

氏 名 (本籍)	ふる古 かわ川 のほる昇
学 位 の 種 類	薬 学 博 士
学 位 記 番 号	薬 博 第 1 6 6 号
学位授与年月日	昭和 6 2 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 薬学専攻
学 位 論 文 題 目	チオリン酸アルキルエステルの肝薬物代謝 酵素系に及ぼす影響

(主 査)

論文審査委員	教授 鈴 木 康 男	教授 橋 本 嘉 幸
		教授 佐 藤 進

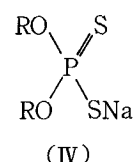
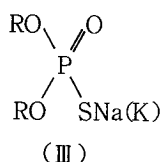
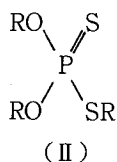
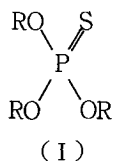
# 論文内容要旨

生体内に取り込まれた脂溶性の薬物や毒物は、体外への排泄が容易になるように“極性化”へと向かう生体内変換を受ける。この極性化反応の最初の段階において中心的な役割を果たしているのは肝小胞体に存在するmixed-function oxidase (MFO)による酸化反応である。しかし、この薬物酸化反応は、必ずしも“解毒化”を意味しておらず、ときとして薬物をより生理活性の強い形に変換することもある。有機リン系の化合物の中で、リン酸部分に硫黄原子を含むチオリン酸エステル類は、様々な異性体のわずかな化学構造の差により、生理作用や毒性が大きく異なるが、これら化合物の生理作用もMFOと密接な関係がある。例えば、有機リン系農薬parathion (P=S)は、MFOによりP=S構造の酸化的脱硫黄化を受け、コリンエステラーゼ阻害作用の強いparaoxon (P=O)となるが、その過程で放出された活性型の硫黄原子は、MFOの中心的酵素cytochrome P-450を破壊し、薬物代謝酵素活性を低下させることが知られている。同様の作用は、二硫化炭素、thioacetamide等のthiono-sulfur化合物についても知られているが、いずれの場合も、他のより強い生理作用の副作用として薬物代謝酵素阻害作用が発現するにすぎない。

本研究の第一の目的は、低毒性でかつ薬物代謝酵素阻害作用の強いチオリン酸エステルを検索し、その構造活性相関を明らかにすることであった。また、それらの化合物が薬物代謝酵素系や他の薬物の薬効、毒性に及ぼす影響を検討する過程でチオリン酸エステルと薬物代謝酵素系との新たな関係が明らかにされた。

## I. チオリン酸アルキルエステルの薬物代謝酵素阻害作用

P=S型有機リン系農薬の化学構造から電子吸引性の脱離基を取り除くか、あるいはアルキル基で置換することにより化合物の低毒性化が期待できる。そこで、以下に示す4種のチオリン酸アルキルエステルのn-alkyl同族体をそれぞれ合成し、肝ミクロソームの薬物代謝酵素活性に対する作用をin vitro, in vivoにおいて検討した。



(R=methyl ~ n-butyl)

各化合物をNADPHの存在下、肝ミクロソームと共にインキュベートしたところ、I型及びII型のトリアルキルエステル類に明らかなcytochrome P-450低下作用が認められ、作用の強さ

は、(I) ethyl > propyl > methyl > butyl 及び (II) ethyl > propyl > butyl > methyl の順であった。

I型、II型化合物をラット腹腔内に投与して肝薬物代謝酵素系の変動を調べたところ、いずれの同族体にもcytochrome P-450及び薬物代謝酵素活性の低下作用が認められた。作用の強さは、I型、II型共にethyl  $\cong$  methyl > propyl > butylの順であったがアミノピリン及びアニリンに対する代謝活性の低下パターンは、I型、II型によって明らかな差が認められ、阻害されるcytochrome P-450分子種が異なることが示唆された。また、I型化合物の投与によってはNADPH-cytochrome c reductase活性の上昇が認められ、II型化合物の投与では出血傾向を伴う強い毒性症状が認められた。

一方、III型、IV型のジアルキルエステルには、in vivoにおいても薬物代謝酵素阻害作用は認められなかった。

I型、II型化合物の薬物代謝酵素阻害作用は、薬物代謝酵素誘導剤phenobarbital(PB)の前投与によって強められ、3-methyl-cholanthrene (3-MC)の前投与によっては弱められることから、特にPB誘導型のcytochrome P-450分子種に対する特異性が高いことが明らかになった。

解熱鎮痛剤アセトアミノフェンは、副作用として肝障害を引き起こすが、そこにはcytochrome P-450による代謝活性化が関与することが明らかにされている。I型化合物の同時投与は、アセトアミノフェンの肝障害性を顕著に抑制し、その作用は、特にI-Me及びI-Etに強く認められた。

以上の結果より、I型化合物の内では特に低級同族体であるI-Me及びI-Etには、in vivoにおいて強い肝薬物代謝酵素阻害作用が有り、これら化合物は毒性も低いことから薬物代謝酵素阻害剤としての有用性が期待される。

## II. チオリン酸アルキルエステルのNADPH-cytochrome c reductase誘導作用

NADPH-cytochrome c reductaseは、MFOにおいて調節的な役割を果たす酵素であるが、I型化合物の投与において認められた本酵素活性の上昇作用は、従来のthiono-sulfur化合物には見られない新しい生理作用である。次に、この作用の機構について検討を加え、化学構造との相関性を明らかにした。

I型化合物の投与により低下した肝薬物代謝酵素活性は、その後回復して平常時を上回るようになる。これに対してNADPH-cytochrome c reductase活性は、化合物の投与後速やかに上昇することから阻害状態からの回復に付随した現象であるとは考え難い。

I型化合物によるNADPH-cytochrome c reductase活性の上昇は、蛋白合成阻害剤cycloheximideの投与により抑制され、また、活性上昇前後でcytochrome cに対するKm値が変化し

ないことから酵素蛋白のde novo合成による酵素誘導現象であることが明らかになった。

I型化合物の同族体は、いずれもこの誘導作用を持つが、作用の強さは、ethyl>propyl>methyl>butylであり、明らかにアルキル鎖の炭素数の影響を受ける。Thiono-sulfur化合物である二硫化炭素にはこの作用が認められなかったが、P=O型のリン酸アルキルエステルであるtriethyl phosphateにもこの誘導作用が認められた。このことからNADPH-cytochrome c reductaseの誘導作用は、リン酸あるいはチオリン酸のトリアルキルエステル構造に依存する作用であることが示唆された。

一方、II型化合物にもやはり同様の誘導作用が認められたが、作用の強さはpropyl>methyl>ethyl>butylであり、I型化合物とはパターンが異なる。II型化合物には肝障害性が認められ、その肝薬物代謝酵素系に対する作用には、化合物の持つ毒性の影響が強く現れていると思われた。

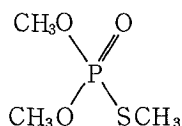
以上のことから、P=S型チオリン酸アルキルエステルは、薬物代謝酵素系の阻害剤としての作用と誘導剤としての作用を合わせ持っており、肝薬物代謝酵素系に対する作用も従来の薬物代謝酵素阻害剤とは異なる特殊な情況を生み出すことが明らかとなった。

### III. チオリン酸アルキルエステルの肝障害性

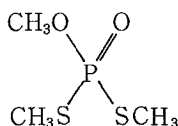
分子内にP-S-alkyl構造を持つチオリン酸アルキルエステル類（下図）は、これまでに知られていない新しいタイプの毒性を有することが近年Aldridge, Fukuto, Imamura等によって明らかにされてきた。この毒性は、ラットにおいては、下痢、口鼻、眼からの出血、著しい体重の減少などの中毒症状を呈し、3~22日後に死亡する“遅延型毒性”であり、コリン作動性の中毒ではないことが明らかにされている。さらに、この中毒においては、肺の障害が直接の死因であることが明らかにされたが、作用機序については不明な点が多い。薬物代謝酵素誘導剤や阻害剤がこの毒性の発現を抑制することから、生体内で代謝的に活性化され肺毒性を示すものと考えられているが代謝活性化に関与する臓器は特定されていない。また、OOS-Me(O)の毒性は、異性体であるI-Meによって極めて特異的に抑制されることが知られているが、その機構も明らかにはなっていない。

本研究においては、II型化合物と極めて構造の類似しているOOS-Me(O)型化合物の肝障害に注目し、OOS-Me(O)型化合物の代謝活性化にはたす肝薬物代謝酵素系の役割を明らかにすることを試みた。また、I-Meによる肝、肺毒性の抑制作用についても検討を加えた。

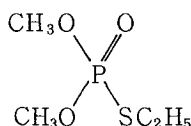
OOS-Me(O)の肝障害性は、ラットに致死量近くのOOS-Me(O)を投与することによっ



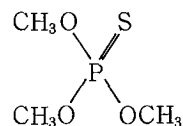
OOS-Me(O)



OSS-Me(O)



OO-Me, S-Et(O)



I-Me

て初めて認められた。この肝障害性は、薬物代謝酵素阻害剤SKF-525A及びpiperonyl butoxideによって抑制されることから、肺毒性と同様、MFOによる代謝活性化がその発現に関与することが示唆された。また、薬物代謝酵素誘導剤PBが肝障害性を増強するのに対し3-MCは、むしろ抑制する。この結果から、肝においてOOS-Me(O)の代謝活性化に関与するcytochrome P-450は、PB誘導型の分子種であることが示唆された。また、OOS-Me(O)の遅延型毒性及び肺毒性は、PBによって軽減し、3-MCによって増強されるという肝毒性とは逆の様相を呈した。

これらの知見は、OOS-Me(O)の致死毒性は、肝障害に由来するものではないことを示唆する。また同時に、肝毒性と肺毒性は発現機構において似ているものの、互いに独立した現象であることを意味する。即ち、肝において生成されたOOS-Me(O)の活性中間体が肺に到達して肺毒性を現すのではなく、肺自身における代謝活性化が重要であることが示唆される。肝におけるOOS-Me(O)の代謝活性化は、肝自身にとっては有害な反応であるが、肺に到達するOOS-Me(O)の量を低下させることで肺毒性を軽減させるという、言わば生物個体にとっては解毒的な意味を持つ代謝経路なのであろう。

また、OOS-Me(O)と同時にその用量の5%のI-Meを投与すると遅延型毒性及び肺毒性の症状は完全に消失し、肝障害も著しく軽減された。このとき、I-Meの投与によって、OOS-Me(O)による肝GSHの低下も顕著に抑制された。I型化合物の同族体の中では、I-MeとI-Etにおいてこの作用は特に強く、同様の作用がII-Meや二硫化炭素においても認められたが、P=O型化合物であるtrimethyl phosphateはこの作用を持たなかった。これらの知見は、I-MeがMFOの阻害剤として働くためにOOS-Me(O)の代謝活性化を抑制していることを示唆しており、同様の現象が肺のMFOにおいても期待される。

OOS-Me(O)はそれ自身、cytochrome P-450の低下作用を持たないが、in vivoにおいては肝薬物代謝酵素活性を顕著に低下させる。この作用は主に、肝障害に起因すると思われるが、I-Meにより肝障害が抑制された状況においてもあまり改善されず、その機序は明らかではない。

OOS-Me(O)と同程度の毒性を持つOSS-Me(O)とOO-Me,S-Et(O)の肝障害性は、OOS-Me(O)とはかなり異なり、その強さは、OO-Me,S-Et(O)  $\gg$  OOS-Me(O)  $\gg$  OSS-Me(O)であった。また、I-Meによる抑制効果にも差が認められ、肝及び肺におけるこれら化合物の代謝様式あるいは活性化に関与するcytochrome P-450分子種が異なることが予想される。

チオリン酸アルキルエステルの生理作用とMFOとの関係を考えると、共通してPB誘導型のcytochrome P-450分子種によるこれら化合物の代謝活性化が高いが、わずかな構造の差が認識されていることを示す知見が随所に認められる。OOS-Me(O)に対するI-Meの拮抗作用は、I型化合物の薬物代謝酵素阻害作用が最も効果的に現れたものであると解釈できる。

## 審査結果の要旨

医薬品は体内で化学変換をうけてその薬効を減じたり、毒性の発現することが多い。したがって薬物代謝活性が制御できれば、医薬品の有用性を高めることが可能である。

本論文は、上記の目的のため、まず薬物代謝反応を阻害する活性を持つ化合物を検索することから研究を開始した。その結果、O,O,O-トリアルキルチオリン酸エステル（Ⅰ型）とトリアルキルジチオリン酸エステル（Ⅱ型）には、*in vivo*, *in vitro*のいずれにおいても肝ミクロソームの薬物代謝活性を低下させる作用のあることを明らかにした。この阻害機構は、エステル自身の代謝の過程で生じる物質がチトクロムP-450を分解するためであろうと推論した。またこれらトリアルキルエステル同族体の作用の強さは、*in vivo*においてエチル>メチル>プロピル>ブチルである。実際にこれらの化合物が、医薬品の代謝を制御できるかを調べるため、その投与が、アセトアミノフェンの代謝と毒性に及ぼす影響を検討した。この結果、アセトアミノフェンの代謝物によって起るとされている肝毒性が顕著に抑制され、その作用の強さは、先の肝薬物代謝酵素阻害作用と相関していた。

上記研究の過程で、Ⅱ型化合物にはそれ自体に極めて特徴的な生体障害が認められることがわかった。その主症状は眼、鼻、小腸の粘膜からの出血や肺水腫であり、投与後長時間ののちに衰弱して死亡する。しかしこれらの症状は、少量のⅠ型化合物を同時に投与すると完全に消失することを明らかにした。この結果は、Ⅱ型化合物の毒性発現には代謝変換が必要であり、Ⅰ型化合物はこの代謝活性を特異的に阻害しているものと考えられた。またⅡ型化合物の第一段階代謝物と考えられるO, O, S-トリアルキルチオリン酸（Ⅰ型の異性体）がⅠ型化合物の投与で蓄積していると推定される知見も得られている。

諸外国でも最近O, O, S型エステルの毒性に関する研究が進められており、構造不明の代謝産物が遅延型毒性の発現に関与するものと推定されている。またⅠ型化合物はこの代謝物を産生する代謝酵素に高い特異性で阻害活性を持っていると考えられる。

以上本研究は、薬物代謝酵素活性を調節する物質としてトリアルキルチオリン酸エステルを開発し、同時に本化合物は、構造類似の高毒性のチオリン酸エステル類の代謝を極めて特異的に抑制し、毒性の発現を軽減することを明らかにした。これらの結果はリン酸化合物の生理作用や毒性機構の解明に役立つ知見であり、博士論文として価値あるものと判定する。