pCNB によるメト・ヘモグロビン形成機構に関する研究

第3報 pCNB の各中間代謝物のメト・ヘモグロビン形成機構について

吉田克己*

STUDIES ON THE MET-HEMOGLOBIN FORMATION
WITH p-CHLOR-NITROBENZENEReport 3. On the Mechanisms of Each Metabolite
of pCNB in Met-hemoglobin Formation

Katsumi YOSHIDA†

1. Met-hemoglobin formation with the amino-derivative (p-chloraniline).

As reported in Reports 1 and 2, amino-derivative of pCNB showed remarkable met-hemoglobin^{1,2)}. When liver homogenate or slices were added in the system consisted of incubation medium, p-Cl-aniline and human blood, remarkable formation was observed as shown in Figure 1. According to this result, I think that the amino derivate itself cannot form the met-hemoglobin, but that it can be a met-former through being metabolized by liver cells to an active metabolite. In this case, it is easily considered that, turned into aminophenol, the amino-derivate forms met-hemoglobin but that the conjugating aminophenol derivate (5-Cl-2-aminophenol) can form only an amount of a half or one fifth or less of the met-hemoglobin as compared with the case of amino (as shown by the in vivo experiment, cf. Fig. 3 of Report 1), so the met-hemoglobin formation with the amino-derivate could not be considered to be performed only by way of its aminophenol.

2. Mechanisms of each metabolite.

Summarized results of the experiments till now are showed in the Table 1. According to the results, the mechanisms of each metabolite were considered as follows:

1) The nitroso-derivate (p-Cl-nitrosobenzene) has a function of direct oxidation of hem-Fe, 2) the hydroxylamino-derivate (p-Cl-phenylhydroxylamine) may act as a perturbator to globin-protein and it or

its oxydized compound oxydized hem-Fe, 3) the amino-derivate, obviously, is converted into an active substance by liver or other organs, and affects hemoglobin, and 4) the aminophenol affects as a perturbator to globin³⁾, and its oxydized compound (iminoquinone) oxydizes hem-Fe.

3. Specific inhibition of aminophenol-derivate on aerobic glycolysis.

Formerly, Onishi, a member of our laboratory, investigating the influences of various derivatives of anthranilic acid manometrically on respiration and glycolysis of Ehrlich ascites tumor cells, observed that the anthranilic acid and its aminophenol-derivatives (ortho and para) remarkably inhibited only aerobic glycolysis of the tumor cells specifically at low concentrations in which respiration and anaerobic glycolysis were not inhibited (10^{-4} or 10^{-5} mol)⁶⁾. I, with collaboration of Fukui and Takatsuka, examining the inhibition by these derivatives and by 2-carboxy,5-aminophenol by means of chemical estimation of lactate, noticed the same results⁷⁾. So supposing that the action observed was caused by the aminophenol structure of these compounds, I also tested p-aminophenol, a simple and typical aminophenolic compound. Results showed specific inhibition in aerobic glycolysis at low concentrations in which oxygen-uptake and anaerobic lactate-formation were not inhibited (cf. Table 2).

The action of specific inhibition on lactate-formation is probably caused by a decrease of NAPH (reduced form) that results from over-oxidation of NAPH catalyzing the lactate-formation, or inhibition on reduction of NAP (oxydized form), by oxydized aminophenol. Since the inhibiting does not occur at anaerobic conditions, it is presumed that com-

*三重県立大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 吉田克己教授)

同産業医学研究所 (主任: 藤野敏行教授)

昭和43年2月12日, 受付, 普通掲載

†From the Dept. of Public Health (Chief: Prof. K. Yoshida)
Mie Prefectural University, School of Medicine, Tsu, Japan.
Received for publication, February 12, 1968.

pounds of amino or aminophenol oxidize NAPH in aerobic conditions by their oxidized forms and deprived of its activity. Reduction of met-hemoglobin to

hemoglobin is catalyzed by NAPH⁸⁾, so decrease of NAPH by amino or aminophenol may probably be one of the mechanisms of met-hemoglobin formation.

報告者は、第1報¹⁾において、pCNB (p-chlor-nitrobenzene) および、新たに合成したその7つの中間代謝物について、これらの Heinz 小体および Met-Hb 形成について研究し、これらの中間体がそれぞれ固有の複雑な機構をもって Met-Hb 形成を行なうことが考えられると述べた。また、第2報²⁾において、2つの中間体の合成を追加するとともに、Met-Hb 形成が中間体、たとえば hydroxylamino 体または aminophenol 体などの自酸化性による Redox system のみをもって Met-Hb 形成を説明することは困難であって、中島らによる perturbed Hb の oxydase 作用³⁾をその機構の説明に介入せしめる必要があることを述べたが、また、同時にこの現象は aminophenol 体の場合には最も顕著で説明に有用ではあるが、他の中間代謝物、たとえば nitroso 体、amino 体などではこの機構だけでは不満足で、同時に他の機構を導入させる必要があることを指摘した。このように、pCNB による Met-Hb 形成を考えるには、このものの各代謝中間体がそれぞれ異なった機構をもって Met-Hb の形成を行ない、pCNB の作用はこれら中間体の作用の複雑な総合とみなされることを述べた。

また、このことは、同時に久保田⁴⁾、石津⁵⁾などの報告する pCNB の Met-Hb 形成の時間的二峰性などの現象も、各中間体を考えることによって可能になることを示している。

本報においては、報告者は amino 体における Met-Hb 形成機構についての若干の研究を行なうとともに、各中間体の作用機構について総括を行ない、また、Hem-Fe 酸化の問題のみならず、amino 体、aminophenol 体による Met-Hb 形成の問題において、同時にこれらの化合物による Met-Hb の Hb への還元阻害の可能性についての若干の研究を行なったのでこれらについて報告する。

1. Amino 体による Met-Hb 形成機構

第1報に報告したごとく、amino 体である p-Cl-aniline は、生体内において、hydroxylamino 体につぐ強力な Met-former であるが、一方 in vitro においてはほとんど酸素を吸収せず、また Met-Hb も形成しないので、この間に大きな矛盾が認められる。この点を検討するために、in vitro の実験において、単に p-Cl-aniline と Hb (blood 希釈液) を接触せしめるだけで

Fig. 1. Met-hemoglobin formation with p-chlor-aniline in vitro.

はなく、これに、肝 homogenate または slice を加えて incubate したところ、Fig. 1 に示すように大量の Met-Hb 形成を認めることができた。

この結果からすると、amino 体は、他の化合物と異なり、単に血流内で Hb と接触することだけでは Met-Hb 形成を行わず、肝その他の臓器細胞内で“何等かの代謝”を受けてはじめて Met-former になるものと考えられる。この場合最も考えやすいのは、細胞にとりこまれ、そこにおける酸化による水酸基の導入によって aminophenol 体に転換し、これが Met-former になることであるが、第1報に示したように、家兎注射において p-Cl-aniline は対応する aminophenol 体である 5-Cl-2-aminophenol に比して、等 mol で aminophenol の 2~5 倍の多量の Met-Hb をつくるので、単純に aminophenol 体への代謝によるとは考えられず、aminophenol よりもさらに強力な不明の中間体の可能性、あるいは後にのべるがごとき amino 体が、Met-Hb の Hb への還元を阻害する可能性の問題なども考える必要がある。

2. 各中間体の作用機構

第1~3報に示されるように、pCNB の各中間代謝物

Tab. 1. Met-hemoglobin formation of each metabolite in various conditions.

metabolite conditions		-NO	-NHOH	-NH ₂	-OH, -NH ₂	NaNO ₂	K ₃ Fe(CN) ₆
in vivo		+	+	+	+	+	+
in vitro	in O ₂	+	+	-	+	+	+
	in N ₂	+	±	-	-	+	+
	in O ₂ with slices or homogenate			+			

Tab. 2. Effects of p-aminophenol on oxygen-uptake (respiration) and lactate-formation (anaerobic and aerobic glycolysis of Ehrlich ascites tumor cells).

		O ₂ -uptake (%)			Lactate-formation (%)			
					in O ₂			in N ₂
		0~1	1~2	0~2	0~1	1~2	0~2	0~2
p-Aminophenol	2.7×10 ⁻⁴ mol	96	108	102	21	2	11	127
	2.7×10 ⁻⁵ mol				79	39	59	

Data are indicated as percentages of the control values without p-aminophenol.

は、それぞれ異なった態度を示し、それぞれが異なった mechanism によって互に独立した Met-former になっている可能性が強く、pCNB による Met-Hb 形成は、その生体内代謝の進行に伴って、それぞれの時間的経過の中で、各中間体の異なった mechanism がからみあって生じているものと考えられる。

今、報告者が今までに検討した諸結果を一括してかかげると Tab. 1 のごとくなる。

この結果から考えると、1) nitroso 体はそれ自身が明らかに酸化剤として直接 Hem-Fe 酸化を行なう機能のあることが考えられ、2) hydroxylamino 体は Hb の perturbator となり、あるいは自らが被酸化物（構造不明の）となって、ついで Hb を酸化する可能性が考えられ、3) amino 体においては、このままでは形成力はなく、明らかに細胞レベルまたはホモジネート酵素群によって代謝され、他の何物かの活性物質に転換することが必要であって、細胞内でこの amino 体より誘導される不明の活性な中間物質を考える必要があり、5) Aminophenol 体においては、Hb の perturbator および被酸化物 (imino-quinone が Hem-Fe 酸化を行ないうる) によって作用を発揮している。

以上のように各中間体は、Met-Hb 形成の機構として、1) グロビン部分の構造変化 (perturbation), 2) Fe-酸化の問題、についてそれぞれ異なった関与の機構になっていることが考えられ、また今一つの問題として、3) 一旦生成した Met-Hb の Hb への生体内還元

に対する各化合物の影響の問題をも考える必要もある。

3. Aminophenol 体の好氣的解糖作用への影響

さきに当研究室において、大西は各種 anthranilic acid 誘導体 (o-aminobenzoic acid) の Ehrlich 腹水癌細胞の糖代謝への影響を検討して、このもの (amino 体) および aminophenol 誘導体が、腹水癌細胞の呼吸および嫌気性解糖を阻害しない低い濃度 (10⁻⁴~10⁻⁵ mol) において、強力に癌細胞の好気性解糖を選択的に阻害する特異な性質をもつ興味ある現象を Warburg 検圧法によって見出した⁶⁾。それで、報告者は、さらに福井、高塚とともに、2-carboxy, 5-aminophenol の誘導体を加えて、実際に化学的に乳酸を定量することによって検討したところ、これらがいずれも同様な作用をもつことを認めた⁷⁾。それで、さらに報告者はこの作用がこれらの化合物のもつ aminophenol 構造に由来する可能性を考え、p-aminophenol について検討したところ全く同様の作用を認めた (cf. Tab. 2)。

このような、酸素の存在下においてのみ乳酸生成を阻害する点は、乳酸生成の機構から考え、また嫌気的条件下では阻害のない点からして、おそらく amino または aminophenol 体の被酸化物が、この反応を触媒する NAPH を酸化し、あるいは NAP の NAPH への還元を阻害するために、NAPH の大幅な減少と酸化型 NAP の蓄積をもたらすためではないかと想像されるが、このような点から考えると、竹村、山村の研究によれば Met-Hb の還元自体にも NAPH の関与が考えられるので⁸⁾、

Met-Hb の還元機構の阻害もまた Met-Hb 生成の機構の一部として考えてゆく必要性が認められる。

4. 総 括

pCNB による Met-Hb 形成の機構について、この化合物の中間代謝物を考慮して検討したところ、最も強力な former は hydroxylamino, amino 誘導体などであり、また in vitro 実験において、好気性、嫌気性下におけるそれぞれの中間体の態度は互にかなり異なっており、これらを総合するに、nitroso 誘導体はそれ自身が酸化剤として働き得ることが考えられ (perturbation も同時に考えられるが) hydroxylamino 誘導体, aminophenol 誘導体は、グロビン変性と好氣的被酸化物による酸化が考えられるが、in vitro の結果とは逆に、in vivo でとくに hydroxylamino が強力な理由はさらに検討が必要で、amino 誘導体では強力な活性物質への代謝を考慮する必要性が考えられ、pCNB の Met-Hb 形成は、これらの諸中間体の作用の総合として現われているものと考えられる。また、Met-Hb 形成においては、

単に Met-Hb 生成だけではなく、おそらくは amino 体, aminophenol 体などにみられる好氣的条件における NAPH への作用を介すると考えられる Met-Hb の Hb への還元の阻害を併せ考慮の必要があろう。

本報告の要旨は、第36回産業医学会 (昭38, 大阪), および第36回衛生学会 (昭41, 岡山), 第25回癌学会 (昭41, 大阪) において発表した。

本研究実務の相当部分を担当された高塚美和、竹沢優子 (旧姓山浦) の両氏に深く感謝する。

文 献

- 1) 吉田克己: 産業医学 8(9); 463, 1966.
- 2) 同 上: 産業医学 9(11); 764, 1967.
- 3) 中島泰知・楠本繁子: 代謝 4(1); 26, 1967.
- 4) 久保田重孝: 染料中間体中毒, 日本の医学の1959年, 1巻, p.356, 東京.
- 5) 石津澄子: 臨床血液 1(12); 843, 19, 195.
- 6) 大西啓夫: 三重医学 3(3); 373, 1959.
- 7) 福井隆男: 三重医学 11(1); 79, 1967.
- 8) 山村行夫: 日本衛生学雑誌 13(4); 550, 1958.

ガスおよび蒸気の迅速測定に!!

北Ⅲ式 ガス検知器

ガス爆発の防止に!!

光明型 可燃性ガス測定器

光明型 可燃性ガス警報装置

光明理化学工業株式会社

東京都目黒区中央町1-8-24 電話東京(711)2176(代表)