薬物代謝の研究 (第2報¹⁾) ペントバルビタール長期連続投与 (1 カ月) による
猫の睡眠時間, 肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性の変動と
ペントバルビタール生体内蓄積について

北川晴雄,²⁾ 吉田祚一,^{2a)} 鎌滝哲也²⁾

千葉大学薬学部^{2a)}

Studies on Drug Metabolism. II.¹⁾ Changes of Sleeping Time, Liver
Microsomal Drug Metabolizing Enzyme Activity and Accumulation
to Various Organs by Long Term Administration
(1 Month) of Pentobarbital in Cats

HARUO KITAGAWA,²⁾ SOICHI YOSHIDA,^{2a)} and TETSUYA KAMATAKI²⁾

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba²⁾

(Received December 22, 1967)

Intraperitoneal injection of 35 mg/kg of pentobarbital was given to cats, and sleeping time was measured, taking the time required from the disappearance of eyelid-closure reflex until its recovery as the index. The animals were divided into six groups given the pretreatment 1, 3, 7, 14, 21, and 28 times, and the control group. Drug metabolizing enzymes in the liver microsomes of the cats in the treated groups were examined by measuring periodically the activities of aminopyrine N-demethylase, aniline hydroxylase, and pentobarbital metabolizing enzyme. At the same time, accumulations of pentobarbital in the plasma, cerebral cortex, cerebral medulla, heart, liver, kidney, fat, and skeletal muscle in the cats were measured to examine their correlation. It was thereby found that the drug-metabolizing enzyme activities increase for about 2 weeks after continuous administration of pentobarbital, then decrease slightly. There were correlation between enzyme activities and sleeping time, and with the amount of pentobarbital accumulated in each organ.

H. Remmer^{3,4)} は種々のバルビツレートをラットに2週間連続投与すると, 肝ミクロゾーム薬物代謝酵素の活性が上昇し, それにともなって睡眠時間および血中生物学的半減期の短縮を認め, さらに長時間型バルビツレートは短時間型バルビツレートよりも強い肝ミクロゾーム薬物代謝酵素誘起作用を有することを報告した。

著者等の一人北川¹⁾ は前報でペントバルビタール高用量投与時における生物学的半減期の延長が, ペントバルビタールの呼吸抑制作用によって引き起こされることを報告したが, 本報においては比較的低用量を猫に長期間連続投与した場合における睡眠時間と薬物代謝酵素活性, さらにペントバルビタールの生体内各臓器への蓄積量の変動の間に相関関係があることを見出したので報告する。

実 験 の 部

睡眠時間の測定 体重 2—3 kg の雄性猫 5 匹を 1 群とし, 7 群用い, 第 1 群より第 7 群まで, それぞれ対照群, 1 回前処置群, 3 回前処置群, 7 回前処置群, 14 回前処置群, 21 回前処置群, 28 回前処置群とした。対照群を除く前処置群の猫にペントバルビタールナトリウムを 35 mg/kg, 1 日 1 回, 同一時刻に連日, 各計画前処置回数日間, 腹腔内注射し, 投与後眼瞼反射の消失より回復までの時間 (min) を睡眠時間として測定した。

肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性の測定 1) 肝ミクロゾーム分画の調製 上記睡眠時間を測定した猫を各

1) 第 1 報: H. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), in press.

2) Location: 1-33 Yayoi-cho, Chiba-shi; a) Present adress: *Institute of Food Microbiology, Okubo, Narashino-shi, Chiba-ken.*

3) H. Remmer, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol.*, **237**, 296 (1959).

4) H. Remmer, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. u. Pharmacol.*, **235**, 279 (1959).

群ごとに計画日数後、すなわち最終投与後 24 hr 後に、股動脈切断によってシャ血して殺し、ただちに肝臓を取り出し、その約 10 g を任意に切り取り、その重量の 4 倍量の 1.15% 塩化カリウム水溶液を加え、氷冷下テフロンホモジナイザーでよくすりつぶし、冷却遠沈機で $9000 \times g$, 20 min 遠心分離し、上澄分画を肝ミクロゾーム分画として使用した。

2) 反応混合液 (Incubation Mixture) の調製 肝ミクロゾーム分画 3 ml をバイアルビンに取り、基質 (ペントバルビタールの場合は $4 \mu\text{mole}/0.2 \text{ ml}$, アミノピリンの場合は $5 \mu\text{mole}/0.2 \text{ ml}$, アニリンの場合は $4 \mu\text{mole}/0.2 \text{ ml}$) を 0.2 ml 加え、さらに Co-factor として塩化マグネシウム $37.5 \mu\text{mole}/0.1 \text{ ml}$ (アミノピリンを基質とする場合は $50 \mu\text{mole}/0.1 \text{ ml}$), ニコチンアミド $75 \mu\text{mole}/0.1 \text{ ml}$ (アミノピリンを基質とする場合は $100 \mu\text{mole}/0.1 \text{ ml}$), グルコース-6-リン酸 $20 \mu\text{mole}/0.1 \text{ ml}$, NADP $0.4 \mu\text{mole}/0.1 \text{ ml}$ をそれぞれ 0.1 ml 加え、さらに pH 7.4 磷酸緩衝液を加えて全量を 5 ml とした。反応は 37° で 30 min (ただしアミノピリンの場合は 45 min) インキュベーションして行なった。

3) 4-アミノアンチピリンの定量 (アミノピリン N-デメチラーゼ活性の測定)⁵⁾ 反応混合液をインキュベート後、10% トリクロル酢酸 5 ml を加え、遠心分離 (3000 rpm) して除タン白し、上澄液を冷時亜硝酸ナトリウムでジアゾ化後、アルカリ性で α -ナフトールとカップリングし、酸性にもどしてから生成する色素をイソアミルアルコールにて抽出し、 $540 \text{ m}\mu$ における吸光度を測定した。別に 4-アミノアンチピリンにより検量線を作製し、4-アミノアンチピリン量を算定した。

4) *p*-アミノフェノールの定量 (アニリン水酸化酵素活性の測定)^{6,7)} 反応混合液をインキュベート後、その 2 ml を 1.5% イソアミルアルコール含有エーテル 20 ml, 0.5 g 塩化ナトリウムとともに 60 ml 共栓遠沈管に入れ、振盪して *p*-アミノフェノールをエーテル層に移行させ、エーテルの一部を一定量別の共栓試験管に移し、フェノールを加え、さらに 0.5 N NaOH を加えて振盪し、水層の発色を $620 \text{ m}\mu$ で測定した。別に一定量の *p*-アミノフェノールより得た検量線から、生成した *p*-アミノフェノール量を算定した。

5) ペントバルビタールの定量¹⁾ 反応混合液をインキュベート後、その 2 ml をとり、Brodie 等の変法により定量した。

ペントバルビタール生体内蓄積量の定量 各投与期間後 24 hr を経て屠殺した猫の血漿、大脳皮質、大脳髄質、心臓、肝臓、腎臓、脂肪 (腹部皮下脂肪)、骨格筋 (大腿筋) に分布しているペントバルビタールの量を上記 5) の方法と同様にして定量した。すなわち血液は血漿 2 ml を、他の臓器は切除した臓器の重量の 4 倍量の 1.15% 塩化カリウム液とともに Waring blender で冷時ホモジナイズし、そのホモジネート 2 ml を使用した。

結果および考察

睡眠時間の変動 ペントバルビタール 35 mg/kg を猫の腹腔内に連続投与 (28 日間) した場合の睡眠時間の変動は Fig. 1 のごとくである。

投与 2 回目 (前投与 1 回) では、1 回目 (前投与なし) より長い睡眠時間を示したが、その後 5 回目まで急激に睡眠時間の短縮がみられ、6 回目より一過性に延長するが、19 回目ぐらいまで全体として睡眠時間の短縮が続く、その後再び延長する傾向がみられた。全体的傾向として睡眠時間の一過性延長、短縮、延長の順で変動した。

Fig. 1. Effect of Long Term Administration of Pentobarbital (35 mg/kg, *i.p.*) on the Sleeping Time in Cats

Fig. 2. Effect of Long Term Administration of Pentobarbital (35 mg/kg, *i.p.*) on Liver Microsomal Aminopyrine N-Demethylase Activity

- 5) B.B. Brodie, J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **99**, 171 (1950).
- 6) L.A. Greenberg, D. Lester, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **88**, 87 (1946).
- 7) B.B. Brodie, J. Axelrod, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **94**, 22 (1948).

肝ミクロソーム薬物代謝酵素活性の変動 各投与期間後におけるアミノピリン-N-脱メチル化, アニリン水酸化, ペントバルビタール代謝酵素活性の変動を図示すると Fig. 2—4 のごとくである.

ペントバルビタール 35 mg/kg 連日腹腔内投与により, アミノピリン N-脱メチル化酵素活性は 7 回前処置 (7 日間連続投与, 8 日目に屠殺) までは増加するが, その後徐々に減少の傾向を示した. この酵素活性の変動は睡眠時間の変動とペントバルビタール投与開始初期および後期において一致がみられたが, 中期すなわち 15 回目投与における睡眠時間の場合は一致がみられなかった.

Fig. 3. Effect of Long Term Administration of Pentobarbital (35 mg/kg, *i.p.*) on Liver Microsomal Aniline Hydroxylase Activity

Fig. 4. Effect of Long Term Administration of Pentobarbital (35 mg/kg, *i.p.*) on Liver Microsomal Pentobarbital Metabolizing Enzyme Activity

アニリン水酸化酵素活性はペントバルビタール投与開始から誘起され, その誘起は 14 回投与に最高となり, 21 回, 28 回投与では 14 回投与に比較して低く, この酵素活性の変動はペントバルビタール連続投与による睡眠時間の変動から予想される酵素活性の変動とほぼ一致した.

ペントバルビタール代謝酵素活性はアニリン水酸化酵素活性とほぼ同様な傾向の変動を示した. すなわち酵素活性は 14 回投与において最高で, 以後減少の傾向を示した.

血漿中あるいは臓器中ペントバルビタール分布濃度の変動 薬物代謝酵素活性は薬物の排泄速度の調節に大きな役割りを演じているので, 酵素活性が高いときには生体内残存量が少なく, 酵素活性が低いときには逆にその残存量が多いことが予測される. そこでペントバルビタール連続投与による薬物代謝酵素活性の変動とペントバルビタールの生体内蓄積の変動との関連を追求するため, ペントバルビタールの各臓器中への分布濃度を経日的に観察した. その結果は Fig. 5—7 のごとくである.

ペントバルビタール 1 回投与後 24 時間を経て屠殺した猫のペントバルビタール蓄積量は各臓器組織とも最高

Fig. 5. Effect of Long Term Administration of Pentobarbital on Its Distribution in Various Tissues of Cats (Liver, Kidney and Plasma)

○ liver
△ kidney
× plasma

Fig. 6. Effect of Long Term Administration of Pentobarbital on Its Distribution in Various Tissues of Cats (Brain and Fat)

○ brain medulla
△ brain cortex
× fat

値を示した。このことは2回目投与のときに睡眠時間が長かったことと一致した。すなわち2回目投与のときに睡眠時間が延長したのは、1回目に投与したペントバルビタールが、低い酵素活性のため24時間後までに十分に代謝できず、かなり高濃度のペントバルビタールが体内に残存しているところ、さらにペントバルビタールを投与したため、残存しているペントバルビタールと新しく投与したペントバルビタールの相加的な睡眠時間が表われたものと考えられる。このペントバルビタールの各臓器組織内への蓄積はペントバルビタールの投与の回数が増加し、肝ミクロゾーム薬物代謝酵素活性の上昇にしたがい、急激に減少し、14回投与ではすべての臓器組織内濃度が大体等しくなる傾向がみられた。また投与1回より14回までの蓄積を比較すると、肺や血漿中の濃度は1回投与時にもあまり蓄積しなかつたし、肝ミクロゾーム代謝酵素活性の上昇による分布濃度の変動もあまり見られなかった。この期間内においては一般に、1回投与時に蓄積が多かった臓器は薬物代謝酵素活性の変動と一致してその蓄積量も変動するが、1回投与時に蓄積が少なかった臓器はあまりその蓄積量が変動しない傾向が認められた。

14回投与以後28回投与まではペントバルビタール代謝酵素活性はやや減少し、睡眠時間はかなり延長した。また臓器蓄積量はbrain cortex, heart, fatのように変らないもの、kidney, brain medullaのように21回目でやや増加、以後減少するものおよびplasma, liver, lung, muscleのように減少の一途をたどるものなどがあり一定しないが、この時期においてある程度の脳の感受性の亢進が考えられる。この原因については明かでないので、今後種々な角度よりの検討が必要である。

結 論

ペントバルビタールを猫に長期間連続投与した場合における睡眠時間、薬物代謝酵素活性の変動とペントバルビタールの生体内臓器中の蓄積量との間に関連があることを見出した。

Fig. 7. Effect of Long Term Administration of Pentobarbital on Its Distribution in Various Tissues of Cats (Lung, Heart and Muscle)

○—○ lung
△—△ heart
×—× muscle