

染毛剤成分の代謝に関する研究

勸食品薬品安全センター 秦野研究所

中尾 美津男

Regioselectivity in *N*-acetylation of nitro-*p*-phenylenediamine (NPDA, 2-nitro-1,4-diaminobenzene), a widely used hair dye component, by rat liver cytosolic *N*-acetyltransferases was studied in relation to its substituent effects on enzymatic *N*-acetylation of mono-substituted anilines. NPDA was acetylated specifically at the *N*⁴-position to afford the *N*⁴-monoacetate, a major urinary metabolite in the rat, when incubated with rat liver cytosol fortified with acetyl-coenzyme A. *N*¹-Acetylation of NPDA did not take place even when the *N*⁴-monoacetate was used as a substrate, suggesting a strong steric hindrance effect of the *ortho* nitro group on the enzymatic *N*¹-acetylation. The steric hindrance effect of the nitro group on the cytosolic *N*-acetylation of the *ortho* amino group was revealed by a comparative study carried out by using aniline, three respective regioisomers of nitroanilines and phenylenediamine (PD)s as model substrates. The comparative study also indicated the enzymatic *N*-acetylation of the mono-substituted anilines to be strongly influenced by the electronic effect of the substituents.

Regioselective *N*-acetylation in the hepatic cytosol was also investigated with *N*¹- and *N*⁴-monoacetates of 1,2,4-triaminobenzene (TAB). The monoacetates yielded the *N*¹, *N*⁴-diacetate, another major urinary metabolite of the hair dye component, in the rat, without concomitant formation of the *N*², *N*⁴-diacetate or the *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetate. The triacetate was formed only from the *N*¹, *N*²-diacetate in the enzymatic reactions. A comparative study, carried out by using *N*-monoacetates of three regioisometric PDs, indicated that the *N*-acetyl group had a potent steric hindrance effect on the primary amino group at the *ortho* position.

Thus, the present *in vitro* study strongly suggested that the two major urinary metabolites, NPDA *N*⁴-acetate and TAB *N*¹, *N*⁴-diacetate, of the hair dye component could be formed, at least in the rat liver, by the enzymatic *N*-acetylation of the corresponding amines.

1. 緒言

染毛剤は古くから広く使用されてきたにもかかわらず、その安全性に関してはあまり検討されていなかった。1975年 B. N. Ames ら¹⁾によって市販の酸化型染毛剤の中に微生物に対して変異原性が認められるものがあり、その変異原性の本体は染毛剤構成成分の芳香族アミン類であることが報告された。以来、染毛剤およびその構成成分の安全性評価のための試験が数多く実施されてきた²⁻⁵⁾。

しかし、染毛剤構成成分の生体内動態、特に代謝に関する報告はあまり多くない⁶⁻¹⁰⁾。そこで本研究は染毛剤の安全性に関する研究の一環としてセミパーマメントヘアカラーの主要な構成成分であり、変異原性^{11, 12)}、染色体異常誘発性¹³⁾、姉妹染色分体交換誘発性¹⁴⁾、不定期DNA合成誘発性¹⁵⁾等が認められ、発癌性^{16, 17)}も報告されている nitro-*p*-phenylenediamine (NPDA, 2-nitro-1,4-diaminobenzene) の代謝について検討した。我々は既に NPDA を投与したラット

の尿中から、2種類の代謝物を検出した。一つは NPDA N^4 -acetate であり、もう一つは 1, 2, 4-triaminobenzene (TAB) N^1, N^4 -diacetate であった¹⁸⁾。NPDA N^1, N^4 -diacetate はその前駆体と考えられる NPDA N^4 -acetate あるいは TAB N^4 -acetate を投与した尿中からも検出された。しかし、TAB N^1, N^4 -diacetate を投与した尿中からは TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate は検出されなかった¹⁹⁾。したがって、NPDA の代謝経路は NPDA → NPDA N^4 -acetate → TAB N^4 -acetate → TAB N^1, N^4 -diacetate であると考えられる。この経路の中で NPDA および TAB N^4 -acetate のアミノ基の N -アセチル化に位置選択性が認められた。そこで、このアミノ基の選択的 N -アセチル化がラット肝を用いても *in vivo* と同様の結果を与えることを確認すると共に nitroaniline, phenylenediamine (PD) 等のモデル化合物を基質として用いて *in vitro* における選択的 N -アセチル化についても検討した。

2 実験材料および方法

2.1 試薬

NPDA N^1 -acetate を Atkinson らの方法²⁰⁾、NPDA N^4 -acetate を Bulow らの方法²¹⁾ にしたがって合成した。TAB N^1 -acetate, TAB N^2 -acetate, TAB N^4 -acetate を Kehrman らの方法²²⁾ にしたがって合成した。合成した TAB N -monoacetate には無水プロピオン酸を加え、 N, N' -dipropionate 誘導体とした。TAB N -monoacetate の N, N' -dipropionate 誘導体のそれぞれの融点は、TAB N^1 -acetate 204°C、TAB N^2 -acetate 200°C および TAB N^4 -acetate は 200°C であった。また、*o*-PD N -acetate を Macallum の方法²³⁾、*o*-PD N, N' -diacetate を Rugheimer の方法²⁴⁾、*m*-PD N, N' -diacetate を Phillips の方法²⁵⁾ にしたがってそれぞれ合成した。その他の試薬については東京化成工業(株)等から購入して使用した。

2.2 肝可溶性画分の調製

動物には6週齢、体重200–210g の Sprague-Dawley 系雄性ラット(日本チャールス・リバー(株), Crj:CD(SD))を使用した。

動物を断頭、放血死させ、直ちに肝臓を摘出した。3倍量の1.15%塩化カリウム溶液を加え、氷冷下テフロンペスル付ホモジェナイザーでホモジェナイズした。ホモジェネートを105,000×g、60分間冷却遠心分離した上清を酵素反応に使用した。Lowry らの方法²⁶⁾ によってタンパク質の定量を行った。

2.3 インキュベーションおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)試料の調製

Lower らの方法²⁷⁾ を改良してインキュベーションを行った。反応液の組成は0.05mlのプロピレングリコールに溶解した基質(芳香族アミン)1.0 μmol, 1.0 μmol アセチルコエンザイム A (アセチル-CoA), 100 μM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)および肝可溶性画分(4.3mg タンパク質相当)であり、全量を1.0mlとした。反応液に基質を加えることによって反応を開始し、37°C、30分間インキュベートした。反応終了後、氷冷下1N水酸化ナトリウムを0.1mlを加えた。次いで、反応液にHPLC用の内部標準物質を加えた後、3倍量の酢酸エチル/*n*-ブタノール(1:1, v/v;使用前に水で飽和した)で2回抽出した。Aniline および nitroaniline 類の代謝物の抽出には酢酸エチルを使用した。有機層を50°C以下で減圧下濃縮乾固し、50%メタノール溶液に溶解し、HPLC試料とした。なお、芳香族アミン類のアセチル化合物の反応液からの回収率は85%以上であった。

2.4 HPLC, 紫外吸収スペクトルおよび質量スペクトル

代謝物の分離を高速液体クロマトグラフ(株島津製作所, LC-6A システム)によって行った。カラムにはShim-pack CLC-ODS(株島津製作所)を用い、流速0.6ml/min, 検出には紫外分光

Table 1. Chromatographic and Spectral Data of Nitro-*p*-phenylenediamine, Its *N*-Acetates, and 1,2,4-Triaminobenzene-*N*-Acetates

Compound	HPLC ^a			TLC ^b Rf value	UV λ_{max} nm (ϵ)	Mass spectral data m/z (relative intensity, %)
	Retention times (min)					
	1	2	3			
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	18.2			0.65	243 (18600)	153 (M ⁺ , 100), 107 (73), 80 (47), 53 (39)
<i>N</i> ¹ -acetate	16.2			0.74	248 (19100)	185 (M ⁺ , 20), 153 (100), 107 (78), 80 (27), 53 (29)
<i>N</i> ² -acetate	25.8			0.46	253 (22700)	195 (M ⁺ , 47), 153 (100), 107 (88), 80 (33), 53 (42)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -diacetate	29.2			0.66	253 (23500)	237 (M ⁺ , 24), 195 (58), 153 (100), 107 (43), 53 (15)
Acetanilide ^c	32.8					
1,2,4-Triaminobenzene ^d	9.8			0.56	232 (21600), 261 (18100)	291 (M ⁺ , 49), 235 (34), 176 (66), 122 (66), 57 (100)
<i>N</i> ¹ -acetate ^d	15.2			0.51	232.5 (20900), 260 (17300)	277 (M ⁺ , 67), 221 (36), 179 (56), 165 (44), 122 (100)
<i>N</i> ² -acetate ^d	16.4			0.52	231 (25400), 262 (21800)	277 (M ⁺ , 58), 221 (40), 179 (38), 165 (57), 122 (100)
<i>N</i> ⁴ -acetate ^d	19.6			0.52	232 (21600), 261 (18100)	277 (M ⁺ , 69), 221 (51), 179 (19), 165 (100), 122 (96)
<i>p</i> -Phenylenediamine						
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -diacetate ^c	22.8					
1,2,4-Triaminobenzene						
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -diacetate		12.0		0.23	223 (18800), 255 (10900), 300 (2300)	207 (M ⁺ , 39), 147 (51), 123 (46), 122 (100), 95 (45)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁴ -diacetate		21.2		0.33	225.5 (29600), 255 (12000), 302 (5100)	207 (M ⁺ , 66), 147 (57), 123 (82), 122 (100), 95 (52)
<i>N</i> ² , <i>N</i> ⁴ -diacetate		14.0		0.27	213 (15900), 260 (12000)	207 (M ⁺ , 72), 147 (76), 123 (88), 122 (100), 95 (52)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² , <i>N</i> ⁴ -triacetate		39.6		0.37	230 (19300), 260 (16000)	249 (M ⁺ , 61), 165 (62), 147 (63), 123 (64), 122 (100)
<i>N</i> ⁴ -Acetylsulfanilamide ^c		26.0				

^a 1: Mobile phase, acetonitrile-water (15:85, v/v); column Shim-pack CLC-ODS; flow rate, 0.6 ml/min. 2: Mobile phase, chloroform-ethanol (95:5, v/v); column Shim-pack CLC-SIL; flow rate, 2.0 ml/min. 3: Mobile phase, methanol-water (10:90, v/v); column Shim-pack CLC-ODS; flow rate, 0.6 ml/min.

^b Mobile phase, chloroform-methanol-25% ammonia water (60:10:1, v/v).

^c Internal standard for HPLC. Plates: Slica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck).

^d *N*¹,*N*²-Dipropionate derivative.

Table 2. Chromatographic and Spectral Data of Nitroanilines, Aniline and Their *N*-Acetates

Compound	HPLC ^a		UV Ethanol λ_{max}	nm (ϵ)	Mass spectral data m/z (relative intensity, %)
	Retention times (min)				
	1	2			
<i>o</i> -Nitroaniline	15.8				
<i>o</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate	11.2		233 (17000)	180 (M ⁺ , 15), 138 (100), 92 (40), 65 (41), 63 (20), 52 (21)	
<i>m</i> -Nitroaniline	11.6				
<i>m</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate	14.2		241 (22900)	180 (M ⁺ , 22), 138 (100), 92 (52), 65 (37), 64 (14), 63 (16)	
<i>p</i> -Nitroaniline	9.6				
<i>p</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate	15.2		315 (14400), 224 (10860)	180 (M ⁺ , 25), 138 (100), 108 (56), 92 (29), 65 (42), 63 (24)	
2,4-Dinitroaniline ^b	19.8				
Aniline	12.0				
Acetanilide	14.6		241 (16000)	135 (M ⁺ , 25), 93 (100), 66 (23), 65 (20)	
<i>m</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate ^b	22.0				

^a 1: Mobile phase, methanol-water (1:1, v/v), 2: mobile phase, methanol-water (4:6, v/v), and other conditions as described in the text.

^b Internal standard for high pressure liquid chromatography.

光度計検出器(株島津製作所, SPD-6A)を使用し, 検出波長254nmで行った。紫外吸収スペクトルについては各試料のエタノール溶液を自記分光光度計(株島津製作所, UV-201A)を用いて測定した。また, 質量スペクトルを質量分析計(株

島津製作所, QP-1000)を用いて, イオン化電圧70eV, イオン源温度290°Cで直接導入法によって測定した。標準品のHPLCによって測定した保持時間, 紫外吸収および質量スペクトルデータをTable 1, 2および3に示した。

Table 3. Chromatographic and Spectral Data of Phenylenediamines and Their *N*-Acetates

Compound	HPLC ^a Retention times (min)		UV Ethanol λ_{max}	nm(ϵ)	Mass spectral data m/z (relative intensity, %)
	1	2			
<i>o</i> -Phenylenediamine	5.6				
<i>N</i> -monoacetate	11.6		292 (2870) 208 (24100)	150 (M^+ , 46), 133 (26), 108 (100), 107 (39), 80 (56), 53 (25)	
<i>N,N'</i> -diacetate	22.8		214 (20700)	192 (M^+ , 20), 133 (35), 132 (36), 108 (100), 107 (31), 80 (32)	
<i>p</i> -Phenylenediamine <i>N,N'</i> -diacetate ^b	31.6				
<i>m</i> -Phenylenediamine	8.0				
<i>N</i> -monoacetate	12.4		296 (2580) 223 (26900)	150 (M^+ , 54), 108 (100), 81 (22), 80 (29), 53 (14)	
<i>N,N'</i> -diacetate	26.4		234 (29300)	192 (M^+ , 22), 150 (34), 108 (100), 81 (12), 80 (21)	
<i>p</i> -Phenylenediamine <i>N,N'</i> -diacetate ^b	20.4				
<i>p</i> -Phenylenediamine	6.4				
<i>N</i> -monoacetate	8.8		260 (15000)	150 (M^+ , 47), 108 (100), 107 (38), 80 (33), 53 (23)	
<i>N,N'</i> -diacetate	20.4		265 (23000)	192 (M^+ , 32), 150 (22), 108 (100), 107 (31), 80 (23), 53 (16)	
<i>m</i> -Phenylenediamine <i>N,N'</i> -diacetate ^b	26.4				

^a 1: Mobile phase, methanol-water-acetic acid (15:85:0.1, v/v), 2: mobile phase, methanol-10 mM phosphate buffer, pH 7.5 (2:8, v/v), and other conditions as described in the text.

^b Internal standard for high pressure liquid chromatography.

3. 結果

3.1 NPDA およびその *N*⁴-acetate の *N*-アセチル化反応

アセチル-CoA 存在下, ラット肝可溶性画分中で NPDA をインキュベートし, HPLC 用内部標準物質を添加した後, 酢酸エチル/*n*-ブタノールで抽出し, HPLC によって代謝物を検索した。クロマトグラム上には基質の他に保持時間 25.8 分にピークが検出された。このピークは加熱 (100°C, 5 分間) した可溶性画分およびアセチル-CoA 不存在下には検出されなかった。この代謝物を高速液体クロマトグラムの保持時間, 紫外吸収スペクトルおよびマススペクトルを標準品と比較した結果, NPDA *N*⁴-acetate であることが明らかになった。しかし, NPDA *N*¹-acetate および NPDA *N*¹, *N*⁴-diacetate は検出されなかった (Table 4)。

NPDA *N*⁴-acetate を基質とした場合も NPDA *N*¹, *N*⁴-diacetate は検出されなかった (Table 4)。

3.2 TAB *N*-mono- および *N,N'*-diacetate の *N*-アセチル化反応

4位のアミノ基の *N*-アセチル化は, TAB の *N*¹-acetate および *N*²-acetate を NPDA と同様の条件でインキュベートした場合にも起こった。つまり, TAB *N*¹-acetate および TAB *N*²-acetate を基質とした反応液に内部標準物質を添加した後, 酢酸エチル/*n*-ブタノール抽出液には, クロマトグラム上にそれぞれ唯一の代謝物である TAB *N*¹, *N*⁴-diacetate (保持時間, 21.2 分) および TAB *N*², *N*⁴-diacetate (保持時間, 14.0 分) のピークが認められた (Table 1)。各々の代謝物を HPLC の再クロマトグラフィー, 紫外吸収およびマススペクトルの検討により確認した (Table 1 および 4)。しかし, それぞれの抽出液には TAB *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetate に相当するクロマトグラム上のピークは認められなかった (Table 4)。

1位のアミノ基の *N*-アセチル化は, TAB *N*⁴-acetate を前述の条件でインキュベートした場合に起こった。TAB *N*⁴-acetate を基質とした

Table 4. *N*-Acetylation of Nitro-*p*-phenylenediamine, 1,2,4-Triaminobenzene *N*-Mono- and *N*, *N'*-Di-acetates by Rat Liver Cytosol

Substrate ^a	Possible metabolite	Metabolite formed (nmol/mg protein/30 min)
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine N^1 -monoacetate	0
	N^4 -monoacetate	28.7
	N^1, N^4 -diacetate	0
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine N^4 -monoacetate	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine N^1, N^4 -diacetate	0
1,2,4-Triaminobenzene N^1 -monoacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2 -diacetate	0
	N^1, N^4 -diacetate	9.4
	N^1, N^2, N^4 -triacetate	0
N^2 -monoacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2 -diacetate	0
	N^2, N^4 -diacetate	11.1
	N^1, N^2, N^4 -triacetate	0
N^4 -monoacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^4 -diacetate	17.3
	N^2, N^4 -diacetate	0
	N^1, N^2, N^4 -triacetate	0
1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2 -diacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2, N^4 -triacetate	27.9
	N^1, N^4 -diacetate	0
	N^2, N^4 -diacetate	0

^a Each substrate (1 mM) was incubated at 37°C for 30 min with rat liver cytosol (4.3 mg protein/ml) in the presence of acetyl-CoA (1 mM) in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing propylene glycol (5%, v/v). Propylene glycol which had no effect on the enzymatic reactions was used for dissolution of the substrates.

反応液中から唯一の代謝物である TAB N^1, N^4 -diacetate を HPLC により分離し、紫外吸収およびマススペクトルによって確認した (Table 1 および 4)。しかしながら、TAB N^2, N^4 -diacetate および TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate は検出されなかった (Table 4)。

TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate が代謝物として反応液中から検出されたのは、TAB N^1, N^2 -diacetate を基質とした場合のみであった。TAB N^1, N^4 -diacetate および N^2, N^4 -diacetate を基質とした場合には TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate は検出されなかった (Table 4)。

3.3 Nitroaniline 類の *N*-アセチル化反応

Aniline のベンゼン環にニトロ基を導入した場

合のアミノ基の *N*-アセチル化に及ぼす影響を検討するためにアセチル-CoA 存在下、ラット肝可溶性画分を用いて、*o*-, *m*-, および *p*-nitroaniline を基質として NPDA と同様の条件でインキュベートした。反応液中の *N*-アセチル化代謝物 nitroaniline *N*-acetate を、内部標準物質を添加した後、酢酸エチルで抽出、HPLC により溶出し、再クロマトグラフィーを行い、その保持時間および紫外吸収、マススペクトルを標準品と比較検討し確認した (Table 2)。

Aniline のベンゼン環にニトロ基を導入することによって、その酵素的 *N*-アセチル化率は aniline のそれに比較して著しく減少した (Table 5)。3 種の nitroaniline の中で *m*-nitroaniline の酵素的 *N*-アセチル化率が最も高かったが、その被

Table 5. *N*-Acetylation of Aniline and Nitroanilines by Rat Liver Cytosol

Substrate ^a	<i>N</i> -Acetate formed (nmol/mg protein/ 30 min)	Relative acetylation
Aniline	38.6	1.00
<i>o</i> -Nitroaniline	0.0	0.00
<i>m</i> -Nitroaniline	19.5	0.51
<i>p</i> -Nitroaniline	4.8	0.12

^a Incubations were carried out under the same conditions as described in Table 4.

N-アセチル化率は aniline の1/2であった。*p*-nitroaniline に対する酵素的*N*-アセチル化率は *m*-nitroaniline のその1/4であり、*o*-nitroaniline のアミノ基は全く*N*-アセチル化を受けなかった。

3.4 PD類およびその*N*-monoacetate類の*N*-アセチル化反応

Anilineのベンゼン環にアミノ基あるいはアセチルアミノ基を導入した場合のアミノ基の*N*-アセチル化に及ぼす影響について検討した。

o-, *m*-, および*p*-PDならびにそれぞれの*N*-monoacetateを用い、アセチル-CoA存在下、肝可溶性画分を加え、前述と同様の条件でインキュベートした。PD類の*N*-アセチル化代謝物であるPD*N*-monoacetate類およびPD*N*, *N'*-diacetate類の確認、PD*N*-monoacetate類の代謝物PD*N*, *N'*-diacetate類の確認を前述のnitroaniline*N*-acetateと同様の方法で行った(Table 3)。Anilineのベンゼン環へのアミノ基の導入は、酵素的*N*-アセチル化率を aniline の1.7-1.9倍増加させた(Table 6)。*o*-PDの酵素的*N*-モノアセチル化率は、他の位置異性

体である *m*-および*p*-PDのそれらよりも高かった。しかし、PD*N*, *N'*-diacetateの生成については、*m*-および*p*-PDが総酵素的*N*-アセチル化率の約15%であるのに対して*o*-PDの場合には*N,N'*-diacetateは全く生成しなかった。

Anilineのベンゼン環にアセチルアミノ基を導入した場合、*o*-PD*N*-monoacetateの酵素的*N*-アセチル化率は aniline に比較して著しく減少した。一方、*m*-PD*N*-monoacetateの*N*-アセチル化率も aniline に比較して僅かに減少したが、*p*-PD*N*-monoacetateの*N*-アセチル化率は増加した。

3.5 NPDAの*N*-アセチル化反応におけるパラオクソンの影響

NPDA *N*¹-acetateを基質としてアセチル-CoA存在下、ラット肝可溶性画分中でインキュベートした場合、反応液中から基質の他にNPDA, NPDA *N*⁴-acetateおよびNPDA *N*¹, *N*⁴-diacetateが検出された。しかし、上述の反応液中に0.1Mパラオクソン(脱アセチル化酵素の阻害剤)を添加した場合、NPDAおよびその*N*⁴

Table 6. *N*-Acetylation of Aniline, Phenylenediamines and Their *N*-Monoacetates by Rat Liver Cytosol

Substrate ^a	<i>N</i> -Acetates formed (nmol/mg protein/30 min)		Total acetylation ^b
	<i>N</i> -Monoacetate	<i>N,N'</i> -Diacetate	
Aniline	39.4		39.4 (1.00)
<i>o</i> -Phenylenediamine	74.1	0.0	74.1 (1.88)
<i>m</i> -Phenylenediamine	64.1	10.4	74.5 (1.89)
<i>p</i> -Phenylenediamine	56.9	10.9	67.8 (1.72)
<i>o</i> -Phenylenediamine <i>N</i> -monoacetate		2.3	2.3 (0.06)
<i>m</i> -Phenylenediamine <i>N</i> -monoacetate		32.1	32.1 (0.81)
<i>p</i> -Phenylenediamine <i>N</i> -monoacetate		44.0	44.0 (1.12)

^a Incubations were carried out under the same conditions as described in Table 4.

^b Numerals in parentheses represent relative acetylation based on the summed values of *N*-mono- and *N,N'*-di-acetates.

Table 7. Effect of Paraoxon on *N*-Acetylation of Nitro-*p*-phenylenediamine and Its *N'*-Acetate by Rat Liver Cytosol^a

Substrate	Metabolites formed (nmol/mg protein/30 min)			
	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N'</i> -acetate	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N'</i> -acetate	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N',N'</i> -diacetate
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N'</i> -acetate				
Complete	50.7	14.6	-	6.0
+ Paraoxon (0.1 mM)	4.3	3.0	-	11.8
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine				
Complete	-	28.7	0	0
+ Paraoxon (0.1 mM)	-	26.5	0	0

^a Incubations were carried out in the absence and in the presence of paraoxon under the same conditions as described in Table 4.

-acetateの生成は著しく減少した(Table 7)。一方、NPDAを基質とした場合、上述の条件下、パラオクソンの存在の有無にかかわらずNPDA *N'*-acetateおよびNPDA *N'*, *N'*-diacetateは全く生成せず、NPDA *N'*-acetateのみが生成した。また、その被*N*-アセチル化率にもほとんど変化が認められなく(Table 7)、パラオクソンの添加によるNPDAの4位のアミノ基の*N*-

アセチル化への影響は認められなかった。NPDA *N'*-acetateおよび*o*-nitroanilineを基質とし、パラオクソンを添加した場合もNPDAの1位のアミノ基と同様に、それぞれのアミノ基は全く*N*-アセチル化を受けなかった。

4. 考察

NPDAの*N*-アセチル化が4位のアミノ基に選択的に起こることが*in vivo*同様、アセチル-CoA存在下、雄性ラット肝可溶性画分を用いた実験においても明らかになった(Table 4およびFig. 1)。

NPDAのモデル化合物nitroanilineの3種の異性体を基質として、その*N*-アセチル化について検討した結果、*o*-nitroanilineのアミノ基は全く*N*-アセチル化を受けず、*m*-および*p*-nitroanilineのアミノ基は*N*-アセチル化を受けた(*m*>*p*)が、anilineの酵素的*N*-アセチル化率に比較して著しく減少した(Table 5)。したがって、NPDAの1位のアミノ基が*N*-アセチル化を受けない原因は、隣接するニトロ基の主に立体障害によるものと考えられる。

Brayら²⁸⁾はラット肝の水抽出物を用いて、数種の芳香族アミンの*N*-アセチル化合物の酵素的脱アセチル化について検討し、nitroaniline *N*-acetateの3種の異性体の酵素的脱アセチル化は、*o*>>*m*>*p*の順であることを報告している。本研究におけるラット肝脱アセチル化酵素は、パラオ

クソンによって著しく阻害を受けた。即ち、NPDA *N*¹-acetateの脱アセチル化酵素は0.1Mパラオクソンの添加により、約92%の阻害を受けた(Table 7)。そこで、脱アセチル化酵素をほぼ完全に阻害する条件である0.1Mパラオクソン存在下、基質としてNPDA, NPDA *N*⁴-acetateおよび*o*-nitroanilineを用いてアセチル-CoAと共にインキュベートしたが、3種の基質共、反応液中に*N*¹-acetateまたは*N*-acetateは検出されなかった。したがって、ニトロ基は*o*-位のアミノ基の*N*-アセチル化を完全に阻害することが明らかになった。

TAB *N*, *N*'-diacetateの*N*-アセチル化によるTAB *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetateの生成は、肝可溶性画分中TAB *N*¹, *N*²-diacetateを基質とした場合のみ生成した。その他の異性体であるTAB *N*¹, *N*⁴-diacetateおよび*N*², *N*⁴-diacetateを基質とした場合にはアミノ基は*N*-アセチル化を受けずTAB *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetateは生成しなかった(Table 4)。同様の選択的*N*-アセチル化はTAB *N*, *N*'-diacetateを投与した場合の*in vivo*においても認められた。また、PD類およびその*N*-monoacetate類, TAB *N* *N*-monoacetate類およびそのTAB *N*, *N*'-

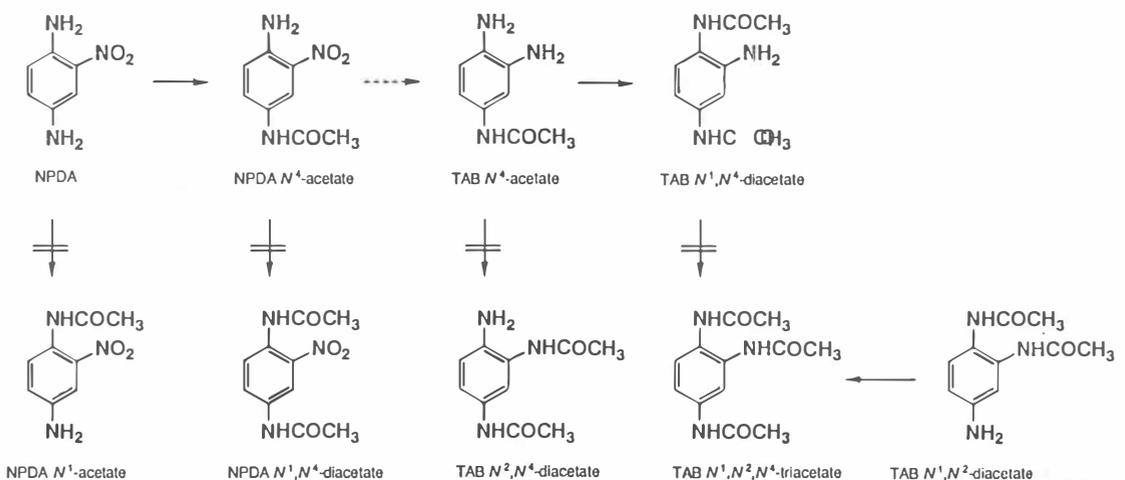


Fig. 1. Regioselective *N*-Acetylations of NPDA and TAB *N*⁴-acetate by Rat Liver Cytosol Fortified with Acetyl-CoA

diacetate類を基質とした場合にも隣接するアセチルアミノ基によってアミノ基のN-アセチル化が起こらないことから、アセチルアミノ基は、その立体障害によってo-位のアミノ基のN-アセチル化を阻害すると考えられる。

TAB N⁴-acetateは*in vivo*と同様にアセチル-CoA存在下、ラット肝可溶性画分を用いても、1位のアミノ基のみ選択的にN-アセチル化を受け、TAB N¹, N⁴-diacetateを生成した。しかし、2位のアミノ基がN-アセチル化を受けたTAB N², N⁴-diacetateおよびTAB N¹, N², N⁴-triacetateは生成しなかった(Table 4およびFig. 1)。このTAB N⁴-acetateの1位のアミノ基の選択的N-アセチル化は、酵素基質相互作用における立体的な影響によるものと考えられる。

酵素的N-アセチル化の立体障害と考えられる報告として、Glinskunら²⁹⁾は、ラット肝可溶性画分を用いて2,4-diaminotolueneのN-アセチル化について検討し、4-acetylamino-2-aminotolueneの特異的生成を認めているが、2-acetyl-4-aminotolueneおよび2,4-diacetylamino-2-aminotolueneを検出していない。また、Granthamら³⁰⁾も2,4-diaminoanisoleをラットに投与した尿中から2,4-diaminoanisoleのN⁴-monoacetateおよびN², N⁴-diacetateを検出しているが、N²-acetateを検出していない。

NPDAは、微生物に対する変異原性を有する^{1, 11-12)}が、その代謝物であるNPDA N⁴-acetateの変異原性はNPDAに比較して低い³¹⁾、したがって、NPDAの不活性化酵素として、N-アセチル化酵素によるアミノ基のN-アセチル化反応は重要であると考えられる。

最後に、本研究に対してご援助頂きました(財)コスメトロロジー研究振興財団に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) B. N. Ames, H. O. Kammen and E. Yamasaki, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 2423 (1975)
- 2) T. Wernick, B. M. Lanman and J. L. Fraux, Toxicol. Appl. Pharmacol., 32, 450(1975)
- 3) C. Burnett, M. M. Jacobs, A. Seppala and P. Shubik, J. Toxicol. Environ. Health, 6, 247 (1980)
- 4) A. L. Giles, C. W. Chung and C. Kommineni, J. Toxicol. Environ. Health, 1, 433(1976)
- 5) G. Iyer, K. Kannan and R. R. Khan, J. Scient. Ind. Res., 44, 392(1985)
- 6) P. H. Grantham, L. Mohan, T. Benjamin, P. P. Roller, J. R. Miller and E. K. Weisburger, J. Environ. Pathol. Toxicol., 3, 149(1980)
- 7) H. Hofer and E. Hruby, Fd. Chem. Toxicol., 21, 331(1983)
- 8) Y. M. Ioannou and H. B. Matthews, J. Toxicol. Environ. Health, 16, 299(1985)
- 9) R. L. Bronaugh and E. R. Congdon, J. Invest. Dermatol., 83, 124(1984)
- 10) L. J. Wolfram and H. I. Maibach, Arch. Dermatol. Res., 277, 235(1985)
- 11) Y. Takeda and R. Yoshimura, Eisei Kagaku, 24, 322(1978)
- 12) M. M. Shahin, C. Choppy and N. Lequesne, Environ. Mutagen., 7, 535(1985)
- 13) W. F. Benedict, Nature, 260, 368(1976)
- 14) P. E. Perry and C. E. Searle, Mutat. Res., 56, 207(1977)
- 15) C. N. Martin, A. C. McDermid and R. C. Garner, Cancer Res., 38, 2621(1978)
- 16) G. Reznik and J. M. Ward, Fd. Cosmet. Toxicol., 17, 493(1979)
- 17) R. R. Maronpot, M. B. Skimkin, H. P. Witschi, L. H. Smith and J. M. Cline, J. Natl. Cancer Inst., 76, 1101(1986)
- 18) M. Nakao and Y. Takeda, J. Toxicol. Environ. Health, 11, 93(1983)
- 19) M. Nakao, Y. Goto, Y. Matsuki, A. Hiratsuka and T. Watabe, Chem. Pharm. Bull., 35, 785 (1975)

- (1987)
- 20) C. M. Atkinson, C. W. Brown, J. McIntyre and J. C. E. Simpon(deceased), *J. Chem. Soc.*, 1954, 2023
- 21) C. Bulow and E. Mann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 30, 977(1897)
- 22) F. Kehrman and C. Mermod, *Helv. Chim. Acta*, 10, 62(1927)
- 23) A. D. Macallum, *J. Soc. Chem. Ind.*, 42, 468 (1923)
- 24) A. D. Rugheimer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 39, 1653(1906)
- 25) M. A. Phillips, *J. Chem. Soc.*, 1928, 172
- 26) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 27) G. M. Lower, Jr. and G. T. Bryan, *Biochem. Pharmacol.*, 22, 1581(1973)
- 28) H. G. Bray, S. P. James, W. V. Thorpe and M. R. Wasdell, *Biochem. J.*, 47, 483(1950)
- 29) T. Glinsukon, T. Benjamin, P. H. Grantham, E. K. Weisburger and P. P. Roller, *Xenobiotica*, 5, 475(1975)
- 30) P. H. Grantham, T. Benjamin, L. C. Tahan, P. P. Roller, J. R. Miller and E. K. Weisburger, *Xenobiotica*, 9, 333(1979)
- 31) K. G. Dossou, M. Robinet, F. Callais, B. Festy and P. H. N'guyen, *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.*, 80, 361(1987)