

## ハロタンのラット肝ミクロソーム中 チトクロームP-450に及ぼす影響

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室 (指導: 平川方久教授)

井 戸 幸 男

(平成4年8月18日受稿)

**Key words** : ハロタン肝障害, 酵素誘導, チトクロームP-450, 還元的代謝

### 緒 言

ハロタンは、1956年 Suckling によって合成されて以来<sup>1)</sup>, その優れた麻酔作用と使いやすさにより、世界中で広く臨床に用いられ、全身麻酔法を飛躍的に進歩させた揮発性麻酔薬である。

しかし、ハロタンの使用開始まもなくよりハロタンが原因と考えられる肝障害が相次いで報告されるようになり<sup>2,3)</sup>, 1966年米国で National Halothane Study が行われた<sup>4)</sup>。その結果、ハロタン麻酔後の肝壊死による死亡例の発生は、約35,000例中1例で、ハロタンが特に肝障害を起こしやすいとは結論づけられなかったが、短期間内にハロタン麻酔を2回以上行くと肝障害が発生しやすくなると指摘している。しかし、その後もハロタン肝障害の存在を示唆する多くの報告がなされた。

一方、1964年に Van Dyke らによって、ハロタンが生体内で分解されることが報告されて以来<sup>5)</sup>, 現在までに、ハロタンは、肝のミクロソーム中チトクロームP-450によって好氣的あるいは嫌氣的に代謝されることが明らかにされている<sup>6-9)</sup>。そして、それらの代謝産物がハロタン肝炎の発症機序に何らかのかかわりを有していると考えられており、ハロタン肝炎の動物モデルがつくられ多くの研究が行われてきた<sup>10-14)</sup>。決定的な結論はいまだ得られていないが、チトクロームP-450によってハロタンが分解をうけるという最初の段階は、多くの研究者の認めることとなっており、ハロタンと肝ミクロソーム中チトクロームP-450とのかかわりに関する研究

が行われている<sup>15-20)</sup>。特に、ハロタン麻酔時に低酸素状態にさらされると、フェノバルビタール (PB) によって酵素誘導されたラットの肝ミクロソーム中チトクロームP-450が正常レベル以下に減少するという報告は<sup>20)</sup>, ハロタン肝炎の機序の一端を示唆する可能性があると考えられる。そこで本研究では in vitro において極低酸素下に投与したハロタンが、ミクロソーム中チトクロームP-450にどのような影響を与えるかを検討した。

### 材料および方法

#### 1. 実験動物

実験動物は、Wistar 系雄性ラット、生後7週齢、体重200~220g を用いた。

#### 2. 肝ミクロソームの調整

ラットは、PB で酵素を誘導した PB 誘導群と無処置群に分け、PB 誘導群は0.1% PB 水を5日間飲ませ、24時間の絶食とした。両群とも塩酸ケタミンを40~50mg筋注して開腹したのち、大動静脈にカニューレーションし、氷冷されたヘパリン加生理食塩水で肝を灌流し、肝を摘出した。摘出した肝は、1.15% KCl 溶液中で Potter-Elvehjem type homogenizer を用いホモジナイズした。10,000×g で40分間遠心し、さらに上清を100,000×g で60分間遠心した後、再度沈殿物を1.15% KCl 溶液中でホモジナイズし、100,000×g で60分間遠心した。得られた沈渣を pH 7.4の保存液 (1 mmol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム, 1 mmol/L ジチオスレイトール, 30%グリセロースを含む0.1 mol リン

酸カリウム緩衝液)に懸濁して-70℃で保存した。遠心分離は、KUBOTA 遠心分離器 KR-180 B型, 日立超遠心分離器 SCP-70型を用いて行った。

### 3. 試 薬

実験に使用した試薬は以下の通りである。Glucose-6-phosphate, nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidized form (NADP), nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) およびアニリンは和光純薬工業(株), チトクロームCはSigma社, アミノピリン, *p*-アミノフェノールはナカライテスク(株), モノメチロールジメチルヒダントインは東京化成工業(株), エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) は(株)同仁薬化学, ニコチン酸アミドは片山化学(株), ハロタンは武田薬品(株)から購入した。その他の試薬は市販の特級を用いた。

### 4. 実験操作

各実験に際して, 凍結保存しておいたマイクロソームを解凍し, biuret 法<sup>21)</sup>にて蛋白定量を行い, 保存液にてマイクロソーム蛋白量を 6 mg蛋白/mlに調整した。

マイクロソーム溶液中に溶存している酸素をより完全に取り除くため, 以下のような凍結吸引法を導入した。側口および共栓付きの耐熱耐圧試験管 (容量20ml) に蛋白濃度調整済みのマイクロソーム 4 mlを入れ NADPH 100 $\mu$ gを添加した。

なお, 比較対照のため NADPH を添加しない非 NADPH 群も作成した。それぞれの試験管を液体窒素中に約1分間浸してマイクロソームを凍結させ, 日立製ロータリー型吸引器にて気相を5分間吸引した。吸引後共栓を閉じて解凍した後, 再度液体窒素に1分間浸して凍結した。3回の凍結, 吸引操作後に, あらかじめ3方活栓に満たしておいた表1に示す組成のガスを, 真空となった気相へ導き, 共栓を再度閉じて解凍し, 37℃の恒温槽中で5分または20分間反応させた。反応の後, マイクロソームを氷水中で0℃に冷却し以下の測定項目につき測定を行った。

### 5. 測定項目および測定方法

#### (1) チトクロームP-450量の測定

マイクロソーム中のチトクロームP-450量は, Omura & Sato の方法<sup>22)</sup>に従い, 日立二波長自記分光光度計557型を用いて吸光度を測定し, 分子吸光係数  $E_{490-450} 91\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ を用いて, マイクロソーム蛋白 1 mg当たりの比含量として算出した。

表1 各実験群のガス組成

1. 空気		20分間 (A 群)
2. 窒素		20分間 (N 群)
3. 窒素	2% (10%) ハロタン	20分間 (非 NADPH 群)
4. 空気	2% (10%) ハロタン	20分間 (AH 群)
5. 窒素	2% (10%) ハロタン	5分間 (NH 5 群)
6. 窒素	2% (10%) ハロタン	20分間 (NH20 群)

ガスの組成およびインキュベイト時間による各群の一覧を示す。

表2 P-450量の変化-1

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A 群	N 群	非 NADPH 群
2	有	100 (2.182 $\pm$ 0.056)	99.8 $\pm$ 3.9	99.0 $\pm$ 3.8
	無	100 (0.713 $\pm$ 0.100)	98.5 $\pm$ 2.3	97.5 $\pm$ 3.3
10	有	100 (2.001 $\pm$ 0.319)	99.8 $\pm$ 0.4	99.8 $\pm$ 0.2
	無	100 (0.656 $\pm$ 0.075)	99.6 $\pm$ 1.0	99.1 $\pm$ 0.7

表中の各群は, A 群: 空気下で20分間, N 群: 純窒素下で20分間, 非 NADPH 群: NADPH 非投与純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃反応させたものである。数値は, 各群とも例数が8例で, A 群の測定結果を100としたときの変化率 (%) を mean  $\pm$  SD で示したものである。( ) 内は, A 群の実測値であり単位は nmole/mg 蛋白を示す。

(2) チトクローム b<sub>5</sub>量の測定

ミクロソーム中のチトクローム b<sub>5</sub>量は, Omura & Sato の方法<sup>22)</sup>に従い, 日立二波長自記分光光度計557型を用いて吸光度を測定し, 分子吸光係数 E<sub>423-409</sub>185cm<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>を用いて, ミクロソーム蛋白 1 mg当たりの比含量として算出した。

(3) TBA 反応物質 (TBARs) 量の測定

ミクロソーム中の TBARs 量の測定は, 和光純薬工業(株)の TBA 測定キットを使用し, 島津蛍光光度計 RF-510 LCA を用いて励起波長515 nm, 蛍光波長553nmで吸光度を測定し, TBARs 量を算出した。

(4) ヘム濃度の測定

ミクロソーム中のヘム濃度の測定は, Appleby & Morton の方法<sup>23)</sup>に従い, 島津分光光度計 UV-210A型を用いて557nmにおける吸光度を測定し変化量を算出した。

(5) アミノピリンN-脱メチル化 (AD) 活性の測定

ミクロソーム中の AD 活性の測定は, Nash の方法<sup>24)</sup>に従い, 反応生成物の formaldehyde を, 島津分光光度計 UV-210A型を用いて412nmにおける吸光度を測定し, ミクロソーム蛋白 1 mg当たりの AD 活性として算出した。

(6) アニリン水酸化 (AH) 活性の測定

ミクロソーム中の AH 活性の測定は, Imai の方法<sup>25)</sup>に従い, 反応生成物の *p*-aminophenol を, 島津分光光度計 UV-210A型を用いて630nmにおける吸光度を測定し, ミクロソーム蛋白 1 mg 当たりの AH 活性として算出した。

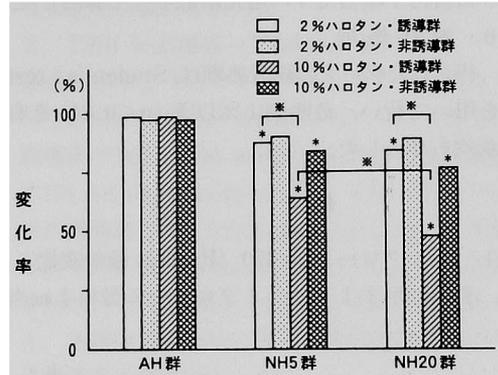


図1 P-450量の変化  
 図中の各群は, AH 群: 空気-ハロタン下で20分間, NH 5 群: 純窒素-ハロタン下で5分間, NH20群: 純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37°Cで反応させたものである。数値は, 各群とも例数が8例で, A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を平均値で示したものである。\*印は対A群との比較, ※印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。

表3 P-450量の変化-2

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A 群	AH群	NH 5 群	NH20群
2	有	100 (2.182 ± 0.056)	98.6 ± 2.5	86.5 ± 6.0*	84.2 ± 5.6*
	無	100 (0.713 ± 0.100)	97.6 ± 2.5	90.0 ± 4.5	89.1 ± 4.8
10	有	100 (2.001 ± 0.319)	99.5 ± 0.2	64.5 ± 8.8*	48.9 ± 6.4*
	無	100 (0.656 ± 0.075)	97.0 ± 2.9	84.0 ± 1.7*	75.8 ± 3.6*

表中の各群は, A 群: 空気下で20分間, AH 群: 空気-ハロタン下で20分間, NH 5 群: 純窒素-ハロタン下で5分間, NH20群: 純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37°Cで反応させたものである。数値は, 各群とも例数が8例で, A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を mean ± SD で示したものである。( )内は, A群の実測値であり単位は nmole/mg 蛋白を示す。\*印は対A群との比較, ※印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。図中では煩雑さを除くため, 一部有意差の印を削除した。

(7) NADPH-チトクロームP-450還元酵素 (fp<sub>2</sub>) 活性の測定

ミクロソーム中の fp<sub>2</sub>活性の測定は, Phillips & Langdon の方法<sup>26)</sup>に従い, チトクロームCの還元変化量を島津分光光度計 UV-210A型を用いて550nmにおける吸光度を測定し, ミクロソーム蛋白 1 mg当たりの還元活性として算出した。

## 6. 統計処理

得られたデータの統計処理は, Student's t-testを用いて行い, 危険率 1%以下 ( $p < 0.01$ ) を有意差ありとした。

## 結 果

## 1. チトクロームP-450 (P-450) 量の変化

表2に示すように, ミクロソーム蛋白 1 mg当

たりのP-450量は, A群は, 2%ハロタン投与の誘導群において $2.182 \pm 0.056$  nmole/mg蛋白, 非誘導群において $0.713 \pm 0.100$  nmole/mg蛋白, 10%ハロタン投与の誘導群において $2.001 \pm 0.319$  nmole/mg蛋白, 非誘導群において $0.656 \pm 0.075$  nmole/mg蛋白であった。A群を100とした変化率で見ると, N群および非 NADPH 群は全く変化を認めなかった。したがって表3, 図1に示すように, N群および非 NADPH 群は省き, A群を対照群とした。

NH 5群およびNH 20群は, A群に対して2%ハロタン投与の誘導群, 10%ハロタン投与の誘導群および非誘導群においてそれぞれ, 86.5%, 84.2%, 64.5%, 48.9%, 84.0%, 75.8%と有意の減少がみられた。

表4 b<sub>5</sub>量の変化

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A 群	AH群	NH 5群	NH20群
2	有	100 (0.400 ± 0.038)	98.0 ± 3.8	99.7 ± 3.2	99.8 ± 2.8
	無	100 (0.264 ± 0.032)	99.6 ± 1.8	101.1 ± 1.7	100.4 ± 2.1
10	有	100 (0.400 ± 0.022)	99.8 ± 0.6	99.8 ± 0.9	100.1 ± 0.7
	無	100 (0.267 ± 0.024)	100.3 ± 1.8	99.6 ± 1.7	100.3 ± 1.9

表中の各群は, A群: 空気下で20分間, AH群: 空気-ハロタン下で20分間, NH 5群: 純窒素-ハロタン下で5分間, NH20群: 純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37°Cで反応させたものである。数値は, 各群とも例数が8例で, A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を mean ± SD で示したものである。( )内は, A群の実測値であり単位は nmole/mg 蛋白を示す。

表5 TBAR<sub>5</sub>量の変化

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A 群	AH群	NH 5群	NH20群
2	有	100 (166.2 ± 66.4)	101.8 ± 13.9	100.6 ± 11.5	99.4 ± 12.6
	無	100 (101.4 ± 10.3)	101.5 ± 5.5	99.9 ± 3.5	100.7 ± 4.8
10	有	100 (123.9 ± 28.8)	100.0 ± 4.6	99.9 ± 5.5	98.9 ± 6.0
	無	100 (100.9 ± 6.4)	100.4 ± 2.4	101.4 ± 2.9	101.3 ± 2.9

表中の各群は, A群: 空気下で20分間, AH群: 空気-ハロタン下で20分間, NH 5群: 純窒素-ハロタン下で5分間, NH20群: 純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37°Cで反応させたものである。数値は, 各群とも例数が8例で, A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を mean ± SD で示したものである。( )内は, A群の実測値であり単位は nmole/mg 蛋白を示す。

つぎに、NH 5群およびNH 20群において、10%ハロタン投与の誘導群は、2%ハロタン投与の誘導群と非誘導群、および10%ハロタン投与の非誘導群に対して有意の減少を認めた。また非誘導群において、2%ハロタンと10%ハロタン投与の間にも有意差を認めた。NH 5群とNH 20群の比較では、10%ハロタン投与の時、誘導群非誘導群ともに有意差を認めた。AH 群は、A群に対して有意差を認めなかった。

2. チトクローム b<sub>5</sub> (b<sub>5</sub>) 量の変化

表4に示すように、ミクロソーム蛋白1mg当たりのb<sub>5</sub>量は、A群は2%ハロタン投与の誘導

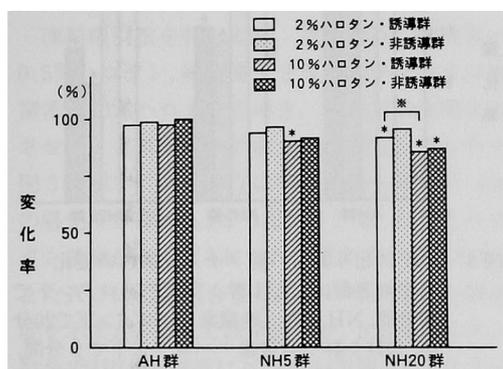


図2 ヘム量の変化

図中の各群は、AH 群：空気-ハロタン下20分間、NH 5群：純窒素-ハロタン下で5分間、NH20群：純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させたものである。数値は、各群とも例数が8例で、A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を平均値で示したものである。\*印は対A群との比較、※印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。

群で0.400±0.038nmole/mg蛋白、非誘導群で0.264±0.032 nmole/mg蛋白、10%ハロタン投与の誘導群で0.400±0.022 nmole/mg蛋白、非誘導群で0.267±0.024 nmole/mg蛋白であった。A群を100とした変化率をそれぞれの群についてみると、各群はA群に対しても対群間比較においても有意差を認めなかった。

3. TBA 反応物質 (TBARs) 量の変化

表5に示すようにミクロソーム蛋白1mg当たりのTBARsの量は、A群は2%ハロタン投与の誘導群で166.2±66.4nmole/mg蛋白、非誘導群で101.4±10.3 nmole/mg蛋白、10%ハロタン投与の誘導群で123.9±28.8 nmole/mg蛋白、非誘導群で100.9±6.4 nmole/mg蛋白であった。A群を100とした変化率をそれぞれの群についてみると、各群はA群に対しても対群間比較においても有意差を認めなかった。

4. ヘム量の変化率

表6、図2に示すように、ミクロソーム中のヘム量をA群を100とした場合の変化率でみると、NH 5群では10%ハロタン投与の誘導群、NH 20群では2%ハロタン投与の誘導群、10%ハロタン投与の誘導群および非誘導群においてそれぞれ、90.0%、93.1%、85.4%、86.1%と有意の減少が認められた。また、NH 20群において誘導群の2%ハロタン投与と10%ハロタン投与の間に有意差が認められた。AH 群は、A群に対して有意差を認めなかった。

5. アミノピリンN-脱メチル化 (AD) 活性の変化

表7、図3に示すように、ミクロソーム蛋白

表6 ヘム量の変化

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A群	AH群	NH 5群	NH20群
2	有	100	99.1 ± 2.6	94.3 ± 4.1	93.1 ± 2.7*
	無	100	99.7 ± 6.2	96.2 ± 7.4	95.4 ± 7.4 ※
10	有	100	98.3 ± 3.0	90.0 ± 4.0*	85.4 ± 4.4*
	無	100	100.3 ± 5.0	91.8 ± 9.9	86.1 ± 11.4*

表中の各群は、A群：空気下で20分間、AH 群：空気-ハロタン下で20分間、NH 5群：純窒素-ハロタン下で5分間、NH20群：純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させたものである。数値は、各群とも例数が8例で、A群の測定結果を100としたときの変化率(%)をmean ± SDで示したものである。\*印は対A群との比較、※印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。

1 mg当たりのAD活性は、A群は2%ハロタン投与の誘導群で166.5±19.2 nmole HCHO/20分/mg蛋白、非誘導群で98.9±31.6 nmole HCHO/20分/mg蛋白、10%ハロタン投与の誘導群で114.7±24.0 nmole HCHO/20分/mg蛋白、非誘導群で51.8±22.5 nmole HCHO/20分/mg蛋白であった。A群を100とした変化率をみると、NH5群とNH20群において、誘導群非誘導群ともにハロタン投与により有意の低下が認められ、非誘導群より誘導群のほうが低下率が大きく、2%ハロタン投与より10%ハロタン投与のほうが低下率が著しかった。また、2%ハロタン投与と10%ハロタン投与の比較では、誘導群および非誘導群間有意差が認められた。AH群は、A群に対して有意差を認めなかった。

6. アニリン水酸化 (AH) 活性の変化

表8, 図4に示すように、ミクロソーム蛋白1 mg当たりのAH活性は、A群は2%ハロタン投与の誘導群で27.8±4.6 nmole p-aminophenol/20分/mg蛋白、非誘導群で19.8±5.9nmole p-aminophenol/20分/mg蛋白、10%ハロタン投与の誘導群で22.2±5.8 nmole p-aminophenol/20分/mg蛋白、非誘導群で13.0±1.6nmole p-aminophenol/20分/mg蛋白であった。A群を100とした変化率をみると、NH5群の誘導群、NH20群の誘導群および非誘導群において有意の低下を認め、非誘導群より誘導群

のほうが低下率が大きく、2%ハロタン投与より10%ハロタン投与のほうが低下率が大きかった。また、NH5群およびNH20群では、10%ハロタン投与の誘導群は、2%ハロタン投与の誘導群、および10%ハロタン投与の非誘導群に比して有意の低下を認めた。AH群は、A群に対して有意差を認めなかった。

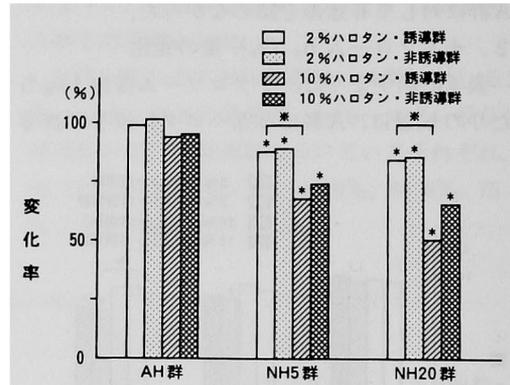


図3 アミノピリンN-脱メチル化活性の変化  
 図中の各群は、AH群：空気-ハロタン下で20分間、NH5群：純窒素-ハロタン下で20分間、NH5群：純窒素-ハロタン下で5分間、NH20群：純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させたものである。数値は、各群とも例数が8例で、A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を平均値で示したものである。\*印は対A群との比較、\*\*印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。

表7 アミノピリンN-脱メチル化活性の変化

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A 群	AH群	NH5群	NH20群
2	有	100 (166.5 ± 19.2)	98.5 ± 2.9	86.2 ± 5.1*	82.7 ± 4.7*
	無	100 (98.9 ± 31.6)	99.8 ± 3.0	87.0 ± 8.5*	84.1 ± 10.6*
10	有	100 (114.7 ± 24.0)	93.8 ± 17.2	62.5 ± 16.0*	47.1 ± 3.3*
	無	100 (51.8 ± 22.5)	94.9 ± 4.4	72.9 ± 14.5*	59.9 ± 13.0*

表中の各群は、A群：空気下で20分間、AH群：空気-ハロタン下で20分間、NH5群：純窒素-ハロタン下で5分間、NH20群：純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させたものである。数値は、各群とも例数が8例で、A群の測定結果を100としたときの変化率(%)をmean ± SDで示したものである。( )内は、A群の実測値であり単位は nmole HCHO/20分/mg 蛋白を示す。\*印は対A群との比較、\*\*印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。図中では煩雑さを除くため、一部有意差の印を削除した。

7. NADPH-チトクロームP-450還元酵素 (fp<sub>2</sub>) 活性の変化

表9に示すように、ミクロソーム蛋白1mg当たりのfp<sub>2</sub>活性は、A群は2%ハロタン投与の誘導群で0.169±0.030 nmole/mg蛋白/分、非誘導群で0.122±0.020 nmole/mg蛋白/分、10%ハロタン投与の誘導群で0.154±0.022 nmole/mg蛋白/分、非誘導群で0.111±0.017 nmole/mg蛋白/分であった。A群を100とした変化率をそれぞれの群についてみると、各群はA群に対しても対群間比較においても有意差を認めなかった。

8. ハロタン濃度の変化によるP-450吸光度の変化

凍結吸引法を行った後、空気のみ、純窒素+0.5%ハロタン、純窒素+2%ハロタンおよび純窒素+10%ハロタンを導き、37℃で20分間反応させ、ミクロソームの吸光度を測定したものを図5に示す。Bのように空気でも最も高いP-450の吸光度が認められ、0.5%、2%、10%とハロタン濃度が高くなるにつれて吸光度が低下した。またAにはCO結合を行わないで測定した吸光度を示すが、空気では平坦だが、0.5%ハロタン投与で470nm付近にピークが出現し、ハロタン濃度の上昇とともに吸光度が高くなった。このピークは反応の後再度凍結吸引操作を加えても消失しなかった。

考 察

現在ハロタン麻酔後の肝障害の原因として種々の説がある<sup>27)</sup>。すなわち、毒性をもつハロタンの代謝産物、免疫反応、肝血流量低下による低酸素、遺伝、および肝細胞のカルシウム恒常性維持の破綻等である。特にハロタンの代謝産物と低酸素状態の組み合わせが重要と考えられ、ラットにフェノバルビタールを投与することにより

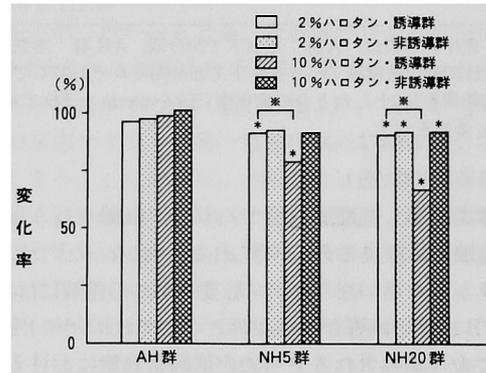


図4 アニリン水酸化活性の変化

図中の各群は、AH群：空気-ハロタン下で20分間、NH5群：純窒素-ハロタン下で5分間、NH20群：純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させたものである。数値は、各群とも例数が8例で、A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を平均値で示したものである。\*印は対A群との比較、\*\*印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。

表8 アニリン水酸化活性の変化

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A 群	AB群	NH5群	NH20群
2	有	100 (27.8 ± 4.6)	98.1 ± 1.4	92.2 ± 2.9*	90.7 ± 3.5*
	無	100 (19.8 ± 5.9)	98.3 ± 5.7	92.4 ± 7.5**	91.5 ± 5.8**
10	有	100 (22.2 ± 5.8)	99.1 ± 10.4	80.2 ± 10.7*	66.2 ± 14.7**
	無	100 (13.0 ± 1.6)	100.8 ± 5.6	91.5 ± 14.7**	91.3 ± 7.1**

表中の各群は、A群：空気下で20分間、AH群：空気-ハロタン下で20分間、NH5群：純窒素-ハロタン下で5分間、NH20群：純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させたものである。数値は、各群とも例数が8例で、A群の測定結果を100としたときの変化率(%)をmean ± SDで示したものである。( )内は、A群の実測値であり単位はnmole p-aminophenol/20分/mg proteinを示す。\*印は対A群との比較、\*\*印は対群間の比較をしたものでそれぞれP<0.01を示す。図中では煩雑さを除くため、一部有意差の印を削除した。

表9 NADPH-テトクロームP-450還元酵素 (fp<sub>2</sub>) 活性の変化

ハロタン濃度 (%)	フェノバルビタール誘導の有無	A 群	AH群	NH 5群	NH20群
2	有	100 (0.169 ± 0.030)	99.1 ± 3.0	99.1 ± 2.0	98.9 ± 2.0
	無	100 (0.122 ± 0.020)	100.0 ± 1.0	98.9 ± 4.3	99.7 ± 1.9
10	有	100 (0.154 ± 0.022)	101.5 ± 2.9	101.2 ± 3.4	101.7 ± 4.0
	無	100 (0.111 ± 0.017)	97.6 ± 4.1	98.3 ± 4.0	97.9 ± 3.7

表中の各群は、A群：空気下で20分間、AH群：空気-ハロタン下で20分間、NH 5群：純窒素-ハロタン下で5分間、NH20群：純窒素-ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させたものである。数値は、各群とも例数が8例で、A群の測定結果を100としたときの変化率(%)を mean ± SD で示したものである。( )内は、A群の実測値であり単位は nmole/mg 蛋白を示す。

酵素誘導し低酸素状態でハロタン麻酔を行うと実験的に肝炎モデルが得られるようになった<sup>10-13</sup>。ラットを用いたハロタン肝炎モデルの作製には、PBによる誘導が必須条件とされており<sup>11,12</sup>、PBにより誘導されるP-450が低酸素状態におけるハロタンの投与で大幅な減少を示すとき肝障害が認められている<sup>20</sup>。

一方、in vitro においてこの低酸素状態を得るのは容易ではない。ミクロソーム溶液中の溶存酸素は、窒素の通気では50%以上を除去することは不可能で、本研究の予備実験においても気相の純窒素による置換の後、純窒素と2%ハロタンによる溶液の通気操作を2時間行ってもP-450は、まったく分解をうけなかった。そこでミクロソーム溶液中の溶存酸素を除去するため凍結吸引法を行った。

操作により取り除かれる酸素の量を概算すると、酸素は一気圧で0℃の水1mlに約0.05ml溶解できる。ミクロソーム溶液にも同様に溶解するとすれば4mlのミクロソーム溶液中には大気中で、約0.04ml溶存していることになる。この状態でミクロソーム溶液の凍結吸引を行うと、ロータリー型吸引器で5分間の吸引により得られる陰圧の程度を0.1mmHgとすると、凍結吸引操作を三度繰り返すことで溶存酸素量は、導入する窒素の純度99.999%に比べ無視できるほどの極少量になる。窒素の導入により最大でも0.00016mlの酸素が気相に流入すると、この酸

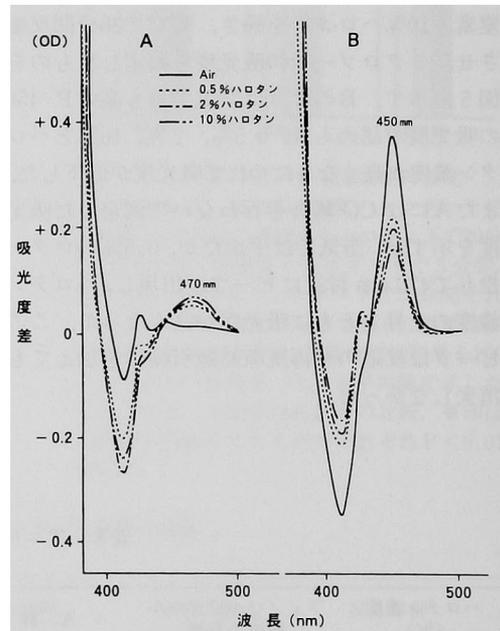


図5 ハロタン濃度差によるミクロソームの吸光度変化

A：空気下，純窒素-0.5%ハロタン下，純窒素-2%ハロタン下，純窒素-10%ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させた後，少量のNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>で還元して描出した吸光度の波形を重ねたもの。B：空気下，純窒素-0.5%ハロタン下，純窒素-2%ハロタン下，純窒素-10%ハロタン下で20分間それぞれ37℃で反応させた後，COを通気し，少量のNa<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>で還元して描出した吸光度の波形を重ねたもの。

素量の溶存により試験管内の酸素分圧は、理論上最大でも約0.008 mmHgとなり極低酸素状態が得られていることになる。導入する窒素の純度を上げたり酸素吸着剤を通すことでさらに極低酸素状態が得られるかも知れない。ただし、この極低酸素状態はあくまで概算であり、実際にどの程度であるのかを確認することは非常に困難である。この凍結吸引法によってえられる極低酸素状態は、NADPHや $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ といった薬剤を添加することによってミクロソームの還元状態を得る実験系よりは影響がかなり少ないと思われる。特に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ は極少量の添加でも溶液中でラジカルを大量に発生し、それのみによってもミクロソームの種々の成分が分解してしまうと考えられる。したがって、凍結吸引法を用いて溶液に溶在している酸素を極力除くことによって得られる物理的な低酸素状態は、薬剤を用いた化学的な方法によるそれよりも反応系にとっては好ましいものと思われる。

吸入されたハロタンの一部は、肝のミクロソーム中チトクロームP-450 (P-450) によって好氣的または嫌氣的代謝を受ける。好氣的代謝による産物は trifluoro acetic acid (TFAA) と  $\text{Br}^-$  イオンで<sup>6,7)</sup>、嫌氣的代謝による産物は 2-chloro-1, 1, 1-trifluoroethane (CTFE)、2-chloro-1, 1-difluoroethylene (CDFE) と  $\text{F}^-$  イオンであると言われている<sup>8,9)</sup>。各代謝経路の最終産物はいずれも毒性を有するとはされていないが、中間代謝産物は直接肝障害を生じさせるような反応を起こす可能性がある<sup>27)</sup>。

肝毒物である四塩化炭素は、反応性に富むフリーラジカルによって肝障害を発生させることが知られている。ハロタン麻酔中にもフリーラジカルは発生するといわれるが<sup>28)</sup>肝毒性として反応するという証拠は得られていない。

1969年 Cohen は、ハロタン麻酔後のマウスで少なくとも2週間のあいだ、非揮発性の代謝産物が肝の macromolecule に共有結合していることを示した。ただし、肝壊死との相関はみられなかったとしている<sup>29)</sup>。この共有結合はフェノバルビタールで誘導した動物において著しく増加し<sup>30)</sup>、低酸素状態で増加する<sup>31)</sup>。したがって還元的代謝産物は酸化的代謝産物よりも肝毒性が

強いと考えられ、ハロタン肝障害に及ぼす還元的代謝の役割に注目が集まった。

ハロタンは、モノオキシゲナーゼであるP-450により酸化される場合、通常基質と同様P-450の疎水性部分のポケットに入り込む。するとNADPHから $\text{fp}_2$ を介して酸化状態のヘム鉄の $\text{Fe}^{3+}$ に第一電子が供給される。 $\text{Fe}^{2+}$ となり酸素分子が結合すると第二電子が供給されて一原子酸素は水を生成する。残る一原子酸素が基質であるハロタンに結合し酸化が完了し、P-450はもとの $\text{Fe}^{3+}$ にもどる。その後ハロタンは主にTFAAへと代謝されて尿中へ排泄される。ところが酸素分子のない還元状態においては、P-450の反応サイクルは第一電子の供給以降停止してしまう。したがって、ハロタンは還元的代謝経路により $\text{Br}^-$ がはずれたのちCTFEおよびCDFEになるといわれている<sup>8,9)</sup>。この還元的代謝反応が進展していると考えられる状態においては、P-450は第一電子の供給以外の役割を果たしていないと考えられるにもかかわらず、*in vivo*<sup>20)</sup>または*in vitro*の本研究においても減少することが認められた。特にPBにより誘導されたP-450においては著しい減少を認めた。これは、PBにより誘導されたP-450種が、ハロタンの代謝にかかわるP-450であることを示している

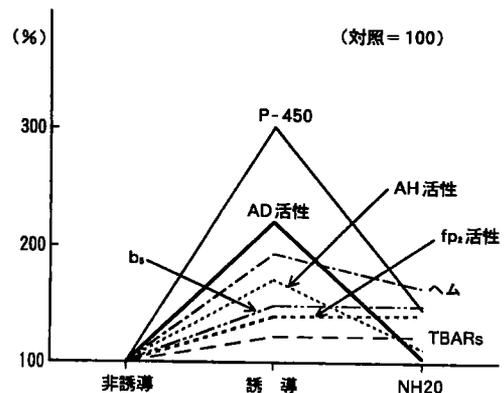


図6 フェノバルビタールによる誘導と純窒素—ハロタンによる変化  
測定を行った7項目についてPB誘導の効果を、10%ハロタン投与の群におけるPB非誘導のA群の値に対してPB誘導のA群の値で示し、純窒素—ハロタンによる変化をNH20群の値で示した。

思われる。図6には、測定を行った項目について、PBによる誘導の割合と極低酸素下に10%ハロタンを投与した時の変化率を示す。実線で結ぶのは、適切でないと思われるが、変化を見やすくするために便宜上おこなった。P-450はPBによる誘導で約3倍に増加し、極低酸素下のハロタン投与により半分以下に減少した。AD活性とAH活性も同様に誘導に伴う増加と極低酸素下のハロタン投与による減少を示した。電子伝達系にかかわる  $b_5$ ,  $fp_2$  およびラディカルの指標である TBARs が、誘導に伴う増加と極低酸素下のハロタン投与によっても変化を受けていないことがうかがわれる。

チトクロームは、補欠分子族であるヘムの種類によって四種類に分類される<sup>32)</sup>。すなわち、チトクロームA, B, C, Dは、それぞれヘムa, プロトヘム, ヘムc, ヘムdを補欠分子族としている。チトクロームP-450と  $b_5$  はチトクロームBに属している。ヘムのアルカリ性溶液(pH 11~12)にピリジンを加えて  $Na_2 S_2 O_4$  で還元すると(ピリジンフェロヘモクロムの生成)、それぞれのヘムに特有な吸光スペクトルを示す。チトクロームBは554~564 nm に  $\alpha$  吸収帯が位置しているが、そのピリジンフェロヘモクロムは557 nm に  $\alpha$  吸収帯が位置し他のヘムと区別することができる。図7は本研究に用いたミクロソームでのピリジンフェロヘモクロムの生成前後の吸光スペクトルを示すが、このヘムはチトクロームBに属していることが明らかである。すなわち、本研究におけるヘムの減少は  $b_5$  が変化していないことを考慮するとP-450の分解を反映していると考えられる。

還元的状態におけるP-450の分解の原因を考えると、ハロタンラディカルによる分解も考慮にいれなければならない。ラディカル反応の指標としてしばしばTBARsが測定されるが、de Grootらによると<sup>33)</sup>、ハロタンによるTBARsは酸素分圧が低いほど増大し、酸素のない状態ではむしろ脂質の過酸化はおこさないと報告している。本研究において測定した、ラディカルにより生成されるTBARsは、酸素の有無、ハロタンの有無にかかわらず、変化が認められなかった。ハロタンラディカルが生成された可能

性は否定できないが、P-450の分解に関連するような著しい量のラディカルが生成されたとは考え難い。すなわち、本研究におけるP-450の減少の機序にラディカルは関与しておらず、別の機序が生じているものと考えられる。

Uehlekeら<sup>31)</sup>は、うさぎの肝ミクロソームで還元状態においてハロタンを投与して473 nm にピークを有する波形をみている。また、<sup>14</sup>Cハロタンを投与して、経時的にハロタンまたはハロタンの代謝産物のミクロソーム蛋白への結合が増加したと報告しており、これはハロタンまたはハロタンの代謝産物がミクロソーム蛋白に結合したもので、ハロタンによる肝障害と関わりがあるかもしれないと指摘している。本研究においても、図5のようにハロタン濃度が高くなるに従い450 nm の吸光度が低下し、470 nm 付近の吸光度が上昇したが、これはハロタンあるいはハロタンの代謝産物がP-450と結合した状態を反映していると考えられる。

本研究の非 NADPH 群においては基質のハロタンが存在しても一電子も供給されないからP-450は分解されていないと考え、P-450の分解の条件とは、極低濃度酸素状態、電子供与体であるNADPH、およびハロタンであると考えられる。電子伝達系において伝達の役割を

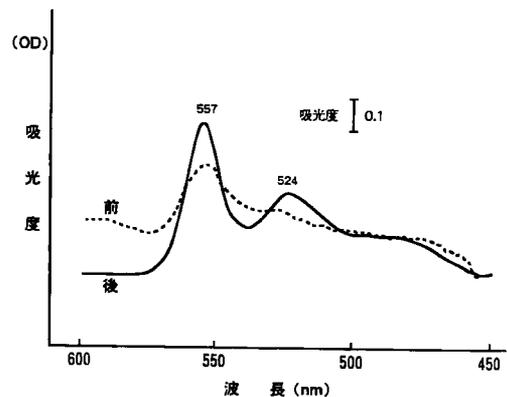


図7 ヘムの吸光度

前：ミクロソームに少量の  $Na_2 S_2 O_4$  を加えて還元した時の吸光度の波形。後：ミクロソームに  $NaOH$  とピリジンを加え、少量の  $Na_2 S_2 O_4$  で還元してピリジンフェロヘモクロムを生成した時の吸光度の波形。

になう  $b_5$  と  $fp_2$  は影響を受けていないから、P-450への一電子供給は円滑に行われたと考えられる。したがって、P-450にハロタンが結合し一電子が供給されたことと、その後の酸化が進展しないということが問題である。

In vivo<sup>20)</sup>と同様 in vitro においても還元状態にハロタンを投与してP-450の減少をみている報告があるが<sup>17)</sup>、これは140 $\mu$ Mという大量のNADPHによる還元状態でのハロタン投与で、化学的還元状態における研究であり、NADPHによる影響は無視しがたいように思われる。本研究では溶存酸素の物理的な除去による還元状態でのハロタンの投与で、P-450の減少を初めて観察したものであり、PBにより誘導されるP-450は極低酸素状態においてハロタンにより分解をうけることがわかった。それは、酵素活性の低下およびヘムの減少により支持される確かな現象であった。ハロタン投与中にP-450が分解される程の低酸素状態に陥ると肝障害を引き起こす可能性が高くなると思われる。正常時においても数 mmHg 程度の酸素分圧しかないミクロソーム付近は、臨床上でも低酸素、低血圧、あるいは肝の圧排などによって容易に局所還流は障害されて、消費酸素が変化しないことと相俟って、極低酸素状態は比較的生きやすいものと思われる。その時、ハロタンはP-450を分解し、自らは還元的代謝をうけて肝細胞を障害する可能性を有しているものと考えられる。

## 結 論

ラットを用いて、フェノバルビタール(PB)投与後に絶食を行い、肝のミクロソームを採取し、in vitro において凍結吸引法により極低酸素状態を得て、2%または10%のハロタンを投与し、37℃で5分または20分間インキュベイトした後、ミクロソーム酸素量、酵素活性を測定し、その変化から、ハロタンが肝ミクロソームに与える影響より肝障害発生機序について検討

した。

1. チトクロームP-450量は、PB誘導のミクロソームにおいて極低酸素状態でハロタンを投与すると減少した。その程度は、2%ハロタン投与より10%ハロタン投与の方が著しく、インキュベイトの時間が長いほど著しかった。非誘導のミクロソームにおいては、10%ハロタン投与時のみ減少した。

2. ヘム量は、PB誘導のミクロソームにおいて極低酸素状態で10%ハロタンを投与すると減少した。2%ハロタン投与でもインキュベイトの時間が長いと減少した。また、非誘導のミクロソームにおいても、10%ハロタン投与時に減少した。

3. アミノピリンN-脱メチル化活性(AD)は、PB誘導、非誘導いずれのミクロソームにおいても、極低酸素状態でハロタンを投与すると低下を示した。その程度は、2%ハロタン投与より10%ハロタン投与の方が著しかった。

4. アニリン水酸化活性(AH)は、PB誘導のミクロソームにおいて極低酸素状態でハロタンを投与すると低下を示した。非誘導のミクロソームにおいても、インキュベイトの時間が長いと、低下を示した。

5. チトクローム  $b_5$  量、TBARs、および  $fp_2$  活性はいずれも変化しなかった。

6. 極低酸素状態でのハロタン投与がP-450を減少させ、ミクロソームの酵素活性を低下させることから、ハロタンの還元的代謝がハロタン肝炎の発生機序と密接に関係していると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師、岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室平川方久教授に謹んで感謝の意を表します。また終始御指導、御助言、御協力を載いた同教室山田輝夫先生ならびに教室員各位の皆様には深甚な謝意を表します。

## 文 献

- 1) Suckling CW: Some chemical and physical factors in the development of fluothane. Br J Anaesth (1957) 29, 466-472.

- 2) Virtue RW and Payne KW : Postoperative death after fluothane. *Anesthesiology* (1958) **19**, 562—563.
- 3) Brody GL and Sweet RB : Halothane anesthesia as a possible cause of massive hepatic necrosis. *Anesthesiology* (1963) **24**, 29—37.
- 4) Subcommittee on the National Halothane Study of the Committee on Anesthesia, National Academy of Sciences-National Research Council : Summary of the National Halothane Study. Possible association between halothane anesthesia and postoperative hepatic necrosis. *J Am Med Assoc* (1966) **197**, 775—788.
- 5) Van Dyke RA, Chenoweth MB and Van Poznak A : Metabolism of volatile anesthetics I. Conversion in vivo of several anesthetics to  $^{14}\text{CO}_2$  and chloride. *Biochem Pharmacol* (1964) **13**, 1239—1247.
- 6) Stier A, Alter H, Hessler O and Rehder K : Urinary excretion of bromide in halothane anesthesia. *Anesth Analg* (1964) **43**, 723—728.
- 7) Rehder K, Forbes J, Med C, Alter H, Hessler O and Stier A : Halothane biotransformation in man : A quantitative study. *Anesthesiology* (1967) **28**, 711—715.
- 8) Mukai S, Morio M, Fujii K and Hanaki C : Volatile metabolites of halothane in the rabbit. *Anesthesiology* (1967) **47**, 248—251.
- 9) Sharp JH, Trudell JR and Cohen EN : Volatile metabolites and decomposition products of halothane in man. *Anesthesiology* (1979) **50**, 2—8.
- 10) Sipes IG and Brown BR : An animal model of hepatotoxicity associated with halothane anesthesia. *Anesthesiology* (1976) **45**, 622—628.
- 11) Ross WT, Daggy BP and Cardell RR : Hepatic necrosis caused by halothane and hypoxia in phenobarbital-treated rats. *Anesthesiology* (1976) **51**, 327—333.
- 12) McLain GE, Sipes IG and Brown BR : An animal model of halothane hepatotoxicity. Roles of enzyme induction and hypoxia. *Anesthesiology* (1979) **51**, 321—326.
- 13) Jee RC, Sipes IG, Gandolfi AJ and Brown BR : Factors influencing halothane hepatotoxicity in the rat hypoxic model. *Toxicol Appl Pharmacol* (1980) **52**, 267—277.
- 14) Lind RC, Gandolfi AJ, Brown BR and Hall PM : Halothane hepatotoxicity in guinea pigs. *Anesth Analg* (1987) **66**, 222—228.
- 15) Fujii K, Morio M and Kikuchi H : A possible role of cytochrome P-450 in anaerobic dehalogenation of halothane. *Biochem Biophys Res Commun* (1981) **101**, 1158—1163.
- 16) Trudell JR, Bøsterling B and Trevor A : 1-chloro-2, 2, 2-trifluoroethyl radical : Formation from halothane by human cytochrome P-450 in reconstituted vesicles and binding to phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* (1981) **102**, 327—377.
- 17) de Groot H, Harnisch and Noll T : Suicidal inactivation of microsomal cytochrome P-450 by halothane under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* (1982) **107**, 885—891.
- 18) Van Dyke RA, Baker MT, Jansson I and Schenkman J : Reductive metabolism of halothane by purified cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* (1988) **37**, 2357—2361.
- 19) Baker MT, Vasquez MT and Chiang CK : Evidence for the stability and cytochrome P-450 specificity of the phenobarbital-induced reductive halothane-cytochrome P-450 complex formed in rat hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol* (1991) **41**, 1691—1699.
- 20) 平山 徹 : ハロセンの肝障害発生機序に関する実験的研究 1. ハロセンの代謝と肝障害 2. 肝ミクロゾーム酵素の変動. *岡山医誌* (1991) **103**, 517—546.
- 21) 岩永貞昭 : ピウレット法・タンパク質の化学II : 生化学実験講前1, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京

- (1976) pp 48—49.
- 22) Omura T and Sato R : The carbonyl monooxygenase of liver microsomes I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* (1964) **239**, 2370—2378.
  - 23) Appleby CA and Morton RK : Lactic dehydrogenase and cytochrome  $b_2$  of baker's yeast. *Biochem J* (1959) **73**, 539—550.
  - 24) Nash T : Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J* (1953) **55**, 416—421.
  - 25) Imai Y, Ito A and Sato R : Evidence for biologically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J Biochem* (1966) **60**, 417—428.
  - 26) Phillips AH and Langdon RG : Hepatic triphospho-pyridinenucleotide cytochrome c reductase. Isolation, characterization and kinetic studies. *J Biol Chem* (1962) **237**, 2652—2660.
  - 27) Ray DC and Drummond GB : Halothane hepatitis. *Br J Anaesth* (1991) **67**, 84—99.
  - 28) Plummer JL, Beckwith ALJ, Bastin FN, Adam JF, Cousins MJ and Jall P : Free radical formation in vivo and hepatotoxicity due to anesthesia with halothane. *Anesthesiology* (1982) **57**, 160—166.
  - 29) Cohen EN : Metabolism of halothane- $2-^{14}C$  in the mouse. *Anesthesiology* (1969) **31**, 560—565.
  - 30) Brown BR and Sipes IG : Biotransformation and hepatotoxicity of halothane. *Biochem Pharmacol* (1977) **26**, 2091—2094.
  - 31) Uehleke H, Hellmer KH and Tabarelli-Poplowski S : Metabolic activation of halothane and its covalent binding to liver endoplasmic proteins in vitro. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* (1973) **279**, 39—52.
  - 32) 山中健生 : ヘムタンパク質・エネルギー代謝と生体酸化下 ; 生化学実験講座12, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京 (1976) pp 545—550.
  - 33) de Groot H and Noll T : Halothane hepatotoxicity : Relation between metabolic activation, hypoxia, covalent binding, lipid peroxidation and liver cell damage. *Hepatology* (1983) **3**, 601—606.

**In vitro effects of halothane exposure on hepatic  
microsomal cytochrome P-450 in rats**

**Yukio IDO**

**Department of Anesthesiology and Resuscitology,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. M. Hirakawa)**

Hepatic microsomes were collected from male rats in which hepatic microsomes enzymes were induced by phenobarbital(PB) and untreated rats. Microsomes were deoxygenated by vacuum-freezing and exposed to 2% or 10% halothane and then incubated in a 37°C bath for 5 or 20 minutes. Microsomal enzyme contents and enzyme activities were measured. The contents of cytochrome P-450 were decreased in PB-induced microsomes (PB-microsomes) and the decrease was greater with 10% halothane or 20-minute incubation than with 2% halothane or 5-minute incubation. The contents of cytochrome P-450 in non-PB-microsomes were also decreased by 10% halothane. Heme contents were decreased in PB-microsomes by 10% halothane, and in non-PB-microsomes by 20-minute incubation with 2% halothane. The activities of aminopyrine demethylation were decreased both in PB and non-PB-microsomes and the decrease was greater with 10% halothane. The activities of aniline hydroxylation were decreased in PB and non-PB-microsomes, and after 20-minute incubation. The contents of cytochrome b<sub>5</sub>, the tetrabutyllic acid reacting substances and the activities of cytochrome P-450 reductase were not changed.

The decreases of microsomal cytochrome P-450 and microsomal enzyme activities by halothane exposure in deoxygenated states might be related to hepatic injury following halothane anesthesia.