チアベンダゾール (TBZ) 投与マウス肝臓のグルタチオン (GSH) 濃度及び GSH 関連酵素活性

戸田千登世,* 安井照代, 橋爪清松, 永納秀男
名城大学薬学部

Effect of Thiabendazole (TBZ) on Glutathione (GSH) and GSH Related Enzymes in Mice Liver

Chitose TODA*, Teruyo YASUI, Kiyomatsu HASHIZUME, and Hideo NAGANO
Faculty of Pharmacy Meijo University, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan

(Received April 10, 2000; Accepted June 26, 2000)

The present study examines the effects of thiabendazole (TBZ), its metabolites, 5-hydroxythiabendazole (5-OH TBZ) and 2-acetylbenzimidazole (ABI), and structural related compounds, thiazoles and thioamides on glutathione (GSH) concentration and GSH-related enzymes in the livers of ICR 11 week-old female mice. GSH concentration in liver and kidney of mice given orally TBZ 0.65 mol/kg (TBZ group) increased significantly compared with control mice from 24 h to 48 h after administration of TBZ. Even in mice to which TBZ at 0.175 mol/kg was administered in combination with L-buthionine sulfoximine (BSO) 4 mmol/kg (i.p.) (BSO-TBZ group), kidney GSH showed significant increase compared with BSO-control mice 48 h after the administration of TBZ. γ -Glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) activity in the livers of the TBZ group markedly increased at 48 h and that of BSO-TBZ group increased from 24 h to 48 h. γ -GCS in mice liver is thus enhanced by TBZ regardless of BSO administration. Hepatic glutathione peroxidase activity of the TBZ group did not change in response to cumene hydroperoxide substrate. That of BSO-treated mice decreased by TBZ-coadministration and significant differences was noted between BSO-control and BSO-TBZ groups from 1 h to 48 h later. Hepatic glutathione S-transferase (GST) activity toward 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) was significantly elevated 24 h after administrations of TBZ in TBZ and BSO-TBZ groups. GST activity toward 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy) propane of TBZ group increased from 0.5 h to 24 h. Hepatic GST activity toward DCNB and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene did not change by administration of 0.65 mol/kg 5-OH TBZ or ABI but increased by administrations of 0.33 mol/kg of thiazole, 4-methylthiazole, 4,5-dimethylthiazole or 2,4-dimethylthiazole. Increase in GSH concentration and GST activity in mice liver by TBZ administration may be considered to provide protection from TBZ or its active metabolites.

Key words—thiabendazole; glutathione; mice liver; glutathione S-transferase; thiazole

緒 言

チアベンダゾール (TBZ) は、家畜の駆虫薬として開発され糞線虫の駆除に用いられているほかに、広い抗菌スペクトルを有することから、合成樹脂や木材などの防腐剤、繊維製品の抗菌加工、農作物のプレ及びポストハーベストとして広く使用されている。我が国では 1987 年から食品添加物に指定されカンキツ類やバナナに使用が許可されているが、残留が懸念される畜産食品及び農産物は国際食品規格委員会により残留許容量が決められている。¹⁾

TBZ は主に芳香環の 5 位水酸化体とその硫酸及びグルクロン酸抱合体として尿中に排泄されることが知られている^{2,3)}が、Mizutani らはグルタチオン (GSH) 合成阻害剤 L-ブチオニンスルホキシミン (BSO) 投与 GSH 涸渇 8 週令雄マウスで TBZ 投与

による GSH 量の減少及び腎障害を認め、⁴⁾ 腎毒性原因物質が TBZ のチアゾール部分に由来する活性代謝物であることを報告^{5,6)}している。

我々は先に、TBZ の安全性再評価を目的として妊娠マウスからスタートした一連の ICR 系雌雄マウスを用いた TBZ 経口大量投与試験において、TBZ が肝ミクロゾームの薬物代謝酵素誘導^{7,8)} (P450 の増加、アニリン及び TBZ 水酸化活性の上昇、雄マウスにおけるテストステロン代謝活性の上昇) を示すことや BSO 前処理がされていない雌マウスで TBZ の連続投与により腎毒性、主として尿細管上皮細胞の異常⁹⁾を認めている。TBZ の薬物代謝酵素誘導は、5 週令マウスでは性差が認められないが、11 週令マウスでは P450 の増加や TBZ 水酸化活性の上昇が雄よりも雌で顕著なこと⁸⁾を、また腎毒性は BSO 投与 GSH 涸渇マウスで顕著で、さ

らにその毒性は雌よりも雄、5週令よりも11週令マウスに強く現れること¹⁰⁾を報告している。

これらのことからTBZの体内挙動がGSHと関わり深いことが示唆されることや、先の実験での腎毒性発現及び死亡例⁷⁻¹⁰⁾から見ても成熟雌マウスで毒性発現が低いことから、今回、ICR系11週令雌マウスを用いて、TBZ投与及びグルタチオン涸渇時のTBZ投与が、GSH量、GSH合成に関連した酵素 γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), GSH 抱合に関連した酵素 glutathione S-transferase (GST), 活性酸素の処理に関与する glutathione peroxidase 及びTBZ代謝物の抱合に関連した酵素の1つ UDP-glucuronosyltransferase の活性に及ぼす影響について検討した。さらにTBZ関連化合物としてチアゾール、4-メチルチアゾール、2,4-ジメチルチアゾール、4,5-ジメチルチアゾール、チオアセトアミド及びチオベンズアミドの投与がGST活性に及ぼす影響について調べた。

実験方法

1. 試薬 TBZ, 2,4-ジメチルチアゾール, 4,5-ジメチルチアゾール, チオアセトアミド, チオベンズアミドは東京化成製, チアゾール及び4-メチルチアゾールはアルドリッチ製, 1,2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (DCNB), 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB), GSH 及び 5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸 (DTNB) は和光製, 4-フルオロ-7-スルフォベンゾフラザンアンモニウム (SBD-F) は同仁化学製, 1,2-エポキシ-3-(*p*-ニトロフェノキシ) プロパン (ENP) 及びBSOはシグマ製を使用し, 5-ヒドロキシチアベンダゾール (5-OH TBZ)²⁾及び2-アセチルベンズイミダゾール (ABI)¹¹⁾は当教室で合成したものを使用した。

2. 実験動物 SLC-ICR系雌マウスを10週令時に購入し、飼料(日本クレア固形飼料CE-2)及び水道水を自由に与え、室温25±1°Cで1週間慣らし飼育したものを使用した。

3. 投与試料及び投与方法 BSOは400mM生理食塩溶液, TBZは3.5及び13%(w/v)オリーブ油懸濁液, 5-OH TBZは14.1%(w/v)及びABIは10.4%(w/v)オリーブ油懸濁液, チアゾールは2.75%(w/v), 4-メチルチアゾールは3.2%(w/v), 2,4-ジメチルチアゾール及び4,5-ジメチルチアゾールは3.7%(w/v)オリーブ油溶液, チオアセトアミドは1.0%(w/v)水溶液及びチオベンズアミドは1.8%(w/v)水懸濁液を調製し投与試料とした。

11週令のICR系雌マウスに、BSO-TBZ群はBSO投与(4mmol/kg i.p.)の1時間後にTBZの0.175mol/kgを1回経口投与した。TBZ群, 5-OH TBZ群及びABI群はそれぞれ投与試料を用いて0.65mol/kg, チアゾール群, 4-メチルチアゾール群, 2,4-ジメチルチアゾール群及び4,5-ジメチルチ

アゾール群は0.33mol/kg, チオアセトアミド群及びチオベンズアミド群は0.13mol/kgを1回経口投与した。投与試料に変えてオリーブ油10ml/kgを経口投与したものをそれぞれBSO-対照群及び対照群とした。

4. GSHの定量及び酵素活性の測定 投与の一定時間後に頸動脈切断により瀉血して屠殺し、摘出した肝臓及び腎臓に1.15%(w/v)KCl-10mMEDTA溶液を加えホモジナイズした。ホモジネートを用いGSHの定量をToyo'oka及びImai¹²⁾に準じたHPLC法で行った。常法に従って肝から調製した可溶性画分及びミクロゾームを用いて酵素活性の測定を行った。可溶性画分を用いて、 γ -GCS活性をSekura及びMeister¹³⁾に、glutathione peroxidase活性をLittle及びO'Brien¹⁴⁾に、GST活性は、DCNBを基質としてAsaokaら¹⁵⁾CDNB及びENPを基質としてHabigら¹⁶⁾の方法に準じそれぞれ測定した。ミクロゾームを用いてUDP-glucuronosyltransferase活性をIsselbacherら¹⁷⁾に準じ測定した。

5. 統計学的処理 Student-*t* 検定で行った。

結果

1. TBZ投与によるGSH濃度の変動

TBZ群ではTBZ投与後12時間から48時間に、オリーブ油のみ投与した対照群に対し、肝GSH濃度の有意な上昇を認めた。

GSH合成阻害剤BSOを1時間前に前投与したBSO-対照群はオリーブ油投与後0.5時間に肝臓のGSH濃度は無投与群の1/2近くまで低下、更に6時間まで減少傾向を示した。GSH涸渇状態においてTBZを投与したBSO-TBZ群は6時間後の肝臓のGSHは更に低濃度を示し、BSO-対照群に対し有意な低下を認めた。BSO-対照群は12時間後には肝GSH濃度の回復が認められたが、BSO-TBZ群のGSH濃度の回復は遅れ有意に低かった。24時間後にはBSO-TBZ群でも肝GSH濃度は回復した。腎臓のGSH濃度は肝臓の約1/4であるが、TBZ群及びBSO-TBZ群とも肝臓と同様な傾向を示し、TBZ群のGSH濃度は24及び48時間後には対照群に比べ有意に高かった。BSO-TBZ群の腎GSH濃度は、12時間後にBSO-対照群に比べ有意な低下が認められたが、24時間後には回復、48時間後にはTBZ群と同様上昇した (Fig. 1)。

2. γ -GCS活性

GSH生合成の第一段階のglutamylcysteineの生合成に関与する肝臓の γ -GCS活性が、TBZ群では上昇傾向にあり、48時間後には有意な上昇を認めた。

γ -GCS阻害剤BSOの効果はBSO-対照群及びBSO-TBZ群ともに0.5から1時間後 (BSO投与の1.5から2時間後) に認められ活性は低下したが、3時間後には回復し、24時間後にはBSO-TBZ群で

Fig. 1. Glutathione Concentration in Mice Liver and Kidney after Administration of TBZ

□ none, ▨ control: mice were administered 10 ml/kg of olive oil (p.o.), ▩ TBZ: 0.65 mol/kg of TBZ (p.o.), ▤ BSO-control: 10 ml/kg of olive oil (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.), ▦ BSO-TBZ: 0.175 mol/kg of TBZ (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.).

✦ total content, ✧ reduced form

All values expressed as reduced form. Each value is the mean $\pm$ S.D. ($n=3-5$). Significantly different from the control or the BSO-control, a) $p<0.05$, b) $p<0.01$.

有意な活性上昇を認めた (Fig. 2).

3. Glutathione Peroxidase 活性

クメンヒドロパーオキシドを基質として測定した肝臓の glutathione peroxidase 活性は, TBZ 群では無投与群及び対照群と同程度の活性を示し大きな変化はなかったが, BSO 投与により低下傾向が見られ, その活性は TBZ を投与したとき更に低下し, BSO-TBZ 群は 1 時間から 48 時間で BSO-対照群に対し有意な低下を認めた (Fig. 3).

4. DCNB 及び ENP に対する GST 活性

GST の基質として置換基がアニオンとして脱離するタイプ I の DCNB 及び GSH が付加するタイプ II の ENP を用いて肝 GST 活性を測定した.

DCNB に対する GST 活性 (DCNB-GST) は, BSO 投与の影響を受けなかった. TBZ 投与により

24 時間以後活性は上昇し, TBZ 群及び BSO-TBZ 群ともそれぞれ対照群に対し有意な上昇を認めた.

ENP を基質としたときの GST (ENP-GST) は TBZ 投与後 0.5 時間から対照群に対し活性が高く, 24 時間まで有意な活性上昇を認めたが, 48 時間後の活性は低下し対照群のレベルに等しかった (Fig. 4).

DCNB-GST が GSH 濃度上昇及び GCS 活性上昇と平行した挙動を示すのに対し, ENP-GST 活性は TBZ 及びその代謝物の体内濃度が高いと思われる時間帯で高かった.

5. TBZ 関連化合物投与の肝 GST 活性への影響

TBZ 関連化合物について投与 48 時間後の DCNB, CDNB 及び ENP に対する肝 GST 活性を測定した.

TBZ の主な代謝物 5-OH TBZ や少量ではあるが

Fig. 2. γ -Glutamylcysteine Synthetase in Mice Liver after Administration of TBZ

■ none, ○ control: mice were administered 10 ml/kg of olive oil (p.o.), ● TBZ: 0.65 mol/kg of TBZ (p.o.), ▽ BSO-control: 10 ml/kg of olive oil (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.), ▽ BSO-TBZ: 0.175 mol/kg of TBZ (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.).

Each value is the mean $\pm$ S.D. ($n=3-5$). Significantly different from the control or the BSO-control, a) $p<0.05$, b) $p<0.01$.

Fig. 3. Glutathione Peroxidase in Mice Liver after Administration of TBZ

■ none, ○ control: mice were administered 10 ml/kg of olive oil (p.o.), ● TBZ: 0.65 mol/kg of TBZ (p.o.), ▽ BSO-control: 10 ml/kg of olive oil (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.), ▽ BSO-TBZ: 0.175 mol/kg of TBZ (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.).

Each value is the mean $\pm$ S.D. ($n=3-5$). Significantly different from the control or the BSO-control, a) $p<0.05$, b) $p<0.01$.

尿中に確認されたABIはDCNB-、CDNB-及びENP-GST活性の上昇を認めなかった。

肝臓あるいは腎臓に対する毒性が報告⁵⁾されているチアゾール類は、投与量をTBZの1/2当量に相当する量としたが、チアゾール、4-メチルチアゾール、2,4-ジメチルチアゾール及び4,5-ジメチルチアゾールで、TBZと同様にDCNB-及びCDNB-GST活性が有意に上昇し、これらの中で腎毒性が最も強

い⁵⁾チアゾールで高い値を示した。

チアゾールの毒性の原因とされる⁵⁾チオアミド構造を有するチオアセトアミド及びチオベンズアミドは毒性を考慮して投与量をTBZの1/5当量とした。チオベンズアミドはDCNB-GST活性が高い傾向を示し、チオアセトアミドは毒性が強く3匹中2匹が死亡した。

ENP-GST活性はTBZでは投与24時間までに活性上昇が認められており、48時間後の測定は適当でないが、チアゾール、4-メチルチアゾール及び4,5-ジメチルチアゾールで高い傾向にあった (Table 1)。

6. 肝UDP-glucuronosyltransferase 活性

TBZの主な代謝経路は5位の水酸化とその硫酸及びグルクロン酸抱合とされており、^{2,3)}マウスでの投与試験においても25時間尿中に5位の水酸化体を、その大部分を硫酸及びグルクロン酸抱合体として確認し、これらの抱合体及びTBZの生体内濃度が6時間後には大きく低下することを報告¹⁸⁾している。グルクロン酸抱合に関与するUDP-glucuronosyltransferaseは、TBZ投与の1時間後には肝臓で活性上昇が認められ、4時間後も高い活性を示すが生体内のTBZ濃度が非常に低い25時間後活性は低下した。 γ -GCS及びDCNB-GSTがTBZ投与の24及び48時間後に有意な活性上昇を示したのとは対照的であった (Table 2)。

考 察

Mizutaniら⁴⁾はBSO投与GSH枯渇8週令雄マウスにおいて、TBZ 200 mg/kg投与で2時間後に腎臓及び肝臓のGSH濃度の有意な低下を認めているが、今回の11週令雌マウス、TBZ 350 mg/kg投与では、肝臓においてBSO-対照群の γ -GCS活性は3時間 (BSO投与の4時間) に回復し、GSH濃度も12時間には回復するが、BSO-TBZ群では酵素活性が既に回復している6及び12時間にGSH濃度の低下が認められ、腎臓でも12時間後に有意な低下を認めた。BSO-TBZ群で認められるようなGSHの濃度低下は、GSHの消費をGSH枯渇状態で観察可能としたもので、TBZの代謝にGSH要求が高まっているために起こると思われる。一方、GSH濃度の上昇が、TBZ群では投与12時間以降に、BSO-TBZ群でも腎臓で48時間後に認められた。GSH生合成の律速酵素である γ -GCSの活性上昇からも、GSH濃度の上昇はGSH生成の亢進によるものであろうと思われる。このような γ -GCS活性の上昇に伴うGSH量の増加は、酸化防止剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA) 投与マウスの肝臓¹⁹⁾や2,3-ジメトキシ1,4-ナフトキノン及びメナジオンによる酸化ストレスで培養牛肺動脈内皮細胞 (BPAEC)²⁰⁾において起こることが報告されている。またTBZの尿細管上皮細胞に対する毒性のた

Fig. 4. Glutathione S-Transferase to DCNB and ENP in Mice Liver after Administration of TBZ

■ none, ○ control: mice were administered 10 ml/kg of olive oil (p.o.), ● TBZ: 0.65 mol/kg of TBZ (p.o.), ▽ BSO-control: 10 ml/kg of olive oil (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.), ▴ BSO-TBZ: 0.175 mol/kg of TBZ (p.o.) 1 h after BSO 4 mmol/kg (i.p.).

Each value is the mean $\pm$ S.D. ($n=3-5$). Significantly different from the control or the BSO-control, a) $p<0.05$, b) $p<0.01$.

め腎組織中の γ -glutamyltransferase (γ -GTP) の活性低下が認められており,^{9,10)} γ -GTP 活性低下による GSH の分解抑制も、腎障害の著しい BSO-TBZ 群の腎臓では GSH 濃度上昇の一因となっているかもしれない。

Fujitani ら²¹⁾ は TBZ の 5 位の水酸化体以外の代謝物として 4 位水酸化体及びチアゾール部分の開裂により生じた ABI を報告しており、さらに Mizutani ら⁹⁾ はマウス尿中代謝物としてチアゾール部分の開裂により生じる benzimidazole-2-ylglyoxal とチオホルムアミドを同定し、TBZ の腎毒性はチオホルムアミドの酸化生成物 S-dioxide によることを示唆し、GSH が代謝生成物の解毒あるいは腎毒性発現の防御に関わっている可能性を示唆している。

また我々は、TBZ の排泄について妊娠マウスを

用いた先の実験で、TBZ 投与の TBZ 体内濃度は 6 時間後には大きく低下し、5 位の水酸化体の硫酸及びグルクロン酸抱合体は 48 時間尿まで検出されるがその大部分は 25 時間までに排泄されること、しかしこれら 5 位の水酸化体とその抱合体の排泄量は、投与 TBZ 量に対し一回投与群で 15—25%、TBZ の肝ミクロゾームの薬物代謝酵素誘導により代謝が亢進されている連続投与群で最終回投与量の 30—50% にすぎないことを、^{7,18)} 非妊娠マウスにおいても 5 位の水酸化体とその抱合体としての TBZ の排泄は妊娠マウスと変わらないことを (未報告) 認めており、TBZ を大量投与されたマウスでは 5 位の水酸化以外の経路により代謝される TBZ が多いことが示唆された。今回の TBZ 投与による、GSH 合成に関与する γ -GCS 及び GSH 抱合に関連

Table 1. Hepatic Glutathione S-Transferase to Various Substrates in Mice 48h after Administration of TBZ and the Related Compounds

Group	Specific activity(nmol/mg protein/min)		
	DCNB	CDNB	ENP
None	95.8 ± 12.8	4033 ± 845	58.8 ± 6.8
Control	102.3 ± 7.3	3746 ± 132	61.4 ± 13.5
TBZ	215.3 ± 17.4 ^{b)}	7756 ± 125 ^{b)}	69.2 ± 7.3
5-OH TBZ	115.6 ± 10.9	4388	32.8
ABI	92.6 ± 9.1	4674	30.9
Thiazole	233.1 ± 13.9 ^{b)}	6288 ± 652 ^{b)}	109.9 ± 1.7 ^{b)}
4-Methylthiazole	216.1 ± 15.0 ^{b)}	5010 ± 424 ^{b)}	95.3 ± 11.2 ^{a)}
2,4-Dimethylthiazole	187.3 ± 16.5 ^{a)}	4603 ± 337 ^{b)}	61.3 ± 17.9
4,5-Dimethylthiazole	215.8 ± 18.1 ^{b)}	5007 ± 511 ^{b)}	102.8 ± 12.4 ^{b)}
4-Thiazolecarboxyl chloride	130.3	3171	56.7
Thioacetamide	94.0	2314	36.8
Thiobenzamide	151.4	3235	80.8

DCNB: 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and ENP: 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxyl)propane were used as substrate. Mice were administered 10 ml/kg of olive oil (control), 0.65 mol/kg of TBZ, 5-OH TBZ and ABI, 0.33 mol/kg of thiazoles in olive oil and 0.13 mol/kg of thioacetamide and thiobenzamide in water, (p.o.), respectively. Each value is the mean ± S.D. (*n* = 3—5) and the mean (*n* = 2) except for thioacetamide (*n* = 1). Significantly different from the control, *a*) *p* < 0.05, *b*) *p* < 0.01.

Table 2. Hepatic UDP-Glucuronosyltransferase in Mice Treated with TBZ

Time (h)	Specific activity (nmol/mg protein/min)	
	Control	TBZ
None	0.07 ± 0.08	
1	0.08 ± 0.03	0.63 ± 0.13 ^{b)}
4	0.03 ± 0.02	0.88 ± 0.30 ^{b)}
25	0.06 ± 0.10	0.15 ± 0.08

Control: olive oil and TBZ: TBZ 0.65 mol/kg were administered (p.o.). Each value is the mean ± S.D. (*n* = 4—5). Significantly different from the control, *a*) *p* < 0.05, *b*) *p* < 0.01.

する GST の活性上昇やチアゾール化合物での GST 活性上昇などからも、マウスにおける TBZ の代謝については、比較的速やかに排泄される 5 位水酸化体とそのグルクロン酸及び硫酸抱合体ばかりでなく、TBZ のチアゾール部分のエポキシ化と開裂による代謝生成物^{6,21)}に GSH 及び GST が関与して代謝排泄される可能性が考えられる。

TBZ の代謝の第 I 相反応 (functionalization reaction) に関与する肝ミクロゾーム薬物代謝酵素は TBZ のほか 3MC 及び PB でも誘導されることを、TBZ を基質とした *in vitro* 実験で確認しており、⁸⁾ この時その代謝物の 1 つ 5-OH TBZ の生成もこれ

らすべてで有意に増加するが、その生成率は aniline hydroxylase 活性を誘導しない 3MC (CYP1A1) が 84% であったのに対し、aniline hydroxylase 活性を誘導する PB (CYP2B1) 及び TBZ はそれぞれ 57% 及び 64% と対照群の約 75% に比べても低い傾向にある (未報告) ことを認めている。さらに TBZ の薬物代謝酵素誘導に関しては Aix らにより、TBZ はウサギ肝培養細胞で CYP1A1 を増加し、この時 CYP1A1 に特異的な mRNA レベルも上昇するが、CYP1A1 の誘導に関与する Ah-receptor のリガンドではなく、CYP1A1 の誘導は TBZ により Ah-receptor 非依存的に起こることが報告されている。²²⁾ CYP1A1 は TBZ の 5 位水酸化に関与していると考えられるが、マウスでは PB 誘導 (CYP2B1) でも 5 位水酸化体は増加することや TBZ の水酸化体は 5 位の他に 4 位も報告されておりベンズイミダゾール部のエポキシ化を経ることも示唆されることなどからも TBZ の水酸化あるいは代謝に関わる P450 分子種は複数存在すると思われる。さらにチアゾール部で起こる開裂は P450 によるエポキシ化を経て起こり、^{5,6)} 生成したチオホルムアミドの毒性原因とされる S-dioxide への酸化⁶⁾は FAD 含有 monooxygenase による²³⁾とされている。またもう 1 つの分解生成物 benzimidazole-2-ylglyoxal のようなジカルボニル化合物は一般にアミンやチオール化合物等と縮合反応をすることが知られており、システインや GSH とも反応するかも知れない。さらにベンズイミダゾール部分については、TBZ のマウスにおける催奇形性²⁴⁾や sister-chromatid exchange 頻度の増加、micronucleated cell の増加及び anaphase-telophase cell の異常などの変異原性²⁵⁾に関連した構造構成部分と考えられている。

TBZ の代謝では、複数の肝ミクロゾーム P450 分子種や FAD 含有 monooxygenase が関与して生じたタイプの異なる代謝物の第 II 相反応 (conjugation or synthetic reaction) に関わる酵素として、UDP-glucuronosyltransferase や GST の活性が上昇すると考えられるが、主に 5-OH TBZ のグルクロン酸抱合を行う UDP-glucuronosyltransferase が速やかに上昇後基底状態に戻るのに対し、DCNB- 及び ENP-GST は経時的に異なる活性上昇を示すことから、タイプの異なる代謝物あるいは中間代謝物に対応した GST 分子種の誘導が示唆される。

安定で安全とされる TBZ ではあるが、肝や腎毒性が知られる⁹⁾チアゾール骨格と変異原性が報告されている^{26—29)}ベンズイミダゾール骨格とを有することからその代謝については種々の活性代謝物の生成が懸念され、GSH 量の増加及び GST 活性の上昇はそれらに対する生体防御反応の 1 つと考えられる。

またこのような GSH 量の増加や GST 活性の上昇は、3'-メチル-4-ジメチルアミノアゾベンゼンなどの発癌物質³⁰⁾や発癌抑制作用が知られる酸化防止剤

BHA^{19,31-34})投与でもよく知られており, TBZ により誘導される GST 分子種については更に検討が必要であり, 薬物代謝酵素 P450 の誘導も含めたこれら酵素活性誘導の違いが, 11 週令雌マウスにおける TBZ の毒性発現の低下に寄与しているのではないかと考えられることから雄マウスとの比較も必要と思われる。

ま と め

(1) 肝 GSH 濃度は, TBZ 投与により TBZ 群は 12 から 48 時間後有意に上昇した。BSO-TBZ 群では 6 から 12 時間後, BSO-対照群に対し有意な低下が見られたが, 24 時間後には回復した。

腎 GSH 濃度も肝臓と同様な傾向を示し, BSO-TBZ 群でも 48 時間後有意な GSH 濃度の上昇を認めた。

(2) 肝 γ -GCS 活性は, TBZ 投与により 24 時間後上昇傾向にあり, TBZ 群は 48 時間後, BSO-TBZ 群は 24 及び 48 時間に有意な上昇を認めた。

(3) 肝 Glutathione peroxidase 活性は, TBZ 群では変化がなかったが, BSO 投与により低下傾向が見られ, TBZ を投与したとき更に低下した。

(4) 肝 DCNB-GST は, TBZ 群及び BSO-TBZ 群ともそれぞれ対照群に対し, TBZ 投与の 24 時間後有意に活性上昇した。ENP-GST は, TBZ 投与群で 0.5 時間から 24 時間まで高い活性を示し対照群に対し有意差を認めたが, 48 時間後には対照群のレベルに低下した。

(5) TBZ の代謝物 5-OH TBZ 及び ABI は肝 DCNB-, CDNB- 及び ENP-GST 活性の上昇を認めなかった。

TBZ 及び TBZ と構造的に関連のあるチアゾール類のチアゾール, 4-メチルチアゾール, 2,4-ジメチルチアゾール及び 4,5-ジメチルチアゾールは, DCNB- 及び CDNB-GST 活性上昇を示した。

(6) 肝 UDP-glucuronosyltransferase 活性は TBZ 投与の 1 から 4 時間後に高い値を示すが, TBZ 濃度が低下した 25 時間後は元のレベルに戻った。

(7) 以上の結果より, マウスにおける TBZ 投与は肝 γ -GCS 及び GST 活性を誘導し, GSH 生成の亢進と TBZ, TBZ の代謝物あるいはそれらによって生ずる生体の異常に応答した GSH 利用の亢進が示唆された。

REFERENCES

- 1) "Shokuhintenkabutsu Koteisho Kaisetsusho", eds. by Ishidate M., Suzuki I., Tanimura M., Hirokawa Pub. Co., Tokyo, 1992, pp. D-728-D-737.
- 2) Tocco D. J., Buhs R. P., Brown H. D., Matzuk A. R., Mertel H. E., Harman R. E., Trenner N. R., *J. Med. Chem.*, **7**, 399-404 (1964).
- 3) Tocco D. J., Egerton J. R., Bowers W., Christensen V. W., Rosenblum C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **149**, 263-271 (1965).
- 4) Mizutani T., Ito K., Nomura H., Nakanishi K., *Fd. Chem. Toxic.*, **28**, 169-177 (1990).
- 5) Mizutani T., Yoshida K., Kawazoe S., *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 174-179 (1993).
- 6) Mizutani T., Yoshida K., Kawazoe S., *Drug Metabolism and Disposition*, **22**, 750-755 (1994).
- 7) Hashizume K., Toda C., Yasui T., Nagano H., Ariyoshi T., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.*, **33**, 349-355 (1987).
- 8) Toda C., Yasui T., Hashizume K., Nagano H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **41**, 220-226 (1995).
- 9) Hashizume K., Toda C., Yasui T., Nagano H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **36**, 413-418 (1990).
- 10) Hashizume K., Toda C., Yasui T., Nagano H., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 69-77 (1992).
- 11) Cheeseman G. W. H., *J. Chem. Soc.*, **1964**, 4645-4646.
- 12) Toyo'oka T., Imai K., *J. Chromatogr.*, **282**, 495-500 (1983).
- 13) Sekura R., Meister A., *J. Biol. Chem.*, **252**, 2599-2605 (1977).
- 14) Little C., O'Brien P. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145-150 (1968).
- 15) Asaoka K., Ito H., Takahashi K., *J. Biochem.*, **82**, 973-981 (1977).
- 16) Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B., *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139 (1974).
- 17) Isselbacher K. J., Chrabas M. F., Quinn R. C., *J. Biol. Chem.*, **237**, 3033-3036 (1962).
- 18) Yasui T., Toda C., Hashizume K., Nagano H., Fujii M., Kameyama Y., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **33**, 25-32 (1987).
- 19) Eaton D. L., Hamel D. M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **126**, 145-149 (1994).
- 20) Shi M. M., Iwamoto T., Forman H. J., *Am. J. Physiol.*, **267**, L414-L421 (1994).
- 21) Fujitani T., Yoneyama M., Ogata A., Ueta T., Mori K., Ichikawa H., *Fd. Chem. Toxic.*, **29**, 265-274 (1991).
- 22) Aix L., Rey-Grobellet X., Larrieu G., Lesca P., Galtier P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 1483-1489 (1994).
- 23) Hanzlik R. P., Cashman J. R., *Drug Metab. Dispos.*, **11**, 201-205 (1983).
- 24) Ogata A., Ando H., Kubo Y., Hirata K., *Fd.*

- Chem. Toxic.*, **22**, 509–520 (1984).
- 25) Mudry de Pargament M. D., Labal de Vinuesa M., Larripa I., *Mutat. Res.*, **188**, 1–6 (1987).
- 26) Szybalski W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **76**, 475–489 (1958).
- 27) Seiler J. P., *Mutat. Res.*, **15**, 273–276 (1972).
- 28) Seiler J. P., *Mutat. Res.*, **40**, 339–348 (1976).
- 29) Banduhn N., Obe G., *Mutat. Res.*, **156**, 199–218 (1985).
- 30) Inoue M., Sakamoto Y., Suzuki M., Tateishi N., Higashi T., Murota S., Yamaguchi K., “Glutathione,” eds. by Sakamoto Y., Kinoshita S., Kodansha Tokyo, 1986, pp. 126–139.
- 31) Benson A. M., Batzinger R. P., Ou S.-Y. L., Bueding E., Cha Y.-N., Talalay P., *Cancer Res.*, **38**, 4486–4495 (1978).
- 32) Benson A. M., Cha Y.-N., Bueding E., Hein H. S., Talalay P., *Cancer Res.*, **39**, 2971–2977 (1979).
- 33) Benson A. M., Hunkeler M. J., York J. L., *Biochem. J.*, **261**, 1023–1029 (1989).
- 34) Pearson W. R., Windle J. J., Morrow J. F., Benson A. M., Talalay P., *J. Biol. Chem.*, **258**, 2052–2062 (1983).