

新睡眠薬及び睡眠薬拮抗物質の探索研究から睡眠機構研究に辿りつくまで
—バルビツール酸からウリジンまで (その 1)¹⁾—

山本 郁男

**The Studies on the Structure-Activity Relationship of Allyl Substituted Oxopyrimidines
Searching for the Novel Antagonist or Agonist of Barbiturates to the
Sleep Mechanism Based on the Uridine Receptor Theory
—Barbituric Acid to Uridine (Part I)¹⁾—**

Ikuo YAMAMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University, 3-Ho Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan

(Received September 28, 2004)

Thirty-six allyl substituted oxopyrimidine analogues such as barbituric acid (BA), barbiturates, uracil, thymine, and related derivatives including 13 new compounds were synthesized and their pharmacologic effects ([hypnotic activity, anticonvulsant activity against pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures, and LD₅₀]) and interactions with the barbiturates were evaluated in mice and rats. The results are briefly and partially summarized as follows. BA prolonged pentobarbital (PB)-induced sleep and had some central depressant effects. *N*,5,5-Triallyl-BA exhibited some hypnotic and anticonvulsant activities, although the other 5,*N*-allyl-compounds did not show any activity except for allobarbitol (AlloB). *N*-Allyl-BA, 5-allyl-BA, *N*¹,*N*³,5-triallyl-BA, *N*,5,5-triallyl-BA, and *N*¹,*N*³,5,5-tetraallyl-BA also prolonged PB-induced sleep. Interestingly, *N*,5,5-triallyl-BA was the most potent in the interaction with AlloB, phenobarbital (PheB), amobarbital (AB), PB, and thiopental (TP) but not barbital (B). *N*¹,*N*³,5,5-Tetraallyl-BA prolonged AlloB-, PB-, and AB-induced sleep but not B-, PheB-, and TP-induced sleep. *N*¹,*N*³,5-Triallyl-B prolonged only PB- and TP-induced sleep. 5,5-Diallyl-BA prolonged PheB- and TP-induced sleep. *N*,5-Diallyl-BA prolonged only TP-induced sleep. In contrast, BA and *N*¹,*N*³,5-triallyl-AB tended to antagonize AlloB, AB, and B. *N*¹,*N*³,5,5-Tetraallyl-BA also slightly antagonized B, PheB, and TP. 5,5-Diallyl-BA antagonized only AB. The prolonging effects of BA, *N*,5,5-triallyl-BA, and *N*¹,*N*³,5,5-tetraallyl-BA on PB-induced sleep were dose dependent. These results indicate that the position and number of allyl groups substituted on the structure of BA play an important role in their depressant activities. This review deals with the structure-activity relationship of allyl-substituted oxopyrimidines as part of our search for antagonists and agonists of barbiturates as well as their mechanisms of action.

Key words—allyl substituted barbiturate; interaction; hypnotic; anticonvulsant; antagonist; agonist

はじめに

睡眠はヒトを含む動物の必須の生理機能あるいは現象であり、食欲と同じように生きるための本能的な要求でもある。しかしながら、「動物はなぜ眠るのか」と言う謎は現在でも完全には解明されていない。

一方、この睡眠を妨げる障害を広く不眠症と呼

び、今日、文明人の5—10人に1人は不眠に悩まされている。このため睡眠薬（催眠薬と書くこともある）の開発研究の歴史は1世紀以上にもなり、これまでに合成された数は万を下らない。1869年抱水クロラルの発見に始まり、1888年スルホナール、さらに1903年バルビツールと続いた睡眠薬は現在、バルビツール酸系、非バルビツール酸系、ベンゾジアゼピン誘導体の3種に構造的に大きく分類される。ここで問題とするバルビツール酸系睡眠薬はこれまで2500種以上が合成され、一時は60種近くが臨床に使用されていた。しかし、最近ではベンゾジアゼピン誘導体にとって代わられた感があるものの、それでも10種余りが世界中で汎用されてい

北陸大学薬学部衛生化学教室 (〒920-1181 金沢市金川町ホ-3)

Present address: School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare (九州保健福祉大学薬学部), 1714-1 Yoshino-machi, Nobeoka, Miyazaki 882-8508, Japan

e-mail: iyamamoto@phoenix.ac.jp

助線に相当する。ただし、横道に入って本道を全く見失う場合も少なくない。

筆者らのバルビツレートアンタゴニストの探索研究はバルビツレート睡眠薬の構造活性相関研究、さらにこの研究途上ウリジンが睡眠促進物質 (Sleep promoting substances: SPS) として発見されたことから、睡眠薬作用機序及び睡眠メカニズム研究へと進展した。これは奇しくもバルビツレートが核酸の1つであるウリジンと共通骨格であるオキソピリミジン環を持つことに端を発している。

本総説は筆者の40年に亘る「睡眠研究」を多少の前後はあるがバルビツレート (非バルビツレートを含む) 代謝研究を縦軸におき、アリル置換バルビツレートの構造活性相関研究を横軸とし、いまだ完全に解かれたとは言えないがこの一大ドラマの前編 (その1) として新睡眠物質及びその受容体 (ウリジン受容体) の発見並びにウリジン受容体説に基づく睡眠メカニズム提唱に至るまでの過程を後編 (後編は続いて報告の予定である) (その2) としてまとめたものである。

1. バルビツール酸 (BA) の *N*-及び *C*-アリル体の合成並びに薬理作用¹³⁾

バルビツレートの基本骨格オキソピリミジン環を持つバルビツール酸 (BA) の1及び3位の *N*¹, *N*³ 及び *C*⁵ 位の3個所にアリル基を導入した理論上考

えられる8種の化合物を Method A (マロン酸ジエチルとジアリル尿素との縮合) と Method B (BA に直接アリルブロマイドを NaOH アルカリ性アセトン存在下反応) を用いて合成した。¹³⁾ これらのいくつかは、例えば5位の *C* に2個のアリル基を持つアロバルビタール (AlloB) (*C*⁵-ジアリルバルビツール酸, 5-DABA) は既に市販されている。そこで B は既に Kaku ら¹²⁾ によって報告されている Method B¹⁴⁻¹⁶⁾ により Fig. 2 に示す *N*¹-モノアリル-BA (*N*-MABA), *C*⁵-モノアリル-BA (5-MABA), *N*¹, *C*⁵-ジアリル-BA (*N*, 5-DABA), *N*, *N*³-DABA, *N*¹, *N*³, *C*⁵-トリアリル-BA (*N*¹, *N*³, 5-TABA) *N*, 5, 5-TABA 及び *N*¹, *N*³, *C*⁵, *C*⁵-テトラアリル-BA (TetraABA) を9—87%で得た。ここでは省略するが、元素分析, ¹H-NMR, IR 等によりその構造はよく支持された。¹³⁾ これまでこれら8種とBAの標品すべてを同時に用いての単独睡眠作用及び相互作用を総合的かつ詳細に報告したものはなかった。この報告が大きな知見を与えた。

まず、原料化合物, BA と AlloB をコントロールとして単独睡眠作用 (HD₅₀), 抗癒れん作用 (ベンチレンテトラゾール, PTZ-ED₅₀), 急性毒性 (LD₅₀) を ddN 系雄性マウス (20—30 g) を用いて検討した。これらの結果を Table 1 に示した。

この結果、単独睡眠作用を示すものは当然のこと

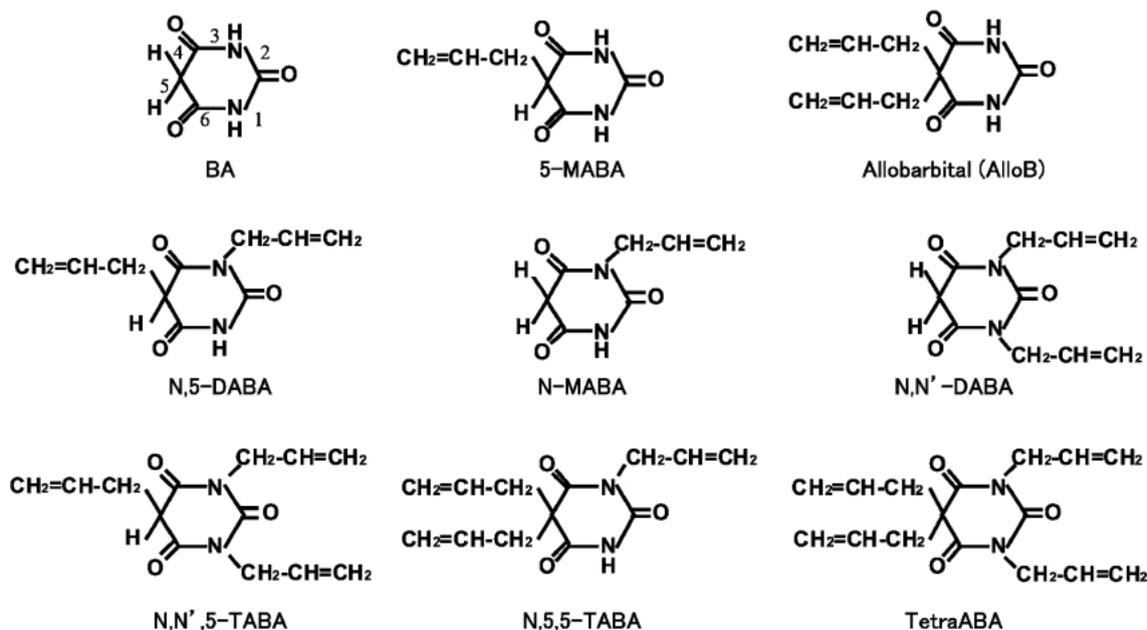


Fig. 2. Structures of BA and Allyl Substituted BA

Table 1. Pharmacological Activities of *C*- or *N*-Allyl Substituted Barbituric Acids

Compound	HD ₅₀ mg/kg, <i>i.p.</i>	PTZ-ED ₅₀ mg/kg, <i>i.p.</i>	LD ₅₀ mg/kg, <i>i.p.</i>
BA	None (640)	>250	505 (467—546)
5-MABA	None (640)	>250	600 (554—650)
<i>N</i> -MABA	None (640)	>250	>640
<i>N</i> , 5-DABA	None (640)	>250	525 (474—581)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ³ -DABA	None (640)	>250	607 (537—686)
AlloB	48.1 (42.9—53.9) ^{a)}	5.42 (3.39—8.67)	185 (167—205)
<i>N</i> , 5, 5-TABA	87.5 (83.8—91.4)	18.0 (15.1—21.3)	342 (309—378)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ³ , 5-TABA	None (640)	>250	640
TetraABA	None (640)	>250	>640

a) The 95% confidence limits, in parentheses, were calculated by the method of Litchfield and Wilcoxon.

ながら AlloB と新たに *N*¹, *C*⁵, *C*⁵-トリアリル-BA (*N*, 5, 5-TABA) の 2 種が見出された. *N*, 5, 5-TABA は AlloB の約 1/2 の作用を示した. 抗痙れん作用は約 1/3, 毒性もほぼ 1/2 であった. しかしながら, 他のすべてのアリル体は致死用量まで増量しても全く睡眠作用を示さず, また抗痙れん作用も 250 mg/kg, *i.p.* という高用量でも認められなかった. そこで, 睡眠作用を示した *N*, 5, 5-TABA と AlloB を詳細に比較した. 結果は Fig. 3 に示すように *N*, 5, 5-TABA は用量反応曲線 (Dose response curve) を示し, AlloB の 60 mg/kg, *i.p.* と比較すると上述のように約 1/2 であったが睡眠作用はいまだ保持していた.

他の化合物の毒性も 500 mg/kg, *i.p.* 以上という高用量であり, いずれもかなり低毒性であることが分かった. これらの結果から睡眠, 抗痙れん作用の発現には BA の 5 位に 2 個のアリル基を有することが必須であり, さらに *N* 位に 1 個のアリル基を導入すると睡眠及び抗痙れん作用は減じ弱いながらも両作用はいまだ保持されることが分かった. しかし, *N* 位にさらに 2 個のアリル基を導入した TetraABA では両作用が完全に消失するということが判明した. 一般にアリル基の導入は脂溶性を増し作用が増強すると考えられていたが, この場合 4 個のアリル基導入で睡眠作用や抗痙れん作用が消失することから, そうではなくむしろ BA の -NH-CO-NH- の存在が必須であると考えられた. これらはブロムワレリル尿素やブロムジエチルアセチル尿素の睡眠作用と似ている.¹⁷⁾

モルヒネの鎮痛にはアリル基を有するナロルフィンが強い拮抗作用を示すことから, 次に, ここに合

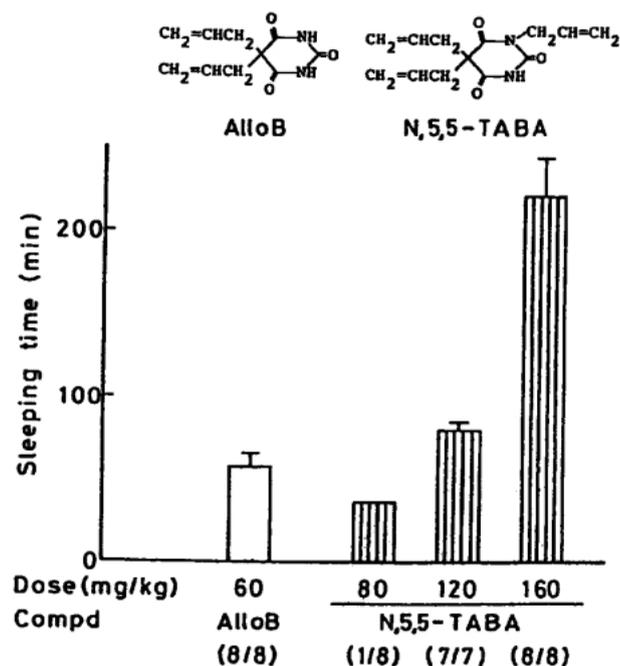


Fig. 3. Hypnotic Activity of AlloB and *N*, 5, 5-TABA

The result is expressed as the mean \pm standard error (S.E.). Fraction in parentheses represent the ratio of number of mice slept to number of mice used.

成した BA を含む 9 種のアリル置換 BA の中枢抑制又は興奮 (若しくはアンタゴニスト作用) 等の有無を知るために, 6 種の市販バルビツレート (AlloB, B, PheB, AB, PB, TP) との相互作用を検討した. すなわち, 睡眠時間を測定することによって相加, 相乗など協力作用あるいは拮抗作用の有無を調べた. その結果を Table 2 に示す. これらは非常に興味ある結果なので詳細に比較し考察を加えてみたい.

これらの実験は Table 2 の下にも書いてあるように, 一番左側のアリル化合物をあらかじめパイロット実験で適当とされた量 (dose/kg, *i.p.*) 60 mg (Al-

Table 2. Effects of BA and C- or N-Allyl Substituted Barbituric Acids on Barbiturate-Induced Sleep

Compound No.	Dose (mg/kg)	Sleeping time (min)							
		AlloB 80 mg/kg	B 300 mg/kg	PheB 130 mg/kg	AB 100 mg/kg	PB 40 mg/kg	TP 50 mg/kg		
Control		113±14 (18)	79±13 (11)	88±29 (8)	92±14 (8)	16±2 (9)	7±1 (6)		
BA	160	89±4 (7)	96±8 (12)	99±13 (8)	74±3 (7)	30±2 ^{b)} (8)	8±1 (7)		
5-MABA	160	172±32 (7)	120±21 (11)	94±5 (7)	121±26 (8)	34±7 ^{a)} (7)	11±3 (6)		
N-MABA	160	115±14 (7)	101±5 (11)	88±13 (7)	127±27 (6)	34±7 ^{a)} (8)	8±1 (5)		
N ¹ , N ³ -DABA	160	177±27 (8)	90±6 (11)	206±36 ^{a)} (8)	75±9 (7)	24±5 (8)	23±3 ^{b)} (6)		
N, 5-DABA	160	164±24 (7)	115±22 (9)	161±50 (7)	99±15 (8)	28±6 (7)	28±6 ^{a)} (7)		
AlloB	60	641±116 ^{b)} (8)	809±170 ^{b)} (6)	1832±25 ^{b)} (4)	344±70 ^{b)} (8)	429±36 ^{b)} (7)	474±96 ^{b)} (7)		
N, 5, 5-TABA	60	318±39 ^{b)} (7)	114±17 (12)	597±63 ^{b)} (6)	220±27 ^{b)} (8)	406±46 ^{b)} (8)	66±14 ^{b)} (7)		
N ¹ , N ³ , 5-TABA	160	86±7 (10)	74±8 (7)	88±18 (6)	143±20 (7)	30±3 ^{b)} (7)	15±3 ^{a)} (7)		
TetraABA	60	178±28 ^{a)} (8)	71±9 (12)	85±21 (6)	209±31 ^{b)} (6)	525±42 ^{b)} (8)	6±1 (7)		

BA and allyl compounds tested were administered *i.p.* 15 min prior to the *i.p.* injection of barbiturate. Data are expressed as the mean ± S.E. Numbers in parentheses represent number of animals used. *a)* Significantly different from the control ($p < 0.05$). *b)* Significantly different from the control ($p < 0.01$).

loB, N,5,5-TABA, TetraABA) 又は 160 mg (BA, N-MABA, 5-MABA, N,N'-DABA, N,5-DABA, N,N',5-TABA) を投与 15 分後に 6 種のバルビツレート これまたあらかじめ決めていた量を *i.p.* で challenge し睡眠時間 (分) を測定した。化合物の中には水に不溶性のものもあるため、1% Tween80 生理食塩液に溶かすか、懸濁液 (コントロールとして 1% Tween80 生理食塩液を用いた) を投与した。その結果、一見奇妙な測定値が得られた。BA は AlloB, B, PheB, AB, TP に対して有意差はみられなかったが、PB に対してのみ約 2 倍の有意な延長を示した (Table 2)。これまで BA 自体には何ら中枢作用はないとされていたが、¹⁷⁾ ウラシル (U) などのオキシピリミジンには HB 睡眠延長作用や抗痙攣作用があるとの報告^{18,19)} もあるので BA 自体にも潜在的に中枢抑制作用があり、これが PB との併用のみに現れたものとする。しかしなぜ同系列の他のバルビツレートにはこの延長作用が出ないのかという興味ある疑問は残った。いずれにせよ、BA は弱いながらも潜在的な中枢抑制作用を有するという初めての知見が得られた。したがって、C⁵ にアリルあるいはアルキル基の置換はその抑制作用を増強して鎮痛、睡眠、抗痙攣作用を発現したものと考えられる。Fig. 4 に BA, N-MABA, 5-MAB 等と 9 種のバルビツレートとの相互作用を図示した。この中で斜線は有意差があることを示している。ここで AlloB を中心として考察を加えると当然のことながら市販の AlloB (60 mg/kg) は 15 分後の Al-

loB 80 mg/kg の投与でコントロールの 113 分に対して約 6 倍の 641 分を示した。これは 15 分後と言っても合計 140 mg/kg を投与したことになるのでこの延長作用は作用部位における相加、相乗作用と考えてよいだろう。5-MABA (172 分)、N-MABA (115 分)、N,N'-DABA (177 分)、N,5-DABA (164 分) と有意差はないもののすべて延長傾向を示した。しかし、HD₅₀ で何ら作用を示さなかった TetraABA (178 分) 及び単独睡眠作用において 120 mg/kg, *i.p.* で約 90 分を示した N,5,5-TABA の 2 種は 318 分と有意な延長をみせた。前者はコントロールに対して 1.5 倍、後者は約 3 倍であった。しかし興味あることに、BA と N,N',5-TABA のみは 89 分及び 86 分とやや短縮傾向を示した。この理由については現在でも明らかではないが N 位のアリル基の導入によって脂溶性の変化が原因だとしても N,N'-DABA が約 1.5 倍の延長を示している事実を考えると不思議でさえある。次に同様に B (300 mg/kg) をみると N¹,N³,5-TABA (74 分)、TetraABA (71 分) は有意差なしであったが、BA (96 分)、5-MABA (120 分)、N-MABA (101 分)、N¹,N³-DABA (90 分)、N,5-DABA (115 分)、N,5,5-TABA (114 分) といずれもやや延長傾向を示した。当然のことながら、AlloB に対しては 809 分と約 10 倍の延長作用を示した。これは予想されていたごとく相乗作用と言えるであろう。しかしながら、ここで先の AlloB に対して延長をみせた N,5,5-TABA と TetraABA は延長を示さず、上述のごとく TetraA-

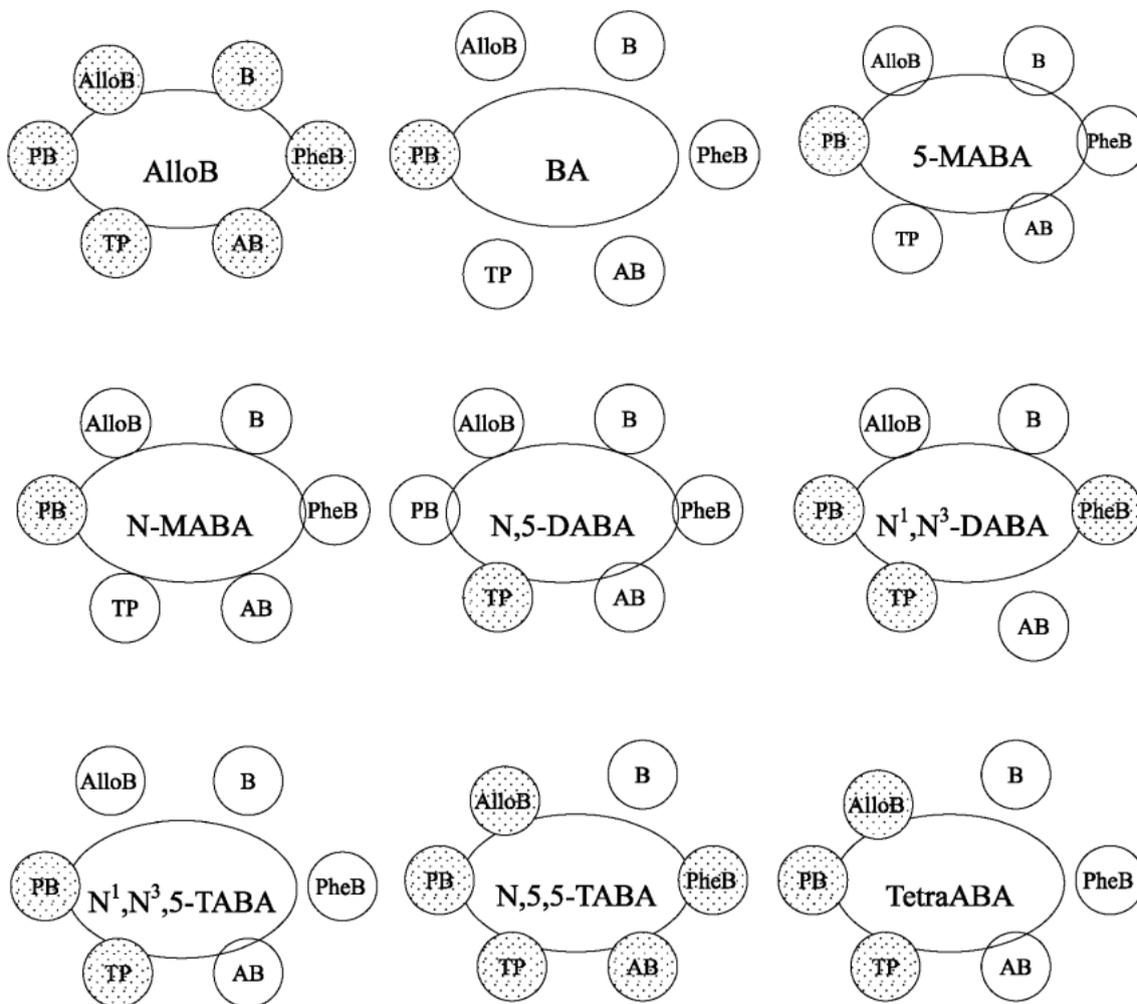


Fig. 4. Illustration of Interaction of Allyl Substituted BA to Six Kinds of Barbiturates
 ●: Significantly, ○: No Significantly.

BA には逆には短縮現象さえみせ構造活性相関の結論に混乱させる結果が得られた。次に PheB (130 mg/kg) に対してはコントロール 88 分のとき、N-MABA, N¹,N³, 5-TABA 及び TetraABA では全く延長作用がみられないにもかかわらず BA (99 分), 5-MABA (94 分), N,5-DABA (161 分) と弱いながらも延長傾向を示した。さらに驚くべきことに、今まで有意な延長をみせなかった N¹,N³-DABA が 206 分と約 2.2 倍, N,5,5-TABA (597 分) が約 6 倍, AlloB (1,832 分) では実に約 20 倍の驚異的な延長作用を示した。この 3 つのバルビツール酸系睡眠薬に対する結果をみただけでもわずかな構造変化によって多彩な作用変化をみせたことは最早, Goodman 及び Gilman のテキストなど従来定説となっていたバルビツールの分類 (長時間型, 中間型, 短時間型, 超短時間型)^{5,6)} に疑問を投げかける

こととなった。つまり生体側の作用部位 (作用メカニズム) が各々のバルビツールによって異なっている (各々のバルビツール自体に対する受容体の存在) のではないかということを示唆している。そこで、次の検討課題として AB について行った。コントロール 92 分のとき, BA (74 分), N¹,N³-DABA (75 分) と短縮傾向を示したのに対して, N-MABA (127 分), 5-MABA (121 分), N¹,N³,5-TABA (143 分) と延長傾向, N,5,5-TABA では (220 分, 約 2.5 倍), TetraABA (209 分, 約 2 倍), AlloB (344 分, 3.5 倍) と有意に延長を示したが, AlloB の 3.5 倍はこのものの睡眠作用を考えると既に述べた AlloB で 641 分 (約 6 倍) であるから非常に短いと言える。そこで次に PB について同様な検討, 考察を行った。PB (40 mg/kg) ではコントロールが 16 分のとき, N¹,N³-DABA (24 分),

N,5-*DABA* (28分)の2つの化合物のみがバラツキがあり有意な延長作用がみられなかったのに対して、既述のように *BA* (30分, 約2倍)を始めとして *N-MABA* (34分, 約2倍), 5-*MABA* (34分, 約2倍), *N*¹,*N*³,5-*TABA* (30分, 約2倍)とすべての化合物に対して約2倍程度の延長作用を示した。しかし, *N*,5,5-*TABA*は406分, 約25倍と驚くべき結果を示した。この事実は *TetraABA*で倍加した。すなわち *AlloB*はこれ自体が睡眠薬として使用されているので429分, 約27倍は先に記述した相加, 相乗作用として当然であるものの, さらに単独睡眠作用において640 mg/kgと投与限界量という高用量でも何ら睡眠作用を示さなかった *TetraABA* (Table 1)が525分(約33倍)と驚異的延長作用を示した。さらに驚くべきことは次の *TP*である。この2つの構造的差異はあらためて指摘するまでもなく >C=O と >C=S の差のみである。周知のように前述のごとく *TP*は *Goodman* 及び *Gilman*¹⁷⁾の書では *ultra short acting barbiturates*として分類されており, 生体内脂肪組織への分布,²⁰⁾ 血漿タンパクへの結合性,²¹⁾ 血液脳関門の透過性などが記述されているものの *TP*は生体内で直ちに一部は *PB*に脱硫変換される²²⁾ことが知られているのでさして結果に差異が出るとは考え難い。それなのに *PB* (50 mg/kg)の投与ではコントロール7分に対して *BA* (8分), *N-MABA* (8分), 5-*MABA* (11分)は, *PB*で3者ともに延長作用の傾向を示したもののすべて有意差はみられなかった。*TP*において, *PB*では525分, 約33倍と驚くべき延長作用を示したのに対して, *TetraABA*では全く有意差なしの(6分)というように嘘のような, 狐にだまされたような結果が得られた。一体これは何なのか?この両者の作用メカニズムにどのような差異があるのであろうか。このようなこれまでの薬理学上の常識を破るような結果はどのように解釈すべきか。*N*¹,*N*³-*DABA* (23分, 約3倍), *N*,5-*DABA* (28分, 約4倍), *N*¹,*N*³,5-*TABA* (15分, 約2倍)とここでも前2者と *PB*の差異は明らかであり *N*,5,5-*TABA*は66分, 約9倍 (*PB*では約25倍)なのに不思議なことに *AlloB*には474分, 約68倍 (*PB*では約27倍)を示した。これは *AlloB* (60 mg/kg)に *AlloB* (80 mg/kg)の約6倍の結果を考えると, この *TP*の約68倍は *AlloB*の約10倍に相

当する。この現象に対して筆者らは“超相乗作用”と名付けざるを得なかった。この作用メカニズムは生体側の要因にはかならないが筆者はこの原因を現在もお追索中であるがいまだ解明されていない。特に *TetraABA*の *PB*と *TP*に対する対照的な差異の解明は薬理学上の新事実発見を秘めているものとの確信を持っている。

そこで一般的であるがこれらの事実を再確認するため, 以下のような検討を行った。その作用メカニズム研究の一環として *Dose response curve*を取って見たのが以下 Fig. 5及び Fig. 6である。すなわち Fig. 5 (+*PB*)では有意な延長を示した *BA*, *N*,5,5-*TABA*及び *TetraABA*の3種を選び検討した。その結果3種の化合物ともに用量依存的に *PB*睡眠を延長した。この *PB*の結果は先に述べたように *BA*自身に中枢抑制作用ありという知見を確認するものであった。また4個のアリル基 (-CH₂-CH=CH₂)を持つ *TetraABA*は全く単独睡眠作用を持たない (Table 1)にもかかわらず, 一方, 睡眠及び抗痙攣作用を *AlloB*の約1/2有する *N*,5,5-*TABA* (3個のアリル基を持つ)と全く同程度の *PB*睡眠延長作用があることがこの *Dose response curve*の検討によって再確認された。本実験は Table 2の実験の追試として重要性を持っている。Fig. 6 (+*TP*)でも2種の化合物 *N*,5,5-*TABA*及び *TetraABA*を用いて検討した。その結果, *TetraABA*は若干のバラツキがあるものの用量依存性を示したのに対して, *N*,5,5-*TABA*はかなりの無理のある結果を示した。すなわち用量依存性はみられなかった。以上のごとく, *BA*骨格へのアリル基の導入により様々な活性の変化がみられた。特に *C*⁵へのアリル基導入は睡眠作用を増強するのに対して *N*位は消失の傾向を示した。しかし, なお *BA*を含めて中枢抑制作用はいずれも保持していた。さらに既述の相互作用の検討結果ではこれまで常識では考えられない様々な結果が得られた。これらはいずれも体内動態 (特に代謝)の差異を強調するにはわずか15分後の投与であるのでこれらは考えられず大きな矛盾をはらんでおり次への展開が期待された。この段階での推論であるが, このように基本構造 (バルビツレートである点)は同じなのに相互作用において各々の作用が異なることは脳内における作用点 (あるいはメカニズム)が一様でないことを示

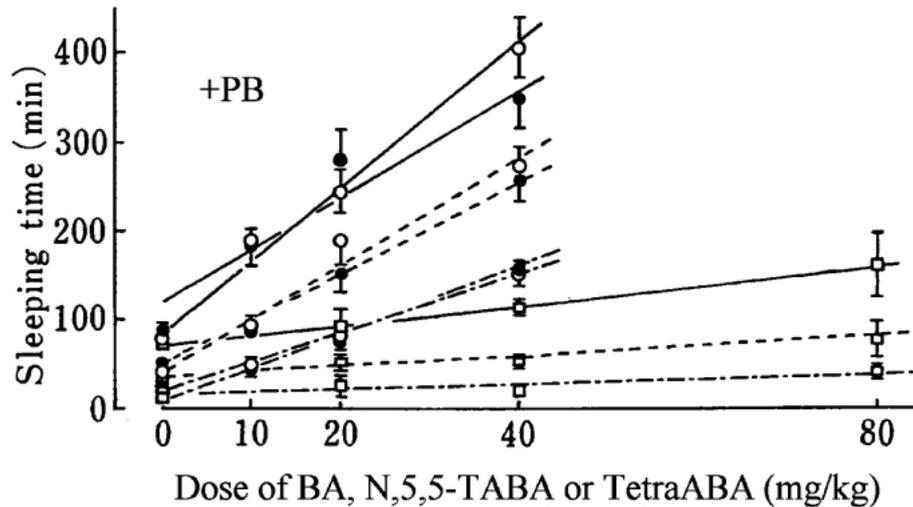


Fig. 5. Dose-Response Curves of BA, *N*,5,5-*TABA* and TetraABA on PB-Induced Sleep

BA, *N*,5,5-*TABA* and TetraABA *i.p.* 15 min before the *i.p.* injection of PB. Control group was pretreated *i.p.* injection of PB. Control group was pretreated with 1% Tween 80-saline as the vehicle. Each point corresponds to the mean sleeping time of 7 mice. Vertical bars indicate S.E. of the mean. □—□: BA+PB 60 mg/kg, ○—○: BA+PB 50 mg/kg, △—△: BA+PB 40 mg/kg, ●—●: *N*,5,5-*TABA*+PB 60 mg/kg, ■—■: *N*,5,5-*TABA*+PB 50 mg/kg, ▲—▲: *N*,5,5-*TABA*+PB 40 mg/kg, ○—○: TetraABA+PB 60 mg/kg, ○—○: TetraABA+PB 50 mg/kg, ○—○: TetraABA+PB 40 mg/kg.

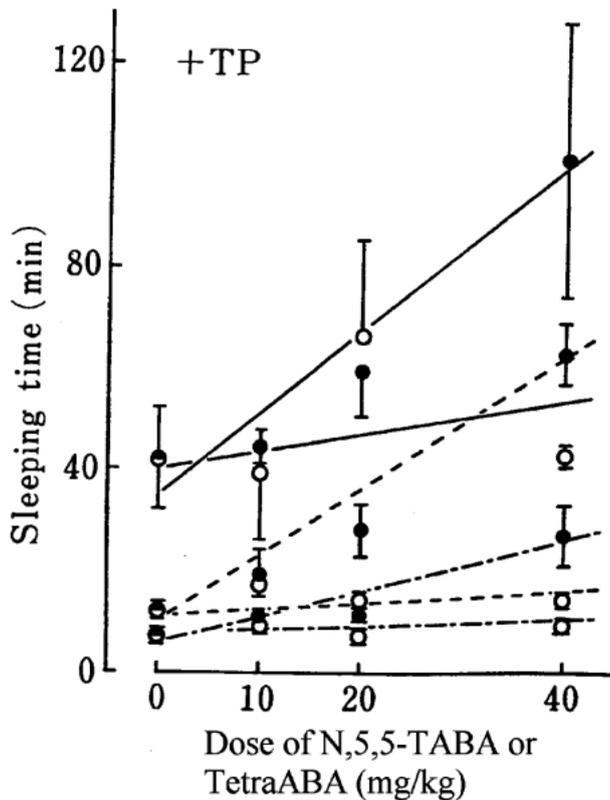


Fig. 6. Dose-Response Curves of *N*,5,5-*TABA* and TetraABA on TP-Induced Sleep

N,5,5-*TABA* and TetraABA were administered *i.p.* 15 min before the *i.p.* injection of TP. Control group was pretreated *i.p.* injection of PB. Control group was pretreated with 1% Tween 80-saline as the vehicle. Each point corresponds to the mean sleeping time of 8 mice. Vertical bars indicate S.E. of the mean. ●—●: *N*,5,5-*TABA*+TP 70 mg/kg, ■—■: *N*,5,5-*TABA*+TP 60 mg/kg, ▲—▲: *N*,5,5-*TABA*+TP 50 mg/kg, ○—○: TetraABA+TP 70 mg/kg, ○—○: TetraABA+TP 60 mg/kg, ○—○: TetraABA+TP 50 mg/kg.

すとともに、何らかの既説にない真理（発見）があることをうかがい知るもので極めて興味深い結果と思われた。これらの事実をより明確にするために、さらに次の研究へと進展させた。ここで一応考えられることは 1) 受容体（レセプター）説 2) 神経伝達物質の変化説 3) 神経修飾物質存在説 4) ABDME 説 5) 新トランスポーター説などが考えられる。

2. ペントバルビタール（PB）、バルビタール（B）、フェノバルビタール（PheB）、アモバルビタール（AB）及びチオペンタール（TP）の *N*-及び *S*-アリル体の合成並びに薬理作用²³⁻²⁵⁾

2-1. 概説 前章において Table 2 にみられるように BA 骨格にアリル基を導入することによって様々な活性物質が得られた。特に睡眠時間を指標とする相互作用の検討によって短縮あるいは延長とその作用は千差万別であった。例えば短縮作用として *N*¹,*N*³,5-*TABA* のごとく AlloB の睡眠作用をコントロールの 113 分に対して 86 分。TetraABA のとき、B に対してコントロール 79 分のとき 71 分、PheB のコントロール 86 分のとき 85 分、*N*¹,*N*³-*DABA* のごとく AB に対してコントロール 92 分のとき *N*¹,*N*³-*DABA* 75 分、TetraABA の TP に対してコントロール 7 分のとき 6 分と有意差はないものの短縮傾向を示した。その他のすべてが延長作用を

示したのであるから、これらの短縮作用には注目しなければならない。そこでアンタゴニストを求めるべくこれら既存の5種のバルビツレートのNHにアリル基を導入することによって化合物を得、これらの薬理作用を前節同様に検討した。

これらを原料とし既述の合成法 (B)¹²⁾ に準じて行い調製した。PB, B, PheB, ABについては*N*-モノアリル体及び*N*¹,*N*³-ジアリル体8種(ただしMABを除く*N*-モノアリル体は2種の異性体が理論上考えられるがラセミ体として使用) TPに関しては3種の生成物が得られた。それらの構造をFig. 7に示す。1つは*N,S*-ジアリル-TP (*N,S*-DATP), *N*-モノアリル-TP (MATP), 及び*N*¹,*N*³-ジアリル

-TP (DATP) であった。主生成物 *N,S*-DATP の構造は、5-イソプロピル-2-チオバルビツール酸と臭化アリルを反応において、5位よりも優位に2位のS原子にアリル基が置換された5-イソプロピル-2-アリルチオバルビツール酸が生成する²²⁾ことから、TPの場合もSへのアリル基の置換がNよりも優位に起こっているものと考えられた。事実、このものの機器分析の結果もよくこの構造を支持していることから確認された。

2-2. BAとそのアリル化合物のときと同様に単独睡眠作用、抗痙れん作用、毒性(LD₅₀)を検討した。その結果をTable 3に示した。いずれのモノアリル体は母化合物の約1/2—1/4の活性を有し

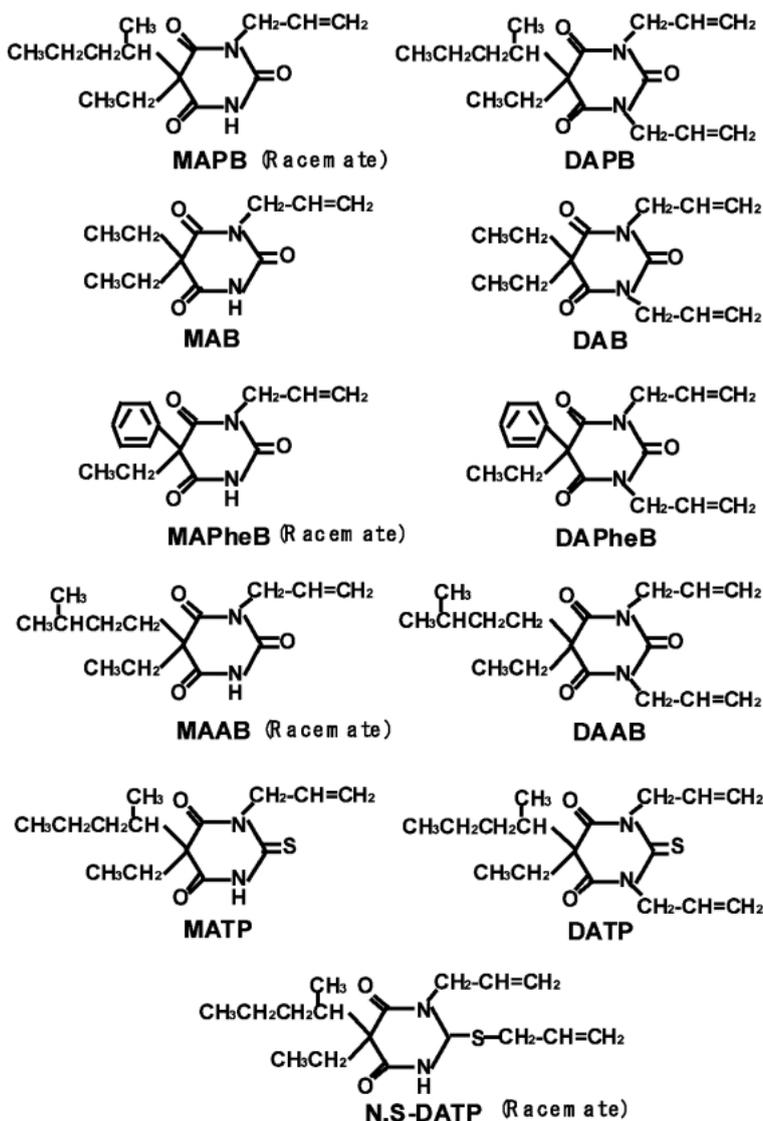


Fig. 7. Structures of Allyl Substituted Barbiturates

Table 3. Pharmacological Activities of *N*- (or *S*)-Allyl Substituted Derivatives

Compound	HD ₅₀ mg/kg, <i>i.p.</i>	PTZ-ED ₅₀ mg/kg, <i>i.p.</i>	LD ₅₀ mg/kg, <i>i.p.</i>
Pentobarbital (PB)	37.0 (36.1—37.9)	12.6 (9.6—16.5)	123 (115—131)
MAPB	77.5 (64.3—93.9)	23.5 (14.2—38.9)	522 (462—590)
DAPB	None	>250	962 (909—1018)
Barbital (B)	179 (153—209)	27.7 (25.5—30.1)	682 (646—720)
MAB	146 (140—152)	25.1 (18.1—34.8)	410 (379—443)
DAB	None	>250	995 (890—1112)
Phenobarbital (PheB)	96.3 (77.0—120)	19.2 (13.8—26.6)	226 (213—240)
MAPheB	186 (173—200)	62.0 (51.0—75.3)	488 (456—522)
DAPheB	None (1400)	>250	1270 (1207—1336)
Amobarbital (AB)	67.0 (53.4—84.1)	17.5 (15.6—19.6)	185 (171—200)
MAAB	176 (147—210)	75.5 (62.1—91.8)	650 (620—682)
DAAB	None	>250	855 (770—949)
Allobarbital (AlloB)	48.1 (42.9—53.9)	5.42 (3.39—8.67)	185 (167—205)
MAAlloB	87.5 (83.8—91.4)	18.0 (15.1—21.3)	342 (309—378)
DAAlloB	None (640)	>250	>640
Thiopental (TP)	53.0 (42.7—65.7)	7.10 (4.73—10.7)	193 (183—203)
MATP	107 (84.7—135)	29.1 (24.2—35.0)	>320
DATP	None (240)	>160	>240
<i>N,S</i> -DATP	275 (215-351)	>250	575 (501—660)

ていたがジアリル体はそれらの活性を消失した。AlloB のジアリル体は Table 1 で示した結果と全く同じであった。しかし、*N,S*-DATP のみはジアリル体であるが 1 個が *S* に結合しているために 1/5 の睡眠作用をいまだ保持していた。このことは TP の作用を知る上において興味深い。この中に特記すべきことは MAB (バルビタールのモノアリル体) であり、母化合物 B の睡眠作用において約 1.5 倍、抗痙れん作用は同等かそれ以上を示した。毒性 (LD₅₀) も薬理作用の強いものは毒性も強く逆相関の関係にあった。上記の TP の 3 種のアリル誘導体は作用メカニズムの研究上のツールとして使える可能性がある。

MAB が母化合物よりも作用が強かったことから、母化合物である B との両者を比較した。その結果は Table 3 に示すように MAB は HD₅₀ 146 mg/kg, *i.p.*, PTZ-ED₅₀ 25.1 mg/kg, *i.p.* を示し、B の各々の値の 179, 27.7 mg/kg, *i.p.* に比較して約 1.5 倍の増加を示した。両者とも用量依存性を示し 200 mg/kg, *i.p.* における睡眠時間を比較すると MAB は 105 分、B はわずかに 12 分と MAB は B に対して約 9 倍と強力であった (Fig. 8)。これまでの結果ではアリル基の *N* 位への導入はすべて睡眠作用

が減弱するか、さもなければ消失していたが B のモノアリル体のみは逆に睡眠作用の増強を示した。将来、この MAB は B よりも毒性が低く作用は強いので临床上使用される可能性があるかもしれない。この事実はこれまで報告のない知見であり本研究を通じての驚くべき結果の 1 つであった。この場合もジアリル体 (DAB) は全く薬理作用を示さなかった。これは予想通りの結果である。このように B のモノアリル体は対照的な作用を持つ化合物と言える。この理由として脂溶性の増大に基づく脳内移行性の増加、あるいは作用部位における親和性の増加、又は薬物代謝酵素の阻害などが考えられるがすべてがこの理由があてはまる訳ではなくこの段階での追求は行わなかった。

2-3. MAPB 及び DAPB を取り上げこれらと AlloB を除く 5 種のバルビツレート睡眠作用に及ぼす相互作用の影響をタイムコースで検討した (Table 4)。両者ともピークタイムに違いがあるものの PheB, AB, PB 及び TP 睡眠を有意に延長した。前節 (2-2) にみられたように、単独睡眠作用を持たなかった DAPB の方が投与後 30 分において AB 及び PB に対して MAPB よりも著しく強い延長作用を示した。しかしながら、さらに興味あることに B、

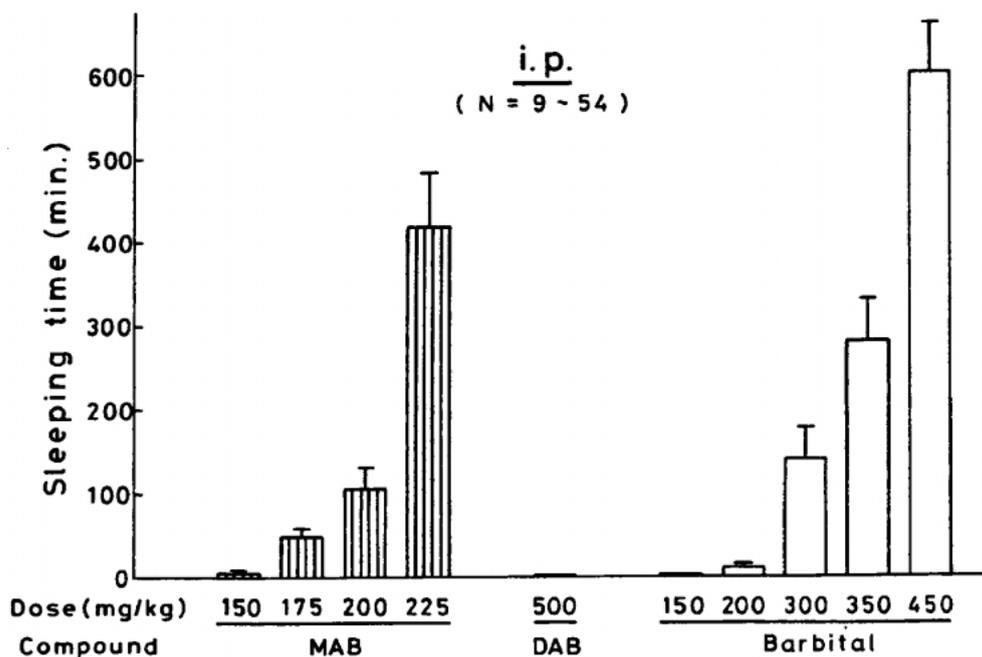


Fig. 8. Sleeping Time Induced by MAB, DAB and Barbitol
The result is expressed as the mean \pm S.E.

Table 4. Time Course of the Effects of MAPB and DAPB on Barbiturates-Induced Sleep

Compound	Time interval (min)	Sleeping time (min)				
		B 350 mg/kg	PheB 150 mg/kg	AB 80 mg/kg	PB 40 mg/kg	TB 60 mg/kg
Control		85 \pm 15 (10)	20 \pm 5 (23)	27 \pm 3 (26)	10 \pm 1 (16)	6 \pm 1 (22)
MAPB (80 mg/kg, <i>i.p.</i>)	1	185 \pm 42 (8)	58 \pm 13** (8)	202 \pm 53** (10)	142 \pm 70 (8)	43 \pm 8** (8)
	15	93 \pm 19 (8)	35 \pm 8 (8)	69 \pm 6* (10)	284 \pm 85** (6)	22 \pm 6* (8)
	30	153 \pm 33 (8)	89 \pm 26* (9)	90 \pm 27* (10)	236 \pm 68** (7)	13 \pm 2* (8)
	60	176 \pm 60 (8)	52 \pm 14* (10)	80 \pm 17* (9)	216 \pm 58* (7)	11 \pm 4 (8)
DAPB (80 mg/kg, <i>i.p.</i>)	1	203 \pm 45* (8)	177 \pm 34** (10)	299 \pm 49** (10)	113 \pm 15** (6)	38 \pm 6** (8)
	15	44 \pm 10 (8)	86 \pm 18** (9)	301 \pm 41** (9)	890 \pm 343** (7)	32 \pm 6* (8)
	30	86 \pm 18 (8)	69 \pm 17* (9)	392 \pm 57** (10)	1559 \pm 165** (7)	15 \pm 3* (8)
	60	44 \pm 12 (8)	42 \pm 18 (10)	431 \pm 56** (10)	698 \pm 263* (7)	19 \pm 3* (8)

Numbers in parentheses represent number of animals used. Data are expressed as the mean \pm S.E. On interaction with PB, MAPB or DAPB was administered at a dose of 160 mg/kg, *i.p.* * Significantly different from the control ($p < 0.05$). ** Significantly different from the control ($p < 0.01$).

PheB, TP に対してはそれほどでもなく B に対して 15, 60 分ではコントロールの約 1/2 の短縮作用を示した。この DAPB の拮抗作用については詳しく後述する (p. 98)。

このように相互作用の検討結果は一元的に論じられない様相を示した。さらに、この事実が誤りでないことを確かめるために DAPB の MAPB 及び PB との相互作用についてタイムコース及び用量依存性の有無について詳細に検討した。

Fig. 9 に示すように PB 睡眠に対する相互作用は

DAPB では投与後 30 分にピークがみられるが MAPB では 15 分であった。この傾向は他の相互作用の実験でもみられたので以後の検討では投与後 15 分とした。用量依存性の検討結果 (Fig. 10) においても、80 mg/kg, *i.p.* までは依存性を示し MAPB は約 23 倍、DAPB では実に 80 倍もの延長作用を示した。この延長 (相互) 作用は PB の投与量を 40 から 50, 60 mg/kg, *i.p.* と増量することによりさらに明確となった (Fig. 11)。以上の結果をまとめるとジアリル体である DAPB が高用量でさえ

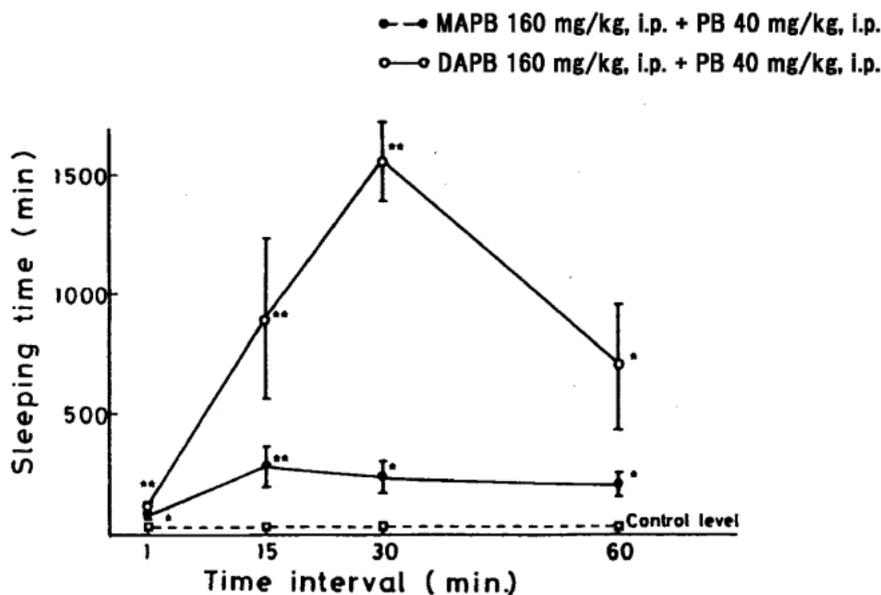


Fig. 9. Time Course of the Effect of MAPB and DAPB on PB-Induced Sleep

The result is expressed as the mean \pm S.E. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

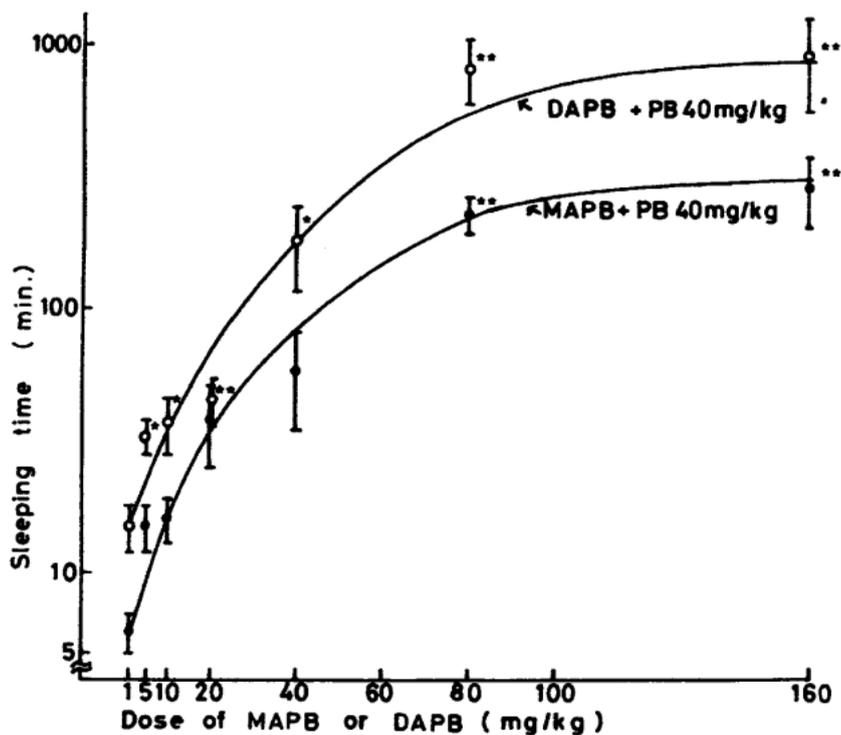


Fig. 10. Effect of Different Doses of MAPB and DAPB on PB-Induced Sleep

Each point corresponds to the mean sleeping time of 8 mice. Vertical bars indicate standard error of the mean. Mean sleeping time of control was 10 ± 1 min ($n = 16$). *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

睡眠作用を持たないにもかかわらず MAPB よりも著しい PB 睡眠増強作用を有していたことである。このメカニズムの解明はバルビツレートの持つ作用や耐性現象をさらに追求する何らかの知見を与えるものと考えられる。

2-4. 次に MAB 及び DAB の 5 種のバルビツレート睡眠作用に及ぼす影響を検討した。Table 5 でみられるように MAB は B に対して 18 倍, PheB に対して 28 倍, AB には 15 倍, PB には 45 倍, TP に対しては実に 250 倍という驚異的な延長作用

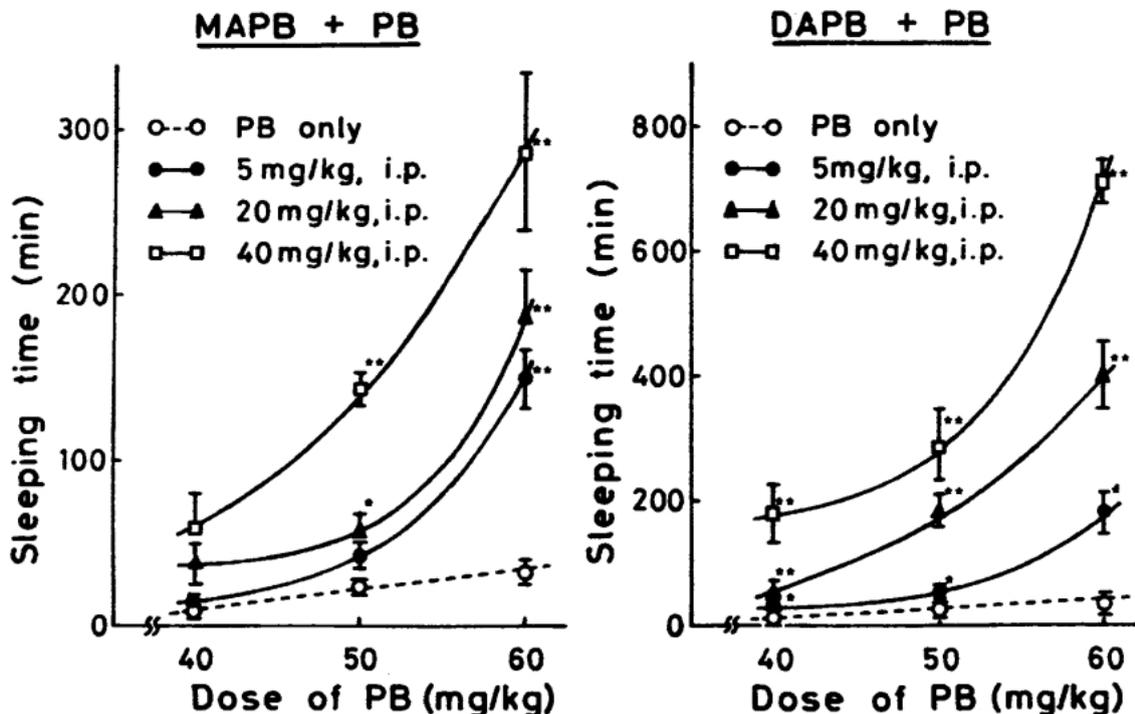


Fig. 11. Dose-Response Curves of PB in Prolonging Effect of MAPB and DAPB on PB-Induced Sleep
 Each point corresponds to the mean sleeping time of 8 mice. Vertical bars indicate standard error of the mean. *Significantly different from the corresponding group treated with PB only ($p < 0.05$). **Significantly different from the corresponding group treated with PB only ($p < 0.01$).

Table 5. Effects of MAB and DAB on Barbiturate-Induced Sleep

Treatment	Sleeping time (min)				
	B 200 mg/kg, <i>i.p.</i>	PheB 150 mg/kg, <i>i.p.</i>	AB 100 mg/kg, <i>i.p.</i>	PB 40 mg/kg, <i>i.p.</i>	TP 50 mg/kg, <i>i.p.</i>
Control	11 ± 3 (16)	50 ± 8 (12)	48 ± 3 (15)	21 ± 4 (15)	4 ± 1 (11)
MAB (150 mg/kg, <i>i.p.</i>)	203 ± 51** (11)	1427 ± 165** (15)	707 ± 92** (13)	961 ± 88** (15)	988 ± 102** (15)
DAB (150 mg/kg, <i>i.p.</i>)	31 ± 7* (11)	157 ± 34* (15)	1111 ± 94** (15)	847 ± 132** (15)	8 ± 1** (14)

Number in parentheses represent number of animals used. Data are expressed as the mean ± S.E. * Significantly different from the control ($p < 0.05$). ** Significantly different from the control ($p < 0.01$).

を示した。MABの睡眠作用はBの1.5倍なので250倍の延長作用は相加、相乗作用の結果として理解できるが、DABではさらに驚くべき結果が得られた。何度も重複を顧みず述べるが、DABは睡眠作用は全くないにもかかわらずBに対して約3倍、PheBも同様約3倍、TPでは約2倍であったが、ABとPBに対してのみ前者は約23倍、後者に対しては実に約40倍の延長作用を示した。これはMABに対する延長時間は異なるものの同じオーダーであった。MABはBの睡眠作用の約120% (5/4)の作用を有するので15倍、45倍は当然と考えられる相加作用であるがDABのAB、PBの作用増

強はなんと説明したらよいのか、全く不明である。対応するAB、PBの構造が酷似している(構造異性体)(Fig. 12)ことがこの結果を納得させる唯一の事実であった。MAB、DABともPBあるいはB睡眠作用に対する予想された短縮(拮抗)作用は認められずすべて協力作用に過ぎなかった。

この延長作用をMAPB及びDAPBと同じようにMAB、DABを150 mg/kg, *i.p.*投与後1, 15, 30, 60分後にB 200 mg/kg, *i.p.*投与(Fig. 13)。逆にB 200 mg/kg, *i.p.*投与直後1, 15, 30, 60分後投与するとFig. 14に示すようにMABは1, 15分でもB睡眠作用を有意に延長するものの、何ら拮抗現象は認

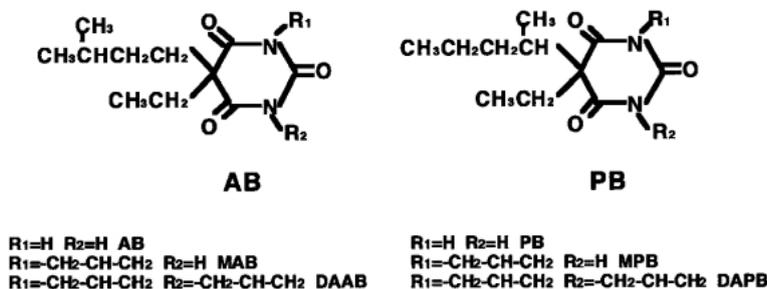


Fig. 12. Structures of *N*-Substituted Amobarbital (AB) and Pentobarbital (PB)

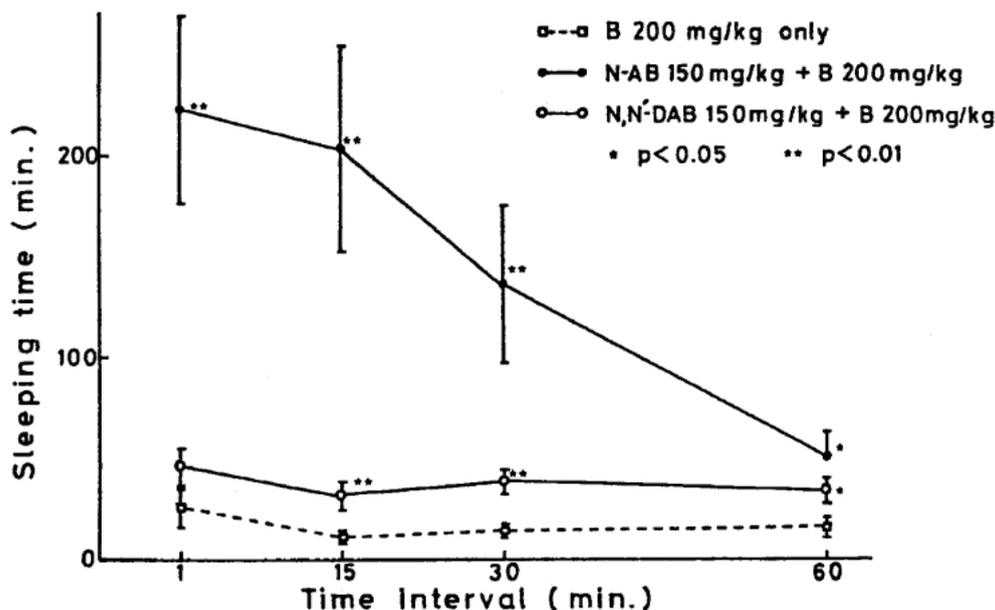


Fig. 13. Time Course of the Effect of MAB and DAB Pretreatment on B-Induced Sleep

The result is expressed as the mean \pm S.E. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

められなかった。一方、DABは1—60分まで12から13倍の延長作用を示した。また投与順序を代えるとMABのピークタイムは30分、測定した4点において有意な延長、DABは前処理の場合と同様の2—4倍の延長を示したに過ぎず投与後の時間による差異はみられなかった。このような検討は一見、無意味のように思えるが、相互作用の実験では必要と考えられる。したがって、筆者らの結果では投与順序による睡眠時間への影響は少ないとの結論が得られた。そこで、さらにMAB及びDABの投与量を50—300 mg/kg, *i.p.* (MABは200 mg/kg, *i.p.*) に変えて睡眠時間を測定した。この結果 (Fig. 15) MABは用量依存性を示したがDABはそれを示さなかった。このことはMABの作用点とDABの作用点異なるものと考えられる。つまりMABとBとの作用点は同じであることから延長作

用が用量依存的であったがDABではこれらはみられずDABとBの作用点は異なるのではないかと考えられた。しかし、AB, PBの作用点は同じということである。再び述べるが、かつてGoodman及びGilman²⁶⁾ではバルビツレートは短時間型、超短時間型など大まかな分類をしており、一般にはこれが容認されているが少なくとも筆者らのこれらの検討ではそれは誤っているのではないかとの知見であった。

そこでMAB及びDABの量を50, 100, 150 mg/kg, *i.p.* 及び150, 300, 450 mg/kg, *i.p.* さらにBの量も100, 200, 300 mg/kg, *i.p.* と変えて睡眠作用をみるという検討を行った。その結果、Fig. 16に示すように強弱の差はあるもののMAB及びDABともにBに対して協力作用を有することが分かった。

2-5. 以上の検討の結果、いずれのバルビツ

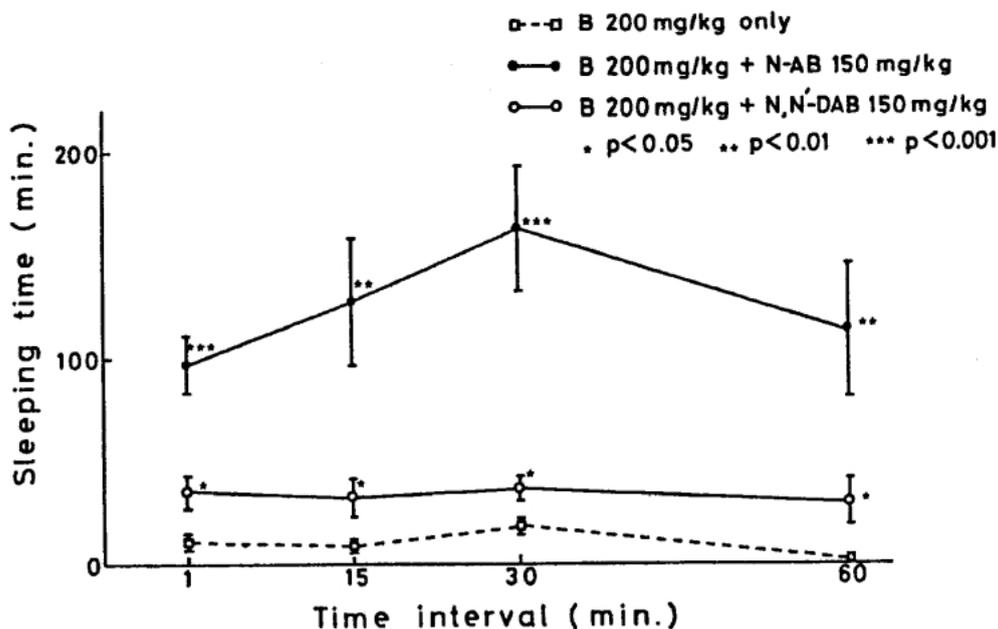


Fig. 14. Time Course of the Effects of MAB and DAB Posttreatment on B-Induced Sleep

The result is expressed as the mean \pm S.E. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

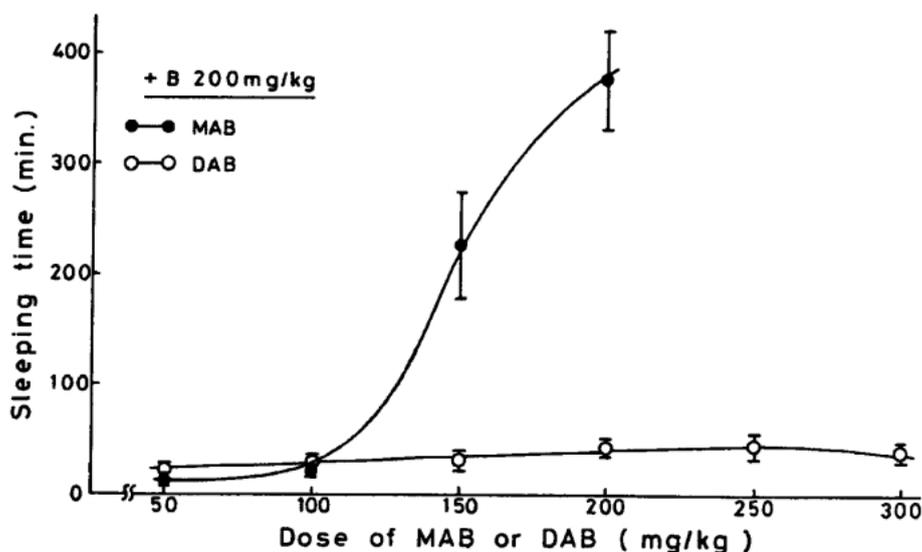


Fig. 15. Effect of Different Doses of MAB and DAB on B-Induced Sleep

Each point corresponds to the mean sleeping time of 15 mice. Vertical bars indicate standard error (S.E.) of the mean.

レートのアリル体は様々な作用を有し、しかも5種のバルビツレートとの相互作用においても一元的な結果を得ることは難しかった。そこで合成したPheB, ABのアリル体についても同様の検討を行った。Table 6の上段に示したMAPheBはBに対してはわずか2倍程度の睡眠延長しか示さなかったがPBに対しては約12倍、TPに対しては約10倍、ABに対しては約7倍の延長作用を示した。しかし

DAPheBはB, PheB, AB, TPには有意差がないか、あるいはあっても2—4倍しか示さなかった。なぜかPBのみMAPheB, DAPheBも同等の約12倍(259分と253分)を示した。他のB, PheB, AB, TPでは明らかな差異がみられる。これはどのように解釈したらよいのだろうか。ここでも新たな疑問が起こった。

さらにTable 6下段のMAABはBに対しては全

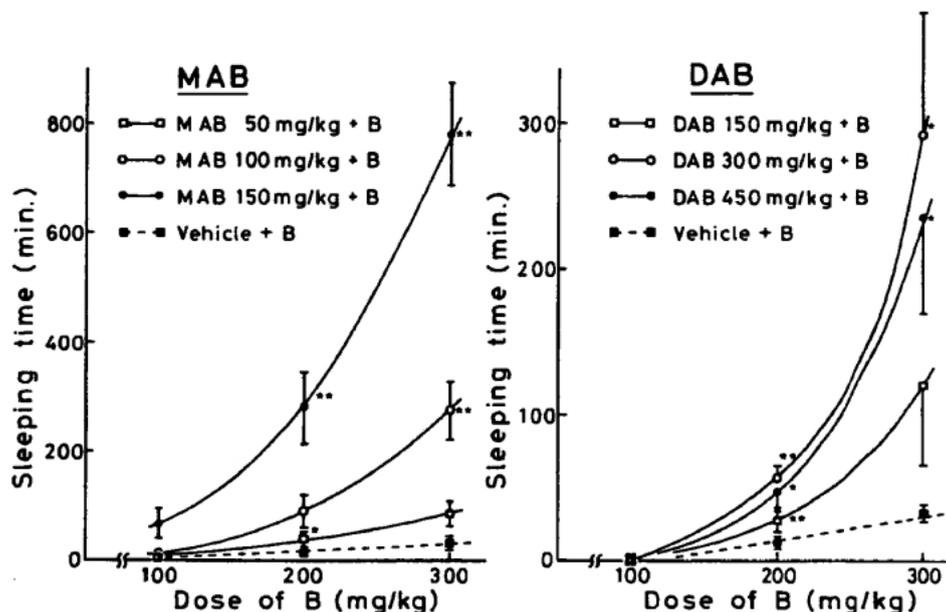


Fig. 16. Dose-Response Curves of B in MAB and DAB Potentiation of B-Induced Sleep

Each point corresponds to the mean sleeping time of 11 mice. Vertical bars indicate standard error (S.E.) of the mean. *Significantly different from the corresponding control ($p < 0.05$). **Significantly different from the corresponding control ($p < 0.01$).

Table 6. Effects of MAPheB, DAPheB, MAAB and DAAB on Barbiturate-Induced Sleep

Treatment	Sleeping time (min)				
	B 300 mg/kg, <i>i.p.</i>	PheB 150 mg/kg, <i>i.p.</i>	AB 100 mg/kg, <i>i.p.</i>	PB 40 mg/kg, <i>i.p.</i>	TP 50 mg/kg, <i>i.p.</i>
Control	32 ± 6 (9)	76 ± 18 (8)	82 ± 7 (8)	21 ± 3 (8)	9 ± 2 (7)
MAPheB	63 ± 6** (12)	233 ± 24** (10)	555 ± 56** (8)	259 ± 29** (8)	87 ± 29* (8)
DAPheB	51 ± 6* (11)	146 ± 34 (8)	324 ± 26** (7)	253 ± 36** (8)	15 ± 3 (7)
Control	32 ± 6 (9)	61 ± 9 (6)	79 ± 7 (8)	13 ± 2 (7)	4 ± 1 (5)
MAAB	39 ± 8 (8)	1573 ± 61** (5)	317 ± 33** (8)	110 ± 21** (8)	11 ± 1** (8)
DAAB	103 ± 29* (11)	405 ± 95* (6)	784 ± 72** (8)	97 ± 21** (8)	10 ± 2 (8)

MAPheB, DAPheB, MAAB and DAAB were administered 15 min prior to the injection of barbiturates. Data are expressed as the mean ± S.E. Number in parentheses represent numbers of animals used. * Significantly different from the control ($p < 0.05$). ** Significantly different from the control ($p < 0.01$).

く有意差はないにもかかわらず PheB に対しては実に 26 倍を示した。しかし、他の AB, PB, TP では 4 倍, 8 倍, 3 倍程度であった。AB に対して、MAAB では約 4 倍であったのに対して単独睡眠作用を全く有しない DAAB は AB に対して約 10 倍の延長作用を示した。これは Table 6 の MAPheB へ B, DAPheB へ B, MAAB と DAAB の AB 100 mg/kg, *i.p.* の欄をみると逆転していることが明白である。これもまた説明不可能な現象であった。前にも述べたように DAPB が B 睡眠を短縮したことに比較して PB の側鎖のメチル基の位置が 1' か 3' によって AB のジアリル体 (DAAB) は B に対してコントロール 32 分, DAAB 103 分と延長作用を示した

ことはわずかな構造の違いによって作用が大きく異なることを示している。Andrews ら^{27,28)} は AB の 5 位側鎖の構造の違いによって、睡眠作用を示すものと興奮作用を示すバルビツレートがあることを報告している。筆者らもしばしばこのようなことがあることを認めている。このバルビツレートの鎮静と興奮作用はこれらバルビツレートの薬物作用の複雑性を示していると言える。

このような不思議な現象に遭遇したことから MAPheB 及び DAPheB の PheB 及び AB に対する用量反応曲線が得られるか否かを検討した。その結果、いずれも用量依存性が認められた。ここでは DAAB の方が MAAB よりもさらに強い延長作用を

有することがより明白となった (Figs. 17, 18).

2-6. 既述のように TP には 3 種のアリル体が得られた. そこで構造の類似する PB のみの相互作用を検討した. その結果, Table 7 の投与 15 分と比較すれば分かるように MAPB は 28 倍, DAPB は 89 倍に対して MATP は 12 倍, DATP は 13 倍, *N,S*-DATP は 20 倍に延長した. ここでも単独では何ら睡眠作用を有しない (Table 3) DATP が睡眠作用を持つ MATP と同等の 12—13 倍睡眠作用を示したことは MAPB と DAPB の差が 3 倍に対してこれらは同じというのは理屈に合わず, ここでもこの現象は現在の薬理学ではどう説明したらよいのだろうかとの疑問を起こさせた.

DAPB の PB 睡眠延長作用の約 90 倍という驚異的な数字に対する 1 つの解釈として, 脳におけるバルビツレート結合部位は γ -アミノ酪酸 (GABA) やベンゾジアゼピン (BZ) 受容体と密接な関係があることから, 以上の様々な睡眠作用の延長や短縮は受容体における結合あるいは親和性の差によるも

のと考えられた. ことから辺りの疑問と未解明分野への探求心がウリジン受容体の発見に連なったように今振りかえってみると想起される. そこで次の実験を試みた.

2-7. DAPB 及び DAB とジアゼパム (DZ) との相互作用 この検討は作用点を推測する上に参考になると考えられる. この方法は筆者との 30 年来の共同研究者である Ho が考案したもので, Flint 及び Ho²⁹⁾ のパーテスト法と呼ばれる. 薬物投与後のマウスを一定の高さの棒に掴ませ, 薬物の鎮静

Table 7. Effects of MATP, DATP and *N, S*-DATP on the PB-Induced Sleep

Compound	Dose (mg/kg, <i>i.p.</i>)	Sleeping time (min)
Control		34 ± 9 (5)
MATP	80	423 ± 43** (6)
DATP	80	438 ± 102* (6)
<i>N, S</i> -DATP	80	663 ± 45** (6)

MATP, DATP and *N, S*-DATP were administered 15 min prior to the 40 mg/kg, *i.p.* injection of PB. Data are expressed as the mean ± S.E. Numbers in parentheses represent numbers of animals used. * Significantly different from the control ($p < 0.05$). ** Significantly different from the control ($p < 0.01$).

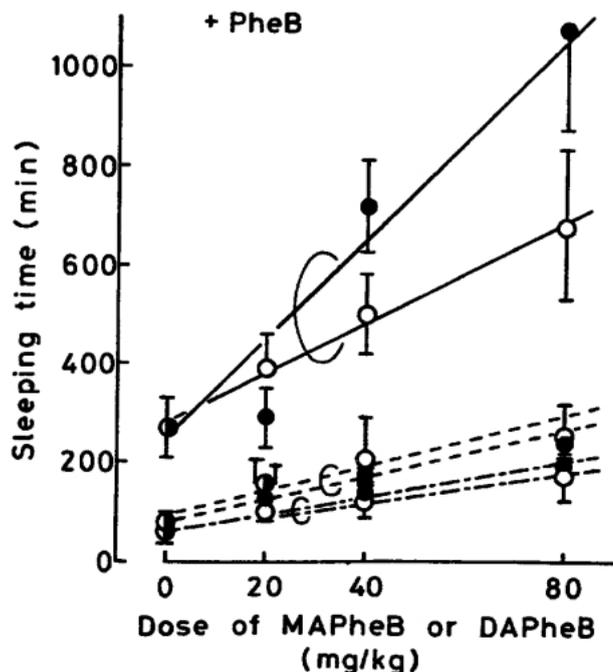


Fig. 17. Dose-Response Curves for Effects of MAPheB and DAPheB on the PheB-Induced Sleep

MAPheB and DAPheB were administered *i.p.* 15 min prior to the *i.p.* injection of PheB. The control group was pretreated with 1% Tween 80-saline (vehicle). Each point corresponds to the mean sleeping time of 8 mice. Vertical bars indicate S.E. of the mean. ●—●: MAPheB+PheB 180 mg/kg, ●—●: MAPheB+PheB 150 mg/kg, ●—●: MAPheB+PheB 120 mg/kg, ○—○: DAPheB+PheB 180 mg/kg, ○—○: DAPheB+PheB 150 mg/kg, ○—○: DAPheB+PheB 120 mg/kg.

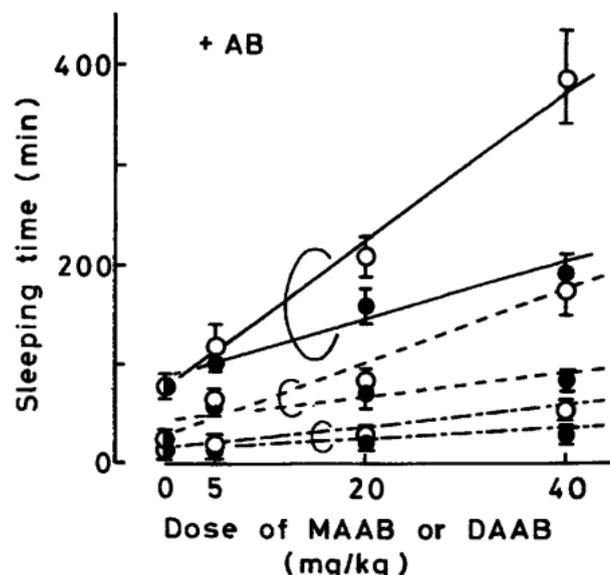


Fig. 18. Dose-Response Curves for Effects of MAAB and DAAB on the AB-Induced Sleep

MAAB and DAAB were administered *i.p.* 15 min prior to the *i.p.* injection of AB. The control group was pretreated with 1% Tween 80-saline (vehicle). Each point corresponds to the mean sleeping time of 8 mice. Vertical bars indicate S.E. of the mean. ●—●: MAAB+AB 100 mg/kg, ●—●: MAAB+AB 80 mg/kg, ●—●: MAAB+AB 60 mg/kg, ○—○: DAAB+AB 100 mg/kg, ○—○: DAAB+AB 80 mg/kg, ○—○: DAAB+AB 60 mg/kg.

催眠作用により平衡感覚の消失をみる。その作用の強さによって落下 (Fall) する匹数 (%) から DZ の運動失調作用の有無を判定するものである。その結果を Fig. 19 に示す。DZ 5 mg/kg, *i.p.* 投与の vehicle では使用したマウス $n=5$ はすべて 3 時間以内に回復するが、DAPB を 5, 10, 80 mg/kg, *i.v.* (尾静脈) 投与では % Fall は 0 であったものが、DAPB と DZ を各 5 mg/kg, *i.v.* 投与後に DZ 5 mg/kg, *i.p.* 投与すると著しく DZ の運動失調作用 (落下) を増強させた。10 mg/kg, *i.v.* では若干の増強作用は認められたものの作用持続時間は 5 時間に留まった。そこで 80 mg/kg, *i.v.* 投与すると実に 8 時間まで延長した。同様に DAB についても検討すると Fig. 20 に示すように DAB 単独では Fall (%) は 0% であり、DZ 5 mg/kg, *i.p.* では 2 時間以内の作用に対して 2.5 倍、5 時間までこの作用が持続した。この原因として 1) 2 種のジアリル体の DZ の代謝阻害 2) DZ の BZ 受容体の親和性に対するジアリル体の効果 3) BZ 受容体へのジアリル体の直接結合が考えられた。いずれにせよこのような中枢抑制薬の増強作用は Adjuvant (補助薬あるいは協力薬) として何らかの薬効増強が考えられるもので、その物質が母化合物よりもより毒性が低い場合には今後補助薬ないし付加薬としての利用価値があるかも知れない。この点については DAPB の代謝研究からより明らかにされるであろう。

3. *N*-メチルバルピツレート (MBs), グルテチミド (GI), メチプリロン (MP) 及びベメグリド (BG) の *N*-アリル体の合成並びに薬理作用³⁰⁾

前節 (2, p. 8) に続いて既存の鎮静・睡眠薬及び類似化合物の *N*-アリル化を行い薬理作用を検討した。*N* 位にメチル基を有する HB の *N*-アリル体は既に Kaku ら¹²⁾ 及び Weinswig ら³¹⁾ によって報告されている。1 個のメチル基と 1 個のアリル基を持つバルピツレートは最初、ブロムアリルを用いて記述の方法でアリル化後、これをジメチル硫酸を用いてメチル化した。GI, MP, BG は NH 基は 1 個しか持たないのでアリル化によって 1 個のアリル基を導入できる。*N*-アリル-HB (AHB) の薬理作用は一部報告されているが、それには一貫性がない。すなわち、Kaku ら¹²⁾ は AHB が鎮静、睡眠、自発運動量減少、呼吸麻痺を来すとしているが、Weinswig ら³¹⁾ は 552 mg/kg, *i.p.* と大量投与でも正向反射の消失はみられない。つまり睡眠作用はないとしているなど大きな違いがある。そこで筆者らはこの点を明らかにすべくアリルメチルバルピタール (AMB), アリルメチルフェノバルピタール (AMPheB), アリルメチルアロバルピタール (AMAlloB), アリルメチルアモバルピタール (AMAB) 及びアリルメチルペントバルピタール (AMPB) を合成し比較検討した。その結果、単独睡眠作用は AHB, アリルグルテチミド (AGI) 及び AMPB に認められたが、

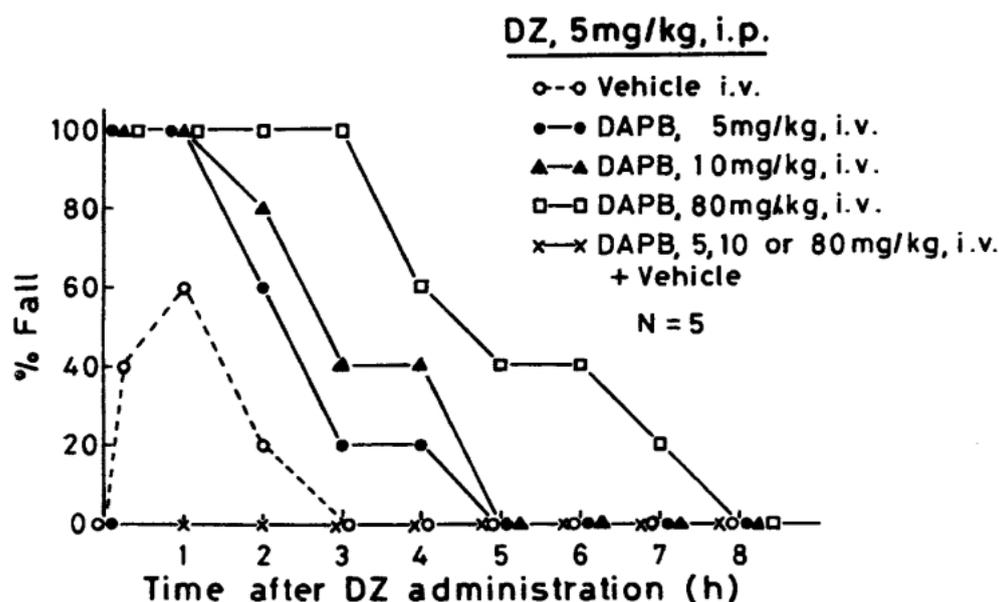


Fig. 19. Effect of Acute DAPB Administration on DZ-Induced Motor Incoordination

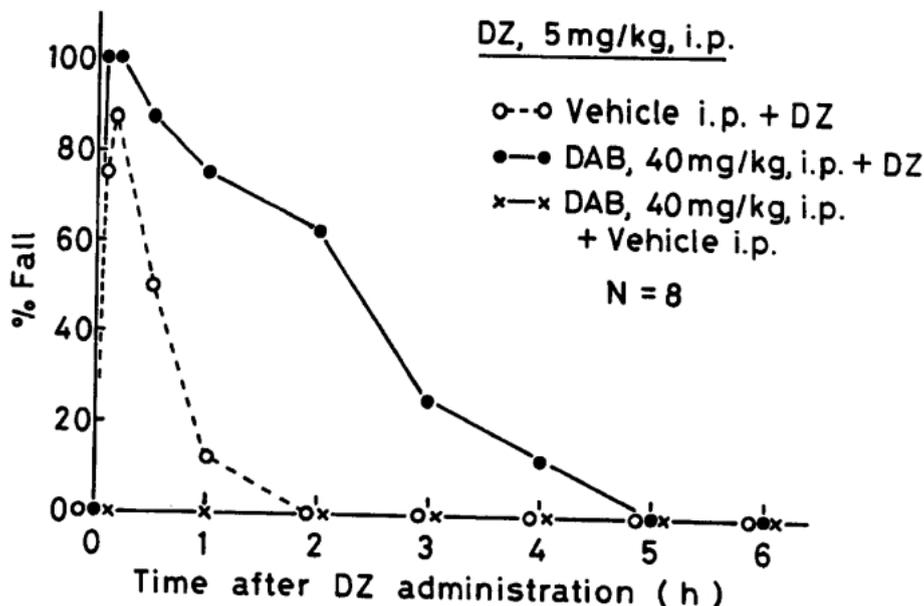


Fig. 20. Effect of Acute DAB Administration on DZ-Induced Motor Incoordination

この強さは AHB は PB の約 1/5, AGI はさらに弱く約 1/12 程度であった (Table 8). そこで睡眠作用を認めた AHB, AGI, AMP を母化合物と比較した. その結果を Fig. 21 に示す. AHB は HB の約 1/3 であり, AGI は 500 mg/kg, *i.p.* では約 1/2, 600 mg/kg, *i.p.* で約 1.2 倍, ただし投与量では 4—5 倍であったが, AMB はほぼ同等であった. ここでも一律の結果は得られなかった. また, 睡眠導入マウスは 100% でなく, ある匹数のものは正向反射消失を示さないものも認められた.

抗痙れん作用は AMB, AMPheB, AHB 及び AMP において確認された. 特に *N* 位に 2 個のアリル基を持つ DAB, DAPheB 及び DAPB が何ら抗痙れん作用はみられなかったにもかかわらず, *N* 位にメチル基とアリル基が入った AMB, AMPheB 及び AMPB に抗痙れん作用があったことは興味深い. B や PheB の *N*-メチル体が抗痙れん薬として市販されていることから, 抗痙れん作用の発現は代謝によって生成した *N*-アリル体あるいは *N'*-メチル体に起因している可能性がある.

そこで, この痙れん作用を詳細に検討した. その結果 Table 9 に示すように顕著な痙れん作用物質は認められなかったけれどもおおむねすべての化合物は LD₅₀ 測定時に痙れん現象が観察された. 最も強い痙れん作用を示したものは AMAlloB で強直性痙れんは 201 秒で起こり死亡率は 67% を示した. 他

Table 8. Pharmacological Activities of *N*-Alyl, *N'*-Methyl Substituted Barbiturates and Related Allyl Substituted Compounds

Compound	HD ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	PTZ-ED ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	LD ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)
AMB	None	101 (76.1—134)	>400
AMPheB	None	211 (156—285)	>640
AMAlloB	None	>250	580 (517—651)
AMAB	None	>250	>640
AMPB	None	105 (80.8—136)	>640
AHB	208 (175—247)	149 (131—169)	>640
AGI	512 (428—612)	>250	>900
AMP	220 (191—253)	42.0 (36.8—47.9)	473 (413—541)

The 95% confidence limits, in parentheses, were calculated according to the method of Litchfield and Wilcoxon (1949).

の化合物はこの用量では間代性痙れんを惹起するのみであった. 拮抗薬やバルビツレート中毒治療薬の中には興奮作用を有するものが多いので痙れん作用を有する *N*-メチル, *N*-アリル体は今後さらに精査する必要がある.

そこで, かつてバルビツール中毒治療剤として使用されていた BG にも 1 個の NH 基を有しているのでアリルベメグリド (ABG) を合成した. その

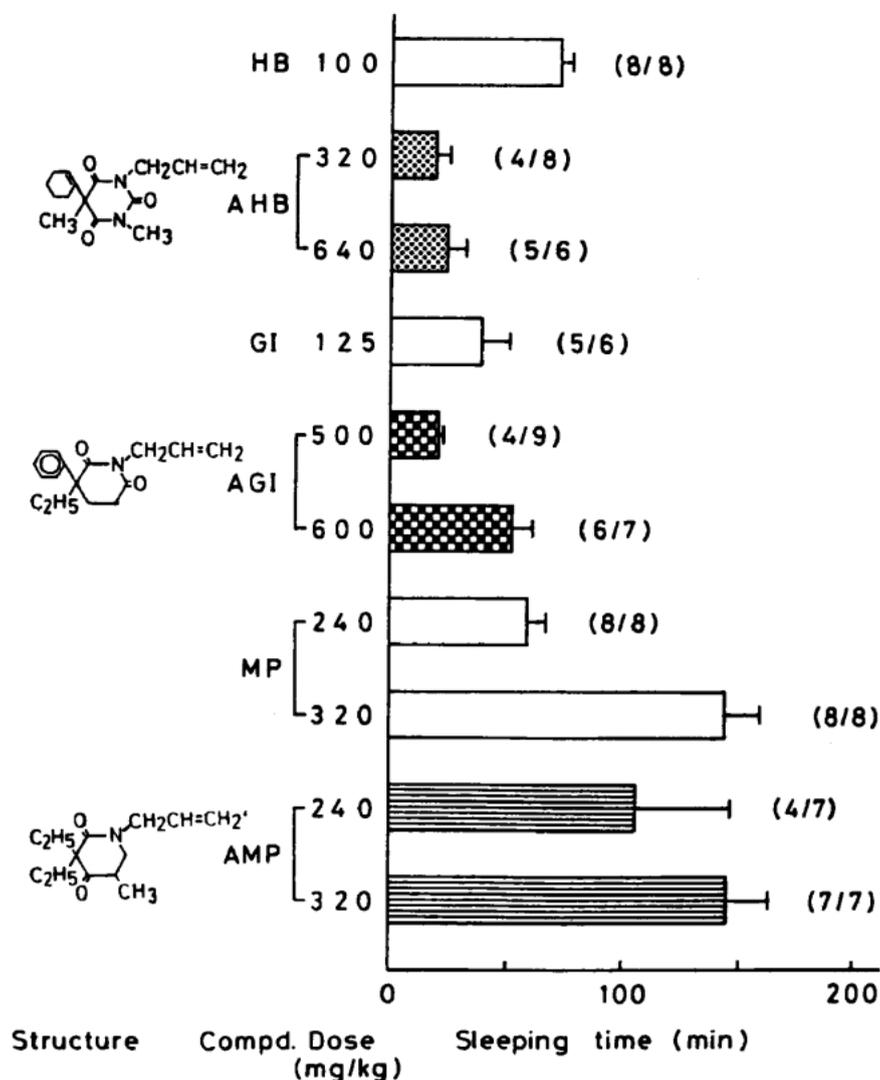


Fig. 21. Hypnotic Activity of *N*-Allyl Substituted Compounds

The result is expressed as the mean \pm S.E. Fractions in parentheses represent the ratio of number of mice slept to number of mice used.

Table 9. Convulsant Activity of *N*-Allyl, *N*'-Methyl Substituted Barbiturates and Related Allyl Substituted Compounds

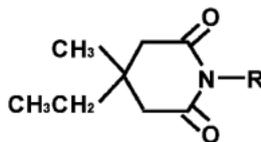
Compound	Dose (mg/kg)	No. of mice	Latency (Mean \pm S.E., sec)		Lethality (%)
			Clonic seizure	Tonic seizure	
AMB	400	7	118 \pm 6 (7)	No seizure	0
AMPheB	640	7	480 \pm 67 (3)	No seizure	0
AMAlloB	640	6	140 \pm 10 (6)	201 \pm 8 (5)	67
AMAB	640	6	491 \pm 84 (6)	No seizure	0
AMPB	640	6	610 \pm 35 (6)	No seizure	0
AMP	400	7	107 \pm 15 (6)	No seizure	0

Numbers in parentheses represent the number of animals convulsed.

薬理作用を示す (Table 10). 痙れん作用 (50%痙れん用量; CD_{50}) は BG の約 1/20 に減少, 毒性も約 1/3 に低下した. 当然のことながら睡眠, 抗痙れ

ん作用ともにみられなかった. BG へのアリル基の導入は Shulman ら^{32,33)} のパーシャルアゴニスト (痙れん作用の減少) に変わるという報告と同一結

Table 10. Pharmacological Activities of Bemegride and ABG



Compound	R	CD ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	HD ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	PTZ-ED ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	LD ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)
Bemegride	H	15.6 (13.6—17.9)	None (50)	N.T.	37.5 (32.6—43.1)
ABG	-CH ₂ CH=CH ₂	310 (293—328)	None (600)	>250	471 (442—502)

The 95% confidence limits, in parentheses, were calculated according to the method Litchfield and Wilcoxon (1949). The word "None" indicates no corresponding pharmacological activity. N.T.=not tested.

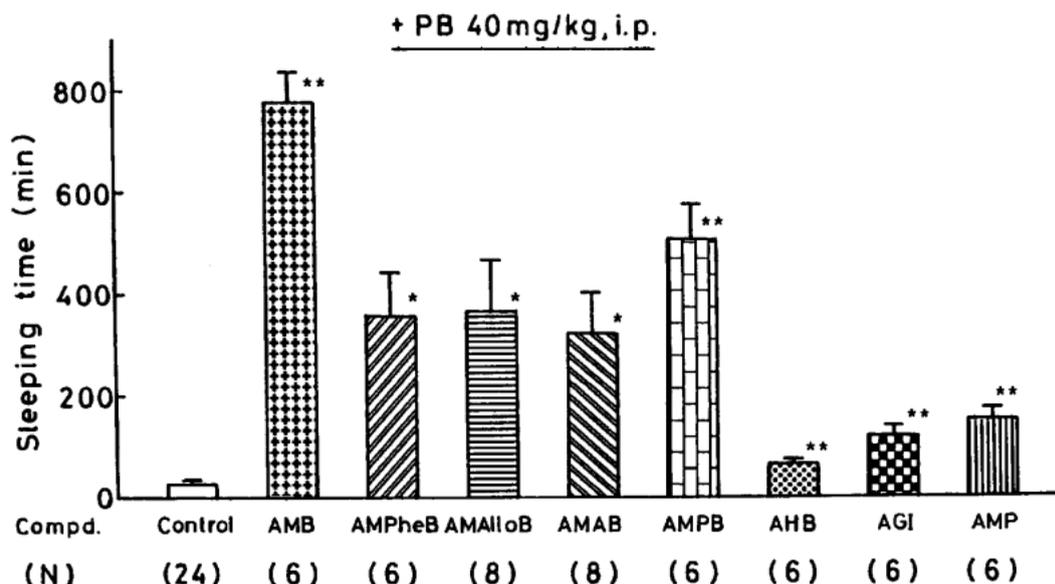


Fig. 22. Effects of *N*-Allyl, *N'*-Methyl Substituted Barbiturates and Related Allyl Substituted Compounds on the PB-Induced Sleep. Numbers in parentheses represent number of animals used. The result is expressed as the mean \pm S.E. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

果であった。この化合物は今後、受容体実験に使われる可能性がある。BGは中枢興奮薬でありAHBの薬理作用に関するKaku¹²⁾及びWeinswigら³¹⁾の報告は実験条件の違いを除けば筆者らの結果はKakuら¹²⁾の報告と同じであった。

そこで前述のごとく各種睡眠薬に対する相互作用を系統的に検討追求した。その結果 (Fig. 22), 驚くべきことにいずれも痙攣作用を有するこれら *N*-メチル, *N*-アリル体はいずれも有意にPBの睡眠作用を延長した。特にAMBはコントロールの約25倍, AMPBは約15倍にも延長した。この点を考えると, これらの化合物は大脳皮質運動領に作用しているものと考えられるが, *N*-アリル置換によって作用部位が一部異なった (移動した) 可能性がある。このようにアリル基の導入は母化合物の作用

部位を著しく変化させることが認められた。21世紀に入りゲノム, バイオプロテオミクス, 分子薬理, 毒性学は著しい進展をみせているが, ここに示したメチル基あるいはアリル基1個の導入によって全く予想しない不統一な結果を示すことは, まだまだ換言すれば生体, 特に脳組織内は依然ブラックボックスの中にあるということを示している。故に, 少し飛躍するかも知れないがいまだ信じられないような脳疾患が存在するのではないだろうか。

そこで, 同様に中枢興奮作用を持つABGについても5種のバルビツレートとの相互作用を検討した。それらの結果をTable 11に一括して示した。ABGは20と80 mg/kg, *i.p.*と2用量を用いた。

興味あることにBGはAB, TPのみに睡眠時間を有意に短縮したがその他は有意差はみられなかつ

Table 11. Effects of Bemegride and ABG on Hypnotic-Induced Sleep

Compound	Dose (mg/kg)	Sleeping time (min)					
		B 300 mg/kg	PheB 150 mg/kg	AB 100 mg/kg	PB 40 mg/kg	TP 50 mg/kg	GI 150 mg/kg
Control		67±7 (15)	85±11 (15)	62±9 (15)	27±3 (15)	6±1 (15)	57±3 (15)
Bemegride	20	62±9 (10)	95±15 (10)	36±4* (13)	39±7 (10)	2±0** (10)	52±5 (10)
ABG	20	60±14 (10)	90±15 (10)	156±15** (10)	62±9** (10)	7±2 (10)	48±6 (10)
	80	33±8** (10)	83±14 (12)	307±35** (10)	63±9** (10)	16±5 (10)	82±11 (10)

The compounds tested were administered *i.p.* 15 min prior to the *i.p.* injection of hypnotics. B: barbital, PheB: Phenobarbital, AB: amobarbital, PB: pentobarbital, TP: thiopental, GI: glutethimide. Data are expressed as the mean±S.E. Numbers in parentheses represent numbers of animals used. * Significantly different from the control ($p<0.05$). ** Significantly different from the control ($p<0.01$).

た。したがって一時 BG はバルビツレート中毒時の治療薬として使われたということはこの検討から誤りであることが明らかとなった。一方、ABG は痙れん作用があるにもかかわらず AB, PB に対して 20 mg/kg, *i.p.* で約 2 倍の延長, AB のみ 80 mg/kg, *i.p.* では約 5 倍延長した。しかし、B (80 mg/kg, *i.p.*) では約 1/2 の短縮を示した。この結果は既述 (p. 82) の DAPB の B 睡眠に対する短縮作用と同様であった。ABG は BG と同様な拮抗作用を B に対しては示したが、AB 及び PB 睡眠を延長するなど、バルビツレートの種類によってアゴニストとアンタゴニスト (パーシャル型) の両作用を有していることが明らかとなった。本化合物もまた耐性、依存性発現機構研究に有用なツール (道具) になると考えられる。

4. ウラシル (U), チミン (T) 及び 6-メチルウラシル (6-MU) の *N*-アリル体の合成並びに薬理作用²⁵⁾

これまで検討してきた BA (マロニル尿素, マロン酸環式ウレイド), バルビツール酸系睡眠薬の数種類, また, GI, MP など非バルビツール酸系睡眠薬はいずれも合成化合物であった。しかし一方生体内にも同様なオキシピリミジン骨格を有するものがある。これらはピリミジンヌクレオシドに属する核酸の塩基部分である。

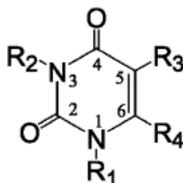
核酸は言うまでもなく生体の遺伝現象及びタンパク質の生合成に関与する生体高分子化合物であるリボ核酸 (RNA), デオキシリボ核酸 (DNA) など, 生体のあらゆる細胞に存在している化合物である。したがって命令を司るあらゆる機能, 現象, 例えば睡眠, 覚醒, 摂食, 性欲, 生殖等に基本的に関連していると考えて間違いない。これに関連して Kase

ら³⁴⁾はピペリジン, Nosjean ら³⁵⁾はメラトニンも睡眠に関連していることを報告している。

そこで筆者らはこれら塩基にも同様にアリル基の導入を試み検討した。不思議なことにこれら生体内関連化合物のあるものは合成されているにもかかわらず基本的な薬理作用, 生理作用についての報告がほとんどないのが当時の実情であった。

しかしながら母化合物である U と T が HB の睡眠を延長すること及び電気ショックに対する抗痙れん作用を弱いながらも有することが Wenzel 及び Keplinger^{18,19)} によって報告されていた。また, Krooth ら³⁶⁾はオキシピリミジン塩基がマウス自発運動量を低用量で増加, 高投与量で抑制するという報告もあった。このことは新たにこのような生体内物質の *N*-アリル置換により拮抗薬や鎮静, 催眠薬の開発の余地があることを示している。しかしながら脳波的にはウラシル (U) は睡眠に何ら影響はしていないことも³⁷⁾報告されている。そこで, これまでの断片的な知見を明らかにすべく U にアリル基を導入してその基本骨格の薬理作用を検討することにした。これまでの知見ではアリル基の導入により既に記述した (p. 75) BA のようによりはっきりとした薬理作用がみられるという結論による。筆者らが合成した *N*-アリル置換 U, T 及び 6-MU の構造及び物理化学的データを一括して Table 12 に示した。文献記載のないものはすべて新規化合物である。ここで U 及び T には 2 個の NH 基があるため各々 *N*¹ と *N*³ の 2 種のアリル体が生成する。

母化合物及び各アリル体の単独投与時の薬理作用は Table 13 に示した。 *N*¹-MAU, *N*³-MAU, *N*¹-MAT, *N*³-MAT, *N*¹-MA-6-MTU 及び *N*³-MA-6-MU はいずれも 500—640 mg/kg, *i.p.* という高用量

Table 12. Physical and Spectral Data for *N*-Allyl-Substituted Derivatives of U, T and 6-MU

Compd.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Yield (%)	mp (°C) (Lit.)	Recryst. solvent	Formula	Analysis (%)			UV λ _{max} nm (log ε)		¹ H-NMR δ (in CDCl ₃)
									calcd	Found	N	EtOH	pH 12	
<i>N</i> ¹ -MAU	-C ₃ H ₅	H	H	H	36	100–103 (105–108) ¹¹⁾	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	55.26 (55.64)	5.30 (5.29)	18.41 (18.35)	267 (4.00)	265 (4.14)	4.42 (2H, d, <i>J</i> = 5 Hz, N ¹ -CH ₂ -), 5.37–5.58 (2H, m, =CH ₂), 5.81 (1H, d, <i>J</i> = 8 Hz, 5-H), 7.27 (1H, d, <i>J</i> = 8 Hz, 6-H)
<i>N</i> ³ -MAU	H	-C ₃ H ₅	H	H	2	135–137 (133–134) ¹²⁾	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈ N ₂ O ₂	55.26 (55.06)	5.30 (5.23)	18.41 (18.35)	261 (3.96)	286 (4.12)	4.53 (2H, d, <i>J</i> = 5 Hz, N ³ -CH ₂ -), 5.08–5.36 (2H, m, =CH ₂), 7.09–7.18 (1H, m, 6-H), 10.48 (1H, brs, N ¹ H)
DAU	-C ₃ H ₅	-C ₃ H ₅	H	H	14	Oil ^{a)}		C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂	62.49 (62.32)	6.29 (6.27)	14.57 (13.97)	267 (3.93)	266 ¹³⁾ (3.97)	4.48 (2H, d, <i>J</i> = 5 Hz, N ¹ -CH ₂ -), 4.63 (2H, d, <i>J</i> = 5 Hz, N ³ -CH ₂ -), 5.19–5.55 (4H, m, (=CH ₂) ₂), 5.86 (1H, d, <i>J</i> = 6 Hz, 5-H), 7.37 (1H, d, <i>J</i> = 6 Hz, 6-H)
<i>N</i> ¹ -MAT	-C ₃ H ₅	H	-CH ₃	H	28	97–99 (96–97) ¹⁴⁾	C ₆ H ₆	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₂	57.82 (57.53)	6.07 (6.00)	16.86 (16.84)	272 (4.01)	271 (3.88)	1.95 (3H, s, 5-CH ₃), 4.42 (2H, d, <i>J</i> = 6 Hz, N ¹ -CH ₂ -), 5.04–5.51 (2H, m, =CH ₂), 5.68–6.20 (1H, m, -CH=), 7.12 (1H, s, 6-H)
<i>N</i> ³ -MAT	H	-C ₃ H ₅	-CH ₃	H	6	174–175 (175–177) ¹²⁾	C ₆ H ₆	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₂	57.82 (57.70)	6.07 (6.08)	16.86 (16.83)	267 (4.09)	293 (4.24)	1.93 (3H, s, 5-CH ₃), 4.63 (2H, d, <i>J</i> = 7 Hz, N ³ -CH ₂ -), 5.19–5.46 (2H, m, =CH ₂), 5.79–6.19 (1H, m, -CH=), 7.17 (1H, d, <i>J</i> = 5 Hz, 6-H), 10.53 (1H, brs, N ¹ H)
DAT	-C ₃ H ₅	-C ₃ H ₅	-CH ₃	H	14	Oil ^{a)}		C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂	64.06 (63.48)	6.84 (6.82)	13.58 (13.86)	272 (4.03)		1.95 (3H, s, 5-CH ₃), 4.42 (2H, d, <i>J</i> = 6 Hz, N ¹ -CH ₂ -), 4.65 (2H, d, <i>J</i> = 5 Hz, N ³ -CH ₂ -), 5.02–5.52 (4H, m, (=CH ₂) ₂), 5.68–6.20 (2H, m, (-CH=) ₂), 7.07 (1H, brs, 6-H)
<i>N</i> ¹ -MA-6-MU	-C ₃ H ₅	H	H	-CH ₃	10	174–175 (184) ¹⁵⁾	CHCl ₃ -MeOH (9 : 1)	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₂	57.82 (57.64)	6.07 (6.13)	16.86 (16.98)	265 (3.94)	267 (4.20)	2.25 (3H, s, 6-CH ₃), 4.48 (2H, d, <i>J</i> = 6 Hz, N ³ -CH ₂ -), 4.99–5.35 (2H, m, =CH ₂), 5.57 (1H, s, 5-H), 5.67–6.09 (1H, m, -CH=), 9.57 (1H, brs, N ¹ H)
<i>N</i> ³ -MA-6-MU	H	-C ₃ H ₅	H	-CH ₃	10	175–179 (184) ¹⁵⁾	C ₆ H ₆	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₂	57.82 (57.61)	6.07 (6.06)	16.86 (16.77)	262 (4.09)	282 (4.20)	2.15 (3H, s, 6-CH ₃), 4.51 (2H, d, <i>J</i> = 6 Hz, N ³ -CH ₂ -), 5.10–5.34 (2H, m, =CH ₂), 5.59 (1H, s, 5-H), 5.66–6.10 (1H, m, -CH=), 10.64 (1H, brs, N ¹ H)
DA-6-MU	-C ₃ H ₅	-C ₃ H ₅	H	-CH ₃	6	58–59	C ₆ H ₁₂	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂	64.06 (64.12)	6.84 (6.95)	13.58 (13.74)	269 (4.27)		2.25 (3H, s, 6-CH ₃), 4.45–4.64 (4H, m, (-CH ₂ -) ₂), 4.99–5.37 (4H, m, (=CH ₂) ₂), 5.60 (1H, s, 5-H), 5.67–6.11 (1H, m, -CH=)

Abbreviations used are: MAU: monoallyluracil, DAU: *N*¹, *N*³-diallyluracil, MAT: monoallylthymine, DAT: *N*¹, *N*³-diallylthymine, MA-6-MU: monoallyl-6-methyluracil, DA-6-MU: *N*¹, *N*³-diallyl-6-methyluracil, -C₃H₅: -CH₂CH=CH₂. a) Oily compounds were purified by column chromatography on silica gel.

でさえ何ら睡眠作用はなく、250 mg/kg, *i.p.* でも PTZ による抗痙攣作用も示さなかった。ところが、ジアリルチミン (DAT), ジアリル-6-MU (DA-6-MU) は作用を持たないにもかかわらず、ジアリルウラシル (DAU) のみが 433 mg/kg, *i.p.* という高用量ながら睡眠作用を示した。毒性

(LD₅₀)は DAT>DA-6-MU>DAU の順であった。DAU が睡眠作用を示したことは、構造的に似る *N*¹,*N*³-DABA や DAB ではみられなかった相違点である。Fig. 23 にその構造を示し比較した。また同じオキソピリミジン骨格でありながら 5 位にメチル基を有する DAT と 5, 6 位にメチル基を有する

DA-6-MU の両者には睡眠作用がないにもかかわらず、核酸塩基でもあり、かつ内因性物質の U の置換体 (DAU) に明らかな中枢抑制作用があったことは大変興味深く思われた。実はこの知見がこの総説 (Part II) に記すウリジン受容体の発見並びに睡眠メカニズムに関する新説に連動している。

そこで相互作用についてはこれまで顕著な作用をみせた PB と B, 及び DZ に絞り検討した。ここでは PB のみは *i.p.* の 2 つの用量 (80, 160 mg/kg, *i.p.*) で相互作用をみた。また *i.p.* 投与では多量のサンプルを必要とし、かつ肝初回通過効果をさけるため今後のことを考えて *i.c.v.* による投与方法によっても検討した。これについては詳しく後述する。80 mg/kg, *i.p.* ではいずれもコントロールに比較して延長あるいは延長傾向を示したが、特に単独睡眠

作用を示した DAU はコントロールの約 5 倍、直接脳内投与 (*i.c.v.*) では約 2 倍の有意な睡眠延長作用を示した。しかし B に対しては N^1 -MAU, DAU, DAT のみが有意な延長作用を認めるに過ぎなかった (Table 14)。ここで *i.c.v.* 投与によって睡眠作用を示したことはこれら *N*-アリル体に睡眠作用があることを示している。一般に薬物を生体内に投与する方法として、経口、皮下、腹腔内、静脈内などの投与方法があるが、いずれも初回通過効果 (各臓器、特に肝での代謝) を受けるために発現した薬理作用が投与された薬物の真の作用であるかあるいは代謝物によるものか不明になることもまれでない。その点、*i.c.v.* 投与は作用部位に直接投与する方法であるので正確に投与薬物の作用を知ることができる。また筆者らは微量な物質、特に薬物の代謝物の活性体であるか否かを知るために他の研究 (例えばカンナビノイドの代謝と毒性との関連に関する研究)³⁸⁾ で多用している方法である。本研究においては、比較的簡便に脳側室内に投与できる Haley 及び McCormick³⁹⁾ の方法により行った。その結果、母化合物 U, T 及び 6-MT も PB 睡眠を有意に延長し、Wenzel 及び Keplinger¹⁸⁾ 及び Krooth ら³⁶⁾ の報告を支持した。これらの結果は生体内物質中にも基本的に睡眠作用や鎮静作用があることを暗示している。すなわち、睡眠促進物質 (SPS) の存在をうかがい知ることができる。

次にこの検討で強い延長作用を有する相乗作用の有無を検討した。その結果を Fig. 24 に示すが予想したごとく DAU と DAT とともに DZ 作用を増強した。コントロールは 2 時間で消失したにもかかわらず DAT は 4 時間、DAU は何と 8 時間まで運動失調作用を延長、持続させた。結果として DAU の

Table 13. Pharmacological Activities of *N*-Allyl Substituted Derivatives of U, T and 6-MU

Compound	HD ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	PTZ-ED ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)	LD ₅₀ (mg/kg, <i>i.p.</i>)
U	None (640) ^{a)}	>250	>640
N^1 -MAU	None (640)	>250	>640
N^3 -MAU	None (500)	>250	>500
DAU	433 (406—462) ^{b)}	259 (215—312)	560 (526—596)
T	None (640)	>250	>640
N^1 -MAT	None (640)	>250	>640
N^3 -MAT	None (500)	>250	>500
DAT	None (550)	>250	375 (347—406)
6-MU	None (640)	>250	>640
N^1 -MA-6-MU	None (640)	>250	>640
N^3 -MA-6-MU	None (640)	>250	>640
DA-6-MU	None (480)	>250	425 (389—464)

a) The word "None" means that there was no loss of righting reflex even at the dose indicated in parentheses. b) The 95% confidence limits are shown in parentheses.

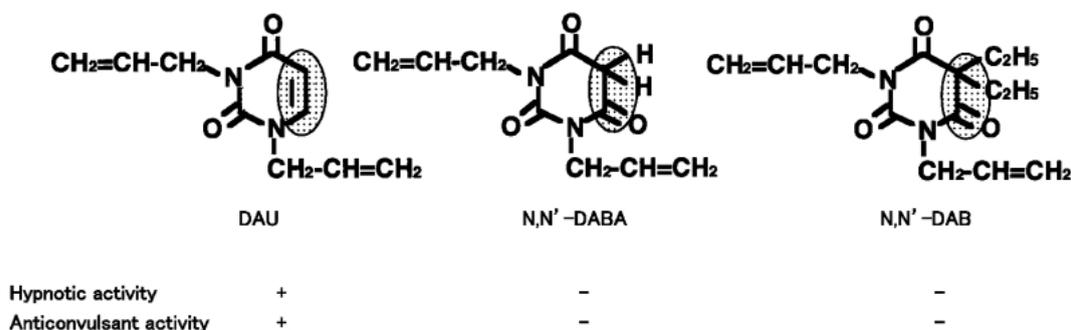


Fig. 23. Structures of DAU, N,N' -DABA and DAB

Table 14. Effects of *N*-Allyl-Substituted Derivatives of U, T, and 6-MU on PB- and B-Induced Sleep

Compound	Sleeping time (min)			
	PB (40 mg/kg, <i>i.p.</i>)			B (300 mg/kg, <i>i.p.</i>)
	80 mg/kg, <i>i.p.</i>	160 mg/kg, <i>i.p.</i>	200 mg/kg, <i>i.p.</i>	160 mg/kg, <i>i.p.</i>
Control	21±2 (30)		67±5 (30)	106±20 (30)
U	33±4* (10)	36±5** (10)	64±7 (10)	108±28 (10)
<i>N</i> ¹ -MAU	39±6** (10)	70±6** (10)	88±17 (10)	204±45* (10)
<i>N</i> ³ -MAU	27±3 (10)	29±4 (10)	63±5 (10)	81±19 (10)
DAU	113±10** (10)	297±26** (10)	112±9** (10)	177±12* (10)
T	33±4* (10)	47±7** (10)	58±7 (10)	103±21 (10)
<i>N</i> ¹ -MAT	66±12** (10)	107±12** (10)	79±15 (10)	121±34 (10)
<i>N</i> ³ -MAT	33±3* (10)	68±4 (10)	71±7 (10)	138±28 (10)
DAT	101±11** (10)	297±26** (10)	82±10 (10)	284±30** (10)
6-MU	18±2 (10)	35±5* (10)	57±6 (10)	87±9 (10)
<i>N</i> ¹ -MA-6-MU	27±5 (10)	69±11** (10)	65±6 (10)	93±19 (10)
<i>N</i> ³ -MA-6-MU	38±6** (10)	67±5** (10)	67±5 (10)	74±5 (10)
DA-6-MU	94±15** (10)	107±8** (10)	88±12 (10)	97±13 (10)

Compounds tested were administered 15 min prior to the injection of PB or B. Data are expressed as the mean ± S.E. Numbers in parentheses represent number of animals used. * Significantly different from the control ($p < 0.05$). ** Significantly different from the control ($p < 0.01$).

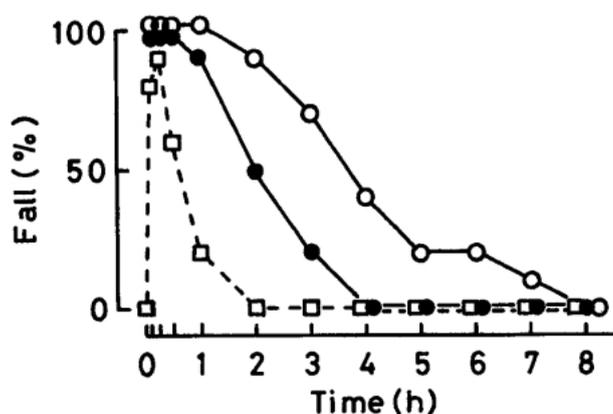


Fig. 24. Effects of DAU and DAT on DZ-Induced Motor Incoordination

DAU and DAT were administered *i.p.* 15 min prior to the *i.p.* injection of DZ. The control group was pretreated with 1% Tween 80-saline (vehicle). The mice were used for each group. □··□: control (1% Tween 80-saline + DZ 5 mg/kg), ○—○: DAU 40 mg/kg + DZ 5 mg/kg, ●—●: DAT 40 mg/kg + DZ 5 mg/kg.

PB, B 及び DZ に対する増強作用はそれ自体の中枢抑制作用に起因することが明らかとなった。繰り返すが U などの核酸塩基自体にも中枢抑制作用があり、それがアリル基という脂溶性を増加させる置換基の導入によって抑制作用が顕著に発現したものと考えられる。したがって、一連の研究に筆者らがアリル基を導入したことは統一した結論を得るのに有効であったことが示された。

5. アリル置換化合物の睡眠機構の解析⁴⁰⁻⁴²⁾

5-1. *N*¹,*N*³-ジアリルペンタバルビタール (DAPB) のバルビタール (B) 睡眠短縮機作⁴⁰⁾

2-3 (p. 82) で得られた DAPB の B の睡眠短縮の作用機作につき若干の検討を行った。

ある薬物活性を有する物質 (これを一般に作用物質, アゴニスト) の作用を減少ないし消失させる物質を拮抗薬 (アンタゴニスト) と定義するならば DAPB が B 睡眠を 1/2 に短縮したことは拮抗作用と言えるかも知れない。しかし拮抗作用には競合的 (competitive) と非競合的 (non-competitive) とがあり、さらに化学的拮抗 (水銀, ヒ素に対する SH 基), 生理学的拮抗 (機能的拮抗) (血圧に対するヒスタミンとノルアドレナリン), 薬理的拮抗 (モルヒネの呼吸抑制に対するナロルフィン, レバロルフアン) 等に分類される。さて、筆者らが見出した DAPB の B に対する睡眠短縮作用はどういう項目に入るのだろうか。それとも新しい現象なのであるうか。

一般に薬物間の相互作用には協力作用と拮抗作用の 2 つがある。本総説では睡眠延長作用を協力, 短縮を拮抗として取り扱うことにする。しかし、まだ、これらアリル化合物の受容体は解明されておらず、これまでの多様な反応はバルビツレートやベンゾジアゼピンにおいて定説となっている (中枢内

GABA_A 受容体 Cl⁻ チャンネル複合体におけるバルビツレート結合部位への結合により Cl⁻ チャンネルの開口。その結果として Cl⁻ が細胞内に流入しシナプス膜に過分極を起こす。このため興奮伝達が弱められ、中枢内での GABA の作用が増強、中枢伝達は弱くなり、そこで中枢抑制作用が発現、言い換えれば抑制系神経機能が亢進して鎮静、催眠が発現する) とは一元的には考えられない。繰り返すが、ここに隠された真理があるのではないかとの思いが筆者らにはあった。このことがさらに次の検討へと導かされた。

現在のところバルビツレート中毒に対する特異的な拮抗薬すなわち治療薬はない。最近ベンゾジアゼピン系鎮静、催眠剤として山之内製薬㈱からベンゾジアゼピン受容体拮抗薬の Flumazenil (アネキセート、中枢性呼吸刺激薬) が発売された。⁴³⁾ しかしながらバルビツレート睡眠に対して機序の詳細を無視することが許されるならば、拮抗と言えるいくつかの化合物がある。例えば BG,⁴⁴⁾ カフェイン,⁴⁵⁾ アデノシン-5'-3'リン酸,⁴⁶⁾ ジブチルサイクリックアデノシン-リン酸⁴⁷⁾ 及びサイロトロピン放出ホルモン (TRH)⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 等が報告されている。

そこで DAPB の B 睡眠短縮作用がマウスのみの現象か、あるいは競合的拮抗であるか否かを確認するために 2 種の動物、マウス及びラットを用いて検討した。B は周知のように薬物代謝を受け難く 95% 以上が未変化体として尿中に排泄されることが知られている⁵¹⁾ ので whole animal を用いる *in vivo* の実験には都合がよい。すなわちバルビツレートの耐性発現には (i) 代謝亢進によるみかけの耐性 (ii) 脳における感受性の低下。真の耐性 (これについてはさらに深い分子薬理的な追求があるがここでは省く) の 2 つが考えられるので、この点前者を除外することができる。

5-1-1. マウス、ラットにおける拮抗作用

Fig. 25 に示すように、マウスにおいて DAPB 80 mg/kg, *i.p.* 投与 15 分後に B 350 mg/kg, *i.p.* 投与するとコントロール睡眠時間を約 60% 短縮した。同時に行った MAPB は先の実験では有意差はなかったが短縮傾向を示した。一方、種をかえてラットを用いても MAPB は延長傾向を示したのに対し DAPB はやはり B 睡眠を約 30% 有意に短縮した。そこでこの現象をさらに詳細に知るためにマウスにおいて用量依存性の有無を検討した。この結果、

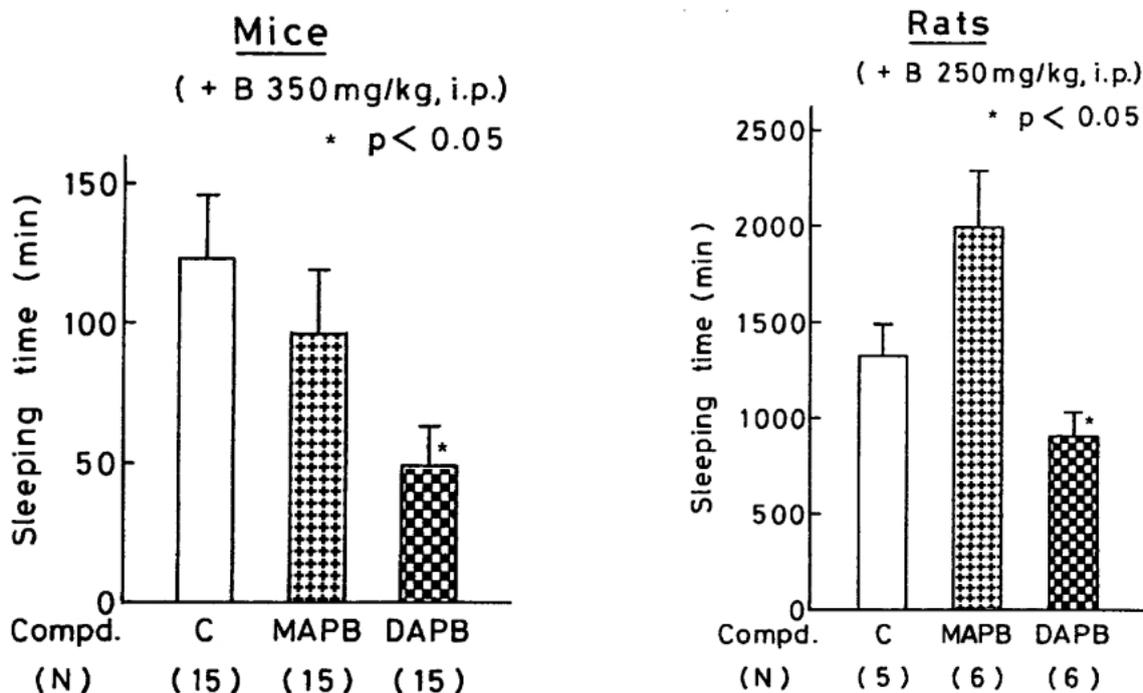


Fig. 25. Effects of MAPB and DAPB on B-Induced Sleep in Mice and Rats

Numbers in parentheses represent numbers of animals used in each group. Each column corresponds to the mean sleeping time. Vertical bars indicate standard error of the mean. Abbreviations used are: C: control, MAPB: *N*-monoallylpentobarbital, DAPB: *N,N'*-diallylpentobarbital, B: barbital. An asterisk (*) indicates significant difference from the control ($p < 0.05$).

Fig. 26 に示すごとく 1, 10 mg/kg, *i.p.* では有意差がなかったものの 20 mg/kg 以上では有意に B 睡眠を短縮し用量依存性が認められた。この現象が中枢作用点における何らかの理由による拮抗作用であることが再確認された。この機作として考えられることは B は既述のようにほとんど代謝を受けないので⁵¹⁾代謝亢進による急激な脳内 B の濃度低下とは考えられない。したがって他の理由として DAPB が B の血液脳関門の透過性を減少させているのか、又は最近、脳内汲出し機構としてのトランスポーターも発見されているのでこれらの関与も考えられる。DAPB 自身には単独催眠作用はないので脳作用部位の B の感受性の低下があっているのかもしれない。いずれにせよ受容体結合実験を行っていないので受容体説で説明できず現在のところ未解明な現象である。

この頃 (1980 年代の中頃)、ようやく Uchizono らによるウリジン,^{52,53)} Hayaishi らによるプロスタグランジン D₂⁵⁴⁾ などの内因性物質が睡眠促進物質 (Sleep Promoting Substance (SPS)) が報告された頃でもある。すなわち、ウリジンの塩基であるオキソピリミジン骨格は DAPB あるいは B に酷似するので DAPB はこれら内因性物質の生合成あるいは関与する (この当時は単なる推測に過ぎなかった) 受容体との結合に直接、間接に影響を与えていると

も考えられた。筆者の知るところでは PB 睡眠を延長して、B 睡眠を短縮する化合物として抗抑うつ薬でありモルホリン骨格を有するペロキサジン、2-*o*-イソプロピル-B がある。⁵⁵⁻⁵⁷⁾ DAPB がこれらの薬物の構造及び作用機作と類似性を有する可能性もあるが、この時点ではなぜ B 睡眠に対してのみ有意に短縮作用をみせるのか依然不明であった。推測が許されるならば B の睡眠機作が他のバルビツレートと一部異なるのではないかと考えられ、興味は尽きない。換言すればバルビタール (B) のみはバルビツール酸系催眠薬の中には分類できないのではないかということである。

5-2. *N,N'*-ジアリルペンタバルビタール (DAPB) のペンタバルビタール (PB) の睡眠延長機作 そこで DAPB の B の短縮作用機作が不明であることから DAPB の PB の延長作用機作を追求することとした。既述 (p. 82) のように 2 種以上の薬物の相互作用において、その作用が増強される場合、協力というが、その作用が別々に投与されたときの相加以上の作用が出現する場合を、相乗と言う。相加作用の例としてクロロホルムとエーテル、相乗作用の例として筋弛緩作用のツボクラリンとエーテル、鎮痛作用におけるアミノピリンとバルビタール、睡眠作用における抱水クロラルとアルコール、またフェノチアジン系トランキライザー

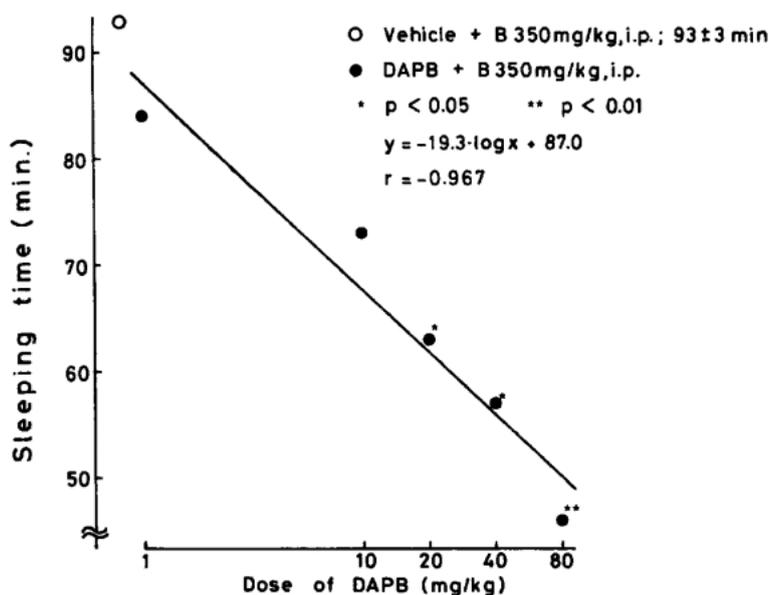


Fig. 26. Effects of Different Doses of DAPB on B-Induced Sleep

Each point corresponds to the mean sleeping time of 13–15 mice. Abbreviations used are: DAPB: *N,N'*-diallylpentobarbital, B: barbital. Asterisks (*) and (**) indicate significant difference from vehicle treated group ($p < 0.05$) and ($p < 0.01$), respectively.

(クロルプロマジン)は催眠薬、麻酔薬、鎮痛薬などの中枢抑制薬のほとんどの作用を相乗的に増強する。さらに大麻成分、テトラヒドロカンナビノールの幻覚作用はアルコールや中枢抑制薬によって増強されることが筆者ら⁵⁸⁾の別の研究によっても明らかにされている。この点を考えると DAPB の PB 睡眠延長作用は相乗作用と言える。これに関連してバルビツレートと他の薬物、ビタミン及びアミノ酸等との相互作用については、これまでに多くの報告がある。⁵⁹⁻⁶⁷⁾ここでバルビツレート睡眠延長作用に及ぼす因子をまとめると次のようなことが列挙される。例えば中枢抑制、体温下降、肝薬物代謝酵素系の阻害、活性代謝物の寄与、作用部位における貯留性、再分布等が報告されている。⁵⁷⁾また、クロルプロマジン、⁶⁰⁾ DZ、⁶⁰⁾ デシプラミン、⁶¹⁾ アルプレノロール、⁶²⁾ フェンフルラミン、⁶³⁾ ドキサプラム及びハロペリドールは中枢あるいは末梢作用によって、SKF 525-A は肝薬物代謝酵素 (P450, CYP) 活性を阻害することによってバルビツレート睡眠を延長させる。 α -トコフェロール及びリジンがバルビツレート睡眠をその中枢に対する直接作用によって増強させることも報告されている。^{66,67)}しかしながら、構造的にも密接な関係は認められないものも多い。したがってバルビツレート骨格を有しているにもかかわらずそれ自身睡眠作用を示さない DAPB

の睡眠延長機作を明確にするということは今後研究を進める上においても重要と思われた。その方法として DAPB 及び PB の投与経路の違いによる影響、¹⁴C-PB を用いての PB 生体内動態に及ぼす影響、肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響、合成 ¹⁴C-DAPB を用いての生体内動態研究、分配係数の測定による脳-血液脳関門の通過量等々、種々多角的かつ総合的に作用機作を検討した。

5-2-1. DAPB の投与経路の違いによる作用の変化 既述のように薬物の薬理作用の発現には投与経路の違いによって異なることがある。極端な場合の例として初回通過効果がある。すなわち投与された薬物が循環器系に入るまでに消化管、肝臓などで受ける代謝反応により体循環に出現する薬物量は少なくなるため作用点に到達する薬物濃度は低くこれが直ちに薬理作用に反映する。また血液脳関門の透過性や肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響により相違がでてくる。そこで *i.p.* 及び *i.c.v.* 投与による DAPB の PB 睡眠に対する差異を検討することにより機作の解明を試みた。特に *i.c.v.* 投与は薬物自体の中枢作用を直接みるためにも意義があると考えられる。

Table 15 に示すように DAPB は *i.v.* 投与においても有意な PB 睡眠延長作用を示した。DAPB *i.v.* 投与後 1 分に PB を challenge すると既に 11 倍、15 分後では 13 倍とピーク効果を示したが 30 分でも

Table 15. Effect of DAPB on the PB-Induced Sleep by Two Routes of Administration

By *i.v.* administration

Treatment	Time interval (min)	Sleeping time (min)	Treatment	Dose (mg/kg)	Sleeping time (min)
Control		38±6 (10)	Control		34±9 (10)
DAPB (40 mg/kg)	1	427±60** (10)	DAPB (15 min)	10	148±38* (10)
	15	504±54** (10)		20	255±48** (10)
	30	387±64** (10)		40	459±36** (10)
	60	418±52** (10)			

By *i.c.v.* administration

Treatment	Time interval (min)	Sleeping time (min)	Treatment	Dose (mg/kg)	Sleeping time (min)
Control		56±6 (10)	Control		62±6 (10)
DAPB (200 mg/kg)	1	201±30** (10)	DAPB (15 min)	50	158±19** (10)
	15	207±24** (10)		100	214±22** (10)
	30	189±24** (10)		200	304±12** (10)
	60	128±16** (10)		PB (15 min)	200

PB (40 mg/kg, *i.p.*) was injected after DAPB administration. Data are expressed as the mean±S.E. Numbers in parentheses represent number of animals used. * Significantly different from the control ($p<0.05$). ** Significantly different from the control ($p<0.01$).

10 倍, 60 分では 11 倍とかなり持続的な延長作用がみられた。そこでピーク時を示した 15 分を設定し 10, 20, 40 mg/kg と DAPB の濃度をあげると 148 分 (4 倍), 255 分 (7 倍), 459 分 (14 倍) と用量依存性を示した。そこで, DAPB を *i.c.v.* 投与すると, 興味あることに 1, 15, 30 分後の PB challenge によってほぼ一定の睡眠時間の延長 (約 3.5 倍) を示した。この延長は 60 分後には約 2 倍に減少した。このことは DAPB は未変化のまま 30 分間というかなり長い間, 脳内に貯留していることを示し, 60 分で約半量になっていることが推測される。15 分と定め 50, 100, 200 μg を *i.c.v.* 投与すると 158, 214, 300 分と強くはないがやはり用量依存的な睡眠延長作用を示した。ちなみに DAPB の代わりに比較のため PB 200 μg を *i.c.v.* 投与後, PB 40 mg/kg, *i.p.* 投与すると 234 分と睡眠時間は減じ DAPB 301 分の約 78% に過ぎなかった。このことは DAPB それ自体には睡眠作用はないゆえに PB の作用点と DAPB の作用点が, あるいは中枢抑制作用機序が一部異なるのではないかとかがわせるものであった。したがって DAPB の PB 睡眠延長機作の 1 つの要因として DAPB それ自体に睡眠作用はないが抑制系に働く。あるいは増長する働き (adjuvant effect, 補助作用) があることが判明した。もしかすると従来のバルビツレート的作用機作と全く別の機作 (複数の受容体の存在) があるのではないかと推測された。そこで逆に DAPB を *i.p.* 投与を行って 15 分後に今度は PB を *i.c.v.* 投与したところ, コントロール 9 分のとき, 80, 160, 320 mg に対して各々 18 分 (2 倍), 28 分 (3 倍), 40 分 (4.5 倍) と用量依存性を示したものの予想よりも低い延長であった (Table 16)。DAPB の脳内移行が小さかったものの有意であったことは, この検討においても DAPB 自体にも中枢抑制作用があることがさらに明確となった。DAPB は GABA_A 受容体 Cl⁻ チャンネル複合体⁶⁸⁾ や DZ 受容体とも結合するが, (これはこの段階では全く推測であるが…) 他にもう 1 つ別の新たな抑制系の受容体と結合し, それと共役して PB の結合する GABA_A-Cl⁻ チャンネル複合体の増幅を促すのではないかと言うことである。こう考えないと DAPB の作用機作を説明できない (Fig. 27)。この段階では DAPB は Fig. 27 のように作用すると考えられた。今後 DAPB は中枢系に

Table 16. Effect of DAPB on the Sleep Induced by *I.c.v.* Injection of PB

Treatment	Dose (mg/kg, <i>i.p.</i>)	Sleeping time (min)
Control		9 ± 2 (10)
DAPB	80	18 ± 4* (10)
	160	28 ± 4** (10)
	320	40 ± 4** (10)

PB (200 μg /mouse, 25 μl), was *i.c.v.* injected 15 min after DAPB administration. Data are expressed as the mean ± S.E. Numbers in parentheses represent numbers of animals used. * Significantly different from the control ($p < 0.05$). ** Significantly different from the control ($p < 0.01$).

おける新しい機作の解明のツールになると考えられる。

5-2-2. DAPB の PB 生体内動態に及ぼす影響

DAPB を *i.p.* あるいは *i.v.* 前投与すると著しい PB の睡眠延長作用を示したことから, DAPB が PB の脳内作用部位での濃度, あるいは代謝物の生成量など PB の生体内動態に大きな影響を与えていることは必至である。そこで DAPB 80 mg/kg, *i.p.* 投与 15 分後に ²⁻¹⁴C-PB (52.0 mCi/mmol) をマーカーとする PB 40 mg/kg, *i.p.* (この量はこれまで challenge に使っていた用量) 投与, Yamamoto ら⁶⁹⁾ の方法に従って, 脳及び血漿中の未変化 PB 及びその代謝物の濃度を経時的に定量した。30—720 分までの各々の濃度を Fig. 28 及び Table 17 に示した。PB の生物学的半減期 ($T_{1/2}$) は DAPB の前処理では脳で約 9 時間, 血漿中 (plasma) で約 15 時間であり, コントロールの 0.7 時間 (脳) 及び 0.6 時間 (血漿) と比較して大幅な差異を示し, 延長作用をよく説明していた。また, 血漿中の総代謝物 (主代謝物は ω -1-水酸化体) 量はコントロールの 30 分で 1/9, 60 分で 1/11, 90 分で 1/12, 180 分で 1/6 であり, 生成量は極度に少なかった。DAPB 80 mg/kg, *i.p.* 投与では PB 睡眠を約 890 分にも延長 (p. 82) するので, 720 分 (12 時間) 後さえなお高濃度の PB が脳及び血漿中に残存していることとよく符号している。この原因はまず第 1 に DAPB の PB 代謝阻害によるものと考えられた。PB は肝 P450 (CYP3A4) によって代謝を受け (ω -1)-水酸化体を生成, 薬効を消失することが知られている。^{70,71)} そこで, 次にこの点をより明確にするために肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響を検討した。

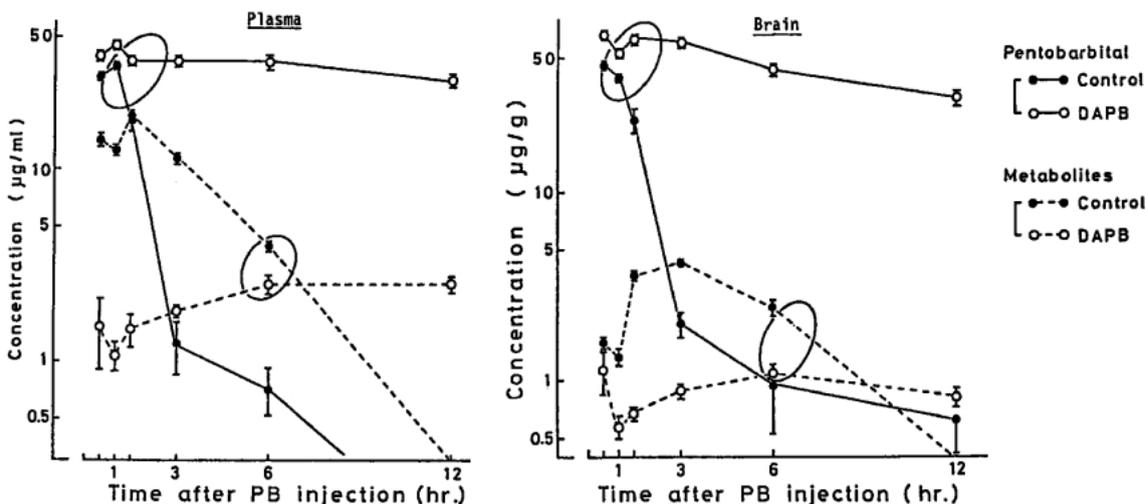


Fig. 27. Brain and Plasma Concentration of Pentobarbital and Its Metabolites

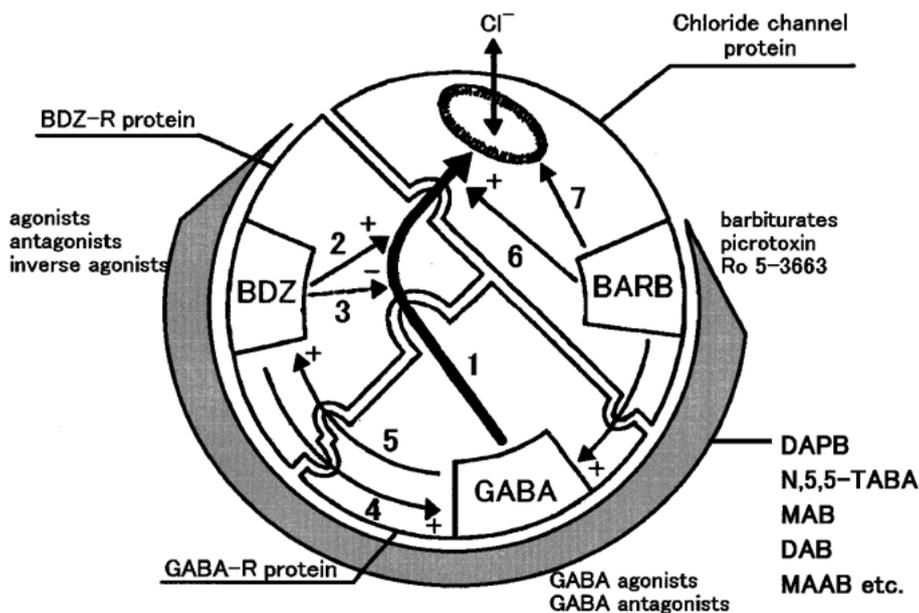


Fig. 28. Hypothetical Model of Operation of the GABA Receptor-Benzodiazepine Receptor-Chloride Channel Complex (Partially Changed)⁶⁷⁾

This complex is shown as consisting of the GABA receptor (GABA-R protein) with the binding domain for GABA mimetics and GABA receptor blockers (GABA), the benzodiazepine receptor (BDZ-R protein) with the binding domain for agonists, competitive antagonists and inverse agonists (BDZ), and the chloride channel protein with the binding domain for barbiturates, picrotoxin (in) and the convulsant benzodiazepine Ro 5-3663 (BARB). Activation of the GABA receptor results in the opening of the chloride channel with benzodiazepine receptor serving as coupling unit (large arrow 1) and increases the binding of benzodiazepine receptor agonists (5). Benzodiazepine agonists enhance the coupling function (2) and increase the affinity of the GABA receptor for GABA agonists (4). Inverse agonists reduce the coupling function of the benzodiazepine receptor (3). Competitive benzodiazepine receptor blockers inhibit the action of both agonists and inverse agonists. Barbiturates change the kinetics of the chloride channel (6) and enhance the affinity of the GABA receptor (8), at high concentrations they open directly the channel (7). Picrotoxin blocks the operation of the chloride channel (from 107). Our compounds including DAPB and MAB may act wholly or on the receptor and complex.

5-2-3. DAPB の肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響

i) DAPB 投与による *in vivo* 阻害 一般に肝薬物代謝酵素は薬物によって誘導又は阻害を受ける。中でもバルビツレートは肝薬物代謝酵素誘導剤として広く知られている。⁷²⁾ したがって、ある薬物

との併用時、その薬物の代謝を促進し、薬理作用を減弱又は消失させる。PB 睡眠は誘導剤の投与によって薬効を消失する。一方、 β -ブロッカー、アロプレノロールはそれ自体の薬理作用にもよるが PB 代謝阻害作用により PB 睡眠を延長する。⁶¹⁾ また、

Table 17. Effect of DAPB on the Brain and Plasma Concentration of PB and Its Metabolites and Their Brain/Blood Ratio

	Treatment	Time after PB injection (min)					
		30	60	90	180	360	720
Brain		nmol/g					
PB	Control	204±9	177±8	106±15	9±1	4±2	3±1
	DAPB	293±2**	238±6**	283±8**	269±11**	194±8**	140±8**
Metabolites	Control	7±0	6±0	16±1	19±0	11±1	1±0
	DAPB	5±1	3±0**	3±0**	4±0**	5±1**	4±0**
Plasma		nmol/ml					
PB	Control	141±5	158±7	81±10	5±2	3±1	Trace
	DAPB	175±1*	196±4**	159±14**	165±3**	166±8**	129±9**
Metabolites	Control	64±5	56±4	82±7	50±3	17±11	0.3
	DAPB	7±3**	5±1**	7±1**	8±0**	11±1	11±1**
Brain/Blood ratio							
PB	Control	1.45	1.12	1.32	1.64	1.32	—
	DAPB	1.67	1.21	1.78	1.63	0.17	1.09
Metabolites	Control	0.11	0.11	0.20	0.38	0.62	0.65
	DAPB	0.77	0.51	0.46	0.48	0.43	0.33

DAPB (80 mg/kg, *i.p.*) was administered 15 min prior to the 40 mg/kg, *i.p.* injection of PB. Data are expressed as the mean±S.E. of 5 mice. * Significantly different from the control ($p<0.05$). ** Significantly different from the control ($p<0.01$).

SKF 525-A のように明白な薬理作用を有さないにもかかわらず *in vivo* 及び *in vitro* において薬物代謝酵素を阻害し、*in vivo* では PB 睡眠を延長するものもある。⁶⁰⁾ 筆者らが見出した DAPB はそれ自体薬理作用を持たず、その骨格から一応バルビツレートに入れられるということから誘導を起こすと考えられるが、事実は 2 個のアリル基のためか PB 睡眠を著しく延長する。そこでこの点を明白にするために DAPB の肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響をエチルモルヒネ脱メチル化活性、*p*-ニトロアニソール-O-脱メチル化活性、アニリン水酸化活性を指標として PB 投与群と比較検討した。DAPB 処理あるいは PB 処理 (いずれも 80 mg/kg, *i.p.*) 60 分後のマウス肝を摘出し、常法⁷⁾に従ってマイクロゾーム画分を調製した。ここで得られた肝マイクロゾームを酵素源とし還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) 再生系において、上述の 3 つの基質に対する活性とともに P450 含量を測定した。その結果、Table 18 に示すように DAPB 投与群はエチルモルヒネ *N*-脱メチル化及びアニリン水酸化の両活性を有意に抑制し、P450 含量を有意に低下させた。しかしながら *p*-ニトロアニソール-O-脱メチル化活性のみは有意に促進(抑制ではない)したが、他の指標ではコントロー

ルとの間に有意差は認められなかった。次に顕著な抑制を示した DAPB 群は投与後何分から始まっているか経時変化を検討した。その結果 (Table 19), DAPB は 30 分から 360 分まで有意な脱メチル化活性の抑制及び投与 10 分後から 360 分まで P450 含量を有意に低下させた。特に驚くべきことにその活性抑制は投与 30 分に約 1/10 (90%) に低下させた。アリル基を *C*⁵ 位に有するバルビツレートは酵素誘導 (促進) を示さずむしろ代謝を阻害 (抑制) するとの報告⁷³⁻⁷⁵⁾もあるので *N* 位にアリル基を有する DAPB もまた同様に阻害するものと考えられる。P450 含量が約 55% 減少していることから、この阻害メカニズムは P450 の合成阻害又は分解と考えられるのでこの点を *in vitro* における阻害機構として次項で検討した。

ii) DAPB の *in vitro* における阻害機構の検討
そこで DAPB の *in vitro* におけるエチルモルヒネ *N*-脱メチル化活性に及ぼす影響を検討した。この場合は無処置マウス肝マイクロゾームを酵素源として、これに DAPB を 3 種の濃度で添加後脱メチル化活性を測定した。その結果は Fig. 29 に示すように明らかな阻害効果を示し、その様式は非競合阻害を示し、*K*_i 値は 5.95 μ M であった。この点のみを考えると SKF 525-A あるいはクロラムフェニコー

Table 18. Effects of PB and DAPB on the Hepatic Drug-Metabolizing Enzyme *In vivo*

Treatment	Ethylmorphine <i>N</i> -demethylase (nmol/min/mg protein)	<i>p</i> -Nitroanisole <i>O</i> -demethylase (nmol/min/mg protein)	Aniline hydroxylase (nmol/min/mg protein)	Cytochrome P450 content (nmol/min/mg protein)
Control	0.805±0.051 (3)	0.939±0.088 (4)	0.749±0.020 (4)	0.725±0.115 (4)
PB	0.813±0.035 (4)	1.196±0.125* (4)	0.698±0.065 (4)	0.628±0.033 (4)
DAPB	0.074±0.017** (3)	0.793±0.066 (4)	0.536±0.043** (4)	0.325±0.027* (4)

Values given are means±S.E. Animals were sacrificed at 1 h after the injection of drugs (80 mg/kg, *i.p.*) and then microsomes were prepared. Numbers in parentheses represent numbers of experiments. * Significantly different from the control ($p<0.05$). ** Significantly different from the control ($p<0.01$).

Table 19. Effect of DAPB on the Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes *In vivo*

Treatment	Time after administration (min)	Ethylmorphine <i>N</i> -demethylase (nmol/min/mg proten)	Cytochrome P450 content (nmol/mg/protein)
Control		0.734±0.149 (5)	0.523±0.019 (5)
DAPB	10	0.373±0.030 (4)	0.380±0.006** (4)
	30	0.163±0.073* (4)	0.380±0.015** (4)
	60	0.080±0.017* (4)	0.337±0.021** (4)
	180	0.198±0.063* (4)	0.301±0.023** (4)
	360	0.190±0.026* (4)	0.264±0.018** (4)

Values given are means±S.E. Animals were sacrificed after 40 mg/kg, *i.p.* injection of DAPB and then microsomes were prepared. Numbers in parentheses represent numbers of samples tested. * Significantly different from the control ($p<0.05$). ** Significantly different from the control ($p<0.01$).

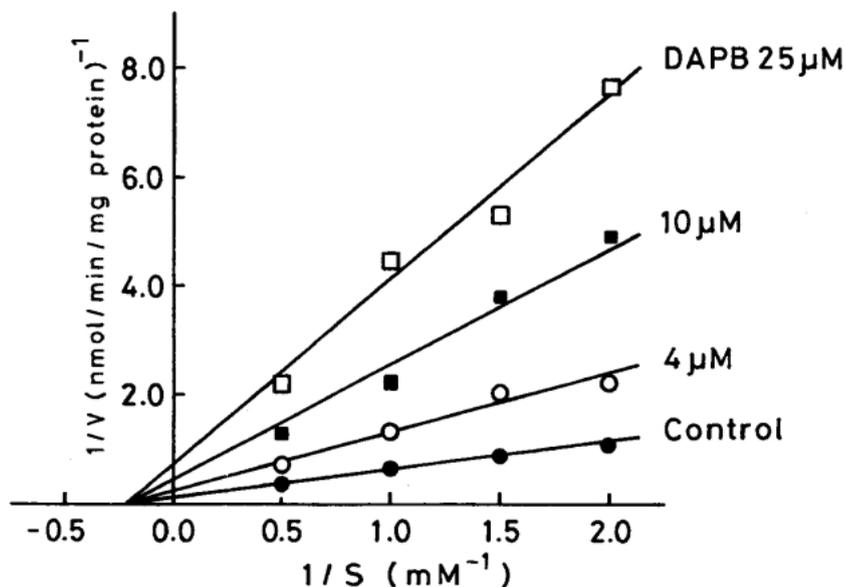


Fig. 29. Lineweaver-Burk Plots Showing Inhibition of EM *N*-Demethylase by DAPB *In Vitro*
 $K_m=5.00$ (all groups). V_{max} : 10.00 (control), 4.35 (4 μM), 2.33 (10 μM), 1.41 (25 μM).

ルと非常によく似ているが、一般に誘導剤として分類されているバルビツレートに *N* 位の 2 個のアリル基を導入した DAPB が一転して強力な阻害剤としての性質を有することは新発見であり極めて興味深い。逆に毒性も 962 mg/kg, *i.p.* というように極端に低いことから何らかのツール (例えば阻害メカ

ニズム追求) として使用可能も考えられる。これに関連して 2-アリル-2-イソプロピルアセトアミド、セコバルビタール又は AlloB などアリル基を有する化合物はポルフィリン生合成系の律速段階、 δ -アミノレブリン酸生合成酵素活性を著しく増加させる一方、P450 含量は減少させるという報告もあ

る.⁷⁶⁾ いずれも P450 のヘムと共有結合するため代謝を阻害するものと考えられているが、この段階ではこれ以上の検討は行っていない。

5-2-4. DAPB の生体内動態の検討⁴²⁾ 以上、DAPB の PB 睡眠延長作用機序として受容体の存在の有無までは明らかにされていないが、DAPB 自体の中枢抑制作用及び DAPB による強い肝薬物代謝酵素活性の阻害のため PB の高い脳内濃度、その結果として延長作用が起こることを明らかにした。次に DAPB の代謝を含めた生体内動態を追求した。

i) DAPB の脳及び血漿中濃度 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -PB を原料としてジアリル化 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -DAPB (比放射能 54.8 mCi/mmole) を調製、その 80 mg/kg , *i.p.* 又は $200\text{ }\mu\text{g/mouse}$, *i.c.v.* 投与。経時的 (15—24 時間) に脳及び血漿を得、各々の総放射活性を測定した。その結果、*i.p.* 投与群では Fig. 30 に示すように DAPB は意外にも脳内への移行は速く、つまり脳-血液関門 (B.B.B.) の通過は容易であり 15 分後には既に最高値を示していた。その後、両分画共 (脳、血漿) に二相性を画き、減少したが脳中の放射活性は 24 時間でも測定され、その長い貯留性が認められた。脳中の $T_{1/2}$ は第 I 相 96 分、第 II 相は 11 時間であり、血漿中の $T_{1/2}$ は各々 102 分及び 9.4 時間と算出された。

I.c.v. 投与群も同様に二相性を示し、脳中の $T_{1/2}$ は 18 分、及び 120 分、血漿中では 42 分、177 分であった (Fig. 31)。 *I.c.v.* 投与の場合でも 30 分までに脳内貯留性が認められ、その後 90 分までに第 I 相の低下が示された。これらのことは DAPB の高い脂溶性のため組織内の取り込み、代謝により第 I 相の早い消失が起こっているが、それ以後は DAPB 自体の代謝阻害によって緩和な第 II 相が出現したものと考えられる。いずれの結果も先の PB 睡眠延長は DAPB の高い脳内分布によって説明された。

ii) ^{14}C -DAPB 投与マウス尿、糞及び呼気中 ^{14}C 排泄率 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -DAPB を 80 mg/kg , *i.p.* 投与マウス (4 匹) における尿、糞及び呼気中 ^{14}C 排泄率を Table 20 に示した。呼気中 CO_2 の測定は Tatsumi ら⁷⁷⁾ の報告に準じて行った。投与後 72 時間までの投与 ^{14}C 量に対する平均累積 ^{14}C 排泄率は、尿中に 58.2%、糞中 12.2% 及び呼気中に 0.1% であった。尿中への排泄は投与後 24 時間までにはほぼ完了しているのに対して糞中へのそれは 24 時間後も続いている。このことは DAPB の脂溶性が高いため胆汁排泄並びに腸肝循環の可能性を示唆するものである。なお呼気中への ^{14}C は少ないものの排出は開環それに続くウレイドへの分解があったものと考えられる。72 時間までの総排泄量は 70.5% であった。

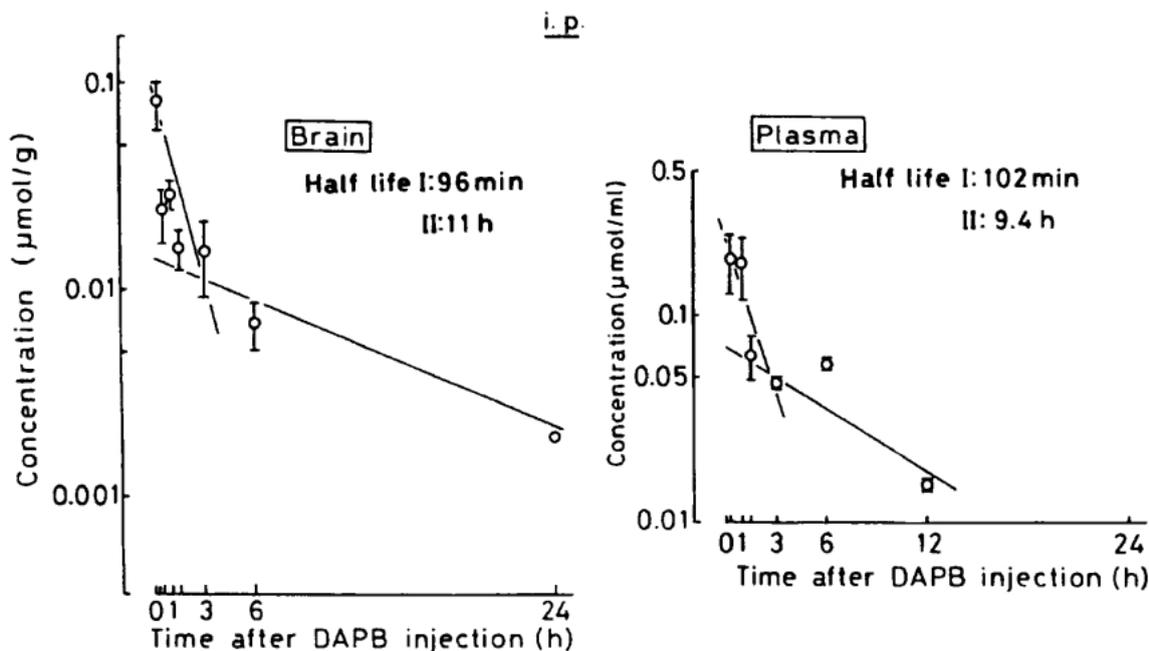


Fig. 30. Brain and Plasma Concentration of DAPB after *I.p.* Injection

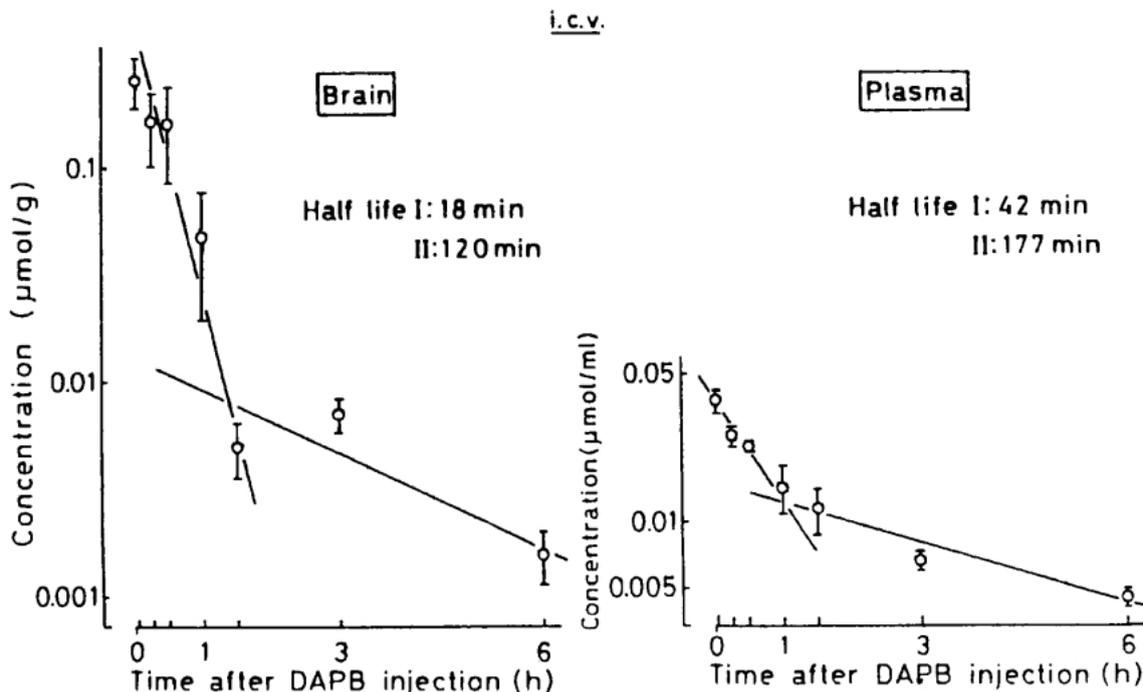


Fig. 31. Brain and Plasma Concentration of DAPB after *I.c.v.* Injection

Table 20. Excretion of DAPB and Its Metabolites

Time after administration (h)	Urine	Feces	^{14}C	Total
	% of total radioactivity			
0-6	9.8	0.1	—	9.9
-24	52.3	7.5	0.1	59.9
-48	56.4	11.1	0.1	67.6
-72	58.2	12.2	0.1	70.5

^{14}C -DAPB was administrated *i.p.* to 4 mice at a dose of 80 mg/kg. Cumulative total radioactivities were shown as %.

そこで次に尿中代謝物について検索を行った。

5-3. DAPB の *In vivo* 代謝

5-3-1. DAPB 代謝物の合成 Yamamoto ら⁷⁸⁾

は PB の (ω -1)-水酸化代謝物が PB の耐性発現に寄与していること。また Irrgang⁷⁹⁾ は AB の (ω -1)-水酸化体は母化合物の約 50% の薬理作用を有しているとの報告もあることから、DAPB 活性代謝物として M-1, DAPB の (ω -1)-水酸化体 [(ω -1)-OH-DAPB] が最も予想された。そこで (ω -1)-OH-DAPB 標品は (ω -1)-OH-PB をアリル化することによって得た。また予想されるエポキシ体 (M-2, M-3, M-5 及び M-6) は Harvey ら⁸⁰⁾ の報告に準じてクロロホルム中 *m*-クロロ過安息香酸による酸化によって得られた。2',3'-ジヒドロキシ体 (M-

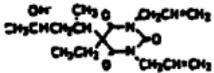
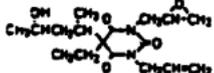
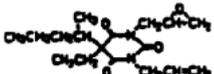
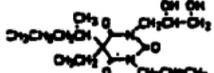
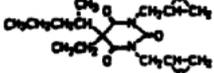
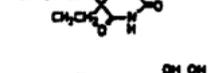
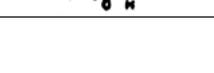
4 及び M-7) は対応するエポキシ体をアセトン中、20% 過塩素酸にて水解するか、又はアルカリ性下、アリル体と KMnO_4 と反応させることにより合成した。これら代謝物はすべて新化合物であるので Table 21 に物理化学的データを一括して示した。その構造はスペクトルデータによく一致することから支持されている。

5-3-2. DAPB 尿中代謝物の単離・同定 C^5

位にアリル基を有するセコバルビタール及び AlloB についてはいくつかの報告はあるが *N* 位にアリル基を有する本研究によって見出された DAPB のような化合物については報告はない。しかし、*N* 位に直鎖のブチル基を有する *N*-*n*-ブチルバルビタールはメチル基のように脱アルキル化を受けずに *n*-ブチル基の (ω -1) 位が水酸化される。⁸¹⁾ 上記のバルビツレートにおいて一般にアリル基はジオール体や 1-メチルブチル基の (ω -1) 位の水酸化体、⁸⁰⁻⁸²⁾ また、シクロヘキセニル環を有する HB ではエポキシドを経てのジオール体経路が報告されている。⁸³⁾

$2\text{-}^{14}\text{C}$ -DAPB を含む DAPB 80 mg/kg, *i.p.* (比放射能 54.8 mCi/mmol) あるいは非標識 DAPB 1 mmol/kg, *i.p.* 投与 72 時間までの尿を試料とし、アルカリ性又は酸性下で代謝物をエーテル及び酢酸エ

Table 21. Spectral Data for the Metabolites Synthesized

Structure	Compound yield		Formula	MS (M ⁺)	IR (cm ⁻¹ KBr)	¹ H-n.m.r. (in CDCl ₃ , δ)
	No.	%				
	M-1	69-6	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₄	322	3450 (OH) 1695 (C=O)	3.60–4.00 (1H, m, -OH), 4.55 (4H, d, J=7 Hz, (N-CH ₂) ₂), 5.16–5.54 (4H, m, (=CH ₂) ₂), 5.70–6.16 (2H, m, (-CH=) ₂).
	M-2	20-6	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₅	338	3448 (OH) 1686 (C=O) 1114 (C-O-C)	2.51–2.78 (2H, m, -CH ₂), 3.03–3.21 (1H, m, -CH-), 3.48–3.75 (1H, m, -OH), 3.90–4.08 (2H, m, N-CH ₂ -), 4.37 (2H, d, J=6 Hz, N-CH ₂ -), 4.98–5.25 (2H, m, =CH ₂), 5.46–5.88 (1H, m, -CH=)
	M-3	48-2	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₄	322	1688 (C=O) 1106 (C-O-C)	2.61–2.88 (2H, m, -CH ₂), 3.18–3.36 (1H, m, -CH-), 3.90–4.41 (2H, m, N-CH ₂ -), 4.56 (2H, d, J=6 Hz N-CH ₂ -), 5.16–5.52 (2H, m, =CH ₂) 5.67–6.18 (1H, m, -CH=)
	M-4	10-2	C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O ₅	340	3448 (OH) 1688 (C=O)	2.70–3.12 (2H, m, (-OH) ₂), 3.42–3.57 (2H, m, -CH ₂ O-), 3.75–4.11 (3H, m, N-CH ₂ -CH-), 4.38 (2H, d, J=6 Hz, N-CH ₂ -), 4.95–5.28 (2H, m, =CH ₂), 5.46–5.91 (1H, m, -CH=)
	M-5	31-4	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₅	338	1685 (C=O) 1080 (C-O-C)	2.61–2.88 (4H, m, (-CH ₂) ₂), 3.12–3.33 (2H, m, (-CH-) ₂), 3.87–4.38 (4H, m, (N-CH ₂ -) ₂)
	M-6	59-8	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₄	282	3200 (NH) 1680 (C=O) 1060 (C-O-C)	2.61–2.88 (2H, m, -CH ₂), 3.09–3.33 (1H, m, -CH-), 3.84–4.35 (2H, m, N-CH ₂ -)
	M-7	43-6	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₅	301	3400 (OH) 3200 (NH) 1680 (C=O)	3.45–3.84 (3H, m, -CHCH ₂ O-), 3.84–4.68 (4H, m, N-CH ₂ , (-OH) ₂)

チルを用いて抽出した。各画分について標識体は液体シンチレーションカウンター、TLC スキャナーを用いて追跡、非標識 DAPB 投与の場合は分離操作を行った後、GC-MS によって代謝物の同定を行った。同定には前項で述べた合成標品を用いた。

尿を pH 10 に調整、脂溶性の高い代謝物のみを得るためまずエーテルを用いて抽出した。このエーテル画分中に TLC にて未変化体のほか、2 種の代謝物 (M-1 及び M-4) の存在が認められた。M-1 は合成標品の Rf. 値と一致、MS の分子イオンピーク (M⁺) 322, そのフラグメントパターンが一致したことから、(ω-1)-OH-DAPB と同定した。一方、M-4 は同様にスペクトルデータの一致により N-(2',3'-ジヒドロキシプロピル)-N'-アリル-PB と同定した (Fig. 32)。これはエポキシ体の水解体と考えられた。エーテル層を希アルカリ溶液で振ると M-4 のほか、1 個のアリル基が離脱した MAPB が代謝物として移行していることが認められた。そこ

でエーテル画分を得た水層を酢酸エチルで振るとこの画分には 3 種のピーク (M-7, M-8, M-9) が認められ、GC-MS のデータから M-7 は N-(2',3'-ジヒドロキシプロピル)-PB, M-8 及び M-9 は各々水酸基を 3 個あるいは 4 個有していることから、M-8 は (ω-1)-OH-N-(2',3'-ジヒドロキシプロピル)-N'-アリル-PB であり、M-9 は N,N'-ジ-(2',3'-ジヒドロキシプロピル)-PB であると推定された (Fig. 33)。さらに水層を 2N HCl で pH 2 に調整、煮沸し抱合体を加水分解したところ 3 種の代謝物の存在が認められた。そのうちの 1 つは M-8 と考えられるがその他は未決定である。

以上の代謝物の Rf. 値及び収率 (排泄%) を Table 22 に示した。主代謝物は M-8 であった。このものは DAPB が C⁵ 位側鎖が (ω-1) 水酸化を受け、さらに 1 個のアリル基の 2 重結合のエポキシ化、引き続きエポキシ体のジオール体への水解が起こったものと考えられる。M-2, M-3, M-5, 及び M-6 の

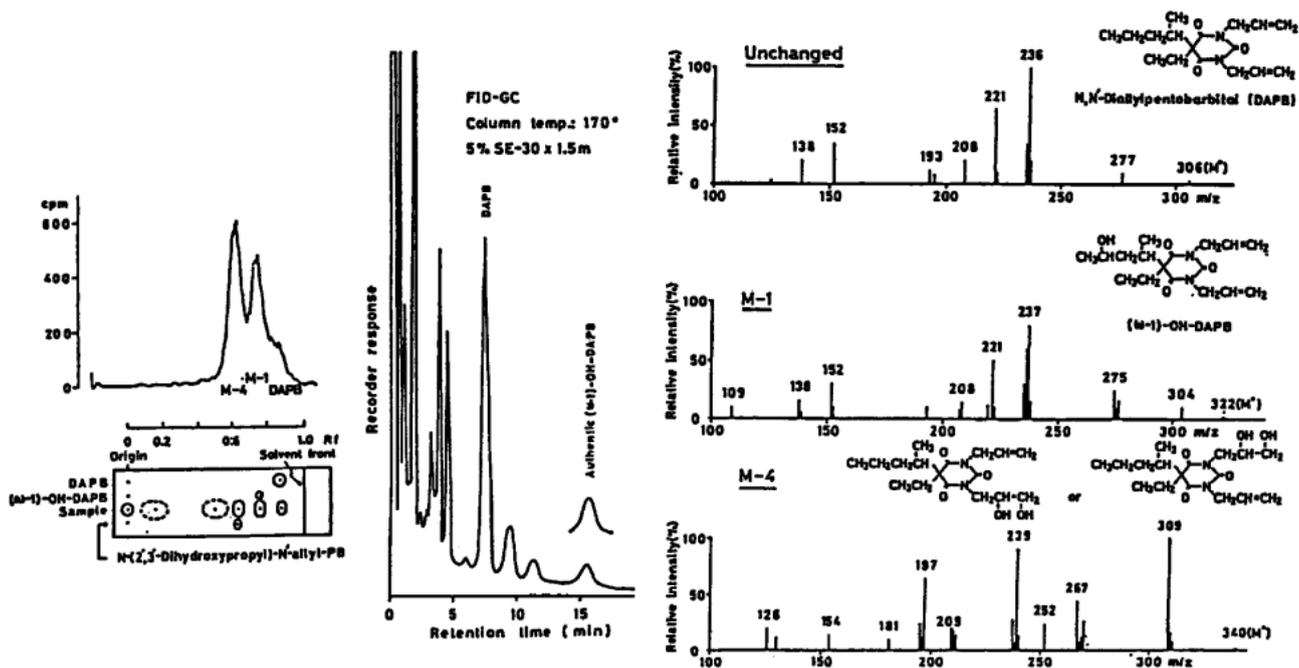


Fig. 32. Radio Chromatogram, Gas Chromatogram and Mass Spectra of DAPB and Its Metabolites

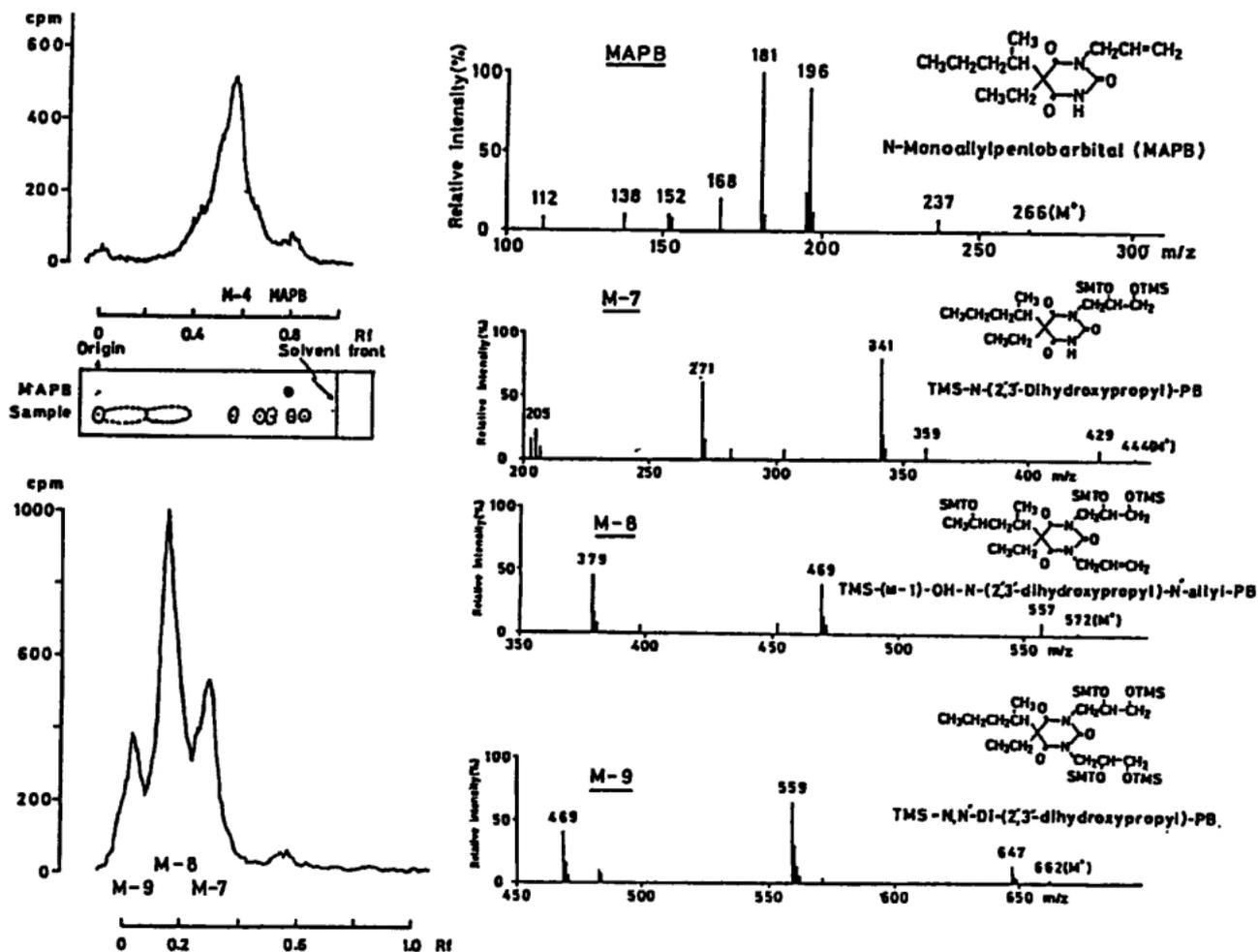


Fig. 33. Radio Chromatogram and Mass Spectra of Metabolites of DAPB

エポキシ体は標品として得られているものの体内では不安定であり、ミクロゾーム画分においてエポキシドヒドロラーゼにより水解されて容易にジオール

体になるものと考えられる。なお未知代謝物 2 ないし 3 が認められたが構造決定までには至っていない。

Table 22. T.l.c. Rf Values and Quantification of DAPB Metabolites Excreted in Urine of Mice Dosed *I.p.* with ^{14}C -*N,N'*-Diallylpentobarbital (DAPB)

Metabolites	Rf. values	Percent of dose
Unchanged (DAPB)	0.84	0.06
M-1 [$(\omega$ -1)-hydroxy-DAPB]	0.72	2.98
M-4 [<i>N</i> -(2', 3'-dihydroxypropyl)- <i>N'</i> -allyl-PB] (MAPB)	0.61	5.26
M-7 [<i>N</i> -(2', 3'-dihydroxypropyl)-PB]	0.78	0.19
M-8 [$(\omega$ -1)-hydroxy- <i>N</i> -(2', 3'-dihydroxypropyl)- <i>N'</i> -allyl-PB]	0.30	3.56
M-9 [<i>N,N'</i> -di-(2', 3'-dihydroxypropyl)-PB]	0.17	6.00
(Unknown)	0.05	2.22
(Unknown)	0.09	4.52
(Unknown)	0.31	4.03
(Unknown)	0.12	5.87
Total		34.69

^{14}C -DAPB was administered *i.p.* to four mice at a dose of 80 mg/kg. The urine was collected every 24 h up to 72 h after dosage. Solvent system was benzene-ethyl acetate-ethanol (10 : 10 : 1, by vol.).

以上の結果、DAPB の代謝マウス *in vivo* において多種類の代謝物を生成することが明らかとなった。したがって DAPB の薬理作用はこれら代謝物を反映しているものと考えられる。これら代謝経路をまとめると ① C^5 位側鎖、1-メチルブチル基の (ω -1) 位の水酸化 ② アリル基のエポキシドジオール化 ③ *N*-脱アリル化 ④ 開環 ($^{14}\text{CO}_2$ の排出) ⑤ 抱合となる。

Fig. 34 にこれらの代謝経路を一括して示した。ここで同定したいくつかの代謝物につき、その薬理作用 (睡眠効果) 及び肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響などを検討した。

5-3-3. DAPB 代謝物の PB との相互作用並びに肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響 一般に薬物の薬効及び毒性が代謝によって影響されるということはフェニルブタゾン、フェナセチン、パラチオンなど多くの例がある。⁸⁴⁾ しばしば薬物は体内において活性代謝物を生成し薬効・毒性化を起こす。これらの例は極性増大の程度がそれほど強くない酸化反応に

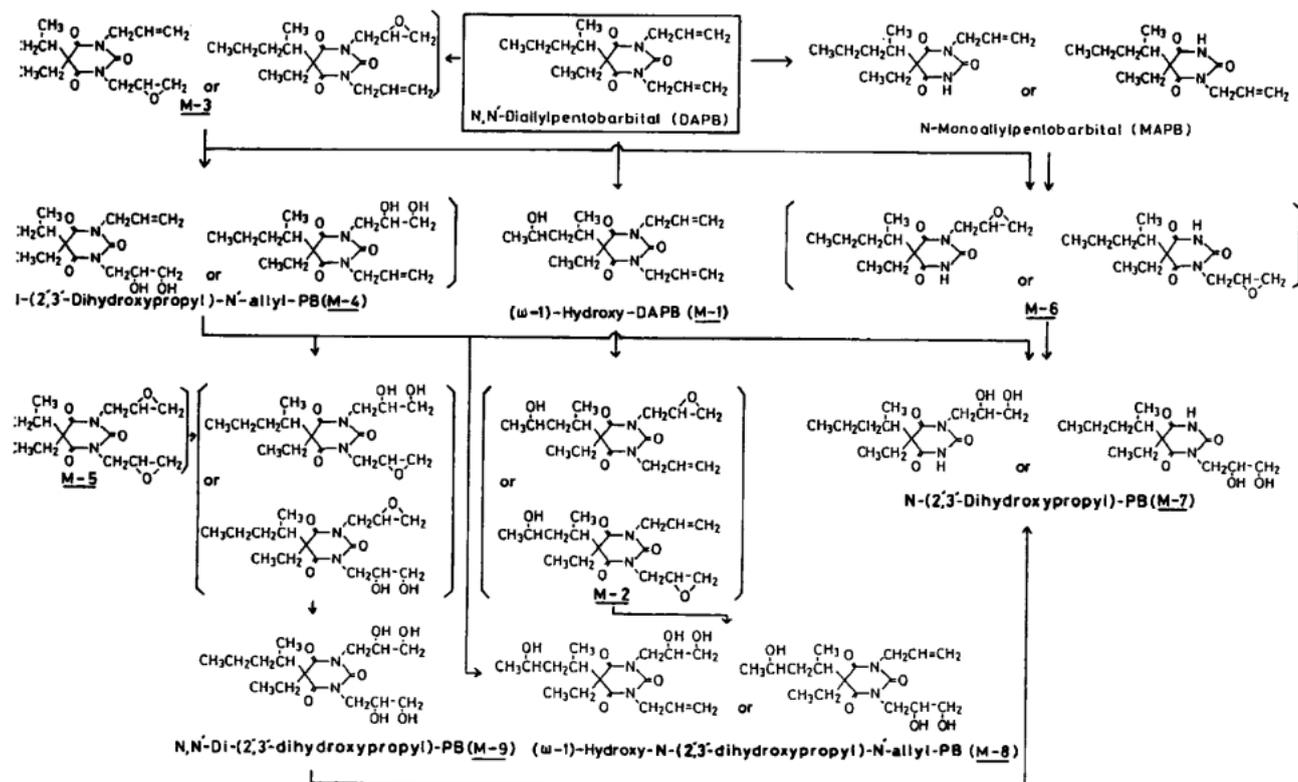


Fig. 34. Possible Metabolic Pathways of DAPB in Mice

このような活性化をみる事ができる。

そこで同定された DAPB の代謝物の薬理作用を PB 睡眠延長作用を指標として合成標品を用いて 3 種の投与経路 (*i.p.*, *i.v.* 及び *i.c.v.*) で検討した。その結果 Fig. 35 に示すように *i.p.* 投与において母化合物 DAPB は当然のことながら M-7 を除くすべての化合物が有意に PB 睡眠を延長した。特に M-1 (ω -1)-水酸化体は DAPB よりも強い延長作用を示す活性代謝物であることが判明した。PB の代謝物 (ω -1) 水酸化体は何ら睡眠作用を示さない解毒代謝物であることを考えると興味深く、DAPB の PB 延長作用に M-1 が大きく寄与していることが明らかとなった。

i.v. 投与の場合もまた同様に M-1 [ω -1)-OH-DAPB] は母化合物 DAPB よりも強い延長を示し活性代謝物であることを再確認した (Fig. 36)。MAPB, M-2, M-3 も有意に延長作用を認めるなど興味ある知見が得られた。しかし、M-5, M-6 は延長傾向を示したものの有意差はなかった。

そこで、DAPB に強い肝薬物代謝酵素阻害作用

が認められたことから、代謝物についても同様に検討した。合成代謝物標品を各々 80 mg/kg, *i.p.* 投与 1 時間後の肝ミクロゾームを用いて *in vivo* エチルモルヒネ *N*-脱メチル化活性及び P450 含量を測定した (Fig. 37)。

i.p. 及び *i.v.* 投与で有意な睡眠延長作用を示した代謝物、特に M-1 は DAPB と同等のエチルモルヒネ *N*-脱メチル化活性を抑制し、P450 含量をいずれも有意に減少させた。このため challenge した PB の代謝を抑制したため脳内の PB 濃度が持続的に高まり睡眠を延長させたことは明白である。しかしながら、DAPB それ自体が中枢抑制作用を有していることから、これら代謝物にも中枢抑制作用があるのではないかと予測し、*i.c.v.* により検討した。その結果 (Fig. 38)、予想通り M-1 は DAPB の 1.6 倍の睡眠延長作用を示す活性代謝物であることが判明した。その他の MAPB, M-2, M-3, M-4, M-7 もまた DAPB に比較して弱いものの活性を有していた。この M-1 が活性代謝物であるとの知見は従来のバルビツール酸誘導体の構造活性相関で定説であ

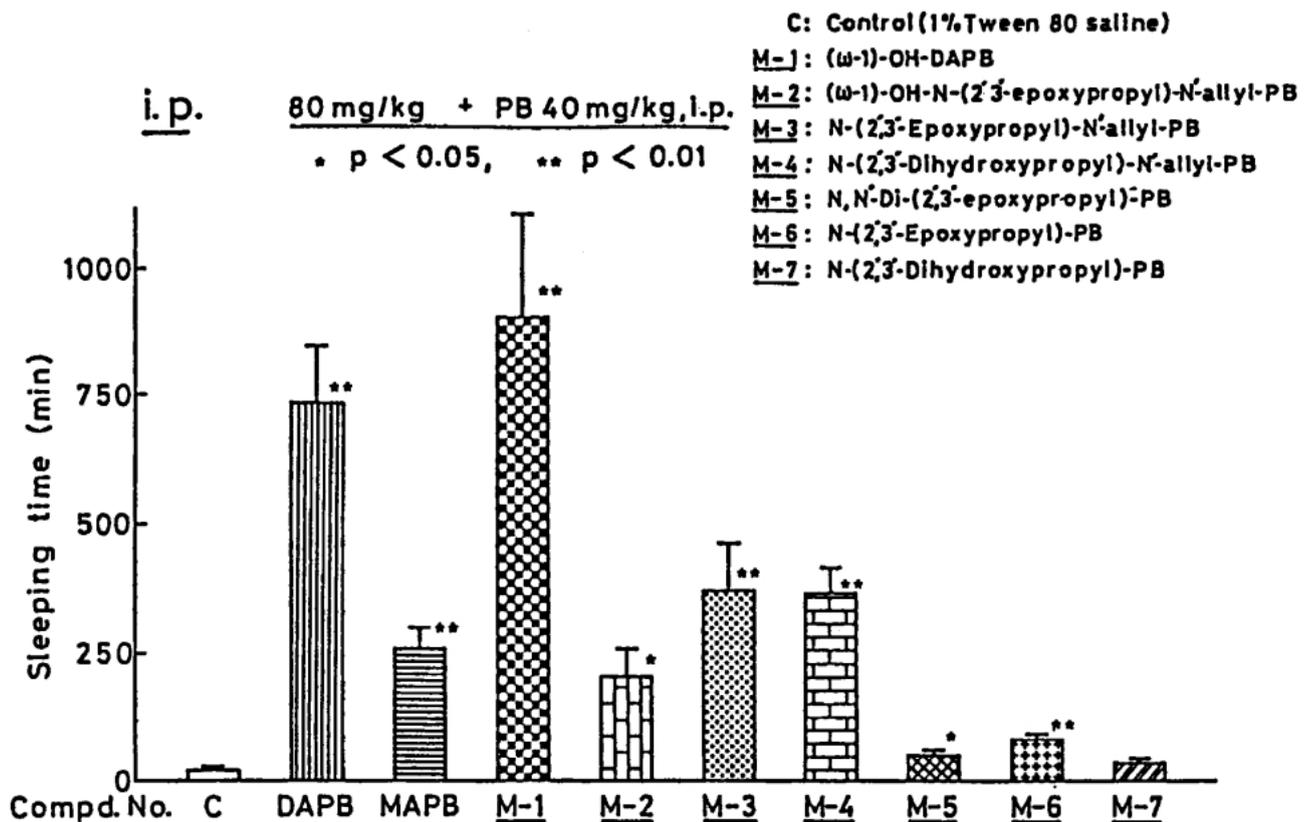


Fig. 35. Effects of DAPB and Its Metabolites on PB-Induced Sleep (*i.p.*)

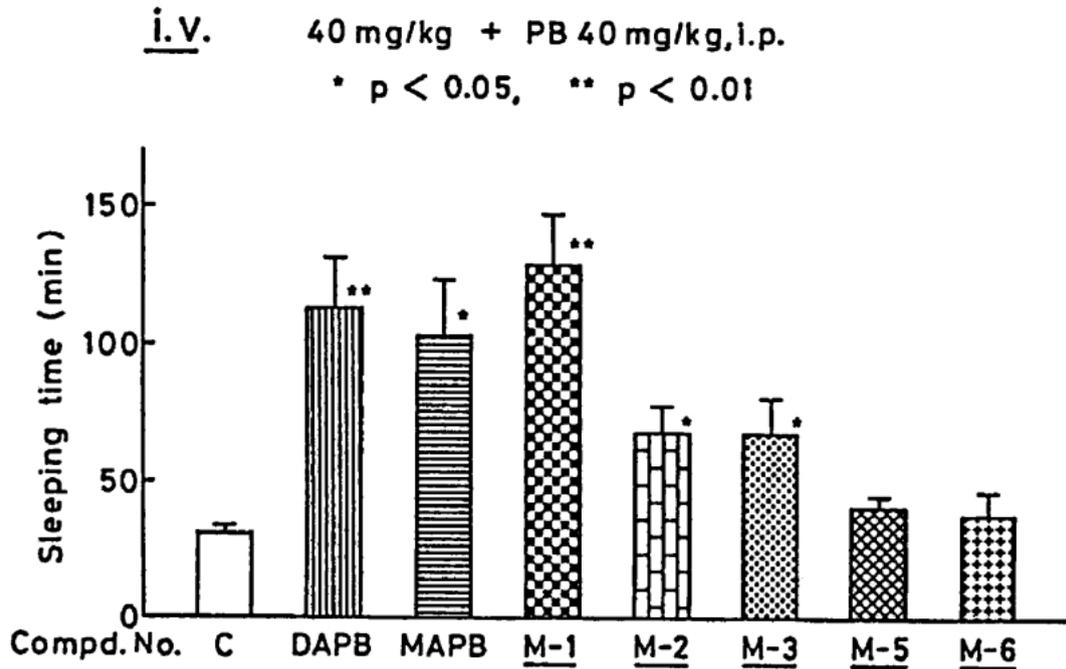


Fig. 36. Effects of DAPB and Its Metabolites on PB-Induced Sleep (i.v.)

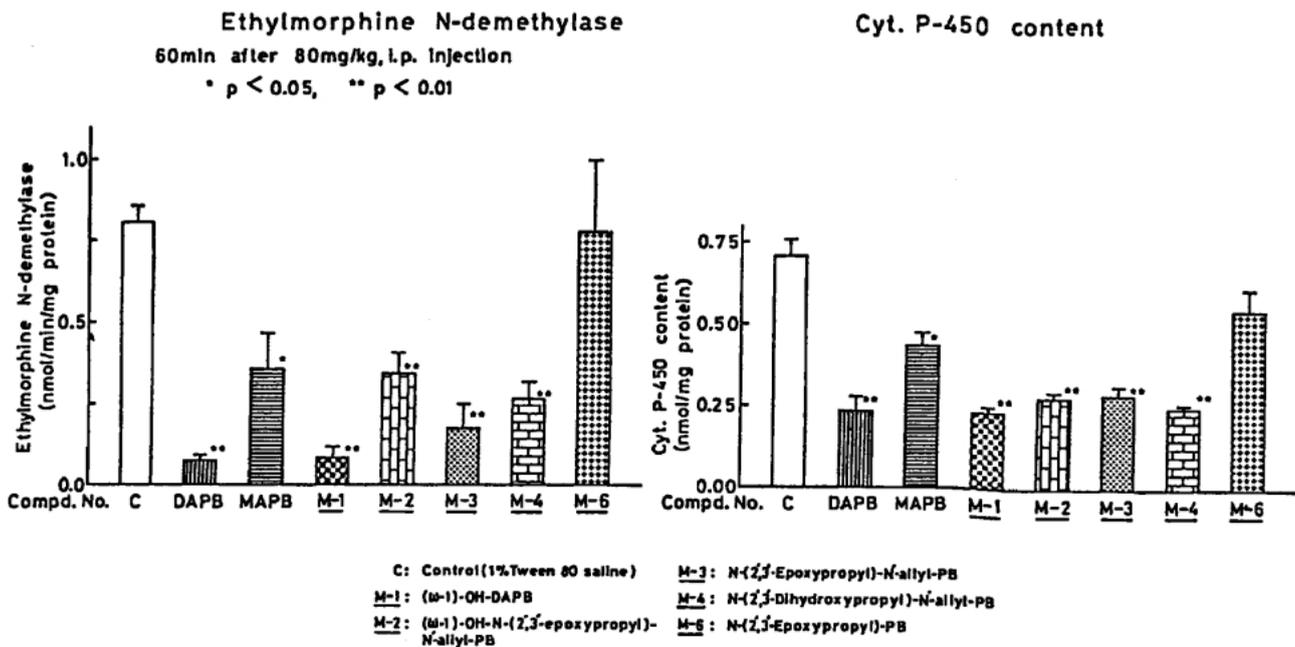


Fig. 37. Effects of DAPB and Its Metabolites on Hepatic Drug Metabolizing Enzymes

った C⁵ 位の側鎖に OH 基が存在する場合は作用を失う (ただし AB の (ω-1) OH 体は母化合物の 1/2) ということを覆すものである。さらにモノアリル体である MAPB にも睡眠作用があり、代謝物 M-2, M-3, M-4 及び M-7 も含めて DAPB の PB 睡眠延長作用にはこれら代謝物の大いなる寄与がある

ことがさらに明らかとなった。なお、DAPB の脱ジアリル体すなわち PB は全く検出されなかったことにより、PB による協力作用は排除された。これらの知見は筆者らが別のグループで行っている大麻主成分 THC (テトラヒドロカンナビノール) の薬理・毒性研究における大部分の代謝物とその薬理・毒作

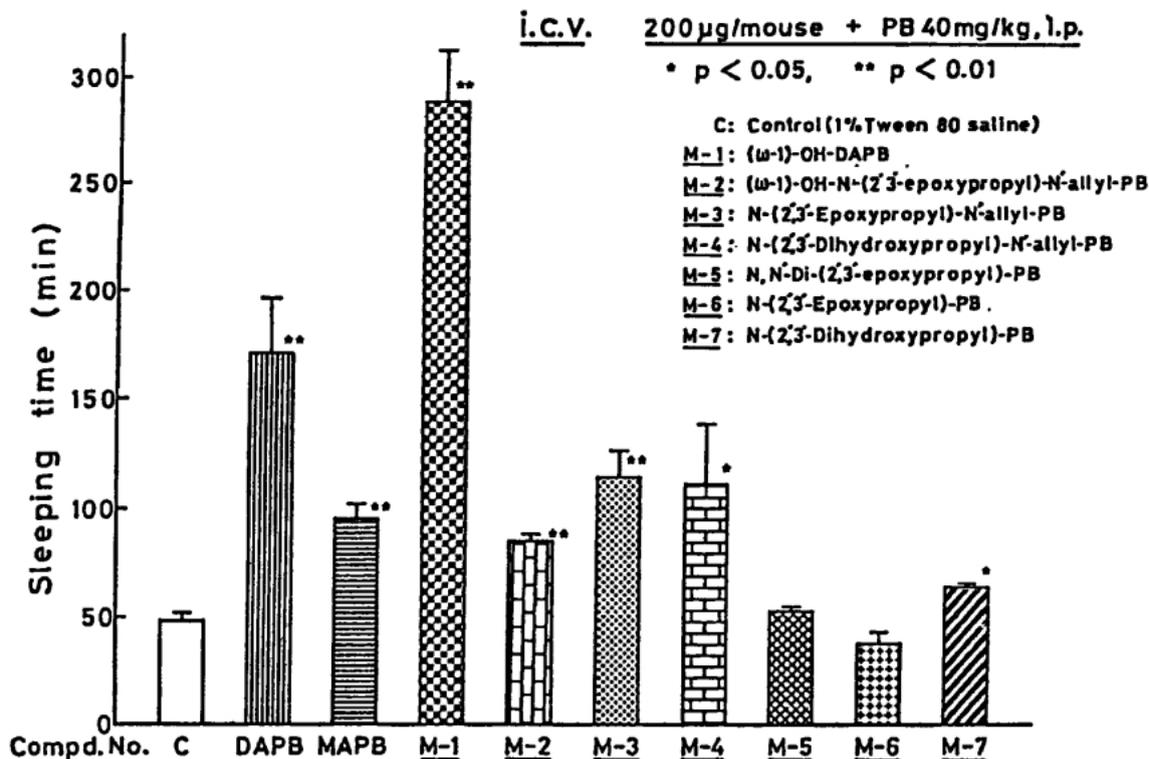


Fig. 38. Effects of DAPB and Its Metabolites on PB-Induced Sleep

用に寄与している知見と全く一致しており、代謝研究の重要性が改めて認識された。^{84,85)} また薬物の体内動態に関してこのような DAPB のようにそれ自体に *i.p.* 投与では睡眠作用示さず、*i.c.v.* 投与で弱いものの作用を有し、かつ他の薬物 (PB) の代謝を強く阻害するというような現象もあることが明らかとなった。この知見は今後、創薬において考慮されるべきではないかと思われる。

5-3-4. DAPB の代謝物の生体内動態 前項で代謝物の DAPB の作用への寄与が大きかったことから、改めて DAPB 代謝物の脳内及び血漿中の挙動を $2\text{-}^{14}\text{C}$ -DAPB を用いて詳細に検討した。

$2\text{-}^{14}\text{C}$ -DAPB 80 mg/kg, *i.p.* 投与し、総放射活性及び未変化体 DAPB、代謝物の脳並びに血漿中濃度を測定した。その結果、6 時間目までの経時変化を Fig. 39 に示した。脳では未変化体 DAPB は投与後から 90 分まで急速に低下したのに対し、代謝物 M-1 [(ω -1)-OH-DAPB] は 60 分 (1 h) にピークを示したもののこれもまた 3 h までに急速に低下した。しかし M-4 (DAPB ジオール体) は 90 分—3 h までは一定の濃度を示した。一方、血漿中では脳中と同様に減少したものの 90 分ではモノアリアル体

(MAPB) の存在が認められた。Total の放射能は明らかな二相性を示した。別の実験として 200 μ g/mouse, *i.c.v.* 投与を行った場合、肝薬物代謝の影響は無視できるので投与 60 分までに脳中に未変化体 (DAPB) の総放射活性 98% が認められたことから、脳中に移行した DAPB の貯留性はかなり高いことが予測された。したがって、投与 1 時間までの延長作用の主因は DAPB 自体の直接関与によるものと考えられた。

5-3-5. DAPB 及びその代謝物の分配係数 前項において DAPB とその代謝物が PB の睡眠延長作用を有する原因は DAPB の代謝阻害作用とともにそれら自体の作用、特に代謝物は活性代謝物として寄与することを述べた。と同時にこれらは脳内貯留性があるために作用が持続するという事も併せて結論付けられた。とするならば経口、あるいは腹腔内投与の場合は当然のことながら血液脳関門を通過する必要がある。一般に非解離型の化合物ではその脂溶性が関門通過の第 1 要因と考えられている。

そこで MAPB、(ω -1)-OH-DAPB 及び M-4 (DAPB ジオール体) を選び比較として PB を加え、*n*-オクタノール/水 (リン酸緩衝液, pH 7.4) を用

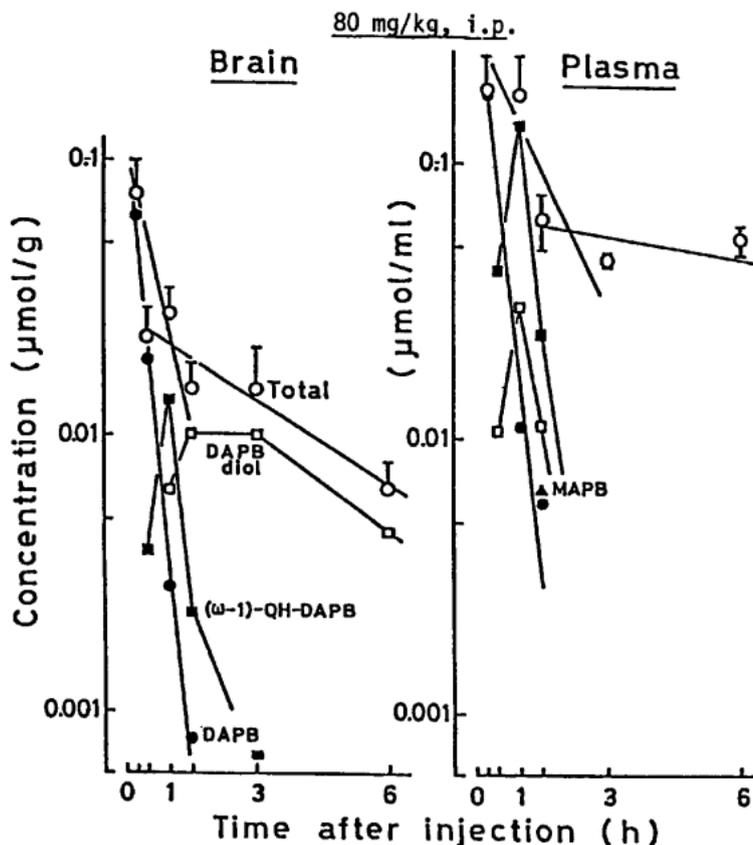


Fig. 39. Brain and Plasma Concentrations of DAPB and Its Metabolites

いて分配係数を算出した。PBの分配係数はHansch⁸⁶⁾あるいはMiller⁸⁷⁾によると89と報告されているが、筆者らの実験では108と求められほぼ近いと考えられた。Table 23に示すようにアリル基導入により分配係数は増加した。PBに比較してDAPBは980(9倍)、MAPBでも263(2.5倍)を示した。M-1[(ω -1)-OH-DAPB]でも164(1.5倍)とPBよりも脂溶性が高かった。これに対してM-4(DAPBジオール体)は41(0.4倍)とかなり低かった。M-1である(ω -1)-OH-DAPBはPB延長作用は1.5倍の活性代謝物であるとしたがこの理由として作用部位におけるhydrophilic(親水性)とhydrophobic(疎水性)からなる部分が受容体(?)の部位とのaffinity(親和性)を高めるために作用が強くなったものと考えられた。ここにも受容体の存在を後(後編その2(Part II))に想定せざるを得ないとの考えが強く生まれた。

6. N^1, N^3 -ジアリルウラシル(DAU)及び N^1, N^3 -ジアリルチミン(DAT)のPB睡眠延長機作⁸⁸⁾

既に(p.95)述べたようにDAUが高用量ながらそれ自体、睡眠作用を有し、かつバルビツレート睡

Table 23. Apparent Partition Coefficient of DAPB and Its Metabolites

Compound	Partition coefficient
DAPB	980 \pm 141
MAPB	263 \pm 32
M-1[(ω -1)-hydroxy-DAPB]	164 \pm 8
M-4	41 \pm 4
PB	108 \pm 2

Partition coefficient was measured in *n*-Octanol/phosphate buffer (pH-7.4). Values given are means \pm S.E. of three samples.

眠を延長すること。その構造はバルビツレートのオキソピリミジン骨格と酷似することから、これらの機作追求は意義あると考えられた。すなわちDAPBは薬物でありPBのアリル体、一方DAUは生体内物質であり、しかも核酸という核タンパク質の構成物質(U)のアリル体、この両者に同一の薬理作用があると考えたからである。(事実、後述するようにウリジン誘導体に睡眠作用があるという世界で初めての発見につながった。これについてはその2(Part II)で詳述する。

DAU自身の睡眠作用に関連して、Uがアデニン

塩基対を形成するように、U の誘導体バルビツレートはアデニン誘導体と水素結合を形成することが報告されている。^{89,90)} さらに、筆者 (Yamamoto) らの研究であるが、⁹¹⁾ *in vitro* でマウス脳ホモジネートを用いた検討で PB が DNA 及び RNA への ³H-チミジン及び ³H-ウリジンの結合を増加させたという事実もある。

6-1. DAU 及び DAT の PB 睡眠延長作用の経時変化 核酸塩基であるウラシル (U) のジアリル体に PB 睡眠延長作用があったということは極めて興味あることである。そこでタイムコース実験を行いこの事実を確認することを試みた。その結果 Fig. 40 に示すように 90 分後さえ有意差を示した。この場合 DAU 200 mg/mouse, *i.c.v.* であるので DAU の直接作用と考えてよい。そこで *i.p.* 投与の場合どのような結果を示すのか興味あるところである。

DAU 又は DAT *i.p.* 投与 10 分から 360 分 (6 h) まで PB 40 mg/kg, *i.p.* を challenge すると DAU は 180 分 (3 h) まで有意な延長を示したが、DAT は 60 分 (1 h) まで差異が認められた。しかし、両者とも脳血液関門を透過し易い性質であることを示すとともに、DAU と DAT の間で延長作用に差があったことは生体常成分とはいえ U と T の差異を示していることに他ならない (Fig. 41)。DAU > DAT であるがその理由は現在のところ不明である。

6-2. DAU 及び DAT の肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響 U 及び T, 両者とも生体内物質であるがそのアリル体は異物である。これらに PB 睡眠延長作用が認められたことから肝薬物代謝酵素系に及ぼす影響を検討した。その結果、Fig. 42 に示すように DAU 投与群は 10—180 分まで *in vivo* エチルモルヒネ *N*-脱メチル化活性を有意に抑制した。同時に Fig. 43 に示すように P450 含量も低下させたが、両者とも 360 分ではコントロールレベルまで回復した。DAT の場合 60—180 分間でエチルモルヒネ *N*-脱メチル化活性を、P450 含量は 10 分、60 分に有意に低下させた。その強さは DAU > DAT であった。

続いて *in vitro* の添加実験を行った。Fig. 44 に示すように DAU は 25 μ M, DAT は 10 μ M から有意にエチルモルヒネ *N*-脱メチル化活性を抑制した。そこで阻害機構を知るために、4, 10, 25 μ M の濃度で薬動力学的な検討を行った。その結果、Lineweaver Burk プロットから、興味あることに DAU は非競合型に近い混合型であり、 K_i 値は 555 μ M と算出された。しかし DAT は明らかな混合型の阻害様式であり、 K_i 値は 232 μ M であった (Fig. 45)。この場合比較として用いた薬物代謝酵素阻害剤として有名な SKF 525-A の K_i 値は 3.52 μ M であり、筆者らが見出した既述の DAPB は 5.95 μ M で

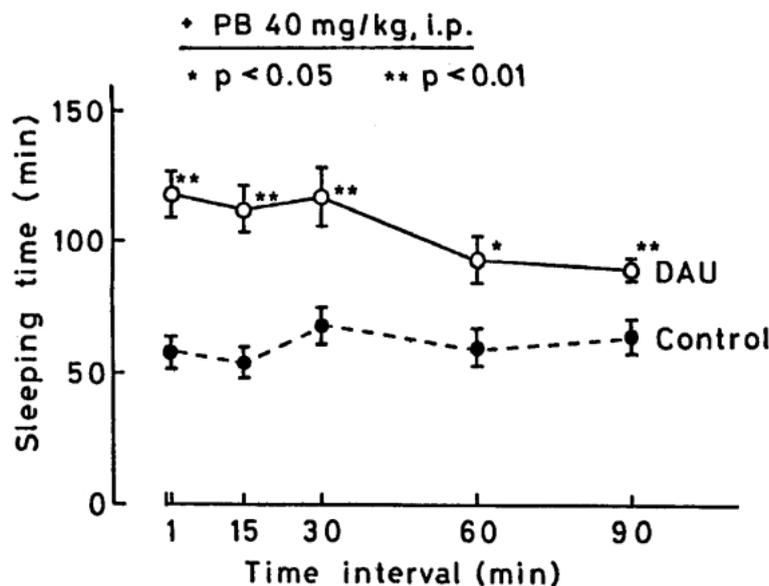


Fig. 40. Effect of *I.c.v.* Injection of DAU on PB-Induced Sleep

The result is expressed as the mean \pm S.E. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

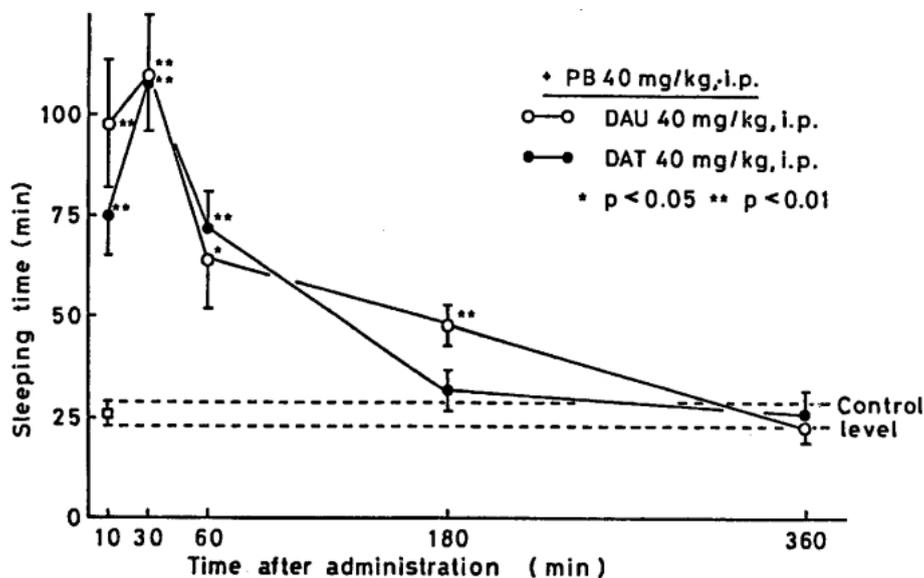


Fig. 41. Time Course of the Effect of DAU and DAT on PB-Induced Sleep

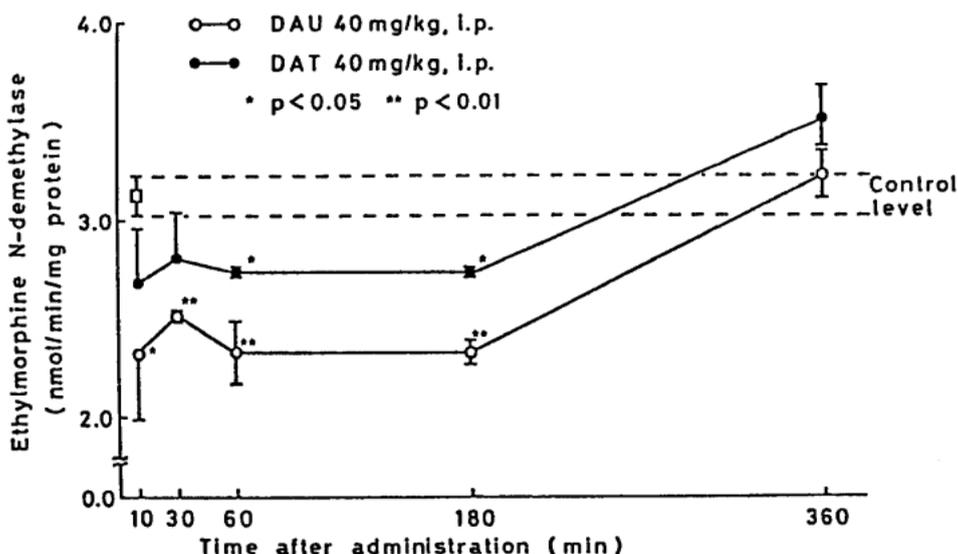


Fig. 42. Time Course of the Effect of DAU and DAT on Ethylmorphine N-Demethylase

あった。このことから DAU と DAT の阻害作用は 1/100 程度の弱いものであるということが判明した。DAU は脳直接投与によっても PB を有意に延長したことから、それ自体睡眠作用があり、それが PB の代謝も同時に阻害したためにコントロールに比して約 4 倍という延長作用を生じたものと考えられる。

以上のことから、DAU は中枢抑制作用及び肝薬物代謝酵素系に及ぼす阻害の両者により PB 睡眠を延長するが、DAT は *i.c.v.* で延長作用が認められなかったことから PB 代謝の阻害のみによって延長作用を示すことが明らかとなった。これらのことか

ら、同じ生体内物質であっても U と T では異なった生理作用の役割を有していると考えられる。

7. 総括 (まとめ)

これまでの知見をまとめると次のようになる。

(1) オキサピリミジン骨格を有する BA の N^1 , N^3 , C^5 にアリル基を導入すると BA 自体にも中枢抑制作用が見出された。また TetraABA のように PB 睡眠を有意に延長するが、PB と構造が似る TP に対しては睡眠延長作用がみられないなど一元的に論ずることができない多様な活性変化がみられた。

(2) 市販のバルビツレート 6 種の N 位にアリル

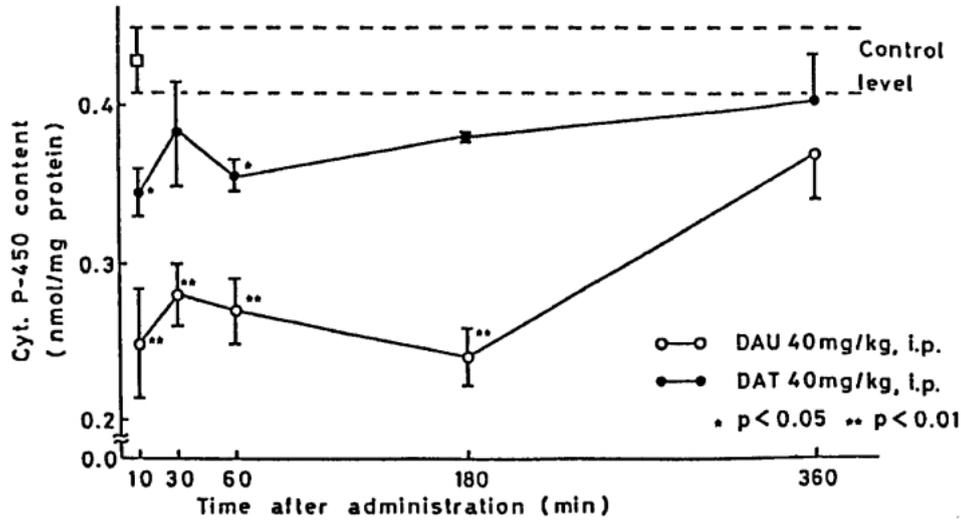


Fig. 43. Time Course of the Effect of DAU and DAT on Cytochrome P450 Content

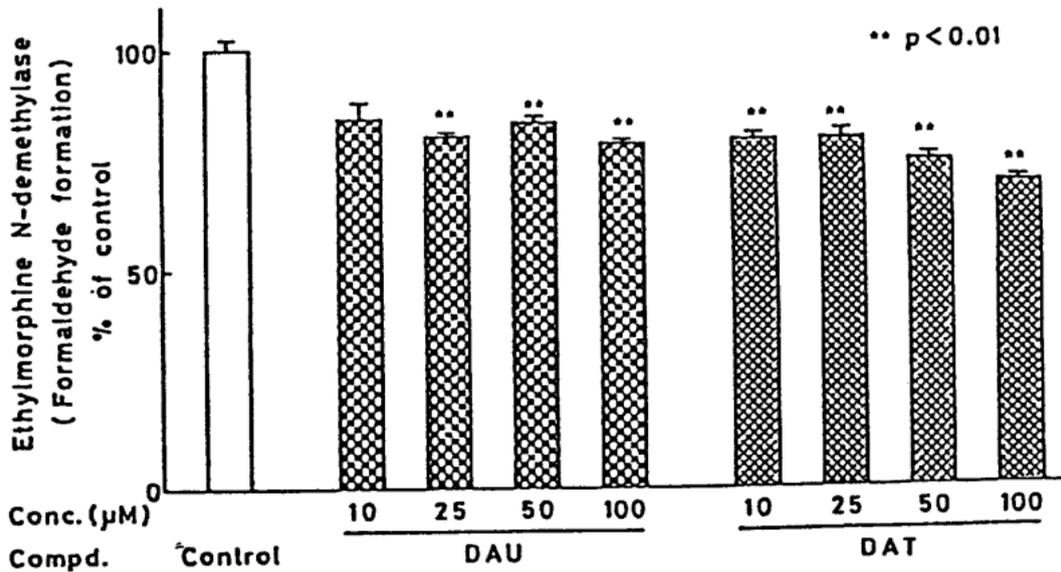


Fig. 44. In vitro Effect of DAU or DAT on Ethylmorphine N-Demethylase in Hepatic Microsomes

基を導入，単独睡眠作用及び相互作用を検討した。MAPBは母化合物よりは弱いものの睡眠，抗癒れん作用が認められた。DAPBは何ら睡眠作用を持たないにもかかわらずPB睡眠を実に約80倍にも延長，DZの運動失調作用を用量依存的に増強するなど相加，相乗作用がみられた。しかしながら興味あることにBに対してのみ特異的にB睡眠を約1/2に短縮。ここに初めてバルピツレート拮抗薬を発見した。

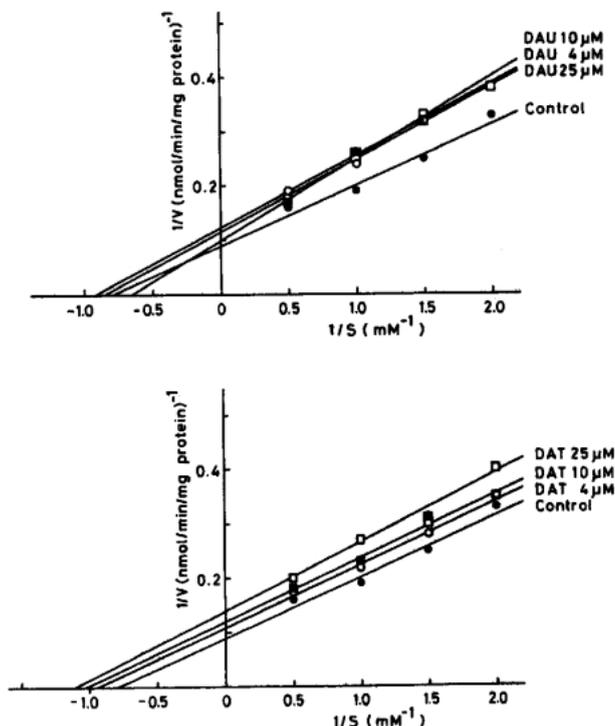
(3) B, PheB, AB及びTPのN-アリル体は単独睡眠作用を減弱あるいは消失するかいずれのバルピツレートに対する相互作用ではすべて延長作用を示

した。

(4) MABはBよりも強い睡眠，抗癒れん作用を示した。また，N,S-DATPはN,N'-ジアリル体(N-DATP)と異なり睡眠作用を有していた。

(5) N-アリル，N'-メチルバルピツレートは睡眠作用を消失するがPB睡眠を有意に延長した。この場合，いずれも高用量であり一部癒れん作用を有していた。

(6) AGI及びAMPはなお睡眠作用を保持しており，かつPB睡眠を有意に延長した。BGは癒れん作用を有するがABGは癒れん作用を消失していたにもかかわらずPB睡眠を延長した。しかしなが



	K_m	V_{max}		K_m	V_{max}
Control	1.267	11.11			
DAU 4 μM	1.083	8.33	DAT 4 μM	1.064	9.09
10 μM	1.500	10.00	10 μM	0.983	8.33
25 μM	1.183	8.70	25 μM	0.900	7.14
$K_i = 555 \mu M$			$K_i = 232 \mu M$		

Fig. 45. Lineweaver-Burk Plots Showing Inhibition of Ethylmorphine *N*-Demethylase by DAU and DAT

ら、B睡眠に対しては短縮作用を示すなど DAPB の B睡眠と同様な拮抗現象がみられた。

(7) U, T 及び 6-MU のアリル体は N^3 -MAU を除き、すべて PB睡眠を有意に増強した。また、DAU は睡眠と痙攣作用を弱いながらも示した。他のジアリル体も PB, B睡眠, DZ 運動失調作用を増強した。

(8) DAPB の B睡眠短縮作用はマウス, ラットの両種で再確認され、この拮抗作用はマウスにおいて用量依存性が認められた。

(9) DAPB の PB睡眠延長のメカニズムを追及した結果、① DAPB は *i.v.* 及び *i.c.v.* 投与でも用量依存的に PB睡眠を延長した。*I.c.v.* 投与の場合において DAPB 自体に中枢抑制作用があることが分かった。② DAPB 前処置により PB の脳及び血漿

中濃度は高く 12 時間まで維持された。③ DAPB は肝薬物代謝酵素活性を抑制、P450 含量を有意に低下させた。*In vitro* エチルモルヒネ *N*-脱メチル化活性の阻害は非競合型を示した。④ *I.p.* 及び *i.c.v.* 投与後の脳及び血漿中からの DAPB の消失は二相性を示した。⑤ マウス尿中代謝物として C^5 位側鎖 ($\omega-1$) 位水酸化体である M-1, [$(\omega-1)$ -OH-DAPB], ジオール体 (M-4, DAPB ジオール体), *N*-脱アリル体 (MAPB) のほか、これらより生成したと考えられる代謝物 [*N*-(2',3'-ジヒドロキシプロピル)-PB (M-7), ($\omega-1$)-OH-*N*-(2',3'-ジヒドロキシプロピル)-*N'*-アリル-PB (M-8) 及び *N*, *N'*-ジ-(2',3'-ジヒドロキシプロピル)-PB (M-9) を同定した。($\omega-1$)-OH-DAPB は母化合物 (DAPB) よりも強力な PB睡眠延長作用を示す活性代謝物であることが明らかとなった。

(10) DAU 及び DAT の PB睡眠延長作用は前者は中枢抑制と肝薬物代謝酵素活性の阻害。しかし DAT は肝薬物代謝酵素活性阻害が主であった。

本総説は既述のように表題のバルビツレートからウリジンへの前編 (その 1) として書かれたものである。バルビツール酸、オキソピリミジン核を有する化合物にアリル化することによる多様な活性変化がみられた。最後にウラシル、チミンへと生体内物質に移行したことから、次に考えられることはウリジン、チミジン等の核酸へと発展させることにある。そしてついにウリジン受容体の発見につながっている。この部分は後編 (その 2) としてまとめる予定である。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、物心両面において九州大学名誉教授 吉村英敏先生には格別の御指導を頂いた。ここに衷心より感謝する。また、実験は渡辺和人教授、木村敏行助教授、伊藤 誠元助手、館岡裕二博士、現岡山大学薬学部 成松鎮雄教授、現信州大学医学部附属病院 松永民秀助教授、北陸大学薬学部衛生化学教室 宇佐見則行 (現九州保健福祉大学薬学部講師)、古田悦子、越上誠、久世治朗、寺岡政作、三木真章、小花清史、池田三千夫、米本栄香、清水寛美大学院修士、山崎文嗣、菅原智州、立川秀樹、紙山英博、平村茂樹、西永尚典、鈴木成明、佐々木 功、木下 功、太田智子、北島淑恵、高橋藤代、森田貴乃、中村信津子、

西由美子, 五十嵐ひとみ, 光定千賀, 大野真理子, 田村昌士, 長倉真由美, 青木理香子, 新井絵理, 大橋洋子, 湯川良子, 亀倉聡代, 堀川都子の諸氏をはじめとする教職員, 学生の方々など, その他多くの共同研究者及び協力者によってなされたものであり心より感謝の意を表します. さらに, 米国ミシシッピ大学医学部薬毒理学教室 Ing Kang Ho 教授, 名古屋大学医学部附属病院 鍋島俊隆教授, 東京医科歯科大学医用機材研究所 井上昌次郎教授, 本多和樹博士には有役な御助言を頂いた. ここに深謝する.

さらに研究費の一部は「文部科学省科学研究費」, 「財団法人島原科学振興会平成2年度研究助成金」, 「日本財団平成9年度笹川科学研究助成(木村敏行)」, 「財団法人薬学研究奨励財団平成13年度研究助成金(木村敏行)」, 「財団法人薬学研究奨励財団平成4年度海外派遣補助金(山本郁男)」及び「北陸大学特別研究助成」によった. ここに記して深く謝意を表します.

REFERENCES

- 1) The JPS Award for the Divisional Scientific Contribution in 2002 was given to this review described on the title of "The Biological and Pharmaceutical Studies on the Action Mechanism of Cannabinoids and Uridine Derivatives as CNS Depressant". However, part of cannabinoids was already appeared in "Pharmacology and Toxicology of Major Constituents of Marijuana-On the Metabolic Activation of Cannabinoids and Its Mechanism," by Yamamoto I., et al., *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **22**, 577-589 (2003).
- 2) Inoue S., Yamamoto I., "Mechanism of Sleep", Asakura, Tokyo, 1997, pp. 103-122.
- 3) Inoue S., "Sleep Substances: Their Roles and Evolution. Endogenous Sleep Substances and Sleep Regulation," eds. by Inoue S., Borbely A. A., Japan Scientific Societies Press, Tokyo /VNU Science Press, Utrecht, 1985, pp. 3-12.
- 4) Kimura T., Ho I.K., Yamamoto I., *Sleep*, **24**, 251-260 (2001).
- 5) Sharpless S.K., "Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 4th Ed.," eds. by Goodman L. S., Gilman A., McMillan Publishing Co., Inc., New York, 1970, pp. 98-134.
- 6) Charney D. S., Mihic S. J., Harris R. A., "Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed.," eds. by Hardman J. G., Limbird L. E., McMillan Publishing Co., Inc., New York, 2001, pp.399-427.
- 7) Ho I. K., Yamamoto I., Loh H. H., *Eur. J. Pharmacol.*, **30**, 164-171 (1975).
- 8) Ho I. K., Harris R. A., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **21**, 83-111 (1981).
- 9) Murata T., Yamamoto I., *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 133-137 (1970).
- 10) Murata T., Yamamoto I., *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 138-142 (1970).
- 11) Murata T., Yamamoto I., *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 143-146 (1970).
- 12) Kaku T., Kase Y., Nagai M., *Yakugaku Zasshi*, **74**, 122-128 (1954).
- 13) Tateoka Y., Kimura T., Yamazaki F., Watanabe K., Yamamoto I., *Yakugaku Zasshi*, **106**, 504-510 (1986).
- 14) Nadkarni M. V., Jones J. W., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **39**, 297-302 (1950).
- 15) Sandberg F., *Acta Physiol. Scand.*, **24**, 7-26 (1951).
- 16) Sandberg F., *Acta Physiol. Scand.*, **24**, 149-162 (1951).
- 17) Harvey S. C., "Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th Ed.," eds. by Goodman A. G., Goodman L. S., Gilman A., McMillan Publishing Co., Inc., New York, 1980, pp. 339-375.
- 18) Wenzel D. G., Keplinger M. L., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **44**, 56-59 (1955).
- 19) Wenzel D. G., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **44**, 550-553 (1955).
- 20) Brodie B. B., Mark L. C., Papper E. M., Lief P. A., Bernstein E., Rovenstine E. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **98**, 85-96 (1950).
- 21) Goldbaum L. R., Smith P. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **111**, 197-209 (1954).
- 22) Lee J., *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 993-996 (1938).
- 23) Yamamoto I., Tateoka Y., Watanabe K., Nabeshima T., Fontenot H. J., Ho I. K., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **50**, 209-219 (1985).
- 24) Tateoka Y., Yamamoto I., Watanabe K., Ho

- I.K., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **52**, 17–28 (1986).
- 25) Tateoka Y., Kimura T., Watanabe K., Yamamoto I., Ho I. K., *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **35**, 778–784 (1987).
- 26) Harvey S. C., “The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th Ed.,” eds. by Goodman L. S., Gilman A., McMillan Publishing Co., Inc., New York, 1975, pp. 102–123.
- 27) Andrews P. R., Jones G. P., Lodge D., *Eur. J. Pharmacol.*, **55**, 115–120 (1979).
- 28) Andrews P. R., Evans R. H., Johnston G. A. R., Willow M., *Experimentia*, **37**, 172–175 (1981).
- 29) Flint B. A., Ho I. K., *Prog. Neuropsychopharmacol.*, **4**, 233–239 (1980).
- 30) Yamamoto I., Tateoka Y., Kimura T., Yamazaki F., Hamajima K., Watanabe K., Ho I.K., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **54**, 191–199 (1986).
- 31) Weinswig M. H., Burkman A. M., Jones W. D., Rowe E. J., *J. Pharm. Sci.*, **56**, 909–911 (1967).
- 32) Shulman A., *Proc. Roy. Aust. Chem. Inst.*, **31**, 41–63 (1964).
- 33) Laycock G. M., Shulman A., *Nature*, **200**, 849–851 (1963).
- 34) Okano Y., Hitoshi T., Matsuda A., Naka M., Takahama K., Kase Y., Miyata T., “Endogenous Sleep Factors,” eds. by Inoue S., Krueger J.M., SPB Academic Publishing bv, Hague, 1990, pp.165–172.
- 35) Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin K., Lefoulon F., Fauchere J., Delagrangé P., Canet E., Boutin J., *J. Biol. Chem.*, **40**, 31311–31317 (2000).
- 36) Krooth R. S., Hsiao W. L., Lam G. F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **207**, 504–514 (1978).
- 37) Honda K., Komoda Y., Inoue S., *Rep. Inst. Med. Den. Eng.*, **18**, 93–95 (1984).
- 38) Yamamoto I., *Yakugaku Zasshi*, **106**, 537–561 (1986).
- 39) Haley T. J., McCormick W. G., *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 12–15 (1957).
- 40) Yamamoto I., Tateoka Y., Watanabe K., Ho I. K., *Life Sci.*, **40**, 1439–1442 (1987).
- 41) Tateoka Y., Kimura T., Watanabe K., Yamamoto I., Ho I.K., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **57**, 173–185 (1987).
- 42) Tateoka Y., Kimura T., Watanabe K., Yamamoto I., Hume A.S., Ho I. K., *Xenobiotica*, **19**, 1355–1368 (1989).
- 43) Takahisa F., Yazaki Y., “Manual of Therapeutic Agents,” *Igakushoin*, Tokyo, 2004, p. 1083.
- 44) Arblaster C. I., Laycock G. M., Shulman A., *Experimentia*, **30**, 1043–1044 (1974).
- 45) Aeschbacher H. U., Atkinson J., Domahidy B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **192**, 635–641 (1975).
- 46) Silberman A., Yu C.-T., Lam K.-W., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **5**, 871–874 (1973).
- 47) Cohn M.L., Cohn M., Taylor F.H., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **7**, 687–699 (1974).
- 48) Prange Jr. A. T., Breese G. R., Cott J. M., Martin B. R., Cooper B. R., Wilson I.C., Plotnikoff N. P., *Life Sci.*, **14**, 447–455 (1974).
- 49) Breese G. R., Cott J. M., Cooper B. R., Prange Jr. A. J., Lipton M. A., Plotnikoff N. P., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **193**, 11–22 (1975).
- 50) Narumi S., Nagai Y., Miyamoto M., Nagawa Y., *Life Sci.*, **32**, 1637–1645 (1983).
- 51) Maynert E. W., van Dyke H. B., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **98**, 184–187 (1950).
- 52) Komoda Y., Ishikawa M., Nagasaki H., Iriki M., Honda K., Inoue S., Higashi A., Uchizono K., *Biomed. Res.*, **4**, 223–228 (1983).
- 53) Honda K., Komoda Y., Nishida S., Nagasaki H., Higashi A., Uchizono K., Inoue S., *Neurosci. Res.*, **1**, 243–252 (1984).
- 54) Ueno R., Honda K., Inoue S., Hayaishi O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 1735–1737 (1983).
- 55) Simon P., Chermat R., Doare L., Bourin M., Farinotti R., *J. Pharmacol.*, **13**, 241–252 (1982).
- 56) Menez J.-F., Bourin M., Colombel M.-C., Benamou C., Larousse C., Bardou L., *Eur. J. Med. Chem.*, **18**, 521–529 (1983).
- 57) Bourin M., Menez J.-F., Colombel M.-C., Larousse C., *Arzneim.-Forsch.*, **37**, 506–509 (1987).
- 58) Yamamoto I., Watanabe K., Matsunaga T., Kimura T., Funahashi T., Yoshimura H., *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **22**, 577–589 (2003).

- 59) Kalyanpur S. G., Naik S. R., Sheth U. K., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **173**, 1–10 (1968).
- 60) Jori A., Bianchetti A., Prestini P.E., *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2687–2694 (1970).
- 61) Shah H. C., Lal H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **179**, 404–409 (1971).
- 62) Peters M. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **181**, 417–424 (1972).
- 63) Marzi E., Gambazza K., Piccinelli G., Garattini S., Bartosek I., *J. Pharm. Pharmacol.*, **33**, 677–679 (1981).
- 64) Sasaki K., Furusawa S., Takayanagi G., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 394–401 (1981).
- 65) Bhargava H. N., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **28**, 267–284 (1980).
- 66) Giarman N. J., Bowers Jr. G. N., Quie P. G., Hampton L. J., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **97**, 473–482 (1954).
- 67) Chang Y.-F., Hernandez M. F., Myslinski N. R., *Life Sci.*, **28**, 407–413 (1981).
- 68) Hafely W., “Biochemistry and Pharmacology,” eds. by Biggio G., Costa E., Raven Press, New York, 1983, pp. 73–93.
- 69) Yamamoto I., Ho I. K., Loh H. H., *Life Sci.*, **20**, 1353–1362 (1977).
- 70) Brodie B. B., Burns J. J., Mark L. C., Lief P. A., Bernstein E., Papper E. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **109**, 26–34 (1953).
- 71) Kuntzman R., Ikeda M., Jacobson M., Conney A. H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **157**, 220–226 (1967).
- 72) Valerino D. M., Vasell E. S., Aurori K. C., Johnson A. O., *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 448–457 (1974).
- 73) Abbritti G., De Matteis F., *Chem.-Biol. Interact.*, **4**, 281–286 (1972).
- 74) Levin W., Sernatinger E., Jacobson M., Kuntzman R., *Science*, **176**, 1341–1343 (1972).
- 75) Levin W., Jacobson M., Sernatinger E., Kuntzman R., *Drug Metab. Dispos.*, **1**, 275–285 (1973).
- 76) Dixon R. L., Fouts J. R., *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 715–720 (1962).
- 77) Tatsumi K., Yamato C., Arima N., Tsukamoto H., *Yakugaku Zasshi*, **88**, 925–929 (1968).
- 78) Yamamoto I., Ho I. K., Loh H. H., *Life Sci.*, **22**, 1103–1112 (1978).
- 79) Irrgang K., *Arzneim.-Forsh.*, **15**, 688–691 (1965).
- 80) Harvey D. J., Glazener L., Johnson D. B., Butler C. M., Horning M. G., *Drug Metab. Dispos.*, **5**, 527–546 (1977).
- 81) Vore M., Bush M. T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **212**, 103–108 (1980).
- 82) Gilbert J. N., Hetherington W. L., Powell J. W., Whalley W. B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **27**, 343–347 (1975).
- 83) Vermeulen N. P., Bakker B. H., Schultink J., van der Gen A., Breimer D. D., *Xenobiotica*, **9**, 289–299 (1979).
- 84) Yamamoto I., *Yakugaku Zasshi*, **106**, 537–561 (1986).
- 85) Yamamoto I., Watanabe K., Matsunaga T., Kimura T., Funahashi T., Yoshimura H., *J. Toxicol. Toxin. Rev.*, **22**, 577–589 (2003).
- 86) Hansch C., Anderson S. M., *J. Med. Chem.*, **10**, 745–753 (1967).
- 87) Miller K. W., Yu S. -C., *Br. J. Pharmacol.*, **61**, 57–63 (1977).
- 88) Tateoka Y., Kimura T., Watanabe K., Yamamoto I., Ho I.K., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **35**, 4928–4934 (1987).
- 89) Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A., *Nature*, **217**, 69–72 (1968).
- 90) Kim S. H., Rich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 402–408 (1968).
- 91) Fontenot H. J., Wilson R. D., Nabeshima T., Yamamoto I., Loh H. H., Ho I. K., *Res. Commun. Subst. Abuse*, **4**, 164–176 (1983).