの積分値から得たスピン密度に比例した。

N-OH-MAB及びN-OH-ABの合成 N-OH-MABはN-benzoyloxy-MABをPoirier等⁵⁶⁾の方法で合成した後、出川と橋本⁵⁷⁾の方法により、KOHで加水分解して得た。N-OH-ABはSato等⁵⁸⁾の方法によりnitroazobenzeneを合成し、ascorbic acidで還元して得た。

〔結果〕 3'-Me-DAB及び3'-Me-MABをMC microsomeと加温して得られたfree radicalはbenzene中で6本のhyperfine structureを示した(Fig 1-1)。これは3'-Me-DABを用いた場合よりも3'-Me-MABを基質とした場合の方が、その強度は強かった。この6本のhyperfine structureはNとHのZeeman効果を基礎に次のように解析した。すなわち、まずNで分裂した3本線がアミノ基に結合しているメチル基の3個のHにより分裂して1:4:7:7:4:1

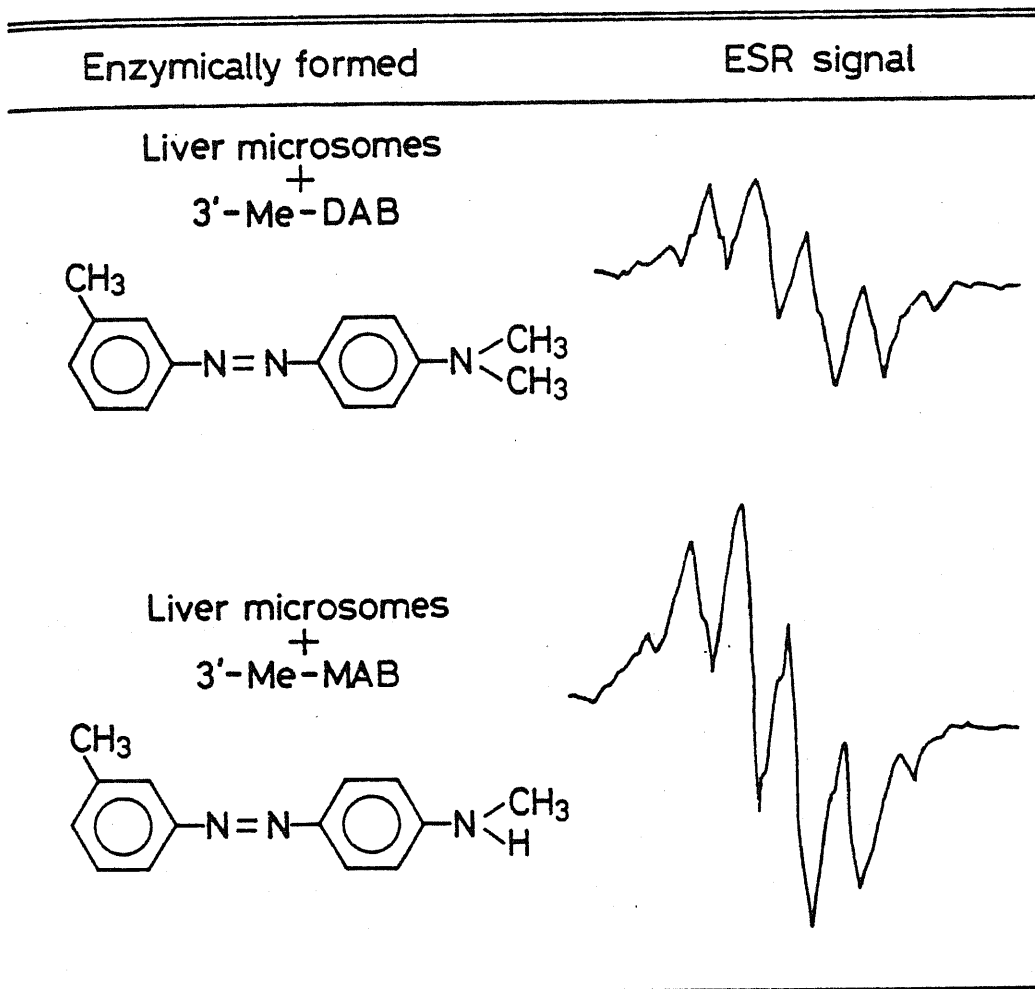


Figure 1-1. Enzymatic formation of free radical from 3'-Me-DAB and 3'-Me-MAB.

の6本線に分裂したものと考えられた (Fig1-2)。一方、3'-Me-MABより生成すると考えられるN-OH-ABはZeeman効果により、Nで分裂した3本線がアミノ基のHにより分裂して1:2:2:1の4

本線に分裂すると考えられた。この解析の妥当性は intermediate neglect differential overlapping (INDO) molecular orbital 法を用いて spin coupling を計算して simulation を行って (Fig 1-3) 確かめた。一方、N-OH-AB 及び N-OH-MAB を合成し、これを benzene に溶かして得られる free radical のシグナルと全く一致することにより確認した (Fig 1-4)。以上の結果、3'-Me-DAB 及び 3'-Me-MAB より得られた free radical は N-OH-3'-Me-MAB と同定できた。さらに N-OH-MAB の peak 強度は N-OH-AB の約 4 倍であった。また、nitrosoazobenzene は強い 3 本線を示すが、代謝では得られなかった。

この free radical は Fig 1-5 に示すように microsome にさらに 105,000 倍の上清画分、5 mM ATP、2 mM Na₂SO₄ を添加して上清の sulfotransferase を活性化した場合、その peak 強度は減少し、上清画分を除くと回復する。また上清画分に 5 mM ATP、2 mM Na₂SO₄ を加え microsome と別に反応させ、後で加えても、ほとんど影響がない。

この free radical は microsome より NADPH を除くと生成せず、60℃で10分間 microsome を加熱した場合生成しない。また光の irradiation によっても生成しない (Fig 1-6)。

以上の様に microsome での MAB の N 位水酸化体が測定可能となったので、この詳細な反応条件を検討した。蛋白量は Fig 1-7 に見られるように、3'-Me-DAB を基質にした場合には、MC microsome では 0.2 mg/ml 程度まで linearity が存在する。一方、3'-Me-MAB

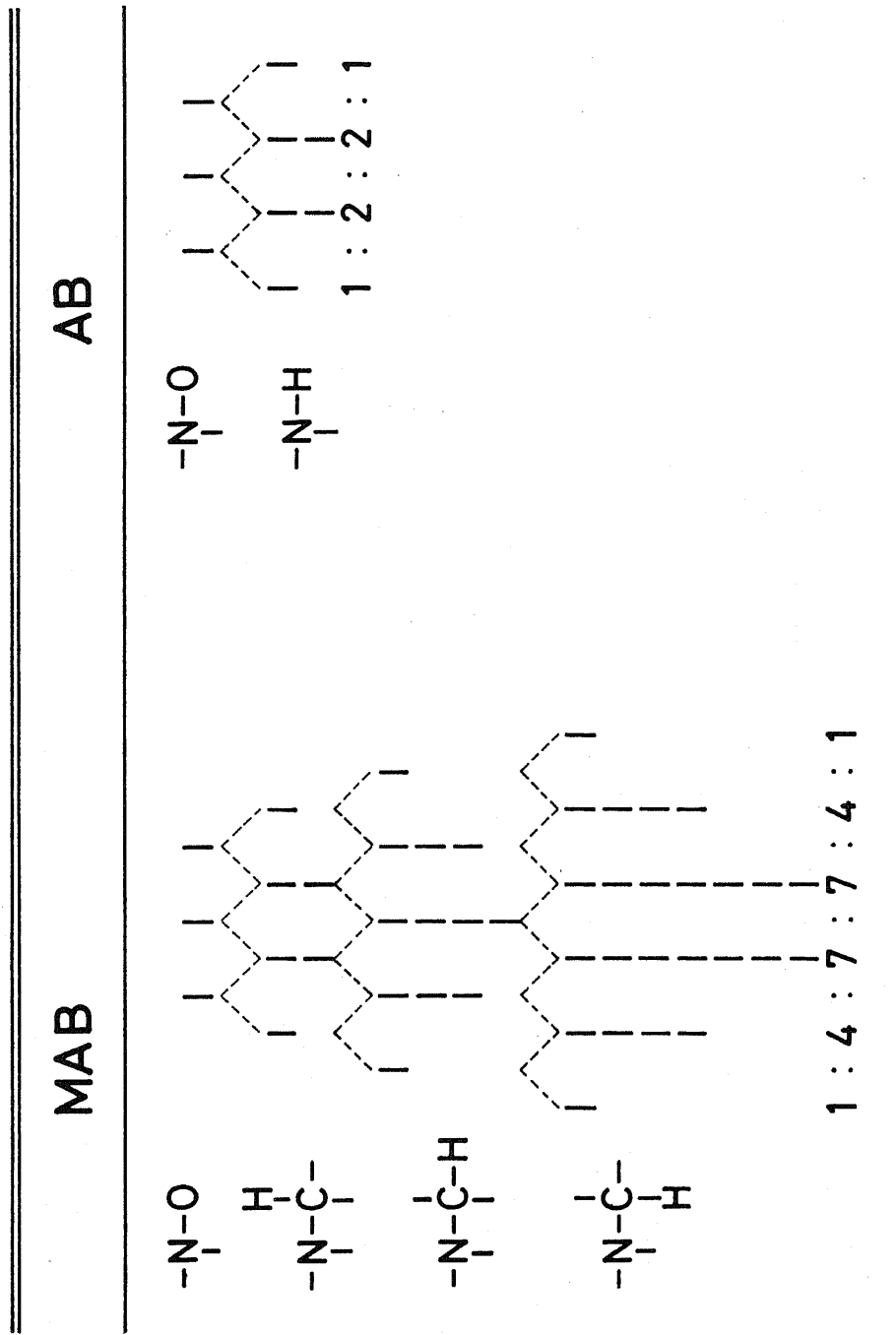


Figure 1-2. Zeeman splittings of N-OH-MAB and N-OH-AB.

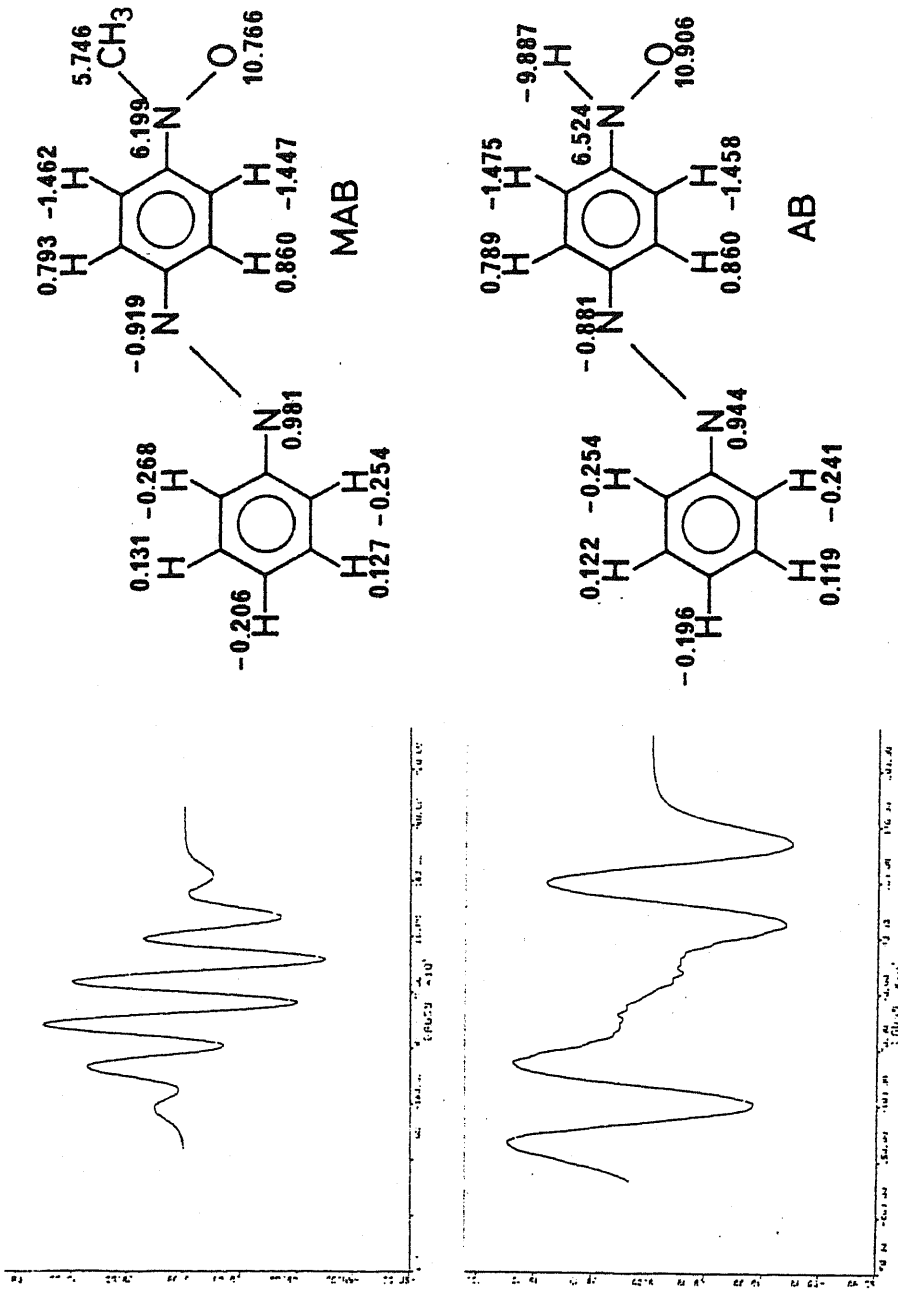


Figure 1-3. Simulated profiles of ESR signals(left) according to the coupling constants (right) for N-OH-MAB(upper) and N-OH-AB(lower) calculated by means of INDO MO method.

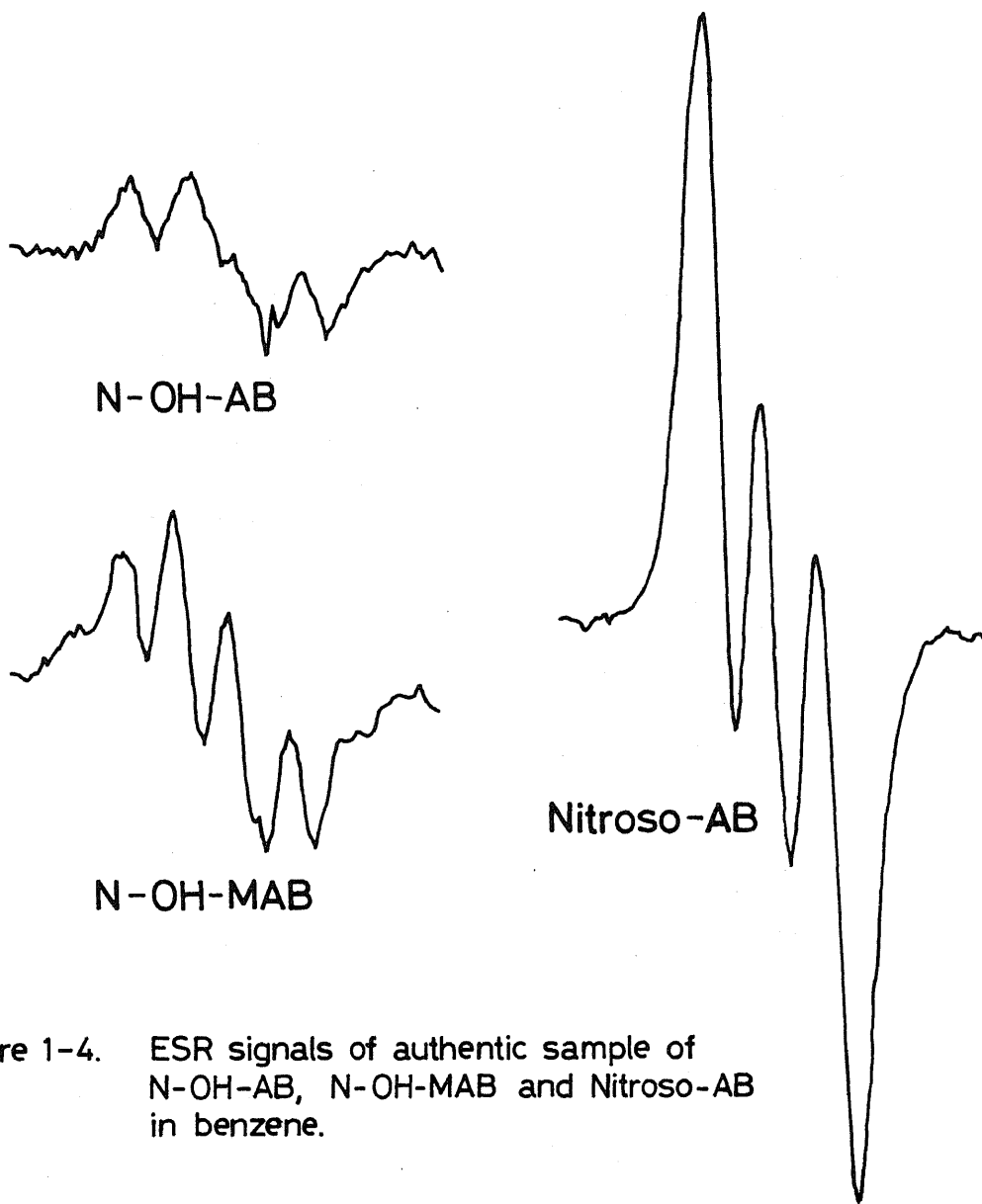


Figure 1-4. ESR signals of authentic sample of N-OH-AB, N-OH-MAB and Nitroso-AB in benzene.

Condition	ESR signal
{ <ul style="list-style-type: none"> Microsomes NADPH Supernatant ATP Na₂SO₄ 	
- Microsomes	
- Supernatant	
- { <ul style="list-style-type: none"> Supernatant ATP Na₂SO₄ 	
Microsomes NADPH	
+ PAPS after incubation	

Figure 1-5 Effect of sulfotransferase on free radical formation from 3'-Me-DAB.





Condition	ESR signal
3'-Me-DAB in Bz photo-irrad (2hr)	
Incubation with Liver microsomes (37°, 10min.) + NADPH	
- NADPH	
Heat-treated microsomes (60°, 10min.)	

Figure 1-6. Condition for free radical formation.

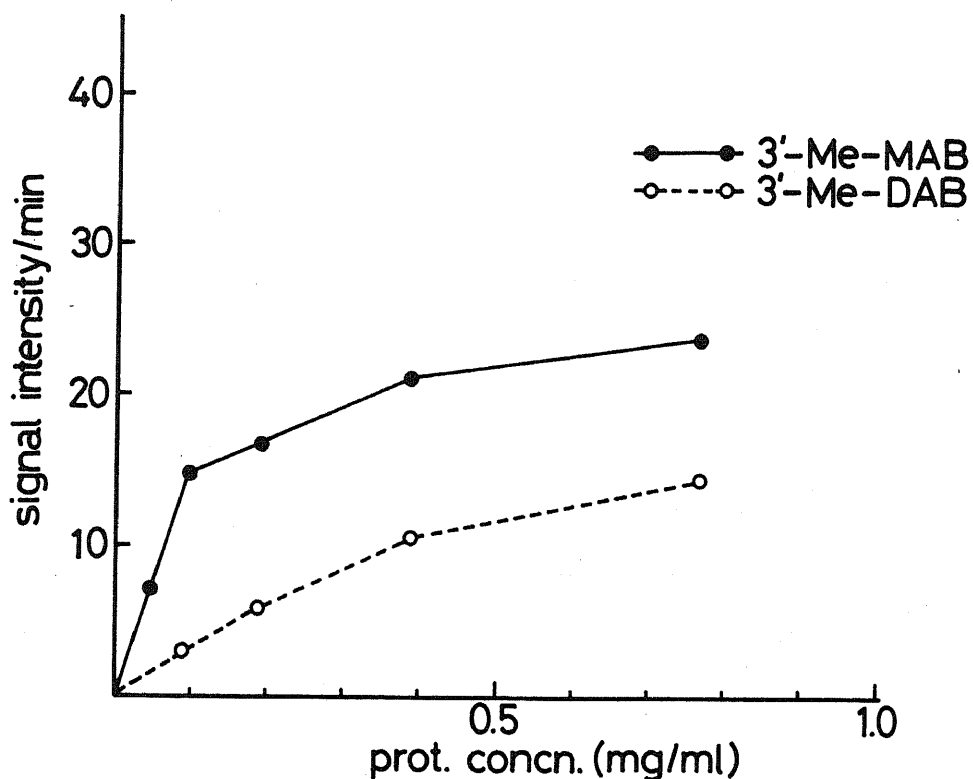


Figure 1-7. Effect of protein concentration on free radical formation.

を基質とした場合には 0.1 mg/ml 以上では linearity が消失した。そこで蛋白量は DAB 誘導体の場合には 0.2 mg/ml にて、MAB 誘導体の場合には 0.1 mg/ml とした。次に incubation time による影響を調べたところ、Fig 1-8 に見られる様に 3'-Me-DAB を基質とした場合 linearity は 15 分までみられ、これは 3'-Me-MAB を用いた時も同様であった。NADPH に対する濃度依存性を Fig 1-9 に示す。3'-Me-DAB 及び 3'-Me-MAB 共に NADPH 濃度 0.25 mM で飽和した。

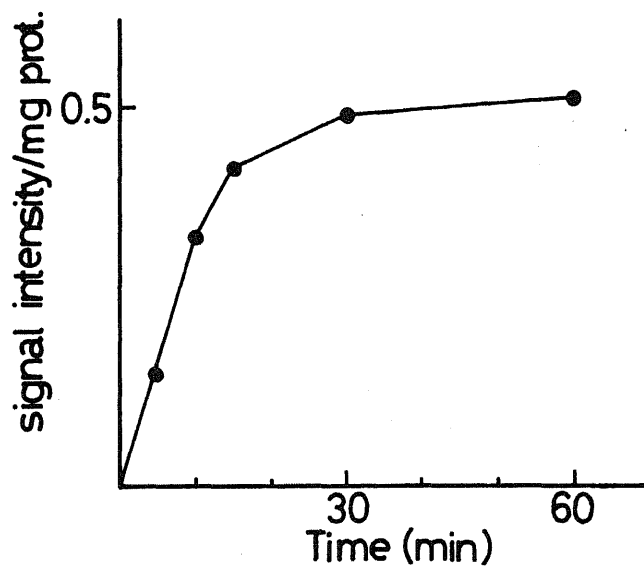


Figure 1-8. Time course of free radical formation.

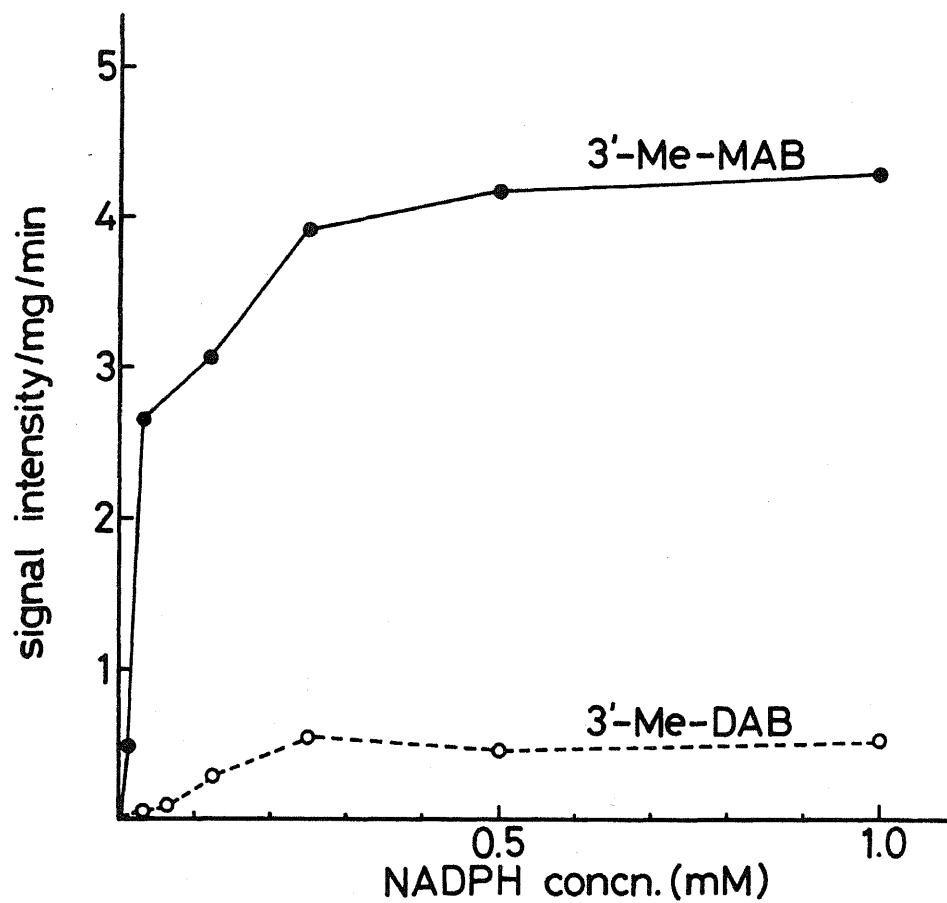


Figure 1-9. Effect of NADPH concentration on the formation of free radical from aminoazo dyes.

〔考察〕 Kadlubar 等³⁸⁾ は N-OH-MAB を microsome 系で直接定量する事が出来なかったが、著者は free radical を測定する事により N-OH-MAB を microsome 系で直接定量する事を可能とした。

Kadlubar 等の方法は酢酸エチル抽出物を薄層クロマトグラフィーで分離したのであるが、N-OH-MAB のように不安定な化合物は、彼等の方法では定量が不可能である。一方、free radical の定量は、他の metabolite の混在は free radical を生成しないかぎり妨害しないので分離の必要性がなく、素早い定量が可能でありすぐれている。

3'-Me-DAB の代謝においても N-OH-AB や nitrosoazobenzene の生成が考えられた。しかも nitroso 体は naphthylamine で見られる様に⁵³⁾、強い 3 本線を示す。Azobenzene の nitroso 体も同様に強い 3 本線を示すが、代謝によっては得られなかった。また N-OH-AB も free radical を生成するが、その強度は N-OH-MAB の約 $1/4$ であった。

さらに幸な事には、後で述べるが、DAB 及び MAB より N-OH-MAB の生成量に比べ非常に少ない。もし N-OH-AB が混在していてもその割合は 5% 前後であり定量にはほとんど影響がなかった。

この free radical 生成は、得られた free radical が N-OH-3'-Me-MAB である事から、3'-Me-DAB より代謝経路は Fig1-10 に示す経路により生成する事がわかった。Prime ring の誘導体は free radical の hyperfine structure に影響をあたえないので、この方法を用いて反応速度と発癌性との相関を検討する事が可能となった。

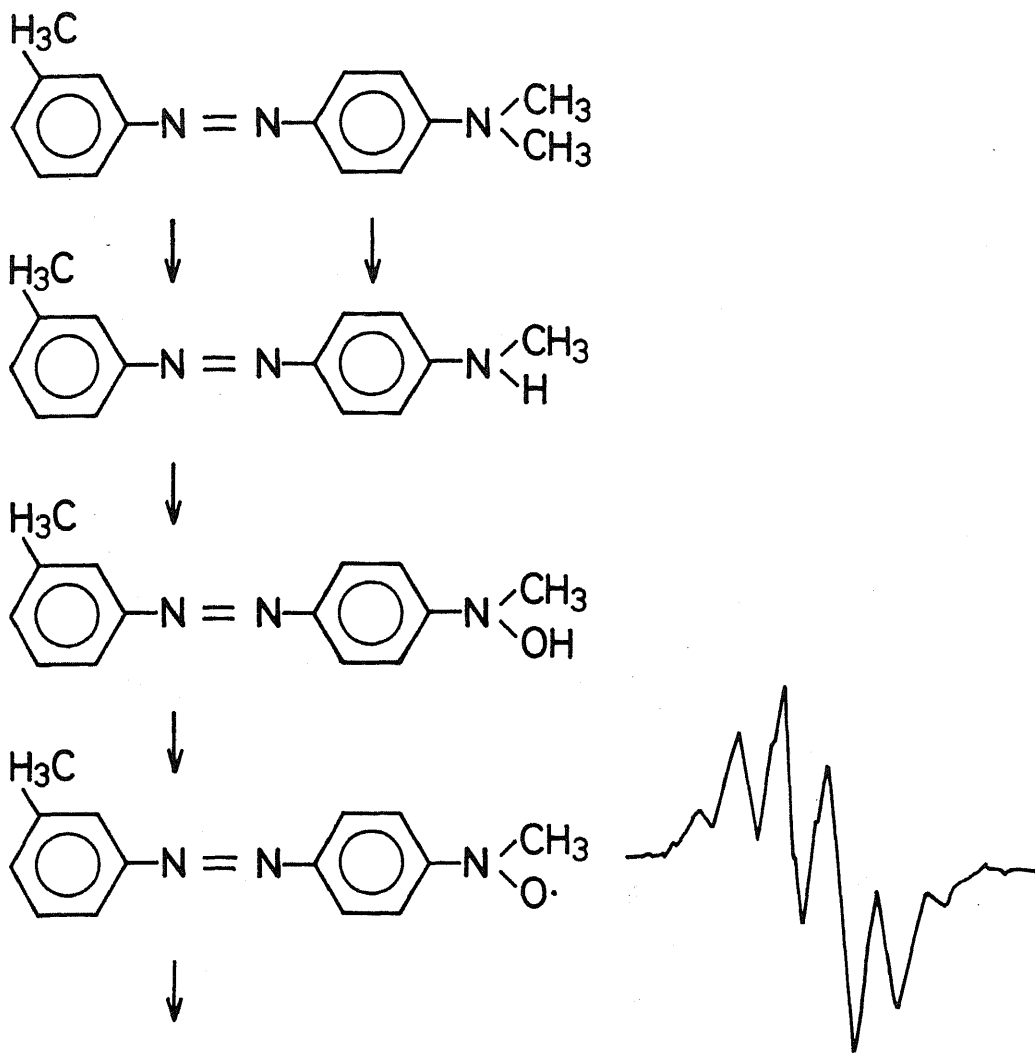


Figure 1-10 Metabolic pathway of 3'-Me-DAB to free radical of N-OH-3'-Me-MAB.

第 2 節 4-Methylaminoazobenzene 誘導体の合成

M A B 誘導体からの N 位水酸化速度を調べる為には各種の M A B 誘導体が必要であるが、3'-Me-及び 4'-NO₂-誘導体を除き他の誘導体の合成はなされていない。そこでまず各種 M A B 誘導体の合成を行った。

〔方法〕 M A B 誘導体の合成は Miller & Miller¹⁸⁾ の方法により合成した。メチル誘導体はそれぞれ o-, m-, p-toluidine を 2 当量の塩酸存在下、0℃で当量の亜硝酸ナトリウムでジアゾ化した後に、これを 2 当量の酢酸ナトリウムと当量の N-メチルアニリンを含んだ 70%メタノール溶液に加え、N-メチルアニリンと coupling させる。この時、この coupling 反応はアゾ結合を生成せず triazene を形成する。この triazene を乾燥後、3 当量の N-メチルアニリン及び 0.7 当量の N-メチルアニリン塩酸塩を加え、45℃で 3~4 時間加温し、N₂ の発生がなくなるまで続ける。反応後過剰の 10%塩酸を加えアミノアゾ色素を沈澱させる。沈澱をよく洗った後に、1N NaOH で中和し、よく水で洗い、これを真空中で乾燥して、benzene : 石油エーテル = 1 : 1 で再結晶を行った。

クロル及びニトロ誘導体はそれぞれクロルアニリン、ニトロアニリンを同様にジアゾカップリングさせて転移を行う。Triazene よりの転移にはクロル誘導体、ニトロ誘導体の場合それぞれ 75℃、90℃に温度を上げて行った。

〔結果〕 MAB誘導体はすべてMABの合成方法により合成が可能であった。これらの合成品のmelting pointは、2'-Me-MAB; 72~73℃、4'-Me-MAB; 98~100℃、2'-Cl-MAB; 68~69℃、3'-Cl-MAB; 65~66℃、4'-Cl-MAB; 111~112.5℃、2'-NO₂-MAB; 130~131℃、3'-NO₂-MAB; 157~158℃、4'-NO₂-MAB; 187~188℃であり展開溶媒としてbenzeneを用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィーで単一のspotが見られた。これを¹³C-NMRで分析した(table 1-1)。

¹³C-NMRのChemical shiftをテトラメチルシランを基準にして、そのshiftをppmで表わしたものであり、これは置換基効果をLevyとNelson⁵⁹⁾の方法により同定した。

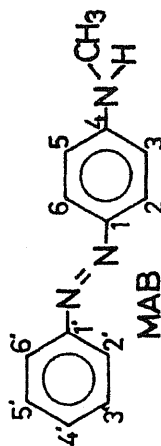
さらにベンゼンのo-, m-, p-置換をKBr法によりIRを測定したところ2'-Me-, 2'-Cl-, 2'-NO₂-MABは770 cm⁻¹にオルト置換、830~850 cm⁻¹にパラ置換の吸収が見られた。3'-Me-, 3'-Cl-, 3'-NO₂-MABでは670~690 cm⁻¹及び750~790 cm⁻¹のメタ置換ベンゼンの吸収が見られた。4'-位の置換体はすべて840 cm⁻¹附近にパラ置換ベンゼンの吸収が見られた。ニトロ誘導体は1340 cm⁻¹にニトロの吸収が見られた。

Table 1-1

¹³C NMR chemical shifts of MAB derivatives^{a)}

MAB	2'-Me-	3'-Me-	4'-Me-	2'-NO ₂ -	3'-NO ₂ -	4'-NO ₂ -	2'-Cl-	3'-Cl-	4'-Cl-
1	144.6	145.1	144.6	144.6	144.9	144.5	144.9	144.2	144.4
2,6	125.1	125.0	125.0	124.9	126.2	125.9	125.7	125.4	125.2
3,5	111.7	111.7	111.7	111.7	111.6	111.8	111.6	111.6	111.7
4	150.1	151.0	151.7	151.5	152.8	152.7	149.1	152.1	151.7
1'	150.1	151.5	153.1	151.0	144.6	154.0	152.1	153.9	151.4
2'	122.1	136.6	122.2	122.1	135.4	116.4	129.8	121.5	123.3
3'	128.8	130.8	138.6	129.4	123.6	149.3	130.2	135.2	128.9
4'	129.3	129.1	130.1	139.6	128.5	123.2	133.7	128.9	134.9
5'	128.8	126.2	128.6	129.4	132.5	129.6	127.0	129.7	128.9
6'	122.1	115.3	119.7	122.1	118.4	128.6	117.5	121.1	123.3
N-Me	30.2	30.3	30.2	30.2	30.1	30.1	30.1	30.1	30.2
ring Me		17.4	21.3	21.3					

a) Chemical shifts are given in ppm downfield from TMS. The solvent is chloroform-d and assignments are based on Ref.59. Numbering of MAB is given as indicated.



第 3 節 アミノアゾ色素の代謝活性化速度と発癌性の強さとの相関

現在までに発癌強度と代謝活性化速度との相関性を定量的に調べた研究の報告はみられない。この相関性を明らかにする事は発癌の機構を解明する上での大きな手がかりとなる。しかし、発癌剤は互いにその構造を異にしている場合が多く、それらの代謝活性化体の構造も大きく異なる。構造と活性の相関を考える場合、活性化体の構造が類似したものについて比較することが必要であるが、アミノアゾ色素はこの要求を満足する数少ない化合物群の一つである。それは多くの誘導体が合成され、しかもそれらの発癌性が定量的に比較されていることによる。しかしアミノアゾ色素の代謝活性化経路で得られる化合物はほとんどが不安定な為に、従来多くの試みがなされてきたにも拘らず、代謝活性化と発癌性との相関を定量的に調べる事はできなかつた。著者は前節までに述べたようにM A BのN位水酸化体の定量法を確立することに成功し、さらに各種M A B誘導体を合成することができた。これにより代謝活性化と発癌性について構造活性相関の手法により検討を加えた。

〔方法〕 D A B誘導体及びM A B誘導体よりの free radical 測定法は第 1 節に示した。D A B誘導体よりのN位脱メチル化は生成するM A B誘導体を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離定量した。定量にはそれぞれのM A B誘導体の検量線を作製し、その peak の高さを用いた。反応液は radical 測定法に用いた濃度を用い液量 1 ml で行った。これを benzene で 2 回抽出し、真空中で乾固し、100 μ l のメタノー

ルに溶解し、その20 μ lをHPLCで分離した。HPLCは日本分光製TrirotorにNucleosil 5C₁₈ (4.6 \times 250 mm)をつけて用いた。溶出条件は82.5%のメタノールの定組成溶出であり、流量は0.8 ml/minとした。

〔結果〕 Phenobarbital (PB)誘導及び無処置のラットから得たmicrosomeを用いた場合、そのsignal intensityが非常に小さく、発癌性の弱いアミノアゾ色素からは定量的扱いが困難であったのでMC microsomeを用いた。Miller & Miller⁶⁰⁾により報告されているpromotor無処理で得られた発癌性、すなわちDABの発癌性を6とした場合の相対的発癌強度を横軸に、発癌性のあるDAB誘導体よりのfree radical生成量を縦軸にとると、Fig 1-11に示す様に、この両者には極めて良好な相関性が見られ、この時の相関係数(r)は0.92であった。さらに回帰直線 $y = 0.016x + 0.08$ が得られ、この回帰直線はy軸で正の値で交差した。一方、非発癌性とされている4'-NO₂-DAB、2-Me-DAB、4'-OH-DABからのfree radical生成速度は、この回帰直線のy切片 $y = 0.08$ よりも小さくなった。

DAB誘導体からのfree radical生成には2段階の酵素反応が必要なため、それぞれの反応速度との相関性を検討した。第一段階の反応はDABのN位脱メチル化であり、第2段階の反応はMABのN位水酸化である。

DAB誘導体よりの脱メチル化速度はHPLCでMAB誘導体を分離定量した。そのHPLCによる溶出patternの例をFig 1-12に示す。

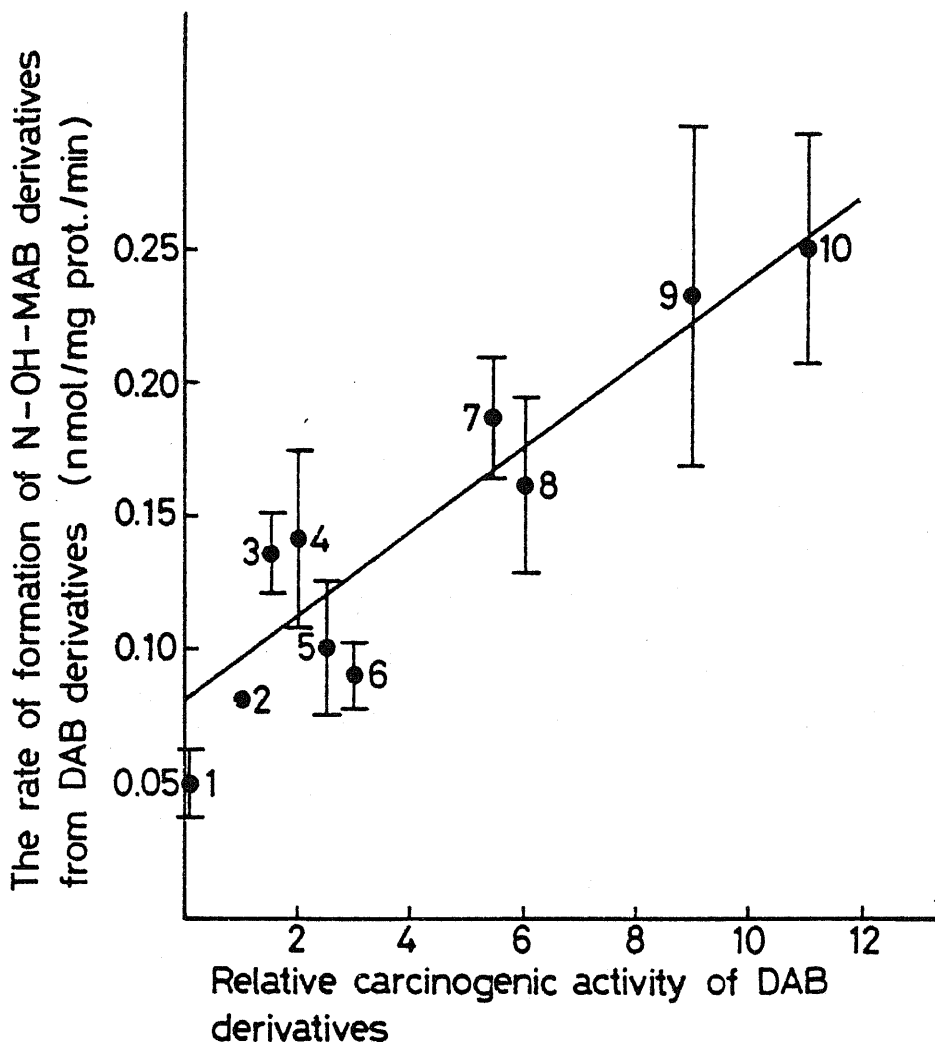


Figure 1-11. Correlation between the rate of formation of N-OH-MAB derivatives from DAB derivatives and their hepato carcinogenicity. Each point of the rate of N-hydroxylation represents mean value \pm SD of five determinations. 1. 4'-NO₂-, 2. 4'-Me-, 3. 4'-Cl-, 4. 2'-Cl-, 5. 2'-Me-, 6. 2'-NO₂-, 7. 3'-Cl-, 8. DAB, 9. 3'-NO₂-, 10. 3'-Me-.

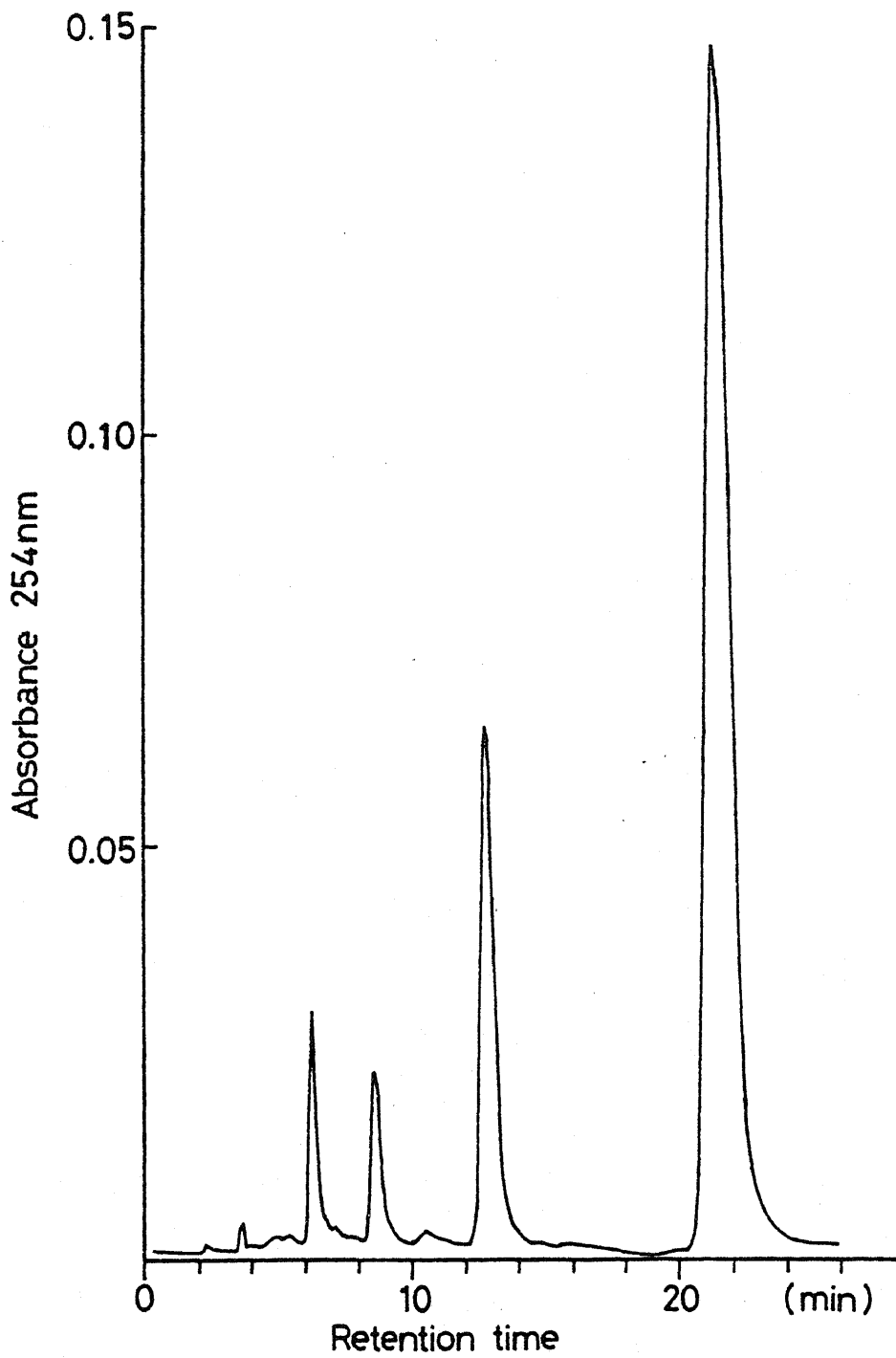


Figure 1-12. HPLC profile of the metabolites of DAB with liver microsomes from 3-MC treated rats.

Retention time (RT) 13分にMABが溶出される。これによりDAB誘導体の脱メチル化速度を測定して縦軸にとり発癌性との相関性を調べたが、Fig 1-13に見られるようにこの両者には相関性は見られなかった。相関係数は $r = -0.13$ であった。

一方、MAB誘導体からのN位水酸化速度と発癌性との相関性を調べた結果、非常に良好な相関関係が見出された(Fig 1-14)。この時、相関係数は0.84であり、回帰直線 $y = 0.088x + 0.307$ が得られた。この場合も、DAB誘導体で見られたように、この直線はy軸と正の値で交差した。一方、非発癌性とされている4'-NO₂-MABのN位水酸化速度は、種々の誘導体のうちでも最もその発癌性の強いとされている3'-Me-MABよりも大きかった。

〔考察〕 Wislocki等⁶¹⁾は究極的発癌剤とみなされているN-OH-MABの硫酸抱合体のモデル化合物としてN-benzoyloxy-MABを考え、この誘導体による発癌性を検討した。その結果発癌性の強さはそれぞれの前駆体であるDAB誘導体の発癌性とは相関性がなく、各種N-benzoyloxy-MAB誘導体の発癌性はほとんど皆同程度である事を見出した。これはアミノアゾ色素の発癌性の強さを決定するものが、ultimate formの反応性ではなく、ultimate formを生成する段階に起る代謝に依存している為と思われた。著者の実験ではDAB誘導体よりのN-OH-MAB誘導体生成速度、なかでも、MAB誘導体のN位水酸化速度がアミノアゾ色素の発癌性の強さを規定していると結論できる。一方、MatsumotoとTerayama⁶²⁾はDABのメチル誘導体を

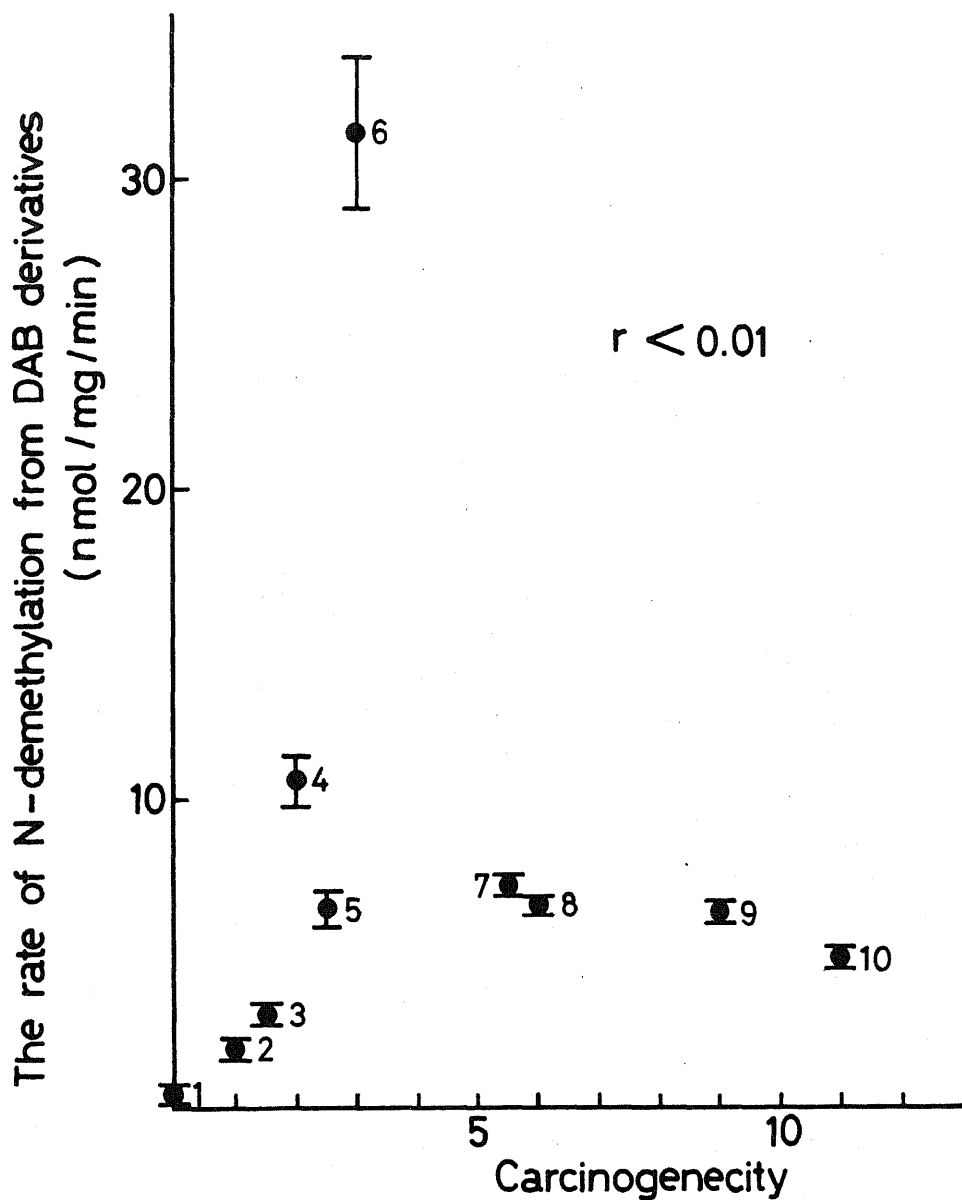


Figure 1-13. Relation of the rate of N-demethylation of DAB derivatives with their carcinogenicity. Numberig of DAB derivatives is the same as in Figure 1-11.

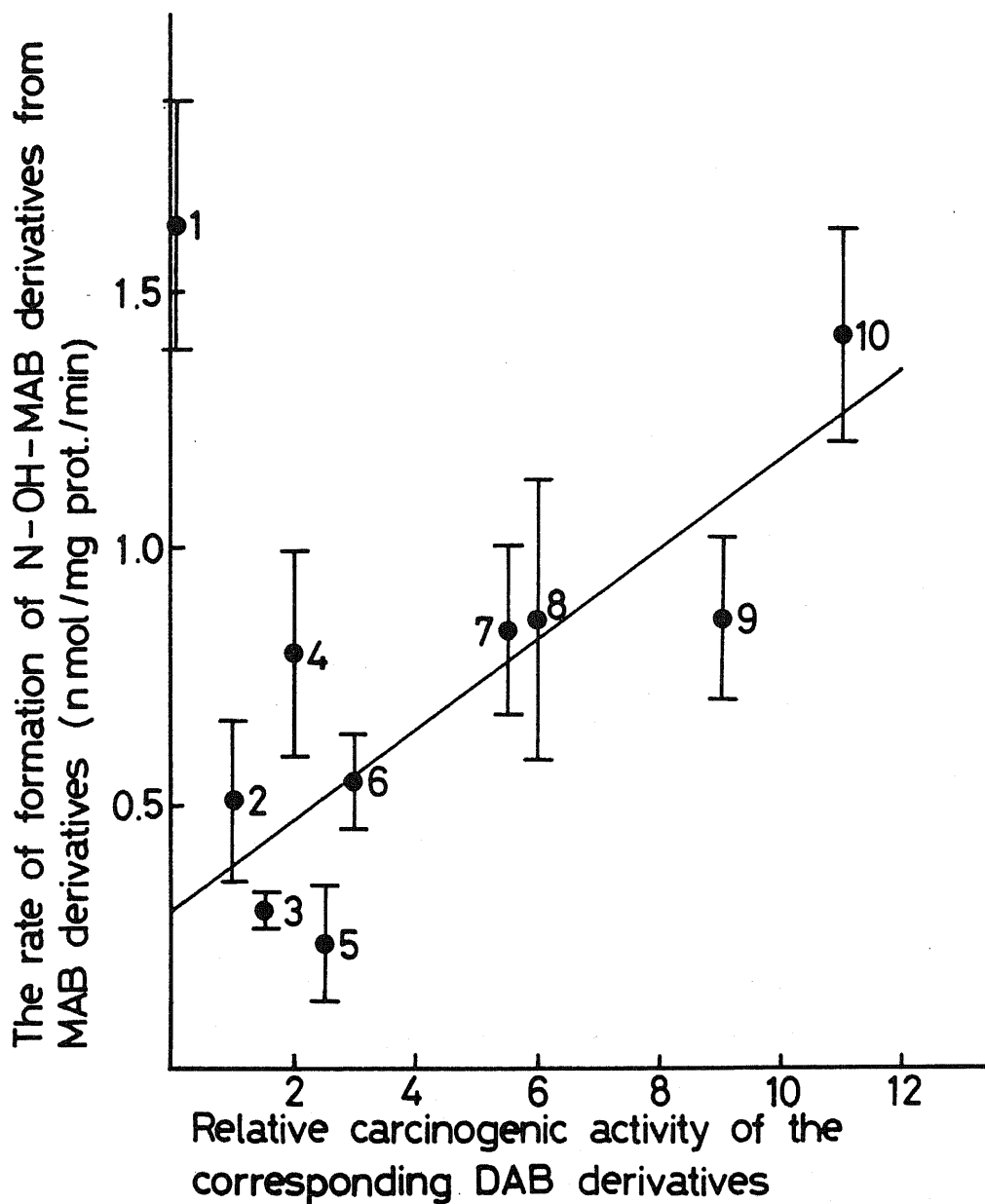


Figure 1-14. Correlation between the rate of formation of N-OH-MAB derivatives from MAB derivatives and carcinogenicity of the corresponding DAB derivatives.

用いて、その脱メチル化速度と発癌性が一部相関性があると報告しているが、彼等はメチル誘導体のみを使用しているにすぎず、さらに統計処理もしていないので信頼性にかける。

2-Me-DABは投与後PBでその発癌性を promote した場合にはDABと同程度の発癌性を示し⁶³⁾、DNAへのbindingはDABよりも多くなる⁶⁴⁾。ところがpromotorの投与がない場合には発癌性はみられず、著者のN-OH-MAB生成速度測定の結果からみても発癌性のない事が予測される。発癌の過程はinitiationとpromotionの2段階よりなると考えるのが通例となっている現在^{65) 66)}、著者の実験はこの両者を含んだcomplete carcinogenとしての発癌性を表わすと考えられ、2-Me-DABは両作用のうちinitiation作用のみを持つアミノアゾ色素と思われた。

HinoとKitagawa⁶⁷⁾はATPase-deficient islandのscoringからinitiationの影響を測定できる事から3'-Me-DABのdoseを変えてラットに投与し、その影響を調べ、3'-Me-DABの発癌性には閾値の存在する事を報告している。今回著者の実験でも同様に回帰直線が原点を通らない事から閾値の存在を示唆しており、しかもこれは代謝体の量もしくは濃度により決定されるものである。

第4節 アミノアゾ色素の変異原性と発癌性との相関

Neoplastic transformation は somatic cell mutation であるという Bauer²⁴⁾ の仮説、発癌剤の DNA への結合と発癌性が並行する事⁶⁸⁾、さらに bacteria による mutation は DNA の変化を伴なう事^{27) 28)} などから、salmonella による mutation は発癌の initiation に対応する現象と考えられている。そこでアミノアゾ色素の salmonella における mutation frequency と発癌性との相関性を検討した。

〔方法〕 S-9 は polychlorinated biphenyl (PCB) (Kanechlor KC-500) 50 mg/kg を 3 日間 i. p 投与し一晩絶食後、致死、灌流し、2 倍容の 0.15 M KCl で homogenize した後、10,000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、その上清を S-9 として用いた。Mutation assay は salmonella TA98 を用い norharmane を添加し、長尾等⁶⁹⁾ の方法に従い、その histidine 要求性株を数え mutation frequency を求めた。アミノアゾ色素の mutation frequency は非常に低く通常の方法では検出し難いので norharmane を加えた。これにより mutation frequency は 3'-Me-DAB で 10 倍以上になった。

〔結果〕 DAB 誘導体の mutation frequency と発癌性は Fig 1-15 に示す様に、この両者には良好な相関性が見られ、その相関係数は 0.83 であり、回帰直線 $y = 5.5x + 1.42$ が得られた。この直線は free radical 生成速度の場合に見られるように原点を通らなかった。

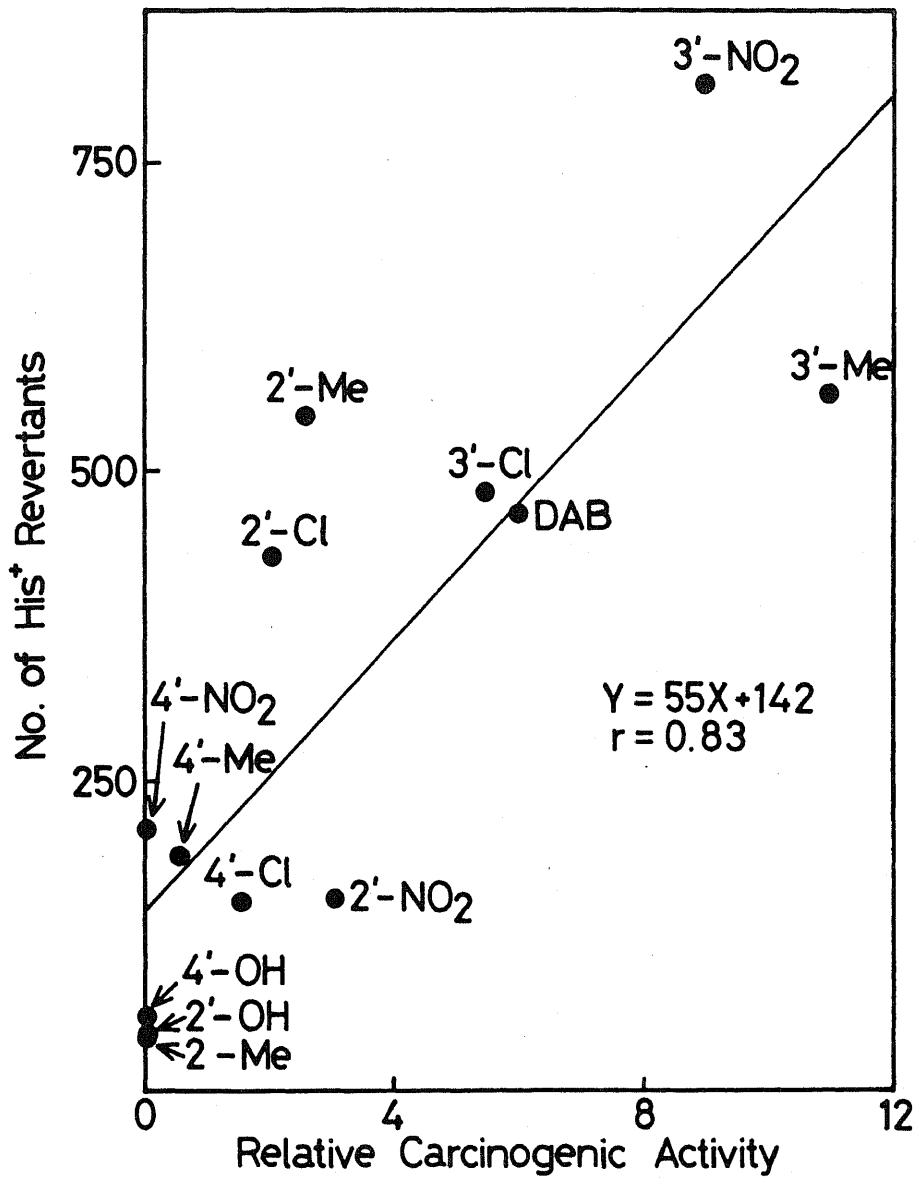


Figure 1-15. Correlation between mutagenicity and carcinogenicity of DAB derivatives.

M A B 誘導体の mutation frequency と発癌性との相関性は Fig 1-16 に示される。この場合も D A B 誘導体の場合と同様に良好な相関性が見られ、相関係数 0.76、回帰直線 $y = 98x + 495$ が得られた。

〔考察〕 発癌性と変異原性は定性的には相関性を示すが、定量的に相関性を調べた報告はなく、種々の構造の異なる発癌剤を比較した場合、その相関性はないといえる⁷⁰⁾。しかしアミノアゾ色素の様に構造が類似し、その ultimate form の構造が似ている場合は、今回示したように変異原性と発癌性に相関性が得られる。一方、Ashby 等⁷¹⁾ は prime ring を他の芳香族等でおきかえた場合には変異原性と発癌性には相関性が見られないと報告している。これは prime ring を他の芳香族におきかえた場合には別の活性化が起こった為と考えられる。

Mori 等⁷²⁾ は 3'-Me-DAB が D A B よりも発癌性が強く、変異原性が強いのは 3'位のメチル基が水酸化を受けた 3'-hydroxymethyl-DAB の変異原活性が強いことに起因すると考えたが、この考えは 3'-Me-D A B 以外について一般的に適用できるものでない事は明らかである。

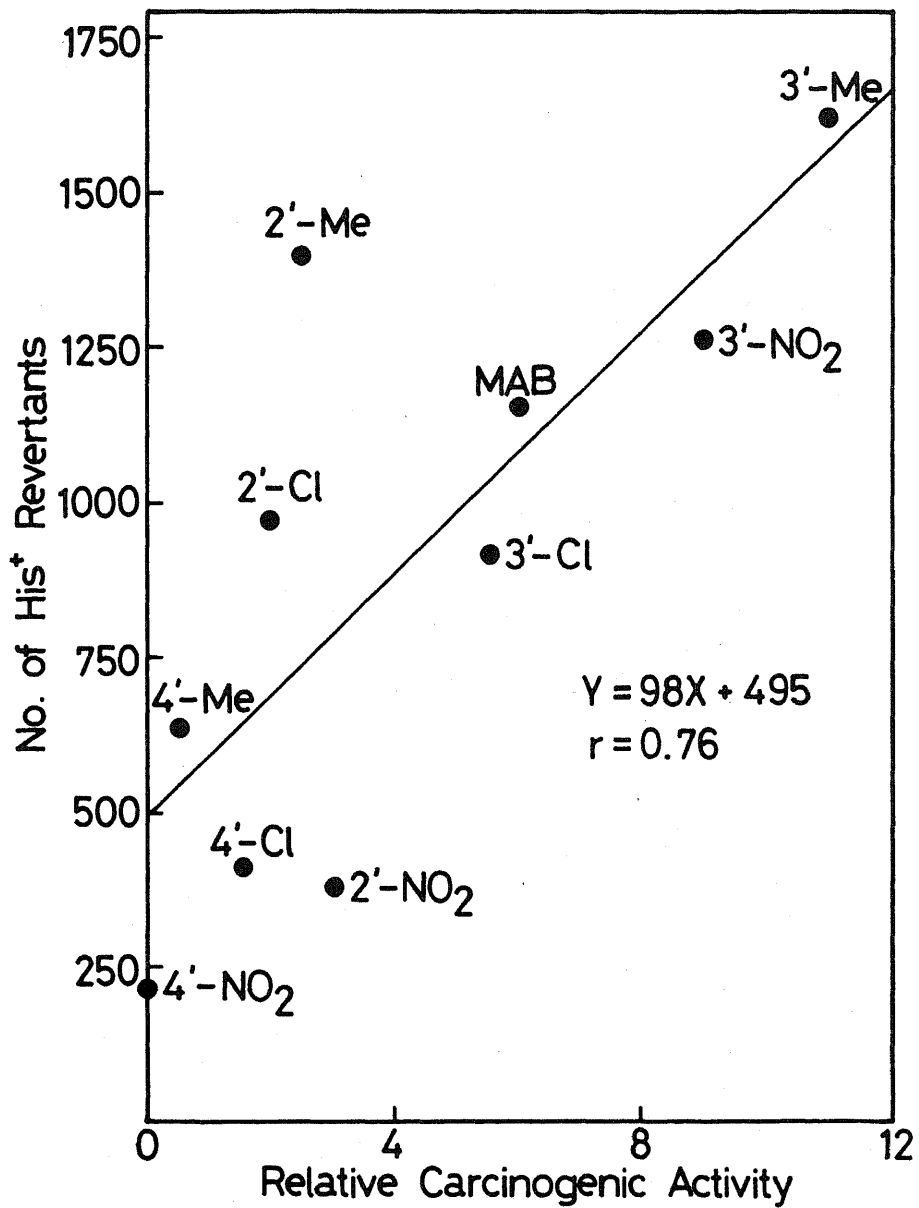


Figure 1-16. Correlation between mutagenicity and carcinogenicity of MAB derivatives.

[小括]

1. 従来microsome 系での反応で直接M A B誘導体のN位水酸化を測定することはできなかったが、free radicalを測定する事により、これが可能となった。
2. アミノアゾ色素の発癌性はfree radical生成量と密接な相関性を示し、各種のM A B誘導体を合成してN位水酸化を調べた結果、発癌性と相関性をもつのはD A Bの脱メチル化ではなくM A BのN位水酸化である事がわかった。さらに代謝量に起因すると思われる閾値の存在を裏付けた。
3. アミノアゾ色素の変異原性は発癌性と定量的な相関を示した。このような相関は現在までのところ、他の化合物では得られていない。

第 2 章 3'-Methyl-4-methylaminoazobenzene の
N 位水酸化に関する酵素の同定

第2章 3'-Methyl-4-methylaminoazobenzene のN位水酸化 に關与する酵素の同定

外因性の化合物が生体に取り込まれてから排泄させるまでに、多くの酵素による代謝が必要である事は良く知られている。まず最初に、Cytochrome P-450 (Cyt. P-450) 等により酸化もしくは還元を受けた化合物は、そのまま、もしくは glucuronic acid, sulfonic acid 等と抱合され腎より排泄される⁴³⁾。

DABにおいても多くの代謝経路が存在し、azo還元、N位脱メチル化、N位水酸化、prime ringの水酸化、アミノ基のアセチル化反応が知られている。Azo還元は、NADPHを electron donor とする NADPH-Cytochrome C reductase (frr) ^{73) 74)}、Cyt. P-450 ⁷⁵⁾、NADHを electron donor とする Cytochrome b₅ ⁷⁶⁾ により起こる。N位脱メチル化は種々の Cyt. P-450 分子種により起こる事が Guengerich ⁷⁷⁾ により、又 mixed function amine oxidase (MFAO) により起こる事が Ziegler ⁷⁸⁾ により示された。Levine と Lu ^{79) 80)} はDABの脱メチル化はMCで誘導され易く、MABの脱メチル化はPBにより誘導され易いことを見出した。さらに彼等は prime ring の水酸化はPBにより誘導され易い事を報告している。これらの反応のほとんどがCyt. P-450の種々の分子種により起る事は明らかである。一方、MABのN位水酸化については Kadlubar 等 ³⁸⁾ の報告があるのみである。しかし彼等は直接 N-OH-MAB を microsome 系より定量せず、その非酵素的分解産物である N-OH-AB を阻害薬

を用いて定量し、MABのN位水酸化速度を推測している。しかしN-OH-ABの生成はN-OH-MABを通らずMABからABが生成し、これが酵素的にN-OH-ABになる別の経路が存在する。したがってこれらに対する特異的な阻害薬であるのかどうか不明であり、彼等の主張するようにMFAOのみによりMABのN位水酸化が起こるのかどうか疑問が残る。そこで著者はこの発癌性を決定する重要な酵素反応であるN位水酸化に関与する酵素をfree radical量として定量し、種々の誘導薬、阻害薬の影響を調べた。

第1節 Microsome でのN位水酸化酵素に対する各種薬剤の影響

Cyt. P-450の誘導剤としてPB及びMCを、阻害剤としては一酸化炭素(CO)、SKF 525A、 α -naphthoflavone(α -NF)、metyrapone(MP)、1-(1-naphthyl)-2-thiourea(ANTU)を用いた。SKF 525A、MPはPBで誘導されたmicrosomeに対し強い阻害効果を示し^{81) 82) 83)}、 α -NFはMC誘導されたmicrosomeに対しその阻害効果を表わし、PBで誘導されたmicrosomeでは活性を上昇させる^{84) 85)}。一方、ANTUはMFAOの阻害剤であり0.5mMでその活性を完全におさえ、ほとんどCyt. P-450には影響をあたえない⁸⁶⁾。これらの阻害剤を用いてMABのN位水酸化酵素を同定できると考えられる。

〔方法〕 3'-Me-DAB, 3'-Me-MABからのfree radical生成量は第1章第1節に示した方法で行った。PBは60mg/kg(i.p)を3日間連続投与し、最後の投与から24時間絶食し、MCの場合と同様に第1章第1節に示された方法でmicrosomeを得た。

MFAOはZieglerとPettit⁸⁷⁾の方法に従い、dimethylaniline(DMA)のN-oxide生成により定量した。

〔結果〕 3'-Me-DABからのfree radical生成はPBに より2~3倍上昇し、MCでは1.2倍活性が上昇した。3'-Me-MABからのfree radical生成はMC前投与で4~5倍の誘導がかかるが、PBで

は阻害がかかる。これらの誘導剤のMFAOに対する影響は両者共に阻害がかかるが、その作用はPBの方がより大きい(table 2-1)。

Electron donarとしてのpyridine nucleotide 要求性を table 2-2 に示す。3'-Me-MABよりの1段階の反応ではNADPH, NADH共にelectron donarとして効果的であるがNADPHの方が僅かにその効果が強い。3'-Me-DABよりの2段階の反応におけるco-factorの作用を比べると、NADPHの方がNADHよりも約2倍良好である。また両者共存下では3'-Me-DABを用いた場合には相乗効果が見られ、3'-Me-MABを用いた場合には阻害効果が見られた。

Cyt. P-450の阻害剤であるCOによる阻害を Fig 2-1 に示した。3'-Me-DABからのN-OH-MAB生成に対し、 $\text{CO}/\text{air} = 1$ の時その阻害は約40%であり、 $\text{CO}/\text{air} = 19$ の時約80%であった。一方、3'-Me-MABのN位水酸化活性は $\text{CO}/\text{air} = 1$ で全く阻害がかからず、 $\text{CO}/\text{air} = 19$ の時に若干阻害の傾向は示したが、その差はほとんどない。

SKF 525Aによる阻害は3'-Me-DAB, 3'-Me-MABからのfree radical生成には影響をあたえなかった(Fig 2-2)。MPの 1.6×10^{-5} Mではむしろfree radical生成を増強した(Fig 2-3)。

α -NFによる阻害を Fig 2-4 に示した。 α -NFではnitroxide radicalの生成を強く阻害し、 α -NF 10^{-4} Mで3'-Me-DABよりのfree radical生成を完全に阻害した。3'-Me-MABのfree radical生成は約80%阻害された。この α -NF濃度においてMFAOの活性はDMAを基質にした場合、阻害効果は見られなかった。

Table 2-1 Effect of pretreatment of inducer on the formation of free radical from 3'-Me-DAB and 3'-Me-MAB and on the N-oxidation of DMA.

Substrate	Microsomes		
	Control	PB-induced	MC-induced
3'-Me-DAB	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.59 ± 0.03
3'-Me-MAB	0.71 ± 0.03	0.46 ± 0.02	3.10 ± 0.22
Dimethylaniline	1.57 ± 0.09	0.53 ± 0.01	1.09 ± 0.01

The amount of free radical is given by the signal height/Mn²⁺/mg protein and that of the N-oxide of dimethylaniline is given as nmol/mg protein/min. Values are expressed as means ± SE of five samples.

Table 2-2 Requirement for Pyridine Nucleotides for Nitroxide Radical Formation

Pyridine nucleotide	Amount of the nitroxide radical	
	3'-Me - DAB	3'-Me - MAB
NADH	0.26±0.03	2.27±0.08
NADPH	0.58±0.02	2.98±0.08
NADH+NADPH	0.94±0.03	3.77±0.23

The amount of free radical is given in the same unit as in Table 2-1
The concentration of pyridine nucleotides is 1mM.

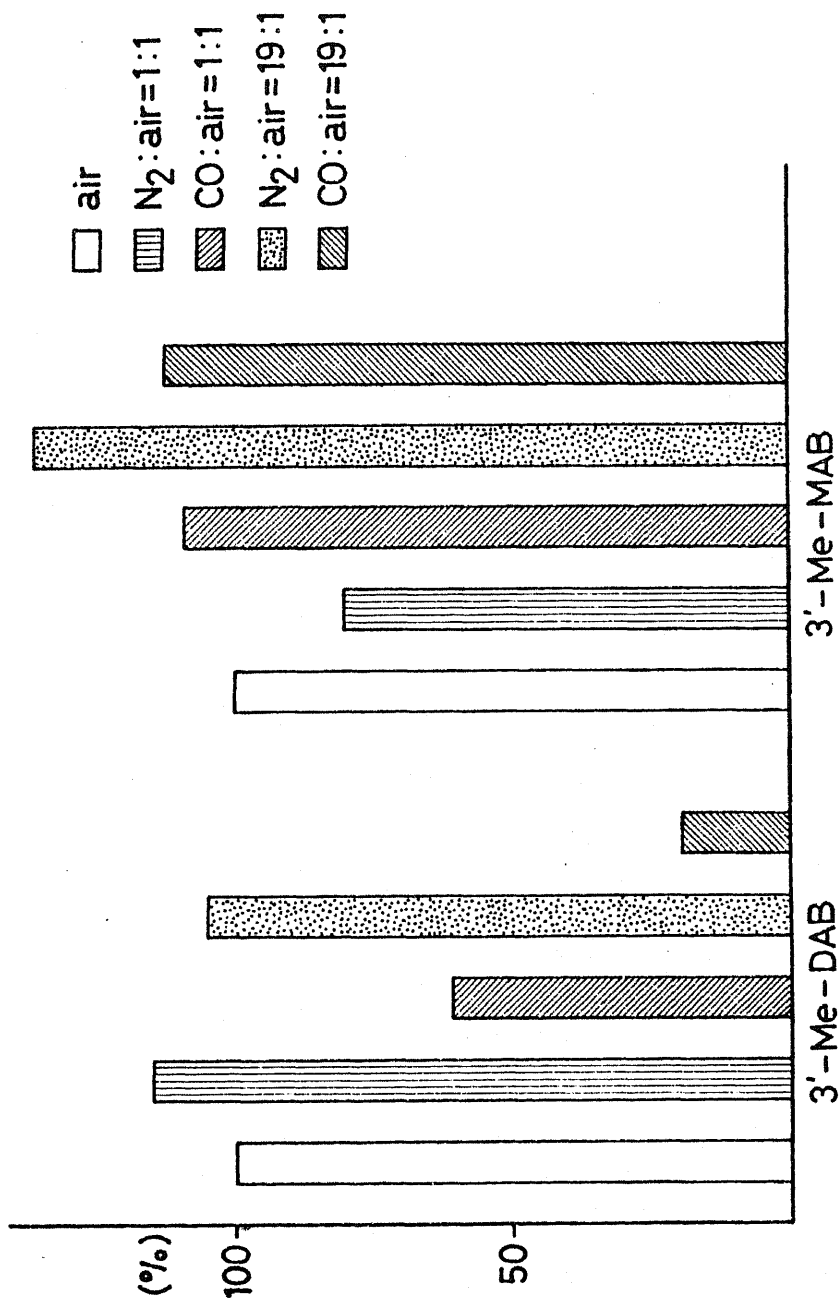


Figure 2-1. Effect of Carbon Monoxide (CO) on Nitroxide radical formation.

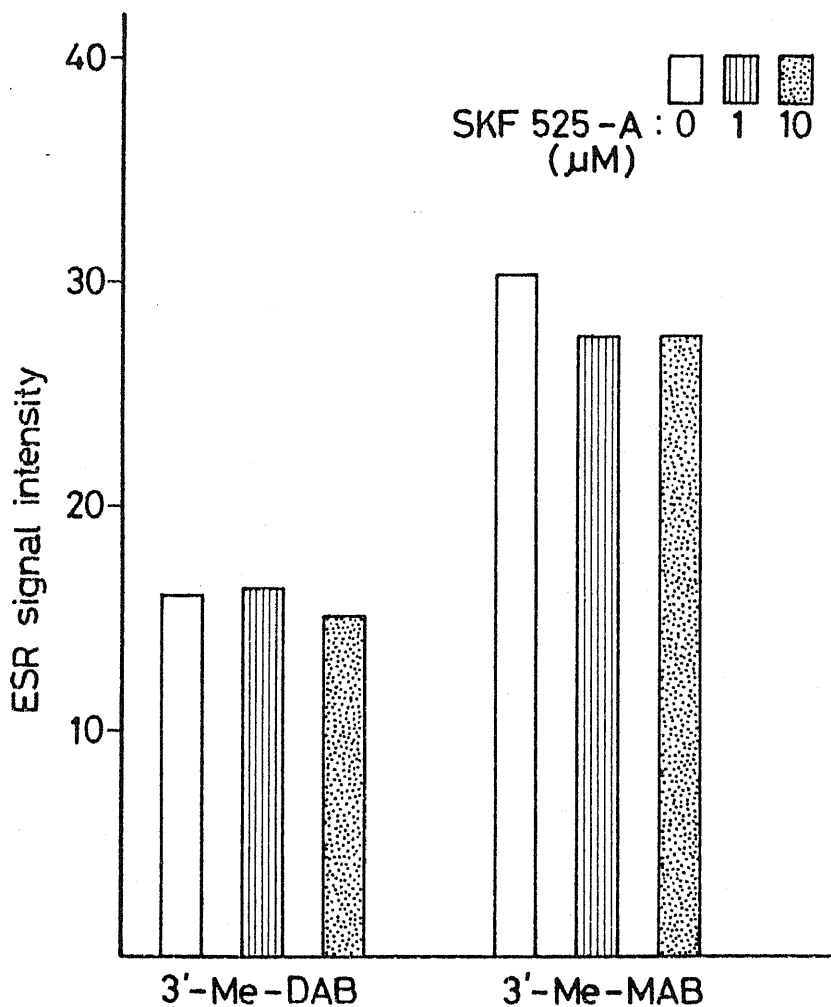


Figure 2-2. Effect of SKF 525A on the formation of nitroxide radical from 3'-Me-MAB and 3'-Me-DAB.

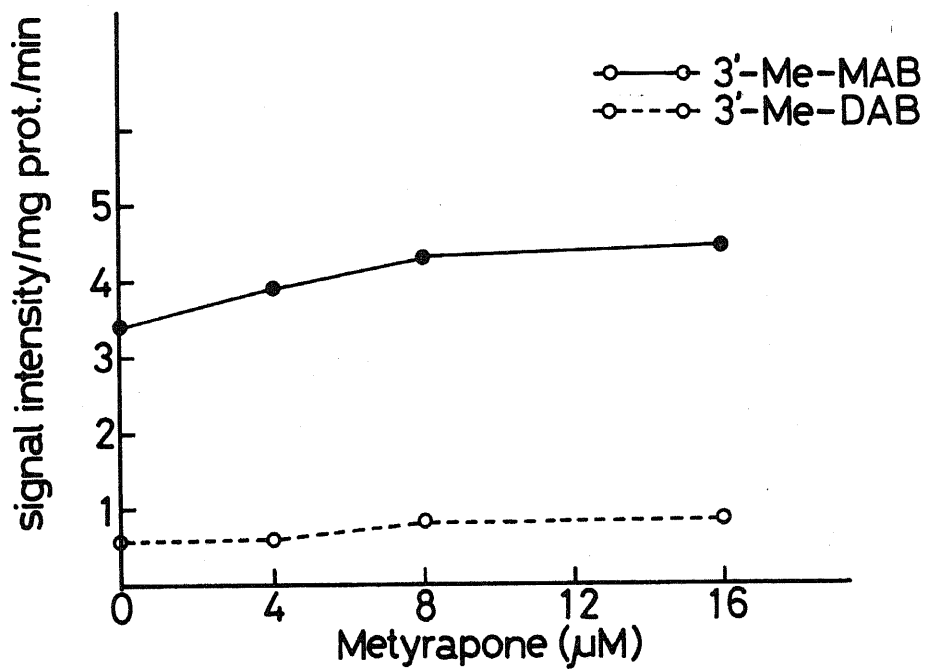


Figure 2-3. Effect of Metyrapone on the formation of nitroxide radicals.

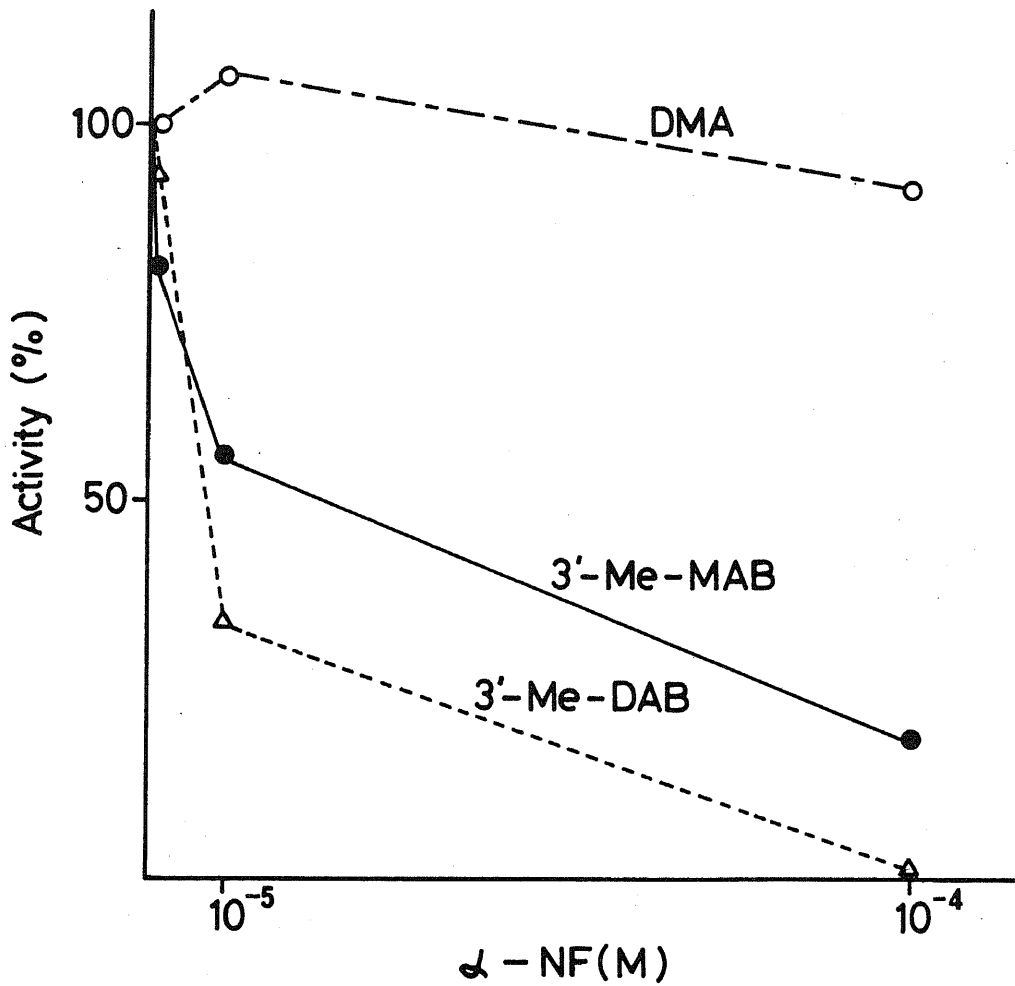


Figure 2-4. Effect of α -naphthoflavone on the nitroxide radical formation.

MFAOの阻害剤であるANTUは0.5 mMでは3'-Me-DABよりの free radical 生成は約90%阻害するが3'-Me-MABからの free radical 生成は約40%阻害されたのとどまった。この時MFAO活性は完全に阻害された(table 2-3)。

〔考察〕 Aromatic amineのN位水酸化には2種類の酵素の関与が指摘されている。AminofluoreneのN位水酸化は、ラットではほとんどMCで誘導されるCyt. P-450で起こるが、豚ではMFAOでもその活性は強く豚の肝microsomeの活性の約半分を占めている⁸⁸⁾。また naphthylamineでも同様にCyt. P-450及びMFAOによりN位水酸化が起る^{53) 89) 90)}。MABのN位水酸化反応はMFAOのみで起り、Cyt. P-450では起らないとKadlubar等³⁸⁾は報告している。彼等はラット肝microsomeのN位水酸化は2-[(2,4-dichloro-6-phenyl)phenoxy]-ethylamine (DPEA)、COにより阻害されない事、Cumene hydroperoxideによりこの反応が起らない事、精製した豚のMFAOによりN位水酸化が起こる事から、ラットのmicrosomeのN位水酸化酵素はMFAOであると結論した。しかしながら、Cyt. P-450には種々の分子種が存在し、種々の阻害剤は比較的分子種としての特異性を保持している。すなわちPB microsomeでの反応はSKF 525A、CO、MPで阻害され易く^{81) 82) 83)}、 α -NFでは阻害はかからずむしろ増強される^{84) 85)}、一方、MC microsomeは α -NFで強く阻害されるが、SKF 525A、COでは阻害されにくい。この事は阻害剤を用いる場合注意されねばならない。彼等はDPEAの分子特

Table 2-3 Effect of 1-(1-Naphthyl)-2-thiourea on the N-Hydroxylation of 3'-Me-DAB and 3'-Me-MAB and on the N-Oxidation of Dimethylaniline in the Microsomal System

ANTU (mM)	3'-Me-DAB (%)	3'-Me-MAB (%)	Dimethylaniline (%)
0	100	100	100
0.05	80	88	ND
0.5	11	61	0

ND = not done

異性を考慮していない。著者の結果ではMCで誘導される事、 α -NFで阻害がかかる事からCyt. P-450もこのN位水酸化に関与していると考えられる。SKF 525A、CO、MPで阻害がかからないのもすべてこの分子種特異性に依るものと考えられる。またNasdev等⁹¹⁾もまたCumene hydroperoxideではMABのN位水酸化は起らない事を確認しているが、著者もこれは確認している。しかしacetylaminofluoreneのようにCyt. P-450によりN位水酸化が起こる化合物でもCumene hydroperoxideによりN位水酸化されない事、Cumene hydroperoxideによる反応は1電子酸化であるのに、NADPHによるCyt. P-450での酸化反応は2電子酸化⁹²⁾という差も存在する事から、Cumene hydroperoxideの実験では同定できない。

さらにANTUによる阻害が不完全である事も、Cyt. P-450の関与をうかがわせた。

第2節 部分精製した mixed function amine oxidase に対する 阻害効果

前節でANTUによるN位水酸化の阻害が不完全である事を報告した。この現象が他の酵素の関与による為か、あるいはANTUによる阻害が基質によって異なる為に現われるものか検討する為に、MFAOを部分精製しCyt. P-450を除いてANTUによる阻害効果を調べた。

〔方法〕 Ziegler 等⁹³⁾が豚で用いた方法によりMFAOをラットから部分精製した。その方法を Fig 2-5 に示す。Triton x-102 : Triton x-45 : Triton x-45 succinate = 5 : 4 : 1 の10%混液を78,000 μ の沈澱分画の0.25M succrose suspension 100 ml当り9 ml加え可溶化し、それを35~50%飽和の硫酸分画を行う。以後、彼等の方法によると polyethylene glycol 分画、2回のDEAE-cellulose column chromatographyと続くが、ラットからの酵素は硫酸分画の段階までに大部分の活性を失い、polyethylene glycol 分画では完全に失活した。そこで硫酸分画を部分精製標品として用いた。この分画にはOmuraとSatoの方法⁹⁴⁾によるCO差スペクトルで見るとかぎりCyt. P-450の混入の形跡は見られなかった。

〔結果〕 3'-Me-MAB及びDMAを基質とした場合の硫酸分画への回収率を table 2-4 に示した。DMAを基質としてその回収率を調べると約20%回収されていた。それにも拘らず3'-Me-MABを基質

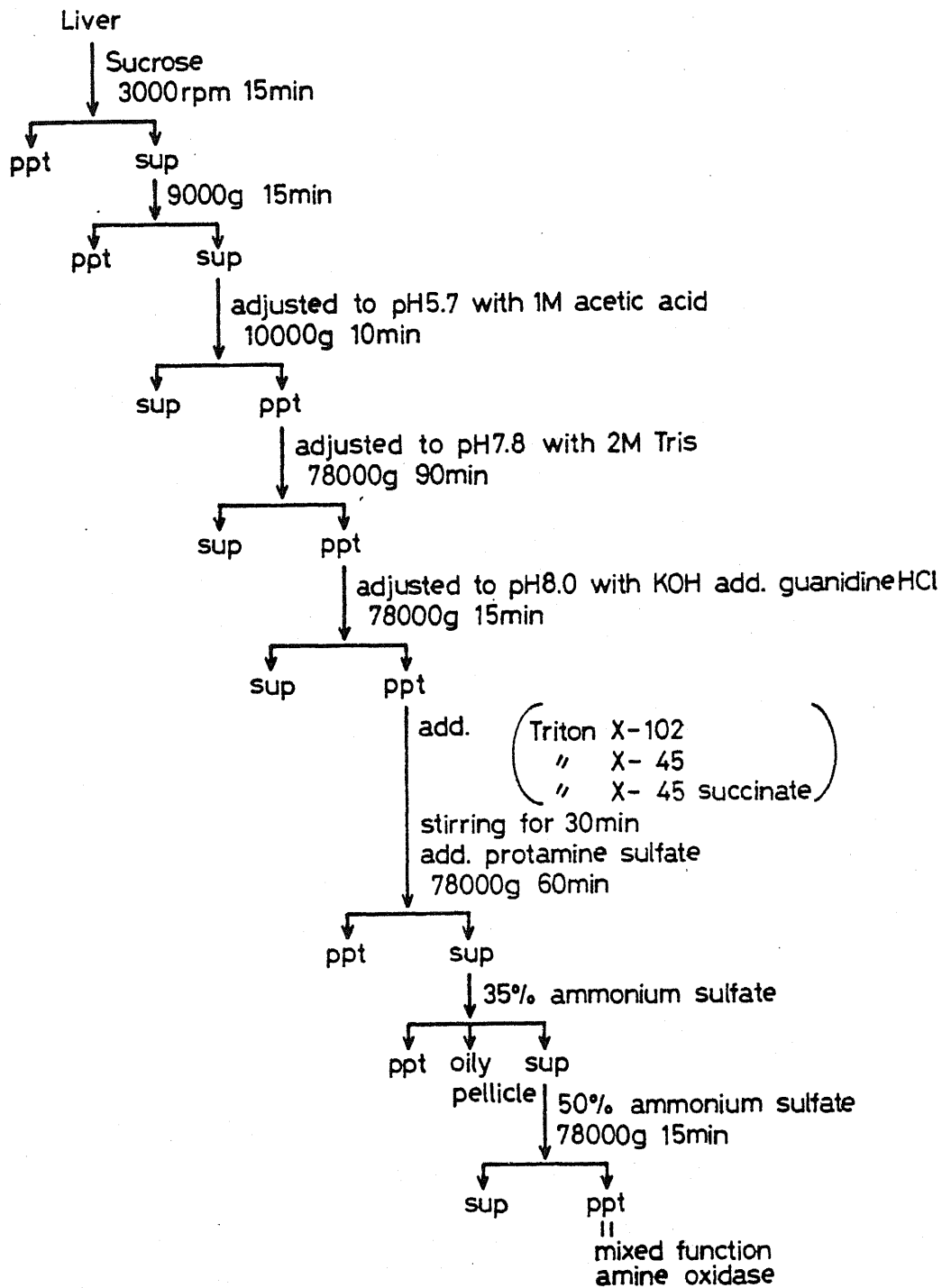


Figure 2-5. Partial purification of MFAO from Rat Liver microsomes.

Table 2-4 Partial purification and yield of MFAO.

	3'-Me-MAB		Dimethylaniline	
	Purification (fold)	Yield (%)	Purification (fold)	Yield (%)
Microsomes	1	100	1	100
Triton-solubilized supernatant	0.42	11	2.85	71
Triton-insoluble precipitate	0.78	70	0.43	38
Ammonium sulfate precipitation (35 ~ 50%)	2.1	7	7	23

とした場合には10%以下であった。その時の精製度合はそれぞれ7倍、2倍であった。

硫安分画での3'-Me-MABのN位水酸化速度及びDMA N-oxide生成に対するANTUの効果をtable 2-5に示す。MC microsomeを用いた場合、3'-Me-MABのN位水酸化は40%の阻害しかかからなかったが部分精製したMFAOを用いた場合にはANTUにより完全に活性は阻害された。DMA N-oxide生成は酵素の分画にかかわりなく完全に阻害された。

さらにtable 2-6に示すようにDMAのN位の酸化はsuperoxide dismutase (SOD)によりどの分画ともに30~40%阻害されるが、3'-Me-MABのN位水酸化は部分精製したMFAO分画でのみ阻害された。

〔考察〕 Ziegler等⁹³⁾の方法ではラットからのMFAOの精製は不可能であり、豚とラットの本酵素の安定性に差がある事が示唆された。部分精製したMFAOに対するANTUの阻害は基質によって変わらず完全であった。前節での阻害の不完全さは基質による阻害効果の差ではなく、MC microsomeでの他の酵素の関与と考えられる。これは前節での α -NFの効果から考えてMCで誘導されるCyt. P-450と思われる。

MFAOはその活性化酸素としてsuperoxide radicalが関与すると考えられており⁹⁵⁾、著者の実験でも部分精製したMFAO分画を用いた場合SODによる阻害がみられた事はこの事を支持する。

Table 2-5 Effect of ANTU on the N-Hydroxylation of 3'-Me-MAB and on the N-oxidation of Dimethylaniline with partially purified MFAO and microsomes from MC treated rats.

	3'-Me-MAB	Dimethylaniline
Partially purified MFAO	(-) 100 (%)	(-) 100 (%)
	(+) 0	(+) 0
Microsomes	(-) 100 (%)	(-) 100 (%)
	(+) 58	(+) 0

(+) and (-) correspond to the presence and absence of 1-(1-naphthyl)-2-thiourea (0.5mM), respectively.

Table 2-6 Effect of superoxide dismutase on the N-Hydroxylation of 3'-Me-MAB and the N-oxidation of DMA.

	3'-Me-MAB	Dimethylaniline
Partially purified MFAO	(-) 100 (%)	(-) 100 (%)
	(+) 65	(+) 68
Microsomes	(-) 100 (%)	(-) 100 (%)
	(+) 123	(+) 55
Triton insoluble	(-) 100 (%)	(-) 100 (%)
	(+) 110	(+) 83

(+) and (-) correspond to the presence and absence of super oxide dismutase (400U/ml), respectively.

MFAOとCyt. P-450のN位水酸化への関与を定量的に調べるには、種々の抗体による阻害効果をみる必要があると考えられる。そこで次の章においてMFAOのラットからの精製法に関して報告する。

[小括]

1. MC microsome 系におけるMABのN位水酸化には従来MFAOのみが働らくと考えられていたがCyt. P-450も同時に関与することがわかった。
2. Ziegler 等の方法ではラットからMFAOを精製する事は出来なかった。これはラットの酵素の方が豚の酵素より不安定な為であり、著者は精製法を改良することによりラットのMFAOを精製する事ができた。これを次の章に記す。

第3章 Mixed function amine oxidase の

精製とアミノアゾ色素の代謝

第3章 Mixed function amine oxidase の精製とアミノアゾ色素の代謝

1953年にMuellerとMiller⁹⁶⁾はmammalianの肝ホモジネート中にN-methyl化合物の酸化的N位脱メチル化に関与する酵素を見出した。この酵素はmicrosome分画に存在し⁹⁷⁾、活性化にはNADPH及び酸素を必要とする^{87) 98) 99)}。この反応はN-methyl化合物をaldehyde及び相当する低級アミンへ代謝する事がGillette等¹⁰⁰⁾の研究で明らかにされた。これらはMason¹⁰¹⁾によるmixed function oxidaseもしくはHayaishi¹⁰²⁾によるmonooxygenaseと考えられた。

Tertiary amineの最初の酸化体は当初よくわからなかったが、1964年McMahonとSullivan¹⁰³⁾はtertiary amineのN位にあるmethyl基への直接的な酸化が起ってN-hydroxymethyl誘導体を形成すると指摘した。このN-hydroxymethyl誘導体は容易にsecondary amineへ分解する。一方、Fish等¹⁰⁴⁾及びZieglerとPettit⁸⁷⁾は最初の酸化は窒素原子に起り、N-oxideを生成すると指摘した。特にZieglerとPettitは肝microsome系での3級アミンの2級アミンへの脱メチル化と同程度の速度でDMAをそのN-oxideへ酸化する事を示した。これがいわゆるMFAOによる反応である。一方、Terayama¹⁰⁵⁾はアミノアゾ色素を用いて、そのN-oxideが鉄イオン、hemin, hemoglobinの存在下で容易に非酵素的に2級アミンへ変る事を示した。このN-oxideを生成する酵素はSKF-525A, COでは阻害がかからず、これは明らかにmicrosome中に存在するCyt.

P-450とは異なる事がZieglerとPettitにより示された¹⁰⁶⁾。この酵素は1972年にZieglerとMitchell¹⁰⁷⁾により豚の肝より精製され、分子内に1分子のFADを含むflavin enzymeである事がわかった。この酵素は哺乳類^{108) 109)}、鳥類¹¹⁰⁾等の肝microsomeに存在するばかりでなくラット¹¹¹⁾、ハムスター¹¹²⁾の核膜にも存在する。

MFAOの生体内での機能は、まず第1にcysteamineをcystamineに、もしくはglutathioneをglutathione disulfideに酸化する事により、蛋白質のs-s bondの再構成に関与して高次構造を保持する事があげられる¹¹³⁾。さらに薬物^{114) 115)}、発癌剤^{116) 117)}の代謝に関与する。外因性の化合物の場合その酸化はアミノ基もしくは-SH基に起る。3級アミンはN-oxideを生成する事は前にも述べたが、2級アミン及び1級アミンではN位の水酸化が起こる¹¹⁸⁾。また-SH基は、-SO⁻基へと酸化される¹¹⁹⁾。

第1節 Mixed function amine oxidase の精製

MFAOは現在まで豚肝microsome より精製されたのみである。発癌過程における代謝活性化に關与する種々の酵素の役割を調べる為、発癌剤のmutation assay、発癌実験、生体高分子とのbinding、代謝活性化が調べられているが、これらはほとんどがラット、マウス等の小動物で行われている。特にアミノアゾ色素の場合Sprague-Dawley系ラットか、Donryu系ラットが用いられている。種々の代謝において種差、系統差が存在する事から⁴³⁾ 代謝と毒性発現を考える上で同一の動物種を用いる必要がある。アミノアゾ色素の場合、Sprague-Dawley系ラットを用いるのはその点で適當と思われる。しかしながらラットからのMFAOは前章にも述べたようにZiegler等⁹³⁾の方法では、その不安定性から精製できなかった。そこでラットからのMFAOの精製を行い、この酵素による代謝への寄与を調べる必要がある。

NADPH-dependentなflavin酵素であるNADPH-Cyt. P-450 Reductase(f_{PT})は2', 5'-ADP Sepharose 4Bを用いて容易に精製できる事から¹²⁰⁾、本酵素も2', 5'-ADP Sepharose 4Bを用いて精製が可能と考えられる。

〔方法〕 第2章第1節にも示したように、MFAOはPBやMCにより誘導されないばかりか阻害がかかるので、無処置のSprague-Dawley系雄性ラット(体重120g前後、5週令)を用いた。MFAO活性の測定法は第2章に記した。Sodium dodecyl Sulfate(SDS) -

polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) は Laemmli¹²⁾ の方法に準じ、sample は SDS と混和した後に加熱せずに泳動した。泳動後 10% 酢酸 - 45% メタノールで 2~3 時間蛋白を固定した後に、0.04% coomassie brilliant blue R-250 の 10% 酢酸 - 45% メタノール溶液で一晩染色し、10% 酢酸 - 10% メタノール溶液でくり返し脱染色を行った。

〔結果〕 可溶化及び精製はすべて 4℃ 以下で行った。可溶化剤は、sodium cholate の様な ionic detergent では阻害されるので⁹³⁾、non ionic detergent を用いる必要がある。この点を含め可溶化剤を検討したが、Triton x-102 : Triton x-45 : Triton x-45 succinate = 5 : 4 : 1 の混合液より優れた可溶化剤は見つからなかった。しかしこの方法でも上清への回収率は低く、不溶性分画にほとんど活性がない事から、適当な安定化剤を用いる必要性が考えられた。

Table 3 - 1 に 20% glycerol の可溶化に対する影響を示した。20% glycerol が存在しない場合には上清への回収率は 55% であるが、20% glycerol が存在した場合には回収率は 95% 以上であった。そこで可溶化、精製に対し特にことわらないかぎり buffer には 20% glycerol、1mM EDTA、1mM dithiothreitol (DTT) を加えた。Microsome を 20~25 mg/ml になる様に 50mM の Tris - HCl buffer (pH 7.5) に suspend し、最終濃度が 1% になる様に Triton 混液を加え 30 分間攪拌した後に、suspension 100 ml 当り 50 mg の protamine sulfate を加え 2 時間、78,000 g で超遠心分

Table 3-1 Effect of 20% glycerol on the recovery of MFAO activity from Triton-solubilized microsomes.

	Total activity (nmol/min)	
	- 20% glycerol	+ 20% glycerol
Microsomes	180	150
Triton-solubilized supernatant	99	145

離した。その上清をあらかじめ 0.2 % Triton x-100 を含んだ 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) で平衡化した DEAE-Sephrose CL-6B (2.6 × 2.6 cm) にかけた。Fig 3-1 に示される様に MFAO はすべて void volume に溶出されるばかりでなく 2 つの peak にわかれる。しかしながら 2 番目の peak は蛋白分解酵素阻害剤である phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) の添加により消失した。Buffer の pH をさらに 8.0 に上昇させたが、MFAO は吸着せず、pH を 8.0 と buffer の濃度を 25 mM に低下させると吸着した。しかしながら column からの回収率は極端に低下し約 30 % であった。そこで buffer の濃度を 50 mM、pH を 8.0 にして isocratic 溶出法により溶出させた (Fig 3-2)。Isocratic 溶出の場合大量の試料を扱う時 column volume が大きい事が必要のため DEAE-Sephrose CL-6B (5 × 30 cm) を用いた。0.2 % Triton x-100 含有 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で溶出させると fr 58 ~ fr 80 に MFAO が溶出された。この MFAO 活性の高い分画 (fr 60 ~ fr 69) を集め最終濃度が 5 μM になるように FAD を加え diaflo membrane (PM10) で 40 ml 以下に濃縮する。

これをそのまま 2', 5'-ADP Sepharose 4B にのせても半分以上は吸着せずに溶出される。そこで 20 % glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT を含んだ蒸留水を加え Tris-HCl buffer 濃度を 40 mM に低下させ、これを 2', 5'-ADP Sepharose 4B (1.6 × 10 cm) に吸着させる。Column volume の 5 倍容以上の 1 mM DTT, 20 % glycerol, 0.2 % Triton x-100 含有 50 mM Tris-HCl buffer

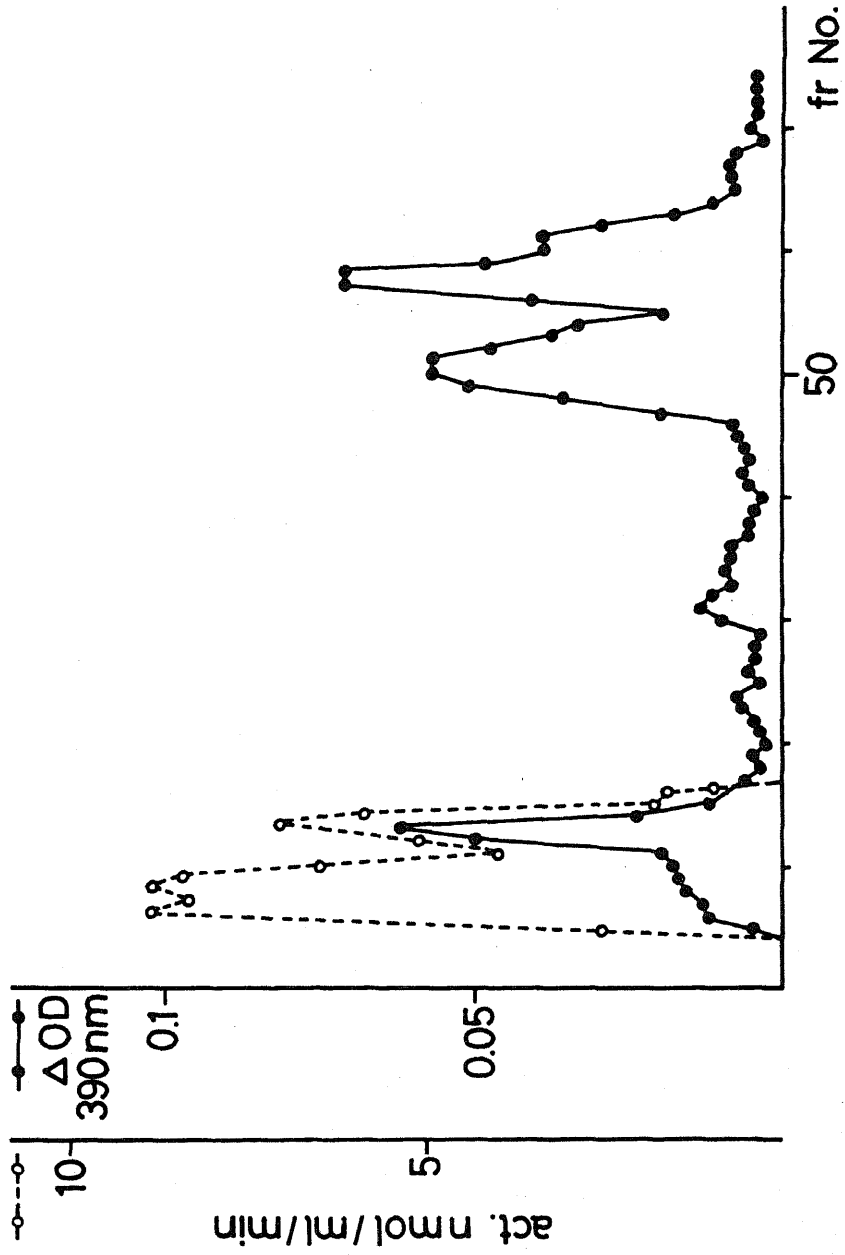


Figure 3-1. DEAE Sepharose CL-6B column chromatography of Triton solubilized supernatant at pH7.5.

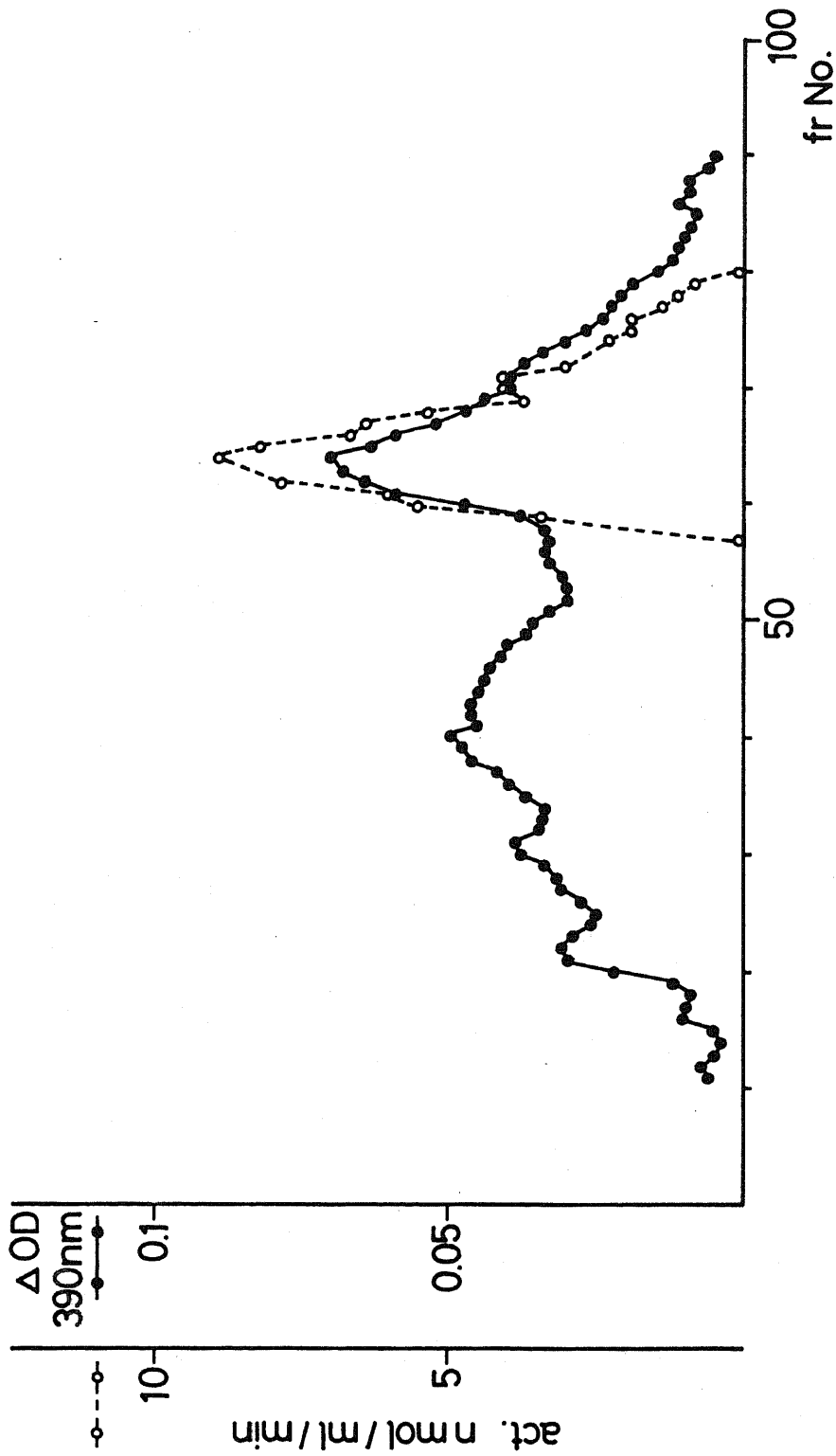


Figure 3-2. DEAE Sepharose CL-6B column chromatography of Triton solubilized supernatant at pH8.0.

(pH8.0)で充分洗い不要な蛋白及びEDTAを除き、充分洗った後に上記bufferと5mMの2'-AMPを含んだ上記buffer各100mlとでlinear gradientを作製し溶出した(Fig 3-3)。

MFAOのフラクションを集め、25mMのpotassium phosphate buffer (K-P buffer) (pH8.0)で平衡化したhydroxylapatite column(1.0×4cm)に吸着させた後、20% glycerol, 1mM DTT 0.2% Triton x-100含有25mM K-P buffer (pH7.0)で洗いcolumnのpHを替る。そこで5倍容以上の20% glycerol, 1mM DTT, 0.2% Triton x-100含有45mM K-P buffer(pH7.0)で洗い、続いてbufferの濃度を60mMに上昇させて溶出させた(Fig 3-4)。これによりMFAOはSDS-PAGEで見るとかぎり単一のprotein bandを示す(Fig 3-5)。SDS-PAGEでの分子量はFig 3-6に見られる様に約59,000であった。この時の比活性、回収率をtable 3-2に示す。回収率は約15%あり、比活性はmicrosomeに比べ350倍になり430 nmol/mg/minであった。

[考察] Ziegler等⁹³⁾は豚の肝よりほぼ同程度の回収率でMFAOを得ている。しかし彼等の比活性はDMAを基質とした場合1040 nmol/mg/min¹⁰⁷⁾なのに対してラットからの酵素は430 nmol/mg/minであり比活性に大きな差があった。一方、分子量は豚で60,000でありほぼ同一と考えられる。ラットの酵素は不安定であり、豚のように安定化剤なしでの精製は不可能であった。またDEAE-Sephrose CL-6Bにかけた時、25mMへとイオン強度を低下させると回収率が低下

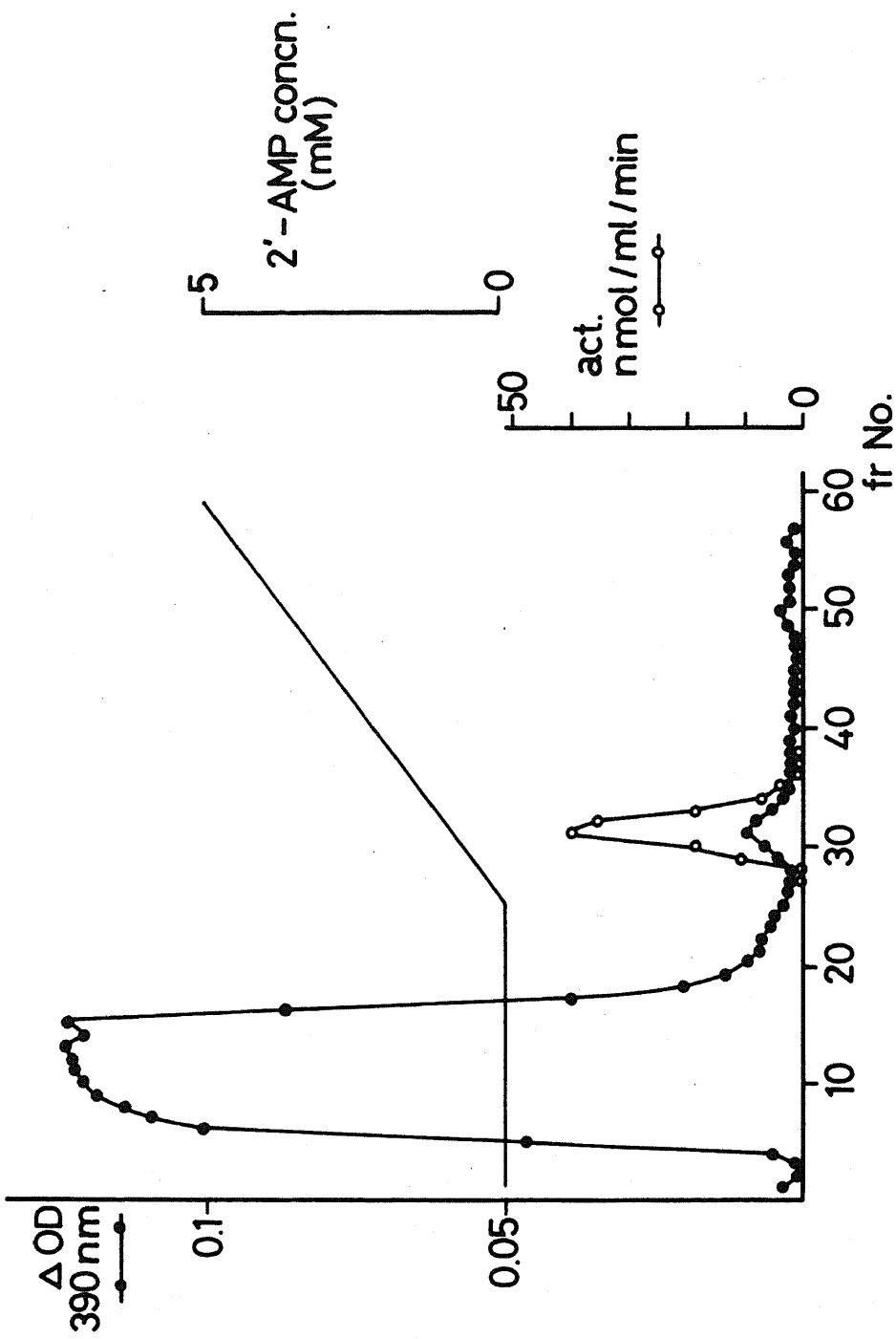


Figure 3-3. 2',5'-ADP Sepharose 4B column chromatography of DEAE Sepharose CL-6B column eluate.

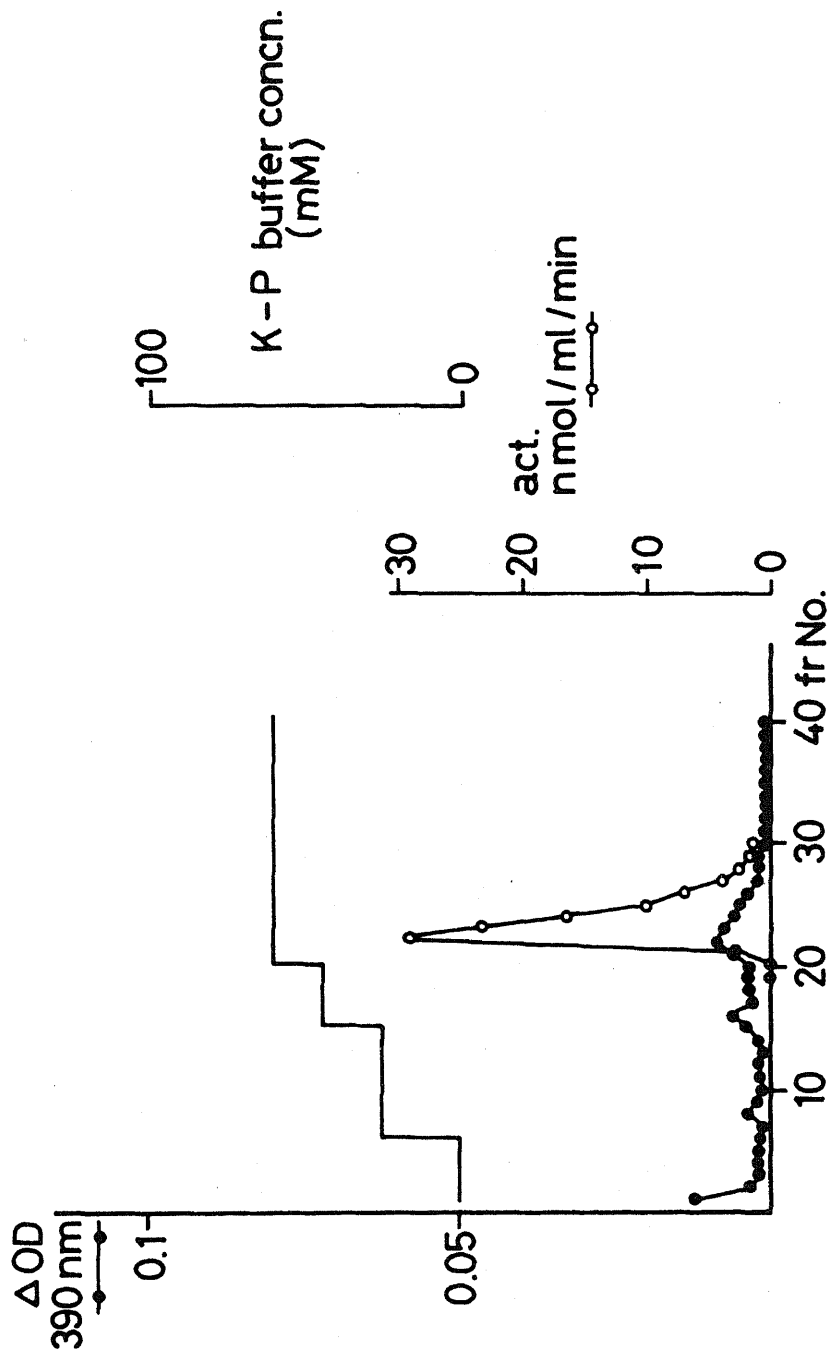


Figure 3-4. Hydroxylapatite column chromatography of 2',5'-ADP Sepharose 4B column eluate.

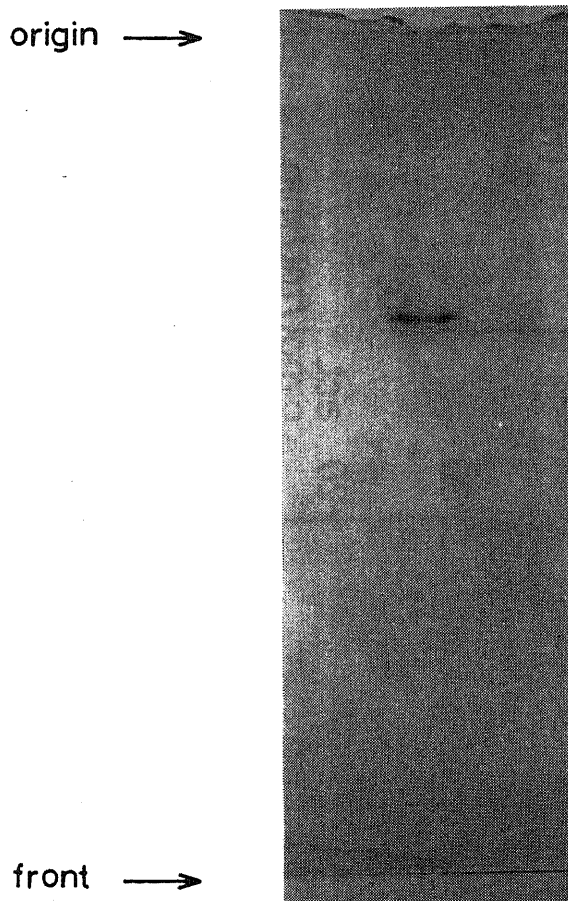


Figure 3-5. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified MFAO. About $7.5\mu\text{g}$ of purified enzyme was electrophoresed in a 10% gel containing 0.1% SDS.

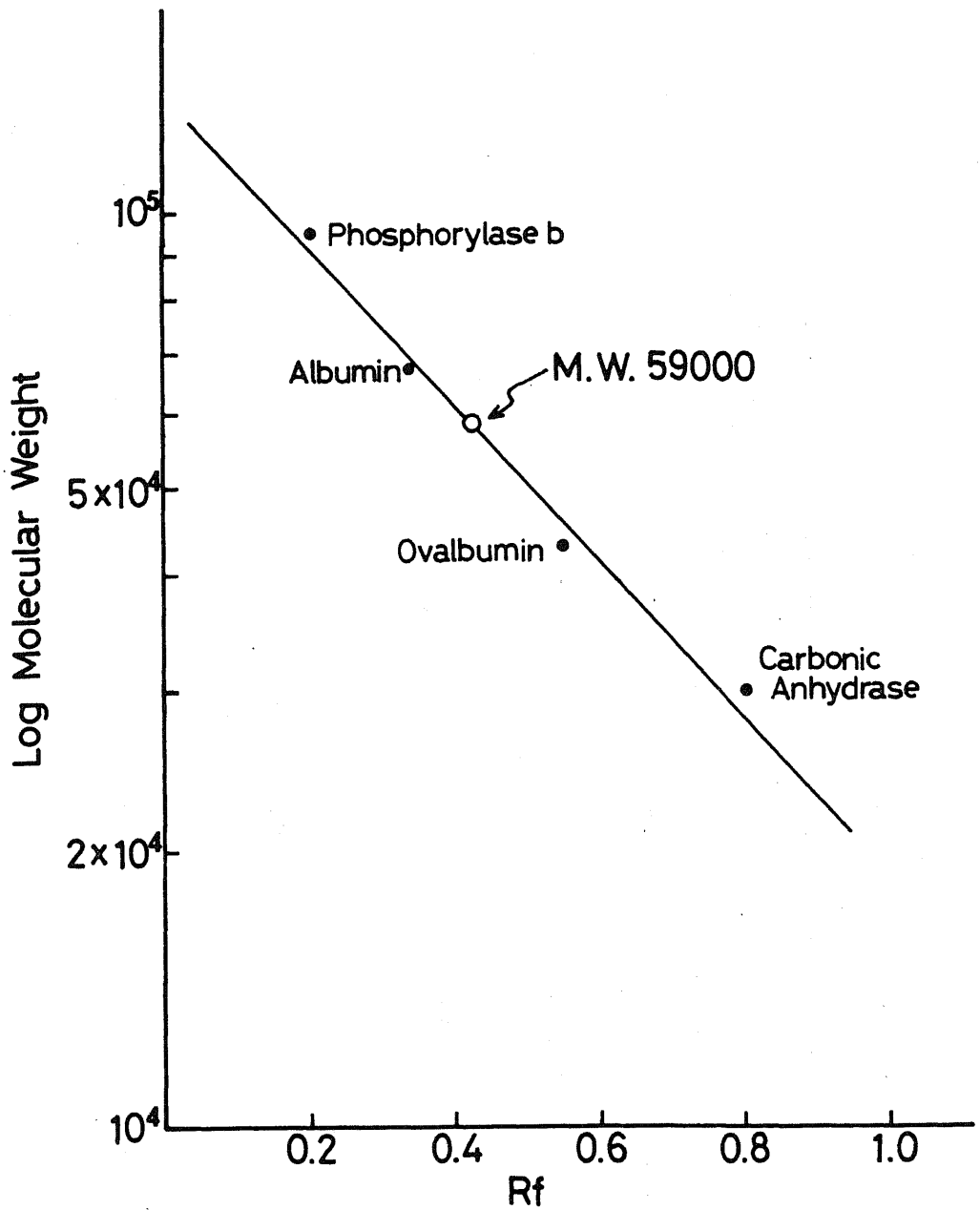


Figure 3-6. Molecular weight determination by calibrated 0.1% SDS-10% PAGE.

Table 3-2 Purification of MFAO from liver microsomes from non-treated rats

	Protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/mg/min)	Purification (fold)	Recovery (%)
Microsomes	1640	2030	1.24	1	100
DEAE-Sepharose CL-60 column elute	91.5	2037	22.3	18	100
2',5'-ADP-Sepharose column elute	2.1	602	287	131	30
Hydroxyapatite column elute	0.67	289	431	348	14

する事から、かなりイオン強度に対して敏感である。Yasukochi と Masters¹²⁰⁾ は NADPH - Cyt. P-450 Reductase の精製に 2', 5' -ADP Sepharose 4B を用いているが、これは著者の場合も同様に MFAO の精製に非常に有効であった。この column は NADP⁺ - dependent な酵素に対し強い affinity を持っているので、この様な酵素の分離には適していた。なお本酵素は -20℃ で保存するかぎり少なくとも 6 ヶ月間は活性の変化は見られなかった。

第2節 Mixed function amin oxidase による ^{14}C -4-dimethylaminoazobenzene 及び ^{14}C -4-methylaminoazobenzene の代謝

ラットのMFAOを用いてアミノアゾ色素の代謝を調べた研究はまだなされていない。そこでアミノアゾ色素の代謝体をHPLCで分離して定量法を確立すると共に、MFAOによる ^{14}C -DAB及び ^{14}C -MABの代謝体をMC microsome系の場合と比較した。

[方法] NADPH 0.5mM, MC microsome 0.1 mg もしくは MFAO 1unit (1nmol DMA N-oxide formed/min)、に基質を50 μ l のメタノールに溶解し最終濃度0.1mM になるように調整、以上を50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) に溶解させ1mlとした。このincubation mixtureを37 $^{\circ}\text{C}$ で10分間incubateした後2mlのbenzeneで2回抽出し、benzene層を真空中で乾燥した。残渣を100 μ lのメタノールに溶解し、90 μ lをHPLCで分離定量した。分離法は55%メタノールで1分間流した後、55%メタノールから90%メタノールまで32分間のlinear gradientによりmetaboliteを溶出させた。流量は0.8ml/minであり、溶出液は30秒づつ回収し、その全量を液体シンチレーションカウンターで定量した。

^{14}C -DAB (1.4mCi/nmol) はNew England Nuclear, Co. Ltdより購入した。 ^{14}C -MABは ^{14}C -aniline塩酸塩(5.9mCi/nmol)をNew England Nuclear, Co. Ltd.より手に入れ第1章第2節に示

した方法により合成し、HPLCにより分離精製した。

〔結果〕 MC microsome による ^{14}C -DABのmetabolite の分離パターンを Fig 3-7 に示す。Peak a (retention time(RT): 4 min), peak b (RT: 14 min)はまだ同定できていない。Peak c (RT: 24 min)はN-OH-AB, peak d (RT: 27 min)は4'-OH-MAB, peak e (RT: 30 min)はAB, peak f (RT: 32 min)はN-OH-MAB, peak g (RT: 34 min)は4'-OH-DAB, peak h (RT: 37 min)はMABと同定された。peak k (RT: 44 min)は基質のDABである。DABのmetaboliteのうちazo還元による代謝体はRT: 20 minまでに溶出されるが、benzeneでは抽出できなかった。一方、1 unitのMFAOによる代謝体はFig 3-8 に示すようにほとんど検出されない。しかしながらMAB (peak h)とDAB (peak k)との間に2つのpeakが出現した。本酵素のみではDABからMABへの脱メチル化はほとんど起らなかった。Incubation mixture中に鉄が2 nmol 共存するとFig 3-9に見られるようにMABが生成する。その時同時にN-OH-MABが生成する。ここで用いられる鉄は2価鉄、3価鉄のどちらでもそれほど効果は変わらず、Cyt. c の様なhemeに配位した鉄でもMABの生成にはそれほど差は見られない。この時の代謝量をtable 3-3に示す。MC microsomeでの代謝体の大部分はMABでtotalのmetaboliteの75%以上であり、MABからの代謝を考えるとprime ringの水酸化よりはるかに多く、prime ringの水酸化は10%にもみえない。一方、MFAOでの代謝は鉄の

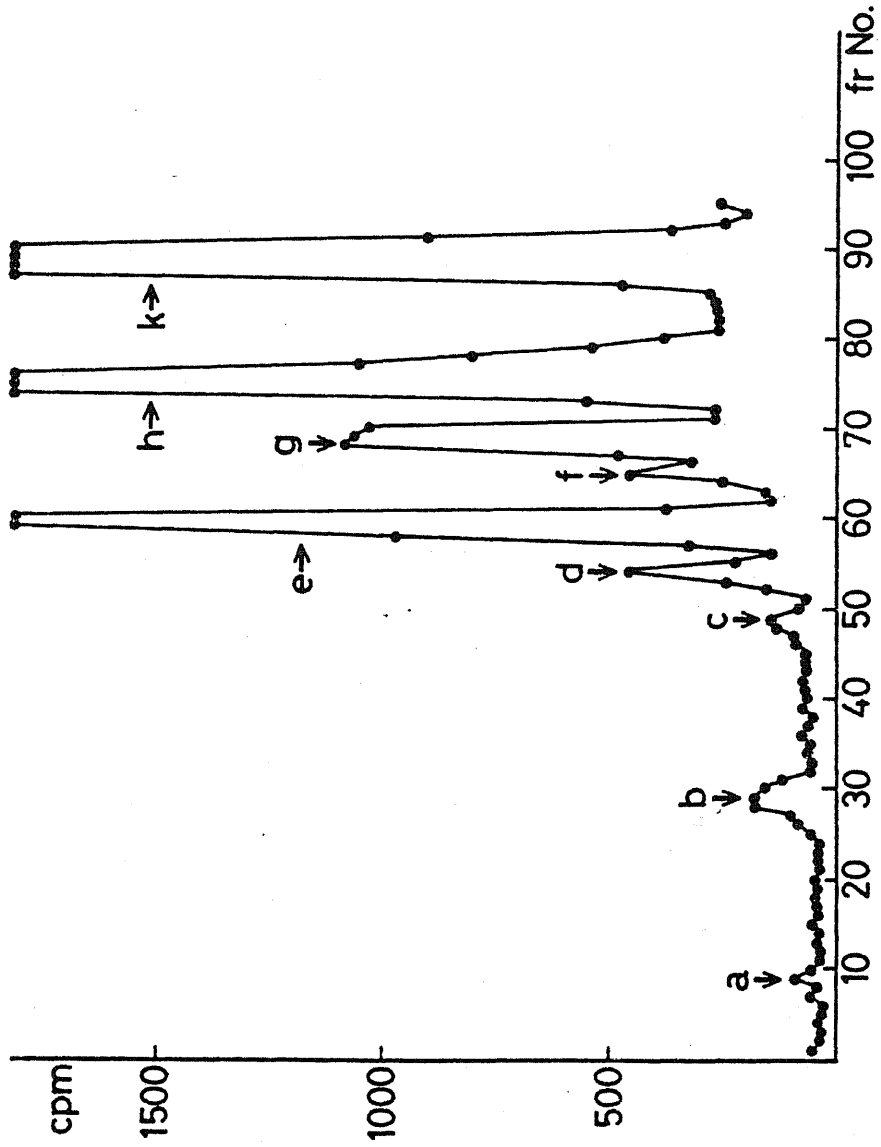


Figure 3-7. HPLC profile of the metabolites of ¹⁴C-DAB with liver microsomes from MC-treated rats.
 a. and b. unknown, c. N-OH-AB, d. 4'-OH-MAB, e. AB
 f. N-OH-MAB, g. 4'-OH-DAB, h. MAB, i. and j. unknown, k. DAB.

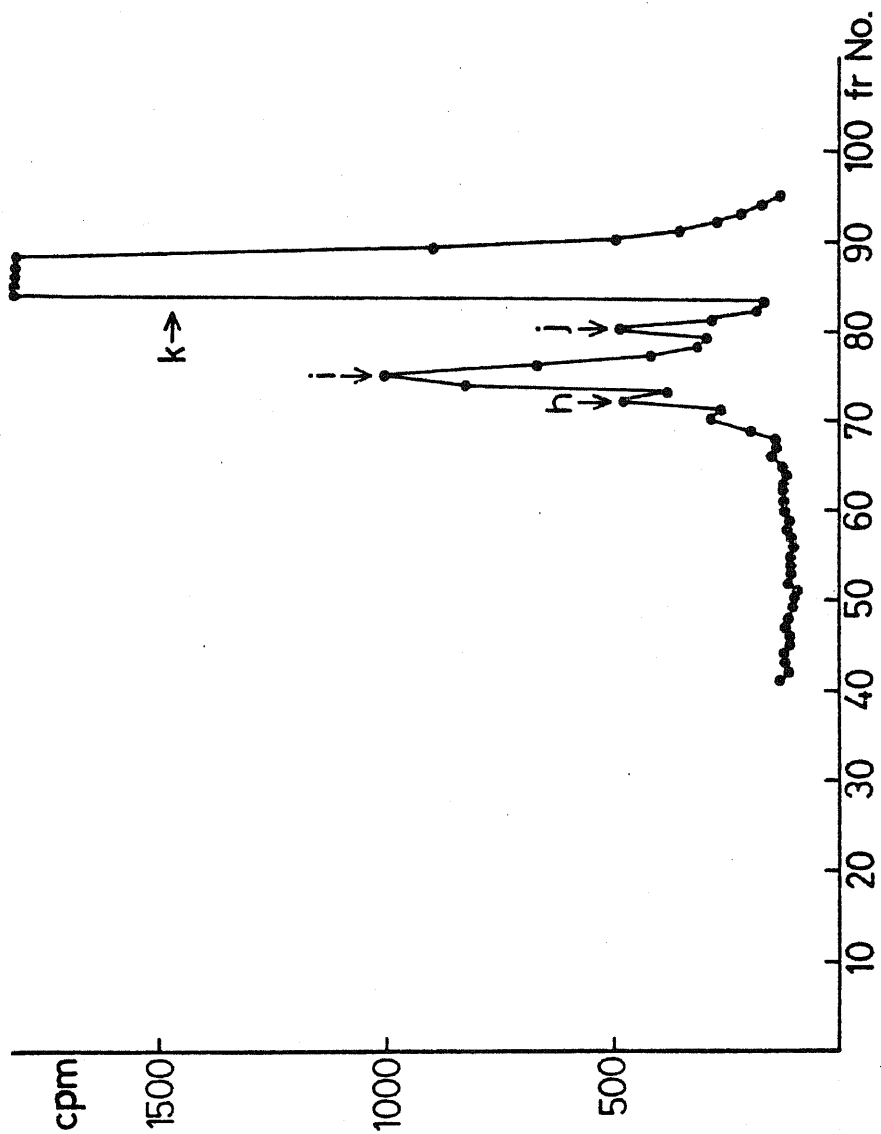


Figure 3-8. HPLC profile of the metabolites of ^{14}C -DAB with purified MFAO. Numbering of the metabolites is the same as in Figure 3-7.

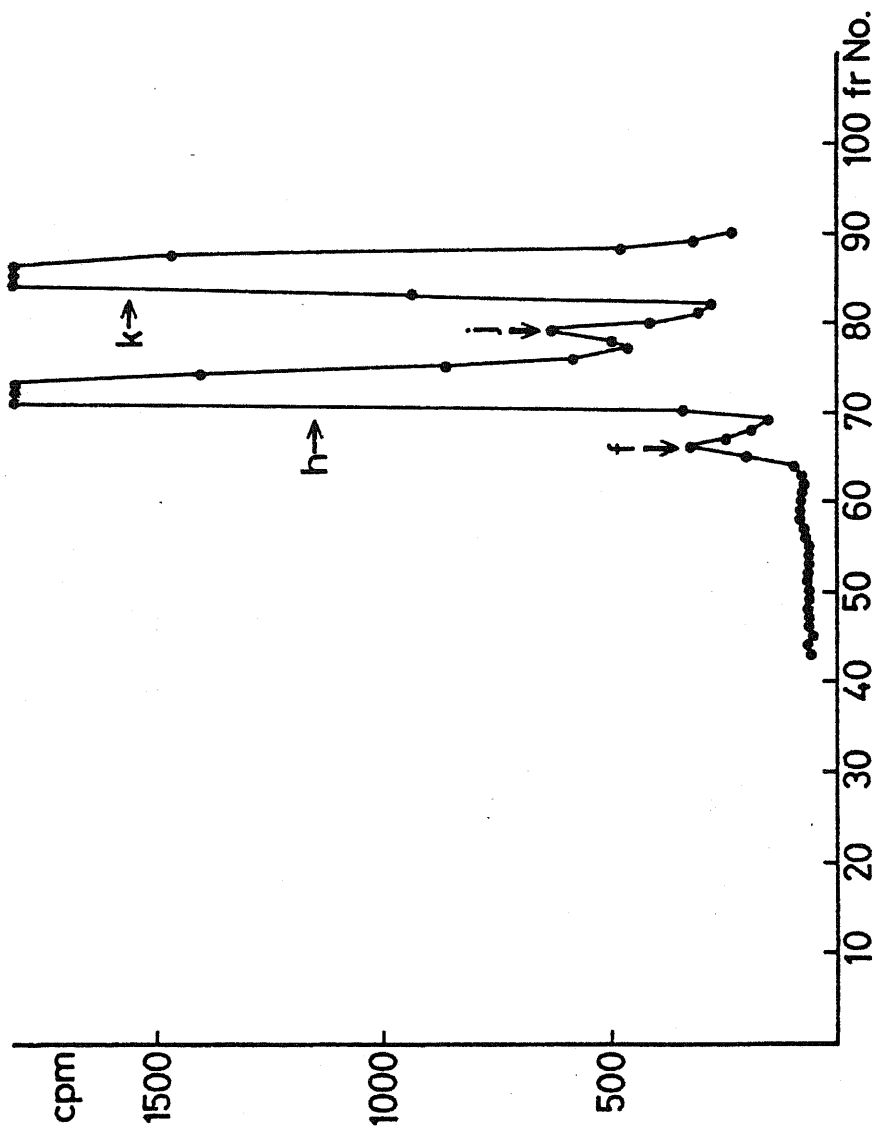


Figure 3-9. HPLC profile of the metabolites of ^{14}C -DAB with purified MFAO and Fe^{2+} .
 Numbering of the metabolites is the same as in Figure 3-7.

Table 3-3 Metabolism of DAB with the purified MFAO from rat liver microsomes in comparison with metabolism with microsomes and the effect of ions on the MFAO system

Metabolite	Microsomes (nmol/mg/min)	MFAO (nmol/unit/min)			
		control	+ FeCl ₂	+ FeCl ₃	+ cyt. C
N-OH-AB	0.05 ± 0.01 ^{a)}	n. d. ^{b)}	n. d.	n. d.	n. d.
4'-OH-MAB	0.19 ± 0.03	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
AB	1.52 ± 0.19	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
N-OH-MAB	0.16 ± 0.01	n. d.	0.05 ± 0.003	0.04 ± 0.005	0.04 ± 0.003
4'-OH-DAB	0.68 ± 0.05	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
MAB	7.49 ± 0.49	0.03 ± 0.004	0.47 ± 0.06	0.43 ± 0.08	0.35 ± 0.06

a) means ± S.D.

b) n. d. means not detected.

存在下ではD A BのN位脱メチル化が起り、鉄の非存在下でのN位脱メチル化に比べ活性は10倍以上になる。

¹⁴C-M A BのM C microsome における代謝はFig 3 - 10に示す。M A BはM C microsome によりN - O H - M A B, A B, 4' - O H - M A B, N - O H - A Bへと代謝される。一方、M F A OではN - O H - M A Bのみが検出され(Fig 3 - 11)、M A BからのN - O H - M A B生成には鉄の存在は不要であった。この時の代謝量をtable 3 - 4に示す。

M A BのM C microsome による代謝の主な産物はA Bであり、全体の85%以上をしめる。

[考察] M F A OはDMAでよく知られているように3級アミンの場合はN - oxide を生成し、鉄の存在下、このN - oxide は容易に転移を起し2級アミンになる。著者もM F A Oが鉄の存在下、D A BをM A Bへと代謝する事を確認した。一方、2級アミンの場合は鉄の存在は必要なく、N - O H - M A Bを生成するが、A BへのN位脱メチル化は観察されなかった。M F A OにおけるD A Bの代謝においてM A BとD A Bの間に2つの不明のpeakが存在するが、M F A OではD A BのN - oxide を生成する事から、この2つのpeakのうちどちらかはD A BのN - oxide の可能性がある。

M C microsome 中にはM F A Oは約1.2 unit/mg存在する事から、D A BのN位脱メチル化における寄与は少ないと思われるが、DMAを基質にした場合、microsome にはCyt. P - 450, Cyt. b₅ 等多くの

鉄が存在する事から、microsomeにより生成したDMAのN - oxideは容易に脱メチル化を受けN - methylanilineになる。この事はmicrosomeにおけるMFAOの量を充分低く見積る原因となるはずであり、精製した酵素からDABの脱メチル化反応への寄与を定量的に算出するのは難かしい。同様にMABのN位水酸化への寄与は定量できず、これを行うにはmicrosomeでの抗体による阻害を調べる方がより正確と考えられる。

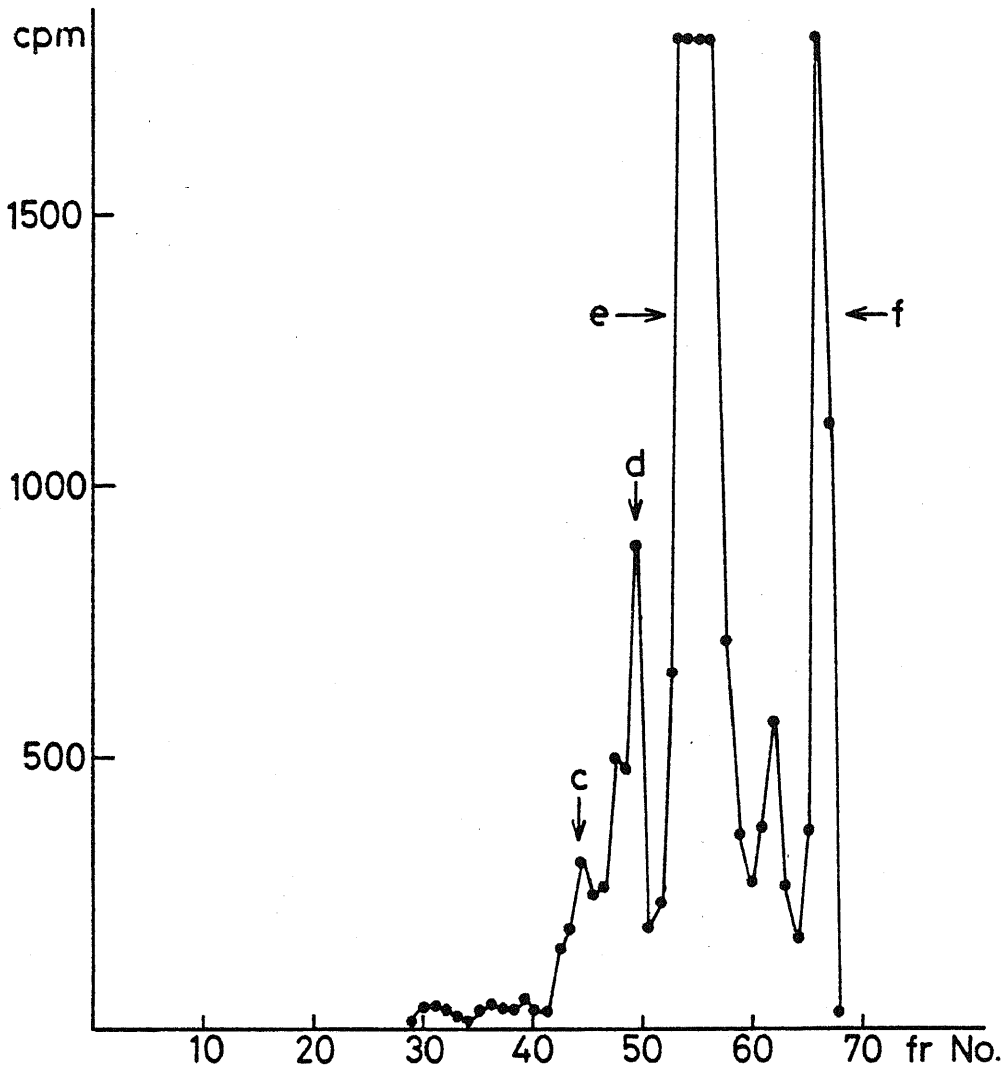


Figure 3-10. HPLC profile of the metabolites of ^{14}C -MAB with liver microsomes from MC-treated rats. Numbering of the metabolites is the same as in Figure 3-7.

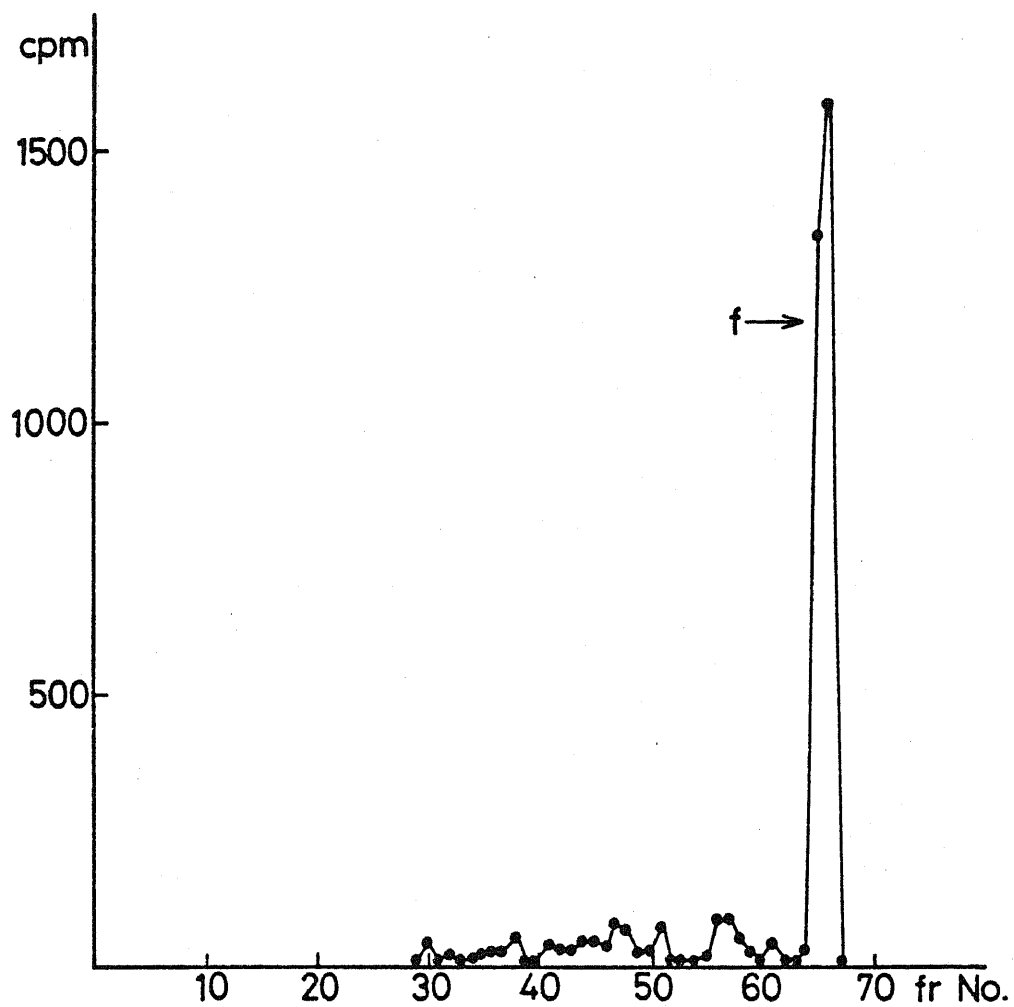


Figure 3-11. HPLC profile of the metabolite of ^{14}C -MAB with purified MFAO. Numberig of the metabolites is the same as in Figure 3-7.

Table 3-4 Metabolism of ¹⁴C-MAB with the purified MFAO from rat liver microsome in comparison with metabolism with microsomes from MC treated rats.

Substrate	Microsomes (nmol/mg/min)	MFAO (nmol/U/min)
N-OH-AB	0.085	—
4'-OH-MAB	0.236	—
AB	3.334	—
N-OH-MAB	0.323	0.020

[小括]

1. MFAOがラット肝microsomeより glycerol 存在下、DEAE-Sephrose CL-6B, 2', 5'-ADP-Sephrose 4B, hydroxylapatite column を用いて精製できた。本酵素の分子量は豚の酵素とほぼ同じ59,000であったが比活性は豚の酵素より低く約 $1/2.5$ であった。
2. 精製したMFAOはDABのN-oxide 生成能があり、鉄の存在下N位脱メチル化を起す。さらに本酵素はMABのN位水酸化を起す。

第 4 章 各種抗体による N 位水酸化及び変異性 に対する影響

第4章 各種抗体によるN位水酸化及び変異原性に対する影響

前章までにMABのN位水酸化にはMFAOとCyt. P-450の両酵素が関与する事がわかった。Cyt. P-450には種々の分子種が存在し、Sato等¹²²⁾はウサギ肝microsomeより13種のCyt. P-450を精製している。ラット肝microsomeからはKawahara等¹²³⁾, Kamataki等¹²⁴⁾, Ryan等¹²⁵⁾が5種のCyt. P-450を精製している。これら種々の分子種は免疫的に区別出来るものも多く¹²⁶⁾、多くの発癌剤の代謝及び変異原性は免疫抗体を用いてそのCyt. P-450分子種の寄与を定量できる事から^{127) 128)}、MABのN位水酸化へのMFAO、Cyt. P-450の関与を定量的に扱うには抗体による阻害を調べるのがより正確である。著者はPBで誘導されるmainのCyt. P-450(PB-1)、MCで誘導されるmainのCyt. P-450(MC-1)、NADPH-Cyt. P-450 reductase (f_{PT})、MFAOの各種抗体を作製しその影響を調べた。

第 1 節 N 位水酸化活性に対する影響

第 2 章、第 3 章において M A B の N 位水酸化には M F A O 及び Cyt. P - 4 5 0 が関与する事がわかった。この N 位水酸化に関与する酵素を定量的に調べる為に各種抗体を用い、その free radical 生成及び第 3 章に示した H P L C による分離法を用いて N 位水酸化体を定量した。

〔方法〕 P B により誘導される main の Cyt. P - 4 5 0 (P B - 1, low spin) 及び M C により誘導される main の Cyt. P - 4 5 0 (M C - 1, low spin) の抗体は Harada と Omura の方法により作製した¹²⁹⁾。F P T の抗体は Omura と Takesue の方法により得た¹³⁰⁾。M F A O の抗体はウサギの foot pad 及び背部皮内に合計 4 5 0 unit の抗原を当量の Freund の complete adjuvant と共に投与し、その 1 週間後より 7 日おきに 1 5 0 unit の抗原を 3 回耳静脈より追加免疫した。最終投与から 7 日目に全血採血し、血清を 2 5 ~ 4 5 % 飽和の硫酸分画し、M F A O 抗体を得た。Cyt. P - 4 5 0 及び f P T の抗体の ouchterlony double diffusion analysis は Harada と Omura の方法に従った¹²⁹⁾。M F A O の場合は detergent を 0.2 % Triton x - 1 0 0 に替えて行った。Cyt. P - 4 5 0 及び f P T の抗体による反応阻害は、まず microsome と抗体を室温で 2 0 分間 incubate した後に、基質及び N A D P H を加え 3 7 ° C で 1 0 分間 incubate した。M F A O 抗体の場合は microsome を Triton 混液で可溶化した後に抗体と反応させ、これを 9,000 g で 2 0 分間遠心分離した後に、その上清を用いて代謝を調べた。B(a)P の

水酸化は Nebert と Gelboin の方法に従った¹³¹⁾。

〔結果〕 作製された4種の抗体は Fig 4-1 a.b にみられるように、互に cross しない。

MC micrososome での free radical 生成に対する f_{PT} の抗体の影響を Fig 4-2 に示す。F_{PT} 抗体では MC micrososome に対し約1.5倍の抗体を加えた場合 Cyt. C の還元活性を85%阻害したのに3'-Me-MAB からの free radical 生成を30%阻害しただけであった。またこの抗体は MFAO 活性には影響がなかった。Anti-PB-1 antibody と anti-MC-1 antibody による阻害を Fig 4-3 に示す。Anti-PB-1 antibody は MC micrososome における B(a)P hydroxylation と同様に3'-Me-MAB よりの free radical 生成を阻害しない。一方、anti-MC-1 antibody は B(a)P hydroxylation を90%阻害するが、3'-Me-MAB からの free radical 生成は35%しか阻害されなかった。

Anti-MFAO antibody の影響は Fig 4-4 に示す。20% glycerol 存在下では free radical 生成は小さく定量できなかった。可溶化の段階で20% glycerol を除き anti-MFAO antibody の効果を調べると、DMA の N-oxide 活性は85%程阻害された。しかしこの可溶化した micrososome は元の micrososome に比べ活性が低く約1/2であった。この条件で3'-Me-MAB からの free radical 生成は阻害されなかった。

次に第3章第2節で用いた方法により HPLC により metabolite を

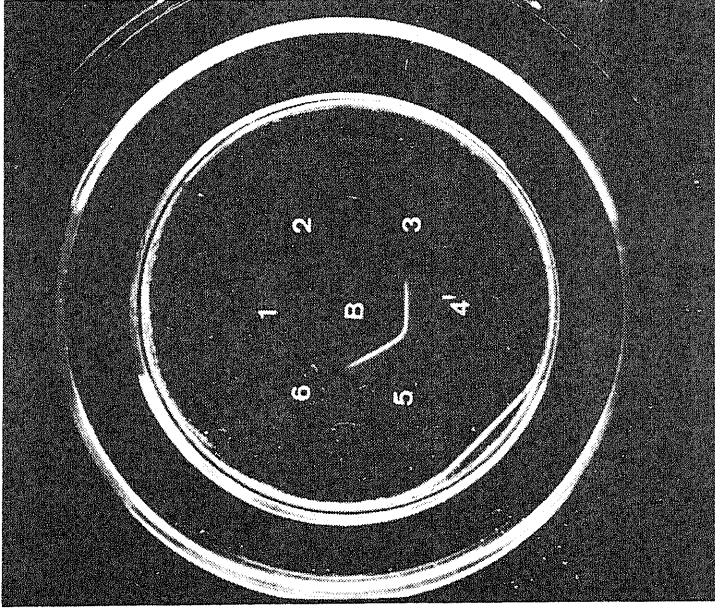
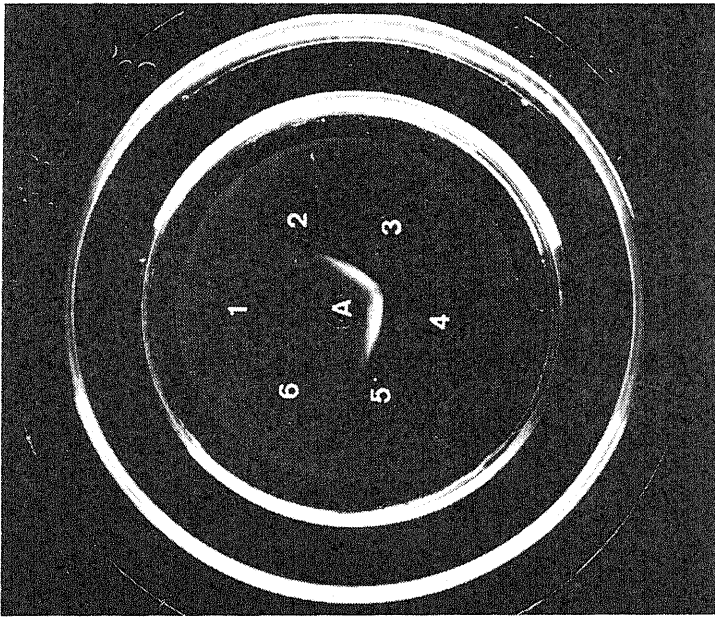


Figure 4-1. (a) Ouchterlony double diffusion test of rabbit antibodies against PB-1 and MC-1. Wells(A) and(B) contained about 0.5mg protein of anti-PB-1 IG and 0.3mg protein of anti-MC-1 IG, respectively. Well(1); saline, Well(2); 15 μ g of fPT, Well(3); 0.1nmol of PB-1 Well(4); 0.1mg of PB microsme., Well(4'); 0.1mg of MC micrososome. Well(5); 0.1nmol of MC-1, Well(6); 1 unit of MFAO.

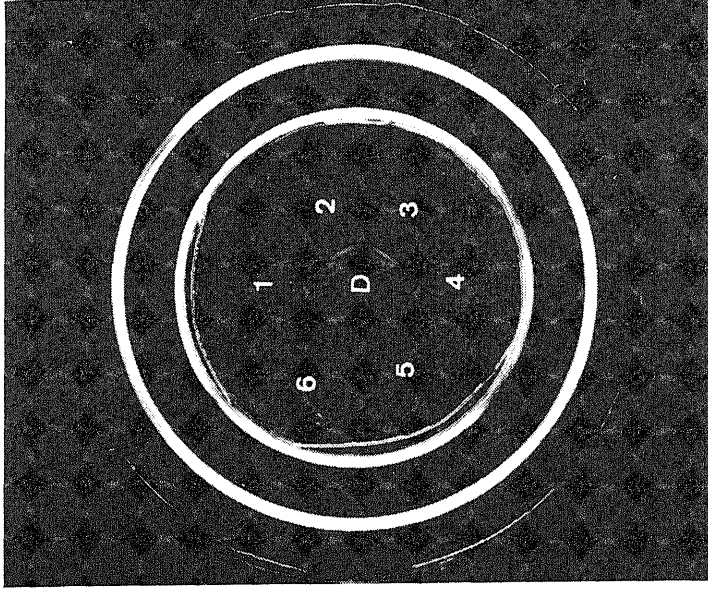
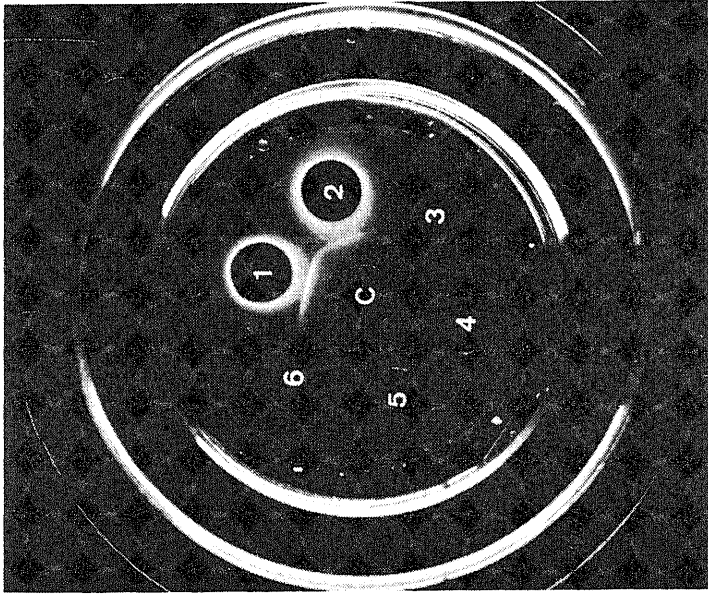


Figure 4-1. (b) Ouchterlony double diffusion test of rabbit antibodies against MFAO and fPT. Wells(C) and (D) contained about 0.3mg protein of anti-MFAO antibody and anti-fPT antibody, respectively. Well(1); 1 unit of MFAO, Well(2); 0.1mg of non-treated microsome Well(3); 15µg of fPT, Well(4); 0.1nmol of PB-1, Well(5); 0.1nmol of MC-1, Well(6); saline.

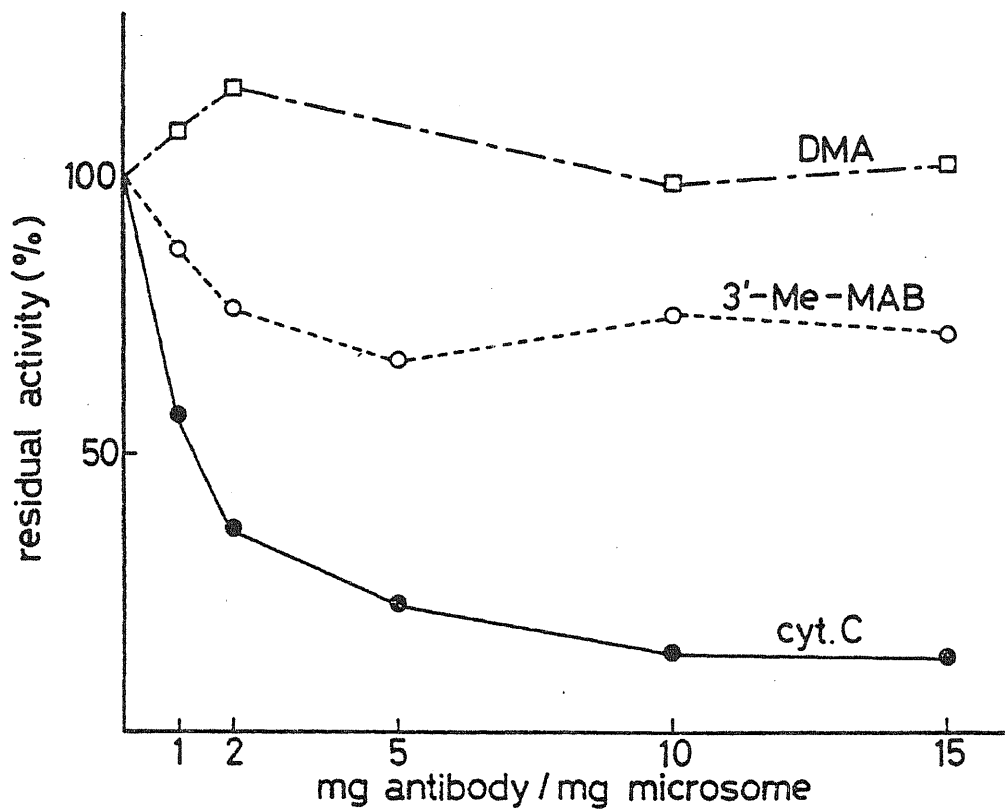


Figure 4-2. Inhibition of cyt.C reduction and 3'-Me-MAB N-hydroxylation activities by anti-fPT antibody.

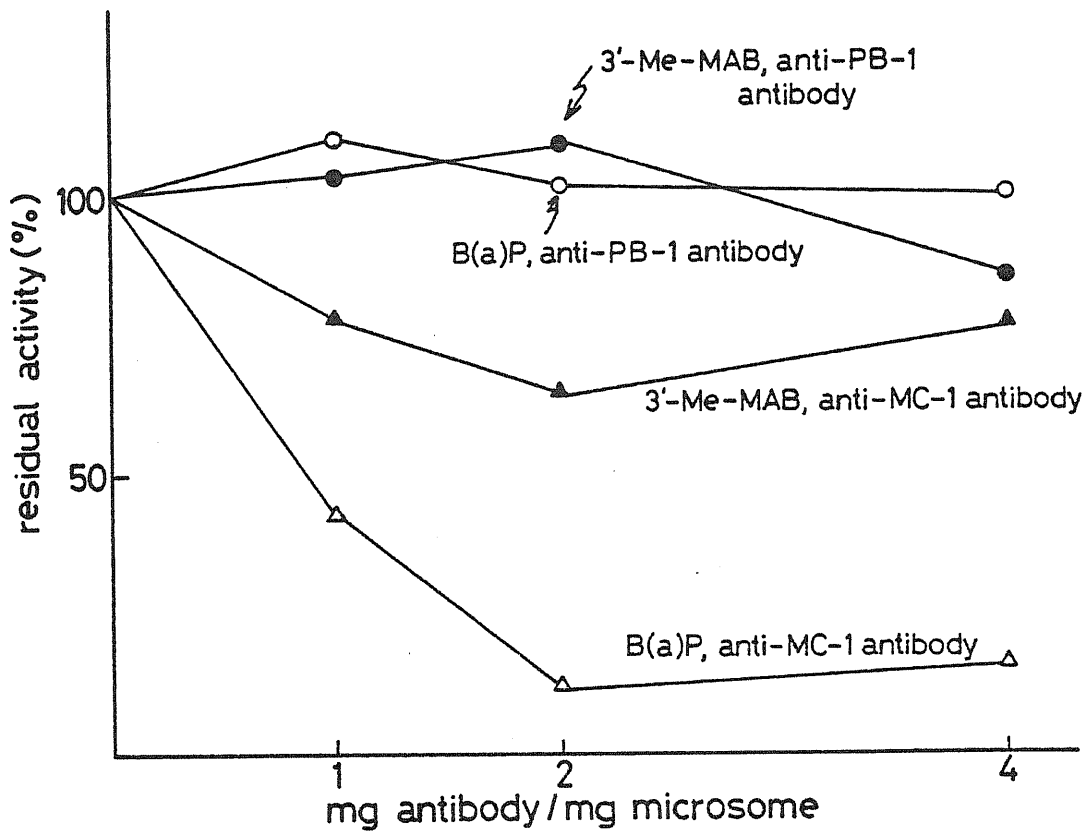


Figure 4-3. Inhibition of Benzo(a)Pyrene hydroxylation and 3'-Me-MAB N-hydroxylation activities by anti-PB-1 antibody and anti-MC-1 antibody.

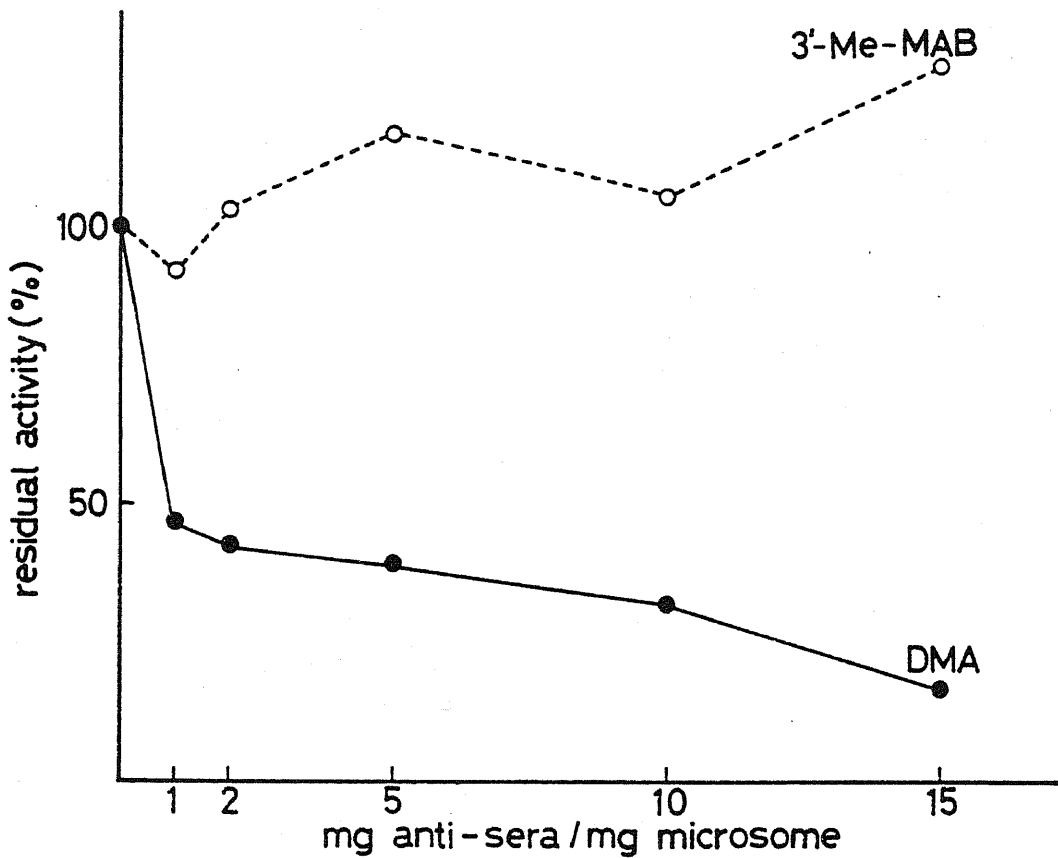


Figure 4-4. Inhibition of DMA N-oxide formation and 3'-Me-MAB by anti-MFAO antibody.

分離し、各種抗体の効果を調べた。MC microsomes における N-OH-MAB の生成は anti-MC-1 antibody により 35% 阻害されるが、anti-PB-1 antibody ではほとんど変わらない。また AB の生成は anti-MC-1 antibody のみによって 55% 阻害された。4'-OH-MAB の生成は anti-PB-1 antibody 及び anti-MC-1 antibody の両方でそれぞれ 20%、35% 阻害された。また N-OH-AB の生成は anti-MC-1 antibody で完全に阻害された (table 4-1)。

PB microsomes に対する各種抗体の影響を table 4-2 に示す。

Anti-PB-1 antibody ではほとんどの活性をおさえられなかった。一方、anti-MC-1 antibody での阻害は N-OH-MAB, AB, 4'-OH-MAB の生成に対し若干の影響をあたえるが、その効果は、MC microsomes の時よりも弱い。

無処置の microsomes では anti-PB-1 antibody, anti-MC-1 antibody 共に MAB の N 位水酸化を阻害しなかった (table 4-3)。また N-OH-AB の生成に対してもこの両抗体による阻害は同程度であり約 55% 阻害した。MAB の prime ring の水酸化、N 位脱メチル化に対しては anti-MC-1 antibody の方がより強い効果を持っている。

〔考察〕 3'-Me-MAB からの free radical 生成に対し MFAO 抗体が阻害効果を示さなかったのは可溶化段階における MFAO の失活により、microsomes 中での free radical 生成がみかけ上 Cyt. P-450 だけが関与する反応になった為と思われる。Anti-fPT antibody に

Table 4-1 Inhibition of ¹⁴C-MAB metabolism by anti-PB-1 antibody and anti-MC-1 antibody with liver microsomes from 3-MC treated rats

	(nmol/mg/min)		
	cont. serum	anti PB-1 antibody	anti MC-1 antibody
4'-OH-AB	0.008	0	0
N-OH-AB	0.018	0.021	0
4'-OH-MAB	0.086	0.069	0.056
AB	0.875	0.997	0.400
N-OH-MAB	0.040	0.043	0.027

antibody/MC microsomes = 4

Table 4-2 Inhibition of ¹⁴C-MAB metabolism by ant-PB-1 antibody and anti-MC-1 antibody with liver microsomes from PB treated rats.

	(nmol/mg/min)		
	cont. serum	anti PB-1 antibody	anti MC-1 antibody
4'-OH - AB	0.002	> 0.001	> 0.001
N - OH - AB	0.004	0.001	0.003
4'-OH - MAB	0.043	0.039	0.032
AB	0.282	0.280	0.257
N - OH - MAB	0.023	0.024	0.028

antibody/PB microsomes = 4

Table 4-3 Inhibition of ¹⁴C-MAB metabolism by anti-PB-1 antibody and anti-MC-1 antibody with liver microsomes from non-treated rats

	(nmol/mg/min)		
	cont. serum	anti PB-1 antibody	anti MC-1 antibody
4'-OH - AB	> 0.001	0	0
N-OH - AB	0.014	0.006	0.006
4'-OH - MAB	0.084	0.072	0.057
AB	1.460	1.400	1.220
N-OH - MAB	0.018	0.023	0.025

antibody / non-treated microsomes = 4

よる free radical 生成阻害は 30% であり、anti-f_{PT} antibody が Cyt. P-450 の電子伝達系の total activity を阻害する事から¹³²⁾、microsome 中における Cyt. P-450 系の関与は 30% 程度と思われる。これは anti-PB-1 antibody により阻害されず、anti-MC-1 antibody によって 35% 阻害される事から、MC microsome 中にあり、MAB の N 位水酸化に関与するのは MC で誘導される Cyt. P-450 (MC-1、low spin) である。これは同様に HPLC による分離定量からも示唆された。

第2節 変異原性に対する影響

第1章第4節に述べた様にmutation frequency とDAB誘導体の発癌性は相関する。一方、代謝のうち、MABのN位水酸化速度がその発癌性と相関し、これに関与する酵素の同定、定量を前節までに報告した。そこでアミノアゾ色素のmutationに関与する酵素を定量し、発癌過程におけるmutationの役割を考察する。

〔方法〕 S-9に抗体を加え30℃で20分間incubateする。Incubate後、発癌剤、salmonella TA98を加え第1章第4節の方法でmutation frequencyを定量した。

〔結果〕 Fig 4-5に示されるようにanti-f_{PT} antibodyによりDAB, MAB, 3'-Me-DAB, 3'-Me-MABのmutagenicityは90%前後阻害される。この阻害はanti-MC-1 antibodyにより同様に強く現れ(89~97%) (Fig 4-6)、anti-PB-1 antibodyではほとんど阻害されずDAB, MAB, 3'-Me-DAB, 3-Me-MABでそれぞれ20%、5%、8%、10%であった。

〔考察〕 アミノアゾ色素の変異原性における代謝活性化はanti-f_{PT} antibody, anti-MC-1 antibodyの結果からほとんどMCで誘導されるmainのCyt. P-450を経由していると考えられる。

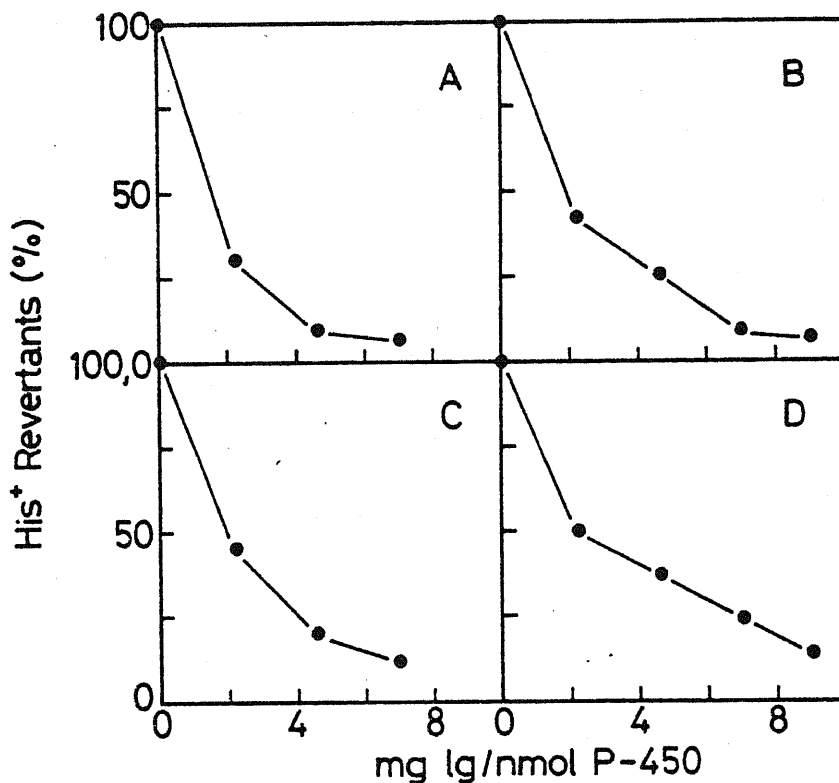


Figure 4-5. Effect of antibody to NADPH-cytochrome P-450 reductase on the mutagenic activities of DAB (A), MAB (B), 3'-methyl-DAB (C) and 3'-methyl-MAB (D). 12.6 μ g of DAB or 3'-methyl-DAB, or 6.25 μ g of MAB, 3'-methyl-MAB was incubated with 1.8 nmoles of total cytochrome P-450 in the S-9 fraction of liver from PCB-treated rats in the presence of antibody. The His⁺ revertants in the presence of antibody are shown in the figure as percentages of the revertants with control Ig, the numbers of which were 387 with DAB; 596 with MAB; 431 with 3'-methyl-DAB; and 572 with 3'-methyl-MAB.

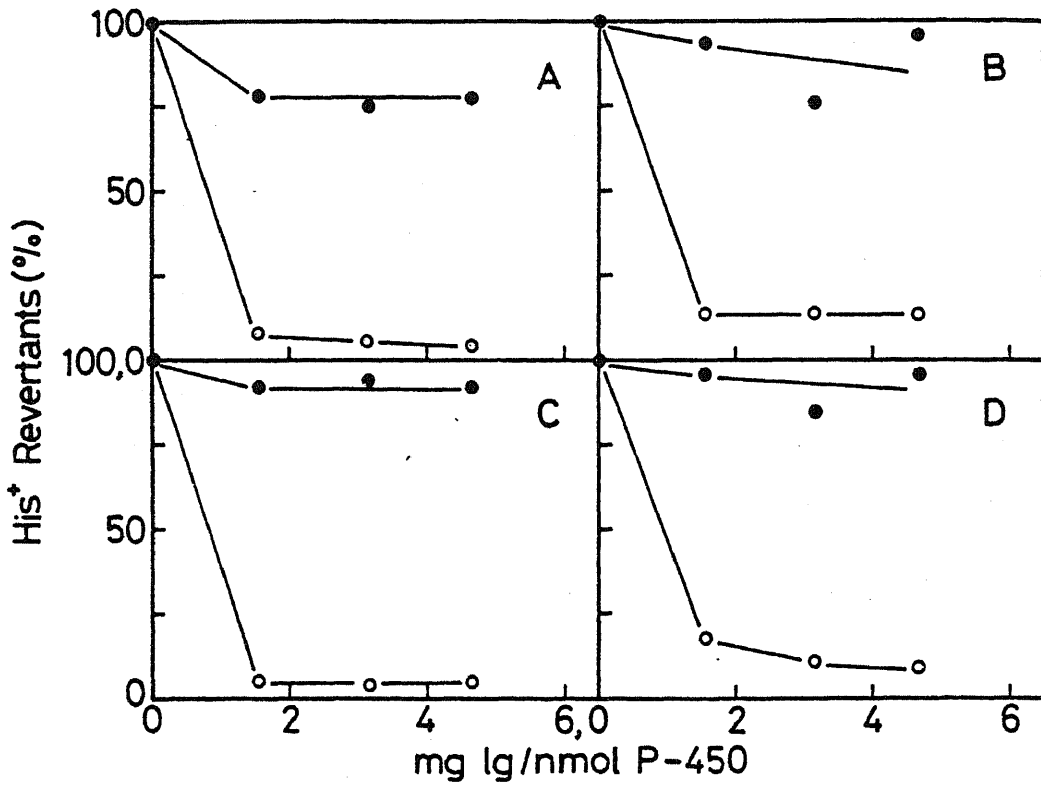


Figure 4-6. Effects of antibodies to MC-P-448 and PB-P-450 on the mutagenic activities of DAB (A), MAB (B), 3'-methyl-DAB (C) and 3'-methyl-MAB (D). The experimental conditions were as for Figure 4-5. ○ MC-P-448; ● PB-P-450.

[小括] アミノアゾ色素の発癌過程での代謝活性化における
MABのN位水酸化に関与する酵素はMFAOがmainであり Cyt. P-
450はminorである。特にMCで誘導される Cyt. P-450を経由す
る pathway を持つにもかかわらず、MC microsome 系ですら Cyt.
P-450のN位水酸化への寄与は40%以下であった。一方、アミノアゾ色素
の変異原性は完全に Cyt. P-450に depend した反応である事から、アミノア
ゾ色素の変異原性の活性化は発癌性のそれとは別の経路を通っていると
考えられる。

Hashimoto 等¹³³⁾ は ABがS-9存在下変異原性を示す事を見出し
ており、またN-OH-ABがN-OH-MABと同様に強い変異原性
を示す事^{134) 135) 136)} や anti-MC-1 antibody で完全に阻害される
のはN-OH-AB以外になかった事などから変異原性に関与する
ultimate formはN-OH-ABであると考えられる。

第 5 章 結 論

第5章 結 論

1. アミノアゾ色素の発癌性と2級アミンのN位水酸化速度がきれいな対応関係を示し、N位水酸化体生成が、発癌反応の律速であること、ならびに発癌に必要なN位水酸化体の生成量には閾値の存在する事がわかった。一方、発癌性と変異原性との間にも平行関係が見られたが、活性化に関与する酵素が異なる事から、この平行関係は見かけ上のものであり、変異原性の場合には1級アミンのN位水酸化が主要な活性化経路であることがわかった。従って変異原性と発癌性のイニシエーションが密接に関連するという一般則はアミノアゾ色素については正しくない事がわかった。
2. ラット肝より初めてMFAOを精製する事に成功した。これは分子量59,000であり豚のMFAOとほぼ同程度であったが、豚のMFAOに比べて著しく不安定で、この事が今まで本酵素の精製ができなかった理由である。MFAOは3級アミンのN-oxide生成に関与し、鉄の存在下容易に転移反応を起して、2級アミンとなる。さらにMFAOはこの2級アミンのN位水酸化に関与する事がわかった。
3. 従来アミノアゾ色素の2級アミンのN位水酸化はもっぱらMFAOのみによるとされてきたが、阻害薬と抗体による阻害実験の結果MFAOとCyt. P-450の両者が関与する事が明らかになった。この場合、Cyt. P-450のうち、PB誘導型のCyt. P-450は全く関与せず、もっぱらMC誘導型のみが関与する事も明らかになった。

謝 辞

本研究に関して終始御指導御鞭撻をいただきました国立がんセンター研究所生物物理部部長永田親義博士、同室長児玉昌彦博士、埼玉県がんセンター研究所所長田頭勇作博士に衷心より感謝の意を表します。

また、本論文提出の機会を与えられ、さらに本論文の御校閲を賜りました千葉大学薬学部北川晴雄教授に深く感謝致します。

さらに本研究に協力して下さいました埼玉県がんセンター研究所生化学部米川博通博士、川尻要博士、渡辺潤子嬢、五十嵐滋之氏及び国立がんセンター研究所生物物理部井上富貴子嬢、相田美砂子嬢に厚く御礼申し上げます。

掲 載 雑 誌 目 録

第1章第1節の内容は *Biochemical Pharmacology* 28, 557～560 (1979) に下記の表題で掲載されたものである。

Nitroxide Radicals Generated from Carcinogenic Aminoazo Dyes During Their Metabolism in vivo and in Enzymatic System in vitro.

第1章第2節及び3節の内容は *Carcinogenesis* 3, 1393～1396 (1982) に下記の表題で掲載されたものである。

A Correlation of the Rate of N-Hydroxylation of Aminoazo Dyes with their Carcinogenic Activity in the Rat.

第2章の内容は *Gann* 73, 55～62 (1982) に下記の表題で掲載されたものである。

N-Hydroxylation Enzymes of Carcinogenic Aminoazo Dyes: A Possible Involvement of Cytochrome P-448

第3章の内容は *Biochemical and Biophysical Research Communications* 110, 640～645 (1983) に下記の表題で掲載されたものである。

Purification of Mixed-Function Amine Oxidase from Rat Liver Microsomes

第4章第2節の内容はBiochemical and Biophysical Research Communications 106, 164~169(1982) に下記の表題で掲載されたものである。

Participation of The Microsomal Electron Transport System in Mutagenic Activation of 4-Dimethylaminoazobenzene, 4-Methylaminoazobenzene and Their 3'-Methyl-Derivatives.

文

献

文 献

- 1) Fischer, B., Munch. Med. Wochschr., 53, 2041 (1906)
- 2) Schmidt, M.B., Virchow's Arch. Path. Anat., 253, 432 (1924)
- 3) Sasaki, T. and Yoshida, T., Virchow's Arch. Path. Anat., 295, 175 (1935)
- 4) Kinoshita, R., Gann, 30, 423 (1936)
- 5) Stevenson, E. S., Dobriner, K., and Rhoads, C.P., Cancer Res., 2, 160 (1942)
- 6) Miller, E. c., Miller, J.A., Sapp, R.W., and Weber, G.M., Cancer Res., 7, 39 (1947)
- 7) Andervont, H.B., J.Natl. Cncer Inst., 10, 927 (1950)
- 8) Grabtree, H.G., Brit. J. Cancer, 3 387 (1949)
- 9) Miller, J.A. and Baumann, C.A., Cancer Res., 5, 157 (1945)
- 10) Miller, J.A. and Miller, E.C., Cancer Res, 7, 39 (1947)
- 11) Mueller, G.C. and Miller, J.A., J. Biol.Chem., 176, 535 (1948)
- 12) Kensler, C.J., Sugiura, K., Young, N.F., Halter, C.R., and Rhoads, C.P., Science, 93, 308 (1941)
- 13) Griften, A.C. and Baumann, C.A., Cancer Res., 8, 279 (1948)
- 14) Fare, G. and Woodhouse, D.L., Brit. J. Cancer, 17, 512 (1963)
- 15) Howell, J.S., Brit. J. Cancer, 12, 594 (1958)
- 16) Yamane, Y. and Sakai, K., Chem. Pharm. Bull., 17, 2488 (1969)
- 17) Yamane, Y. and Sakai, K., Gann, 64, 563 (1973)
- 18) Miller, J.A. and Miller, E.C., J. Exp. Med., 87, 139 (1948)

- 19) Miller, E.C. and Miller, J.A., *Cancer res.*, 7, 468 (1947)
- 20) Miller, E.C., Miller, J.A., Sapp, R.W. and Weber, G.M., *Cancer Res.*, 9, 336 (1949)
- 21) Scribner, J.D., Miller, J.A. and Miller, E.C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20, 560 (1965)
- 22) Higashinakagawa, T., Matsumoto, M. and Terayama, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 811 (1966)
- 23) Pitot, H. and Heidelberger, C., *Cancer Res.*, 23, 1694 (1963)
- 24) Jacob, F. and Monod, J., *J. Mol. Biol.*, 3, 318 (1961)
- 25) Bauer, K.H., : *Mutationstheorie der Geschwulst-Entstehung* Julius Springer, Berlin (1928)
- 26) Mandel, J.D. and Greenberg, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3 575 (1960)
- 27) Schoental, R., *Nature*, 209, 726 (1966)
- 28) Ames, B.N., Gurney, E.G., Miller, J.A. and Bartsch, H., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 3128 (1972)
- 29) Marroquin, F.R. and Farber, E., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 4, 41 (1963)
- 30) Cramer, J.W., Miller, J.A. and Miller, E.C., *J. Biol. Chem.* 235, 885 (1960)
- 31) Miller, J.A., Cramer, J.W. and Miller, E.C., *Cancer Res.*, 20, 950 (1960)
- 32) Miller, J.A., Wyatt, C.S., Miller, E.C. and Hartmann, A., *Cancer Res.*, 21, 1465 (1961)
- 33) Anderson, R.A., Enomoto, M., Miller, E.C., And Miller, J.A., *Cancer Res.*, 24, 128 (1964)
- 34) Baldwin, R.W. and Smith, W.R.D., *Brit. J. Cancer*, 19, 433 (1965)
- 35) Miller, E.C., Lotlikar, P.D., Pitot, H.C., Fletcher, T.L. and Miller, J.A., *Cancer Res.*, 26, 2239 (1966)

- 36) Poirier, L.A., Miller, J.A. Miller, E.C. and Sato, K.,
Cancer Res., 27, 1600 (1967)
- 37) Hashimoto, Y. and Degawa, M., Gann, 66, 215 (1975)
- 38) Kadlubar, F.F., Miller, J.A. and Miller, E.C., Cancer
Res., 36, 1196 (1976)
- 39) Kadlubar, F.F., Miller, J.A. and Miller, E.C., Cancer
Res., 36, 2350 (1976)
- 40) Tarpley, W.G., Miller, J.A. and Miller, E.C., Cancer
Res., 40, 2493 (1980)
- 41) Beland, F.A., Tullis, D.L., Kadlubar, F.F., Straub, K.M.
and Evans, F.E., Chem.-Biol. Interact., 31, 1 (1980)
- 42) Tullis, D.L., Straub, K.M. and Kadlubar, F.F.,
Chem.-Biol. Interact., 38, 15 (1981)
- 43) 北川 晴雄、野口 照久、伊藤 隆太 :
くすりの代謝、南江堂(1971)
- 44) DePierre, J.W. and Ernster, L., Biochim. Biophys. Acta,
473, 149 (1978)
- 45) Wood, A.W., et al, J. Biol. Chem., 254, 4408 (1979)
- 46) Yoshizawa, H., Uchihara, R., Kamataki, T
Kato, R., Ueno, Y., Cancer Res., 42, 1120 (1982)
- 47) Schut, H.A.J., Wirth, P.J. and Thorgeirsson, S.S.,
Mol. Pharmacol., 14, 682 (1978)
- 48) Takeishi, K., Okuno-Kaneda, S. and Seno, T., Mut. Res.,
62, 425 (1979)
- 49) Kadlubar, F.F., Miller, J.A. and Miller, E.C.,
Cancer Res., 37, 805 (1977)
- 50) Radomski, J.L. and Brill, E., Science, 167, 992 (1970)
- 51) Bartsch, H. and Hecker, E., Biochim. Biophys. Acta,
237, 567 (1971)

- 52) Floyd, R.A., Soong, L.M. and Culver, P.L., *Cancer Res.*, 36 1510 (1976)
- 53) Nakayama, T., Kimura, T., Kodama, M. and Nagata, T., *Gann*, 73, 382 (1982)
- 54) Nagata, T., Kataoka, N., Imamura, A., Kawazoe, Y. and Chihara, G., *Gann*, 57, 323 (1966)
- 55) Nagata, T., Tagashira, Y. and Kodama, M.,: *Chemical Carcinogenesis*, ed. Ts'o, P.O.P and DiPaolo, J.A., p87 Dekker, New York, (1974)
- 56) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, r.J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 57) Degawa, M. and Hashimoto, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 1485 (1976)
- 58) Sato, K., Poirrier, L.A., Miller, J.A. and Miller, E.C., *Cancer Res.*, 26 1678 (1966)
- 59) Levy, G.C. and Nelson, G.L., ; *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemicals*, Wiley-Interscience, New York and London (1972)
- 60) Miller, J.A. and Miller, E.C., *Advan. Cancer Res.*, 1, 339 (1953)
- 61) Wislocki, P.G., Miller, J.A. and Miller, E.C., *Cancer Res.*, 35, 880 (1975)
- 62) Matsumoto, M. and Terayama, H., *Gann*, 52, 239 (1961)
- 63) Kitagawa, T., Pitot, H.C., Miller, E.C. and Miller, J.A., *Cancer Res.*, 39 112 (1979)
- 64) Warwick, G.P., *Eur. J. Cancer*, 3 227 (1967)
- 65) Berenblum, I. and Shubik, P., *Brit. J. Cancer*, 1, 383 (1947)
- 66) Berenblum, I., *Adv. Cancer Res.*, 2 129 (1954)
- 67) Hino, O. and Kitagawa, T., *Gann*, 72, 637 (1981)
- 68) Brookes, P. and Lowley, P.D., *Nature*, 202, 781 (1964)

- 69) Nagao, M. Yahagi, M., Honda, M., Seino, Y., Kawachi, T. and Sugimura, T., *Cancer Lett.*, 3, 339 (1977)
- 70) Sugimura, T., : *Genetic Toxicology*, ed. Fleck, R.A. and Hollaender, A., p243 (1982) Plenum Pub. New York
- 71) Ashby, J., Leferre, P.A., Styles, J.A., Charlesworth, J. and Paton, D., *Mut. Res.*, 93, 67 (1982)
- 72) Mori, Y., Niwa, T., Hori, T. and Toyoshi, K., *Carcinogenesis*, 1, 121 (1980)
- 73) Hernandez, P.H., Gillette, J.R. and Mazel, P., *Biochem. Pharmacol.*, 16, 1859 (1967)
- 74) Ketterer, B., Ross-Mansell, P., and Davidson, H., *Chem.-Biol. Interact.*, 2 183 (1970)
- 75) Hernandez, P.H., Mazel, P. and Gillette, J.R., *Biochem. Phamacol.*, 16, 1877 (1967)
- 76) Autrup, H. and Warwick, G.P., *Chem.-Biol. Interact.*, 11, 329 (1975)
- 77) Guengerich, F.P., *J. Biol. Chem.*, 252, 3970 (1977)
- 78) Ziegler, D.M., McKee, E.M. and Poulsen, L.L., *Drug Metab. Dispos.*, 1, 314 (1973)
- 79) Levine, W.G. and Lu, A.Y.H., *Drug Metab. Dispos.*, 10, 102 (1982)
- 80) Levine, W.G., *Drug Metab. Dispos.*, 8, 212 (1980)
- 81) Grundin, R., Moldeus, P., Nadi, H. and Orrenius, S., *Cytochrome P-450 and b₅*, ed. Cooper, D.Y., Rosenthal, o., Snyder, R. and Witmer, C., p251 (1975) Plenum Pub. New York,
- 82) Hildebrandt, A.G., *Biological Hydroxylation Mechanisms*, ed. Boyd, G.S. and Smellie, R.M.S., p79 (1972) Academic Press, New York,
- 83) Leibman, K.C., *Mol. Pharmacol.*, 5, 1 (1969)
- 84) Wiebel, F.J., Lentz, J.C., Diamond, L. and Gelboin, H.V., *Arch. Biochem Biophys.*, 144, 78 (1971)

- 85) Kinoshita, N. and Gelboin, H.V., *Cancer Res.*, 32, 1329 (1972)
- 86) Ziegler, D.M. and Mitchell, C.H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 150, 116 (1972)
- 87) Ziegler, D.M. and Petit, F.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 188 (1964)
- 88) Frederick, C.B., Mays, J.B., Ziegler, D.M., Guengerich, F.P. and Kadlubar, F.F., *Cancer Res.*, 42, 2671 (1982)
- 89) Poulsen, L.L., Masters, B.S.S. and Ziegler, D.M., *Xenobiotica*, 6, 481 (1976)
- 90) Kawajiri, K., Yonekawa, H., Harada, N., Noshiro, M., Omura, T. and Tagashira, Y., *Cancer Res.*, 40, 1652 (1980)
- 91) Vasdev, S., Tsuruta, Y. and O'Brien, P.J., *Biochem. Pharmacol.*, 31, 607 (1982)
- 92) 佐藤 了、"薬物代謝—肝小胞体を中心として"
講談社サイエンティフィク (1973)
- 93) Ziegler, D.M. and Poulsen, L.L., *Methods in Enzymology*, Vol. 52, ed. Fleiser, S. and Packer, L., p142 (1978) Academic Press, New York
- 94) Omura, T. and Sato, R., *J. Biol. Chem.*, 239, 2370 (1964)
- 95) Raukman, E.J., Rosen, G.M. and Kitchell, B.B., *Mol. Pharmacol.*, 15, 131 (1979)
- 96) Mueller, G.C. and Miller, J.A., *J. Biol. Chem.*, 202, 579 (1953)
- 97) LaDu, B.N., Guadette, L.E., Trousof, N. and Brodie, B.B., *J. Biol. Chem.*, 214, 741 (1955)
- 98) Casida, J.E. and Stahmann, M.A., *J. Agr. Food Chem.*, 1, 883 (1953)
- 99) Baker, J.R. and Chaykin, S., *J. Biol. Chem.*, 237, 1309 (1962)

- 100) Gillette, J.R., Brodle, B.B. and LaDu, B.N.,
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 119, 532 (1957)
- 101) Mason, H.S., Science, 125, 1185 (1957)
- 102) Hayaishi, O., Oxygenase, ed Hayaishi, O., p6 (1962)
Academic Press, New York
- 103) McMahon, R.E. and Sullivan, H.R., Life Sci., 3 1167
(1964)
- 104) Fish, M.S., Johnson, N.M., Lawrence, E.P. and Horning
E.C., Biochim. Biophys. Acta., 21, 196 (1955)
- 105) Terayama, H., Gann, 55, 195 (1963)
- 106) Ziegler, D.M. and Pettit, F.H., Biochem, 5 2932 (1966)
- 107) Ziegler, D.M. and Mitchell, C.H., Arch. Biochem. Biophys.,
150, 116 (1972)
- 108) Gold, M.S. and Ziegler, D.M., Xenobiotica, 3 179 (1973)
- 109) Hlavica, P. and Kehl, M., Biochem. J., 164, 487 (1977)
- 110) Pan, H.P., Fouts, J.R. and Devereux, T.R., Life Sci.,
17, 817 (1975)
- 111) Sum, C.Y. and Kasper, C.B., Biochemical. Pharmacol.,
31, 69 (1982)
- 112) Patton, S.E., Rosen, G.M., Rauckman, E.J., Graham, D.G.,
Small, B. and Ziegler, D.M., Mol. Pharmacol., 18, 151
(1980)
- 113) Poulsen, L.L. and Ziegler, D.M., Arch. Biochem. Biophys.,
183, 563 (1977)
- 114) Progh, R.A. and Ziegler, D.M., Arch. Biochem. Biophys.,
180, 363 (1977)
- 115) Kloss, M.W., Caragnaro, J., Rosen, G.M. and Rauckman,
E.J., Toxicol. Appl. Pharmacol., 64, 88 (1982)
- 116) Lotlikar, P.D., Wertman, K. and Luha, L., Biochem. J.,
136, 1137 (1973)

- 117) Prough, R.A., Freeman, P.C. and Hines, R., J.Biol. Chem., 256, 4178 (1981)
- 118) Ziegler, D.M., Poulsen, L.L. and McKee, E.M., Xenobiotica, 1, 523 (1971)
- 119) Poulsen, L.L., Hyslop, R.M. and Ziegler, D.M., Biochem. Pharmacol., 23, 3431 (1974)
- 120) Yasukochi, Y. and Masters, B.S.S., J. Biol. Chem., 251, 5337 (1976)
- 121) Laemmli, U.K., Nature, 227, 680 (1970)
- 122) 青山 俊文、 今井 嘉郎、 佐藤 了 : 生化学 54 (1982)
- 123) Kuwahara, S., Harada, W., Omura, T. and Mannering, G.J., Microsomes, Drug Oxidations and Drug Toxicity, ed. Sato, R., and Kato, R., p87 Japan Scientific Societies Pres, Tokyo (1982)
- 124) Kamataki, T., Yoshizawa, H., Ishi, K. and Kato, R., Microsomes, Drug Oxidations and Drug Toxicity, ed Sato, R. and Kato, R., p463 Japan Scientific Societies Pres, Tokyo (1982)
- 125) Ryan, D.E., Thomas, P.E. and Levin, W., Arch, Biochem. Biophys., 216, 272 (1982)
- 126) Harada. N. and Omura, T., J. Biochem. 89, 237 (1981)
- 127) Kawajiri, K., Yonekawa, H., Harada, N. Noshiro, M., Omura, T. and Tagashira, Y., Cancer Res., 40, 1652 (1981)
- 128) Watanabe, J., kawajiri, K., Yonekawa., Nagao, M., and Tagashira, Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., 104, 193 (1982)
- 129) Harada, N. and Omura, T., J. Bio chem., 89, 237 (1981)
- 130) Omura, T. and Takesue, S., J. Biochem., 67, 249 (1970)
- 131) Nebert, D.W. and Gelboin, H.V., J. biol. Chem., 243, 6242 (1968)

- 132) Sato,R. and Omura,T., Cytochrome P-450, Kodansha, Tokyo,
and Academic Press New York
- 133) Hashimoto, Y., Watanabe, H.K, and Degawa, M., Gann,
72, 921 (1981)
- 134) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y., Matsushima, T.,
Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y., Cancer Lett.,
1,91 (1975)
- 135) Nagao, M., Yahagi, T., Honda, M., Seino, Y., Kawachi, T.
and Sugimura, T., Cancer Lett., 3,339 (1977)
- 136) Degawa, M., Shoji, Y., Masuko, K. and Hashimoto, Y.,
Cancer Lett., 8,71 (1979)

昭和58年7月7日

山根靖弘 薬学研究所長
〃 副査 殿

来る7月19日開催予定の薬学研究所専門委員会
及び薬学研究所委員会に^{おいて}木村晃之より提出
された「アミノアゾ色素の代謝活性化と変異原性
並びに発癌性との相関性に関する研究」と題する
学位論文の審査が行われることになっていますが、
主査である北川晴雄は「理学分野における日本と
シンガポールとの学術交流についての打合せ」のため
7月18日より7月22日までシンガポールに急遽出張
することになりました。従いまして、主査代理として
是非先生に御頼みいたしたく、ここに伏して御頼み
申し上げます。なお、審査に関する一切を御まかせ
致すことを申し添えます。

主査

北川 晴雄 