短報

SD ラット肝サイトソルによる 2,4,6-トリニトロトルエンの主代謝物 4-アミノ-2,6-ジニトロトルエンのアセチル化

Acetylation of 4-amino-2,6-dinitrotoluene, a Major Metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by Liver Cytosol of SD Rats

李 松¹, 熊谷嘉人², 桐谷聖子¹, 下條信弘²¹筑波大学大学院医学研究科, ²筑波大学社会医学系環境医学Song Li¹, Yoshito KUMAGAI², Minako KIRIYA-SAKAI¹, Nobuhiro SHIMOJO²¹Doctoral Program in Medical Sciences and ²Department of Environmental Medicine, Institute of Community Medicine, University of Tsukuba

キーワード: Trinitrotoluene, 4-amino-2,6-dinitrotoluene, Acetylation, Rat cytosol

はじめに

2,4,6-トリニトロトルエン (TNT) は爆薬の原料として使用されている産業化学物質である。その慢性中毒時には低色素性貧血, 肝臓障害, 白内障が認められ, 重症では再生不良性貧血, 急性黄色肝萎縮または肝硬変を生じる¹⁻³⁾。職業曝露では TNT は皮膚および肺から生体に吸収され, ニトロ基が還元されて主代謝として 4-アミノ-2,6-ジニトロトルエン (ADNT) が生成される^{4,5)}。ADNT は TNT より強い変異原性を有することから, TNT の活性代謝物と考えられている^{6,7)}。アミノフルオレンをはじめとする変異原性を示す芳香族アミノ化合物は肝臓に存在する N-アセチル転移酵素 (NAT) により, N-アセチル化されて最終的に反応性に富む活性代謝物が毒性発現や変異原性の原因であるとされている^{8,9)}。しかし, ADNT のアセチル化反応についてはこれまで全く研究がなされていない。今回, 我々はラット

サイトソルを用いて, ADNT のアセチル化反応について検討した。

実験方法

化合物: TNT, ADNT 及び 4-アセチルアミノ-2,6-ジニトロトルエン (AADNT) は McGookin らの方法¹⁰⁾に従って合成した。

酵素溶液の調製: 5 週齢の Sprague-Dawley (SD) 雄性ラットの肝臓 (5 匹分) を摘出し, 湿重量に対し 4 倍量の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) -0.25 M Sucrose-0.1 mM EDTA を加え, ホモジネート液を作成した。その後, 9,000 g で 20 分間遠心分離し, 更にその上清を 105,000 g で 60 分間遠心分離を行い, 上清 (サイトソル) を酵素源とした。

ADNT のアセチル化活性: 反応は 20 μ l の酵素溶液 (242 μ g 蛋白), 40 μ l の 500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 20 μ l の 40 mM のアセチル CoA (AcCoA) 溶液及び 2 μ l の 50 mM ADNT からなる 200 μ l の反応系で行った。37℃ で 60 分間反応させた後, メタノールを加えて反応を停止し, 遠心分離して得た上清の一部を HPLC に供した。HPLC による分離は逆相カラム (YMC-Pack ODS-AM, 250 mm $\times$ 4.6 mm ID) を用い, アセトニトリル / H₂O (1:1, v/v) を移動相として, 流速 1.0 ml/min で分離し, 255 nm の吸収を検出した。

結果及び考察

ADNT を SD ラット肝サイトソルおよび AcCoA 共存下で反応した結果, HPLC 上で基質である ADNT (保持時間, 9.3 分) 以外に代謝物のピーク (保持時間, 7.5 分) が観察された。このピークの保持時間は合成 AADNT 標品のそれと完全に一致した。AADNT の生成は酵素あるいは AcCoA 非存在下では見られなかった。サイトソルおよびミクロソームをそれぞれ酵素源として AADNT 生成活性を調べた結果, 比活性はそれぞれ 0.35 及び 0.01 nmol/min/mg であり, ADNT のアセチル化反応を触媒する NAT はサイトソルに局在することが示された。ADNT のアセチル化反応に NAT 分子種 (NAT1 と NAT2) が関与していることを確かめる目的で, 両分子種の典型的基質を用いて阻害実験を行った (Table 1)。

NAT1 の基質である *p*-アミノ安息香酸及び *p*-アミノサリチル酸を反応系に添加すると, AADNT の生成は濃度依存的に阻害された。同様な現象は NAT2 の基質であるプロカインアミド及びスルファジミジン添加時にも観察された。

以上の結果より, TNT の主代謝物質である ADNT は, SD ラット肝サイトソルに存在する NAT により, AcCoA 依存的に AADNT に代謝されることが明らかと

1998 年 6 月 24 日受付; 1998 年 8 月 21 日受理

連絡先: 下條信弘 〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学社会医学系環境医学。Correspondence to: N. Shimojo, Department of Environmental Medicine, Institute of Community Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

Table 1. Effect of substrates for NAT isozymes on acetylation of ADNT by liver cytosol of SD rats

Addition	Conc. (mM)	Enzyme activity (nmol/mg/min)
None		0.35 (100)
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	1.0	0.33 (94)
	2.0	0.32 (91)
	10.0	0.21 (60)
	20.0	0.08 (23)
<i>p</i> -Aminosalicylic acid	1.0	0.30 (86)
	2.0	0.25 (71)
	10.0	0.04 (11)
	20.0	0.03 (9)
Procainamide	1.0	0.21 (60)
	2.0	0.19 (54)
	5.0	0.04 (11)
Sulfadimidine	1.0	0.36 (103)
	2.0	0.38 (109)
	10.0	0.21 (60)
	20.0	0.18 (51)

Numbers in parenthesis indicate percent of control.
Each value is the mean of duplicate determinations.

なった。また、阻害実験の結果より、NAT1のみならずNAT2の両分子種が本反応に関与している可能性が示唆された。アセチル化を受けた芳香族アミノ体はさらに水酸化されることがDNAや生体高分子との共有結合に関係することが知られている^{11, 12)}。従ってADNTのアセチル化反応は、母化合物であるTNTによって生じる変異原性や肝障害において、重要な役割を演じていることが考えられる。

参考文献

- 1) Djerassi L, Vitany L. Haemolytic episode in G6 PD deficient workers exposed to TNT. *Br J Ind Med* 1975; 32: 54-58.
- 2) Rickert DE. Metabolism of nitromatic compounds. *Drug Metab Rev* 1978; 18: 25-53.
- 3) Anshou Z. Aclinical study of trinitrotoluene cataract. *Pol J Occup Med* 1990; 3: 171-176.
- 4) Yinon J, Hwang DG. Identification of urinary metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene in rats by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicol Lett* 1985; 26: 205-209.
- 5) Yinon J, Hwang DG. Metabolic studies of explosives: Part 5. Detection and analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites in urine of munition workers by micro liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 1986; 1: 123-125.
- 6) Ahlborg G, Enisto P, Sorsa M. Mutagenic activity and metabolite in the urine of workers of explosives. *Br J Ind Med* 1986; 45: 353-358.
- 7) Ten EL, Ho CH, Griest WH, Tyndall RT. Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. *J Toxicol Environ Health* 1992; 36: 165-175.
- 8) Evans DAP. N-Acetyltransferase. *Pharmacol Ther* 1989; 42: 157-234.
- 9) Weber WW, Hein DW. N-Acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol Rev* 1985; 37: 25-79.
- 10) McGookin A, Wift SRS, Tittensor E. ORIENTATION PROBLEM. PART III. 4,6-DINITRO- α -TOLUIDINE. *J Am Chem Soc* 1940; 92-94.
- 11) Mattano SS, Land S, King CM, Weber WW. Purification and biochemical characterization of hepatic arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylators mice: Identity with arylhydroxamic acid N,O-acetyltransferase and N-hydroxyarylamines O-acetyltransferase. *Molecular Pharmacology* 1989; 35: 599-609.
- 12) Trinidad A, Heinn DW, Rustan TD, et al. Purification of hepatic polymorphic arylamine N-acetyltransferase from homozygous rapid acetylators inbred hamster: Identity with polymorphic N-hydroxyarylamines-O-acetyltransferase. *Cancer Res* 1990; 50: 7942-7949.