

# エタノールとフェノバルビタールの単独又は同時投与がニワトリ胚の生育と肝薬物代謝系に及ぼす影響

著者名(日)	菅家 祐輔, 小久保 清子, 堀口 美恵子
雑誌名	大妻女子大学家政系研究紀要
巻	41
ページ	33-38
発行年	2005-03-03
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1114/00002127/">http://id.nii.ac.jp/1114/00002127/</a>

# エタノールとフェノバルビタールの単独又は同時投与がニワトリ胚の生育と肝薬物代謝系に及ぼす影響

菅家 祐輔、小久保 清子、堀口 美恵子\*、碓井 之雄\*\*、坂本 義光\*\*\*

(大妻女子大学家政学部食物学科、\*大妻女子大学短期大学部家政科、

\*\*青葉学園短期大学食物栄養学科、\*\*\*東京都健康安全センター環境保健部)

## Effects of Ethanol and/or Phenobarbital on Embryonic Development and Hepatic Drug Metabolizing System in Chick Embryos

Yusuke Kanke, Kiyoko Kokubo, Mieko Horiguchi, Yukio Usui and Yoshimitu Sakamoto

Key words : alcohol (ethanol) アルコール (エタノール), phenobarbital フェノバルビタール, chick embryo ニワトリ胚, hepatic drug metabolizing system 肝薬物代謝系, embryonic toxicity 胚毒性

### 和文要旨

ニワトリの受精卵にエタノール (EtOH) とフェノバルビタール (PB) を単独若しくは同時に投与して、胚の生存率や肝薬物代謝系などに及ぼす影響について調べた。

白色レグホン系ニワトリの受精卵 (入卵 1 1 日目) を 4 群に分け、生理食塩液、EtOH、PB、EtOH + PBのいずれかを一定量投与して 8 日間培養し、19 日目に割卵した。

対照群と比較して、EtOH 単独投与群は胚の生存率や肝薬物代謝酵素活性に差異を認めなかった。PB 単独投与群も胚の生存率には対照群とほとんど差がなかったが、アニリン 4-水酸化酵素、アミノピリン N-脱メチル化酵素、UDP-グルクロン酸転移酵素の肝薬物代謝酵素活性はいずれも誘導され、有意に高値を示した。しかし、単独投与時と同等の EtOH と PB を同時に投与した群では、割卵時までに全ての胚が死滅した。

以上、本実験の結果は、ニワトリ胚が薬物代謝の研究領域でも哺乳動物に代替可能な有用な実験系であることを確認すると共に、EtOH と PB の相互作用が胎児の発育に極めて重大な影響を及ぼす可能性のあることを示唆した。

### Summary

“Effects of Ethanol and/or Phenobarbital on Embryonic Development and Hepatic Drug

Metabolizing System in Chick Embryos”

This study was designed to investigate the embryonic toxicity of ethanol (EtOH) and phenobarbital (PB) interaction in the chick embryo (CE). Fertilized eggs of White Leghorn strain were treated with EtOH and/or PB, and incubated for 8 days at 37.7°C and in 60-70% humidity. Compared to the control group given Ringer's solution, there was no difference in the viability of both EtOH and PB-treated CE. Although EtOH alone resulted in no consistent pattern of hepatic aniline 4-hydroxylase, aminopyrine N-demethylase and UDP-glucuronosyl transferase activities, PB without EtOH induced all three drug metabolizing enzyme activities. However, the combination of EtOH and PB at the dose levels used here caused the death of all embryos.

The present preliminary study suggests that CE provides a useful model for studying the interactions of EtOH and other drugs, and the simultaneous administration of EtOH and PB has more deleterious effect on embryonic development than either treatment alone.

### 1. 緒言

平成13年国民生活基礎調査<sup>1)</sup>によると、常習的な飲酒者 (12歳以上) は男が54.6%、女が23%でその中の男では4割近く、女でも2割近くが日本酒に換

算して1日平均2合以上の飲酒量を示している。それに伴い様々な健康障害や多くの社会問題が生じているが、近年、キッチンドリンクや高齢者の飲酒などに加え妊婦の飲酒問題が我が国におけるアルコール関連問題として新たな対応を迫られている。

「胎児性アルコール症候群」は、脳の発育が障害される不治の疾病で、知能が遅れ、IQは60かそれ以下になることもあり、アメリカでは精神遅滞の原因として最も重要視されている<sup>2)</sup>。本疾病は妊娠中の女性の飲酒によって惹起されるが<sup>3)</sup>、その重篤度はアルコール(EtOH)と同時に摂取される他の物質との相互作用に左右されるといわれている<sup>4)</sup>。

ニワトリ胚(CE)は従来から実験発生学や催奇形性、カビ毒などの研究や検査における被験動物として重用されてきているが<sup>5)</sup>、近年は動物福祉や研究開発の効率化の観点から哺乳動物の代替可能な実験動物としても種々の分野において使用されている<sup>6)</sup>。胎児性アルコール症候群の研究においてもCEが種々の動物と並んでその発生機序の解明のために利用されている<sup>7)</sup>。しかし、飲酒前後に飲用される可能性の大なる物質の一つと思われる催眠・鎮静薬フェノバルビタール(PB)とEtOHのCEに対する相互作用について調べた報告は知られていない。

そこで本研究では、EtOHとPBの同時投与の胎児毒性についての手がかりを得るのに果たしてCEが適する実験系であるか否かを検討する目的で若干の生化学的な実験を試みた。

## 2. 実験方法

**受精卵の培養**：白色レグホン種ニワトリの受精卵(千葉県東金市・(株)三宅孵卵場)を、温度37.7℃、湿度60~70%、1時間ごとに転卵するように設定した孵卵器(昭和フランキ研究所)に入卵し、無処理のまま10日間培養した。

入卵11日目に検卵により無精卵を排除した後、受精卵を①対照群(20個)、②EtOH処理群(39個)、③PB処理群(20個)、④EtOH+PB処理群(38個)の4群に分けた。そして、鈍端部の気室上に開けた直径2~3mmの小穴から、それぞれの試験液を卵1個あたり50 $\mu$ lずつ投与した。すなわち、①対照群には生理食塩液(大塚製薬(株))を入卵11日目から18日までの連日、②EtOH群には生理食塩液で希釈した40%EtOHを11日目と12日目、60%EtOHを13日目と14日目、80%EtOHを15日目と16日目、100%EtOHを15日目と16日目で順次EtOH濃度を高め各々2日間ず

つ投与した。一方、③PB投与群には生理食塩液で60mg/mlに溶解したPB溶液を入卵11日目から3日間だけ投与し、④EtOH+PB処理群においては、②EtOH群と同一のEtOH処理をする傍ら11日目から3日間にわたり同時に③PB投与群と同様のPB処理を行った。

**胚の形態学的観察**：入卵18日まで所定の試験液処理後、19日目に割卵して生存胚を取り出し、身長、体重を測定すると共に、頭部や脚などについて形態学的な異常の有無を調べた。

**酵素標品の作成**：生存胚から摘出された肝などの臓器は重量測定後、以後の生化学の実験に供するまで-80℃で凍結保存した。凍結融解した肝組織を0.25Mショ糖溶液でPotter-Elvehjem型ホモジナイザーを用い氷冷しながらホモジナイズ後、冷却遠心分離機(ベックマン・コールター社製Microfuge R、F241.5ローター)で12,500xg、3℃、15分間遠心分離し、上清のポストミトコンドリア画分を得た。

**酵素活性の測定**：上記ポストミトコンドリアを酵素源として、グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、アルカリ性ホスファターゼ(ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の各酵素活性を臨床化学自動分析装置スポットケム SP-4410(アークレイ社製)で測定した。また、薬物代謝系の第1相反応のチトクロムP-450酵素であるアニリン4-水酸化酵素(AH)とアミノピリンN-脱メチル化酵素(AD)及び第2相反応の中心的な役割を担うUDP-グルクロン酸転移酵素(UDPGT)の各酵素活性も12,500xg上清を酵素源として測定した<sup>8)</sup>。なお、酵素標品中のタンパク質含量をLowryらの方法<sup>9)</sup>で測定し、各酵素の比活性を算出した。

**統計処理**：測定結果は全て平均値 $\pm$ 平均偏差であらわし、Studentのt検定により対照群と処理群の二群間における有意差の有無を危険率5%で検定した。

## 3. 実験結果

### (1) EtOH単独投与の影響

CEの各種器官の原基の発生がほぼ完了する時期と思われる入卵11日目から割卵前日の18日目までの間、2日間づつEtOH濃度を40%、60%、80%、100%と段階的に高めて連続投与した。その結果、CEの生存率は87%で対照群の90%とほとんど差がなかったが、生存胚34体中6体に全身的な浮腫や脚のねじれ等の形態学的異常を認めた。また、胚の身長と体重も対

照群のそれぞれ93.5%と88.4%で有意に小さかった (表1)。

EtOH投与群の胚では肝重量も対照群の約85%で有意に小さかったが、比肝重量では差がなかった。肝臓のポストミトコンドリア画分で測定された GOT、GPT、ALP、LDH、及び薬物代謝第I相のAH、AD、第II相のUDPGTのいずれの活性においても、EtOH投与群と対照群との間に有意差を認め

なかった (表2)。

## (2) PB単独投与の影響

入卵11日目から連続3日間、生理食塩液に溶解したPB (60mg/ml) を投与し、19日目に割卵した。その結果、胚の生存率は対照群やEtOH処理群より若干低く85%であったが、形態学的異常は僅か1体に短肢を認めただけであった。しかし、生存胚の身

Table 1. Effects of ethanol and/or phenobarbital on developing chick embryos

	Cont.	EtOH	PB	EtOH+PB
No. of eggs treated	20	39	20	38
Live embryos on day 19	18	34	17	0
Survival embryos (%)	90	87	85	0
Abnormal embryos (%)	0	6	1	-
Height (cm)	12.3 ± 0.4	11.5 ± 0.5 *	11.7 ± 0.4 *	-
Body wt. (g)	20.7 ± 1.3	18.3 ± 1.9 *	19.7 ± 1.1 *	-

Abbreviations: Cont, Control; EtOH, Ethanol; PB, Phenobarbital.

Each value in the height and body weight is the mean ± SD.

\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the control group.

Table 2. Effects of ethanol and/or phenobarbital on hepatic enzyme activities in chick embryos

	Cont.	EtOH	PB	EtOH+PB
Liver wt. (g)	0.486 ± 0.042	0.435 ± 0.040*	0.491 ± 0.038	-
Liver wt./ Body wt. (%)	2.35 ± 0.20	2.39 ± 0.25	2.49 ± 0.14	-
GOT	862 ± 123	875 ± 168	783 ± 48	-
GPT	6.2 ± 0.8	5.2 ± 1.6	3.9 ± 0.9*	-
ALP	140 ± 18	146 ± 37	106 ± 12*	-
LDH	12,53 ± 1,823	13,342 ± 1,456	10,648 ± 1,077	-
AH	67.8 ± 4.7	67.4 ± 10.0	111.9 ± 13.3*	-
AD	36.8 ± 4.8	41.0 ± 9.7	50.4 ± 4.0*	-
UDPGT	4.6 ± 0.4	5.2 ± 0.8	37.6 ± 14.2*	-

Abbreviations: Cont, Control; EtOH, Ethanol; PB, Phenobarbital; GOT, glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic-pyruvic transaminase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactic dehydrogenase; AH, aniline 4-hydroxylase; ADH, aminopyrine N-demethylase; UDPGT, UDP-glucuronosyl transferase.

Unit for GOT, GPT, ALP and LDH is IU/g protein.

Unit for AH, AD and UDPGT is n mole/ min /g protein.

Each value is the mean ± SD.

\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from value for the control group.

長と体重はいずれも対照群の約95%で、有意に小さかった (表1)。

生存胚から摘出された肝臓の重量と比重量にはPB投与の影響は認められなかったが、肝組織中のGPTとALP活性は対照群のそれぞれ約63%と約76%で有意な低値を示した。一方、薬物代謝酵素に対しては、いずれもマイクロゾーム酵素であるAH、AD、UDPGT活性を有意に増大させ、殊にUDPGTには約8倍もの誘導作用を示した (表2)。

### (3) EtOHとPBの同時投与の影響

EtOHとPBの両物質を、それぞれ単独投与時と同一の濃度・投与量・投与方法で、入卵11日目から38個の受精卵に同時投与した。その結果、12,13日目に各1個、14日目に6個、15日目に22個、16日目に6個、17,18日目に各1個の受精卵で検卵により血管の脱落や消滅が観察され、19日目の割卵時までにすべての胚が死亡した (表1)。

## 4. 考察

### EtOH単独の影響について

本実験に用いられた実験条件、すなわちEtOHの投与時期、投与部位、投与量、投与方法、割卵時期などは、数回にわたる予備実験を経て決定された。その結果、観察されたCEのEtOHによる致死率や生存胚の形態学的な異常の発生などの成績は概ね他者の報告<sup>10)</sup>と一致し、EtOHには致死率は高くなくともかなり強い催奇形性のあることが確認された。一般にラットなどではEtOHの短期投与は肝マイクロゾーム水酸化活性を阻害し<sup>11)</sup>、逆に長期投与はアニリンの水酸化を特異的に誘導するとされている<sup>12)</sup>。これまで、CEの肝臓についてはこれらの薬物代謝酵素がEtOHによってどのような影響を受けるかについての知見はほとんど知られていない。

薬物代謝第I相酵素のAH、ADおよび第II相酵素のUDPGTはいずれもマイクロゾームに局在するとされているが、本実験においては、12,500 x g 上清のポストミトコンドリア画分を酵素源として測定した<sup>8)</sup>。本実験に先がけ、入卵6日目から18日目までの期間、連続的に50%EtOHを投与した予備実験において、AH活性の有意な低下とUDPGTの活性の有意な上昇を認めた。しかし、本実験条件下ではいずれの酵素活性にもEtOH単独投与による有意な変動を認めなかった。

このようにEtOHによる薬物代謝酵素への影響が

一定の傾向を示さなかった理由は不明である。しかし、実験条件が厳密に同一でなかったことが最大の理由と思われるが、酵素源としてマイクロゾームでなくポストミトコンドリア画分を使用したことも一因かもしれない。さらに受精卵は産卵以前にすでに卵管内において初期発生の胚胞期まで発生が進行しているといわれているので培養開始の入卵時のHamburgerとHamiltonのchick stage<sup>13)</sup>が不揃いであった可能性も否定できない。また、同一孵卵日齢でも特に初期の発生には発育に関して個体差が大きいとされていること<sup>14)</sup>も関与している可能性があると思われる。

### PB単独投与の影響について

催眠・鎮静薬であるPBは、薬物代謝マイクロゾーム酵素の誘導剤として良く知られている。本実験において入卵11日目から3日間の連続投与によって胚の生存率、身長、体重が若干低値を示したものの、形態学的には著しい影響を示さず、また、肝重量にも差を認めなかった。

GPTなどは肝細胞が損傷されると血中に逸脱し血中の酵素活性が上昇するものの、壊死や変性した肝組織中の活性は必ずしも高値を示すとは限らず、むしろ低値を示したという報告がある<sup>15)</sup>。本実験においてもPB投与によってGPTとALPが低値を示したことから、肝組織が多少なりとも損傷を受けた可能性がある。

一方、肝の薬物代謝酵素に関しては酵素源がポストミトコンドリアであったにもかかわらず、PBはラットなどの哺乳動物同様CE肝臓のいずれのマイクロゾーム酵素に対しても顕著な誘導効果を示した。PBのこのような誘導効果は、予備実験においても入卵7日目や13日目に1回投与しただけでも認められた。このことは、CEの肝臓は例えポストミトコンドリア画分であっても、PBなどの誘導剤に鋭敏に反応する優れた薬物代謝の実験系として極めて有用であることを示唆するものと思われる。

### EtOHとPBの同時投与について

上述の如く、EtOH単独、PB単独ではCEはそれぞれ対照群と大差のない胚の生存率を示したにもかかわらず、両者の同時投与は胚の生育を短期に阻害し割卵時までに全ての胚を死亡させた。

この現象の原因は不明であるが、少なくとも二つの可能性が考えられる。第一は、両物質は互いに相手の代謝に全く関与せず、従ってEtOHとPBの両者

の中枢神経抑制作用が相加的に現れたいわゆる薬動力学的相互作用によるものである。第二は、PBの代謝に係わるミクロゾーム酵素がEtOHによって阻害され、PBの中枢神経抑制作用が増強された可能性である。本実験の結果だけからみると後者より前者の機序による方が妥当と思われる。しかし、CEではなくラットを使った実験で、各種のバルビツール酸による睡眠時間がEtOHの同時投与によって延長され<sup>16)</sup>、中でもバルビツール酸とPBによる効果が顕著だったとする報告<sup>17)</sup>やラットに対する腹腔投与による実験で5種類のバルビツール酸のLD<sub>50</sub>(半数致死量)がEtOHの同時投与でいずれも低下し、特にPBとバルビトンで著しかったとする報告<sup>18)</sup>があるので第二のメカニズムによる可能性も否定できない。さらに、上述のように著者らの予備実験においてもEtOHによるAH活性阻害作用の観察されたこともあるので、P-450の分子種レベルで調べるなど第二の機序に関する今後のより詳細な検討が必要とされる。その他、EtOHがPBの代謝に影響を及ぼすのと同様に、PBがEtOHの代謝を変更する可能性の有無についても検討の余地があると思われる。

以上、本実験の結果、in vitroとin vivoの中間に位置するCEは、PBやそれに類似する薬物と他の生体異物の相互作用に関する薬物代謝の研究や胎児毒性の分野の研究にも極めて有用な被検動物であることが明らかになった。また、哺乳類と鳥類とでは一般的に種差が著しいものの、胚の発生に関しては種々の点で両者は共通しているといわれているので<sup>19)</sup>、EtOHとPBの同時投与がCEの生存を著しく阻害した本実験の結果は妊婦の飲酒に関して重大な警告を発していると思われる。

## 5. 結論

ニワトリの受精卵にEtOHとPBを投与した。それぞれの単独投与では高い胚の生存率を示したにもかかわらず、両者の同時投与は胚の生存を著しく阻害した。この現象は、両者の薬動力学的相互作用によって中枢神経抑制作用が相加的に増強されたことに起因すると思われる。本実験の結果は、妊婦の飲酒に対し重大な警鐘を鳴らすとともに、CEが胎児毒性の研究領域においても哺乳動物の代替動物として極めて有用であることを示唆した。

## 引用文献

- 1) (財)厚生統計協会(編):「国民衛生の動向」、厚生指標、50、83—84 (2003)
- 2) Iversen, I. (訳・廣中直行):「Drugs (薬)」、岩波書店、東京、99—102 (2003)
- 3) Schenker, S., Becker, H.C., Randall, C.L., Philips, K., Baskin, G.S., and Henderson, G.I.: Fetal Alcohol Syndrome: Current Status of Pathogenesis. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 14, 635—647 (1990)
- 4) Miller Jr., R.R., Heckel, C.D., Koss, W.J., Montague, S.L. and Greenman, A.L.: Ethanol- and Nicotine-Induced Membrane Changes in Embryonic and Neonatal Chick Brains, *Comp. Biochem. Physiol.* 130C, 163—178 (2001)
- 5) Stern, C.D. and Holland, P.W.H. (監訳:八杉貞雄、西郷秀俊):「Essential Developmental Biology—A Practical Approach (発生物学の必須テクニック; 固体から分子へ)」、メディカル・サイエンス・インターナショナル、東京、43—51 (1995)
- 6) 吉山友二:ニワトリ胚の実験動物代替法への応用:時間薬理学的・薬物相互作用学的研究(薬物相互作用学的アプローチ)、第21回In Vitro 発生毒性研究会要旨集、7—8 (2000)
- 7) Becker, S. and Shibley, Jr., I.: Teratogenicity of Ethanol in Different Chicken Strains, *Alcohol* 33, 457—464 (1998)
- 8) Gibson, G.G., and Skett, P. (監修:村田敏郎):「Introduction to Drug Metabolism (薬物代謝学)」、講談社、247—284 (2000)
- 9) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275 (1951)
- 10) Gilani, B. and Persaud, T.: Embryopathic Effects of Ethanol and Caffeine in the Chick, *Anat. Anz.* 158, 231—235 (1985)
- 11) Rubin, E., and Lieber, C.S.: Hepatic Microsomal Enzyme in Man and Rat: Induction and Inhibition of Hepatic Microsomal and Mitochondrial Enzymes by Ethanol, *Science*, 162, 690—692 (1968)
- 12) Narayama, S., Bounds, P.L., and Winston, G.W.: Differential Induction of Peroxygenase-Dependent Microsomal Aniline Hydroxylase by Chronic Ethanol Ingestion, *Drug Chem. Toxicol.* 13, 155—172 (1990)
- 13) Hamburger, V. and Hamilton, H.L.: A Series of

- Normal Stages in the Development of the Chick Embryo, *J. Morphol.* 88, 49—92 (1951)
- 14) 田嶋嘉雄 (監修) : 「実験動物学」、朝倉書店、218—235 (1976)
- 15) Noguchi, M, Fujitsuka, T., Honda, K.,and Kawai, Y.: Effects of Phenobarbital on Drug Metabolizing Enzyme Activities and Other Biochemical Parameters in Rats with DL-Ethionine ̄ Induced Liver Injury, *J. Toxicol. Sci.*,19,203—212 (1994)
- 16) Schuppel, R.V.A. and Kuthe, C.: Ethanol as a Selective Inhibitor of Microsomal Barbiturate Hydroxylation In Vitro and In Vivo, *Adv. Exp. Med. Biol.* 132, 363—372 (1980)
- 17) Coldwell, B.B., Wiberg ,G.S. and Trenholm, H.L.: Some Effects of Ethanol on the Toxicity and Distribution of Barbiturates in Rats, *Can. J. Physiol.Pharmacol.* 48,254—264 (1970)
- 18) Wiberg, G.S., Coldwell, B.B. and Trenholm, H.L.: Toxicity of Ethanol-Barbiturate Mixtures, *J.Pharm.Pharmac.*, 21, 232-236 (1969)
- 19) Chosh, C., Bandyopadhyay, S., and Medda, J.N. : Protective Role of Thyroxine in Methylparathion Intoxicated Chick Embryos, *Drug Chem. Toxicol* .21,495—506 (1998)