薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
115 (9) 661-680 (1995)

薬物代謝酵素の分子薬理・毒性学的研究. 薬物動態研究事始めから
21 世紀における薬物療法

加藤隆一

慶應義塾大学医学部, 〒160 新宿区信濃町 35

**Molecular Pharmacological and Toxicological Studies of
Drug-Metabolizing Enzymes**

Ryuichi KATO

*Department of Pharmacology, School of Medicine Keio University,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan*

(Received April 13, 1995)

Studies on drug metabolism have opened new fields in the evaluation of drug efficacy and drug safety in experimental animals and humans, especially in the development of new drugs.

The author described the history of discoveries of induction and inhibition of drug-metabolizing enzymes as a key point in the development of drug interaction studies. Studies on the sex-related differences in drug-metabolism have been important fields for understanding the sex-related toxicity and efficacy of drugs and their species differences under normal and pathological conditions. Rats are unique animals among experimental animals and humans. The activities of hepatic drug-metabolizing enzymes, especially cytochrome P450 and sulfo-transferase, are regulated through the sex-related secretion pattern of growth hormone.

The drug-metabolizing enzymes convert drugs into not only inactive metabolites, but produce toxic intermediates which cause mutagenesis, carcinogenesis and drug-caused allergic reactions. The author carried out extensive studies on the metabolic activation of mutagenic-carcinogenic arylamines and demonstrated important roles of O-acetylation and O-sulfation to cause DNA damages by N-hydroxyarylamines.

Pharmacogenetic studies on hamster acetyltransferase were described to understand the individual differences in polymorphic acetylation of arylamines and N-hydroxyarylamines in relation to DNA damages.

Finally, the author emphasizes important roles of drug metabolism studies for the development of new drugs by showing a prototype, which has multiple metabolic pathways by multiple enzymes and this shows reduced-extents of individual differences, for increasing efficacy and safety in a future clinical drug therapy.

Key words—drug metabolism; sex-related enzyme; carcinogen metabolic activation; pharmacogenetics; individual difference

本総説は平成7年度日本薬学会学会賞の受賞業績を中心に薬物動態研究の重要性につき記述したものである。

1) はじめに

薬物反応 (R) は作用部位の薬の濃度 (C) と薬に対する感受性 (S) という2つの変動する因子により決定される.

$$R=f(C \cdot S) \quad (1)$$

しかし, 1958年筆者が薬物代謝の研究を始めた頃には次節のストリキニーネの性差について述べるように薬の反応性の差は組織の感受性によるものとされ, 作用部位の薬物の濃度はほとんど変動しないものと考えられていた (Co は変動しない因子)

$$R'=fCo(S) \quad (1)'$$

しかし, 次節で述べるような筆者の体験から薬の反応性の差は組織の感受性によるよりはむしろ作用部位の薬の濃度により決定されるものであり, 薬の代謝の研究は今後の医学・薬学における極めて重要な分野に発展すると考えた. このことが筆者に臨床医から薬理学者の道を歩ませ, 今回の日本薬学会学会賞受賞のきっかけとなった.

2) 薬物代謝研究の始め

a) 薬物代謝酵素の誘導の発見 1958年秋電気ショック後のセロトニンの脳内代謝の変動を研究していた筆者はクロールプロマジン前処置 (48時間前) したラットではペントバルビタール (腹腔内投与) による睡眠時間が有意に減少することを見出した. この原因として当時の常識としてまず考えられたことはクロールプロマジンの投与による中枢神経系の感受性の低下であった. しかし, 筆者は他の因子として薬の中枢神経系の移行の低下の可能性を考えペントバルビタールの脳内及び血清中濃度を測定した. その結果, 驚くべきことには脳内のみならず血清中のペントバルビタール濃度が減少していた.^{1,2)} その結果明らかにされたことは, 肝スライス及びミクロゾームにおけるペントバルビタールの代謝が亢進していることであり, この亢進は24時間後に起こり48時間後をピークに次第に減少した.²⁾ この代謝亢進が酵素誘導によることはエチオニンや6-メルカプトプリンなどの蛋白合成阻害剤や核酸合成阻害剤の前投与により確認された.^{3,4)} 次いで筆者はドイツの Remmer 教授 (1959) がバルビチュレートの耐性研究中見出したフェノバルビタールの投与によりヘキソバルビタールの代謝が促進されるという報告から, クロールプロマジン以外の他の薬物でも酵素誘導を起こすのではないかと考え, メプロバメート, フェナグリコドール, グルティミド, フェニトインなども強い酵素誘導を起こすことを見出し, これらを *inducer* と命名した.^{2,5,6)} さらに他の多くの薬物の代謝がフェノバルビタールやフェナグリコドールなどの前投与により亢進する可能性を薬理学的スクリーニングで見出し, これらを *inducing drug* と命名した.^{5,7)} Fig. 1 に示すようにフェナグリコドールなどの投与によりペントバルビタールの睡眠作用の減少に伴って投与2時間後の脳内ペントバルビタール濃度は減少した.²⁾ 同じようにストリキニーネの死亡率は *in vitro* における代謝の亢進に伴って減少した (Fig. 2).⁹⁾ これらペントバルビタールの代謝の亢進と睡眠作用の減少, そしてストリキニーネの代謝酵素の誘導と毒性の減少は *inducer* とエチオニンの同時投与により完全に消失した.^{4,9)} さらにカリソプロドールやメプロバメートについての多くの酵素誘導の実験が行われ, 日常用いられている数多くの脂溶性の薬が *inducer* として見い出され, 酵素誘導の実態が確認された.^{6,8,9)}

b) 薬物代謝酵素の阻害と誘導 (薬物相互作用の基礎) 筆者はまた日常用いられている数多くの薬が投与直後には他の薬の代謝を抑制することを見出した.^{10,11)} これらの薬の代謝

Fig. 1. The Sleeping-time and Brain and Serum Pentobarbitone Concentrations of Controls (Cross-hatched Column) and Phenaglycodol, Glutethimide or Nikethamide-pretreated Rats at Different Time Intervals between Pretreatment and Injection of Pentobarbitone (Kato *et al.*, 1962)²⁾

Rats were injected intraperitoneally with 25 mg/kg of pentobarbitone sodium after pretreatment with phenaglycodol (130 mg/kg injected intraperitoneally, black column), glutethimide (80 mg/kg injected intraperitoneally, diagonal-hatched column) or nikethamide (200 mg/kg injected intraperitoneally, open column). Determination of pentobarbitone concentration was carried out 3 h after the injection.

薬物代謝酵素に対する阻害と誘導作用（二相性作用）の面から次の4種に分類した。¹²⁾

I. 阻害作用と誘導作用を示すもの。

例：クロールサイクリジン，クロールプロマジン

II. 阻害作用を示すが，誘導作用は弱いもの。

例：SKF 525-A，イソニアジッド

III. 阻害作用は弱い，誘導作用が強いもの。

例：フェノバルビタール，グルテイミド

Fig. 2. Effect of Pretreatments with Phenobarbital, Phenaglycodol or Nikethamide on Mortality by Strychnine and on the Strychnine Metabolism (Kato *et al.*, 1962)⁹⁾

Rats were pretreated with phenobarbital, phenaglycodol or nikethamide at different time intervals before the injection of strychnine (1.8 mg/kg) or the determination of strychnine metabolism.

□, phenobarbital pretreated; ■, phenaglycodol pretreated; ▨, nikethamide pretreated.

阻害作用は12時間後には消失し，24時間後からは酵素誘導が起こり，代謝の亢進が見られた (Fig. 3). SKF 525-A のように薬物阻害剤として知られていた薬物も同じように24時間後からは酵素誘導薬として作用した (Fig. 4). さらに酵素誘導薬として知られていたクロールプロマジンやクロールサイクリジンが投与直後には酵素阻害薬として作用した。^{11,12)} 筆者は薬物を

IV. 阻害作用も誘導作用も無いが極めて弱いもの。

例：モルヒネ，アルコール

これら筆者の薬物代謝酵素に対する阻害と誘導の研究が基礎となり薬物相互作用の研究が著しく推進された。

c) 薬物代謝酵素の性差・年齢差と薬効・毒性 筆者は雌ラットを用いることにより偶然ストリキニーネの性差を見出した。ストリキニーネの誘導に性差のあることはすでに1938年に米国の薬理学会誌 (JPET) に報告されていたが、当時の物の考え方により、中枢神経系の感受性の差によるとされていた。

しかし、酵素誘導によりストリキニーネの毒性が代謝により著しく変わることを体験していた筆者は雌雄差の原因も代謝の差でないかと考えストリキニーネの投与を腹腔内から静注に変えたところ、性差が完全に消失した (Table 1).^{13,14)} これらの結果は初回通過効果 (当時はこのような言葉はなかった) に関する初めての

Fig. 3. Inhibitory and Stimulatory Action of SKF 525A and Glutethimide on the *in Vivo* Metabolism of Meprobamate (Kato *et al.*, 1964)¹²⁾

Meprobamate (150 mg/kg, i.p.) were administered 30 min (I) or 48 h (II) after the pretreatment with SKF 525A (50 mg/kg) or glutethimide (40 mg/kg).

Fig. 4. Effect of Pretreatment with SKF 525A, DPEA, Chlorcyclizine, Glutethimide and Phenaglycodol on the *in Vivo* Metabolism of Pentobarbital (Kato *et al.*, 1964)¹²⁾

SKF 525A (50 mg/kg), DPEA (50 mg/kg), chlorcyclizine (25 mg/kg), glutethimide (40 mg/kg) and phenaglycodol (60 mg/kg) were injected intraperitoneally. Pentobarbital (20 mg/kg) were intraperitoneally administered at different time intervals after the pretreatments and the serum pentobarbital concentrations were determined 1 h later. Female rats, weighing about 110 g were used.

▨, SKF 525A; ■, DPEA; □, chlorcyclizine; ▤, glutethimide; ▥, phenaglycodol.

Table 1. Sex-difference in Strychnine Toxicity of Rats (Kato *et al.*, 1962)^{13,14)}

Sex	Administration	LD ₅₀ (mg/kg)	Ratio
Male	i.p.	2.82	×1.74
Female	i.p.	1.62	
Male	i.p.+SKF	1.58	×1.03
Female	i.p.+SKF	1.53	
Male	i.v.	0.51	×1.00
Female	i.v.	0.51	

典型的な例であった。さらに肝スライス及びミクロゾームにおけるストリキニーネの代謝実験の結果、雄の活性は雌に比べて約2.5—3.0倍も高いこと、これらの活性はアンドロジェンにより決定されることが明らかにされた (Fig. 5).^{13,14)} この結果、ストリキニーネの性差の原因は中枢神経系の感受性の差によるのではなく、肝における代謝の差であることが確認された。引き続きカリソプロドールの麻痺作用の性差や octamethylpyrophosphoramidate (OMPA) の性差についても同様な結果が得られた。カリソプロドールによる麻痺時間には約5倍の性差が認められたが麻痺から回復した時の脳内及び血清中濃度には差がなく、中枢神経系の感受性には性差がないことを示した (Table 2).¹⁵⁾ 引き続いて行ったラットの実験で肝の薬物代謝酵素の活性は出生時にはほとんど認められず、その後急速に上昇し、雌では30日齢前後でピークになり、その後徐々に低下し、老齢化に伴いさらに低下することを示した。¹⁶⁾ 一方、雄ラットでは40日齢後性成熟に伴い活性が上昇し、50—60日齢では明らかな性差が出現し老齢化に伴い活性は著しく低下する。それゆえ、ストリキニーネの毒性やカリソプロドールの麻痺時間には30—40日齢までは性差が認められなかった。

d) 薬物代謝酵素の種差と薬効・毒性 筆者はモルモットがストリキニーネ（腹腔内投与）に対してラットに比べて高い抵抗性（LD₅₀値で約6.7倍）示したことから、この差も代謝

Fig. 5. Effects of Castration and Hormone Treatments on the Toxicity and Metabolism of Strychnine in Rats (Kato *et al.*, 1962)¹⁴⁾

a) LD₅₀ of strychnine. b) Metabolism by liver microsomes. c) Metabolism by liver slices. Male rats were castrated 25 d before sacrifice and treated with 200 µg/kg (s.c.) of estradiol, or 2.5 mg/kg (s.c.) of testosterone or 4-chlortestosterone for 15 d before sacrifice.

□, female rats; ■, male rats.

Table 2. Brain and Serum Carisoprodol Concentrations at the End of Paralysis in Male and Female Rats (Kato *et al.*, 1961)¹⁵⁾

Sex	Duration of paralysis (min)	Carisoprodol concentration at the end of paralysis	
		Brain (µg/g)	Serum (µg/ml)
Male	46 ± 3.7	103 ± 3.3	121 ± 3.8
Female	103 ± 8.5	128 ± 3.0	143 ± 3.7

200 mg/kg of carisoprodol were injected intraperitoneally.

の差ではないかと考え静注後の LD₅₀ を検討したところ、ラットに比べて LD₅₀ 値は 20% も低かった。また、肝におけるストリキニーネの代謝は約 3.1 倍高かった。¹⁷⁾ これらの結果から筆者は薬物の効果や毒性の種差も組織の感受性の差よりはむしろ代謝の差の方が大きな要因ではないかとの確信を強めた。引き続きカリソプロドールやゾキサゾールアミンの麻痺時間に著しい種差を認めたが、麻痺から覚醒した時の脳内及び血清中濃度には有意な差異は認められず、これらの種差も感受性の差よりは代謝の差によることが明らかにされた (Table 3)。¹⁸⁾ 事実、これらの動物の肝における代謝活性は麻痺時間に逆比例していた。

3) 薬物代謝酵素活性及びチトクロム P450 含量の病態時における変動の性差と種差

大村・佐藤 (1964) によりチトクロム P450 (P450) が発見されるや筆者は P450 がミクロゾームの薬物代謝酵素の本体である可能性を、その一酸化炭素阻害作用、生後発達、酵素誘導、絶食・砂糖食の影響、臓器分布などにおける相関性から示した。¹⁹⁾ 当時は P450 は一種と考えられていたが、性差や病態時の変動、酵素誘導時の変動から複数の P450 の存在が予想された。1967 年になり P450 が基質と結合すると差スペクトルが出現することが示され複数の P450 の存在が示唆された。一方筆者は薬物代謝酵素活性には性差を示す基質 (アンドロジェン依存性、ヘキソバルビタールやアミノピリンなど) と示さない基質 (アンドロジェン非依存性、アニリンなど) が存在することを見出し、雄ラットでは絶食、モルヒネ投与、糖尿病、副腎摘除、甲状腺中毒時などにおいてはアンドロジェン依存性の活性のみが著しく低下することを示した。²⁰⁻²²⁾ それゆえ、雌ラットではヘキソバルビタール酸化活性やアミノピリン N-脱メチル化活性に著しい変動が見られず、病態時の活性の変動にも著しい性差が見られなかった (Table 4)。ヘキソバルビタール酸化活性やアミノピリン N-脱メチル化活性の性差の大きさはそれらと P450 結合差スペクトルの性差とほぼ相関し、病態時における変動にも相関性が認められ、アンドロジェン依存性 P450 の存在が推定された。²³⁻²⁷⁾ これらの結果、アンドロジェン依存性 P450 はこれら病態時にはその発現が抑制されやすい分子種であると考えられた。^{27,28)} 一方、興味深いことには薬物代謝酵素活性にほとんど性差を示さないマウスやウサギ肝ミクロゾームでは P450 結合差スペクトルにも性差を示さず (アンドロジェン依存性 P450 が存在しない) かつこれら病態時の活性の変動にも性差が認められず、活性の変動は雌雄動物ともラットの雌の変

Table 3. Species Differences in Strychnine Toxicity in Rats and Guinea-pigs (Kato *et al.*, 1963)¹⁷⁾

Species	Injection route	Strychnine	
		LD ₅₀ (mg/kg)	Metabolism (μg/g/h)
Rat	i.p.	1.62	129
G-P	i.p.	10.90×6.7	397
Rat	i.v.	0.57	—
G-P	i.v.	0.46×0.81	—
Rat	i.p. (SKF)	1.33	14
G-P	i.p. (SKF)	2.72×2.1	108

Table 4. Sex-related Changes in Microsomal Drug Metabolizing Enzymes in Rats Liver in Pathological States

	Male		Female	
	Hex	AN	Hex	AN
1) Fasting	↓ ↓	↑	≡	↑
2) Diabetes	↓ ↓ ↓	↑	≡	↑
3) Morphine intoxication	↓ ↓ ↓	≡	≡	≡
4) Hyperthyroidism	↓ ↓ ↓	≡	≡	≡
5) Adrenectomy	↓ ↓ ↓	≡ ~ ↓	≡ ~ ↓	≡ ~ ↓

Table 5. Species Differences in Changes of Hepatic Microsomal Drug Metabolizing Enzymes in Pathological States

	Male rats	Male mice	Male rabbits	Human
1) Fasting	↓ ↓	↓ ~ ≡	≡	≡
2) Diabetes	↓ ↓	≡ ~ ↑	≡ ~ ↑	≡
3) Morphine intoxication	↓ ↓	≡	≡	≡
4) Hyperthyroidism	↓ ↓	≡	↑	≡ ~ ↑
5) Adrenectomy	↓ ↓	↓ ~ ≡	≡	≡ ~ ↓

動と類似していた (Table 5).²⁶⁻³⁰⁾ 以上の結果から、薬物代謝に性差を示さないヒトではこれらの病態時における変動も雄ラットのような大きな変動を示さず、雌ラットの変動に類似するものと考えられた。²⁷⁾

4) 雌雄特異性 P450 の精製と性差発現の分子機構

1983 年当教室の鎌滝らは雌雄ラット肝より雌雄特異 P450 を精製し、P450-male と P450-female と命名した。^{31,32)} 雄ラットでは生後 20—25 日に P450-female が一時的に発現するが、P450-male の発現 (30 日後) に伴い抑制され、老齢化に伴い P450-male の消失に伴い発現する。一方、雌ラットでは生後 20—25 日に P450-female が出現し、30 日齢でピークになり高いレベルが維持されるが、P450-male は生涯を通じて発現しない (Fig. 6).^{33,34)} しかし、下垂体を切除すると雄ラットでは P450-male は約 1/3 に減少し、P450-female は出現しない。一方、雌ラットでは P450-female は消失し、P450-male は出現してこない。興味深いことには下垂体切除ラットではアンドロジェンもエストロジェンも全く作用を発現せず、下垂体因子の関与が推定された。^{34,35)} 下垂体切除雌雄ラットに成長ホルモンを 1 日 2 回、7 日間皮下投与 (雄ラットにおける分泌パターンを模倣)、又は少量を 7 日間持続注入 (雌ラットにおける分泌パターンを模倣) すると雌雄ラットにおける性特異性 P450 レベルはほぼ正常レベルへ復帰する (Fig. 7).^{35,36)} それゆえ、アンドロジェンは視床下部間脳下垂体系に作用して、成長ホルモンの分泌パターンを変

Fig. 6. The Developmental Aspects of P-450-Male, P-450-Female and Benzo[a]pyrene Hydroxylase in Male and Female Rats (Maeda et al., 1984)³³⁾

Fig. 7. Effects of Hypophysectomy and Growth Hormone Treatment on the Contents of P-450-Male and P-450-Female in Rat Liver Microsomes³⁶⁾

a) $p < 0.05$ (vs. corresponding control group), b) $p < 0.05$ (vs. corresponding hypox. group), c) $p < 0.05$ (vs. corresponding hypox. + GH(s) group).

Fig. 8. Age-related Changes in Hepatic Contents of Neonatal and Pubertal Forms of Cytochromes P450 (adapted from Yamazoe *et al.*, 1989d)^{40,42)}

Neonatal forms appear soon after birth in liver, and attain their maximal levels within 3 weeks of age. Some of the forms maintain their levels (such as CYP3A2 in male rats), but most forms are decreased during puberty. Pubertal forms appear in liver 4 weeks after birth and continue to increase until maturation.

Table 6. Sex-Related Differences in Hepatic Level of Cytochrome P450 (CYP) in Rats

P450 forms	Difference (fold)		P450 forms	Difference (fold)	
Male specific			Female specific		
2C11	m>f	20× ↑	2C12	m<f	20× ↑
3A2	m>f	10× ↑			
2A2	m>f	10×			
C13	m>f	10× ↑			
2C22	m>f	10× ↑			
Male dominant			Female dominant		
2B1 ^{a)}	m>f	3—10×	2A1	m<f	2×
2B2 ^{a)}	m>f		2C7	m<f	2×
3A1	m>f	2×	2E1	m<f	1.5×
		5×	1A2	m<f	2×
No sex difference					
2C6	m=f				
1A1	m=5				

a) Levels in non-induced male rats are low (0.6—4 pmol/mg protein).

えることにより肝における P450 の発現を調節しているものと考えられる。これら性特異性 P450 の発現調節には新生児期インプリンティングが見られ、生後 24 時間以内に精巣を切除すると、雌型パターンになり性成熟後アンドロジェンを投与しても雄型へは復帰しない。^{37,38)}

その後当教室の山添らは雌雄ラットの P450 の生後発達には Fig. 8 に示すように成長ホルモンの分泌パターンに関連して著しい差があり、neonatal 型と pubertal 型に分類されることを示した。^{39—41)} 例えば、CYP3A1 (6β-1) の活性は下垂体により抑制的に調節されており、特に雌型の成長ホルモンの分泌によりその発現が強く抑制される。^{41,42)} これらの P450 の発現の調節は転写レベルで行われており、蛋白と mRNA レベルの変動は常に一致していた。^{39,42—44)} Table 6 に示すようにラット肝 P450 の発現レベルの性差の程度はその分子種により著しく異なり、中には性差を示さないものも認められる。⁴²⁾

5) 変異・がん原性アリルアミンの代謝的活性化

a) P450 による N-水酸化 多くのアリルアミンやアリルアミドががん原性を示すことは古くから知られていたが、近年国立がんセンター杉村らにより蛋白熱分解物より多くの変異・

がん原性化合物（ヘテロサイクリックアミン）が見い出された。鎌滝らは PCB 処置ラット肝より高スピン型の P450 (P450d) を精製し、これら変異原が N-水酸化され活性化されることを明らかにした。^{45,46)} P450d (CYP1A2) は従来がん原物質の代謝的活性化に関与するとされてきた P450c (CYP1A1) に比べてベンズピレンの代謝的活性化は極めて弱いがこれら変異原に対する水酸化活性は著しく強い。^{47,48)} Fig. 9 に示すようにこれら N-水酸化活性には著しい種差があり、かつ PCB による誘導にも著しい種差が存在する。⁴⁹⁾ しかし、N-水酸化体の生成量と復帰変異体数間には高い相関性があり、いずれの動物においても N-水酸化が変異原の活性化に関連していることが明らかにされた。さらに従来の Ames 試験系で用いられた肝 9000×g 上清の代わりに、精製 P450 を用いる新しい試験系を作り、種々の変異原の代謝的活性化に関与する P450 の分子種を明らかにする道を開いた。^{50,51)}

Fig. 9. Relationship between the Formation of N-OH-Trp-P-2 and the Induction of Revertants by Liver Microsomes from Rats, Mice, Hamsters Guinea Pigs, and Rabbits (1981)⁴⁹⁾

All animals were treated with PCB (500 mg/kg) intraperitoneally and killed 7 d later. Open, untreated; closed, PCB-treated.

b) エステル化による N-水酸化体の活性化 i) O-アセチル化による活性化——アリルアミンの N-水酸化体はアセチル CoA にアセチル化されず、直接的に DNA と共有結合体を作るとされていたが、当教室の山添らは N-hydroxy-Glu-P-1 がアセチル CoA 依存性に O-アセチル化されて DNA 傷害性が著しく増加することを示した。⁵²⁻⁵⁴⁾ Fig. 10 に示すようにこれら N-水酸化体の直接又は O-アセチル化による DNA 傷害性の比には基質による差が認められ、これら N-水酸化体の化学的な安定性に関連するものと考えられる。⁵²⁾ 一方、当教室の斉藤はハムスター肝より O-アセチル化酵素を精製し、1つの酵素が O-アセチル化、N-アセチル化及び N,O-アセチル転移反応を行うことを示した。⁵⁵⁾ その結果、Fig. 11 に示すようにアセチル化反応にはまず酵素がアセチル化され、そのアセチル基を受容する基質に渡し、次の 5つの反応を行うも

Fig. 10. Substrate Specificity of O-Acetyltransferase (Saito *et al.*, 1986)^{52,71)}

tRNA-binding of N-OH-Glu-P-1, N-OH-Trp-P-2, and N-OH-AF was assayed in the presence of enzyme (open symbols), or in the absence of enzyme (closed symbols).

Fig. 11. Mechanisms of N-Acetylation, O-Acetylation and N,O-Acetyltransfer by Acetyltransferase

Table 7. Species Differences in Acetyl-CoA Dependent Binding by Liver Cytosol⁵⁴⁾

Species	Amounts of metabolite bound to tRNA (pmol/min/mg protein)			N,O-Acetyltransferase activity (pmol/min/mg protein)
	N-OH-Glu-P-1	N-OH-Trp-P-2	N-OH-AF	
Hamster	656.4±11.2	85.9±31.0	1008.8±263.5	361.3±87.1
Rat	177.5±35.8	62.7±23.4	94.9± 34.6	114.5±59.4
Rabbit ^{a)}				
Rapid	75.3±24.8	<0.1	5676.4±440.4	218.8±73.5
Slow	<0.1	<0.1	69.9	<0.1
Mouse				
Male	6.3± 0.7	<0.1	296.0± 38.1	<0.1
Female	10.8± 2.5	<0.1	299.2± 33.5	<0.1
Guinea pig	1.0± 1.0	0.4± 0.4	520.8±131.7	1.7± 1.2
Dog	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

a) The rabbits which showed polymorphism to the N-acetylation activity of 2-AF.

のと考えられた。⁵²⁾

A) アセチル CoA がアセチル供与体

- 1) 受容体が R-NHOH→アセチル CoA 依存性 O-アセチル化反応
- 2) 受容体が R-NH₂→アセチル CoA 依存性 N-アセチル化反応

B) ヒドロキサム酸がアセチル供与体

- 1) 受容体が R-NHOH→ヒドロキサム酸依存性 O-アセチル化反応
(分子間 N,O-アセチル転移反応)
- 2) 受容体が R-NH₂→ヒドロキサム酸依存性 N-アセチル化反応
(N,N-アセチル転移反応)

C) 供与体が存在しない場合

- 1) 分子内 N,O-アセチル転移反応

しかし、これら O-アセチル化及び N,O-アセチル転移活性には著しい種差があり、その種差はまた基質により著しく異なる (Table 7).^{52,54)} 山添らはさらにハムスター肝より 2 種のアセチル化酵素 (AT-I と AT-II) を精製し、さらにその cDNA をクローニングし、COS-1 細胞に発現することにより、その活性の差を明らかにした (Fig. 12) (Table 8).⁵⁶⁻⁶⁰⁾ AT-I はアセチル CoA とアリルヒドロキサム酸をアセチル供与体として利用でき、多くの基質を O-アセチル化でき

るが、一方、AT-II はアセチル CoA のみしか利用できず、一部の基質しか O-アセチル化できない。

ii) プロリル t-RNA 合成酵素による活性化 (O-プロリル化) ——山添らは N-hydroxy-Trp-P-2 がプロリンの存在下にプロリル t-RNA 合成酵素により O-プロリル化され活性化されることを酵素を部分的に精製することにより実証した。⁶¹⁾ この反応はヒドロキシルアミンなどにより阻害されることなどから、プロリル t-RNA 合成酵素が N-hydroxy-Trp-P-2 を受容物質として誤認識するものと考えられた。しかし、この反応は N-hydroxy-Trp-P-2 に特異的で、他の N-水酸化体を用いた時には活性はほとんど認められなかった。

iii) O-硫酸化による活性化——N-hydroxy-AAF のようなヒドロキサム酸の O-硫酸化につ

いて多くの研究が報告されていたが、一級アミンの N-水酸化体の O-硫酸化については知られていなかった。山添らは N-hydroxy-Glu-P-1 が O-硫酸化により活性化されることを見出した。⁶²⁾ これら O-硫酸化活性には著しい性差があり、その活性はミクロゾームの薬物代謝酵素と同様に成長ホルモンにより調節される。⁶²⁾ さらに山添らは世界に先駆けて数種の O-硫酸化酵素をクローニングし、発現させた実績をもとに新しい分類・命名法を提案した。⁶³⁻⁶⁸⁾ Table 9 に示すようにこれら O-硫酸化には著しい種差が認められ、一方個々の精製または COS-1 細胞に発現された O-硫酸化酵素による活性化は酵素の分子種により異なる (Fig. 13, 14).^{65, 66, 68, 69)}

ラット肝における活性は一般にヒト肝における活性よりも高いが、興味深いことには N-hydroxy-PhIP の O-硫酸化のヒト肝の活性はラットよりも数倍高い (Fig. 14).⁶⁵⁾ COS-1 細胞に

Fig. 12. Acetyl Co-A-dependent and Arylhydroxamic Acid-dependent Acetylation of Arylamines and N-Hydroxyarylamines (Amide) by Purified AT-I and AT-II (Kato, Yamazoe, 1994)^{56, 58)}

Activities of purified AT-I and AT-II are presented as relative values (expressed as 100 for the higher activity between two enzymes).

■, AT-I; □, AT-II.

Table 8. Acetylating Activities of AT-I and AT-II Expressed in COS-1 Cells⁶⁰⁾

Substrate	COS-1 cells			Purified prep.
	AT-I	AT-II	II/I ^{a)}	II/I
N-Acetylation				
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	450 (33)	13200 (2760)	29.3	153.3
2-Aminofluorene	1810 (130)	9700 (2040)	5.36	4.18
4-Aminoazobenzene	11800 (860)	<200 (<45)	0.017	0.009
O-Acetylation				
N-OH-Glu-P-1	970 (71)	14 (3)	0.014	0.058

Activities are expressed as nmol min⁻¹ per mg acetyltransferase or nmol min⁻¹ per mg cytosolic protein in parentheses. *a*) Ratio of AT-II to AT-I is shown. Acetyl CoA was used as a cofactor, except that N-OH-AAF was used for 4-aminoazobenzene.

Table 9. Sulfotransferase-Mediated DNA Binding of N-Hydroxy Derivatives of Glu-P-1, IQ, 2-AF and 2-AAF in Liver Cytosols of Human and Various Species of Experimental Animals

Subject	Amounts bound to calf thymus DNA (pmol/mg DNA/mg protein/min)			
	N-Hydroxy-Glu-P-1	N-Hydroxy-IQ	N-Hydroxy-AF	N-Hydroxy-AAF
Mouse	3.8±1.7	nd ^{a)}	1.7±0.3	2.9±0.5
Rat	22.1±2.1	2.6±0.3	12.6±1.0	34.2±3.8
Guinea-pig	3.0±0.6	nd	2.8±0.4	6.2±1.3
Hamster	3.9±0.6	nd	4.1±0.5	3.8±0.7
Rabbit	3.2±0.5	nd	2.1±0.3	4.0±1.6
Dog	nd	nd	1.9±0.2	2.9±0.9
Monkey	2.0±1.0	nd	3.6±0.6	6.6±1.7
Human	3.0±1.3	nd	5.4±2.3	3.5±1.7

a) nd: not detected (0.5 pmol/mg DNA/mg protein/min).

Fig. 13. Sulfotransferase-Mediated Binding of (A) N-OH-AAF and (B) N-OH-AF⁶⁶ COS-I cells expressed sulfotransferase and rat liver cytosols were used.

Fig. 14. PAPS-Dependent DNA Binding of [³H]N-OH-PhIP in Human and Rat Livers and Sulfotransferase-Expressed COS-1 Cells⁶⁵⁾

The concentration of N-OH-PhIP was 100 μ M. Data on DNA binding in the cDNA-expressed cells shown in A were converted to rates of DNA binding per nmol sulfotransferase expressed in cells (B).

発現させた O-硫酸化酵素を用いた実験の結果, N-hydroxy-AAF も N-hydroxy-AF や N-hydroxy-Glu-P-1 も同じ酵素, ST1C1 により O-硫酸化されることが明らかにされた (Fig. 13).^{66,69)}

6) Ames 試験菌の代謝的活性化能と高感受性試験菌の創製

a) Ames 試験菌の代謝的活性化能 Ames 試験菌 (サルモネラ菌) には P450 がないので, 外から肝 9000×g 上清を添加したのが Ames 試験系である. しかし, 生成された N-水酸化体の菌体内における代謝的活性化能に関しては知られていなかった. 当教室の斎藤はまずニトロピレン抵抗性菌 (TA 98/1,8-DNP₆) の原因が O-アセチル化酵素の欠損株であることを示した.⁷⁰⁾ ついでサルモネラ試験菌より O-アセチル化酵素を精製し, 1つの蛋白が O-アセチル化及び N-アセチル化を行うが N,O-アセチル転移反応を触媒できないことを示した.⁷¹⁾ すなわち, サルモネラ菌には哺乳動物の AT-II 型のみのアセチル化酵素しかなく, アセチル CoA をアセチル供与体として利用できるが, アリルヒドロキسام酸は利用できない.⁷²⁾ さらに山添らは Ames 試験菌には O-硫酸化酵素が存在しないことを示した.^{72,73)} これらのことが AAF や N-hydroxy-AAF が強いがん原性を示すにもかかわらず, 弱い変異原性しか示さない原因と考えられた.^{47,73,74)}

b) O-アセチル化及び O-硫酸化酵素を導入した高感受性試験菌の創製 山添らは Ames 試験菌の代謝的活性化能の欠如を補うべく, ハムスターの O-アセチル化酵素の cDNA を TA1538 菌に導入して新しい高感受性試験菌 (SAT-138) を作成した.⁷⁵⁾ Fig. 15 に示すように SAT138 は TA1538 に比べて N-hydroxy-AAF に対して約 1 万倍の高感受性を示し, サルモネラ菌の O-アセチル化酵素を増幅発現させた試験菌 YG1024 に比べても 1000 倍以上の高感受性菌であった.^{75,76)} さらに強いがん原物質でありながら変異原性が陰性のベンチジンに対しても高感受性を示した (Fig. 16).⁷⁵⁾ ベンチジンは P450 により N-水酸化を受ける前にまず N-アセチル化されることが必要であり, Ames 試験系では菌体外にアセチル CoA が存在しないので, N-アセチル化されない.⁷⁷⁾ それゆえ, ベンチジンはサルモネラ菌体内に入り N-アセチル化され, 一旦菌体外へ出て, P450 により N-水酸化されヒドロキسام酸となり, 再び菌体内に入るものと考えられる (Fig. 17). しかし, 従来の試験菌にはヒドロキسام酸を活性化する酵素が存在

Fig. 15. Sensitivity for Mutagenesis of SAT-138, TA1538, YG1024 and TA98 Strains to N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene without Metabolic Activation (Ando *et al.*, 1993)⁷⁵⁾

—●—, SAT138 (AT-I-expressed);
—○—, TA1538; —▲—, YG1024; —△—, TA98.

Fig. 16. Sensitivity for Mutagenesis of SAT-138, TA1538, TA98 and TA100 Strains to Benzidine with Metabolic Activation (Ando *et al.*, 1993)⁷⁵⁾

—●—, SAT138 (AT-I-expressed);
—○—, TA1538; —△—, TA98; —▽—, TA100.

Fig. 17. Metabolic Activation of Benzidine in a New Strain of Ames Test

Fig. 18. Individual Difference in the Concentration of Pentobarbital in the Brain at the End of Narcosis (Kato *et al.*, 1969)⁷⁸⁾

Seventy-two rats were treated with pentobarbital sodium (30 mg/kg, i.p.) and the rats were killed at the end of narcosis and the concentration of pentobarbital in the brain was determined. The results are expressed as the concentration of pentobarbital sodium in the brain at the end of narcosis.

しないので、変異原性が示されない。一方、SAT138 にはヒドロキサム酸を活性化できるハムスターの AT-I 型のアセチル化酵素が発現されているので高感受性を示す。^{58,74)} この差が通常の Ames 試験では陰性であるベンチジンに対して SAT138 菌を用いた時には強い変異原性が認められることの原因である。

7) 薬物反応性の個体・個人差と薬理遺伝学

a) 個体・個人差の研究 ラットの性差や種差が薬物の代謝能に密接に依存していることを示した筆者は、さらに薬物反応性の個体差もその代謝能に関連していることを明らかにした。⁷⁸⁾ すなわち、Fig. 18 に示すようにペントバルビタール (30 mg/kg, i.p.) によるラットの麻酔時間には著しい個体差が認められたが、麻酔から覚醒した時の血清及び脳内濃度には著しい差はなかった。ラットと異なり遺伝的に雑種であるヒトにおいても薬物に対する反応性には著し

い個人差が存在する。^{79,80)} 1968年 Vessel らは一卵生双生児と二卵性双生児における薬の半減期を検討し、二卵性双生児間にはかなりの差が認められるが、一卵生双生児間には差がほとんど認められず、薬の代謝速度が遺伝的に強く支配されていることを明らかにした。⁸¹⁾ その後多くの薬理遺伝学的形質が見い出され、薬理遺伝学研究の今日の隆盛となった。⁸²⁾ 筆者らも *in vitro* におけるトルブタミド、メフェニトイン、ベキソバルビタール、ジアゼパムの代謝、アリルアミンのN-水酸化体のO-アセチル化、O-硫酸化に著しい個人差を認めた。^{64,83,84)} 後述のようにある酵素分子種が欠損すると酵素活性レベルでは薬理遺伝学的な著しい個人差が見られる。しかし、臨床におけるように個体レベルで検討するとこれらの個人差はかなり減少している場合が多い。その理由は、*in vivo* における薬の代謝には複数の代謝経路があり、多くの酵素が関与しているので、1つの酵素の欠損の影響がかなり減弱されているが、単経路代謝の薬の場合にはこれらの影響がそのまま強く現れるからである。

b) 薬理遺伝学的研究 筆者は薬理遺伝学的研究の重要性を早くから指摘し、その発展に貢献してきた。^{58,83-87)} メフェニトインの *in vivo* での代謝速度には著しい個人差が存在し、その欠損者は白人では3-4%であるが、東洋人では約20%の欠損者が存在する。筆者らは日本人の肝ミクロゾームにおける選択的なS-メフェニトインの4-水酸化活性の欠損者が19例中5例存在することを示した (Fig. 19).⁸³⁾ この場合、R-メフェニトインの4-水酸化活性にはほとんど差が認められていない。筆者らはヒト肝から一種のチトクロム P450 を精製し、P450 human-2 と名付けた。⁸⁸⁾ このものは肝ミクロゾームの含量の多さから重要な P450 と考えられ、cDNA をクローニングして酵母に発現した結果、この CYP2C9 が S-メフェニトインを立体選択的に代謝することを示した。^{89,90)} さらに、2個のアミノ酸を欠損又は変異させたものは R-メフェニトインのみを選択的に欠損することを明らかにした。⁹⁰⁾ 一方、De Morais ら (1994) により CYP2C19 が S-メフェニトインの立体選択的代謝に高い活性を示すことが明らかにされ、その

Fig. 19. Distribution of Extensive Metabolizers (EM) and Poor Metabolizers (PM) for Mephenytoin (MP) Hydroxylation by the Metabolic Ratios of Hydroxylation (Yasumori *et al.*, 1990)⁸³⁾

The R/S ratios of each individual are as follows: 0.09, 0.13, 0.14, 0.15, 0.17×2, 0.19, 0.20, 0.28, 0.29×4, and 0.30 for 14 EMs and 0.71, 0.72, 0.88, 2.01, and 2.47 for five PMs.

■, EM; □, PM.

Fig. 20. Correlation between Acetyl CoA-Dependent AF N-Acetylation and Ratio of AT-II/AT-I in Hepatic Cytosols from Individual Hamsters (Ozawa *et al.*, 1990)⁵⁸⁾

Ratios of AT-II/AT-I in the hepatic cytosols (62.5 μg of protein) were determined by Western blot analyses. Each symbol represents values from an individual animal: □, ■, rapid acetylators; △, ▲, intermediate acetylators; ○, ●, slow acetylators. Open and closed symbols represent female and male animals respectively.

肝ミクロゾーム中の含量は極めて低いが、薬理遺伝学的に主要な役割を演じているものと考えられている。⁹¹⁾

山添らは雑系の Syrian-golden ハムスターのうちに N-ヒドロキシアシルアミンの O-アセチル化活性が低いグループが存在することを見出し、これらハムスターを 10 数代にわたり近交交配することにより、メンデルの法則に従い優性遺伝されることを明らかにした (Fig. 21).^{58, 59)} O-アセチル化酵素には第 5 章で述べたように AT-I と AT-II の 2 種があり、欠損個体 (slow acetylator) は AT-II が欠損していた。^{58, 59, 92)} しかし、AT-II mRNA レベルでは slow acetylator も正常な rapid acetylator との間に有意な差が認められなかった。⁶⁰⁾ Slow acetylator では AT-I 遺伝子は正常であったが、AT-II の cDNA の 826 番目の塩基が C→T 変異を起こし、243 番目のアミノ酸が終止コドン (TGA) となっていた。その結果、AT-II では短い不完全な mRNA が生成され、ついで生成された酵素蛋白が不安定ですみやかに分解されるので検出されないものと考えられた。^{60, 92)}

8) 21 世紀における薬物療法

上述のようにヒトにおける薬の代謝には著しい個人差が認められ、これら、個人差は遺伝的に規定されている外、併用薬物による薬物相互作用、年齢、食事、病態などにより起こる。⁹³⁾ その結果、これらの患者では薬の作用が著しく強くあるいは弱くなり、有害作用の原因となる。

a) TDM の推進と病棟薬剤師の役割 それゆえ、これら薬の代謝の個人差による生体内の活性な薬物量を至適なレベルに維持させるために、個々の患者の薬の血中濃度をモニタリングして、その患者に適した投与量・投与間隔を設計する治療的薬物モニタリング (therapeutic drug monitoring, TDM) の実施を推進することが必要である。TDM の実施の推進に必要なことの第一は医師にその重要性和有用性を認識させることである。このためには臨床薬理学の卒前・卒後教育の推進と病棟薬剤師のレベルの向上と活躍が必要とされる。

第二は患者に負担が少なく、かつ短時間の情報が得られる測定法の開発である。すなわち、population pharmacokinetics の導入と相まって高感度で少量の採血で可能な定量法や非観血的な定量法の開発を促進することが必要である。第三は健保適用の薬の種類とモニタリングの回数の増加である。このためには関係各位に TDM を実施することが、いかに医薬原病の発生率を減少させ、入院・治療期間を短縮させ、医療経済の節約ばかりでなく、労働力向上により国民経済へ好影響を及ぼすかを認識させることが必要である。TDM の推進の結果、病棟薬剤師の処方への寄与の可能性の飛躍的増加が期待される。

b) 患者に優しい個人差の少ない薬の開発の必要性 一方、製薬企業は今後薬物動態に個人差の少ない患者に優しい薬の開発を心掛けるべきである。個人差の少ない薬は安全性が高

Fig. 21. Results of Cross-Matings of Intra- and Inter-acetylator Phenotypes (Ozawa *et al.*, 1990)⁵⁸⁾

Ratios of AT-II/AT-I in hepatic cytosols from F1 generation produced by cross-matings of inter- (R×I, R×S and I×S) and intra- (R×R, I×I and S×S) phenotypes were plotted. □, △ and ○ represent rapid (R), intermediate (I) and slow (S) acetylator individuals respectively.

Table 10. Advantage and Disadvantage in Development of Monometabolic Pathway (Enzyme) Drugs and Polymetabolic Pathway (Enzyme) Drugs

	Monometabolic pathway (enzyme) drugs	Polymetabolic pathway (enzyme) drugs
1) Drug metabolism study	Simple, easy	Complicated, not easy
2) Toxicity by metabolite	Lower occurrence	Higher occurrence
3) Species difference	Marked species difference, but lower frequency	Less marked species difference
4) Clinical effects	Large variability in efficacy, higher adressed effect	Less variability in efficacy, less adressed effect

く、無効の人が少なく医師が使い易い薬として広く使われる薬となる可能性を持っている。すでに述べたように薬はその生体内代謝が主として1つの経路又は複数の経路により行われているか否かにより単代謝経路医薬品と複代謝経路医薬品に分けられる。

Table 10 に両種医薬品の特徴をまとめて示したが、個人差の少ない薬という観点から複代謝経路医薬品の開発候補品として選ぶべきであろう。すなわち、単代謝経路の薬ではその代謝経路が遺伝的に低下したり、薬物相互作用や病態で低下したりした時にはその影響が直接現れ、その薬の血中濃度が著しく増加するが、一方、複数の代謝経路をもつ薬では、たとえ主代謝経路がブロックされても他の代謝経路がバイパスとなり、血中濃度の増加を軽減させることができる。しかし、1つの代謝経路にも複数の代謝酵素が関与し、P450 で知られているように1つの代謝酵素が複数の代謝経路に関与しているので、単代謝経路医薬品・複代謝経路医薬品の代わりに単代謝酵素医薬品・複代謝酵素医薬品という概念を導入すべきであろう。^{84,94)}

c) 薬と患者の代謝能の特性につき明らかにしておくべきこと まず、各製薬企業は薬物相互作用的及び遺伝薬理学的有害作用などの発現をさけることも含めて自社の開発医薬品につきさらに既発売の主要医薬品につき、それらを代謝する酵素の分子種を実験動物とヒトにおいて明らかにしておくことが社会的な責任であろう。その結果、薬物相互作用上注意せねばならない、あるいは注意した方がよい薬の組み合わせが理解されるし、また、遺伝薬理学的有害作用の起こる可能性の予測が可能となる。さらに、医薬品開発の過程においてもこれらの点を踏まえて、実験動物からヒトへの外挿の科学性の向上が期待されよう。一方、将来個々の患者は血液 DNA などの解析により、個人の薬物代謝能の遺伝的特性が明らかにされ、その特性は個人の健康カードに記入され、投薬時には参考に供されることが必要とされよう。

謝辞 イタリア、ミラノ大学薬理学教室における研究は E. Chiesara 助手（現ミラノ大学教授）、米国、NIH、国立心臓研究所における研究は J. R. Gillette 博士との協力のもとに行われた。また、国立衛生試験所における研究は高仲 正博士（現昭和大学薬学部客員教授）及び高橋 惇博士（現国立衛生試験所・医化学部長）の協力のもとに行われた。慶應大における研究は当時助教授であった北大薬学部 鎌滝哲也教授及び東北大薬学部 山添 康教授を中心に、斉藤和季助手（現千葉大薬学部教授）、石井賢二助手（現東京理科大薬学部助教授）、三田四郎助手（現参天製薬中央研所長）及び永田 清助手（現東北大薬学部助手）、小澤正吾助手の協力により行われたもので、改めて感謝の意を表したい。

引用文献

- 1) Kato R., *Atti. Soc. Lombarda Sci. Med. Biol.*, **14**, 777 (1959).

- 2) Kato R., Chiesara E., *Br. J. Pharmacol.*, **18**, 29 (1962).
- 3) Kato R., Frontino G., Vassanelli P., *Jpn. J. Pharmacol.*, **11**, 25 (1961).
- 4) Kato R., Frontino G., Vassanelli P., *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 211 (1962).
- 5) Kato R., *Atti. Soc. Lombarda Sci. Med. Biol.*, **14**, 783 (1959).
- 6) Kato R., Vassanelli P., *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 779 (1962).
- 7) Kato R., *Arzneim. Forsch.*, **11**, 797 (1961).
- 8) Kato R., Chiesara E., Frontino G., *Jpn. J. Pharmacol.*, **11**, 31 (1961).
- 8) Kato R., Chiesara E., Frontino G., *Jpn. J. Pharmacol.*, **11**, 31 (1961).
- 9) Kato R., Chiesara E., Vassanelli P., *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 913 (1962).
- 10) Kato R., Vassanelli P., Chiesara E., *Experientia*, **18**, 453 (1962).
- 11) Kato R., Chiesara E., Vassanelli P., *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 357 (1963).
- 12) Kato R., Chiesara E., Vassanelli P., *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 69 (1964).
- 13) Kato R., Chiesara E., Frontino G., *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 221 (1962).
- 14) Kato R., Chiesara E., Vassanelli P., *Jpn. J. Pharmacol.*, **12**, 26 (1962).
- 15) Kato R., Chiesara E., Vassanelli P., *Med. Exp.*, **4**, 387 (1961).
- 16) Kato R., Vassanelli P., Frontino G., Chiesara E., *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 1037 (1964).
- 17) Kato R., Vassanelli P., Frontino G., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **144**, 416 (1963).
- 18) 加藤隆一, *ファルマシア*, **1**, 161 (1965).
- 19) Kato R., *J. Biochem.*, **59**, 574 (1966).
- 20) Kato R., Gillette J. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **150**, 279 (1965).
- 21) Kato R., Gillette J. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **150**, 285 (1965).
- 22) Kato R., Takahashi A., *Mol. Pharmacol.*, **4**, 109 (1968).
- 23) Kato R., Onoda K., *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 1649 (1970).
- 24) Kato R., Takahashi A., Onoda K., *J. Biochem.*, **66**, 739 (1969).
- 25) Kato R., Takanaka A., Takahashi A., *J. Biochem.*, **68**, 613 (1970).
- 26) Kato R., Takanaka A., Onoda K., *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 447 (1971).
- 27) Kato R., *Drug Metab. Rev.*, **3**, 1 (1974).
- 28) Kato R., "Advances in Cytopharmacology," ed. by Clementi S. F., Ceccrelli B., Raven Press, New York, 1971, p. 249.
- 29) Kato R., Onoda K., Takanaka A., *Jpn. J. Pharmacol.*, **20**, 546 (1970).
- 30) Kato R., Onoda K., Takanaka A., *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1093 (1971).
- 31) Kamataki T., Maeda K., Yamazoe Y., Nagai T., Kato R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **225**, 758 (1983).
- 32) Maeda K., Kamataki T., Nagai T., Kato R., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 509 (1984).
- 33) Kamataki T., Maeda K., Shimada M., Kitani K., Nagai T., Kato R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 222 (1985).
- 34) Kamataki T., Shimada M., Maeda K., Kato R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 1247 (1985).
- 35) Kato R., Yamazoe Y., Shimada M., Murayama N., Kamataki T., *J. Biochem.*, **100**, 895 (1986).
- 36) Yamazoe Y., Shimada M., Kamataki T., Kato R., *Jpn. J. Pharmacol.*, **42**, 371 (1986).

- 37) Kamataki T., Maeda K., Shimada M., Nagai T., Kato R., *J. Biochem.*, **96**, 1939 (1984).
- 38) Shimada M., Murayama N., Yamazoe Y., Kamataki T., Kato R., *Jpn. J. Pharmacol.*, **45**, 467 (1987).
- 39) Yamazoe Y., Shimada M., Murayama N., Kato R., *J. Biol. Chem.*, **262**, 7423 (1987).
- 40) Kato R., Yamazoe Y., "Microsomes and Drug Oxidations," ed. by Miners J., Birkett D. J., Drew R., McManus M. L., Taylor & Francis, London, 1988, p. 140.
- 41) Yamazoe Y., Shimada M., Murayama N., Nagata K., Kato R., "Xenobiotic Metabolism and Disposition," ed. by Kato R., Estabrook R. W., Cayen M. N., Taylor & Francis, London, 1989, p. 37.
- 42) Kato R., Yamazoe Y., "Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 105 Cytochrome P 450," ed. by Schenkman J. B., Greim H., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1993, p. 447.
- 43) Shimada M., Murayama N., Yamauchi K., Yamazoe Y., Kato R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **270**, 578 (1989).
- 44) Shimada M., Nagata K., Murayama N., Yamazoe Y., Kato R., *J. Biochem.*, **106**, 1030 (1989).
- 45) Kamataki T., Maeda K., Yamazoe Y., Matsuda N., Ishii K., Kato R., *Mol. Pharmacol.*, **24**, 146 (1983).
- 46) Yamazoe Y., Shimada M., Kamataki T., Kato R., *Cancer Res.*, **43**, 5768 (1983).
- 47) Kato R., Kamataki T., Yamazoe Y., *Environ. Health Perspec.*, **49**, 21 (1983).
- 48) Kato R., *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **16**, 307 (1986).
- 49) Yamazoe Y., Kamataki T., Kato R., *Cancer Res.*, **41**, 4518 (1981).
- 50) Ishii K., Ando M., Kamataki T., Kato R., Nagao M., *Cancer Lett.*, **9**, 271 (1980).
- 51) Ishii K., Yamazoe Y., Kamataki T., Kato R., *Chem. Biol. Interact.*, **38**, 1 (1981).
- 52) Kato R., Yamazoe Y., *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 297 (1987).
- 53) Shinohara A., Saito K., Yamazoe Y., Kamataki T., Kato R., *Carcinogenesis*, **6**, 305 (1985).
- 54) Shinohara A., Saito K., Yamazoe Y., Kamataki T., Kato R., *Cancer Res.*, **46**, 4362 (1986).
- 55) Saito K., Shinohara A., Kamataki T., Kato R., *J. Biochem.*, **99**, 1689 (1986).
- 56) Kato R., Yamazoe Y., *Drug Metab. Rev.*, **26**, 413 (1994).
- 57) Kato R., Yamazoe Y., "Xenobiotic Metabolism and Disposition," ed. by Kato R., Estabrook R. W., Cayen M. N., Taylor & Francis, London, 1989, p. 383.
- 58) Ozawa S., Abu-Zeid M., Kawakubo Y., Toyama S., Yamazoe Y., Kato R., *Carcinogenesis*, **11**, 2137 (1990).
- 59) Abu-Zeid M., Nagata K., Miyata M., Ozawa S., Fukuhara M., Yamazoe Y., Kato R., *Mol. Carcinogen.*, **4**, 81 (1991).
- 60) Nagata K., Ozawa S., Miyata M., Shimada M., Yamazoe Y., Kato R., *Pharmacogenetics*, **4**, 91 (1994).
- 61) Yamazoe Y., Shimada M., Shinohara A., Saito K., Kamataki T., Kato R., *Biochem. Cancer Res.*, **45**, 2495 (1985).
- 62) Yamazoe Y., Manabe S., Murayama N., Kato R., *Mol. Pharmacol.*, **32**, 536 (1987).
- 63) Gong D.-W., Ozawa S., Yamazoe Y., Kato R., *J. Biochem.*, **110**, 226 (1991).
- 64) Abu-Zeid M., Yamazoe Y., Kato R., *Carcinogenesis*, **13**, 1307 (1992).

- 65) Ozawa S., Chou H.-C., Kadlubar F. F., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R., *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 1220 (1994).
- 66) Nagata K., Ozawa S., Miyata M., Shimada M., Gong D.-W., Yamazoe Y., Kato R., *J. Biol. Chem.*, **268**, 24720 (1993).
- 67) Yamazoe Y., Ozawa S., Nagata K., Gong D.-W., Kato R., *Environ. Health Perspec.*, **102**, 99 (1994).
- 68) Yamazoe Y., Nagata K., Ozawa S., Kato R., *Chem.-Biol. Interact.*, **92**, 107 (1994).
- 69) Ozawa S., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R., *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 264 (1995).
- 70) Saito K., Yamazoe Y., Kamataki T., Kato R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **116**, 141 (1983).
- 71) Saito K., Shinohara A., Kamataki T., Kato R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**, 286 (1985).
- 72) Yamazoe Y., Abu-Zeid M., Gong D., Staiano N., Kato R., *Carcinogenesis*, **10**, 1675 (1989).
- 73) Kato R., Yamazoe Y., "Mechanisms of Environmental Mutagenesis-Carcinogenesis," ed. by Kappas A., Plenum Press, New York, 1990, p. 211.
- 74) Kato R., Yamazoe Y., *Drug Metab. Rev.*, **26**, 413 (1994).
- 75) Ando M., Shindo Y., Fujita M., Ozawa S., Yamazoe Y., Kato R., *Mutat. Res.*, **292**, 155 (1993).
- 76) Watanabe M., Jr. Ishidate M., Nohmi T., *Mutat. Res.*, **234**, 337 (1990).
- 77) Yamazoe Y., Roth R. W., Kadlubar F. F., *Carcinogenesis*, **7**, 179 (1986).
- 78) Kato R., Takanaka A., Onoda K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **19**, 260 (1969).
- 79) 加藤隆一, 慶応医学, **55**, 185 (1978).
- 80) 加藤隆一, 自律神経, **21**, 279 (1984).
- 81) Vessel E. F., Page J. G., *Science*, **159**, 1479 (1968).
- 82) Meyer U. A., *Pharmacol. Therap.*, **46**, 349 (1990).
- 83) Yasumori T., Murayama N., Yamazoe Y., Kato R., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**, 313 (1990).
- 84) Yasumori T., Nagata K., Yang S. K., Chen L.-S., Murayama N., Yamazoe Y., Kato R., *Pharmacogenetics*, **3**, 291 (1993).
- 85) 加藤隆一, 代謝, **12**, 3 (1975).
- 86) 加藤隆一, 月刊薬事, **23**, 1039 (1981).
- 87) 加藤隆一, 村木 篁, トキシコロジーフォーラム, **8**, 179 (1985).
- 88) Yasumori T., Kawano S., Nagata K., Shimada M., Yamazoe Y., Kato R., *J. Biochem.*, **102**, 1075 (1987).
- 89) Yasumori T., Murayama N., Yamazoe Y., Abe A., Nogi Y., Fukasawa T., Kato R., *Mol. Pharmacol.*, **35**, 443 (1989).
- 90) Yasumori T., Yamazoe Y., Kato R., *J. Biochem.*, **109**, 711 (1991).
- 91) de Moraes S. M. F., Wilkinson G. R., Blaisdell J., Meyer U. A., Goldstein J. A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15419 (1994).
- 92) Kato R., Yamazoe Y., *Drug Metab. Rev.*, **27**, 241 (1995).
- 93) 加藤隆一, "臨床薬物動態学," 南江堂, 東京, 1992.
- 94) Yasumori T., Li Q.-H., Yamazoe Y., Ueda M., Tsuzuki T., Kato R., *Pharmacogenetics*, **4**, 323 (1994).