

ラット血中および肝内酵素活性に及ぼす Cefamandole の影響：

GPT 活性低下機作の解析

松原尚志・戸内明

塩野義製薬株式会社研究所

ラットに大量の Cefamandole および Cefazolin を投与し、血漿中および肝組織中の数種の酵素活性の変動を検討した。血漿中の GPT 活性は Cefamandole 投与 15~30 分後に著しく低下したが、その後回復し、投与 2 時間後には正常レベルにまで戻った。他方、Cefazolin の投与で血漿 GPT 活性は時間とともに徐々に低下し、投与 1~2 日後でも非常に低い活性を示した。この低下した酵素活性の回復には 3~4 日間を要した。

Cefamandole の連続投与では肝内 GPT 活性に影響はみられなかったが、Cefazolin の 2~3 日間の連続投与によっては血漿および肝臓中の GPT 活性がともに低下した。

GPT 以外の肝臓内酵素活性は、両剤ともにほとんど影響を与えなかった。

肝 cytosol の GPT に対し、両剤は *in vitro* の系で活性阻害を示した。これらの結果から Cefamandole および Cefazolin は、直接 GPT 酵素に作用して活性阻害をひき起こすと結論できた。Cefazolin については、他の要因も関与して GPT 活性を著しく低下させるものと推論できた。

血清酵素の S-GOT および S-GPT は肝臓やその他いくつかの臓器から漏出てきたものであることが知られているが、肝障害時にこれらの酵素活性が増大することから肝機能の検査項目の一つとして血清酵素活性の測定が広くおこなわれている¹⁾。ところが、セファロスポリン系抗生物質である Cefamandole sodium (以下 CMD と略) や Cefazolin sodium (以下 CEZ と略) を実験動物(ラット)に大量投与すると、S-GPT 活性が特異的に低下することが見出され²⁾、一般的な概念からは説明困難な成績が得られている。また、イスでの亜急性毒性試験時にも、CEZ や CMD の投与で S-GPT 活性および肝組織内の GPT 活性がともに特異的に低下することが確かめられている³⁾。このような結果は動物種差に関係なく、CMD や CEZ が生体内の GPT 酵素に対して特異的に影響を及ぼしているように考えられたので、ラットを用いて CMD や CEZ による GPT 活性の低下機構についていくらかの検討をおこなった。

実験方法

1. 実験動物

実験には、静岡県実験動物農協産の雄性 SLC SPRAGUE-DAWLEY 系 SPF ラットを用いた。動物を恒温 (24 ± 1 °C)、恒湿 (55 ± 10%) の飼育室で飼料(日本クレア製 CA-1 固形飼料)と飲料水を自由に摂取させて 1 週間飼育し、実験環境に順応した 9 週令の動物を実験に供した。

2. 検体の調製および投与

CMD および CEZ は 0.8%, NaCl に溶解し、エーテル麻酔下でラット尾静脈に 0.5 ml/min. の速度で注入した。投与液中の検体濃度は実験群ごとに異なり、投

与液の容量が 0.666 ml/100 g となるように検体濃度を調整した。対照群のラットには 0.8% NaCl 溶液を 0.666 ml/100 g の割合で投与した。

3. 測定試料の採取および調製

検体投与一定時間後にラットを断頭屠殺し、放血される血液を集めて血漿の分離をおこなった。また、肝組織の採取も同時におこない、採取した試料は活性測定時まで -20°C で凍結保存した。酵素活性の測定は、試料採取後 1 週間以内におこなった。

活性測定時に凍結した肝組織を室温で融解した後に、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を含む 0.25 M Sucrose 中でホモジナイズし、組織濃度が 100 mg eq./ml のホモジェネイトを作製した。このホモジェネイトを 2 枚のガーゼを用いて濾過し、得られた濾液を酵素活性測定用の試料として用いた。また、ラット肝ホモジェネイトを 105,000 × g で 60 分間遠心し、その上清部分を採取して肝 cytosol 分画として実験に供した。

4. 酵素活性の測定

肝組織中の cytochrome P-450 含量、アニリン水酸化活性およびアミノピリン脱メチル化活性は、既報の方法⁴⁻⁶⁾ に従って測定した。

肝組織および血漿中の酸性フォスファターゼ活性は、BESSEY らの方法⁷⁾ をいくらか変更して求めた。すなわち、4 mg *p*-nitrophenyl phosphate を含む 50 mM citrate-HCl buffer (pH 4.4) (全量 0.9 ml) に 0.1 ml の血漿または肝ホモジェネイト (0.5 mg eq.) を添加して反応を開始した。37°C で 30 分間反応させた

後に 0.1 N NaOH (4 ml) を加えて反応を停止し、生成した *p*-nitrophenol を 410 nm で比色定量した。

肝組織および血漿中の GPT 活性は、WEOBLEWSKI-KARMEN 法⁹⁾ を改良し 30°C で求めた。すなわち、アラニン (0.2 millimoles), NADH (0.4 mg) および LDH (10 I. U.) を含む 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) の反応系 (全量 2.6 ml) に 0.2 ml の肝ホモジェネイト (1 mg eq.) または血漿を添加して盲検値を求めた後に、0.2 ml の 0.2 M α -ケトグルタル酸を添加して NADH の酸化速度を経時的に 340 nm の吸光度変化として記録した。酵素活性は NADH の酸化速度として表わし、NADH の量は分子吸光係数を $6.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として求めた⁹⁾。GOT 活性も GPT 活性測定の場合と同様の方法で求めた。ただし、GOT 活性測定の場合にはアラニンの代わりにアスパラギン酸を、また LDH の代わりに MDH (0.05 mg) を反応系に添加した。

肝 cytosol の蛋白量は Biuret 法¹⁰⁾ で測定した。

実験結果

1. CMD および CEZ の 1 回投与実験

CMD や CEZ 投与動物で S-GPT 活性の特異的な低下現象が観察されているので、その機構を明らかにするために、ラットに大量 (1~4 g/kg) の CMD および CEZ を 1 回投与し、2 日後の体重、肝重量、血漿および肝組織中の数種の酵素活性等について検討した。大量の CMD の投与によっても体重には変動がみられなかったが、肝重量は有意の低下を示した。血漿および肝組織中の GPT 活性も、CMD の 1 回投与によっては影

響がみられなかったが、肝臓中の GOT 活性は CMD 投与動物で増大の傾向を示した。小胞体膜局在の cytochrome P-450 含量は CMD の投与で変動を示さなかったが、アニリン水酸化活性は薬物投与動物で低下の傾向を示した (Table 1)。

ラットに大量の CEZ を投与すると、体重、肝重量ともにわずかではあるが減少の傾向を示した。血漿および肝臓中の GOT 活性は変動を示さなかったが、血漿中の GPT 活性は有意に低下することが確かめられた。けれども、肝細胞中の GPT 活性はこのような実験条件下では変動を示さなかった。肝臓中の薬物水酸化酵素系の機能 (cytochrome P-450 含量, アニリン水酸化反応およびアミノピリン脱メチル化反応の活性) も、CEZ の投与によってはほとんど影響をうけなかった (Table 2)。

2. CMD および CEZ の連続投与実験

Table 1 および 2 に示すように、ラットに大量の検体を投与しても、1 回投与実験では CEZ 投与動物で血漿中の GPT 活性が低下したのみで、CMD 投与動物では変動がみられなかった。このような結果は、GPT 活性の低下した亜急性毒性試験時の結果^{2,3)} とは異なるので、その点を明らかにする目的で、ラットに大量 (2 g/kg) の CMD および CEZ を 1 日 1 回の割合で 1~3 日間連続投与し、最終投与 2 日後の動物について血漿および肝組織の酵素活性を検討した。

Table 3 に示すように、CMD の連続投与によっても、1 回投与 (Table 1) の場合と同様にラットにはほとんど変動が認められなかった。一方、CEZ の連続投与をおこなった場合には、血中および肝臓中の GOT 活性に

Table 1 Plasma and liver enzyme activities in rats after single intravenous administration of various amounts of CMD

	Control	Administration of CMD at the dose of			
		1 g/kg	2 g/kg	3 g/kg	4 g/kg
Body weight (g)	309 ± 2	309 ± 7	314 ± 5	305 ± 4	317 ± 2
Liver weight (g) (% of B.W.)	13.6 ± 0.7 4.26 ± 0.18	11.2 ± 0.6* 3.60 ± 0.11*	11.2 ± 0.5* 3.51 ± 0.10*	11.0 ± 0.3* 3.52 ± 0.12*	11.6 ± 0.4 3.61 ± 0.11*
Plasma GPT activity (nmol/min./ml)	21.6 ± 1.4	23.4 ± 1.0	25.7 ± 1.5	27.3 ± 1.4	27.3 ± 1.4
Liver transaminase activity (nmol/min./mg)					
GOT	96 ± 6	109 ± 11	126 ± 9*	133 ± 11*	139 ± 9*
GPT	31.0 ± 3.2	29.3 ± 1.9	27.9 ± 2.1	26.9 ± 3.0	28.5 ± 0.6
Liver drug-metabolizing enzyme system					
Cytochrome P-450 content (nmol/g)	53.0 ± 2.5	55.3 ± 2.9	47.8 ± 2.1	50.7 ± 3.0	57.1 ± 3.0
Aniline hydroxylase activity (nmol/min./g)	31.3 ± 0.8	30.9 ± 2.6	26.4 ± 1.3*	25.5 ± 2.1*	22.6 ± 1.7**

The values in the table represent the mean ± S.E. of 4 animals.

Significantly different from control group: * (p < 0.05) ** (p < 0.01)

Table 2 Plasma and liver enzyme activities in rats after single intravenous administration of various amounts of CEZ

	Control	Administration of CEZ at the dose of			
		1 g/kg	2 g/kg	3 g/kg	4 g/kg
Body weight (g)	341 ± 10	328 ± 4	321 ± 7	326 ± 6	317 ± 2
Liver weight (g) (% of B.W.)	14.1 ± 0.8 4.14 ± 0.06	13.0 ± 0.4 3.98 ± 0.11	12.9 ± 0.6 4.03 ± 0.15	13.1 ± 0.2* 4.01 ± 0.12	12.9 ± 0.5 4.08 ± 0.17
Plasma enzyme activity (nmol/min./ml)					
GOT	87 ± 8	92 ± 6	85 ± 5	115 ± 11	90 ± 8
GPT	29.3 ± 0.4	24.4 ± 1.2**	18.4 ± 1.3**	22.4 ± 1.0**	20.1 ± 2.0**
Liver transaminase activity (nmol/min./mg)					
GOT	132 ± 10	136 ± 12	132 ± 2	123 ± 8	135 ± 3
GPT	44.8 ± 4.6	39.2 ± 3.7	43.8 ± 1.2	37.0 ± 2.1	40.2 ± 4.0
Liver drug-metabolizing enzyme system					
Cytochrome P-450 content (nmol/g)	54.9 ± 0.9	63.8 ± 3.6	61.2 ± 2.4	55.4 ± 2.8	54.6 ± 4.7
Aniline hydroxylase activity (nmol/min./g)	41.1 ± 3.3	38.6 ± 3.9	41.2 ± 1.4	34.2 ± 2.1	36.4 ± 3.8
Aminopyrine N-demethylase activity (μmol/min./g)	1.42 ± 0.05	1.42 ± 0.10	1.48 ± 0.02	1.36 ± 0.06	1.48 ± 0.07

The values in the table represent the mean ± S.E. of 4 animals.

Significantly different from control group: * (p < 0.05) ** (p < 0.01)

Table 3 Alterations of plasma and liver enzyme activities in rats following successive intravenous administrations of CMD

	Control	Administrations of CMD for		
		1 day	2 days	3 days
No. of rat	4	5	5	5
Body weight (g)	331 ± 7	340 ± 8	335 ± 10	331 ± 7
Liver weight (g) (% of B.W.)	14.1 ± 0.4 4.26 ± 0.06	12.8 ± 0.5 3.75 ± 0.07**	13.2 ± 0.6 3.92 ± 0.08*	13.4 ± 0.3 4.05 ± 0.08
Plasma enzyme activity (nmol/min./ml)				
GOT	70 ± 4	79 ± 7	80 ± 9	76 ± 6
GPT	27.6 ± 1.2	30.0 ± 1.4	30.8 ± 1.6	31.8 ± 1.4
Liver transaminase activity (nmol/min./mg)				
GOT	114 ± 4	121 ± 5	130 ± 6	115 ± 6
GPT	35.3 ± 5.5	34.0 ± 2.1	34.8 ± 3.2	30.1 ± 2.8
Liver drug-metabolizing enzyme system				
Cytochrome P-450 content (nmol/g)	55.8 ± 2.2	53.8 ± 2.5	48.4 ± 2.7	54.4 ± 2.5
Aniline hydroxylase activity (nmol/min./g)	30.9 ± 3.9	28.4 ± 2.5	25.3 ± 1.7	26.1 ± 2.3

The values in the table represent the mean ± S.E.

Significantly different from control group: * (p < 0.05) ** (p < 0.01)

は大きな影響が認められなかったが、血漿および肝組織中の GPT 活性はともに著しい活性低下を示した。特に肝臓中の GPT 活性の低下は投与回数と関連性を示し、投与回数が多いほど活性は低値を示した。肝薬物水酸化酵素系の機能は、CEZ の連続投与によっても全く影響が認められなかった (Table 4)。

3. CMD および CEZ の投与直後の影響

ラットに CMD および CEZ を 1 回投与した実験 (Table 1 および 2) および連続投与実験 (Table 3 および 4) とともに最終投与 2 日後の動物で、生体内の酵素活性変動を検討してきた。ところで、実験動物に 20 ~ 100 mg/kg の CMD および CEZ を 1 回投与した後

Table 4 Alterations of plasma and liver enzyme activities in rats following successive intravenous administrations of CEZ

	Control	Administrations of CEZ for		
		1 day	2 days	3 days
No. of rat	5	4	5	5
Body weight (g)	323 ± 7	319 ± 3	324 ± 7	321 ± 2
Liver weight (g) (% of B.W.)	13.6 ± 0.7 4.21 ± 0.11	12.3 ± 0.4 3.85 ± 0.08*	12.6 ± 0.4 3.88 ± 0.12	12.6 ± 0.3 3.93 ± 0.09
Plasma enzyme activity (nmol/min./ml)				
GOT	76 ± 10	66 ± 6	77 ± 8	65 ± 5
GPT	28.4 ± 0.5	15.1 ± 0.2**	18.9 ± 1.0**	16.9 ± 0.7**
Liver transaminase activity (nmol/min./mg)				
GOT	133 ± 5	160 ± 6**	148 ± 6	142 ± 4
GPT	43.6 ± 2.7	41.2 ± 4.2	36.4 ± 1.5*	31.1 ± 1.3**
Liver drug-metabolizing enzyme system				
Cytochrome P-450 content (nmol/g)	58.9 ± 1.4	62.1 ± 1.9	60.9 ± 2.1	58.0 ± 3.3
Aniline hydroxylase activity (nmol/min./g)	34.7 ± 2.5	35.2 ± 2.1	31.6 ± 1.6	31.3 ± 1.2

The values in the table represent the mean ± S.E.

Significantly different from control group: * ($p < 0.05$) ** ($p < 0.01$)

の体内からの排泄は比較的速く、CMD では2~3時間、CEZ では5~6時間で投与した薬物のほとんど大部分が体外に排出されてしまうことが報告されている¹¹⁾。したがって、検体投与2日後には、大量投与(2 g/kg)であっても生体内にCMDやCEZの残存する可能性はほとんどないものと考えられた。そこで、生体内に検体の存在する検体投与直後の酵素活性変動について検討した。

ラットにCMDを2 g/kgの割合で投与し、注入開始時の15分後から24時間後までの間に測定試料を採取して酵素活性の測定をおこなった。CMD投与15~60分後に肝重量がいくらか減少する傾向がみられたが、その他には体重、肝重量ともに大きな変動は認められなかった。血漿中のGPT活性はCMD投与15~30分後には著しく低下したが、その後は回復の傾向を示して、投与2時間後にはほぼ正常レベルにまで戻ることが確かめられた。血中のGOT活性も、CMD投与30分後には低下したが、その後徐々に回復の傾向を示した。けれども、肝臓中のトランスアミナーゼ活性は、CMDを投与直後でもほとんど変動を示さなかった。肝組織中のcytochrome P-450含量やアミノピリン脱メチル化活性は、CMD投与によってほとんど変動を示さなかったが、アニリン水酸化活性はわずかではあるが低下の傾向を示した(Table 5)。

Table 6に示すように、CEZの投与(2 g/kg)直後の体重、肝重量、血漿GOT活性および肝薬物水酸化酵素系の変動は、ほぼCMD投与の場合と同様の結果を示した。けれども、血漿中のGPT活性はCMD投与

の場合のような急速な活性低下を示さず、CEZ投与後徐々に活性が低下して、投与24時間後でも全く回復の傾向のみられないことがわかった(Table 6)。

CEZ投与によって低下した血漿中のGPT活性が投与24時間後でも回復しないのでCEZ投与1日後から1週間後までの血漿中のGPT活性の変動を調べた。Table 7に示すように、血漿中GPT活性はCEZ投与1日後には低値を示し、その後回復の傾向を示すことがわかった。けれども、投与2~4日後でもまだ完全に正常レベルにまでは回復せず、完全な回復には長時間を要することが明らかとなった。血中の他の酵素(GOTや酸性フォスファターゼ)や肝内の数種の酵素活性には、ほとんど影響がみられなかった。Table 5~7の結果は、ラットに同じ量のCMDとCEZとを投与しても、GPT活性低下の時間経過が異なることを示しており、CMDとCEZによるGPT活性の低下機構はいくらも異なるものと推察された。

4. CMDの投与量と血清酵素活性との関係

CMDの投与によっても注入直後には血中GPT活性の低下することが確かめられたので、ラットに0.5~2.0 g/kgのCMDを投与し、30分後および24時間後の血漿中のGPT、GOTおよび酸性フォスファターゼ活性について検討した。投与30分後の血漿中のGPT活性は、CMDの少量(0.5 g/kg)投与群では全く影響がみられなかったが、投与量を増大してゆくと漸次活性の低下してゆくことが確かめられた。投与24時間後には全実験群で活性の低下は観察されなかった。血漿中の酸性フォスファターゼおよびGOT活性は、CMD投与

Table 5 Alterations in plasma and liver enzyme activities in rats following intravenous administration of CMD

	Control	CMD-administered rat (Time after injection)						
		15 min.	30 min.	60 min.	2 hrs.	6 hrs.	24 hrs.	
Body weight (g)	322 ± 5	312 ± 9	315 ± 15	320 ± 10	328 ± 15	328 ± 16	325 ± 16	
Liver weight (g) (% of B.W.)	12.7 ± 0.6 3.94 ± 0.11	11.6 ± 1.0 3.71 ± 0.21	11.8 ± 0.8 3.73 ± 0.10	12.0 ± 0.1 3.75 ± 0.11	12.1 ± 1.1 3.69 ± 0.17	12.8 ± 0.7 3.89 ± 0.04	12.8 ± 0.9 3.93 ± 0.16	
Plasma enzyme activity (nmol/min./ml)								
GOT	92 ± 26	82 ± 18	51 ± 4	70 ± 2	85 ± 15	69 ± 8	63 ± 8	
GPT	21.9 ± 2.7	9.0 ± 0.6**	9.0 ± 0.2**	18.0 ± 0.1	24.4 ± 2.8	23.2 ± 0.5	24.3 ± 1.1	
Liver transaminase activity (nmol/min./mg)								
GOT	134 ± 15	135 ± 9	134 ± 2	137 ± 5	136 ± 6	131 ± 1	138 ± 6	
GPT	45.7 ± 4.3	39.2 ± 3.4	46.0 ± 2.5	41.3 ± 4.0	33.0 ± 1.4*	36.5 ± 2.6	42.3 ± 4.4	
Liver drug-metabolizing enzyme system								
Cytochrome P-450 content (nmol/g)	57.1 ± 6.6	67.5 ± 3.5	64.3 ± 2.6	56.6 ± 1.3	50.3 ± 2.8	50.1 ± 1.2	51.2 ± 3.9	
Aniline hydroxylase activity (nmol/min./g)	37.2 ± 1.8	30.2 ± 2.9	33.1 ± 2.6	37.2 ± 1.5	33.5 ± 0.4	34.6 ± 1.7	28.9 ± 0.7	
Aminopyrine N-demethylase activity (μmol/min./g)	1.37 ± 0.01	1.41 ± 0.04	1.37 ± 0.06	1.46 ± 0.08	1.35 ± 0.02	1.34 ± 0.02	1.39 ± 0.04	

The values in the table represent the mean ± S.E. of 3 animals.
Significantly different from control group: * (p < 0.05) ** (p < 0.01)

Table 6 Alterations in plasma and liver enzyme activities of rats following intravenous administrations of CEZ

	Control	CEZ-administered rat (Time after injection)				
		30 min.	60 min.	2 hrs.	6 hrs.	24 hrs.
Body weight (g)	342 ± 10	348 ± 3	347 ± 12	348 ± 9	355 ± 5	347 ± 8
Liver weight (g) (% of B.W.)	14.0 ± 0.3 4.11 ± 0.08	12.7 ± 0.35 3.66 ± 0.08*	13.2 ± 0.8 3.81 ± 0.09	15.3 ± 1.0 4.29 ± 0.35	14.5 ± 0.5 4.09 ± 0.10	12.5 ± 0.6 3.60 ± 0.11*
Plasma enzyme activity (nmol/min./ml)						
GOT	98 ± 16	75 ± 6	64 ± 3	76 ± 3	67 ± 9	108 ± 27
GPT	26.2 ± 1.8	22.2 ± 2.5	19.8 ± 0.5*	—	17.2 ± 1.4*	15.8 ± 3.0*
Liver transaminase activity (nmol/min./mg)						
GOT	126 ± 8	144 ± 12	133 ± 3	138 ± 13	148 ± 15	167 ± 7
GPT	32.1 ± 2.5	43.1 ± 1.5*	39.2 ± 3.1	46.6 ± 7.1	45.7 ± 1.3**	49.7 ± 2.7**
Liver drug-metabolizing enzyme system						
Cytochrome P-450 content (nmol/g)	57.1 ± 4.2	68.9 ± 1.6	53.9 ± 2.9	57.5 ± 0.2	56.2 ± 3.5	56.2 ± 2.4
Aniline hydroxylase activity (nmol/min./g)	37.8 ± 3.4	43.1 ± 2.1	39.3 ± 1.2	41.9 ± 2.7	32.7 ± 3.6	41.4 ± 3.3
Aminopyrine N-demethylase activity (μmol/min./g)	1.33 ± 0.02	1.35 ± 0.01	1.27 ± 0.01	1.37 ± 0.04	1.25 ± 0.06	1.43 ± 0.03

The values in the table represent the mean ± S.E. of 3 animals.

Significantly different from control group: * (p < 0.05) ** (p < 0.01)

Table 7 Recovery of altered plasma and liver enzyme activities of rats by intravenous administration of CEZ

	Control	CEZ-administered rat (Days after injection)				
		1	2	3	4	7
Body weight (g)	338 ± 1	318 ± 2*	343 ± 3	344 ± 4	343 ± 5	354 ± 7*
Liver weight (g) (% of B.W.)	13.7 ± 0.4 4.06 ± 0.12	12.0 ± 0.5* 3.78 ± 0.08	13.1 ± 0.4 3.93 ± 0.11	13.9 ± 0.3 4.06 ± 0.05	13.4 ± 0.4 3.90 ± 0.05	14.4 ± 0.5 4.06 ± 0.06
Plasma enzyme activity (nmol/min./ml)						
GOT	91 ± 7	81 ± 4	85 ± 4	103 ± 9	77 ± 9	136 ± 30
GPT	27.8 ± 1.0	13.8 ± 0.5**	22.5 ± 2.2	23.8 ± 2.1	24.8 ± 0.9	37.5 ± 3.9*
Acid phosphatase	26.9 ± 2.1	36.0 ± 0.6**	26.3 ± 3.0	29.1 ± 2.4	—	—
Liver enzyme activity (nmol/min./mg)						
GOT	150 ± 4	150 ± 8	110 ± 6**	110 ± 9**	160 ± 6	150 ± 3
GPT	44.0 ± 3.9	36.9 ± 4.3	40.6 ± 4.3	33.2 ± 3.0	31.0 ± 3.5	40.9 ± 3.7
Acid phosphatase	9.80 ± 0.31	10.94 ± 0.49	—	—	—	—
Liver drug-metabolizing enzyme system						
Cytochrome P-450 content (nmol/g)	64.0 ± 3.8	62.3 ± 3.2	59.9 ± 3.0	56.0 ± 3.2	67.4 ± 4.0	53.5 ± 4.5
Aniline hydroxylase activity (nmol/min./g)	37.1 ± 1.5	41.3 ± 0.5*	37.2 ± 3.7	34.3 ± 2.0	31.7 ± 2.7	34.0 ± 3.5
Aminopyrine N-demethylase activity (μmol/min./g)	1.58 ± 0.06	1.64 ± 0.02	1.43 ± 0.08	1.29 ± 0.02	1.61 ± 0.05	1.55 ± 0.08

The values in the table represent the mean ± S.E. of 3 animals.

Significantly different from control group: * (p < 0.05) ** (p < 0.01)

Table 8 Alteration of plasma enzyme activities of rats following intravenous administration of various amounts of CMD

Administration	Time after administration (hr.)	Plasma enzyme activity (nmol/min./ml)		
		GOT	GPT	Acid phosphatase
None (control)	—	65 ± 6	23.0 ± 1.3	26.5 ± 1.2
CMD (0.5 g/kg)	0.5	101 ± 9*	25.7 ± 1.9	33.8 ± 1.8*
	24.0	91 ± 10	31.5 ± 4.0	38.1 ± 0.5**
CMD (1.0 g/kg)	0.5	61 ± 7	19.1 ± 0.7	26.6 ± 1.7
	24.0	83 ± 19	29.1 ± 2.8	35.8 ± 4.8
CMD (2.0 g/kg)	0.5	63 ± 2	15.0 ± 1.3*	31.1 ± 3.4
	24.0	67 ± 14	24.6 ± 2.1	37.5 ± 2.3**

The values in the table represent the mean ± S.E. of 3 animals.

Statistically significant (* p < 0.05, ** p < 0.01) against control group.

Table 9 Effects of CMD and CEZ on GOT and GPT activities in rat liver cytosol

Concentration of CMD or CEZ (mg/ml)	GOT activity (nmol/min./ml)		GPT activity (nmol/min./ml)	
	CMD	CEZ	CMD	CEZ
0	145	145	44.4	46.0
0.003	143	145	43.9	46.8
0.033	146	146	40.1	46.5
0.167	147	144	33.2	43.4
0.333	144	145	27.6	40.8
0.667	139	146	20.7	36.6
1.000	139	142	16.3	35.3

Concentration of cytosol in the reaction mixture was 0.10 mg protein/ml, and the activity are expressed as nmoles NADH oxidized/min./ml of reaction mixture.

動物でわずかではあるが増大傾向を示した (Table 8)。

5. 肝細胞内 GPT 活性の CMD および CEZ による直接阻害

ラットに CMD や CEZ を投与したときにみられた特異的な GPT 活性の低下現象が、これらの薬物の酵素に対する直接作用のためであるのか、それとも別の要因による二次的な影響であるのかを明らかにするために、肝細胞 cytosol に局在する S-GPT 活性に対する CMD および CEZ の影響を *in vitro* の系で検討した。Table 9 に示すように、cytosol 局在の GOT 活性は反応系に CMD や CEZ を加えてもほとんど影響がみられず、高濃度の検体存在下でわずかに活性低下の傾向を示したのみであった。それに対して、GPT 活性は反応系に CMD や CEZ を添加することにより阻害され、活性の阻害は添加する薬物の量が増大するほどより顕著に認められた。この *in vitro* の系での GPT 活性の阻害は、CEZ よりも CMD の添加によってより強くひきおこされた (Table 9)。ここに示す結果は、CMD も CEZ もともに GPT 酵素に直接作用して活性の阻害をひきおこすが、その作用は CMD の方が CEZ よりも強いことを示している。

考 察

実験動物に大量の CMD や CEZ を投与した際に、血清酵素である S-GPT 活性が特異的に低下することが見出されている^{2,3)} が、このような現象は Ceftezole sodium (以下 CTZ と略) を投与した動物でも観察されている¹²⁾。この機序として、二木ら¹²⁾ は血中から尿中への排泄促進のためであるとしているが、GPT 酵素だけが特異的に排出されるのであれば特異的な S-GPT 活性低下は観察されないはずであり、このような考えが妥当であるかどうかは疑わしい。他方、CMD および CEZ のイヌでの 亜急性毒性試験時に血漿中の酵素活性だけでなく肝臓内 GPT 活性も低下することが確かめられた³⁾ ので、他の臓器内の酵素活性にも影響が出ているものと推察された。このような結果から考えて、CMD、CEZ および CTZ 投与動物で観察された GPT 活性の低下は、この酵素の尿中への排泄促進のためではないと結論できた。

肝臓内の GPT 活性も、CMD や CEZ の連続投与によって低下することがイヌでの実験で確かめられた³⁾ ので、肝内の他の酵素系への影響が心配されたが、肝細胞

小胞体膜局在の薬物水酸化酵素系 (cytochrome P-450 含量, アニリン水酸化活性およびアミノピリン脱メチル化活性), リソゾーム局在の酸性フォスファターゼおよびミトコンドリアと cytosol の両面に局在する GOT などの機能にはほとんど影響が認められなかった。したがって、肝細胞内でも CMD や CEZ の投与によって GPT のみが特異的に影響をうけると結論できた。同様の結果はラットに大量の CEZ を 1 回ないしは連続投与し、2 日後に酵素活性を調べた実験 (Table 2 および 4) でも得ることができた。ラットでの実験で、血中の GPT は CEZ の 1 回投与でも活性低下を示した (Table 2) が、肝組織内 GPT 活性の低下は連続投与時にだけ認められていた (Table 4)。このことは、血中の酵素量に比べ肝臓内の酵素量が非常に多い¹³⁾ ためであろうと、推察された。

CMD 投与による血漿 GPT 活性の低下は投与 15~30 分後に顕著におこり、その後急速に正常レベルにまで回復することが確かめられた (Table 5) が、このような活性変動の経過は CMD の血中濃度変化と関連しており、CMD の血中濃度の高いときのみ酵素活性の低下がひきおこされるように考えられた。このことは、CMD が直接酵素に作用して活性低下をひきおこす直接作用が活性低下の原因であることを推察させるものである。事実 *in vitro* の実験系で、肝 GPT 活性を反応系に添加した CMD で阻害することができた (Table 9)。他方、CEZ による血漿 GPT 活性の低下は投与後徐々に起こり、その回復にも長時間必要とすることがわかった (Table 6 および 7)。また、*in vitro* の実験系で、CEZ による GPT 活性阻害作用は、CMD よりも弱いことが明らかにされている (Table 9)。これらの結果は、CEZ を動物に投与すると血中 CEZ 濃度の上昇にともなって、直接作用による GPT 活性低下もひきおこされるが、他の要因も関与して、CEZ の血中濃度が低下した投与 1~2 日後でも活性の回復がみられない (Table 2, 4, 6 および 7) ものと推察された。CEZ が GPT 酵素に直接作用して活性阻害をひきおこすことは FEUER ら¹⁴⁾ によっても報告されているが、他の要因については現段階では明らかでない。CMD 投与による GPT 活性低下は速やかに回復するので、連続投与をおこなってもわずかな活性低下しかおこらないが、CEZ 投与による GPT 活性低下は 1~2 日後でも回復しないために、連続投与をおこなうと著しい活性低下がひきおこされるものと考えられた。

この報告に示すように、CMD や CEZ の投与によってひきおこされる特異的な変化は GPT 活性の低下現象であるが、投与直後には、血漿中の GOT 活性もわずか

ではあるが活性低下を示すことがわかった (Table 5 および 6)。ただし、GOT に対する影響は少なく、CEZ 投与の場合でも速やかに回復したので、生理的な影響はほとんどないものと考えられた。これに対して、CMD や CEZ 投与による生体内の GPT 活性低下は、この酵素の関与する生理機能低下をひきおこすものと考えられた。けれども、CMD の少量 (0.5 g/kg) 投与ラットでは GPT 活性の低下が観察されない (Table 8) ので、臨床用量の CMD 投与においては問題となるような影響はあらわれないものと推察された。

文 献

- 1) 鈴木 宏: GOT, GPT (トランスアミナーゼ)。日本臨床 29: 629~636, 1971
- 2) 波多野宗利, ほか: Cefamandole のラットでの亜急性毒性試験, 公表予定
- 3) 原田喜男, ほか: Cefamandole のイヌでの亜急性毒性試験, 公表予定
- 4) MATSUBARA, T.; M. KOIKE, A. TOUCHI, Y. TOCHINO & K. SUGENO: Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. Anal. Biochem. 75: 596~603, 1976
- 5) MATSUBARA, T. & Y. TOCHINO: Inhibitory action of cyanide on aniline hydroxylase system. FEBS Letters 52: 77~80, 1975
- 6) MATSUBARA, T.; A. TOUCHI & Y. TOCHINO: Hepatic aminopyrine N-demethylase system. Further studies of assay procedure. Jap. J. Pharmacol. 27: 127~136, 1977
- 7) BESSEY, O. A.; O. H. LOWRY & M. J. BROCK: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem. 164: 321~329, 1946
- 8) LA DUE, J. S.; F. WRÖBLEWSKI & A. KARMEN: Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. Science 120: 497~499, 1954
- 9) HORECKER, B. L. & A. KORNERG: The extinction coefficient of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem. 175: 385~390, 1948
- 10) GORNALL, A. G.; C. J. BARDAWILL & M. M. DAVID: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751~766, 1949
- 11) 吉田 正, 木村靖雄, 土肥正善, 中清水 弘, 棚野義博: Cefamandole の動物における体内動態, Chemotherapy 27 (S-5): 112~119, 1979
- 12) 二木力夫, 塩田尚三, 宇佐美正義, 野口午郎, 杉山 修, 大川広行, 高垣善男: Ceftezole の一般毒性および胎仔へ

- の影響。Chemotherapy 24: 671~701, 1976
- 13) 吉田光孝・中山年正：グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)・グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)。臨床検査 15: 1245~1257, 1971
- 14) FEUER, G; T. BALAZS, T. FARBER, M. LIPIEN, M. S. ILYAS & R. ILSE; Alanine aminotransferase activity of rat tissues following the administration of cefazolin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 41: 185~186, 1977

INHIBITORY ACTION OF CEFAMANDOLE ON GLUTAMIC PYRUVIC TRANSAMINASE ACTIVITY IN RATS

TAKASHI MATSUBARA and AKIRA TOUCHI
Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.

Effects of cefamandole sodium and cefazolin sodium administrations on several enzyme activities in plasma and liver were examined in rats. Marked decrease in plasma glutamic pyruvic transaminase activity was observed 15~30 min. after the intravenous administration of cefamandole and the activity recovered to normal range 2 hrs. later. On the other hand, the activity of glutamic pyruvic transaminase in plasma depressed gradually following the administration of cefazolin, and lower activity was observed even at 1~2 days later. Successive administrations of cefazolin for 2~3 days resulted in decrease of the glutamic pyruvic transaminase activity in both plasma and liver, but not by the administration of cefamandole. However, other enzyme activities in plasma and liver were not affected by the administration of cefamandole and cefazolin.

Glutamic pyruvic transaminase activity in liver cytosol was inhibited by adding cefamandole and cefazolin to the reaction mixture, suggesting direct interaction of cefamandole and cefazolin with the enzyme followed by inhibition of the enzyme activity.