

氏 名 (本籍) みね ぎし けん いちろう
嶺 岸 謙 一 郎

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 薬 博 第 1 3 号

学位授与年月日 昭 和 4 3 年 3 月 2 6 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専門課程 東北大学大学院薬学研究科
薬学専攻

学位論文題目 生体内酸化的脱メチル化反応に関する研究

(主 査)

論文審査委員 教授 亀 谷 哲 治 教授 小 沢 光

教授 南 原 利 夫

論 文 内 容 要 旨

最近、薬物の汎用にともない薬物による副作用、習慣性 (habituation) 及び耽溺性 (addiction) の問題や Thalidomide 等にみられる催奇型性の問題等社会的弊害が引き起されている。

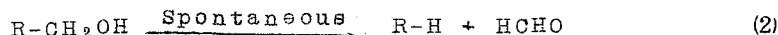
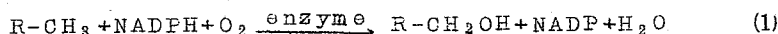
この様な問題を解決するには薬物の生体内における吸収、分布、代謝、排泄などの運命を研究することが必要である。これを基礎として汎く薬物の作用機序を明らかにし更により副作用の少ない薬物を目的に応じて合成するための、又、現在、非常な勢いで発達している新しい医薬品を正しく使用して治療効果を上げるための急務であるからである。

本論文は以上の様な観点からしばしば我が国において流行毒ともなつたバルビツール酸系の催眠薬と morphine 系薬物を取り上げ、それらが薬物代謝の適応機構の上に与える影響を検討しつゝ反応機作の究明に関する実験を行つた。

即ち、薬物代謝反応の中酸化脱メチル化反応 (oxidative demethylation) 系を用い、N-methyl基を有するバルビツール酸系薬物及び morphine 系薬物を基質とし、これらの代謝系に及ぼす薬物の影響とその際の生化学的変化を検討した。

一般に薬物の酸化解毒酵素については主として動物肝臓の microsomes 画分にその活性が存在し、NADPH と分子状酸素を必要とする酵素系であることが確認されている。

従つて、酸化脱メチル化反応は



と考えられ、反応中に水酸化反応を伴い、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ は不安定なため(2)の反応は自然に進むものと思われる。

基質として methylbarbital, morphine 及び meperidine を用いて、動物種による脱メチル化反応活性の違いを見ると $\text{Rat} > \text{Guinea-pig} \geq \text{mouse}$ の順であつたが Brodie et al の aminopyrine の demethylation, p-nitrobenzoic acid の還元反応, prontosil より sulfanil amide の生成の結果と可成り異つた傾向が観察され、基質や反応型及び種によつてその酵素活性は可成り違うことが推察される。従つて一つの反応型の活性が低い時は他の反応型が代償し得る様な機構を生体は有しているものと考えられる。一般に諸種薬物を動物に前処置することによつて薬物代謝酵素の活性が変動することが認めら

れている。

ことに発癌性物質である 3-methylcholanthrene(3-MC), benzpyrene(BP) 及び barbituric acid 系催眠薬は薬物代謝酵素の活性を著るしく上昇させる事が知られている。従つて著者はこれらの誘導薬物を用いて、薬物代謝機構の一つである脱メチル反応及び水酸化反応がいかに変動するかを実験した。その結果、3-MC, BP によつては methylbarbital の脱メチル化反応, EHB の水酸化反応は活性化されず, MAB の脱メチル化反応及び acetanilide の水酸化反応のみが活性化される事が認められた。barbiturate による活性化は発癌剤と反対に acetanilide の水酸化反応には影響なく, methylbarbital の脱メチル化及び EHB の水酸化に対して著るしい活性化作用が認められた。従つて誘導薬物に対して response を異にする少なくとも二つの酵素系の存在が考えられる。

phenobarbital による誘導効果は、50 時間目を境として前後に二つの活性極大が現われることを見出したので、その中の一つの活性極大はその主代謝物である p-hydroxy-phenobarbital によるものかどうかを検討した。

その結果 p-hydroxy-phenobarbital の効果は phenobarbital の $1/4$ にすぎず、これは Toki et al によつて報告されている hexobarbital の sleeping time に対する phenobarbital 及び p-hydroxy-phenobarbital の影響と一致した。

更に薬物による酵素誘導現象が副腎を介する可能性も考えられるので副腎摘出 rat についても検討を加えた。副腎摘出を行うと一般に薬物代謝酵素活性は低下する。Cortisone 5mg./kg/day の3日間の投与ではその活性は回復されないが 25mg./kg/day の3日間投与によつて可成りの回復が観察された。更に intact rat 及び stdrved rat においても cortisone 投与によつてわずかながら薬物の代謝活性の上昇が認められた。副腎摘出 rat に phenobarbital を投与すると intact rat の場合と同様 phenobarbital による誘導効果が観察される。従つて phenobarbital の作用は副腎を介していない事が確認された。

phenobarbital による薬物代謝活性の誘導効果は puromycin 及び 8-azaguanine 等の蛋白並びに核酸合成阻害剤の投与によつて著るしく抑制される点から更に ^{14}C -amino acids の肝蛋白質への取り込みについても検討を加えた。amino acids の取り込みは control において $\text{microsomes} > \text{mitochondria} > \text{supernatant} \geq \text{nucleus}$ となり、phenobarbital の前処置によつて microsomes 画分への取り込み増加が著る

しく薬物の活性増加と同様な傾向を示した。更に副腎摘出ratでもphenobarbitalによつてmicrosomes画分へのamino acidsの取り込み増加が観察され、amino acidsの取り込みと薬物代謝活性は同様の結果を示した。

以上の結果よりphenobarbitalによる誘導効果は非特異的な蛋白合成の誘導による薬物代謝酵素のde novoな合成と考えられる。

Lineweaver-Burkの方法によつてそれぞれの基質に対するKm値及びVm値を求めると、代謝される割合は酵素と基質の親和性の面からある程度説明され得る。即ちmethylbarbitalはKm値は 5.00×10^{-4} M、meperidineは 2.50×10^{-4} Mでmethylbarbitalは比較的代謝されにくい、meperidineはmethylbarbitalに比べて非常によく代謝される。phenobarbitalによる誘導効果によつてmethylbarbitalの最大反応速度は約9倍になるのに対しmeperidineの場合は約2倍弱であつた。

以上phenobarbitalによる酵素誘導について検討を加えたが次にAxelrodによつて認められたmorphine投与による薬物代謝系の抑制作用について検討を加えた。

麻薬類のmorphine、nalorphine、codeine、meperidineを3日間前処置すると前記meperidineの脱メチル化反応活性は低下し特にmorphineにおいて顕著である。

そこでmorphineを連続投与し、meperidine、codeine、morphine、methylbarbitalを基質としてそれぞれの脱メチル化反応に対する影響をみると、morphine連続投与後脱メチル化活性は次第に低下し、4日間投与後では著るしい低下が観察された。

morphineの薬理的拮抗薬であるnalorphineによつても一回の投与ではほぼ同程度の影響を与えるが、nalorphineの投与を数回くりかえしてもmorphineに見られると同様な活性低下は認められない。脱メチル化反応においてもmorphineとnalorphineの前処置による拮抗現象は観察され、morphine投与後1時間でnalorphineを投与すると最も著明であつた。この拮抗現象は動物のmorphinizationが進むに従つて観察されなくなる。

morphine前処置動物にphenobarbitalを投与するとmorphineの4日間投与ではまだphenobarbitalによる誘導効果は観察されるがmorphinizationが進むにつれてphenobarbitalによる誘導効果も観察されなくなる。従つてmorphinizationの判定に際し従来のように禁断現象の出現をまつことなくphenobarbital効果の消失によつて生化学的に行い得ることを見出した。

この様なmorphineの非特異的な阻害機構は恐らく脳下垂体-副腎の分泌機能を抑制することによつて結果的に薬物の代謝を抑制するのであろうとの報告がある。しかしながら副腎摘出

rat における morphine の影響は intact rat におけると同様に観察された。従つてこの様な morphine の作用は脳下垂体—副腎の系を介するものではないと考えられる。

副腎摘出 rat における nalorphine の影響は intact rat に見られるほど明らかではなかつた。

morphine と nalorphine との拮抗は副腎摘出 rat においても観察された。

次に蛋白質合成系への morphine の影響について検討すると、morphine の短期間投与では 14 C-amino acids の liver proteins への取り込みは減少し、後、次第に回復し、一週間後ではほぼ正常にもどつている。morphine の長期投与 (4 週間) の場合においては amino acids の取り込み速度には morphine の影響は観察されない。

脱メチル化反応に対する morphine 投与の影響は細胞画分再結合による実験から microsomes 画分に顕著であつた。従つて microsomes 画分のどの様な部分に影響を与えているかについて更に検討した。細胞細分画法により smooth surfaced endoplasmic reticulum (SER) と rough surfaced endoplasmic reticulum (RER) とに分画しそれぞれについて meperidine の脱メチル化反応活性を調べると morphine の影響は SER において顕著に認められ、RER では認められなかつた。morphine 投与によつて meperidine の脱メチル化反応の Km 値にやゝ変化が認められ、Vm 値は control の $1/2$ 以下になつてゐることが認められた。

更に、以上述べた phenobarbital 及び morphine 等の薬物処置による実験より methylbarbital は誘導効果の研究に、meperidine は代謝抑制及び阻害剤の研究にそれぞれ優れた基質であることを提唱することが出来た。

次に cofactor 供給系と考えられる G-6-P dehydrogenase に対する薬物の影響を調べると、phenobarbital によつてやはり活性増加が認められるが、それは高々 2 倍であつた。しかし薬物代謝活性の増加に伴い経時的に同様な傾向を示す点注目される。

G-6-P dehydrogenase に対する morphine 投与の影響は動物の年齢によつて異つた作用を示し、若い rat においては活性増加が認められ、これに反し、高令 rat においては著しい阻害が認められた。長期投与 (4 週間) においては phenobarbital, morphine による G-6-P dehydrogenase に対する影響は認められずこれは生体が常に恒常性 (homeostasis) を維持する様に何らかの代謝調節を行つてゐるためと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は動物肝ミクロソームにおける薬物代謝反応の中、酸化脱メチル化反応系をとり上げ N-methyl基を有するバルビツール酸系およびmorphine系薬物を基質とし、種々の薬物の影響とその際の生化学的変化につき検討を加えたものである。

すなわち phenobarbital 投与による酸化脱メチル化反応を指標とした薬物代謝酵素の誘導は蛋白合成促進によるものであり、副腎機能を介するものではない。また phenobarbital の作用と 3-methylcholanthrene および benzpyrene の作用との比較により、誘導薬物に対して response を異にする少くも 2 つの酸化酵素系が存在する事を認めた。

副腎摘出によつて薬物代謝活性は低下し、副腎皮質ホルモン投与で回復する。また intact-rat および starved rat においても副腎皮質ホルモンの影響が観察される。

Morphine の投与により薬物代謝酵素活性は低下するがこれは副腎の機能を介するものではなく、薬理的拮抗薬である nalorphine によつて拮抗的に回復される。このような拮抗現象は morphinization が進むにつれて観察されなくなり、phenobarbital による誘導効果も観察されなくなる。従つて morphinization の判定に際し従来のように禁断現象の出現を待つこと無く、phenobarbital 効果の消失によつて生化学的に行ない得ることを見出した。

Morphine 投与の初期においては蛋白合成は阻害されるが長期投与では正常に復していることが認められた。morphine の作用は microsomes level で影響しており smooth surfaced endoplasmic reticulum において顕著である。

Cofactor 供給系である glucose-6-phosphate dehydrogenase に対しても薬物の影響は観察され、phenobarbital によつては活性化される。morphine によつては動物の年齢によつて異つた作用を示し、若い rat では活性増加が認められ、高令 rat では活性の低下が認められた。

さらに肝ミクロソームの薬物代謝反応に関する実験における基質として methylbarbital は活性上昇効果の研究に、meperidine は代謝抑制および阻害剤の研究にそれぞれすぐれた基質であることを提唱することが出来た。

以上本論文は薬物代謝反応に関して生化学的考察を加え、多くの新知見を得たものであつて博士論文に値するものであることを認める。