短 報

ジメチルホルムアミドのラット肝薬物代謝
酵素系に及ぼす影響Effects of *N,N*-Dimethylformamide on
Hepatic Drug Metabolizing Enzymes
in Rats

Key words: *N,N*-dimethylformamide; liver; cytochrome P-450; glutathione

ジメチルホルムアミド (*N,N*-dimethylformamide, DMF) は、主にポリビニルクロライド、ポリアクリロニトリル、ポリウレタンなどのポリマーの製造に広く用いられているが、最近、DMF に曝露されたヒトの尿中からメルカプツール酸が検出されたという報告がなされた¹⁾。このことは、DMF 代謝に関する従来説である肝で cytochrome P-450 (P-450) の関与する経路に加えて、一部はグルタチオン抱合を受けて代謝される可能性を示唆する。しかしながら、DMF の肝グルタチオン系酵素および P-450 を含む肝モノオキシゲナーゼ系への影響については、ほとんど検索されていない。

今回われわれは、DMF のラット肝薬物代謝酵素系について検索し、興味ある知見を得たので報告する。

実験材料および方法

DMF 処置群、対照群とも 7~8 週齢の Wistar 系雄性ラット 7 匹ずつを用いた。飼料 (日本クレア CE-2) および飲水の摂取は両群とも自由とした。試薬は和光純薬社製特級 DMF を用い、DMF 処置群にはその原液 (1 ml/kg) を週 3 回で 2 週間、計 6 回腹腔内に投与した。対照群には生理食塩水を同様のスケジュールで投与した。ラットは最終投与後絶食とし、24 時間後にエーテル麻酔下で解剖した。肝は氷冷生理食塩水にて灌流後に摘出し、その一部をホモジナイズ後、Kato らの方法²⁾によりサイトゾール分画、ミクロゾーム分画を得た。

ミクロゾーム分画では P-450 量および protoheme 量を Omura and Sato の方法³⁾で、cytochrome b₅ (b₅) 量を Strittmater and Velick の方法⁴⁾で測定した。また、NADPH-cytochrome c reductase 活性と NADH-ferricyanide reductase 活性を Phillips and Langdon⁵⁾の方法で測定した。

サイトゾール分画では glutathione reductase (GR) 活性を Carlberg and Mannervik の方法⁶⁾で、glutathione peroxidase (GPx) 活性を *tert*-butylhydroperoxide を基

Table 1. Effects of *N,N*-dimethylformamide on body and liver weight and hepatic microsomal monooxygenase system.

	Control	DMF-treated
Body weight (g)	293.6 ± 18.9	243.4 ± 10.5**
Liver (g)	10.99 ± 0.92	11.98 ± 1.86
(mg/g S.W.)	37.4 ± 1.5	49.3 ± 7.7*
Microsomal protein (mg/g liver)	12.9 ± 2.2	9.4 ± 1.5*
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.68 ± 0.10	0.43 ± 0.04**
Cytochrome b ₅ (nmol/mg protein)	0.41 ± 0.07	0.36 ± 0.05
Protoheme (nmol/mg protein)	1.49 ± 0.23	1.21 ± 0.17
NADPH-cytochrome c reductase (nmol/mg protein/min)	156.7 ± 8.5	134.6 ± 19.7
NADH-ferricyanide reductase (μmol/mg protein/min)	5.92 ± 1.27	5.90 ± 0.62

Results are expressed as mean ± SD of seven rats.

*, **: Significantly different from control, $P < 0.01$, $P < 0.001$, respectively.

質とする Beutler らの方法⁷⁾で、glutathione-S-transferase (GST) 活性を 1-chloro-2,4-dinitrobenzene を基質として Habig らの方法⁸⁾で測定した。

有意差検定は Student's *t*-test によった。

結果および考察

肝ミクロゾームのモノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響については Table 1 に示すが、ミクロゾーム分画中のタンパク量は DMF 処置群で約 27% の有意な減少を認めた。P-450 量は DMF 処置群で約 35% の有意な減少を、protoheme 量は DMF 処置群で減少傾向を認めた。しかし、b₅ 量は両群間で有意差はなかった。また、NADPH-cytochrome c reductase 活性および NADH-ferricyanide reductase 活性は両群間で有意差はなかった。DMF の肝モノオキシゲナーゼ系に及ぼす影響については、Scailteur らの報告があるが、これは DMF (1 ml/kg) を雌性ラットに 4 日間連日腹腔内投与しているもので、肝 P-450 量および b₅ 量に変化はみられなかったと述べている⁹⁾。今回われわれは同量の DMF を Wistar 系雄性ラットに週 3 回で 2 週間、計 6 回腹腔内投与したが、肝 P-450 量は減少していた。肝 P-450 量の減少の機序としては、(1) P-450 のヘム蛋白質に基質あるいはその代謝産物が共有結合して P-450 を修飾し破壊する可能性、(2) ヘムやアポプロテインの合成阻害あるいは分解促進の可能性、(3) 広汎な細胞障害あるいはミクロゾーム膜の障害の可能性が考えられるが、本実験では血液生化学的には肝障害がみられなかったこと (結果略)、肝の b₅ 量、NADPH-cytochrome c reductase 活性および NADH-ferricyanide reductase 活性に変化がないことより (3) の可能性は低いものと思われる。また、本実験では DMF 処置群での体重減少が肝 P-450 の減少に関係

Fig.1. Effects of DMF on hepatic glutathione metabolism. Results are expressed as mean $\pm$ SD of seven rats. Control group (open bars), DMF-treated group (hatched bars). *,** Significantly different from control, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively. GR: glutathione reductase, GPx: glutathione peroxidase, GST: glutathione-S-transferase.

していることも否定できない。

肝サイトゾールのグルタチオン系酵素に及ぼす影響については、Fig.1に示すように GR 活性において DMF 処置群で約 15% の有意な増加を認めた。GPx 活性には両群間で有意差は得られなかったが、GST 活性は DMF 処置群で約 64% の有意な増加を認めた。

近年、DMF に曝露されたヒトの尿中に *N*-acetyl-S-(*N*-alkylcarbamoyl) cysteines といわれるメルカプツール酸の一種が検出されたという報告がなされた¹⁾。このことは、DMF がグルタチオン抱合を受ける可能性を示唆する。しかし、われわれの調べた限りでは、DMF の肝グルタチオン量に及ぼす影響についてはきわめて報告が少なく、Scaiteurらが DMF (1 ml/kg) 腹腔内投与後、1時間および 24 時間で肝グルタチオン量の変化はみられなかったと報告しているのみである¹⁰⁾。肝グルタチオン系酵素については報告がない。われわれは予備実験で DMF 皮下投与後、絶食の状態での肝グルタチオン量の経時変化について検討した。DMF 処置群では対照群に比べて 6~8 時間後に減少のピークがあることを確認している (未発表データ)。このことと尿中メルカプツール酸排泄の報告と考えあわせるとラットにおいても DMF 解毒代謝過程において、グルタチオン抱合を受ける可能性があるものと思われる。また、GR 活性の増加に関しても、グルタチオン消費に伴い、還元型グルタチ

オンを維持するためその活性が増加している可能性がある。

以上、DMF のラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響について検討した。肝 P-450 量の減少、GR 活性および GST 活性の増加を認めたことは、ラットにおける DMF の肝毒性機序解明において興味ある知見と思われる。

文 献

- 1) Mraz J, Cross H, Gescher A, et al. Differences between Rodents and humans in the metabolic toxification of *N,N*-dimethylformamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 98: 507-516.
- 2) Kato R, Takanaka A, Takayanagi M. Substrate-induced spectral change of liver microsomes in phenobarbital and methylcholanthrene-treated male and female rats. *J Biochem* 1970; 68: 395-413.
- 3) Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239: 2370-2378.
- 4) Strittmatter P, Velick SF. The isolation and properties of microsomal cytochrome. *J Biol Chem* 1956; 221: 253-264.
- 5) Phillips AH, Langdon RG. Hepatic tri-phosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation characterization and kinetic studies. *J Biol Chem* 1962; 237: 2652-2660.
- 6) Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. In: Meister A, ed. *Methods in enzymology*. Orlando: Academic Press, 1985; 113: 484-490.
- 7) Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, et al. International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 1977; 35: 331-340.
- 8) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
- 9) Scaiteur V, Buchet JP, Lauwerys R. The relationship between dimethyl-formamide metabolism and toxicity. In: Brown SS, Davies DS, eds. *Organ-directed toxicity: chemical indices and mechanisms*. Oxford and New York: Pergamon, 1981: 169-174.
- 10) Scaiteur V, Lauwerys R. *In vivo* metabolism of dimethylformamide and relation to toxicity in the male rat. *Arch Toxicol* 1984; 56: 87-91.

今津和彦*,**, 藤代一也*, 井上尚英*

* 産業医科大学産業生態科学研究所環境中毒学教室

** (現在) NTT 北九州病院健康管理科

Kazuhiko IMAZU, ** Kazuya FUJISHIRO* and Naohide INOUE*

* Department of Environmental Toxicology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan

** Present address: Department of Health Care, NTT Kitakyusyu Hospital, Kokurakita-ku, Kitakyusyu, 802 Japan

平成3年10月14日受付

通信先: 今津あて, Reprint requests to K. Imazu