Bromazepam の代謝に関する研究 (第 4 報¹⁾) 2-(2-Amino-5-bromobenzoyl)-pyridine の肝ミクロソームによる水酸化²⁾

沢田英夫, 原 明,^{3a)} 木戸 啓, 福元 守^{3b)}

徳島文理大学薬学部,^{3a)} 岐阜大学医学部^{3b)}

Studies on Metabolism of Bromazepam. IV.¹⁾ Hydroxylation of 2-(2-Amino-5-bromobenzoyl)pyridine by Liver Microsomal Enzymes²⁾

HIDEO SAWADA, AKIRA HARA,^{3a)} AKIRA KIDO, and MAMORU FUKUMOTO^{3b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University of Arts & Science^{3a)}
and Gifu University, School of Medicine^{3b)}

(Received January 24, 1974)

Hydroxylation of 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine (ABBP) to 3-OH-ABBP in animal liver was found to be mediated by the microsomal mixed-function oxidase system requiring nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) and O₂. When ABBP was incubated with microsomal fraction prepared from the liver of rats treated with phenobarbital or benzo[*a*]pyrene, hydroxylation of ABBP was enhanced about 2-fold of that of control rats. Hydroxylation of ABBP by microsomes of rats and rabbits was inhibited by SKF-525A, HgCl₂, CuCl₂, *p*-chloromercuribenzoate (PCMB), cytochrome c, and CO. The kinetic constants of ABBP hydroxylation by liver microsomes of various animal species indicated a similar affinity of ABBP.

It is of interest that a factor which activates the hydroxylating activity was found in the soluble fraction of various organs of animals.

Bromazepam (BZ), 7-bromo-1,3-dihydro-5-(2-pyridyl)-2H-1,4-benzodiazepin-2-one の代謝について著者らはウサギおよびイヌの BZ 経口投与尿よりその代謝産物として BZ の環開裂体である 2-(2-amino-5-bromobenzoyl)pyridine (ABBP) およびその水酸化体 2-(2-amino-5-bromo-3-hydroxybenzoyl)pyridine (3-OH ABBP),^{4a,b)} さらに BZ の 3-hydroxy 誘導体 (3-OH BZ)⁵⁾ を単離同定した。またウサギ,⁵⁾ およびヒト¹⁾ におけるこれら代謝産物の尿中排泄を観察し, 3-OH ABBP のグルクロン酸抱合体が主代謝産物として排泄されることを明らかにしたが, 最近 Schwartz ら⁶⁾ もまた ¹⁴C-BZ を投与したラット, イヌ, マウスおよびヒトの代謝産物として 3-OH ABBP を認めている。本報では 3-OH ABBP の生成経路を明らかにする目的で各種動物肝における BZ の代謝産物 ABBP の水酸化機作について検討し, 本水酸化が主として肝ミクロソームの水酸化酵素により行なわれることを認め, 本酵素の性状および各種動物間の種差について実験を行なったので報告する。

実 験 の 部

実験材料 試薬——ABBP および 3-OH ABBP は Hoffmann-La Roche から提供を受けた合成標品を用いた。nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH) および glucose-6-phosphate (G-6-P) は Sigma Chemical Co. の製品を, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) は Boehringer Mannheim の製品を用いた。

- 1) 第 3 報: 沢田英夫, 福元 守, 矢野博子, 原 明, 木戸 啓, 岐阜医紀, **20**, 619 (1972).
- 2) 日本薬学会第 93 年会で発表, 東京, 1973 年 4 月.
- 3) Location: a) Yamashiro-cho, Tokushima; b) Tsukasa-machi 40, Gifu.
- 4) a) H. Sawada, *Experientia*, **28**, 393 (1972); b) 沢田英夫, 矢野博子, 木戸 啓, 薬誌, **92**, 1237 (1972).
- 5) 沢田英夫, 原 明, 矢野博子, 木戸 啓, 岐阜医紀, **21**, 237 (1973).
- 6) M.A. Schwartz, E. Postma, S.J. Kolis, A.S. Leon, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1776 (1973).

使用動物——体重 150—200 g の Wistar 系雄性ラット，体重 2.5—3.0 kg の雄性ウサギおよびアカゲザル（雌）を実験に供した。薬剤処置ラットはあらかじめ phenobarbital sodium (75 mg/kg) を生理食塩水にとかし，4 日間腹腔内に投与し，benzo[*a*]pyrene (25 mg/kg) は落花生油にとかし 1 回腹腔内投与した。対照群にはそれぞれ生理食塩水と落花生油を投与した。

実験方法 酵素液の調製——実験には 24 時間絶食させた各動物を瀉血死させたのち，生理食塩水で灌流した肝を剔出した。酵素の細胞局在性の実験には，肝に 9 倍量の 0.25M sucrose を加え Potter-Elvehjem テフロンガラスホモジナイザーでホモジナイズし，Hogeboom-Schneider の方法⁷⁾ に準じて核，ミトコンドリア，ミクロゾームおよび可溶性画分に分離した。しかし，ミクロゾームを主体とする本実験では 10% 肝ホモジネートを 9000×*g* で 10 分間遠心分離した上清を 105000×*g* で 60 分間遠心分離し，得られたミクロゾーム沈殿をホモジネートと同量の 0.25M sucrose に懸濁して用いた。なお，以上の操作は 0—4° で行なった。

酵素活性の測定——i) ABBP 水酸化活性の反応系：20 ml 三角フラスコに Tris-HCl buffer (pH 7.4, 100 μmoles), NADP (1 μmole), MgCl₂ (12.5 μmoles), nicotinamide (2.5 μmoles), G-6-P (25 μmoles), G-6-P DH (1 unit), ABBP (0.5 μmole) および酵素液 0.5 ml をそれぞれ添加し，全量 2.5 ml とした。Incubation は metabolic shaker で 37°, 30 分間空気気相下で行なった。

ii) 3-OH ABBP の定量：生成した 3-OH ABBP は反応液に 30% トリクロル酢酸 0.5 ml を加えて反応を停止し，遠心分離 (3500 rpm, 10 分間) して除蛋白した上清 2 ml に 17.5% 炭酸ナトリウム 0.2 ml を加えて中和後，1M borate buffer (pH 8.0) 1 ml と 2,6-dichloroquinonechloroimide⁸⁾ 溶液 (2,6-dichloroquinonechloroimide 100 mg を用時 100 ml の水に加え 10 分間攪拌し過して用いる) 0.3 ml を加え発色させ 10 分間放置後，630 mμ の吸光度で測定した。

iii) 3-OH ABBP の代謝活性の測定：前記の反応系を用い，基質として 3-OH ABBP (0.15 μmole) を添加して同様反応を行なった。活性値は 3-OH ABBP の減少量 (mμmoles) で表わした。

蛋白量の測定——蛋白量は Gornall ら⁹⁾ のビュレット法および Lowry ら¹⁰⁾ の方法で測定した。

反応生成物の抽出——反応系として phosphate buffer (pH 7.4, 300 μmoles), NADP (2.5 μmoles), G-6-P (100 μmoles), MgCl₂ (25 μmoles), ABBP (25 μmoles) および肝ホモジネート (肝 0.1 g 相当量) を加えて全量 10 ml とし，37° 1 時間 incubate 後，反応液に酢酸エチル 20 ml を加え 30 分間機械振盪抽出し，無水硫酸ナトリウムで脱水後，酢酸エチルを低温で蒸発乾固し，残渣の反応生成物を少量の酢酸エチルに溶解して薄層クロマトグラフィーの試料とした。

薄層クロマトグラフィー——シリカゲル薄層 (厚さ 250 μ, Kieselgel G) は 110°, 1 時間加熱活性化して用いた。展開溶媒として，アセトン-クロロホルム (1:9)，酢酸エチル-クロロホルム (1:1)，エーテル-クロロホルム (1:3) を用い，各種検出呈色試薬として Bratton-Marshall, Fluorescein-hydrogen peroxide, Folin-Ciocalteu, 2,6-dichloroquinonechloroimide の各試薬を用いた。

赤外吸収 (IR) および Mass スペクトル——日本分光 IRG 赤外分光光度計および日立 RMU-7L 形質量分析計を用いて測定した。

結 果

1. 肝ホモジネートによる ABBP の水酸化生成物の同定

ABBP を基質としてラット肝ホモジネートと incubate 後，反応液の酢酸エチル抽出物を薄層クロマトグラフィーによって観察した結果，Table I に示すように compound (1) の未反応の ABBP のほかに 4 個のスポットを確認した。主生成物の compound (2) は *R_f* 値，呈色反応とも合成標品 3-OH ABBP と一致し，薄層クロマトグラフィーにより単離した本物質を 0.25N 水酸化ナトリウム-75% エタノール水溶液に溶解して紫外線吸収 (UV) スペクトルを測定した結果，λ_{max}: 233, 262, 308, 440 mμ を示し，合成標品と全く一致した結果をえた。これらの成績から compound (2) は 3-OH ABBP であることが確認された。また，薄層上で赤橙色蛍光を有する赤色物質 compound (3) を同定する目的で，2-amino-7-bromo-1,9-bis(2-pyridinecarbonyl)-3H-phenoxazin-3-one の合成を次の方法に従って行なった。すなわち，3-OH ABBP (0.5 mmole) を 50 ml の 0.1N NaOH に溶解，K₃FeCN₆ (0.5 mmole) の水溶液を加えて少時攪拌し，ただちにエーテル 50 ml で 2 度抽出，濃縮後シリカゲルのカラムクロマトグラフィー (5×45 cm) により分離し，クロロホルム-メタノール-28% アンモニア水 (80:10:1) で溶出される赤橙色蛍光の分画を低温で蒸発乾固し，アセトンから再結晶して mp 276° (decomp.) の針状赤

7) G.H. Hogeboom, W.C. Schneider, "The Nucleic Acids," Vol. 2, ed. by E. Chargaff, J.N. Davidson, Academic Press, New York, 1955, p. 199.

8) J.W. Porteous, R.T. Williams, *Biochem. J.*, **44**, 46 (1949).

9) A.G. Gornall, C.S. Bardawill, M.M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).

10) O.H. Lowry, N.J. Rowebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

TABLE I. *R_f* Values and Color Reactions of Metabolites formed on Incubation of ABBP with Rat Liver Homogenate Preparation on Thin-Layer Chromatography

Compound	Solvent system ^{a)}			Color reaction ^{b)}				
	A	B	C	I	II	III	IV	V
1	0.68	0.97	0.75	purple	pink	—	—	brown
2	0.50	0.97	0.60	brown	pink	greenish blue	blue	brown
3	0.20	0.43	0.23	—	pink	—	—	reddish orange
4	0.70	0.97	0.79	—	—	grayish blue	—	—
5	0.33	0.69	0.31	purple	pink	gray	—	—
ABBP	0.68	0.97	0.75	purple	pink	—	—	brown
3-OH ABBP	0.50	0.97	0.60	brown	pink	greenish blue	blue	brown

a) solvent system; A=chloroform-acetone(9:1), B=chloroform-ethyl acetate(1:1), C=chloroform-ether(3:1)

b) spray reagent: I=Bratton-Marshall, II=fluorescein-hydrogen peroxide, III=Folin-Ciocalteu, IV=2,6-dichloroquinonechloroimide, V=fluorescence under UV light
adsorbent: Kiesel gel G (Merck)

色結晶をえた。本物質の各種分析値は, *Anal.* Calcd. $C_{24}H_{13}O_4N_4$ Br: C, 57.50; H, 2.61; N, 11.17. Found: C, 57.13; H, 2.63; N, 10.89. UV $\lambda_{\max}^{EtOH}$ m μ (log ϵ): 240 (4.56), 265 (4.30), 425 (4.40), 450 (4.40). IR $\nu_{\max}^{KBr}$ cm $^{-1}$: 3375, 3280 ($-NH_2$), 1680 (CO), 1600—1550 (quinone CO). Mass Spectrum *m/e*: 499 (M^+), 501 ($M^+ + 2$) で, 上記の方法に従って得た 2-amino-7-bromo-1,9-bis(2-pyridinecarbonyl)-3*H*-phenoxazin-3-one と薄層クロマトグラフィーにより分離した compound (3) は *R_f* 値, 呈色反応および UV スペクトルとも一致した成績をえた。このほかフェノール性物質 compound (4) と Bratton-Marshall 反応陽性の compound (5) を検出したが, 微量のため精査できなかった。また, ウサギ肝ホモジネートでも同様の生成物が観察された。なお, NADPH の非添加系でも少量の 3-OH ABBP および compound (5) の生成を認めたが, 嫌氣的条件下では全く生成されなかった。

2. ABBP 水酸化活性の細胞局在性

ラットおよびウサギ肝ホモジネートを用いて ABBP 水酸化活性の細胞局在性について観察した結果, Table II に示すように活性はミクロゾーム画分にはみ認められたが, 9000×*g* 上清の活性に比べかなり低い活性であった。

しかし, ミクロゾームに可溶性画分を添加すると, ほぼ 9000×*g* 上清の活性を回復した。また熱処理したミクロゾームに可溶性画分を添加しても活性は全く認められなかった。そこでミクロゾームを酵素液とした反応系に Fig. 1 に示すように可溶性画分を添加すると添加量に応じて活性が上昇することより, 可溶性画分に水酸化活性を増加させる因子の存在を認めた。この因子は非透析性で, 硫酸で 70—100% 飽和画分に, エタノール

TABLE II. Intracellular Distribution of ABBP-Hydroxylation Activity in Rat and Rabbit Liver

Fraction	Rabbit		Rat	
	Activity (μmoles/min/g liver)	Relative activity ^{a)} (%)	Activity (μmoles/min/g liver)	Relative activity (%)
Whole homogenates	47.33	100	61.53	100
Nuclear fraction	7.67	16	8.61	14
Mitochondrial fraction	1.67	4	0.00	0
9000× <i>g</i> Sup.	49.00	104	61.53	100
Microsomes	24.67	52	25.84	42
Soluble fraction	0.00	0	0.00	0
Microsomes + soluble fraction ^{b)}	48.67	103	59.23	96

a) Activity in whole homogenates is arbitrarily taken as 100.

b) Soluble fraction (0.2 ml) was added.

Fig. 1. Effect of Soluble Fraction on the ABBP-Hydroxylation by Rat Liver Microsomes

Solubel fraction which was prepared from 10 % homogenate was added in the incubation mixture.
The activity of microsomes is arbitrarily taken as 100%.

Fig. 2. Time Course of ABBP-Hydroxylation

●—● : microsomes, ○—○ : microsomes + soluble fraction from rat liver
●—● : microsomes, ○—○ : microsomes + soluble fraction from rabbit liver

で 40—60% (v/v) 画分に分離された。また 80°, 5 分間の熱処理では安定であるが、それ以上の高温では完全に失活した。さらに、肝以外の他の臓器（腎、肺、脳、脾）の可溶性画分にも同じ性質の因子の存在を認め、ウサギ肝の可溶性画分の因子も全く同じ性質を示したので、ウサギ肝の可溶性画分を 80°, 5 分間の熱処理後、硫酸分画により部分精製した因子について Sephadex G-100 によるゲル濾過法で分子量を測定した結果、本因子は 3 万前後の分子量と推定された。

3. Cofactor の要求性

一般に酵素系における水酸化反応の cofactor として NADPH や NADH などの還元型 pyridine nucleotide 類が要求されることが知られている。そこで ABBP 水酸化反応系の要求度に相当する十分量の NADPH generating system, NADH (2 mM), NAD, NADP (各 1 mM), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN) (各 0.1 mM) の添加実験を行なった結果、本水酸化反応系は NADPH のみを必須因子とし、非 NADPH 存在下では全く活性が認められなかった。さらに FAD, FMN は NADPH 存在下でも活性にはほとんど影響しなかった。したがって反応系に十分量の NADPH generating system を添加したが、MgCl₂ と nicotinamide はいずれも高濃度で活性を阻害するためそれぞれ至適濃度 5 mM, 1 mM を添加した。

4. ABBP 水酸化活性の Time Course および水素イオン濃度の影響

3-OH ABBP の生成反応は Fig. 2 に示すようにミクロゾームのみではラット、ウサギともに 15 分後は徐々に減少し、30 分以後では生成量の減少が認められた。しかしながら、反応系に可溶性画分を添加すると、ウサ

TABLE III. The Formation of 2-Amino-7-bromo-1,9-bis(2-pyridinecarbonyl)-3H-phenoxazin-3-one from 3-OH ABBP by Rat Liver Microsomes

Incubation mixture	Activity (μmoles/30 min)
Microsomes	3.1
Microsomes + NADPH	79.9
Microsomes + NADH	6.2
Microsomes + NADP	4.9
Microsomes + NADPH + soluble fraction (0.2 ml)	80.0
Boiled microsomes ^{a)} + NADPH	4.9

a) Microsomes were treated in a boiling water bath for 5 min.

ギの肝ミクロゾームでは 45 分まで直線的に進行した。ラットでは直線性は認められないが、60 分まで 3-OH ABBP の生成量の増加が観察された。一方、Table III に示すように 3-OH ABBP は NADPH と O_2 存在下にミクロゾームで酸化され、またその生成物は 2-amino-7-bromo-1,9-bis(2-pyridinecarbonyl)-3H-phenoxazin-3-one であることを薄層クロマトグラフィーによって確認した。この際可溶性画分は全く影響しなかった。ウサギ肝ミクロゾームでも同様の活性が認められた。

ABBP 水酸化活性の至適 pH はラットでは 7.4—8.0 に、ウサギでは 7.4—7.6 に認められた。そこで反応系には pH 7.4 の Tris-HCl buffer を用い、十分量の可溶性画分 (肝 0.05 g 相当量のミクロゾームは対して可溶性画分 0.2 ml) を添加した。

TABLE IV. Effects of Various Inhibitors on ABBP-Hydroxylating Activity

Inhibitor	Concentration (M)	Inhibition (%)	
		Rat	Rabbit
None		0.0	0.0
PCMB ^{a)}	10^{-4}	51.0	41.0
	5×10^{-5}	35.0	24.6
SKF-525A	10^{-5}	30.0	32.5
CuCl ₂	5×10^{-5}	96.0	88.7
	10^{-5}	17.0	32.8
HgCl ₂	10^{-5}	80.6	89.0
Cytochrome c	10^{-5}	80.2	41.8
CO(20%)-O ₂ (20%)-N ₂ (60%)		40.0	—

Figures in this table represent per cent of control.

a) *p*-chloromercuribenzoate

5. ABBP 水酸化活性に及ぼす各種阻害剤の影響

Table IV に示すように SKF-525A, HgCl₂, CuCl₂, PCMB および cytochrome c によりそれぞれ低濃度で阻害され、さらに CO によっても阻害された。また triton X-100, コール酸ナトリウムなどの detergent で明らかに阻害されたが、*o*-phenanthroline, 2,2'-bipyridine, NaN₃, KCN (各 1 mM) などでは全く阻害されなかった。しかし、ascorbic acid, cysteine, glutathione (各 0.2 mM) などの阻害剤の添加では 20% 前後の活性増加が認められた。

6. ABBP 水酸化活性の安定性

ラット肝ミクロゾームをホモジネート量の 1/5 の濃度に 0.25 M sucrose に懸濁して氷冷下に保存し、1 週連続して活性を測定した結果、本水酸化活性はミクロゾーム調製後 2 日目から急激に失活し、3 日目で約 60% が失活し、6 日目ではほとんど活性を認めなかった。また NADPH generating system 存在下におけるミクロゾームの preincubation に対する ABBP 水酸化活性の安定性は Fig. 3 に示すように preincubation time の増加にともなって活性は顕著に低下した。しかし、ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 存在下に preincubation した場合には活性の低下はわずかであった。なお、0°での ageing および preincubation の際に可溶性画分を添加しておいても、いずれの場合も ABBP 水酸化活性の失活には

Fig. 3. Effects of Preincubation of Microsomes with NADPH-Generating System on the Activity of ABBP-Hydroxylation

After microsomes were preincubated in the presence of NADPH-generating system and EDTA or soluble fraction, incubation was started when ABBP and NADPH-generating system were added.

○—○: none, ●—●: soluble fraction, △—△: 0.5 mM EDTA

影響がなかった。

7. Phenobarbital および Benzo[a]pyrene の前投与による ABBP 水酸化活性の変動

実験方法に記したようにラットに phenobarbital および benzo[a]pyrene を投与し、活性測定の際に酵素液として肝 0.05 g 相当量の 9000×g 上清を用い、基質濃度は 2.5 μ moles とした。その結果は対照群の比活性が 0.64 ± 0.02 μ moles/min/mg 蛋白であるのに対し、phenobarbital 投与例（例数 3）では 1.08 ± 0.05 , benzo-pyrene 投与例（例数 3）では 1.15 ± 0.11 となり、いずれの場合も活性の誘導を認めた。

8. 各種動物肝による ABBP の水酸化

ラットおよびウサギの臓器（肝、腎、小腸、脾、肺、脳）の 9000×g 上清の ABBP 水酸化活性を観察した結果、肝にのみ高い活性が認められた。したがって種による本活性の差異を比較するため、ラット、ウサギおよびサル（ヒト）の肝を用いて観察した結果、サル肝でもミクロゾームにのみ活性が認められ、ラットの場合と同様に可溶性画分の添加により約 1.8 倍の活性増加を認め、また Table V に示すようにいずれの動物でも同程度の活性が認められた。

TABLE V. Kinetic Constants for the Hydroxylation of ABBP by the Liver of Various Animal Species

Species	Sex (n)	Specific activity (μ moles/min/mg)	K _m (mM)	V _{max} (μ moles/min/mg)
Rat	male (3)	1.65 ± 0.10	0.103 ± 0.003	2.46 ± 0.14
Rabbit	male (3)	0.98 ± 0.08	0.046 ± 0.003	1.02 ± 0.07
Monkey	male (1)	2.15	0.176	3.17

考 察

著者らはさきに BZ を経口投与したウサギ、⁵⁾ ヒト¹⁾ では 3-OH ABBP が主代謝産物として尿中に排泄され、また ABBP を経口投与したウサギ尿中にも同様認められることを明らかにした⁴⁾ が、本報ではラット、ウサギおよびサルの肝ミクロゾームにおいて BZ の環開裂体である ABBP が NADPH と O₂ 存在下に 3-OH ABBP を生成することを確認し、これら動物間における本活性の種差は認められなかった。Schwartz ら⁶⁾ は ¹⁴C-BZ を投与したヒトおよび動物の尿中代謝産物を定量し、3-OH BZ が主代謝産物で 3-OH ABBP の排泄量は動物では極めて少なく、ヒトでは両者ともほぼ同量の割合に排泄されることを報告している。しかしながら、著者ら¹¹⁾ は BZ を経口投与したウサギ尿中から新代謝産物（BZ の C-9 位の水酸化誘導体および C-5' 位の水酸化誘導体）を単離し、これらを含む BZ の代謝産物の尿中排泄を観察した結果、BZ (50 mg/kg) を経口投与後 24 時間尿中にはマウスをのぞく、ラット、イヌ、モルモット、ウサギでは 3-OH ABBP が主代謝産物でそれぞれ全排泄量の 35.1%, 51.7%, 31.5%, 56.6% を占め、遊離および抱合型として排泄されることを明らかにした。したがって、ウサギ、ラット、イヌ、モルモットの主代謝経路は BZ の diazepine 環の開裂後生じた ABBP が 3-OH ABBP に水酸化される経路であると考ええる。

他の benzodiazepine 誘導体薬剤 medazepam,¹²⁾ oxazolam¹³⁾ では 3-OH ABBP と類似の化学構造を有する尿中代謝産物として 2-amino-5-chloro-3-hydroxybenzophenone (ACHB) が、また nitrazepam¹⁴⁾ では 2-amino-3-hydroxy-5-nitrobenzophenone が検出されている。一方、*in vitro* での ACHB の生成に関して、Yasumura ら¹³⁾ はラット肝ホモジネートを用いて 2-amino-5-chlorobenzophenone (ACB) から生成することを認めているが、著者らの反応系でも ACB から ACHB の生成が観察され、ACB は ABBP と同様に肝ミクロゾームで水酸化されると考える。

11) 沢田英夫, 原 明, 日本薬学会第 94 年会で発表, 仙台, 1974 年 4 月。

12) M.A. Schwartz, J.J. Carbone, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 343 (1970).

13) A. Yasumura, H. Murata, K. Hattori, K. Matsuda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **19**, 1929 (1971).

14) J. Rieder, G. Wendt, "The Benzodiazepines," ed. by S. Garattini, E. Mussini, L.O. Randall, Raven Press, New York, 1973, p. 99.

また著者らは, *in vitro* における ABBP の代謝産物として主生成物 3-OH ABBP の他にその酸化縮合体 2-amino-7-bromo-1,9-bis(2-pyridinecarbonyl)-3H-phenoxazin-3-one を同定した. Kiese-Lenk¹⁵⁾ は *p*-chloro-aniline の尿中代謝産物である 2-hydroxy-4-chloroaniline の抱合体を glucuronidase-sulphatase で水解した際, その 2 分子酸化縮合体を認め, また Subba Rao-Vaidyanathan¹⁶⁾ はラット肝核画分に 3-hydroxyanthranilic acid からその酸化縮合体 cinnabaric acid (2-amino-3-oxo-3H-phenoxazine-1,9-dicarboxylic acid) を生成する cinnabaric acid synthase が存在することを明らかにしているが, ABBP の水酸化体 3-OH ABBP もまたこれら 2 種の化合物と同様に *o*-aminophenol 誘導体であり phenoxazine 核を有する酸化縮合体の生成を認めた. また, 本化合物は肝ミクロゾームにより NADPH と O₂ 存在下に生成される. したがって, ミクロゾーム単独での ABBP 水酸化活性の time course が 10 分以後で直線性を示さない (Fig. 2) ことは生成した 3-OH ABBP が酸化縮合反応にあずかることで説明されるが, これに対し酸化縮合反応に全く関与しない可溶性画分の添加により反応初期から 3-OH ABBP の生成増加が観察されることから, 明らかに可溶性画分中に ABBP 水酸化活性増加因子の存在が示唆される. なお, ウサギに比較してラットでは 3-OH ABBP の酸化縮合活性がより強い. ため, 可溶性画分添加時の time course が直線性を示さないと考えられる.

ABBP 水酸化系は NADPH のみを必須因子とし, ミクロゾームの mixed function oxidase の阻害剤である SKF-525A, HgCl₂, CuCl₂, CO および cytochrome c で阻害され, また phenobarbital, benzo[a]pyrene の前投与で本活性が誘導されることから, ABBP の水酸化反応はミクロゾームの NADPH 依存性電子伝達系を介して行なわれると考えられる. Wills¹⁷⁾ はラット肝ミクロゾームの NADPH 依存の脂質過酸化により aminopyrine や aniline の代謝酵素活性が低下するが, 脂質過酸化は EDTA で阻害されることを認め, また北川^{18,19)} は EDTA による脂質過酸化の阻害効果と薬物代謝活性の増加の機作を明らかにしているが, EDTA 添加により脂質過酸化による ABBP 水酸化活性の低下が抑制されることから, 本質的には本活性は他の薬物代謝活性と同様にミクロゾームの脂質構造と密接な関係を有すると推察される.

しかしながら, 可溶性画分の添加によりミクロゾーム単独の活性が約 2 倍に活性増加されることは acetanilide などの薬物²⁰⁾ の水酸化系とは若干異なる機作が考えられる. 最近, 石黒^{21,22)} は anthranilamide および *o*-aminoacetophenone の肝ミクロゾームによる水酸化の必須因子を可溶性画分に認め, 本因子を単一に精製しその性状を明らかにしているが, ABBP 水酸化活性を活性化する因子は必須因子ではないが, anthranilamide の水酸化に関与する因子と物理的性状が類似し, また基質である ABBP は anthranilamide と同様に *o*-aminobenzoyl 化合物に属することから, *o*-aminobenzoyl 化合物の水酸化に特異的に作用する因子と考えられる.

結 語

1. 3-OH ABBP は NADPH と O₂ 存在下に肝ミクロゾームにより ABBP から生成され, 本 ABBP 水酸化活性は SKF-525A, HgCl₂, CuCl₂, PCMB, cytochrome c で強く阻害された. また, phenobarbital おいび benzo[a]pyrene の前投与で約 2 倍に誘導されることから本反応はミクロゾームの NADPH 依存性電子伝達系を介して行なわれると考えられる.

2. ABBP 水酸化活性はラット, ウサギ, サルでも肝にのみ強い活性が観察され, またいずれの動物でも同程度の親和性が認められた.

3. ラット肝のほか腎, 肺, 脳, 脾の可溶性画分に蛋白性の ABBP 水酸化系の活性化因子の存在を認めた.

15) M. Kiese, W. Lenk, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 379 (1971).

16) P.V. Subba Rao, C.S. Vaidyanathan, *Biochem. J.*, **99**, 317 (1966).

17) E.D. Wills, *Biochem. J.*, **113**, 333 (1969).

18) 北川晴雄, 鎌滝哲也, 第 4 回薬物代謝と薬効, 毒性シンポジウム講演要旨集, 仙台, 1972 年 11 月, p. 51.

19) T. Kamataki, H. Kitagawa, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 319 (1973).

20) C. Mitoma, H.S. Posner, H.C. Reitz, S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 431 (1956).

21) T.M. Sutamihardija, A. Ishikura, Y. Nagamura, I. Ishiguro, *Experientia*, **29**, 26 (1973).

22) 石倉明弘, 内藤純子, 石黒伊三雄, 日本薬学会第 93 年会講演要旨集(Ⅲ), 東京, 1973 年 4 月, p. 222.