「薬 学 雑 誌」
YAKUGAKU ZASSHI
85 (7) 602 ~ 605 (1965)

UDC 615.711.5-092.21

94. 内田精一, 木下良裕, 草刈一郎, 布施昌孝: 強心配糖体の代謝と分布に関する
研究 (第3報^{*1}) Digitoxin およびその代謝産物の
血清蛋白との結合能について

Seiichi Uchida, Yoshihiro Kinoshita, Ichiro Kusakari, and Masataka Fuse :
Studies on the Metabolism and Distribution of Cardiac Glycosides.
III. Protein Binding of Digitoxin and Its Metabolites.

(Department of Pharmacology, Sapporo Medical College^{*2})

The extent of binding of digitoxin and its metabolites to bovine albumin or rat serum was determined by the method of equilibrium dialysis or ultrafiltration. The results were as follows :

1) It was found that the binding effect of bovine albumin or rat serum was most marked with digitoxigenin monodigitoxoside, less with digitoxin and digitoxigenin didigitoxoside, and least with digoxin.

2) With increasing concentration of digitoxin, digitoxigenin didigitoxoside or didigitoxigenin monodigitoxoside the binding proportion decreased.

3) In a phosphate buffer of pH 6.4~9.2, there was no obvious effect of pH on the drug-protein binding.

(Received January 21, 1965)

強心配糖体と血清蛋白との結合に関しては、すでに数多くの報告がみられる。それらによると、一般に作用持続時間の長い強心配糖体は、血清蛋白と結合しやすい傾向にあることを示す成績が得られている。¹⁻³⁾

一方, digitoxin の代謝経路には2つの過程があり, C-3 に結合している3分子の糖 (digitoxose) の段階的な分離による digitoxigenin didigitoxoside (以下 Dt-bis と略), digitoxigenin monodigitoxoside (以下 Dt-21 と略) および, 12 β 位の水酸化により生じた digoxin などがその代謝産物として知られている。^{4,5)} これらの代謝産物は未変化の digitoxin に比して, 同程度あるいはより強い心臓作用を有しているが,^{6,7)} 作用持続時間は digitoxin よりはるかに短く,^{7,8)} すみやかに尿あるいは便中に排泄されるという。^{4,5,9-11)} したがって, digitoxin が個有の蓄積作用をあらわすためには, digitoxigenin とそれに結合している3分子の digitoxose の存在が重要な意義を有するものと考えられている。しかし, digitoxin の血清蛋白との結合能^{*3} と, Dt-bis あるいは Dt-21 のそれらとの間に相異があるかどうかについての直接的な証明は, 現在まで得られていないようである。

また, digitoxin の蛋白結合におよぼす pH の影響については 2,3 の報告があるが, その結果は必ずしも一定していない。¹²⁻¹⁴⁾

*1 第2報: 本誌, 84, 605 (1964).

*2 Minami-1-Nishi-17, Sapporo.

- 1) E. Suter: *Helv. Physiol. Acta*, **2**, 211 (1944).
- 2) E. Rothlin, A. Kallenberger: *Arch. int. Pharmacodyn.*, **81**, 520 (1950).
- 3) L. Lendle, *et al.*: *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.*, **177**, 550 (1935).
- 4) K. Repke: *Ibid.*, **237**, 34 (1959).
- 5) K. Repke: *Ibid.*, **237**, 155 (1959).
- 6) G. Kroneberg, *et al.*: *Ibid.*, **237**, 222 (1959).
- 7) G. Kroneberg, *et al.*: *Ibid.*, **243**, 91 (1962).
- 8) W. Schaumann, K. Stoepel: *Ibid.*, **245**, 518 (1963).
- 9) K. Repke: *Ibid.*, **236**, 242 (1959).
- 10) S.E. Wright: "The Metabolism of Cardiac Glycosides," p. 61 (1960), Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U. S. A.
- 11) J.E. Doherty: *Am. Heart J.*, **63**, 528 (1962).
- 12) R.A. Hoekstra: *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.*, **162**, 649 (1931).
- 13) G. Fawaz, A. Farah: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **80**, 193 (1944).
- 14) J.L. Spratt, G.T. Okita: *Ibid.*, **124**, 109 (1958).

そこでわれわれは、透析平衡法および限外濾過法によって、これら代謝産物とシロネズミ血清あるいは bovine albumin との結合能を測定し、digitoxin のそれと比較検討した。また、pH 6.4~9.2 の phosphate buffer 中におけるこれら配糖体と bovine albumin との結合比^{*3}を測定し、pH の変動に伴って結合比に変化がみられるかどうかを追求した。

実験の部

試薬 digitoxin (Merck 製), digoxin (中外製薬より提供を受けたもの), Dt-bis および Dt-21 (C.F. Boehringer & Soehne 社より提供を受けたもの) などは 0.1% の割合に EtOH に溶解し、用時 phosphate buffer (M/15) で所定の濃度に希釈した。albumin は NBC 製 Albumin (Bovine Crystalline) を用いた。

透析平衡法 Okita,¹⁴⁾ Farah¹⁵⁾ 等の方法に準じ行なった。すなわち、シロネズミから得た新鮮な血清を pH 7.4 の phosphate buffer で 6 倍に希釈し、これに $5 \times 10^{-5} M$ となるよう強心配糖体を加え検液とした。Visking Company 製 Cellulose Tube の一端を糸でかたく縛って囊状とし、検液 4 ml. を入れ上端を縛り、pH 7.4 の phosphate buffer 8 ml. を入れた試験管内につし、4⁰ の氷室中に平衡に達するまで放置した。別に、血清を含まない検液を同様に処置し、囊内の配糖体濃度が外液のそれと等しくなった時をもって平衡に達したとした。この条件下において上記の配糖体が平衡に達するまでに 11~12 日を要した。平衡に達したのち、血清添加例について、囊内に残存する配糖体の濃度および外液中の配糖体濃度を前報¹⁶⁾と同様 Repke の方法¹⁷⁾により比色定量し、内外両層の濃度差と、内層の濃度との比から、血清蛋白との結合率^{*3}を百分率で算出した。なお、内外両層の CHCl₃ 抽出液中に検出された配糖体の総量は、最初に添加した量と一致したので、たとえ透析期間中に配糖体の分解がおこっていたとしても、本定量法によっては検出できない程度の微量であると考えた。

限外濾過法 掛見等の方法¹⁸⁾に準じ行なった。すなわち、pH 7.4 の phosphate buffer で 6 倍に希釈したシロネズミの血清あるいは、pH 6.4~9.2 の phosphate buffer に 0.5% の割合に albumin を添加した溶液^{*4}に、配糖体を加え検液とした。この場合の配糖体濃度は $2.5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-4} M$ (最終濃度) とした。上述の Cellulose 囊に検液 4 ml. を入れ、ガーゼで包んで補強してから、目盛り付きの遠沈管に入れ、約 4000 r.p.m. で遠心濾過を行ない、濾液が約 1.2 ml. になるまで濾過を行なった。濾液中の配糖体濃度を測定し、別に蛋白を含まない検液から同様にして得た濾液中の濃度を測定し、両者の濃度比を結合していない配糖体の百分率とし、100 からこの値を差引き結合比とした。

実験結果ならびに考察

透析平衡法による成績 透析平衡法による digitoxin およびその代謝産物のシロネズミ血清との結合率を Fig. 1 に示した。digoxin の結合率は 7.5% となり、digitoxin の結合率 52.1% に比しはるかに低い値となった。しかし、Dt-bis および Dt-21 の結合率はそれぞれ 54.6, 80.7% と高い値を示し、ことに Dt-21 では digitoxin に比し、明らかに高い結合率を示した。

限外濾過法による成績 各配糖体とシロネズミ血清との結合比を Fig. 2 に示した。Fig. 1 に示した実験と同一の配糖体濃度である $5 \times 10^{-5} M$ で比較すると、透析平衡法、限外濾過法と 2 つの異なった方法によって得た値はほぼ一致した。しかし、Dt-21 と digitoxin との結合比の相違は、Fig. 1 における結合率の差ほど著明でなかった。また、digitoxin, Dt-bis および Dt-21 では、その濃度を高くすると、結合比は低下した。しか

Fig. 1. Binding of Digitoxin and its Metabolites with Serum of Rat

Binding ratio was determined by equilibrium dialysis method. Serum was diluted with five volumes of phosphate buffer (pH 7.4, M/15). Glycosides were used at a concentration of $5 \times 10^{-5} M$. Each bar represents the mean of 6 to 8 experiments and bracketed line represents the standard error of the means. Dt-bis indicates digitoxigenin didigitoxoside and Dt-21 indicates digitoxigenin monodigitoxoside.

^{*3} 透析平衡法と限外濾過法によって得た成績の混同を防ぐため、便宜上透析平衡法によった値を結合率、限外濾過法によった値を結合比として示した。結合能とは一般的な意味での結合の度合いを示した。

^{*4} 正常血清中の albumin 濃度は 3% 前後であるから、6 倍に希釈した血清と 0.5% albumin 溶液とは albumin に関しほぼ等濃度である。

15) A. Farah: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 83, 143 (1945).

16) 第1報 内田: 本誌, 84, 602 (1964).

17) K. Repke: Arch. exptl. Pathol. Pharmacol., 233, 261 (1958).

18) 掛見, 他: 本誌, 82, 536 (1962).

Fig. 2. Binding of Digitoxin and its Metabolites with Serum of Rat

Binding ratio was determined by ultrafiltration method. Serum was diluted with five volumes of phosphate buffer (pH 7.4, $M/15$). Glycosides concentration varied as indicated. Each point represents the mean of 5 to 8 experiments. Dt-bis indicates digitoxigenin didigitoxoside and Dt-21 indicates digitoxigenin monodigitoxoside.

Fig. 3. Binding of Digitoxin and its Metabolites with Bovine Albumin

Binding ratio was determined by ultrafiltration method. Albumin concentration was kept at 0.5%. Glycosides concentration varied as indicated. Each point represents the mean of 5 to 6 experiments. Dt-bis indicates digitoxigenin didigitoxoside and Dt-21 indicates digitoxigenin monodigitoxoside.

Fig. 4. Binding of Digitoxin and its Metabolites with Bovine Albumin in $M/15$ Phosphate Buffer of Various pH Values

Binding ratio was determined by ultrafiltration method, using 0.5% albumin and $5 \times 10^{-3} M$ glycosides. Each point represents the mean of 6 to 8 experiments. Dt-bis indicates digitoxigenin didigitoxoside and Dt-21 indicates digitoxigenin monodigitoxoside.

し, digitoxin では添加量の多少に関係なく, 非常に低い結合比を示した。

さらに, albumin と各配糖体との結合比を Fig. 3 に示した。ここに得た成績は, シロネズミ血清との結合比を示した Fig. 2 の成績とほぼ近い値を示した。このことから, 血清とこれら配糖体との結合は, おもに血清中の albumin との結合によるものと考えられる。

つぎに, これらの配糖体と albumin との結合におよぼす pH の影響について検討した。ヒトの血清の pH の正常値は 7.4 であるという。acidosis あるいは alkalosis の場合には多少の変動があるが, 病的な場合においてもその限界 (maximum tolerated pH range) は 7.0~7.8 と考えられている。¹⁹⁾ そこで, 本実験においては, pH 7.4 を中心として, わずかに酸あるいはアルカリ側に傾いた場合についてのみ, 結合比の測定を行なった。その結果, Fig. 4 にみられるようにいずれの配糖体においても, pH 6.4~9.2 の範囲では, その結合比に大差は認められなかった。この成績は平衡透析法によって digitoxin と血清蛋白との結合能を求めた Okita 等の成績¹⁴⁾ と一致した。しかし, 摘出蛙心に digitoxin および血清蛋白を含む溶液を灌流し, 灌流液の pH の変化に伴う毒性の変化から求めた Hoekstra の成績¹²⁾ とは一致し

19) C.H. Best, N.B. Taylor: "The Physiological Basis of Medical Practice," 7th Ed., 131 (1961), The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland, U.S.A.

なかった。

以上, 本実験を通じて, digoxin の血清蛋白との結合能は非常に低く, Dt-bis, Dt-21 のそれらは digitoxin と同程度あるいはそれ以上に高いことが認められた。さきに著者は, 摘出鶏胎心法および透析 (流水に対する) による実験から, digitoxin とヒト血清アルブミンあるいはシロネズミ血清蛋白との結合能は大であるが, digoxin とはほとんど結合しないことを報告した。²⁰⁾ このように digitoxin とその代謝産物の蛋白結合能と作用持続時間との間には平行関係を見いだすことはできなかった。

限外濾過が腎臓の糸球体濾過と近似した方法である²¹⁾ ならば, 限外濾過法によって求めた蛋白結合比の大なる薬物は, 糸球体で濾過されがたいことは当然考えられるところである。今回求めた digitoxin およびその代謝産物の血清蛋白との結合能が, それらの作用持続時間と平行関係を有しなかった理由としては, それら配糖体の作用持続時間が, 糸球体での濾過量の大小によるだけでなく, 他の多くの因子たとえば, 尿細管からの再吸収, あるいは腎臓以外の排泄経路, すなわち胆汁内排泄^{22,23)} 胆汁とともに十二指腸内に排泄された配糖体の腸からの再吸収, または臓器組織との結合性²⁴⁾ などが複雑な形で関与しているためであると考えられる。

本研究にあたり, digitoxigenin didigitoxoside, digitoxigenin monodigitoxoside を提供された C.F. Boehringer & Soehne 社 Dr. Edmund R. Reverchon に感謝いたします。

札幌医科大学薬理学教室

20) 内田: 本誌, 84, 596 (1964).

21) A. Goldstein: Pharmacol. Rev., 1, 102 (1949).

22) E. Cox, S.E. Wright: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 126, 117 (1959).

23) G.T. Okita, et al.: Ibid., 115, 371 (1955).

24) 三山: 日薬理誌, 53, 412 (1957).