

原 著

ラット肝ミクロゾームのアルコール (ETHANOL)
酸化酵素系

松 村 理 一 郎

信州大学医学部薬理学教室

HEPATIC MICROSOMAL ETHANOL-OXIDIZING ENZYME
SYSTEM OF RATS : INTRAMICROSOMAL ENZYME
DISTRIBUTION

Riichiro MATSUMURA

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shinshu University,
Matsumoto, Japan

Key words : ミクロゾームのエタノール酸化酵素系 (microsomal ethanol-oxidizing enzyme system, MEOS), ミクロゾーム内分布 (intramicrosomal distribution), アミノピリン N-脱メチル化 (aminopyrine N-demethylation), catalase, 薬物代謝酵素系 (drug metabolizing enzyme system), 過酸化水素生成活性 (H_2O_2 -generating activity), aniline, azide

Abstract

With microsomal ethanol oxidizing system of rat liver, its intramicrosomal distribution was studied after ultracentrifugation ($300,000\times g$, 3 hours) with sucrose density gradient (0.9 to 1.7 M).

1. Disagreement of intramicrosomal distribution of the activity was found between the NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity and the H_2O_2 -generating system-dependent activity. This finding shows that a part of the NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity of microsomes could not be substituted with H_2O_2 -generating system.

2. The pattern of the distribution of H_2O_2 -generating system-dependent ethanol-oxidizing activity was similar to the distribution of catalase activity, except a partial dissociation of the pattern near-by 1.5 M sucrose.

3. Aniline and pyrazole inhibited the microsomal NADPH- O_2 -dependent ethanol oxidation *in vitro*, while these showed little inhibition of the H_2O_2 -dependent ethanol oxidation.

4. Catalase inhibitors, azide, 3-amino-1,2,4-triazole and cyanide, inhibited the H_2O_2 -dependent ethanol oxidation *in vitro*, while did not so much inhibit the NADPH- O_2 -dependent ethanol oxidation.

5. Addition of aniline changed the pattern of the distribution of NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity. Pattern of the distribution of aniline-sensitive NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity was similar to that of protein distribution.

6. The distribution of NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity after addition of azide

was similar to the distribution of aniline-sensitive activity.

7. NADPH-O₂-dependent H₂O₂-generating activity in microsomes was similar to the distribution of aniline-sensitive NADPH-O₂-dependent ethanol oxidizing activity, of aminopyrine N-demethylase activity or of protein.

It has been concluded that the greater part of the apparent NADPH-O₂-dependent ethanol-oxidation is covered by both the aniline-sensitive NADPH-O₂-dependent ethanol oxidation and ethanol oxidation by NADPH-O₂-dependent H₂O₂-generation plus catalase. The mechanism of aniline-sensitive ethanol oxidation may be common with that of aniline p-hydroxylation in hepatic microsomes. Furthermore, it was suggested that the H₂O₂-dependent ethanol-oxidizing activity which is not involved in catalase may exist in the microsomes.

Orme-Johnson and Ziegler¹⁾によって哺乳動物の肝ミクロゾームに NADPH-O₂ 依存の ethanol (以下アルコール) 酸化酵素系の存在することが報告されて以来、この mixed-function oxidation の機序について研究が進められてきている。このミクロゾームのアルコール酸化酵素系は、NAD を必要としないことから、アルコール脱水素酵素 (alcohol : NAD oxidoreductase (1.1.1.1)) と区別されている。また肝ミクロゾームによるこのアルコール酸化活性は *in vitro* で、SKF 525-A (β -diethylaminoethyl-diphenylacetate · HCl) によって抑制されず、azide あるいは cyanide によって強く抑制される²⁾。一方肝ミクロゾームのいわゆる薬物代謝酵素系による ethoxy-biphenyl の O-dealkylation は SKF 525-A により強く抑えられるが、azide あるいは cyanide によっては抑制されない²⁾。これらの報告は、肝ミクロゾームのアルコール酸化酵素系が、いわゆる薬物代謝酵素系と同一のものでないという考えの根拠とされている。

Roach ら³⁾は、ラット肝ミクロゾームのアルコール酸化酵素系において、添加 H₂O₂ は NADPH-O₂ に代わりえないが、H₂O₂ 生成系は NADPH O₂ に代わりうることを示して catalase の関与を示唆し、microsomal mixed-function oxidase の関与がほとんど問題にならないという見解を示した。また Khanna ら⁴⁾は、反応の初期においてのみ、H₂O₂ の添加が NADPH-O₂ に代わりうることを報告している。これは、ミクロゾームに含まれる catalase が添加した H₂O₂ をすみやかに消費するために生じた現象と考えられる。さらに Isselbacher and Carter⁵⁾はミクロゾームへの catalase 添加の実験から、ミクロゾームの catalase が NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化に関与し、その重要な部分をしめるものと結論し

ている。

これに対し Lieber ら²⁾は、catalase 阻害剤による NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性の抑制と catalase 活性の抑制の間に、大きな差の認められること、ならびにアルコール連用ラットでは、この肝ミクロゾームのアルコール酸化活性が増加するのに対し、catalase 活性には増加のみられないことをあげて、catalase の関与のない別の機構、すなわち microsomal mixed-function oxidase が、その主体であると主張している。しかしこれには、catalase 阻害剤が H₂O₂ 生成系活性を抑えないという前提、あるいは NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成活性に、アルコール連用による増加がないという前提を必要とするが、これらの検討はなされていない。以上のごとく、肝ミクロゾームのアルコール酸化の機序については、意見の一致をみていない。

そこで今回、ラット肝ミクロゾームの NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化酵素系の本質を明らかにするため、アルコール酸化酵素系活性および catalase 活性のミクロゾーム内分布の異同を手がかりとし、これらと関連のある酵素系活性の分布、ならびに阻害剤による影響を比較検討した。

実験方法

実験動物としては、体重 150~250g の Wistar 系雄ラットを使用した。断頭後肝を摘出し、ただちに氷冷した 0.15M KCl 液に入れ、冷却後秤量した。肝は 4 倍量の 0.25M 蔗糖液あるいは 0.15M KCl 液中で細切した後、テフロン軸頭の比較的ゆるい (クリアランス約 0.5mm) Potter 型ホモジナイザーでホモジネート (20%) を調製した。このホモジネートを 9,000 × g, 10min 遠心 (Tomimaga 90-UV, No 4 Rotor) し、その上清を 105,000 × g, 60 min (Hitachi 40 P, RP

40 Rotor) 遠心してミクロゾームの沈澱をえた。これを 0.25M 蔗糖液に分散 (約 40mg protein/ml) して、ミクロゾーム分散原液とした。

あらかじめ密度勾配作製装置 (Automatic density gradienter, Hitachi DGK-U) を用いて調製し、冷却した蔗糖連続密度勾配 (0.9~1.7 M) 4ml の上に、このミクロゾーム分散原液 1ml を積層し、300,000 × g, 180 min 遠心 (Hitachi 65-P, RPS-65T Rotor) することによって、ミクロゾームを、subfractionate し、これをフラクシヨネーター (Density gradient fractionator, Hitachi DGF) で一定適数ずつ 15~40 分画に分取した。各分画は KCl-tris-HCl 液 (KCl 0.15M, tris 20mM, pH 7.4) で 1.0 または 1.5ml に希釈し、その 0.5ml を用いた。

アルコール酸化活性におよぼす阻害剤の影響を比較した実験 (表 1) では、ミクロゾーム分散原液 1 容を KCl-tris-HCl 液 2 容で希釈したミクロゾーム液、あるいは 3,000 units/ml catalase 溶液の 0.5ml を使用した。

NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性測定用の incubation medium⁸⁾ は総量 3.1ml とし、0.33mM NADP; 8mM sodium isocitrate; 8mM ethanol; 1 unit isocitrate dehydrogenase (1.1.1.42); 0.15 M KCl; 5mM MgCl₂; 50mM tris-HCl, pH 7.4 および 0.5ml submicrosomal 分画 (あるいはミクロゾーム液) を含有するように調整した。

インキュベーションのための容器は、内容量 26ml のバイアルを用い、ゴムキャップをし、とめ金をつけて用いた。インキュベーションは恒温槽 (山本科学) 中で 37°C, 10min, 120回/min の振とうでおこなった。インキュベーション後ただちに氷冷し、つづいて %N H₂SO₄ (6μg/ml isobutanol を含む) 液 0.5ml を添加することによって反応を停止させた。

アルコール酸化活性は、生成 acetaldehyde 量を測定して求めた。活性の単位は、上記の条件で 1 分間に生成する acetaldehyde の量を μmoles/10min/fraction で表わした。

acetaldehyde の測定はガスクロマトグラフ (Hitachi Perkin-Elmer F6-D, 検出器: FID, 記録計: Hitachi QPD 33, 0-1 mV 付属) を使用し、気液平衡法⁹⁾¹⁰⁾ を一部改変して用いた。すなわち、反応の停止を %N H₂SO₄ でおこない、Na₂WO₄ の添加を省略するとともに、H₂SO₄ の添加と同時に isobutanol 3.0μg を内部標準物質として添加した。反応停止後、

バイアルを 55°C 恒温槽中に 20分以上おき、バイアル中の acetaldehyde が気液間で平衡に達するのをまって、その気相の 0.5ml を用いた。acetaldehyde と内部標準物質のピーク高比を求め、あらかじめ用意した標準曲線から、acetaldehyde 濃度を算出した。

ガスクロマトグラフ運転の条件: カラムには PEG-1500 をコーティングした長さ 45m, 内径 0.5mm の Golay カラム (ステンレス毛细管カラム) を使用。温度はそれぞれ、試料室 50°C, カラム 75°C, FID pipe 60°C。窒素流量は 40ml/min, 分割比 1:4。水素流量は 30ml/min。検出器への空気圧 2.0kg/cm²。気相試料のガスクロマトグラフへの注入量は 0.5ml。感度の attenuation range および attenuation はともに 1 とした。

H₂O₂ 依存のアルコール酸化活性の測定においては、上述の NADPH-O₂ 依存の酸化活性測定用の incubation medium を一部かえて用いた。すなわち、NADP, isocitrate および isocitrate dehydrogenase の代わりに glucose (4mM) および glucose oxidase (1.1.3.4) (3 units) を用いた。

catalase 活性の測定は、H₂O₂ の分解速度を分光的に測定する方法¹¹⁾ を一部改変して用いた。すなわち H₂O₂ の紫外域における吸収極大は 203mμ にみられるが、装置の感度および試料の状態を考慮して、今回の実験では 210mμ を用いた。また H₂O₂ の添加量は 10mM とした。装置は、自記分光光度計 (Hitachi EPS-3T) に記録計 (Hitachi QPD-33) を付属させ、経時記録した。必要に応じ、積分球付属装置を付属させて用いた。

aminopyrine N-demethylase 活性は基質 aminopyrine の酸化によって生ずる formaldehyde の量をもって表わした。aminopyrine N-demethylase 活性の測定は NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性の測定条件と同じ条件でおこなった。ただし、基質には ethanol の代わりに aminopyrine 2mM を用い、反応の停止には H₂SO₄ の代わりに 1N HClO₄ 1.0ml を用いた。

formaldehyde の定量は Nash 法¹²⁾ を一部改変しておこなった。すなわち、反応停止後、3,000 rpm, 5 min 遠心し、その上清 1.0ml に Nash 試液の 2 倍濃度液 1.0ml を加え、37°C で 30 min 発色させ冷却、この液に、50v/v% ethanol 液 2.0ml を加えた後、414mμ で吸光度を測定した¹³⁾。

ミクロゾームの蛋白質量の測定には Lowry ら¹⁴⁾ の方

法および 280m μ の吸光度から求める方法 (260m μ の吸光度も同時に測定し、核酸による影響を補正)¹⁵⁾によった。

試薬 : catalase (hydrogen-peroxide : hydrogen-peroxide oxidoreductase (1. 11. 1. 6)) は 3,000 units/mg (Nutritional Biochem.), glucose oxidase (β -D-glucose : oxygen oxidoreductase (1. 1. 3. 4)) は 15 units/mg (Nutritional Biochem.), isocitrate dehydrogenase (*threo*-D₅-isocitrate : NADP oxidoreductase (decarboxylating) (1. 1. 1. 42)) は 20 units/ml の 50% glycerol 液 (2 units/mg protein) (Boehringer Mannheim), NADP は NADP \cdot 2Na 85% (enzymatically) (Boehringer Mannheim), そのほか isocitrate \cdot 3 Na (Sigma), tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Sigma), sodium azide (和光), pyrazole (東京化成), 3-amino-1, 2, 4-triazole (東京化成) の試薬を用いた。sodium cyanide は分析用試薬 (半井), aniline \cdot HCl は 1 級試薬 (和光), aminopyrine は局方品 (三晃), その他の試薬は JIS 特級試薬 (和光純薬および関東化学) を使用した。

実験成績

1. アルコール酸化活性のミクロゾーム内分布

ラット肝ミクロゾームの NADPH-O₂ 依存, ならびに H₂O₂ 依存のアルコール酸化活性および catalase 活性のミクロゾーム内分布の 1 例を Fig. 1 に示した。H₂O₂ 依存のアルコール酸化活性の分布は, NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性の分布と一致しない。H₂O₂ 依存の酸化活性分布は, 蔗糖 0.25M と 0.9M の境界面の近くに大きなピーク, さらに 1.4M 付近および 1.6M 付近にそれぞれ 1 つのピークを示している。これに対し, catalase 活性は, 蔗糖 0.25M と 0.9M の境界面付近および 1.6M 付近に活性分布のピークをもつが, 1.4M 付近にはピークを示さない。NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性のピークは, この例では 1.0~1.1M にみられる。しかし, この活性分布のピークおよびパターンは, 蛋白質濃度分布のピークおよびパターンとは, かならずしも一致しない (分布のパターンについては Fig. 3 参照)。

2. 薬物代謝酵素活性とアルコールの mixed-function oxidase 活性

NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性と NADPH-O₂ 依存の aminopyrine N-demethylase 活性の分布

の 1 例を Fig. 2 に示した。両酵素活性のピークの位置は一致しない。ただし Fig. 3 は分画をあらくとしたため, みかけ上一致しているようにみえる。amino-

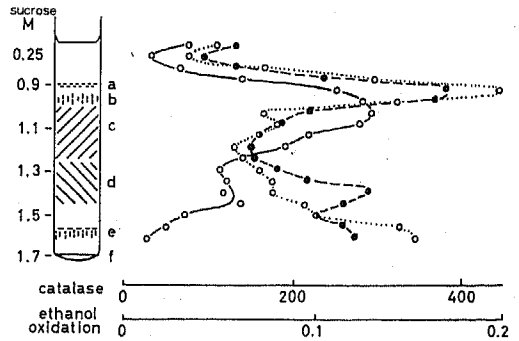


Figure 1. Intramicrosomal localizations of ethanol-oxidizing activity in the rat liver.

Right : NADPH-generating system and oxygen, \circ — \circ ; H₂O₂-generating system, \bullet — \bullet ; catalase activity, \circ \circ .

Left : a, b and c, segments of smooth endoplasmic reticulum; d and e, segments of rough endoplasmic reticulum; f, glycogen pellet.

ethanol oxidizing activity : μ moles acetaldehyde formed/10 min/fraction.

catalase activity : μ moles H₂O₂ consumed/min/fraction.

In this experiment, liver homogenates were prepared with 0.15 M KCl solution.

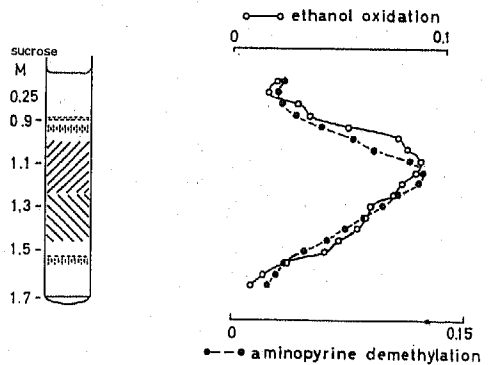


Figure 2. Intramicrosomal localizations of apparent NADPH-O₂-dependent ethanol-oxidizing activity and aminopyrine N-demethylase activity.

ethanol-oxidizing activity (μ moles acetaldehyde formed/10 min/fraction), \circ — \circ ; aminopyrine N-demethylase activity (μ moles formaldehyde/10 min/fraction), \bullet — \bullet .

pyrine N-demethylase 活性の分布と、このアルコール酸化活性の分布とは、細かい点で異なる。すなわちピークの位置でみると、前者は後者に比し蔗糖低濃度側に、わずかにずれ、分布のパターンでは、後者は一般にピークの両側に肩を示す。

ミクロゾームの各分画に catalase 1500 units (0.5

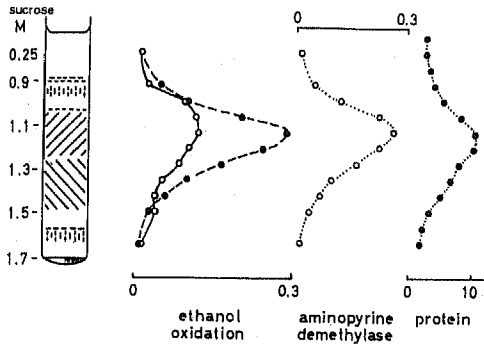


Figure 3. Effect of catalase addition on intra-microsomal distribution of the NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity. ethanol-oxidizing activity (μ moles acetaldehyde formed/10 min/fraction, \circ — \circ); activity after catalase addition, \bullet — \bullet ; aminopyrine N-demethylase activity (μ moles formaldehyde formed/10 min/fraction), \circ — \circ ; protein (mg/fraction), \bullet — \bullet .

mg) を添加し, NADPH- O_2 依存のアルコール酸化活性の分布をみると (Fig. 3), 分布のパターンは, aminopyrine N-demethylase 活性のそれに似てくる。いいかえれば, catalase 添加時のアルコール酸化活性の分布と catalase 不添加時のアルコール酸化活性分布との間には, パターンのズレがみとめられる。catalase 添加時のアルコール酸化活性分布のパターンを基準とすると, 蔗糖 1.0M および 1.3M 付近の 2カ所においてパターンのズレが極大になる。

3. 阻害剤の影響

肝ミクロゾームの NADPH- O_2 依存のアルコール酸化活性と H_2O_2 依存の酸化活性におよぼす阻害剤の影響を Table 1 に示した。ミクロゾームによるアルコール酸化活性の阻害剤による抑制の程度をしらべてみると, sodium azide (10^{-6} ~ 10^{-4} M) および 3-amino-1,2,4-triazole (2×10^{-3} M) においては NADPH- O_2 依存のアルコール酸化の抑制に比し, H_2O_2 依存のアルコール酸化の抑制の方が有意に大きい。このことは sodium cyanide (2×10^{-5} M) でもみられた (NaN_3 10^{-5} M と同程度)。これに対し, aniline (2×10^{-3} M) あるいは pyrazole (2×10^{-3} M) による抑制は, H_2O_2 依存のアルコール酸化においてはほとんどみられないけれども, NADPH- O_2 依存の酸化系において明らかにみとめられた。aminopyrine (2×10^{-3} M) は, NADPH- O_2 依存のアルコール酸化に対

Table 1. Effects of inhibitors on the oxidation of ethanol by microsomes or catalase. per cent of control

inhibitors	ethanol-oxidizing systems		
	microsomes		catalase
	NADPH- O_2 -dependent	H_2O_2 -dependent	H_2O_2 -dependent
none (control)	100	100	100
NaN_3 10^{-5} M	47	11**	11**
NaN_3 10^{-6} M	85	65*	67*
3-amino-1,2,4-triazole 2×10^{-3} M	76	49**	37**
aminopyrine 2×10^{-3} M	100	83*	76**
aniline 2×10^{-3} M	62	93**	93**
pyrazole 2×10^{-3} M	70	98**	96**

Figures are the mean of 3 experiments.

*: $p < 0.05$, NADPH- O_2 -dependent vs. H_2O_2 -dependent.

** : $p < 0.01$, NADPH- O_2 -dependent vs. H_2O_2 -dependent.

するよりも、 H_2O_2 依存のそれに対して、より強い抑制を示した。対照実験として H_2O_2 生成系に依存するアルコール酸化活性について、catalase 標品をマイクロゾームの代わりに用い、catalase によるアルコール酸化活性をマイクロゾームによるそれと比較した結果 (Table 1. 右)、この両者に対する阻害剤の効果は、ほぼ平行の関係を示した。

マイクロゾーム各分画に aniline $2 \times 10^{-8} M$ を添加

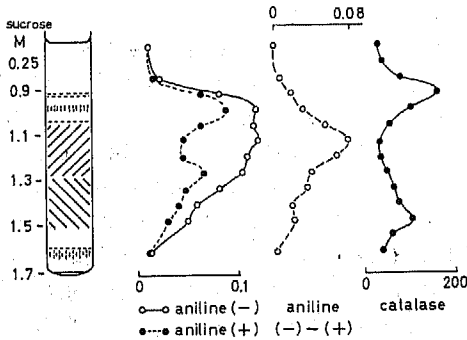


Figure 4. Effect of aniline addition on intra-microsomal distribution of NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity. ethanol-oxidizing activity (μ moles acetaldehyde formed/10 min/fraction), \circ — \circ ; activity after aniline addition, \bullet — \bullet ; difference of the activities in the presence and absence of aniline, \circ — \bullet ; catalase activity (μ moles H_2O_2 consumed/min/fraction), \bullet — \bullet .

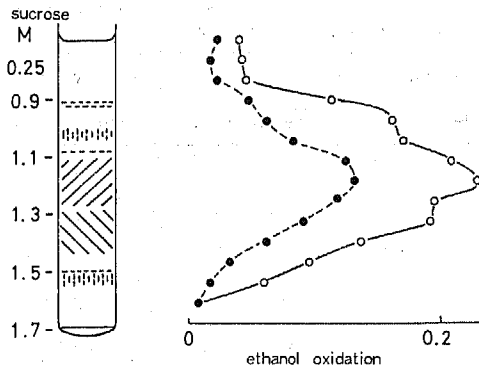


Figure 5. Effect of azide addition on intra-microsomal distribution of the NADPH- O_2 -dependent ethanol-oxidizing activity. ethanol-oxidizing activity (μ moles acetaldehyde formed/10 min/fraction), \circ — \circ ; activity after azide addition, \bullet — \bullet .

したさいの、NADPH- O_2 依存のアルコール酸化活性を aniline 添加のない場合と比較すると (Fig. 4), aniline 添加によるアルコール酸化活性の分布の変化は、この図の例では、蔗糖 1.15M 付近を中心にみられた。すなわち、この部分のアルコール酸化活性 (NADPH- O_2 依存の) は aniline による抑制を、うけやすいといえる。

マイクロゾームの各分画に、sodium azide $5 \times 10^{-6} M$ を添加したさいの NADPH- O_2 依存のアルコール酸化活性の分布は、Fig. 5 に示すように、azide 添加により、ピークの両側で強い抑制をうける。azide 添加時のピークの位置は蛋白質分布のそれとほぼ一致する。

ラット肝マイクロゾームによる acetaldehyde 消費活性は、今回の ethanol からの acetaldehyde 生成活性測定の下条件下では、まったくみとめられなかった。

考 察

肝マイクロゾームの NADPH- O_2 依存のアルコール酸化の機構についてのこれまでの諸学者の見解は2つの主張に大別される。前述のごとく1つは、肝マイクロゾームの NADPH- O_2 依存の H_2O_2 生成を catalase が利用して、アルコールを酸化するという見解である^{9) 5) 16)}。これに対し、Lieber ら^{6) 7) 8)}は、catalase 阻害剤 (azide, 3-amino-1,2,4-triazol) についての成績およびアルコール連用ラット肝マイクロゾームの酵素系活性に関する実験の成績にもとづいて、NADPH- O_2 依存のアルコール酸化は、catalase の関与とは別の機構、すなわちマイクロゾームの mixed function oxidase による酸化であると主張している。著者は肝マイクロゾームによるアルコール酸化の機構をさらに解明する目的で実験をおこなった。

1. Roach らあるいは Lieber らの成績と

著者の成績との相違

Roach ら⁹⁾は 3-amino-1,2,4-triazole が、肝マイクロゾームの NADPH- O_2 依存のアルコール酸化と H_2O_2 依存のアルコール酸化に対し、同程度の抑制を示すと報告している。しかし著者の今回の実験では、3-amino-1,2,4-triazole は NADPH- O_2 依存のアルコール酸化に対するよりは H_2O_2 依存の酸化に対してより強い抑制を示した。この実験成績の差異は、彼らの実験が、3-amino-1,2,4-triazole を *in vivo* で投与しているのに対し、著者の実験においてはこれを *in vitro* の系に加えたことによるものと思われる。

Lieber らの報告によれば, *in vivo* に投与された pyrazole (アルコール脱水素酵素阻害剤) は肝ミクロゾームの NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化をほとんど抑えないが, H₂O₂ 依存のアルコール酸化を著しく抑えるという。この報告は, 著者の *in vitro* 添加による実験成績とは完全に相反するものであるが, これも *in vivo* と *in vitro* の実験条件の差にもとづくものと思われる。

in vivo 投与の場合には, 薬物の直接の作用のみでなく, 二次的な変化も含めて観察していることが多いため, 上記のような実験成績の相違が現われるのであろう。

2. ミクロゾームの H₂O₂ 生成系

ラット肝ミクロゾームの電子伝達系による NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成系の存在はほぼ間違いないと思われるが, この活性についての直接的証明は, 現在のところ不可能である¹⁷⁾。ミクロゾームに catalase を添加したさいの, いわゆる NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性のミクロゾーム内分布は, 「真の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化 (catalase の関与しない)」に, 「NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成活性」に依存するアルコール酸化が重なり合って形成された分布と考えられる。このことは, catalase の関与による H₂O₂ 依存のアルコール酸化を, catalase 阻害剤 (azide, 3-amino-1, 2, 4-triazole, cyanide) がとくに強く抑制すること, および NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性の分布におよぼす azide の影響についての実験成績からも支持される。これらの実験成績は, 肝ミクロゾームの薬物代謝酵素系が, 多くの薬物を基質とするとともに, 水を基質として NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成をおこなうという考え¹⁸⁾を裏づけるものかもしれない。

3. 肝ミクロゾームのアルコール酸化に

関与する酵素系

今回の実験から, ミクロゾームによる NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性の中には, 「H₂O₂ 生成活性とミクロゾーム分画中の catalase の組合せ」で説明できない活性の存在することが明らかである。これは, Lieber らの主張するように, 「catalase および NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成」とは無関係な「NADPH-O₂ 依存の」アルコール酸化酵素系の存在を裏づけるものといえる。

一方, NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成活性と catalase によるアルコールの酸化が, ミクロゾームの

アルコール酸化系の本体であるとする主張³⁾⁴⁾⁵⁾¹⁶⁾については, H₂O₂ 生成系 (glucose oxidase プラス glucose) 使用時のミクロゾームのアルコール酸化活性の分布が, catalase 活性の分布によく似ていることから, この系の関与も大きいものと考えられる。

a. NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化系と薬物代謝酵素系

catalase の関与を含む「みかけ上」の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化の活性分布は, aminopyrine N-demethylase 活性の分布との間に, ズレを示す。しかし, catalase 添加時の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性分布, azide 添加時の活性分布, および aniline 添加による活性の変化のパターンに対し, aminopyrine N-demethylase 活性の分布のパターンはほぼ一致する。このことは, 「NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成と catalase」の関与のない, 「真の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化」の活性分布が, aminopyrine N-demethylase 活性の分布と, おおよそ一致することを示している。

また, 肝ミクロゾームの cytochrome P-450 がアルコールによって type II 類似のスペクトル変化 (差スペクトル) を示す¹⁹⁾²⁰⁾こと, ならびに type II の差スペクトルを示す aniline²¹⁾あるいは pyrazole²²⁾によって, NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化が特異的に抑制される (表 1) こと, さらに, aniline p-水酸化の活性がアルコール²⁰⁾²²⁾や pyrazole²²⁾によって competitive に抑制されることなどから, catalase の関与のない「真の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化」は, 薬物代謝酵素系による, aniline の p-水酸化の機構と共通の機構によっておこなわれるものと考えられる。

b. H₂O₂ 生成系プラス catalase によるアルコール酸化

azide 添加時の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性の分布と azide 不添加時のその活性の分布との間には, そのパターンに大きなズレがみられる。「肝ミクロゾームの, NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成活性と catalase 活性」によって生ずるアルコールの酸化活性の分布が, このズレに相当するものとみなされる。また, aniline 添加時の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性の分布も, ほぼこれを示すといえる。これらのことから, 「みかけ上」のいわゆる NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性は, 「真の NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性」に, 「NADPH-O₂ 依存の

H₂O₂ 生成活性プラス catalase によるアルコール酸化活性」が重なったものとみるのが妥当と結論されよう。

c. H₂O₂ 生成系と未知の因子による
アルコール酸化

Fig. 1 にみられる H₂O₂ 依存のアルコール酸化活性の分布と catalase 活性の分布の不一致については、catalase の関与のない H₂O₂ 依存のアルコール酸化系 (peroxidase 様活性) の存在が予想される。しかし、両活性分布のみかけ上の不一致をひき起すような物質が粗面ミクロゾームに含まれる可能性も否定できず、その本体の解明は今後の問題である。

4. 肝ミクロゾームのアルコール酸化酵素系
をめぐる問題

in vivo では、肝細胞内に含まれる H₂O₂ 生成系、NADPH、catalase、ミクロゾームなどの組み合わせによって、アルコールが、肝でかなり酸化されるものと思われる。ただ、肝細胞内で生理的に、どの機構がどの程度、アルコールの酸化に関与するかは明らかでない。おそらく cytosol のアルコール脱水素酵素 (1. 1. 1) による酸化に比し、これらによる酸化は小さいであろう⁷⁾。9,000×g 上清やホモジネートにおいては、アルコールの酸化によって生ずる acetaldehyde は、可溶分画およびミトコンドリアにより、速やかに消費される²⁴⁾ため、acetaldehyde の生成活性から直接それを測定することが困難である。それゆえ、どの機構が、生理的なアルコール酸化に主役を演じているかについては、直接に比較することができない。

ラット肝ミクロゾームの NADPH-O₂ 依存のアルコール酸化活性は、アルコール連用時に増加する²⁴⁾が、同時に aniline の p-水酸化酵素活性も増加²⁵⁾²⁶⁾する。このことは、前述 (考察 3, a) の考察とも関連して、アルコールの連用が、cytochrome P-450 との間に type II に属する差スペクトルを生ずる薬物に対し、その代謝酵素活性の増加をひき起す可能性のあることを予想させる。

要 約

ラット肝ミクロゾームのアルコール酸化酵素系活性のミクロゾーム内分布が、NADPH-O₂ 依存の酸化活性と、H₂O₂ 依存の酸化活性とで、異なることを示し、2つの相異なるアルコール酸化機構が肝ミクロゾームに共存することを明らかにした。この2つの酸化酵素系について、catalase, catalase 阻害剤, cyto-

chrome P-450 と type II の差スペクトルを生ずる薬物 (aniline, pyrazole) などの添加実験によって、その性質が明らかにされた。一方の酸化系は、ミクロゾームの mixed-function oxidase による NADPH-O₂ 依存の H₂O₂ 生成、およびこの生成 H₂O₂ をミクロゾーム分画に含まれる catalase が利用してのアルコールの酸化であり、他方の酸化系は、ミクロゾームによる NADPH-O₂ 依存のアルコールの直接の酸化で、その酸化機構は aniline の p-水酸化の機構と共通と考えられるものであると結論された。さらに、H₂O₂ 依存のアルコール酸化の中に、一部 catalase の関与しない活性の存在することを示唆する実験成績もえられた。

本論文の要旨は第45回日本薬理学会総会 (1972年4月27日, 仙台) において発表したものである。

文 献

- 1) Orme-Johnson, W. H. and Ziegler, D. M.: Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21: 78-82, 1965.
- 2) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M.: Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding, *Science*, 162: 917-918, 1968.
- 3) Roach, M. K., Reese, W. N., Jr. and Creaven, P. J.: Ethanol oxidation in the microsomal fraction of rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36: 596-602, 1969.
- 4) Khanna, J. M., Kalant, H. and Lin, G.: Metabolism of ethanol by rat liver microsomal enzymes, *Biochem. Pharmacol.*, 19: 2493-2499, 1970.
- 5) Isselbacher, K. J. and Carter, E. A.: Ethanol oxidation by liver microsomes: Evidence against a separate and distinct enzyme system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39: 530-537, 1970.
- 6) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M.: Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system. *In vitro* characteristics and adaptive properties *in vivo*; *J. Biol. Chem.*, 245: 2505-2512, 1970.

- 7) Lieber, C. S. : New pathway of ethanol metabolism in the liver, *Gastroenterology*, 59 : 930-937, 1970.
- 8) Matsumura, R., Masamura, E., Tsukada, M. and Nakanishi, S. : Ethanol oxidation by the hepatic microsomes after prolonged ethanol treatment, *Med. J. Shinshu Univ.*, 15 : 291-292, 1971.
- 9) Duritz, G. and Truitt, E. B., Jr. : A rapid method for the simultaneous determination of acetaldehyde and ethanol in blood using gas chromatography, *Quart. J. Stud. Alc.*, 25 : 498-510, 1964.
- 10) 松村理一郎 : Gas chromatography vapor phase 法による, より確かな血中 acetaldehyde 定量法 : 2, 3 測定法の比較と血液の前処理, *アルコール研究*, 4 : 55-56, 1969.
- 11) Chance, B. and Maenly, A. C. : Assay of catalase and peroxidases, *Method in Enzymology* vol. II, pp. 764-775, Academic Press, New York, 1955.
- 12) Nash, T. : The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, *Biochem. J.*, 55 : 416-421, 1953.
- 13) 松村理一郎 : pivampicillin および生体成分を含む試料中の formaldehyde の測定法, (投稿準備中).
- 14) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951.
- 15) Layne, E. : Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, *Method in Enzymology* vol. III, pp. 447-454, Academic Press, New York, 1957.
- 16) Tephly, T. R., Tinelli, F. and Watkins, W. D. : Alcohol metabolism : Role of microsomal oxidation in vivo, *Science*, 166 : 627-628, 1969.
- 17) Gillette, J. R. : *Microsomes and Drug Oxidation*, Ed. by Gillette, J. R. et al., pp. 222, Academic Press, New York, 1969.
- 18) 加藤隆一 : 薬物代謝酵素, 薬物の作用点 (高木博司編), pp. 227-276, 南江堂, 東京, 1968.
- 19) Rubin, E., Lieber, C. S., Alvares, A. P., Levin, W. and Kuntzman, R. : Ethanol binding to hepatic microsomes—Its increase by ethanol consumption, *Biochem. Pharmacol.*, 20 : 229-231, 1971.
- 20) Shiohara, E., Tsukada, M., Kinoshita, G. and Nakanishi, S. : Further studies on inhibitory effect of ethanol on p-hydroxylation of aniline *in vitro*, *Med. J. Shinshu Univ.*, 16 : 31-37, 1971.
- 21) Schenkman, J. B., Remmer, H. and Estabrook, R. W. : Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome, *Mol. Pharmacol.*, 3 : 113-123, 1967.
- 22) Rubin, E., Gang, H. and Lieber, C. S. : Interaction of ethanol and pyrazole with hepatic microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42 : 1-8, 1971.
- 23) Nakanishi, S., Masamura, E. and Tsukada, M. : Inhibitory effect of ethanol on p-hydroxylation of aniline *in vitro*, *Med. J. Shinshu Univ.*, 15 : 11-15, 1970.
- 24) Matsumura, R. : Consumption of acetaldehyde and formaldehyde with hepatic subcellular fractions of rat and ethanol, (in preparation).
- 25) Nakanishi, S., Masamura, E., Tsukada, M., Miyazawa, T. and Matsumura, R. : Hepatic drug-metabolizing enzymes in rat with adequate diet after prolonged ethanol treatment, *Med. J. Shinshu Univ.*, 15 : 91-95, 1970.
- 26) Nakanishi, S., Masamura, E., Tsukada, M. and Matsumura, R. : Kinetic studies for aniline hydroxylase after prolonged ethanol treatment, *Japan. J. Pharmacol.*, 21 : 303-309, 1971.

(1972. 7. 8 受稿)