抗腫瘍性多糖体, シゾフィラン (SPG) の体内動態に関する研究 (第2報)

SPG のラット肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響

丹治昭治,^{*,a} 秋間和雄,^a 吉岡 実,^a 野村数夫,^a
堀場督敏,^a 相本太刀夫^b

科研製薬株式会社中央研究所,^a 摂南大学薬学部^b

Studies on Metabolism and Disposition of Sizofiran (SPG), an Anti-tumor Polysaccharide. II. Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzyme System in Rats

Shohji TANJI,^{*,a} Kazuo AKIMA,^a Minoru YOSHIOKA,^a Kazuo NOMURA,^a
Masahiro HORIBA,^a and Tachio AIMOTO^b

Central Research Laboratory, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.,^a 28-8,
Honkomagome 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113,
Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Setsunan University,^b 45-1, Nagaotoge-cho,
Hirakata, Osaka, 573-01, Japan

(Received August 24, 1989)

The effect of a single or multiple administration of sizofiran (SPG), an anti-tumor polysaccharide, on a hepatic drug-metabolizing enzyme system was studied in rats. When SPG was given intravenously at a single dose of 0.5 or 10 mg/kg, no alteration was observed in activities of aminopyrine (AP) *N*-demethylase and aniline hydroxylase, and in cytochrome P-450 (P-450) content in the livers of rats 48 h after dosing. However, only AP demethylase activity decreased by 34% after the administration of 200 mg/kg. Similarly, no change in the hepatic enzyme activities and P-450 content was observed for up to 180 d after a single dose of 10 mg/kg.

Subcutaneous treatment of animals with either 10 or 40 mg/kg dose for 3 and 6 months resulted in no alteration in the enzyme activities and P-450 content.

These results may indicate that the therapeutically effective dose of SPG has no effect on a hepatic drug-metabolizing enzyme system in rats.

Keywords—sizofiran (SPG); immunopotentiating agent; aminopyrine *N*-demethylase; aniline hydroxylase; cytochrome P-450 content; rat liver

緒 言

シゾフィラン (SPG) は、宿主の免疫能を賦活することにより抗腫瘍作用を発現する多糖体である。¹⁾ 体内動態の研究において SPG は、細網内皮系細胞に富んだ組織である肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節などに選択的に、かつ高濃度に分布し、また、これらの組織に極めて長期間にわたって滞留することが報告されている。^{2,3)}

これまでに、zymozan,^{4,5)} *Corynebacterium parvum* 死菌,⁶⁾ OK-432 (*Streptococcus haemolyticus* Su 株製剤),^{7,8)} BCG 菌細胞壁成分,⁷⁾ PSK (*Coriolus versicolor* 由来の glycoprotein),^{5,7)} *Mycobacterium butyricum* 死菌,⁵⁾ levamisole,⁵⁾ lipopolysaccharide (*E. coli* 由来),⁸⁾ lentinan (*Lentinus edodes* 由来の polysaccharide)⁹⁾ などの免疫賦活剤は、マウスの肝薬物代謝酵素活性を低下あるいは構成成分量を減少させることが報告されている。

本研究では、SPG が肝薬物代謝酵素活性やチトクロム P-450 (P-450) 量へ影響を与えるかどうかを知る目的で、SPG をラットに単回又は長期間連続投与し、その影響を検討した。

実 験 の 部

1. 実験材料 SPG は台糖(株)研究所より提供を受けた。Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

(oxidized form), glucose 6-phosphate 及びウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma Chemical 社製のものを使用した。その他の試薬は市販特級規格品を用いた。

2. 実験動物及び薬物投与 Wistar 系雄性ラットは日本クレア社から購入し、固型飼料 (CE-2, 日本クレア社) 及び水道水を自由に摂取させて飼育した。実験には 5—6 週令, 体重約 150—240 g のものを使用した。

SPG は生理食塩水溶液とし, 単回投与実験では 0.5, 10 又は 200 mg/kg を尾静脈内に, また, 長期間連続投与実験では, 反復静脈内投与が困難であるために静脈内投与と同様に SPG の抗腫瘍作用が現れる皮下投与法を用い, 10 又は 40 mg/kg を隔日 1 回 3 又は 6 カ月間鼠頸部皮下に投与した。対照動物には生理食塩水を投与した。

3. 肝薬物代謝酵素活性及び P-450 量の測定 ラットは一夜絶食させた後, 薬物代謝酵素活性の日周リズムを考慮し, 10—11 a.m. の間に屠殺した。速やかに開腹し, 肝門脈より冷生理食塩水を灌流して血液を除いた。以下の操作はすべて氷冷下で行った。細切した肝臓を秤量し, 3 倍容の 0.25 M ショ糖水溶液を加えて, テフロンホモジナイザーを用いて 25 w/v% ホモジネートを調製した。得られたホモジネートを 10500×g, 15 分間遠心分離し, 10500×g 上清を得た。更にマイクロゾーム画分は 10500×g 上清より Cinti らのカルシウム沈澱法¹⁰⁾を用いて調製した。10500×g 上清のアミノピリン (AP) *N*-脱メチル化酵素活性は Nash の方法,¹¹⁾ また, アニリン (AN) 水酸化酵素活性は Kato らの方法¹²⁾により測定した。マイクロゾームの P-450 量は Omura らの方法¹³⁾を用いて測定した。10500×g 上清及びマイクロゾームのタンパク量は, BSA を標準タンパクとして Lowry らの方法¹⁴⁾に従って測定した。

結果及び考察

SPG の 0.5, 10 又は 200 mg/kg を静脈内に単回投与し, 48 時間後のラット肝について測定した結果を Table I に示した。SPG は, 実験動物において強い抗腫瘍作用を示す用量^{1,15)}の 0.5 又は 10 mg/kg 投与で, 肝ホモジネートの 10500×g 上清画分の AP *N*-脱メチル化酵素及び AN 水酸化酵素活性やマイクロゾームの P-450 量には影響を与えなかった。これは, SPG と同じく多糖体である lentinan が, 低用量 (1 mg/kg×4 回) で, 両代謝酵素活性及び P-450 量を減少させるという報告⁹⁾と異なる結果であった。一方, ヒトでの臨床投与量¹⁾の数百倍に相当する 200 mg/kg の高用量投与では, AP 代謝酵素活性が有意な影響を受け, 約 35% 減少した。なお, SPG 10 mg/kg 投与後初期 (12 及び 24 時間後) においても酵素活性や P-450 量に変動は認められなかった (データ省略)。

SPG のマウス²⁾やラット³⁾における体内分布実験において SPG は, 細網内皮系細胞に富んだ組織である肝臓, 脾臓及びリンパ節等に選択的に, かつ高濃度に分布し, また, 長期間滞留していたことから, SPG 単回投与後の肝薬物代謝酵素系への影響について長期間にわたって検討した。SPG 10 mg/kg を静脈内投与したのち, 180 日まで所定の日時毎に動物を屠殺し, 酵素活性や P-450 量を測定した結果を Fig. 1 に示した。酵素活性や P-450 量は若干の増減を示しながら推移したが, いずれの増減も有意な変動ではなかった。

次に, SPG の 10 又は 40 mg/kg を 3 及び 6 カ月間隔日に反復皮下投与し, 体重, 肝重量及び肝薬物代謝酵素系への影響について調べた (Table II)。10 及び 40 mg/kg のいずれの投与群においても, 3 カ月間投与では, 体重, 肝重量, 両酵素活性, 及び P-450 量のいずれにも影響は認められなかった。一方, 6 カ月間投与において

TABLE I. Effects of a Single Intravenous Administration of SPG on Hepatic Drug-Metabolizing Enzyme Activities and Cytochrome P-450 Content in Rats

Dose (mg/kg)	Aminopyrine <i>N</i> -demethylase		Aniline hydroxylase		Cytochrome P-450	
	Activity ^{a)}	Change (%)	Activity ^{b)}	Change (%)	Content ^{c)}	Change (%)
Control	3.82±0.04	—	0.97±0.25	—	0.93±0.20	—
0.5	3.65±0.58	— 4.4	0.93±0.17	— 4.1	1.03±0.14	+10.8
10	3.79±0.81	— 0.8	1.08±0.33	+11.3	0.99±0.06	+ 6.5
200	2.50±0.17 ^{d)}	—34.6	0.88±0.14	— 9.3	0.82±0.05	—11.8

Rats fasted overnight prior to be killed were killed 48 h after administration of SPG and their livers were removed. Enzyme activities in 10500×g supernatant fraction and cytochrome P-450 content in microsomal fraction from the liver homogenates were determined. Each value represents the mean±S.D. for 3 animals.

a) nmol HCHO formed/mg protein/min. b) nmol *p*-aminophenol formed/mg protein/min. c) nmol/mg protein. d) *p*<0.05.

も肝重量のわずかな増加が認められたこと以外、有意な変化は見られなかった。

SPG は、抗腫瘍作用を発現する常用量 (0.5—10 mg/kg) の単回投与や 10 又は 40 mg/kg の長期間反復投与では、肝薬物酵素系には影響を与えなかった。これは、SPG がラットでは薬物代謝酵素系に対する作用をほとんど有しないことによるものか、あるいは SPG が、肝臓では Kupffer 細胞などの細網内皮系細胞に選択的に取込まれ、実質細胞に分布しないこと²⁾ や肝臓の細胞の数パーセントを占める Kupffer 細胞中にも薬物代謝酵素が存在し、その活性は実質細胞の活性よりかなり低いこと¹⁶⁾ などから、SPG が Kupffer 細胞の薬物代謝酵素を阻害するとしても、本研究に用いた実験方法では確認できなかったことによるものと考えられる。

一方、最近 SPG が腹腔内投与でラット肝 P-450 量及び P-450 による代謝活性を低下させ、3-メチルコラントレンによるチトクロム P-448L の誘導を特異的に抑制することが報告されている。¹⁷⁾ この結果は本研究結果と異なっているが、投与量、投与経路、投与回数などの違いがあるものの、その相違の理由は不明である。

マウスにおいて、免疫賦活剤の薬物代謝酵素阻害による併用薬の薬効や毒性の変動が報告されているが、^{8,7,9,18,19)} ラットにおいて、SPG は薬物代謝阻害を示さなかったことから、他の薬物が併用されても、併用薬物の薬効や毒性に影響を与えないものと考えられる。しかし、この点に関しては更に検討する必要がある、また、SPG のマウスの薬物代謝酵素

Fig. 1. Time Course of Aminopyrine *N*-Demethylase and Aniline Hydroxylase Activities in 10500 $\times$ *g* Supernatant Fraction and Cytochrome P-450 Content in Microsomal Fraction from Livers of Rats after a Single Intravenous Administration of SPG

Rats were given a single intravenous dose of 10 mg/kg of SPG. Control animals received an equivalent volume of a vehicle. Each point represents the mean of 4 animals.

a) Control values ranged from 2.16 ± 0.15 (mean $\pm$ S.D.) to 3.82 ± 0.04 nmol HCHO formed/mg protein/min. b) Control values ranged from 0.59 ± 0.06 to 0.97 ± 0.25 nmol *p*-aminophenol formed/mg protein/min. c) Control values ranged from 0.84 ± 0.14 to 0.99 ± 0.09 nmol/mg protein.

TABLE II. Effects of Subcutaneously Treatment of Rats with SPG on Their Body and Liver Weights, Hepatic Drug-Metabolizing Enzyme Activities and Cytochrome P-450 Content

Period (months)	Dose (mg/kg)	Body wt (g)	Liver wt (g)	Aminopyrine <i>N</i> -demethylase		Aniline hydroxylase		Cytochrome P-450	
				Activity ^{a)}	Change (%)	Activity ^{b)}	Change (%)	Content ^{c)}	Change (%)
3	Control	433 $\pm$ 49	3.35 $\pm$ 0.24	2.99 $\pm$ 0.24	—	0.56 $\pm$ 0.12	—	0.97 $\pm$ 0.04	—
	10	434 $\pm$ 47	3.33 $\pm$ 0.17	2.49 $\pm$ 0.21	—16.7	0.42 $\pm$ 0.06	—25.0	0.89 $\pm$ 0.07	—8.2
	40	434 $\pm$ 17	3.26 $\pm$ 0.14	2.83 $\pm$ 0.54	—5.4	0.48 $\pm$ 0.15	—14.3	0.87 $\pm$ 0.09	—10.3
6	Control	558 $\pm$ 52	2.92 $\pm$ 0.15	3.79 $\pm$ 0.40	—	0.76 $\pm$ 0.12	—	1.12 $\pm$ 0.07	—
	10	558 $\pm$ 34	3.34 $\pm$ 0.21 ^{d)}	3.61 $\pm$ 0.73	—4.7	0.64 $\pm$ 0.07	—15.8	1.14 $\pm$ 0.10	+1.8
	40	515 $\pm$ 37	3.49 $\pm$ 0.31 ^{d)}	3.82 $\pm$ 0.53	+0.8	0.73 $\pm$ 0.10	—3.9	1.05 $\pm$ 0.10	—6.2

Rats were given subcutaneously a 10 or 40 mg/kg dose of SPG once a day every other day for up to 3 or 6 months. Control animals received an equivalent volume of a vehicle. They were killed 24 h after the last administration and their livers were removed. Then, enzyme activities in 10500 $\times$ *g* supernatant fraction and cytochrome P-450 content in microsomal fraction from the liver homogenates were assayed. Each value represents the mean $\pm$ S.D. for 3 to 4 animals.

a) nmol HCHO formed/mg protein/min. b) nmol *p*-aminophenol formed/mg protein/min. c) nmol/mg protein. d) $p < 0.05$.

系に及ぼす影響も今後検討する必要があると思われる。

引 用 文 献

- 1) 小島 進, 門脇豊一, *ファルマシア*, **23**, 169 (1987).
- 2) V. Mizuhira, M. Ono, J. Yokofujita, M. Kinoshita, T. Asano, T. Hase, K. Amemiya, *Acta Histochem. Cytochem.*, **18**, 221 (1985).
- 3) 堀場督敏, 秋間和雄, 羽瀬豊治, 有可 正, 雨宮功治, 宗近一雄, 田畑 吾, 相本太刀夫, *薬誌*, **108**, 763 (1988).
- 4) H. Hojo, Y. Suzuki, Y. Konishi, M. Uchiyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 10 (1976).
- 5) 佐々木健一, 斉藤正明, 高柳義一, *応用薬理*, **22**, 827 (1981).
- 6) L. F. Soyka, W. G. Hunt, S. E. Knight, R. S. Foster, Jr., *Cancer Res.*, **36**, 4425 (1976).
- 7) H. Hojo, Y. Hashimoto, *Toxicol. Lett.*, **1**, 89 (1977).
- 8) 佐々木健一, 斉藤正明, 高柳義一, *薬誌*, **101**, 932 (1981).
- 9) K. Sasaki, M. Sasaki, M. Ishikawa, G. Takayanagi, *Jpn. J. Pharmacol.*, **37**, 107 (1985).
- 10) D. L. Cinti, P. Moldeus, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 3249 (1972).
- 11) T. Nash, *Biochem. J.*, **55**, 416 (1953).
- 12) R. Kato, J. R. Gillette, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **150**, 279 (1965).
- 13) T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
- 14) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, F. A. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 15) 百木克夫, 有可 正, 斉藤伍作, *臨床と研究*, **55**, 3736 (1978).
- 16) T. C. Peterson, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3911 (1987).
- 17) 柴 義博, 小祝紀美子, 蓬田 伸, 石川正明, 佐々木健一, 高柳義男, 日本薬学会第 109 年会, 名古屋. 1989 年 4 月, 講演要旨集 IV, p. 131.
- 18) T. Higuchi, T. Nakamura, H. Uchino, *Experientia*, **33**, 940 (1977).
- 19) T. Higuchi, T. Nakamura, H. Uchino, *Cancer Res.*, **37**, 3668 (1977).