放射性同位元素による医薬品の分析 (第 8 報¹⁾) *l*-Ephedrine 代謝における種差²⁾

馬場茂雄, 榎垣一憲, 松田暁忠, 長瀬雄三
東京薬科大学³⁾

Studies on the Analysis of Drugs by Use of Radioisotopes. VIII.¹⁾ Species Differences in *l*-Ephedrine Metabolism²⁾

SHIGEO BABA, KAZUNORI ENOGAKI, AKITADA MATSUDA and YŪZŌ NAGASE
Tokyo College of Pharmacy³⁾

(Received April 27, 1972)

The metabolism of *l*-ephedrine [α -¹⁴C] (I) in mice, rats, guinea pigs, and rabbits was studied by a tracer technique to clarify the species differences in metabolic pathways. I was subcutaneously administered in a dose of 5 mg/kg and the urine excreted during 24 hr after the administration was analyzed.

In mice, the major part of ¹⁴C activity was excreted as unchanged I. In guinea pigs, a large quantity of norephedrine and considerable amounts of benzoic acid and 1-phenyl-1,2-propanediol were excreted, but the amount of *p*-hydroxyephedrine and its metabolites was very small. In rats, the metabolic activity was low next to mice and the excretion of a considerable amount of substrate was observed; the *p*-hydroxylation activity, however, was the highest in animals tested here, so that the main metabolites were *p*-hydroxyephedrine and its conjugated metabolite. In rabbits, both the N-demethylation and deamination activities were extremely high, and the major part of administered I was excreted as deaminated products. A remarkable amount of 1-phenyl-1,2-propanediol and its conjugated metabolite were also detected in rabbit urine.

放射性同位元素によるトレーサー法は、感度の高いことおよび確実な知見が期待できることなどの利点をもっており、最近薬物の代謝研究に盛んに利用されている。薬物代謝実験の知見は最終的にはヒトについて得られることが最も望ましいが、国際放射線防護委員会の勧告にもあるように、われわれは不必要な放射線の被曝をできるだけ避けるべきで、放射性同位元素によるトレーサー実験をヒトに対して適用することには多くの問題点が残されている。このためまず動物について代謝実験を行ない、その実験結果からヒトの場合を予想する方法が現在ではとられているが、薬物の代謝様式は実験動物の種類により大きく異なることも知られており、⁴⁾ ただ一種の動物について得られた結果からヒトにおける代謝を論ずることは危険である。そこである薬物について、各種実験動物と代謝様式との間に存在する関係を明らかにすることは、新しい薬物の動物実験によって得られた結果をヒトに外挿するにあたって有益な指針を与えると考え、著者らは ephedrine を例にして、薬物の代謝様式の各種実験動物による差異を研究した。

Axelrod 等⁵⁾ は各種実験動物に非標識の *l*-ephedrine を投与し、24 時間以内に尿中に排泄された代謝産物を向流分配抽出法で分離し、メチルオレンジとアミノ基との呈色反応を指標にして代謝産物を検索しているが、この方法ではアミノ基をもつ代謝産物しか定量されておらず、脱アミノ化された代謝産物に対する知見はまったく得られていない。たとえば、脱アミノ化活性の高い家兎では投与した *l*-ephedrine のわずか 3.8% が未代謝の基質またはその代謝産物として説明されたにすぎない。

一方長瀬、馬場、松田等は *d*- および *l*-ephedrine- α -¹⁴C を用いて、家兎肝ホモジネート、⁶⁾ 家兎肝スライスに

- 1) 第 7 報: 松田暁忠, 馬場茂雄, 長瀬雄三, 薬誌, 91, 542 (1971).
- 2) 日本薬学会第 92 年会, 大阪, 1972 年 4 月発表,
- 3) Location: Kitashinjuku 3-20-1 Shinjuku-ku, Tokyo.
- 4) たとえば赤木満州雄, “薬物代謝の生化学,” 南江堂, 1965, p 253.
- 5) J. Axelrod, J. Pharmacol. Exptl. Therap., 109, 62 (1953).
- 6) 馬場茂雄, 松田暁忠, 長瀬雄三, 薬誌, 89, 833 (1969).

による実験,⁷⁾ 家兎 *in vivo* の実験⁸⁾ などの一連の実験を行ない、すでに明らかにされていた代謝産物のほか、1-phenyl-1,2-propanediol および 1-hydroxy-1-phenyl-2-propanone などの新しい中性代謝産物、予想はされていたが定量することができなかった benzoic acid および hippuric acid などの代謝産物を同定・定量し、いずれの場合にも試料中の ^{14}C -radioactivity の 90—100% を説明した。

そこで著者らは家兎に対して行なわれた分析方法をマウス、ラットおよびモルモットに準用して、家兎の実験結果とも比較しながらこれらの実験動物間の代謝様式の差異を明らかにした。

実 験 の 部

実験材料

標識化合物 長瀬、馬場等の方法⁹⁾ にしたがって合成した比放射能 $1.86 \mu\text{Ci/mg}$ の *l*-ephedrine- α - ^{14}C を用いた。

逆希釈分析に使用した非標識化合物 Ephedrine は局方塩酸エフェドリンを使用し、benzoic acid, hippuric acid および *p*-hydroxybenzoic acid は東京化成株式会社製試薬特級品を使用した。norephedrine は W.H. Hurtung 等の方法,¹⁰⁾ 1-phenyl-1,2-propanediol は Th. Zincke 等の方法,¹¹⁾ *p*-hydroxyhippuric acid は E. Fischer の方法¹²⁾ にしたがって合成した。また *p*-hydroxyephedrine は日本ヘキスト株式会社より提供していただいた。

実験動物 各種実験動物とも健康な雄動物を使用し、飼育はすべて恒温室中で 23° で行なった。飼料および水は自由に与え、モルモットには毎日 10mg のアスコルビン酸を飲料水に溶かして与えた。マウスは体重約 20g の dd 系マウスを、ラットは体重約 200g のウイスター系ラットを、モルモットは体重約 400g の白色ハートレイ系モルモットを使用した。なおマウスは 3 匹ずつ飼育し 15 匹一群として実験した。その他の動物は別々に飼育し、3 匹一群として実験した。

実験方法

放射能の測定および装置 液体シンチレーション計数装置 (液シン) による測定——親水性シンチレータに可溶性の物質は数 mg を、尿は 0.2 ml をバイアルに採り、親水性シンチレータ 15 ml に溶解して、日本無線医理学研究所製 LSC-502 型液シンで測定した。糞中の放射能測定はその 10% 懸濁液 1 ml を湿式酸化法¹³⁾ で $^{14}\text{CO}_2$ に分解し、 $^{14}\text{CO}_2$ をシンチレータに吸収させることにより測定試料を調製した。なお親水性シンチレータは PPO 4.0g, dimethyl POPOP 0.4 g, naphthalene 100 g を toluene-dioxane-ethylcellosolve (15:75:10) の混液 1 liter に溶かすことにより、また $^{14}\text{CO}_2$ をシンチレータは PPO 4.0 g, dimethyl POPOP 0.4 g を toluene-ethylcellosolve-ethanolamine (48:40:12) の混液 1 liter に溶解することにより調製した。

4 π -ペーパークロマトスキャンナー (PPC スキャンナー) による放射能の測定——ペーパークロマトグラムは日本無線医理学研究所製の PPC スキャンナー TRM I を用いて測定した。

***l*-Ephedrine- α - ^{14}C の投与** *l*-Ephedrine- α - ^{14}C 注射液は *l*-ephedrine- α - ^{14}C を正確に秤り、注射用蒸留水に溶かし、0.1 ml または 0.2 ml 中に 5 mg/kg に相当する量が溶解しているように調製した。投与量は各実験動物とも塩酸塩として体重 1 kg 当りに 5 mg に統一し、投与方法は皮下注射とした。

尿および糞の採取 尿および糞の採取は 24 時間ごとに 7 日間にわたって行なった。ラットおよびモルモットについてはラット用代謝ケージを使用し、採尿容器中に適量のエタノールをあらかじめ加えて、採尿中の尿の防腐に留意した。またマウスについては円筒形のプラスチック製代謝ケージを使用し、底に汚紙を敷いてこれに尿を吸着させ、50% エタノールで溶出し、15 匹分を合わせてこれをマウス尿とした。

代謝産物の分析 約 10^5 dpm の放射能に相当する各実験動物の尿を適当に濃縮し、2.5 cm 幅の Whatman No2 または 3MC の汚紙にスポットし、iso-BuOH-HCOOH-H₂O (100:12:10) の系で下降法により展開し、PPC スキャンナーで走査し、各ピークの *R_f* 値と標準化合物のそれに対比させ代謝産物の推定を行ない、松田等の方法⁶⁾ に準じて逆希釈分析した。

結 果 と 考 察

尿および糞への排泄

Table I には各種実験動物における 24 時間ごとの尿および糞中の *l*-ephedrine- α - ^{14}C 排泄量 (各動物の平均

- 7) 馬場茂雄, 松田暁忠, 長瀬雄三, 川井邦男, 薬誌, **91**, 584 (1971).
- 8) 松田暁忠, 馬場茂雄, 長瀬雄三, 薬誌, **91**, 542 (1971).
- 9) 長瀬雄三, 馬場茂雄, 山田泰司, 松山陽太郎, 薬誌, **89**, 833 (1969).
- 10) W.H. Hurtung, J.C. Munck, *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 2262 (1929).
- 11) Th. Zincke, K. Zahn, *Chem. Ber.*, **43**, 849 (1910).
- 12) E. Fischer, *Chem. Ber.*, **41**, 2875 (1908).
- 13) 薬誌投稿中.

値)を示した。*l*-ephedrine- α - ^{14}C 投与後 24 時間以内に、マウスでは約 93% が、モルモットでは、80—86% が、またラットでは 60—85% が尿中に排泄された。また各種実験動物とも 2—9% が糞中に 24 時間以内に排泄され、さらに 2 日以降数日間にわたって尿および糞中に少量ながら排泄された。

なお家兎による実験では、投与後 24 時間以内に約 90% が、さらに 4 日間の累積で 94% が尿中に排泄され、糞中排泄は 4 日間の累積でも 0.3—0.5% にすぎないことがすでに報告されている。⁸⁾

以上のように、各種実験動物とも投与した *l*-ephedrine- α - ^{14}C の大部分は投与後 24 時間以内に尿中に排泄されることから、代謝産物の分析は 24 時間以内に排泄された尿について行なった。

TABLE I. Excretion of *l*-Ephedrine- α - ^{14}C

Days after dosing	Mouse(%)		Guinea pig(%)		Rat(%)	
	Urine	Faeces	Urine	Faeces	Urine	Faeces
1	92.5	2.9	83.3	6.8	70.6	8.9
2	0.8	0.4	2.7	0.6	1.1	1.5
3	0.8	0.6	0.5	0.2	0.2	0.4
4	0.4	0.2	0.2	0.0	0.1	0.2
5	0.1	0.3	0.1	0.0	0.0	0.2
6	0.2	0.3	0.1	0.0	0.0	0.1
7	0.1	0.2	0.2	0.0	0.1	0.2
Total	94.7	4.9	87.2	7.6	72.2	11.5

Fig. 1. Paper Chromatograms of Urine from *l*-Ephedrine- α - ^{14}C Administered Animals

尿中の代謝産物

各種実験動物の濃縮尿を PPC スキャナーで走査した結果を Fig. 1 に図示した。Fig. 1 において *Rf* 値の小さい方から順にピーク 1 (*Rf* 値 0.0 付近), ピーク 2 (*Rf* 値 0.4 付近), ピーク 3 (*Rf* 値 0.5—0.6), ピーク 4 (*Rf* 値 0.8—0.9) とした。なおこれらのピークのあらわれる位置は展開条件や試料中の夾雑物により影響を受けるので Fig. 1 には若干補正したデータを示した。ピーク 1 には ephedrine および *p*-hydroxyephedrine などの抱合体が、ピーク 2 には *p*-hydroxyephedrine が、ピーク 3 には ephedrine および norephedrine (家兎で

は 1-phenyl-1,2-propanediol および hippuric acid などの抱合体) が、ピーク 4 には benzoic acid, hippuric acid, *p*-hydroxy benzoic acid および *p*-hydroxyhippuric acid が含まれるものと思われる。

次に各種実験動物の 24 時間以内に排泄された尿について代謝産物の量的割合を検討した。

Table II には各種実験動物におけるこの割合をそれぞれの種類の動物実験の平均値を示した。

マウスでは未変化の ephedrine が多いことが特徴で、投与後 24 時間以内に排泄された ^{14}C -radioactivity の 85.8% は未変化の ephedrine によるものである。このほか少量ではあるが、norephedrine, *p*-hydroxyephedrine, hippuric acid および benzoic acid なども検出された。未変化のまま回収された ephedrine の量が著しく多いことからマウスは薬物代謝能が低いように一見思われるが、たとえばマウスの hexobarbital に対する代謝酵素活性は家兎、ラット、犬およびヒトなどよりも高いことが Quinn 等¹⁴⁾ により報告されている。また amphetamine- ^{14}C を投与した場合、24 時間以内に排泄された尿では未変化体はわずか約 30% にすぎず、大部分は代謝産物であることも L.G. Dring 等¹⁵⁾ により明らかにされている。これらのことを考えると、マウスにおいて未変化の ephedrine が著しく多いのは、代謝活性の低さに起因することも考えられるほか、その理由の一つとして、モルモットや家兎の新鮮尿の pH がいずれも 8.0—8.5 を示すのに対し、マウスのそれは 5.4 でマ

14) Quinn, et al., *Biochem. Pharmacol.* **1**, 152 (1958).

15) L.G. Dring, et al., *Biochem. J.*, **116**, 425 (1970).

ウスでは投与された ephedrine が代謝される以前に未変化体のまま速かに排泄される生理的条件下にあることも考えられる。

モルモットでは norephedrine が多く、それ以降の代謝産物すなわち 1-phenyl-1,2-propane diol および benzoic acid も比較的多いが、芳香核の水酸化された代謝産物は少ない。また興味深いことは free の benzoic acid が比較的多いことである。この現象は amphetamine の代謝実験においてもみられている。¹⁶⁾ モルモットや家兎の場合の free benzoic acid が比較的多いのは、モルモットや家兎の尿がアルカリにかたよっているため、pKa が 4.2 の benzoic acid が速かに腎排泄されることや hippurate をつくる酵素活性が他の動物に比べて低いことなどが考えられる。このほか *p*-hydroxybenzoic acid および hippuric acid も検出されたが、*p*-hydroxyephedrine はほとんど検出されなかった。なお未同定の部分が他の実験動物に比較してやや多いがこのなかには *p*-hydroxynorephedrine および benzoyl glucuronide などの存在も考えられる。ラットでは *p*-hydroxyephedrine およびその抱合体は多いが、さらにこれらの代謝産物から側鎖の代謝によって生成すると考えられる *p*-hydroxybenzoic acid や *p*-hydroxyhippuric acid の量は少ないことが特徴である。すなわちラットでは *p* 位の水酸化は容易に受けるが、脱メチル化、脱アミノ化、側鎖の酸化は受けにくい。またマウスに次いで未変化の ephedrine が多く、ラットの尿の pH もマウスと同じく 5.4 である。G.R. Wilkinson ら¹⁷⁾ は、ヒトにおいて酸性尿 (pH 5) では 24 時間以内に排泄される ephedrine の量が多く、アルカリ尿 (pH 8) ではこれが少ないことを報告している。これらのことは尿の pH と未変化の ephedrine の排泄量との相関性を示唆するものである。

またラットにおいては、投与量を 10 倍にして予備的な実験を行ない、投与量の代謝パターンに対する影響も検討した。投与後 24 時間以内に尿中に排泄された ¹⁴C-radioactivity は 89.8% であった。また未代謝の ephedrine は 63.1% で 5 mg/kg 投与群より多く、代謝産物はやや少ないことが認められた。しかし投与量を 10 倍にしたにもかかわらずその本質的な影響は認められなかった。

家兎では ephedrine, norephedrine および *p*-hydroxyephedrine らのアミノ基を持つものがきわめて少ないのに対し、脱アミノ化以降の代謝産物すなわち 1-phenyl-1,2-propanediol, benzoic acid およびこれらの抱合体が多いこと、また芳香核の水酸化された代謝産物は比較的少ないことが特徴で、芳香核の水酸化よりも側鎖の代謝が主代謝経路と考えられる。

TABLE II. Metabolites of *l*-Ephedrine- α -¹⁴C in the Urine of Various Animals

Metabolite	Animal			
	Mouse (%)	Guinea pig (%)	Rat (%)	Rabbit (%)
Ephedrine (Glucuronide)	85.8	1.6 $\pm$ 0.69	56.4 $\pm$ 0.70 (1.8)	0.7 $\pm$ 0.39
Norephedrine	2.9	51.9 $\pm$ 2.08	4.6 $\pm$ 1.15	1.3 $\pm$ 0.42
<i>p</i> -Hydroxyephedrine (Glucuronide)	2.3	0.0	31.0 $\pm$ 4.47 (24.1)	0.7 $\pm$ 0.05
1-Phenyl-1,2-propanediol (Conjugated form)	0.0	8.6 $\pm$ 6.81	0.1 $\pm$ 0.12	29.1 $\pm$ 6.81 (23.4)
Benzoic acid (Hippuric acid)	1.5 (1.1)	25.8 $\pm$ 4.91 (2.8)	3.1 $\pm$ 0.12 (2.7)	52.0 $\pm$ 5.92 (32.9)
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (<i>p</i> -Hydroxyhippuric acid)	0.0	0.5 $\pm$ 0.05	1.1 $\pm$ 0.22 (1.1)	10.1 $\pm$ 5.39 (8.8)
Total	92.5	88.4	96.3	93.9

l-Ephedrine 代謝における種差

Ephedrine の代謝反応としては芳香核の水酸化、脱メチル化、脱アミノ化、および側鎖の酸化的切断をあげることができる。排泄される代謝産物の量は、その動物の代謝活性のほかに基質やそれぞれの代謝産物の体内貯留

16) L.G. Dring *et al.*, *Biochem. J.*, **116**, 425 (1970).

17) G.R. Wilkinson *et al.*, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **162**, 139 (1968).

時間—排泄速度—によっても当然左右されるので、*in vivo* 実験での代謝産物の量から直接代謝活性を論ずることは危険であるが、後者の影響をできるだけ除外しながら各代謝活性の比較を試みよう。

まず芳香核の水酸化された代謝産物について考察しよう。*p*-Hydroxyephedrine およびその代謝産物の合計量はラットが最も多く、約30% に達し、家兎 10%、マウス 2.3%、モルモット 0.5% の順になる。しかし同定された代謝産物の総量に対する水酸化された代謝産物の割合では、ラットが 80.5%、マウスが 34.3%、家兎が 11.6%、モルモットが 0.6% となる。すなわち芳香核の水酸化反応はラットでは最も主要な代謝経路であるが、マウスでも比較的重要な経路であることがわかる。これに対し家兎およびモルモットではこれらの代謝産物の割合は少ない。

次に N- 脱メチル化以降の代謝産物についてみると、この量は家兎およびモルモットではおおよそ 90% にも達するのに対し、ラットおよびマウスではその約 10 分の 1 以下である。またこれらを代謝産物の総量に対する割合でみると、モルモットが 100%、家兎が 99.2%、で、これらの動物は ephedrine をほとんど脱メチル化以降の代謝産物として排泄する。一方マウスでもこの割合は大きく、主要な代謝経路であると思われるのに対し、ラットでは他の動物に比較して著しく脱メチル化体の割合が小さい。

最後に脱アミノ化以降の代謝産物についてみると、家兎が最も大きく約 90% であるのに続いて、モルモットが約 35% と比較的大きくなっている。これに対しラットおよびマウスでは 5% 以下である。これを代謝産物の総量に対する割合でみると家兎が 97.8% となり、家兎は脱メチル化に続いて脱アミノ化が速かに起こるものと考えられる。またモルモットが 40.2%、マウスが 24.4%、ラットが 13.1% となり、マウスおよびラットでは脱アミノ化反応はそれほど重要な経路ではないと思われる。