

原 著

## Doxapram Hydrochloride による急性脂肪肝

武 田 隆 幸

信州大学医学部薬理学教室

### DOXAPRAM HYDROCHLORIDE-INDUCED FATTY LIVER IN RATS

Takayuki TAKEDA

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,  
Shinshu University

Key words: ドキサプラムハイドロクロリド (Doxapram hydrochloride)  
急性脂肪肝 (acute fatty liver)

#### 緒 言

Doxapram hydrochloride [1-ethyl-4-(2-morpholinoethyl)-3, 3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride] (以下 Dop. HCl) はヒトおよびイス, ウサギ<sup>2)</sup>, ラット<sup>3)</sup>において著明な呼吸興奮作用を示すことが報告されている。この効果はヒトにおいて 1~2mg/kg の静脈内投与 (以下 *i. v.* 投与) でみとめられ, チオペンタール麻酔時の呼吸抑制を回復させるには 0.5mg/kg の *i. v.* 投与においても有効である<sup>4)</sup>。

一方このものは上記の呼吸興奮作用のほか, ラット肝アルコール脱水素酵素の活性を上昇させ, ウサギ, イス肝アルコール脱水素酵素に抑制的に作用することが Da Vanzo ら<sup>5)</sup> によって報告されている。さらに Branham ら<sup>6)</sup> は雌ラットにこのものを 50~100mg/kg という極めて大量腹腔内投与 (以下 *i. p.* 投与) をおこなうと 8~16hrs 後に肝トリグリセリドの濃度が 3~5 倍に上昇し, 24hrs 後には対照群のそれと同じレベルになることを報告している。

しかし雌ラットについての報告はない。著者の成績では, 雌ラットについては Branham ら<sup>6)</sup> の成績とほぼ同様に肝トリグリセリドの上昇がみとめられたが, 雄ラットについては Dop. HCl 50~100mg/kg *i. p.* 投与後 2~36hrs では肝トリグリセリドレベルに変化はみとめられなかった。一方イスについては Ward ら<sup>7)</sup>

が雌雄の雑犬に Dop. HCl を 20mg/kg *i. p.* 投与したさい, 8~16hrs 後に肝トリグリセリドレベルが上昇することを報告している。

以上, 臨床的に使用される量よりも遙かに大量の Dop. HCl を動物に投与したさい, 一過性の急性脂肪肝発現がみとめられるという報告から, 今回著者は雌ラットを用いて Dop. HCl の肝脂質代謝に及ぼす影響について研究をおこなった。

#### 実験方法

体重 200g 前後の Wistar 系雌ラットをもちいた。動物はラット用固型飼料 (CLEA, CE 2) を自由に与えて飼育した。

Dop. HCl は A. H. Robins 社 (U. S. A.) より提供をうけ, 20mg/ml の生理食塩水溶液とした。1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸 (第一化学) は 4% 牛血清アルブミンの生理食塩水に溶かし, 15 $\mu$ Ci/ml とした。1-<sup>14</sup>C-酢酸ナトリウム (第一化学) は 40 $\mu$ Ci/40mg/ml の生理食塩水溶液とした。<sup>3</sup>H-ロイシン (第一化学) は 100 $\mu$ Ci/ml の生理食塩水溶液とした。Triton-WR1339 (R & H) は 200mg/ml の生理食塩水溶液とした。Dop. HCl の代謝物 (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> および M<sub>3</sub>) は名古屋大学工学部工業有機化学教室の飯塚欣二博士から提供をうけたものを 20mg/ml の生理食塩水溶液として使用した。なお M<sub>1</sub> は 1-ethyl-4-(2-N, N-dihydroxyethylaminoethyl)-

3,3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride, M<sub>2</sub> は 1-ethyl-4-(2-hydroxyethylaminoethyl)-3,3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride, M<sub>3</sub> は 1-ethyl-4-(2-aminoethyl)-3,3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride を示す。

実験当日、午前9時～9時30分の間に Dop. HCl を投与し、直ちにエサを除いた。

脂肪組織における lipolysis は基本的に Schotz ら<sup>8)</sup>の方法により、遊離脂肪酸の定量については宇井ら<sup>10)</sup>の方法によった。

肝における酢酸から脂肪酸への合成は 1-<sup>14</sup>C-酢酸ナトリウムをもちい、Lieber ら<sup>11)</sup>の方法により分画した脂肪酸分画中の <sup>14</sup>C 放射能より測定した。

肝における脂肪酸酸化は 1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸を肝スライスとインキュベイトし、生じた <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を Passman ら<sup>12)</sup>の方法により測定した。

肝および血漿中トリグリセリドは Flecher<sup>13)</sup>の方法を一部改変して定量した。

肝における脂肪酸からトリグリセリドへの合成は、1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸の肝トリグリセリドへの取りこみより測定した。

肝および血漿中トリグリセリドの分離はシリカゲル薄層クロマトグラフィーによりおこなった。

肝および血漿中蛋白は Schmidt-Thannhauser 法<sup>14)</sup>により分画した。

成 績

1. 末梢脂肪組織からの脂肪酸の動員

i) Dop. HCl 100mg/kg を *i. p.* 投与し、一定時間後に採取した卵巣付近の脂肪組織について lipolysis を検討した。Dop. HCl 投与後 2～16hrs に亘るいずれの時間に採取した脂肪組織においても対照に比し差はみとめられなかった。

ii) 卵巣付近の脂肪組織を Dop. HCl あるいはその代謝物 (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> および M<sub>3</sub>) を 10<sup>-3</sup>g/ml の濃度を含むメジウム中で 2hrs インキュベーションをおこない、遊離された脂肪酸量を測定した (表1)。

Epinephrine 10<sup>-4</sup>g/ml により lipolysis が 2 倍に促進される条件下で、Dop. HCl は 10<sup>-3</sup>g/ml の濃度でわずかに lipolysis を促進させる傾向を示した。一方 Dop. HCl の代謝物はいずれも lipolysis に影響を及ぼさなかった。

2. 肝における酢酸からの脂肪酸の合成

i) Dop. HCl 100mg/kg を *i. p.* 投与し、4, 8,

16hrs 後に 1-<sup>14</sup>C-酢酸ナトリウムを 20μCi *i. v.* 投与し、60min 後に肝を摘出した。肝脂肪酸分画における <sup>14</sup>C レベルは Dop. HCl 投与後 4, 16hrs においては対照群に比し、差はみとめられなかったが 8hrs 後においては対照の約 2 倍程度増加した (表2)。

ii) Dop. HCl 100mg/kg を *i. p.* 投与したのち、4, 8, 16hrs 後に採取した肝スライスにおける 1-<sup>14</sup>C-酢酸の脂肪酸への取りこみを検討した。Dop. HCl 投与後 2, 16hrs 後に採取した肝スライスにおいては対照に比し差はみとめられなかったが、4, 8hrs 後に採取した肝スライスにおいては、対照の 3～5 倍に増加した。

表 1 Dop. HCl ならびにその代謝物の末梢脂肪組織における lipolysis に及ぼす影響

脂肪組織を Dop. HCl あるいはその代謝物 10<sup>-3</sup>g/ml, あるいは epinephrine 10<sup>-4</sup>g/ml を含む Krebs Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) 中で、37°C, 3hrs インキュベーションをおこない、遊離脂肪酸を測定した。

	遊離脂肪酸量 (μEq/g-湿重量)
Control	3.12 ± 0.09
Dop. HCl	2.65 ± 0.63
M-1	3.92 ± 0.79
M-2	3.48 ± 0.48
M-3	3.12 ± 0.72
Epinephrine	6.06 ± 0.75*

数値は各群 3 サンプルの 平均値±標準偏差  
\* P<0.05

表 2 1-<sup>14</sup>C-酢酸の肝脂肪酸へのとりこみに及ぼす Dop. HCl の影響

Dop. HCl 100mg/kg *i. p.* 投与後、4, 8, 16hrs に <sup>14</sup>C-酢酸 20μCi を *i. v.* 投与し、60min 後に肝を採取して脂肪酸分画にとりこまれた <sup>14</sup>C 放射能を測定した。

Dop. HCl 投与後の時間 (hrs)	脂肪酸中の <sup>14</sup> C 放射能 (dpm × 10 <sup>6</sup> /g-肝湿重量)	
	対 照 群	Dop. HCl 投 与 群
4	5.417 ± 0.432	6.017 ± 0.199
8	4.519 ± 0.458	8.384 ± 0.900*
16	0.440 ± 0.068	0.441 ± 0.060

数値は 平均値±標準偏差  
\* P<0.05

iii) 正常ラットより調製した肝スライスを Dop. HCl あるいはその代謝物を  $10^{-3}g/me$  の濃度を含む  $1-^{14}C$ -酢酸ナトリウムと 3hrs インキュベイトし、 $1-^{14}C$ -酢酸の脂肪酸への取りこみを検討した。Dop. HCl の添加によってわずかに阻害の傾向がみとめられ、一方代謝物によりわずかに促進の傾向を示した。

3. 肝における脂肪酸の酸化

i) Dop. HCl  $100mg/kg$  *i. p.* 投与し、2, 4, 8, 16 hrs 後に採取した肝スライスを  $1-^{14}C$ -パルミチン酸と  $37^{\circ}C$ , 2hrs インキュベーションをおこない、生じた  $^{14}CO_2$  を測定した。Dop. HCl 投与後 2, 16hrs に採取した肝スライスにおける脂肪酸の酸化は対照に比し差はみとめられなかったが 4, 8hrs 後に採取した肝スライスにおいてはそれぞれおおよそ抑制された (図 1)。

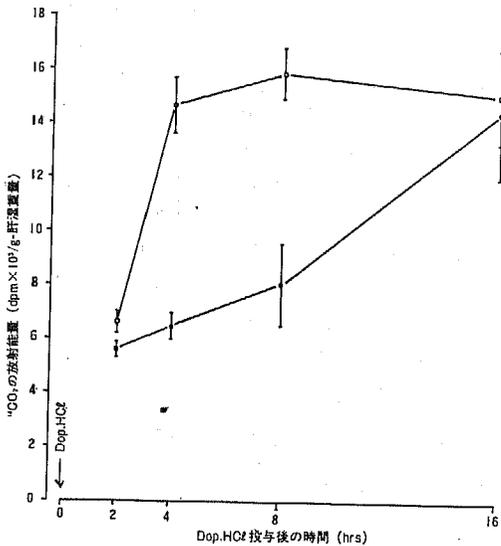


図 1 肝における  $1-^{14}C$ -パルミチン酸からの  $^{14}CO_2$  への酸化に及ぼす Dop. HCl の影響

Dop. HCl  $100mg/kg$  *i. p.* 投与後、2, 4, 8, 16 hrs に動物を殺し、採取した肝スライスを  $^{14}C$ -パルミチン酸を結合した牛血清アルブミンの Krebs Ringer phosphate buffer (pH 7.4) 4% 溶液中で  $37^{\circ}C$ , 2hrs インキュベーションをおこない、生じた  $^{14}CO_2$  の放射能を測定した。

- 対照群
- Dop. HCl 投与群

ii) 正常ラットより採取した肝スライスを、Dop. HCl あるいはその代謝物を  $10^{-3}g/me$  の濃度を含む

$1-^{14}C$ -パルミチン酸と  $37^{\circ}C$ , 2hrs インキュベーションをおこない、生じた  $^{14}CO_2$  を測定したが Dop. HCl およびその代謝物の添加はほとんど影響しなかった。

4. 肝におけるトリグリセリドの合成

i) Dop. HCl  $100mg/kg$  *i. p.* 投与後、2, 4, 8, 16, 24hrs 後に  $1-^{14}C$ -パルミチン酸  $25\mu Ci/kg$  *i. v.* 投与し、20min 後に肝を摘出した。肝トリグリセリドレベルおよび肝トリグリセリド中  $^{14}C$  レベルは、Dop. HCl 投与後 2hrs においては対照に比し、差がみとめられなかった。しかし Dop. HCl 投与後 4~8hrs においては肝トリグリセリドレベルは対照の 2 倍、16hrs では対照の 4~5 倍に増加した。一方、トリグリセリド中の  $^{14}C$  レベルは、Dop. HCl 投与後 4hrs において対照の 3 倍となり、8~16hrs には 4hrs のレベルよりわずかに低下するが、なお高いレベルにあり、24 hrs 後には対照群と差がみとめられなかった (図 2)。

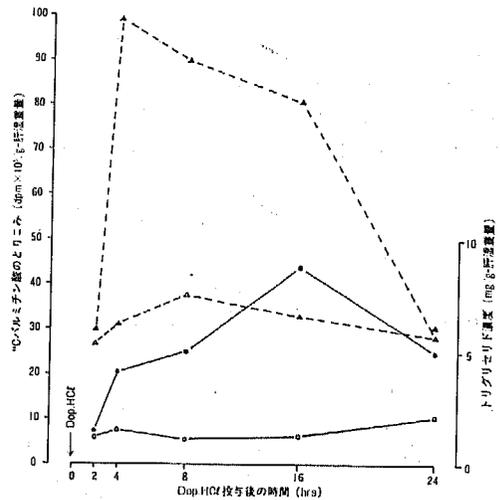


図 2 肝トリグリセリドの濃度および肝トリグリセリドへの  $1-^{14}C$ -パルミチン酸のとりこみに及ぼす Dop. HCl の影響

Dop. HCl  $100mg/kg$  を *i. p.* 投与し、2, 4, 8, 16, 24hrs 後に  $^{14}C$ -パルミチン酸  $25\mu Ci/kg$  *i. v.* 投与して 20min 後に肝を採取し、肝トリグリセリド濃度および肝トリグリセリド中の  $^{14}C$  放射能量を測定した。

- 対照群 (生理食塩水)
- Dop. HCl 投与群
- △.....△  $^{14}C$ -パルミチン酸のとりこみ
- ▲.....▲ 対照群 (生理食塩水)
- ▲.....▲ Dop. HCl 投与群

ii) Dop. HCl 25~150mg/kg *i. p.* 投与後 8hrs に  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸  $25\mu\text{Ci/kg}$  を *i. v.* 投与し, 60min 後に肝, 血液を採取した。肝トリグリセリドレベルおよび肝トリグリセリド中の  $^{14}\text{C}$  レベルは, Dop. HCl を 25~50mg/kg 投与したさいには対照に比し差はみとめられず, 100~150mg/kg の投与で上昇した。同時に採取した血漿中トリグリセリドのレベルはいずれの投与量においても対照に比し差がなかった。また血漿中遊離脂肪酸のレベルは 150mg/kg 投与群のみ上昇した (表 3)。

iii) Dop. HCl あるいはその代謝物 100mg/kg を *i. p.* 投与したのち, 2, 4, 8, 16, 24hrs 後に採取した肝スライスを  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸と 30min インキュベーションをおこない, トリグリセリド分画中  $^{14}\text{C}$  レベルを測定した。Dop. HCl 投与後 8hrs における肝スライスにおいてのみトリグリセリド中の  $^{14}\text{C}$  レベルは対照に比し上昇した。一方代謝物はいずれも影響がなかった。

肝トリグリセリドレベルは Dop. HCl 投与群については Dop. HCl 投与後 8~16hrs において上昇した。一方  $\text{M}_1$ ,  $\text{M}_2$  投与後 16hrs の肝においてトリグリセリドレベルが 2 倍に上昇したが  $\text{M}_3$  は影響がなかった。

iv) 正常ラットより採取した肝スライスを Dop. HCl  $10\text{-}^{29}\text{g/ml}$  を含むメジウム中で,  $37^\circ\text{C}$ , 30, 60, 120min プレインキュベーションをおこなったのち,  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸を加え, 30min インキュベーションをおこなったさいのトリグリセリド分画中  $^{14}\text{C}$  レベルを測定した。

また Dop. HCl あるいはその代謝物を  $10^{-3}\sim 10^{-6}\text{g/ml}$  の濃度に  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸とともにメジウムに加え,  $37^\circ\text{C}$ , 30min インキュベーションをおこない, トリグリセリド分画中  $^{14}\text{C}$  レベルを測定した。以上の実験において Dop. HCl あるいはその代謝物はいずれも  $^{14}\text{C}$ -パルミチン酸のトリグリセリドへのとりこみに影響がなかった。

#### 5. 肝トリグリセリドの血中への分泌

i) Dop. HCl 100mg/kg *i. p.* 投与後 8hrs に  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸  $25\mu\text{Ci/kg}$  を *i. v.* 投与し, 20, 40, 60, 90, 120min 後に肝および血液を採取してトリグリセリド分画中の  $^{14}\text{C}$  レベルを測定した。肝, 血漿いずれのトリグリセリド分画についても Dop. HCl 投与群における  $^{14}\text{C}$  レベルは対照群より高い値を示した (表 4)。

ii) Triton WR-1339 100mg を *i. v.* 投与し, 直ちに Dop. HCl 100mg/kg を *i. p.* 投与したのち, 2, 4, 8, 16hrs 後に  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸を *i. v.* 投与し, 60min 後に, 肝, 血液を採取してトリグリセリドレベルおよびトリグリセリド分画中  $^{14}\text{C}$  レベルを測定した。肝におけるトリグリセリドレベルおよびトリグリセリドへの  $^{14}\text{C}$  のとりこみは Dop. HCl のみ投与したさい (図 2) とほぼ同様のパターンで対照群に比し増加した。しかし増加の程度は, 肝トリグリセリドレベルに関しては Triton-Dop. HCl 投与後 4hrs で対照群の 3 倍, 8hrs で 10 倍, 16hrs で 3 倍と高く, また肝トリグリセリドへの  $^{14}\text{C}$  の取りこみに関しても, 8hrs 後で対照群の 3 倍, 16hrs 後で 8 倍と高い値を示した。

表 3 Dop. HCl の肝, 血漿中トリグリセリド濃度, 血漿遊離脂肪酸濃度および  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -パルミチン酸の肝トリグリセリドへのとりこみに及ぼす影響

Dop. HCl 25~150mg/kg を *i. p.* 投与し, 8hrs 後に  $^{14}\text{C}$ -パルミチン酸  $25\mu\text{Ci/kg}$  を *i. v.* 投与し, 60min 後に, 肝, 血液を採取した。

Dop. HCl 投与量 (mg/kg)	肝トリグリセリド濃度 (mg/g-肝湿重量)	肝トリグリセリド中の $^{14}\text{C}$ 放射能量 (dpm $\times 10^6$ /g-肝湿重量)	血漿トリグリセリド濃度 (mg/dl)	血漿遊離脂肪酸濃度 (mEq/l)
Saline	12.16 $\pm$ 1.73	3.724 $\pm$ 0.693	85.02 $\pm$ 33.60	0.7379 $\pm$ 0.1355
25	12.22 $\pm$ 1.26	3.123 $\pm$ 0.098	90.96 $\pm$ 16.71	0.8812 $\pm$ 0.0416
50	16.57 $\pm$ 2.14	3.736 $\pm$ 0.333	77.12 $\pm$ 4.15	0.8912 $\pm$ 0.1189
100	34.17 $\pm$ 7.34*	10.393 $\pm$ 2.224*	96.48 $\pm$ 4.23	0.7715 $\pm$ 0.1828
150	58.70 $\pm$ 3.09**	39.680 $\pm$ 3.967**	96.28 $\pm$ 7.54	2.3972 $\pm$ 0.2798***

数値は 平均値  $\pm$  標準偏差

\*  $P < 0.05$

\*\*  $P < 0.01$

\*\*\*  $P < 0.001$

表 4 1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸投与後の肝, 血漿トリグリセリド中 <sup>14</sup>C 放射能に及ぼす Dop. HCl の影響

Dop. HCl 100mg/kg *i. p.* 投与後 8hrs に <sup>14</sup>C-パルミチン酸 25 $\mu$ Ci/kg を *i. v.* 投与し, パルミチン酸投与後, 20, 40, 60, 90, 120min 後に肝, 血液を採取した。

1- <sup>14</sup> C-パルミチン酸 投与後の時間 (min)	肝トリグリセリド中の <sup>14</sup> C 放射能 (dpm $\times$ 10 <sup>3</sup> /g-肝湿重量)		血漿トリグリセリド中の <sup>14</sup> C 放射能 (dpm $\times$ 10 <sup>3</sup> /ml-血漿)	
	対 照 群	Dop. HCl 投与群	対 照 群	Dop. HCl 投与群
20	1.962 $\pm$ 0.027	4.014 $\pm$ 0.019*	3.241 $\pm$ 0.024	3.960 $\pm$ 0.056
40	1.677 $\pm$ 0.111	4.572 $\pm$ 0.493*	2.482 $\pm$ 0.755	3.982 $\pm$ 1.015
60	1.611 $\pm$ 0.120	4.462 $\pm$ 0.221*	2.236 $\pm$ 0.699	3.415 $\pm$ 1.057
90	1.788 $\pm$ 0.312	3.789 $\pm$ 0.495*	1.006 $\pm$ 0.023	1.732 $\pm$ 0.191
120	0.816 $\pm$ 0.166	3.831 $\pm$ 0.459*	0.276 $\pm$ 0.038	1.096 $\pm$ 0.226

数値は 平均値  $\pm$  標準偏差

\* P < 0.05

血漿中トリグリセリド分画中の <sup>14</sup>C レベルは Triton-Dop. HCl 投与後 4hrs において対照の  $\frac{1}{2}$  以下に低下したが, 2, 8, 16hrs においては対照群に比し差がみとめられなかった (表 5)。

表 5 Triton 処置ラットにおける 1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸のトリグリセリドへの移行に及ぼす Dop. HCl の影響

Triton 100mg *i. v.*, Dop. HCl 100mg/kg *i. p.* 投与後, 2, 4, 8, 16hrs に <sup>14</sup>C-パルミチン酸 25  $\mu$ Ci/kg *i. v.* 投与し, パルミチン酸投与後 60min に全血を採取した。

Dop. HCl 投与後の時間 (hrs)	血漿トリグリセリド中の <sup>14</sup> C 放射能 (dpm $\times$ 10 <sup>3</sup> /ml-血漿)	
	対 照 群	Dop. HCl 投 与 群
2	6.915 $\pm$ 0.046	6.290 $\pm$ 2.369
4	5.385 $\pm$ 0.351	1.619 $\pm$ 0.024*
8	0.883 $\pm$ 0.461	1.040 $\pm$ 0.129
16	0.845 $\pm$ 0.574	0.352 $\pm$ 0.061

数値は 平均値  $\pm$  標準偏差

\* P < 0.05

血漿中トリグリセリドレベルは Triton-Dop. HCl 投与後 2, 4hrs では対照群に比して差がなく, 8, 16 hrs 後に対照群の 2 倍に上昇した (図 3)。

iii) Triton-Dop. HCl を投与したのち, 2, 4, 8, 16hrs 後に <sup>3</sup>H-ロイシン 40 $\mu$ Ci を *i. p.* 投与し, 60min 後に肝, 血液を採取して蛋白分画中の <sup>3</sup>H レベルを測定した。肝蛋白分画における <sup>3</sup>H レベルは Triton-Dop. HCl 投与後 2~16hrs 後のいずれの時間におい

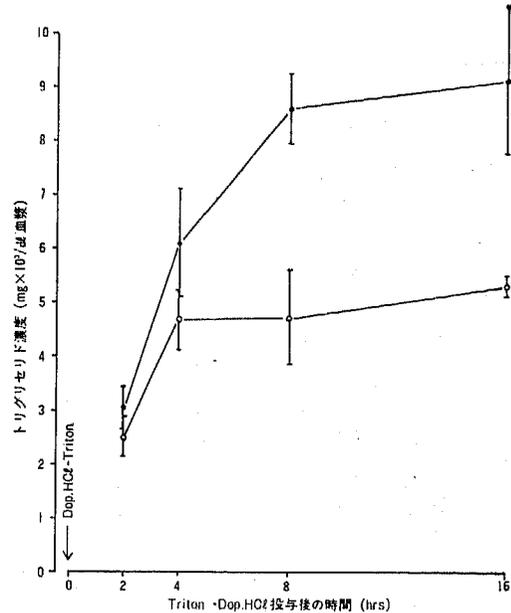


図 3 Triton WR-1339 処置ラットにおける血漿中トリグリセリドの濃度に及ぼす Dop. HCl の影響

Triton 100mg *i. v.*, Dop. HCl 100mg/kg *i. p.* 投与後, 2, 4, 8, 16hrs 後に採取した血漿中トリグリセリドを測定した。

- 対照群 (Triton)
- Triton-Dop. HCl 投与群

ても対照に比し, 低い値を示した。とくに 4hrs 後のレベルは対照群の  $\frac{1}{2}$  であった。

血漿蛋白分画における <sup>3</sup>H-レベルは Triton-Dop.

HCl 投与後 2hrs においては対照に比し差がなかったが 4hrs 後にはもととなり、8, 16hrs においても対照群より低レベルにあった。

### 考 察

Branham ら<sup>6)</sup>は Dop, HCl 50~100mg/kg を雌ラットに *i. p.* 投与をおこなうと 8~16hrs 後に急性脂肪肝が発現することを報告しており、著者もこの現象を確認している。今回 Dop, HCl による脂肪肝発現について次の項目に及ぼす Dop, HCl の影響を検討した。

- 1) 末梢脂肪組織における lipolysis
- 2) 肝における酢酸から脂肪酸への合成
- 3) 肝における脂肪酸酸化
- 4) 肝における脂肪酸からトリグリセリドへの合成
- 5) 肝からのトリグリセリドの血漿中への分泌

Dop, HCl の脂肪組織における lipolysis に及ぼす影響については、Dop, HCl を *in vivo* に投与したさいにも、また Dop, HCl あるいはその代謝物を *in vitro* に加えた場合にも影響がみとめられなかった。

貯蔵脂肪からの脂肪酸の動員がおこなわれる条件下では、血中の遊離脂肪酸レベルが上昇することが報告されている<sup>15)</sup>。今回の実験において、Dop, HCl 100 mg/kg を投与したさい、血漿中遊離脂肪酸のレベルには変化がみとめられなかった。Dop, HCl 150mg/kg *i. p.* 投与によりはじめて血漿中遊離脂肪酸のレベルは上昇した。したがって Dop, HCl による急性脂肪肝発現に関し、末梢脂肪組織からの脂肪酸の動員が大きく関与しているとは考え難い。

Dop, HCl の 1-<sup>14</sup>C-酢酸から脂肪酸への合成に及ぼす影響については、Dop, HCl 投与後 4hrs に <sup>14</sup>C-酢酸を *i. v.* 投与したさいにも、また Dop, HCl 投与後 4, 8hrs 後に採取した肝を <sup>14</sup>C-酢酸とインキュベイトしたさいにも、肝脂肪酸分画への <sup>14</sup>C のとりこみは増加した。しかし正常ラット肝を Dop, HCl あるいはその代謝物を含むメジウム中で <sup>14</sup>C-酢酸とインキュベーションをおこなっても <sup>14</sup>C の脂肪酸分画へのとりこみは増加しなかった。Dop, HCl を *in vivo* に投与したさいみられる肝における脂肪酸の合成増加は、トリグリセリド合成基質の供給という意味で脂肪肝発現に関与している可能性が大であると思われる。

Dop, HCl の脂肪酸酸化に及ぼす影響については、Dop, HCl 投与後 4, 8hrs に採取した肝スライスにおいて脂肪酸の酸化が抑制された。この成績は先に述べ

た脂肪酸の合成促進と同様、トリグリセリド合成基質の供給という意味で脂肪肝発現に関与しているものと思われる。

Dop, HCl 投与後の肝トリグリセリドレベルの上昇と、1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸のトリグリセリドへのとりこみはよく相関した。すなわち Dop, HCl 投与後 4hrs において <sup>14</sup>C のとりこみは最高に達し、以後 16hrs まで高いレベルを維持しているがそれに伴って肝トリグリセリドのレベルが上昇している。また、Dop, HCl 投与後 24hrs においては <sup>14</sup>C のとりこみは対照のレベルに戻っている。このさい肝のトリグリセリドレベルは低下はしているがなお対照の 2 倍のレベルにあった。

さらに Dop, HCl 50mg/kg 以下を投与したさいには脂肪肝は発現しない。このさい 1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸の肝トリグリセリドへのとりこみも増加しない。

Dop, HCl 投与後 8hrs に 1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸を投与し、肝および血漿中トリグリセリド分画の <sup>14</sup>C レベルをパルミチン酸投与後経時的に検討した成績において、肝および血漿いずれに関しても Dop, HCl 投与群におけるトリグリセリド中 <sup>14</sup>C レベルは対照群に比し、高いレベルにあった。

Triton-WR 1339 を *i. v.* 投与すると、血漿中リポ蛋白の加水分解、組織への移行が長時間に亘って阻害されることが知られている<sup>16,17)</sup>。Triton-Dop, HCl 投与後一定時間における 1-<sup>14</sup>C-パルミチン酸の肝、血漿中トリグリセリドへのとりこみは、肝においては対照に比して増加したが血漿においてはむしろ低下した。このさい肝トリグリセリドレベルは上昇し、血漿トリグリセリドレベルは対照と差がなかった。したがって Dop, HCl の投与により肝トリグリセリドの血漿中への分泌は抑制されているものと思われる。

Triton 処置したさいに血漿中トリグリセリドへの <sup>14</sup>C-パルミチン酸の移行阻害がみとめられた点については、Dop, HCl のみ投与したラットにおいて、肝より血中へ分泌された <sup>14</sup>C-トリグリセリドは血中で速やかに加水分解され、あるいは組織にとりこまれることにより、肝からの分泌と血中 <sup>14</sup>C-トリグリセリドのレベルとが必ずしも相関しない故であろうと思われる。<sup>3</sup>H-ロイシン投与後、肝、血漿蛋白分画の <sup>3</sup>H レベルを測定したが、Dop, HCl 投与群は肝および血漿いずれにおいても、また Dop, HCl 投与後いずれの時間においても、蛋白分画の <sup>3</sup>H レベルは対照に比し、低い値を示した。とくに血漿に関しては <sup>14</sup>C-パルミチン酸

の血漿トリグリセリドへの移行が最低となる Dop. HCl 投与後 4hrs において、<sup>3</sup>H-ロイシンの血漿蛋白へのとりこみも最低となり、みかけ上一致した。肝トリグリセリドの血漿への移行は  $\beta$ -リポ蛋白の形でおこなわれ、ethionine<sup>18)</sup>、puromycine<sup>19)</sup>などの蛋白合成阻害剤が脂肪肝を発現させることが知られている。<sup>3</sup>H-ロイシンを *in vivo* に投与したさい、蛋白分画中の <sup>3</sup>H レベルがただちに蛋白合成を表わすとは云えないが<sup>14</sup>C-トリグリセリドの血漿中への移行と時間的に一致した事実は興味深い。

以上 Dop. HCl による急性脂肪肝について述べたが、Dop. HCl による肝トリグリセリドレベルの一過性上昇は、Dop. HCl を *in vivo* に投与したさい、肝における脂肪酸の合成系、脂肪酸の酸化系、トリグリセリドの合成系、肝トリグリセリドの血漿への分泌系がすべて肝トリグリセリドレベルを上昇させる方向に反応が進むことにより発現する。そのうちトリグリセリドの合成は肝トリグリセリドのレベルとよく相関し、Dop. HCl による促進は対照の10倍にも達することから、もっとも大きく関与しているものと思われる。

また脂質代謝に及ぼす Dop. HCl の影響は Dop. HCl あるいはその代謝物を *in vitro* に加えたさいにはみとめられなかった。これらの成績は Dop. HCl による脂肪肝発現が Dop. HCl あるいはその代謝物の直接作用による可能性のほとんどないことを思わせる。Dop. HCl は間接的に、たとえば神経系、内分泌系を介して影響を与える可能性が考えられ、今後この方面から研究を進める必要があると思われる。

### 総 括

Doxapram hydrochloride (以下 Dop. HCl) の雌ラットにおける肝トリグリセリド上昇作用について検討した。

Dop. HCl を *in vivo* に投与したさい、

1. Dop. HCl は末梢脂肪組織の脂肪酸動員にほとんど影響がなかった。
2. Dop. HCl は肝における酢酸から脂肪酸への合成を促進した。
3. Dop. HCl は肝における脂肪酸の酸化を抑制した。
4. Dop. HCl は肝におけるトリグリセリドの合成を促進した。
5. Dop. HCl は Triton-WR 1339 処置ラットに

において肝トリグリセリドの血漿中への移行を顕著に抑制した。

正常動物より摘出した組織に Dop. HCl を加えたさいには何らの影響もみとめられなかった。

### 文 献

- 1) Canter, H. G.: Comparative study of three respiratory stimulants in chronic obstructive emphysema. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 87: 830-835, 1963
- 2) Klemm, W. R.: Physiologic responses to equivalent doses of doxapram and various analeptic combinations in acute barbiturate narcosis in dogs. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 8: 505-511, 1964
- 3) 久我哲郎, 内藤 惇: 1-Ethyl-4-(2-morpholinoethyl)-3,3-diphenyl-2-pyrrolidinone hydrochloride (Doxapram) の薬理作用. *日薬理誌*, 69: 702-710, 1973
- 4) Siker, E. S., Mustafa, K. and Wolfson, B.: The analeptic effects of doxapram hydrochloride on thiopentone induced depression. *Brit. J. Anaesth.*, 36: 216-223, 1964
- 5) Da Vanzo, J. P., Kline, E. S., Kang, L. S., Watterson, J. P. and Ward, J. W.: Species dependent effects of doxapram hydrochloride on alcohol dehydrogenase activity. *Europ. J. Pharmacol.*, 6: 152-162, 1969
- 6) Branham, G. W. and Wooles, W. R.: Hepatic lipid alterations produced by doxapram. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 9: 347-355, 1966
- 7) Ward, J. P., Gilbert, D. L., Franko, V. and Woodard, G.: Toxicologic studies of doxapram hydrochloride. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 13: 242-250, 1968
- 8) Schotz, M. C. and Page, I. H.: Effect of adrenergic blocking agents on the release of free fatty acids from rat adipose tissue. *J. Lipid Res.*, 1: 466-498, 1959
- 9) 武田隆幸: Doxapram hydrochloride の代謝物に関する研究. *信州医誌*, 21: 549-560, 1973
- 10) Itaya, K. and Ui, M.: Colorimetric determination of free fatty acid in biological fluids. *J. Lipid Res.*, 6: 16-20, 1965

- 11) Lieber, C. S. and Schmid, R. : The effect of ethanol on fatty acid metabolism ; Stimulation of hepatic fatty acid synthesis in vitro. *J. clin. Invest.*, 40 : 394-399, 1961
- 12) Passman, J. M., Radin, N. S. and Cooper, J. A. : Liquid scintillation technique for measuring carbon-14-dioxide activity. *Analyt. Chem.*, 28 : 484-486, 1956
- 13) Flecher, M. J. : A colorimetric method for estimating serum triglyceride. *Clin. chim. Acta*, 22 : 393-397, 1968
- 14) Schmidt, G. and Thannhauser, S. J. : A method for determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissue. *J. biol. Chem.*, 161 : 83-89, 1945
- 15) Fredrickson, D. S. and Gordon, R. S. : Transport of fatty acid. *Physiol. Rev.*, 38 : 585-630, 1958
- 16) Friedman, M. and Byers, S. O. : Mechanism underlying hypercholesteremia induced by triton WR-1339. *Amer. J. Physiol.*, 190 : 439-445, 1957
- 17) Recknagel, R. O., Lombardi, B. and Schotz, M. C. : A new insight into pathogenesis of carbon tetrachloride fat infiltration. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 104 : 608-610, 1960
- 18) Ugatio, G. and Lombardi, B. : Serum lipoproteins in rats with ethionine-induced fatty liver. *Lab. Invest.*, 14 : 711-719, 1965
- 19) Robinson, D. S. and Seakins, A. : The development in the rat of fatty livers associated with reduced plasma-lipoprotein synthesis. *Biochim. biophys. Acta*, 62 : 163-165, 1962

(1974. 5. 2 受稿)