薬物代謝の研究 (第10報¹⁾) ペントバルビタールと血漿たん白
との結合について その 2²⁾

北川晴雄, 門沢弘行

千葉大学薬学部³⁾Studies on Drug Metabolism. X.¹⁾ Binding of Pentobarbital
with Plasma Protein. (2)²⁾

HARUO KITAGAWA and HIROYUKI KADOSAWA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba³⁾

(Received May 17, 1969)

Binding of pentobarbital (sodium 5-ethyl 5-(1-methylbutyl)barbiturate) with plasma protein of male and female rats was studied *in vivo* using the modified Rehberg's method.

The female rat had more extensive binding capacity than the male rat, but the fraction of drug bound was similar in both sexes. As a result of castration, the degree of sex difference in the binding capacity lowered.

When SKF-525 A, the inhibitor of metabolism of pentobarbital, was preadministered to the rat, blood level and amount bound of pentobarbital remained at the highest level, but fraction of drug bound was constant. The extent of binding was lowered in the rat pretreated with ether.

緒 言

著者等は薬効、毒性の種属差や性差の原因解明の手はじめとして、薬物のたん白結合の問題をとりあげ、前報²⁾において、ペントバルビタールと血漿たん白との結合について、*in vitro* の実験結果に関する知見を報告した。

さらに著者等は *in vivo* についても若干の知見をえたので、ここに報告する。

実 験 の 部

実験動物

1. 対照群 Control Group 体重 230 g 前後の Wistar 系雄性ラットおよび 200 g 前後の雌性ラットを用いた。実験前数週間、固型飼料 (日本クレア製 CE-2) および水道水にて飼育し、体重増加率ならびに一般状態から健康上異常のないことを確かめて実験に供した。

2. 去勢群 Castration Group 体重 30—40 g (生後 4 週令) の雌雄 Wistar 系ラットを常法により去勢し、手術後 4 週間、前記対照群と同様に飼育し、実験に供した。

3. エーテル前処置群 Ether Pretreatment Group 対照群と同様に飼育した Wistar 系ラットをエーテル飽和したグローック中に入れ、麻酔状態を観察し、手術期 (第 III 期) を過ぎ、中毒期 (第 IV 期) に入ってから呼吸が急激に抑制された時点でラットをグローックから取り出し、ペントバルビタールを投与し、実験に供した。

4. SKF-525 A 前処置群 SKF-525 A Pretreatment Group 対照群と同様に飼育した Wistar 系ラットに SKF-525 A (2-diethylaminoethyl-2,2-diphenylvalerate) 30 mg/kg 腹腔内注射し、投与 30 分後に実験に供した。

実験試料

1. ペントバルビタール溶液の調製 ペントバルビタール・ナトリウム (Sodium 5-ethyl 5-(1-methylbutyl) barbiturate——注射用ミンタル “田辺”) を注射用蒸留水に溶かし、35 mg/10 ml および 70 mg/10 ml 溶液を調製した。

1) 第9報: 北川晴雄, 鎌滝哲也, 小野健司, 会川清枝, 日本体質学雑誌, 投稿中。

2) その1: 北川晴雄, 門沢弘行, 鎌滝哲也, 吉田祚一, 薬誌, 88, 1512 (1968)。

3) Location: 1-33, Yayoi-cho, Chiba-shi, Chiba.

2. 血漿の分離 あらかじめ 0.25 ml/血液 5 ml の 2 重シュウ酸塩溶液を試験管にとり、これを 50° 以下で乾燥させ、採血用試験管とした。

ラットにペントバルビタールを 35 mg/kg または 70 mg/kg 腹腔内注射後、経時的に頸静脈より採血用試験管に採血し、3000 rpm で 15 min 間遠心分離し、血漿を分離した。

実験方法

雄性および雌性ラットをそれぞれ 2 匹、を 1 群とし、ペントバルビタールを 35 mg/kg または 70 mg/kg 腹腔内注射し、注射後 15, 45, 75, 135, 195 min および麻酔よりの覚醒時に採血し、血漿を分離した。なお予試験の結果より最高血中濃度は注射後 15 min である。

この血漿の一部を用い、ペントバルビタールの血中濃度を Brodie 等の方法⁴⁾ によって測定し、残りの一部を用い、ペントバルビタールと血漿たん白との結合量を P.B. Rehberg⁵⁾ の A centrifugation method of ultrafiltration using cellophan tubes を改良した方法によって測定した。すなわち十分洗浄した Visking cellulose tube に測定すべき血漿を入れ、これを 60 メッシュのステンレス網で tube が密着するように自製した円筒型保護バスケットに入れ、60 ml ポリエチレン製遠心沈殿管に懸垂した。これをまず 2000 rpm で 10 min 遠心分離し、cellulose tube および保護バスケットの脱水をし、ついで遠心沈殿管を乾燥した清浄なものに交換し、4000 rpm (約 1000×g) で 2 hr 遠心分離し、限外滲液をうる。この滲液中のペントバルビタール量を Brodie 等の方法⁴⁾ で定量し、別に求めた血中濃度との差から結合量を求めた。ここに得られた結合量は血漿 1 ml 当りの結合値を μg で表わし、結合率は血中濃度に対する結合値のグラフより求めた。

また血漿たん白量は血漿を 0.5N NaOH で 1000 倍に希釈し、その 1 ml を検体とし、Folin-Ciocalteu 法⁶⁾ で定量した。

実験結果

雄ラットにペントバルビタール 35 mg/kg 投与したところ、最高血中濃度は 21.77 $\mu\text{g/ml}$, biologic half life は 107.5 min で、この際の結合値は最高 16.61 $\mu\text{g/ml}$, この half life は 88 min であった。

またペントバルビタール 70 mg/kg 投与したところ、最高血中濃度は 49.34 $\mu\text{g/ml}$, biologic half life は 95.0 min で、この際の結合値は最高 36.69 $\mu\text{g/ml}$, この half life は 68 min であった (Fig. 1).

Fig. 1. Blood Level and Amount Drug Bound of Pentobarbital in Male Rat, administered *i.p.* 35 mg/kg or 70 mg/kg

Blood level 35 mg/kg 70 mg/kg
Amount bound ○-----○ △-----△

Fig. 2. Blood Level and Amount Drug Bound of Pentobarbital in Female Rat, administered *i.p.* 35 mg/kg or 70 mg/kg

Blood level 35 mg/kg 70 mg/kg
Amount bound ○-----○ △-----△

また雌ラットにペントバルビタール 35 mg/kg 投与した場合は最高血中濃度は 29.18 $\mu\text{g/ml}$, biologic half life は 167.5 min で、この際の結合値は最高 20.02 $\mu\text{g/ml}$, この half life は 154.5 min であり、ペントバルビタール 70 mg/kg 投与した場合は最高血中濃度は 51.94 $\mu\text{g/ml}$, biologic half life は 210.0 min であったが、雄ラットの場合と異なり半数以上のラットが死亡した (Fig. 2).

4) B.B. Brodie, J.J. Burns, L.C. Mark, P.A. Lief, E. Bernstein, E.M. Papper, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 109, 261 (1953).

5) P.B. Rehberg, *Acta Phys. Scandinav.* 5, 305 (1943).

6) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, L. Farr, R.J. Randall *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

Fig. 3. Variation in the Binding of Pentobarbital by Male Rat-plasma with Castration (for 4 Weeks)

Blood level Control Castrated
Amount bound ○-----○ △-----△

Fig. 4. Variation in the Binding of Pentobarbital by Female Rat-plasma with Castration (for 4 Weeks)

Blood level Control Castrated
Amount bound ○-----○ △-----△

以上のことから明らかなように *in vivo* においても *in vitro* の場合²⁾ と同様な性差がみられ、雌ラットにおける結合値の方が雄ラットにおける結合値より大きかった。

雌雄ラットを去勢した場合を比較してみると、雄ラットを去勢すると結合値は高くなり、雌ラットを去勢すると逆に結合値は低くなり、雌雄によって去勢の影響が異なって現われた (Fig. 3 および Fig. 4)。

このようなことから結合に sex dependent な factor が関与していることが推察される。

エーテル麻酔した場合、ペントバルビタールと血漿たん白との結合にいかなる影響をおよぼすかについて、*in vitro* に関する結果を前報²⁾ において報告したが、今回は *in vivo* について検討したところ、*in vitro* の場合と同様結合量が低下しエーテル麻酔によってペントバルビタールと血漿たん白との結合が影響を受けることが見いだされた (Fig. 5)。したがって結合の測定をする場合、常に実験動物の麻酔の影響を考慮することが必要である。

薬物と血漿たん白との結合と薬物代謝との関連について検討するため、あらかじめ SKF-525 A 30 mg/kg を腹腔内注射し、注射後 30 分にペントバルビタール 35 mg/kg を腹腔内注射し、ペントバルビタールの血中濃度、血漿たん白との結合値を測定した。その結果は Fig. 6 のとおりである。

Fig. 5. Influence of Ether anesthesia on the Binding of Pentobarbital by Male Rat-plasma

Blood level Control Ether
Amount bound ○-----○ △-----△

Fig. 6. Variation in the Binding of Pentobarbital by Male Rat-plasma with Pre-treatment with SKF-525 A

Blood level Control SKF-525 A
Amount bound ○-----○ △-----△

Fig. 7. Relationship between Blood Level and Amount Drug Bound of Pentobarbital

a) female rat ●: control (35 mg/kg)
○: castrated

b) male rat ●: control (35 mg/kg)
■: control (70 mg/kg)
▲: treated with ether
×: treated with SKF-525 A
○: castrated

すなわち血中濃度、結合値とも最高値を持続し、その値と対照の値との間に有意な差は認められなかった。したがって SKF-525 A 前処置による結合値の変動はペントバルビタル代謝の阻害が主な原因であると考えられる。

以上の結果を結合率を求めるため、血中濃度-結合値のグラフにすると Fig. 7 のごとくである。

すなわち雌雄ともプロットは直線的に分散し、直線の傾き(結合率)は雌雄ともに 0.67 で、性差は見られなかった。

また、すべての場合血漿たん白量を Fohlin-Ciocalcu 法¹⁸⁾ で測定したところ 6.45—6.55 g/dl で、有意な差は認められなかった。

考 察

薬物と血漿たん白との結合によって薬理活性が変動することはよく知られているが、この活性の変動は 3 つの場合に分類されることができる。

まず第一は薬物が receptor のたん白質と特異的に結合する場合で、その結合の強さと薬理活性とは平行する。コリンエステラーゼ阻害薬や SH-酵素阻害薬と酵素との結合あるいはサルファ剤、抗生物質と菌体たん白との結合がこの例として知られている。

第 2 は血中たん白や培地たん白との結合の場合で、その結合の強さは薬理活性と反比例する。これらについては古くから化学療法領域で研究され、数多くの報告⁷⁻⁹⁾ が行なわれている。

第 3 は薬物代謝酵素が局在している肝ミクロソームたん白との結合の場合で、薬物は肝ミクロソームたん白との結合により代謝されるので、その結合量が多いほど代謝されやすく、多くの場合薬理活性が失われやすくなる。¹⁰⁾ 薬物のたん白結合量測定には従来、限外濾過法、⁸⁾ 平衡透析法、¹¹⁾ 分光光度法、^{12), 13)} 電気泳動法、^{14), 15)} 超遠

7) G.N. Rolinson, R. Sutherland, *Brit. J. Pharmacol.*, **25**, 638 (1965).

8) L.R. Goldbaum, P.K. Smith, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **111**, 197 (1954).

9) A.H. Anton, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **129**, 282 (1960).

10) J.R. Gillette, "Drugs and Enzymes," 2nd. International Pharmacological Meeting, **4**, 9 (1965), ed. by B.B. Brodie and J.R. Gillette.

11) I.M. Klotz, F.M. Walker, R.B. Pivan, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1486 (1946).

12) U. Westphal, B.D. Ashley, G.L. Selden, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5135 (1958).

13) F.L. Rodkey, *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 38 (1961).

14) B.N. Premachandra, A.K. Ray, Y. Hirata, H.T. Blumenthal, *Endocrinology*, **73**, 135 (1963).

15) R.V. Rice, M.A. Stahmann, R.A. Alberty, *J. Biol. Chem.* **209**, 105 (1954).

心法¹⁶⁾などが用いられており、前報²⁾の *in vitro* の実験においては平衡透析法を用いたが、血漿の希釈という方法論的に大きな欠点があるため、今回の *in vivo* の実験に最も適する方法を検討し、その結果 Rehberg の限外濾過法を用いることとした。この方法は種々実験者によって改良が加えられており、ガーゼを用いる方法¹⁷⁾も使われ、掛見等¹⁸⁾はサリチル酸誘導体のたん白結合の測定にこの方法を応用しているが、ガーゼへの薬物の吸着、脱水などを考えると、ステンレス網(自製)の保護バスケットを用いる方が適当と考え、本実験においてはもっぱらこれを用いた。また遠心条件は予試験の結果から 4000 rpm (約 $1000 \times g$) が最高限度で、この回転数で 2 時間遠心すれば定量に必要な量の濾液がえられることが判明したので、もっぱらこの遠心条件を用いた。また遠心時の温度は薬物の分解防止、遠心機自体の能力から 0° を選んだ。

ペントバルビタールのラットにおける血中濃度、biologic half life および結合量に性差がみられ、castration によりその差が小さくなった。しかし結合率には性差がみられず、また血中たん白量にも差がみられなかったことから、結合能力それ自体には性差がなく、他の要因によって血中濃度が高まり、結合量に差異が生じたものと考えられる。

そこでこれら要因を究明するためまずペントバルビタール 70 mg/kg という大量投与を行なって血中濃度を上昇させて結合量を測定したところ、結合量の増加はみられたが、結合率には変化がみられなかった。

また、血中濃度に影響をおよぼす因子として代謝活性が考えられるので、雄ラットに SKF-525 A を前投与し、ペントバルビタールの血中濃度および結合量を測定したところ、いずれも最高値の持続化がみられたが、結合率には変化がみられなかった。

このように血中濃度範囲においては結合率が血中濃度に関係なく一定であるので、ペントバルビタールと血漿たん白との間に stoichiometric な関係が成立しているものと推察される。

前報²⁾においてエーテル麻酔が結合に影響を与えることを *in vitro* の実験について報告したが、今回は *in vivo* について実験を行なったところ、結合量は低下したが結合率には変化がみられず、前回と同様の結果がえられた。この原因についてはエーテル麻酔によるホルモンバランスの変動、ペントバルビタールの脂肪組織への incorporation の促進などが考えられるが、エーテルの作用によって release されたアドレナリン¹⁹⁾が脂肪組織に働いて脂肪酸の遊離が促進し、これが薬物たん白複合体に作用して脂肪酸-たん白複合体を作り、薬物を遊離するという報告²⁰⁾もあり、未だ不明な点が多く、現段階で結論を下すにはあまりにも早計である。

今後、さらにたん白結合と薬物代謝に関する数多くの問題について検討する予定である。

結 論

ペントバルビタールと血漿たん白との結合についてラットを用い、*in vivo* で検討し次の結論をえた。

- 1) ペントバルビタールと血漿たん白との結合に性差がみられ、結合量は雌の方が大きかった。
- 2) 結合量の性差は castration によって小さくなった。
- 3) SKF-525 A 前投与によりペントバルビタールの血中濃度および結合量の最高値の持続がみられた。
- 4) エーテル麻酔によって結合量の低下がみられた。
- 5) いずれの場合も結合率に差異はみられず、血中濃度と結合率の間に関係があると考えられる。

16) 伊藤信也, 安村恵津子, 名和田京子, 日本薬学会第 87 年年会講演要旨集, 京都, 1967 年 4 月, p. 324.

17) A.S. Prasad, E.B. Flink, *J. Appl. Physiol.* 10, 103 (1957).

18) 掛見喜一郎, 有田隆一, 山科 肇, 小西良士, 薬誌, 82, 536 (1962).

19) E. Browning, *Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents*, Elsevier Publishing Co. (1965).

20) 大宮彬男, 中井健五, 日薬理誌, 64, § 92 (1968).