ラット肝チトクローム P450 2C11 によるクロルフェニラミンの
立体選択的 *N*-脱メチル化に及ぼす四塩化炭素誘起肝障害の影響

野村明生, 櫻井栄一,* 引地 登

東北薬科大学

**Effect of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury on
Stereoselective *N*-Demethylation of Chlorpheniramine by
Rat Hepatic Cytochrome P450 2C11 Isozyme**

Akio NOMURA, Eiichi SAKURAI,* and Noboru HIKICHI

*Tohoku College of Pharmacy, 4-1 Komatsushima, 4-chome, Aoba-ku,
Sendai 981-0905, Japan*

(Received February 23, 1998)

We examined the effect of a carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatic injury on the stereoselective *N*-demethylation of *RS*-($\pm$)-chlorpheniramine (Chp) by cytochrome P450 (CYP) 2C11 isozyme. In the non-treated rat liver microsomes, the stereoselective *N*-demethylation of racemic Chp was observed. However, in the CCl_4 -treated (0.5 ml/kg, i.p.) rat liver microsomes, the *N*-demethylation activities of *S*-(+)- and *R*-(-)-Chp decreased continuously up to the third day after the treatment with CCl_4 , and reached about 9 and 13% of control values, respectively, and the stereoselective *N*-demethylation of Chp was not observed. Moreover, in the liver microsomes at the 7th day after the treatment with CCl_4 , the *N*-demethylation activities of both enantiomers recovered to an original level, and the stereoselective *N*-demethylation of Chp was again observed. The addition of 30 μl of the anti-rat CYP2C11 serum to the reaction mixture containing 1 mg of microsomal protein inhibited the formation of monodesmethylchlorpheniramine (DMChp) from both enantiomers to 74 and 57% of the control values for *S*-(+)- and *R*-(-)-Chp, respectively. In the liver microsomes of a male rat at the 1st day after the treatment of CCl_4 , the addition of the anti-rat CYP 2C11 serum (30 μl) also caused 25% inhibition of the formation of DMChp from *S*-(+)-Chp, but anti-rat CYP2C11 had no inhibitory effect on the rates of microsomal *N*-demethylation of *R*-(-)-enantiomer. On the other hand, in the liver microsomes of a male rat at the 7th day after the treatment with CCl_4 , the anti-rat CYP2C11 serum had an inhibitory effect on the rates of microsomal *N*-demethylation of either *S*-(+)- or *R*-(-)-enantiomers again. Moreover, it was confirmed by Western blotting analysis that the density of the stained bands of CYP2C11 in the liver microsomes from male rats at the 1st, 2nd and 3rd days after the treatment with CCl_4 , was thinner than that from non-treatment male rats. These results indicated that the changes of *N*-demethylation activities of Chp in the CCl_4 -induced hepatic injury were due to the variation of microsomal CYP2C11.

Key words—cytochrome P450 2C11; hepatic injury; stereoselectivity; *N*-demethylation; chlorpheniramine; carbon tetrachloride

緒 言

肝臓は薬物の生体内での構造変換の主要な部位であり、それに関わる多くの酵素が存在している。中でもチトクローム P450 (CYP) は薬物代謝に大きく貢献している酵素であり、肝ミクロソーム中に多種のアイソザイムとして存在している。¹⁾

H1-受容体の拮抗薬であるマレイン酸クロルフェニラミン (Chp) は強力な抗ヒスタミン作用を有し、感冒薬や抗アレルギー薬として汎用されている。Chp はその構造内に不斉炭素を有している。Chp の主要代謝経路は *N*-脱メチル化であり、*in vivo* 及び *in vitro* 実験において、モノデスメチルクロルフェニラミン (DMChp) とジデスメチルクロルフェニラミン (DDMChp) の生成が確認されている。²⁻⁷⁾ 先の研究で我々は、ラット肝ミクロソームにおける *RS*-(±)-Chp の *N*-脱メチル化の立体選択性が年齢や性の違いで様相がかなり異なることを報告した。⁸⁾ また、この *N*-脱メチル化反応は肝ミクロソーム中の CYP により触媒され、8 週令雄性ラットでは CYP2C11, CYP2B1, CYP3A2 の各アイソザイムが関与していることが確認された。しかし、CYP2C11 以外のアイソザイムによる触媒作用は僅かであった。さらに、CYP2C11 は立体選択的に Chp の *N*-脱メチル化を触媒することを見いだした。⁹⁾

ところで、Chp は抗ヒスタミン薬として汎用されている薬物の 1 つであり、長期間に、しかも他剤と併用される場合が多い。また、Chp は肝臓中の CYP によって代謝を受けること^{8,9)} から、肝疾患による代謝変動を考慮する必要があると考えられる。

そこで本研究では、実験的肝障害モデルとして繁用されている四塩化炭素 (CCl₄) 誘起肝障害ラットを用いて、*RS*-(±)-Chp の立体選択的 *N*-脱メチル化活性の変動を検討した。さらに、Chp の *N*-脱メチル化を触媒する主要なアイソザイムである CYP2C11 に対する CCl₄ 誘起肝障害の影響について考察した。

実 験 の 部

1. 実験動物 8 週令 Wistar 系雄性ラット (日本エスエルシー) を用いた。日内変動を考慮して温度 22—24°C、湿度 50—60%、照度サイクル 12 時間 (明期; 07:00—19:00) の環境にて、一定期間、固形飼料 (CE-2, 日本クレア) と水を自由に摂取させて飼育した。

2. 試薬類 *RS*-(±)-Chp は興和新薬、*S*-(+)-Chp は吉富製薬、*R*-(−)-Chp, *RS*-(±)-DMChp, *RS*-(±)-DDMChp はアメリカ・シェリング社よりそれぞれ供与を受けた。CCl₄ はナカライテスクから、また、阻害試験用及びイムノブロッティング用抗ラット CYP2C11 血清、電気泳動用ゲル、電気泳動用緩衝液は第一化学薬品からそれぞれ購入した。その他の試薬あるいは溶媒類は、すべて市販特級品を用いた。

3. 肝障害ラットの作成 CCl₄ (0.5 ml/kg) を雄性ラット (8 週令) に腹腔内投与して作成した。

4. 肝ミクロソームの調製及び酵素反応条件 CCl₄ 又は対照群には生理食塩水をそれぞれ投与し、1, 2, 3, 5 及び 7 日後に屠殺しそれぞれ常法によりラット肝ミクロソーム分画を調製した。また、得られたミクロソーム分画は 0.1 M リン酸緩衝液 (KH₂PO₄-Na₂HPO₄·12H₂O; pH 7.4) に懸濁し、タンパク質濃度を 20 mg/ml に調製した。タンパク質濃度は Bio-Rad タンパク定量キットにより測定した。¹⁰⁾ 酵素反応条件は前報⁸⁾ に従い、基質濃度として *RS*-(±)-Chp を 1.0 mM 含み、最終容量が 2.0 ml になるように調製した。この反応液に肝ミクロソーム調製液を加え、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート (NADPH) 再生系にて 37°C

で30分間好氣的に反応させた。反応停止には0.4 M 過塩素酸溶液を1 ml 添加した。

5. ラット CYP2C11 抗体による RS-(±)-Chp の N-脱メチル化反応の阻害実験 ラット肝ミクロソーム中の CYP2C11 に対する抑制効果の検討は前報⁹⁾に従い行った。すなわち、肝ミクロソーム調製液 (1 mg protein/ml) に抗ラット CYP2C11 血清を 30 μ l 添加し、37°C で20分間プレインキュベートすることにより検討した。

6. HPLC による DMChp の光学分割定量 0.4 M 過塩素酸溶液添加試料を 800 $\times$ g で10分間遠心分離した。その上清を前報⁸⁾に従いアルカリ性にてベンゼン抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生成された DMChp の光学分割定量を行った。HPLC の装置及び条件は前報⁸⁾に従った。

7. 電気泳動法及びイムノブロッティングによる CYP2C11 の検出 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli 法¹¹⁾ に準じて行った。すなわち、肝ミクロソーム調製液 (1 mg protein/ml) に SDS-トリス β ME セプラゾールを加えて処理したサンプルを 10% アクリルアミドゲルにアプライし、25 mM トリス-192 mM グリシン、0.1% SDS 緩衝液 (pH 8.4) 中で 100 mV, 1 時間泳動を行った。

ウェスタンブロッティングは SDS-PAGE が終了したゲルを polyvinylidene difluoride (PVDF) 転写膜に転写し、一次抗体に抗ラット CYP2C11 ヤギ血清を、二次抗体にアルカリフォスファターゼ標識抗ヤギ IgG ウサギ血清を用いて、それぞれ 1 時間反応を行った。また、発色には 0.24 mM ニトロブルーテトラゾラム: 46 mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート (100:1) を用いた。

8. Kinetic Parameter の算出及び統計処理 K_m , V_{max} 値は非線形最小二乗法プログラム (MULTI) を用いてミハエリス-メンテン式にあてはめ求めた。

また、結果における各エナンチオマー間の統計学的有意差は Student's *t*-test により行い、 $p < 0.05$ を有意として示した。

結 果

1. ラット肝ミクロソームにおける RS-(±)-Chp の立体選択的 N-脱メチル化に及ぼす CCl₄ 誘起肝障害の影響 Fig. 1 に CCl₄ 処理後における Chp の N-脱メチル化活性の変動を示した。CCl₄ 投与3日後まで Chp の N-脱メチル化活性は低下し続け、CCl₄ 投与3日後においては S-(+)-Chp の N-脱メチル化活性は約 9%, R-(-)-Chp のそれは約 13% まで正常時に比較して低下した。この時、正常時にみられた立体選択的 N-脱メチル化は認められなくなった。

しかし、CCl₄ 投与5日後においては RS-(±)-Chp の N-脱メチル化活性は回復傾向を示しはじめた。また、CCl₄ 投与7日後には S-(+)-体、R-(-)-体ともに正常時の約 67% の N-脱メチル化活性を示し、N-脱メチル化に立体選択性が認められた。

Fig. 1. Effect of CCl₄ on the N-Demethylation of Racemic Chlorpheniramine in Male Rat Liver Microsomes

Each value is the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. * $p < 0.05$, significantly different between enantiomers. $\circ$; S-(+)-DMChp, $\bullet$; R-(-)-DMChp

また, Fig. 2 には *RS*-(±)-Chp の *N*-脱メチル化反応を対照群 (未処理) 及び CCl_4 処理 1 日後の肝ミクロソームを用いて検討した結果をミハエリス-メンテンプロットにて示した. CCl_4 処理 1 日後のラット肝ミクロソームを用いたとき, *S*-(+)-DMChp 及び *R*-(-)-DMChp の生成量は両者とも未処理時と比較して減少した. さらに, Chp の各エナンチオマーの *N*-脱メチル化に対する K_m , $V_{\max}$ 及び Cl_{int} 値はエナンチオマー間で有意な差が認められず, 未処理肝ミクロソームで認められた立体選択的 *N*-脱メチル化は消失した. (Table 1)

2. CCl_4 処理による CYP2C11 含量の変動 未処理, CCl_4 投与 1 日後及び CCl_4 投与 7 日後のラット肝ミクロソームに抗ラット CYP2C11 血清を添加し, *RS*-(±)-Chp の *N*-脱メチル化活性に対する抑制効果を Table 2 に示した.

未処理ラット肝ミクロソームに抗ラット CYP2C11 血清を 30 μl 添加すると Chp の *N*-脱メチル化は *S*-(+)-Chp, *R*-(-)-Chp それぞれ約 74, 57% 抑制され, CYP2C11 による Chp の立体選択的 *N*-脱メチル化が確認された.

また, *RS*-(±)-Chp の立体選択的 *N*-脱メチル化活性が低下した CCl_4 投与 1 日後のラット肝ミクロソームに抗ラット CYP2C11 血清を 30 μl 添加すると, *S*-(+)-Chp の *N*-脱メチル化活性に対して 25% の抑制効果が認められた. しかし, *R*-(-)-Chp に対する抑制効果は見られなかった.

一方, Chp の *N*-脱メチル化活性の回復が認められた CCl_4 投与 7 日後のラット肝ミクロソームに抗ラット CYP2C11 血清を 30 μl 添加すると, *S*-(+)-Chp では約 90%, *R*-(-)-Chp では約 46% の *N*-脱メチル化活性の抑制が認められ, CYP2C11 による *RS*-(±)-Chp の立体選択的 *N*-脱メチル化反応が再び観察された.

3. イムノブロッティングによる CYP2C11 の検出 Fig. 3 に未処理及び CCl_4 処理後の肝ミクロソーム中の CYP2C11 をウェスタンブ

Fig. 2. Michaelis-Menten Plots in the Formation of DMChp Enantiomer from Racemic Chp Incubated with Non- and CCl_4 -Treated Male Rat Liver Microsomes

Each value is the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different between enantiomers. † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$, significantly different from the non-treatment in the *N*-demethylation of *S*-(+)-Chp. # $p < 0.05$, significantly different from the non-treatment in the *N*-demethylation of *R*-(-)-Chp. Non-treatment, ○; *S*-(+)-DMChp, ●; *R*-(-)-DMChp, ■; CCl_4 -treatment, □; *S*-(+)-DMChp, ◻; *R*-(-)-DMChp, ◼

Table 1. Kinetic Parameters of *N*-Demethylation of Racemic Chlorpheniramine in Male Rat Liver Microsomes

	Non-treatment		CCl_4 -treatment	
	<i>S</i> -(+)-Chp	<i>R</i> -(-)-Chp	<i>S</i> -(+)-Chp	<i>R</i> -(-)-Chp
K_m	0.18 ± 0.07	0.16 ± 0.07	0.22 ± 0.07	0.24 ± 0.12
$V_{\max}$	$0.29 \pm 0.04^{*, \dagger}$	$0.13 \pm 0.03^{\dagger}$	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.02
$V_{\max}/K_m$	$1.73 \pm 0.28^{*, \dagger}$	$0.87 \pm 0.12^{\dagger}$	0.35 ± 0.07	0.20 ± 0.02

Each value is expressed as the mean $\pm$ S.E. of 5 experiments. $V_{\max}$: nmol/mg protein/min, K_m : mM, $V_{\max}/K_m$: $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein/min. * $p < 0.05$, significantly different between enantiomers. † $p < 0.05$, significantly different from the non-treatment in the *N*-demethylation of *S*-(+)- or *R*-(-)-Chp.

Table 2. Immunoinhibition of the *N*-Demethylation of Racemic Chlorpheniramine by Liver Microsomes from Non- and CCl₄-Treated Male Rats

		<i>S</i> -(+)-Chp		<i>R</i> -(-)-Chp	
		nmol/mg protein/min	(% of control)	nmol/mg protein/min	(% of control)
Non-treatment					
	Control	0.179	(100.0)	0.149	(100.0)
	CYP2C11	0.047	(26.1)	0.064	(43.0)
CCl ₄ -treatment					
1st day	Control	0.043	(100.0)	0.027	(100.0)
	CYP2C11	0.032	(75.4)	0.027	(100.0)
7th day	Control	0.105	(100.0)	0.036	(100.0)
	CYP2C11	0.011	(10.8)	0.020	(54.2)

Liver microsomal protein (200 μ g) was combined with 30 μ l each of anti-rat CYP2C11 serum and normal goat serum and incubated at 37°C for 30 min before adding the reaction mixture containing 250 μ M racemic chlorpheniramine. Values for the antibody-treated group are expressed as a percentage of those for the control group.

ロットィングにて示した。未処理、CCl₄処理5日後及びCCl₄処理7日後の各レーンにおいてCYP2C11に相当するバンドが確認された。

また、CCl₄処理1,2及び3日後の肝ミクロソームにおいて、それぞれラットCYP2C11抗体と交差する蛋白バンドは確認されたものの、極めて微弱であった。

考 察

薬物代謝の多くは肝臓中のCYPに依存している。したがって、薬物代謝は肝障害時には正常時と比較して大きく変動することが予測される。

これまでにCCl₄が肝ミクロソームにおけるエチルモルヒネの*N*-脱メチル化^{12,13)}やジメチルアニリンの*N*-脱メチル化及び*N*-酸化¹⁴⁾を低下させることは報告されている。また、DingellとHeimberg¹⁵⁾はCCl₄(0.5 ml/kg)処理24時間後にはアミノピリンの*N*-脱メチル化が正常時の35%の活性値を示すことを報告している。

本研究ではCCl₄により実験的に肝障害を誘起させ、*RS*-(±)-Chpの*N*-脱メチル化反応を正常時と比較し、立体選択性の変化について検討した。

その結果、CCl₄処理においても*RS*-(±)-Chpの*N*-脱メチル化反応は確認されたが、その活性は正常時と比較して*S*-(+)-及び*R*-(-)-Chpの双方とも顕著に低くなり、また、その活性値もエナンチオマー間で差が見られなくなった。なお、この代謝生成物であるDMChpからDDMChpへの*N*-脱メチル化反応は未処理及びCCl₄処理時においても認められなかった。

CCl₄処理後さらに時間が経過すると*RS*-(±)-Chpの立体選択的*N*-脱メチル化活性は回復してくることが確認された。このことはGlende¹⁶⁾のCCl₄処理によりアミノピリン*N*-脱メチル化活性が処理後24時間をピークに低下し、処理後4日目には回復するという報告と類似していた。

CCl₄による肝実質障害のメカニズムはCYPによりCCl₄がトリメチルラジカルとなり、これが脂質過酸化反応を起こし、過酸化脂質を生成して小胞体や細胞膜を損傷するものである。¹⁷⁾ また、CCl₄の毒性はCYPの誘導剤で増強され、¹⁸⁾ 阻害剤で軽減することが知られている。¹⁹⁾ また、CYPアイソザイムの中でCYP2C11は雄性ラット肝臓に常在し、²⁰⁾ Chpの立体選択的*N*-脱メチル化反応を触媒する主要なCYPアイソザイムである。⁹⁾ そこで今回はラット

Fig. 3. Western Blot Analysis of Male Rat Liver Microsomal Proteins with a Goat Anti-Rat CYP2C11 Antibody

Lane 1 contains the liver microsomes (5 μ g protein) from non-treated rats. Lanes 2, 3, 4, 5 and 6 contain the rat liver microsomes (5 μ g protein) at the 1, 2, 3, 5 and 7th days after CCl_4 -treatment, respectively. Lane 7 contains the standard CYP2C11 (10 μ g protein). They were electrophoresed in 10% acrylamide gels and then transferred electrophoretically to a polyvinylidene membrane and stained with anti-rat CYP2C11 serum.

CYP2C11 抗体を用いて、 CCl_4 による肝障害及びその障害回復時における Chp の *N*-脱メチル化に対する CYP2C11 の関与についてさらに検討を加えた。

未処理のラット肝ミクロソームに抗ラット CYP2C11 血清を添加すると Chp の *N*-脱メチル化に立体選択的な抑制効果が認められた。また、Chp の立体選択的 *N*-脱メチル化活性が低下した CCl_4 投与 1 日後の肝ミクロソームに抗ラット CYP2C11 血清を添加すると、*S*-(+)-Chp の *N*-脱メチル化活性に対し 25% の抑制効果が認められた。しかし、*R*-(-)-Chp に対しては抑制効果はなかった。さらに、ウエスタンブロッティングにより CYP2C11 の存在を確認したところ、未処理時と比較して CYP2C11 含量が減少した。このことから CCl_4 誘起肝障害における Chp の *N*-脱メチル化反応の低下は、CYP2C11 が傷害を受け減少した結果に起因することが示唆された。

一方、*RS*-($\pm$)-Chp の立体選択的 *N*-脱メチル化活性の回復期における CCl_4 投与 7 日後の肝ミクロソームに抗ラット CYP2C11 血清を添加すると未処理時と同様に顕著な *N*-脱メチル化活性の抑制効果が認められた。また、ウエスタンブロッティングにおいて、未処理時と同程度の CYP2C11 が認められた。このことから、 CCl_4 による肝障害の回復期には CYP2C11 が再び発現してくると思われた。

以上のことから、 CCl_4 誘起肝障害での *RS*-($\pm$)-Chp の立体選択的 *N*-脱メチル化活性の変

動は、CYP2C11 の CCl_4 による損傷及びその回復という過程に起因するものであることが考えられた。

引用文献

- 1) Gonzalez F. J., *Pharmacol. Rev.*, **40**, 243—288 (1988).
- 2) Kamm J. J., Ferullo C. R., Miller D. van Loon E. J., *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 659—671 (1969).
- 3) Peets E. A., Jackson M., Symchowicz S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **180**, 464—474 (1972).
- 4) Thompson J. A., Shiohita G. W., *Drug. Metab. Dispos.*, **9**, 5—9 (1981).
- 5) Huang S. M., Huang Y. C., Chiou W. L., *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **9**, 711—723 (1981).
- 6) Huang S. M., Athanikar N. K., Sridhar K., Huang Y. C., Chiou W. L., *Eur. J. Clin.*

- Pharmacol.*, **22**, 359—365 (1982).
- 7) Zbaida S., Touitou E., *J. Pharm. Sci.*, **77**, 188—190 (1988).
 - 8) 野村明生, 櫻井栄一, 引地 登, *薬誌*, **115**, 633—640 (1995).
 - 9) Nomura A., Sakurai E., Hikichi N., *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 257—262 (1997).
 - 10) Bradford M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248—254 (1976).
 - 11) Laemmli U. K., *Nature* (London), **227**, 680—685 (1970).
 - 12) Castro J. A., Sasame H. A., Howard S., Gillette J. R., *Life Sci.*, **7**, 129—136 (1968).
 - 13) Greene F. E., Bitten S., Gillette J. R., *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1531—1533 (1969).
 - 14) Smuckler E. A., Arrheniys E., Hultin T., *Biochem. J.*, **103**, 55—64 (1967).
 - 15) Dingell J. V., Murray H., *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1269—1278 (1968).
 - 16) Glende E. A. Jr., *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1697—1702 (1972).
 - 17) McCay P. B., Lai E. K., Poyer J. L., DuBose C. M., Janzen E. G., *J. Biol. Chem.*, **259**, 2135—2143 (1984).
 - 18) Garner R. C., McLean A. E. M., *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 645—650 (1969).
 - 19) Miyazawa T., Suzuki T., Fujimoto F., Kaneda T., *J. Biochem.*, **107**, 689—693 (1990).
 - 20) Waxman D. J., *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 71—84 (1988).