

ラット肝 tryptophan oxygenase に及ぼす lithium chloride の影響

石黒 茂・宮尾 陟

(家畜薬理学研究室)

昭和54年8月1日 受理

Effects of Lithium Chloride on the Activity of Rat Liver Tryptophan Oxygenase

Shigeru ISHIGURO and Noboru MIYAO

(Laboratory of Veterinary Pharmacology)

諸 論

肝 tryptophan oxygenase (TO) が誘導活性化されると tryptophan (Try) より kynurenine への主要代謝経路が盛んとなり、脳 5-hydroxytryptamine の生成が減少することが Curzon and Bridges³⁾, Curzon and Green^{4,6,7)} により示唆されている。脳機能に影響をもつ薬物と肝 TO 活性との関連として、宮尾ら¹²⁾はラットへ major tranquilizer および minor tranquilizer 投与による肝 TO の誘導を観察し、肝 TO の誘導はこれらの tranquilizer の作用の強さと関連し、誘導機構は下垂体-副腎系を介することを示唆した。

lithium (Li) 塩は躁うつ病の躁期の治療および予防に効果があり、またうつ期にも有効とされ、特長ある二相性の薬効を示す薬物である。他の向精神作用薬とは異なり単純なアルカリ無機塩類ではあるが、その向精神作用機序についてはまだ必ずしも一致した見解は得られていない。今回は lithium chloride (LiCl) をラット腹腔内へ投与して肝 TO に及ぼす影響について観察し、2, 3 の知見を得たので報告する。

材 料 と 方 法

1. 実験動物

Wister 系雄性ラット、8~9 週齢、体重 200~280 g を使用した。飼料は固型飼料（日本クレア、CE-2）、飲料水は水道水を用いそれぞれ自由に給与した。飼育はエコンケージ（日本クレア）に 4 または 5 匹を収容し、23±1°C の室内温度で実施した。

副腎摘出はラットを pentobarbital 麻酔後、常法通り同時に両側の副腎を摘出し、後処置に penicillin

本論文の要旨は、第 87 回日本獣医学会において発表した。

を投与して、固型飼料および生理食塩水を給与した。術後 4, 5 日のものを実験に供した。

2. TO 活性の測定

Knox and Mehler¹⁰⁾ に準じて 0.14 M KCl (含 2.5 mM NaOH) による肝 homogenate について測定した。hematin を添加した総酵素活性と、hematin を添加しないホロ酵素活性の両者を実施した。酵素活性は kynurenine (KN) 生成 μM/肝湿重量 g/h で表わした。添加した hematin は和光純薬製で M/10 NaOH 0.1 ml に溶解後蒸留水を加えて終濃度 2 μM として用いた。KN の量は日立101型および200型分光光度計を用いて、波長 365 nm で水を対照として測定した。

in vitro における LiCl の影響については Frieden ら⁵⁾ に準じて 1.0 g/kg の L-Try をラット腹腔内へ投与して、6 時間後に基質誘導された肝 TO について調べた。

3. 血漿 corticosterone の測定

Zenker and Bernstein²¹⁾ の方法によったが脱脂質には石油エーテルのかわりに isoctane (同仁薬化研究所) を用いた。

4. 副腎 ascorbic acid の測定

Maickel¹¹⁾ の方法に従ったが、除タンパクに際し trichloroacetic acid のかわりに metaphosphoric acid を使用した。

5. 薬物と投与法

LiCl (半井化学、特級) を 500 mM の濃度に蒸留水に溶解し (pH 6.4), 5.0 mEq/kg をラット腹腔内へ投与した。

結 果

1. 肝 TO 活性に及ぼす LiCl 投与の影響

LiCl 一回投与後の肝 TO 活性値の経時的変動を

Fig. 1 に示した。LiCl 投与 2 時間後までは 0 時間より低下し、総酵素活性、ホロ酵素活性は投与 1 時間後には 22%, 31%，投与 2 時間後には 20%, 17% の減少を示した。投与 5 時間後には両酵素活性とも 0 時間より増加し、0 時間の 213%, 178% の活性を示し、投与 7 時間後には総酵素活性、ホロ酵素活性とともに最高の活性値を示して 0 時間の約 230%, 183% であった。それ以後は減少傾向を示し、投与 14 時間後には 0 時間の活性よりやや低い値を示した。

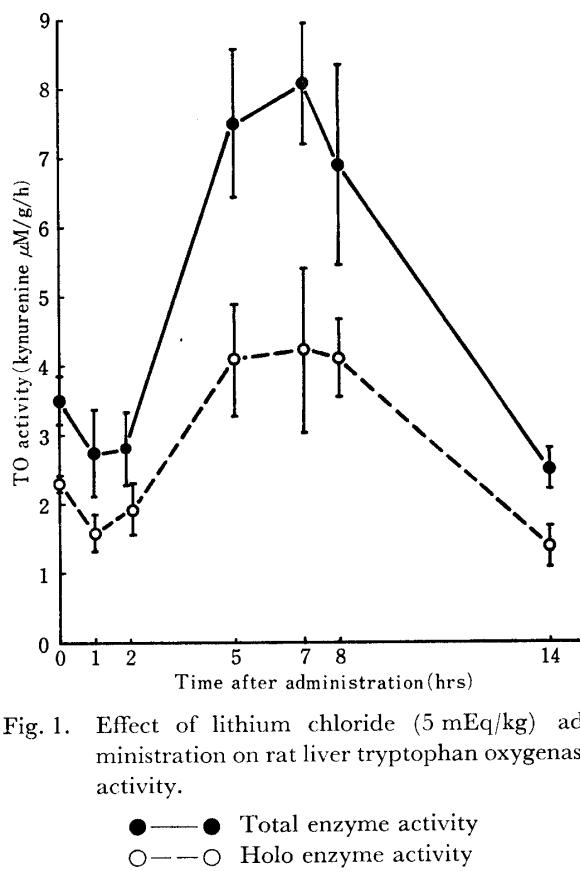


Fig. 1. Effect of lithium chloride (5 mEq/kg) administration on rat liver tryptophan oxygenase activity.

●—● Total enzyme activity
○—○ Holo enzyme activity

Table 1. The effect of lithium chloride 5 mEq/kg on liver tryptophan oxygenase activity in rats

Time after administration (hrs)	Total enzyme activity	Holo enzyme activity (kynurenine μM/g/h)	Apo enzyme	Holo/Apo ratio
0 (9)* ¹	3.53 ± 0.37* ²	2.31 ± 0.13* ²	1.22	1.89
1 (6)	2.75 ± 0.65* ³	1.58 ± 0.28* ³	1.17	1.35
2 (6)	2.82 ± 0.56* ³	1.92 ± 0.40* ³	0.90	2.13
5 (6)	7.51 ± 1.12*	4.11 ± 0.83*	3.40	1.21
7 (8)	8.08 ± 0.91*	4.23 ± 1.20*	3.85	1.10
8 (6)	6.88 ± 1.47*	4.10 ± 0.57*	2.78	1.47
14 (7)	2.50 ± 0.33*	1.37 ± 0.33*	1.12	1.21

*¹: Number of animals.

*²: Mean ± standard deviation.

*³: Significantly different from 0 time ($P < 0.01$).

一方アポ酵素は Table 1 に示すように投与 2 時間後に最低を示し、以後増加して投与 7 時間後に最高値を示した。

ホロ酵素とアポ酵素の比率は投与 2 時間後が最大の値を示し、投与 2 時間までに相当量のアポ酵素がホロ酵素化することを示している。

2. in vitro での肝 TO 活性に及ぼす LiCl の影響

LiCl 投与 2 時間まで肝 TO 活性が 0 時間より減少したことについては、Badawy and Smith¹⁾ が salicylate 投与例で観察した salicylate の直接作用による肝 TO 抑制と同じような LiCl による直接作用ではないかと考え、まず L-Try 1.0 g/kg を腹腔内へ投与して肝 TO を基質誘導し、投与 6 時間後の homogenate に LiCl を in vitro で終濃度 0, 0.5, 1.0, 1.25 mM となるように添加した後、直ちにホロ酵素活性を測定した。L-Try 投与によりホロ酵素活性は誘導され (Table 2)，正常ラットの約 8 倍 (18.36 ± 1.36 KN $\mu\text{M}/\text{g}/\text{h}$) の活性増加を示しているが、LiCl の添加はいずれもホロ酵素活性を阻害し、0.5 mM では 13.66 ± 0.61 , 1.0 mM では 8.01 ± 0.68 , 1.25 mM では 3.77 ± 0.87 KN $\mu\text{M}/\text{g}/\text{h}$ の活性値を示して、L-Try により誘導された肝 TO を抑制した。

3. 副腎摘出ラットの TO 活性に及ぼす LiCl の影響

副腎摘出ラットの総酵素活性、ホロ酵素活性は正常ラットより 14%, 34% の減少を示し、LiCl 投与による TO の誘導も Table 3 に示すように著しく低く抑えられた (Table 1, 3)。それでも投与 5, 7 時間後にはホロ酵素活性は Fig. 2 に示すように約 30% の増加を示した。

4. LiCl 投与による血漿 corticosterone の動向

Fig. 3 に LiCl 投与後の血漿 corticosterone (CS) 濃

Table 2. The effect of lithium chloride in vitro on the activity of tryptophan oxygenase in rat liver homogenates^{*1}

Lithium chloride (mM)	Enzyme activity (kynurenine $\mu\text{M}/\text{g/h}$)	Percent inhibition
0	18.36 \pm 1.63 ^{*2}	0
0.5	13.66 \pm 0.61 ^{*3}	22.5
1.0	8.01 \pm 0.68 ^{*3}	56.4
1.25	3.77 \pm 0.87 ^{*3}	79.5

*¹: Tryptophan oxygenase was induced 6 hrs earlier by a single injection of 1.0 g/kg L-tryptophan.

*²: Mean \pm standard deviation of seven animals.

*³: Significantly different from 0 mM ($P < 0.001$)

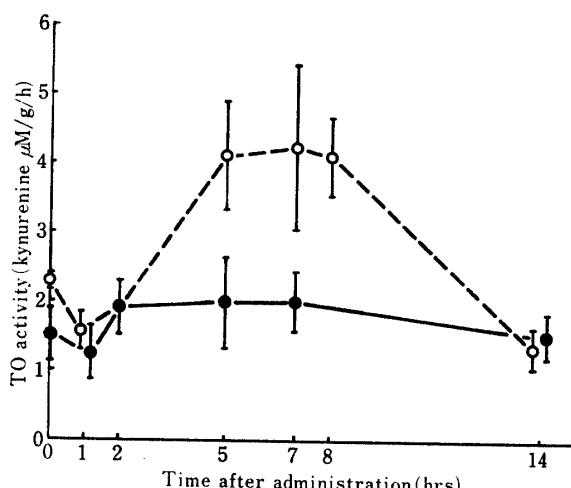


Fig. 2. Effect of lithium chloride (5 mEq/kg) administration on holo tryptophan oxygenase activity in the livers of normal and adrenalectomized rats.

○—○ Normal
●—● Adrenalectomized

Table 3. The effect of lithium chloride 5 mEq/kg on liver tryptophan oxygenase activity in adrenalectomized rats

Time after administration (hrs)	Total enzyme activity (kynurenine $\mu\text{M}/\text{g/h}$)	Holo enzyme activity (kynurenine $\mu\text{M}/\text{g/h}$)	Apo enzyme	Holo/Apo ratio
0 (9)* ¹	3.03 \pm 0.33 ^{*2}	1.53 \pm 0.41 ^{*2}	1.50	1.02
1 (7)	2.21 \pm 0.60 ^{*3}	1.26 \pm 0.41	0.95	1.33
2 (6)	3.14 \pm 0.37	1.92 \pm 0.40 ^{*4}	1.22	1.57
5 (9)	3.25 \pm 1.12	2.00 \pm 0.67	1.25	1.60
7 (6)	2.93 \pm 0.54	2.00 \pm 0.45 ^{*4}	0.93	2.15
14 (5)	3.10 \pm 0.83	1.53 \pm 0.33	1.57	0.97

*¹: Number of animals.

*²: Mean \pm standard deviation.

*³: Significantly different from 0 time ($P < 0.001$).

*⁴: Significantly different from 0 time ($P < 0.05$).

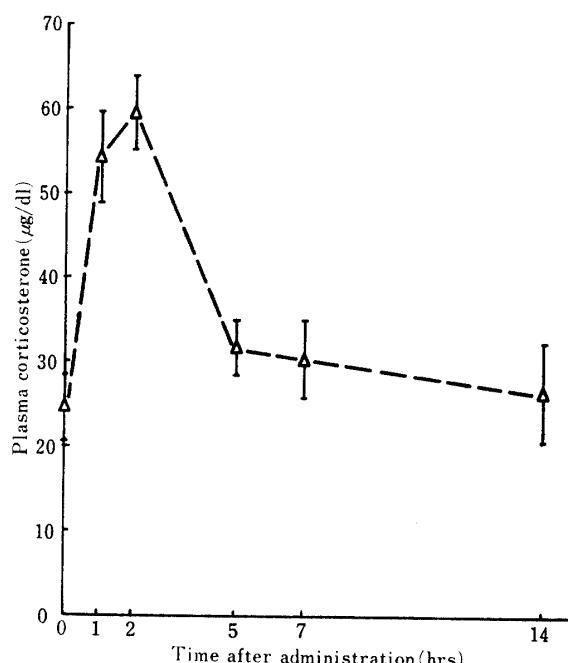


Fig. 3. Effect of lithium chloride (5 mEq/kg) administration on the plasma corticosterone level.

度の経時的動向を示した。LiCl 投与直後より急激に増加して投与 1 時間後には 0 時間の 220%， 2 時間後には 240% を示して最高濃度となり、以後減少して投与 5 時間後には約 130% の値にまで回復し、投与 14 時間後にはほぼ正常値にまで回復した。

5. LiCl 投与による副腎 ascorbic acid の動向

Fig. 4 に示すように LiCl 投与による副腎 ascorbic acid (AA) は急激な減少を示している。投与 1 時間後には 0 時間の 46%， 2 時間後には 42% まで減少して最低の濃度を示して、以後次第に回復に向い投与 14 時間後には 0 時間の 75% まで回復した。

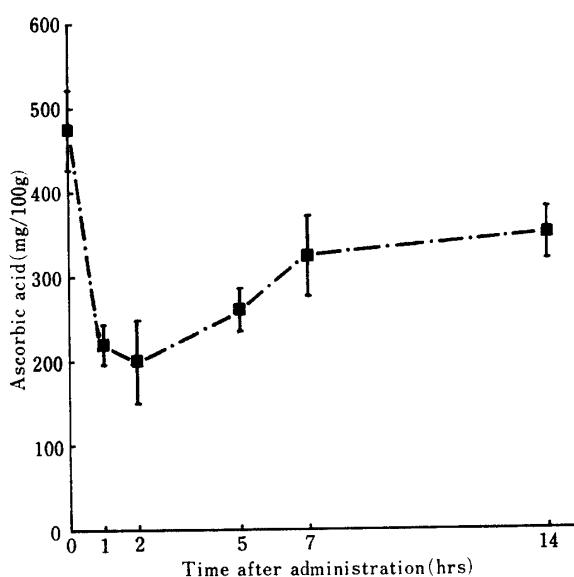


Fig. 4. Effect of lithium chloride (5 mEq/kg) administration on the adrenal ascorbic acid level.

考 察

Li は薬理学の成書によるとラットに 7.5 mEq/kgまでの投与は何らの影響を与えないといわれている。一方小澤ら¹⁴⁾は Li 2.7 mEq/kg の経口投与、野津・古川¹⁵⁾は 2.4 mEq/kg の腹腔内投与でラットの行動が抑制され、反復投与することによりさらに抑制を受けることを報告している。試みに 7.5 mEq/kg をラット腹腔内へ投与し 4 時間後に肝 TO 活性を測定したところ、総酵素活性、ホロ酵素活性はそれぞれ 5.30 ± 0.83 , 4.44 ± 1.14 KN $\mu\text{M}/\text{g}/\text{h}$ (4 匹) と明らかな活性の増加を示し、LiCl 投与による肝 TO 活性の誘導が認められた。しかしながら LiCl を投与した部位の腹腔内の腸管壁、腸間膜および皮下に出血が認められた。したがって投与量は 7.5 mEq/kg, 2.4 mEq/kg のほぼ中間量の 5.0 mEq/kg としたが、この濃度では投与直後より腹部の疼痛症状を示して、腹部を約 30 秒程伸展し、やがて行動は抑制されて静かになり、また口渴による水摂取量の増大等が一般症状として観察された。

LiCl 5.0 mEq/kg の腹腔内投与後の肝 TO 活性の変動は二相性の反応を示し、投与直後 2 時間までは 0 時間より総酵素活性、ホロ酵素活性とも低く、その後増加した (Fig. 1, Table 1)。投与直後の肝 TO 活性の減少は、Table 2 に示した結果からみて、Badawy and Smith¹¹ が salicylate 投与例で観察した結果と同様な、LiCl の肝 TO に対する直接作用による抑制と考えられる。また LiCl 投与により肝 TO 活性が投与

1 時間で最も大きく抑制され、2 時間ではやや回復した事 (Table 1) は、LiCO₃ (2.7 mEq/kg) を経口投与後、肝での Li の分布を測定し、投与 1 時間後に肝の Li は最高濃度を示し、その後は減少するという小澤ら¹⁴⁾の観察からもうなづけるところである。

LiCl 5.0 mEq/kg の投与による肝 TO 活性の動向は、LiCl の直接作用による抑制の後は、誘導活性化されて総酵素活性、ホロ酵素活性は、投与 5 時間後にはそれぞれ 2.1 倍、1.78 倍となり、投与 7 時間後には 2.3 倍、1.8 倍の最高活性を示して、投与 8 時間後にはやや減少して 1.9 倍、1.78 倍となり、その後は減少をつづける。これを宮尾ら¹²⁾の major tranquilizer の chlorpromazine (50 mg/kg i. p.), haloperidol (10 mg/kg i. p.) および minor tranquilizer の meprobamate (200 mg/kg p. o.), diazepam (10 mg/kg i. p.) hydroxyzine (60 mg/kg i. p.) の投与結果と比較してみると、LiCl 投与による肝 TO の活性増加は major tranquilizer による活性増加よりも少なく、minor tranquilizer による活性増加よりも大きく、ほぼ両者の中間程度の誘導能を示している。

LiCl による肝 TO 活性の増加が、他の tranquilizer と同様な副腎皮質ステロイド分泌によるストレス性のものであるかどうかを確認するために副腎摘出ラットに LiCl を投与する実験を行なった。

副腎摘出によりラット肝 TO は正常ラットに比べて低下し、総酵素活性、ホロ酵素活性は正常ラットの 86%, 66% の活性を示し (Table 1, 3 の 0 時間), 宮尾ら¹²⁾の報告と比較すると総酵素活性の減少率は小さく、ホロ酵素活性の減少率は大きくなっている。その後の LiCl 投与の結果は、正常ラットの場合に比べて著しく低く抑えられたが (Table 1, 3 の 1~7 時間)，なおある程度の活性増加が投与 5, 7 時間後に認められた (Fig. 2)。このわずかな活性増加はストレスによる下垂体-副腎系以外の反応系によるものと考えられる。その他の反応系としては宮尾ら¹²⁾が前述したように insulin による活性誘導¹⁹⁾, salicylate¹¹, isocarboxazid^{17, 18)} でみられる Try 遊離による基質誘導、免疫抑制剤等による酵素タンパクの分解阻害¹⁶⁾、プリン誘導体による不活性なホロ酵素の活性化^{2, 9)}、その他 Shimazu²⁰⁾ のいう視床下部-自律神経系による代謝制御等が考えられる。しかしながら Try の遊離については Poitou ら¹⁵⁾ Iwata ら⁸⁾ は Li 塩の連続または一回投与で認めておらず、LiCl 投与後の Try 遊離による基質誘導は否定し得ると思われるが、これらの点については今後追究の予定である。

副腎摘出によりラット肝 TO 活性はやや低下し、LiCl 投与による肝 TO 活性増加も大きく抑制されたことは、LiCl 投与による肝 TO の誘導はその大部分は副腎を介することが示唆される。さらに tranquilizer の場合¹²⁾と同様、下垂体参画の有無を検討した。LiCl 5.0 mEq/kg の投与により血漿 CS 濃度は大きく増加し、投与 2 時間後には 0 時間の 2.4 倍の最大濃度となり、投与 14 時間後には 0 時間の値近くまでもどった (Fig. 3)。この結果は前回¹²⁾の chlorpromazine (CPZ) 投与後の血漿 CS 濃度の増加に比べて大きく、念のために新たなラットに CPZ の投与を試みたが、やはり前回と同程度の増加であり、LiCl による血漿 CS の増加は TO 活性増加のより大きい CPZ の場合と比べて非常に大きいことは興味のあるところである。

LiCl 投与後の副腎 AA の動向は、やはり CPZ の場合¹²⁾と同様である (Fig. 4) が、その減少は CPZ の場合より小さかった。血漿 CS と副腎 AA の動向における LiCl と CPZ の場合のこの矛盾については現時点では不明であるが、前回¹²⁾考察したような両者の解離が関係するかもしれない。

LiCl 投与後の肝 TO 活性、血漿 CS 濃度、副腎 AA 濃度の動向をまとめて%変化で示すと Fig. 5 のとおりであり、投与 2 時間で血漿 CS 濃度の最大の増加と副腎 AA 濃度の最大の減少が認められ、LiCl の場合

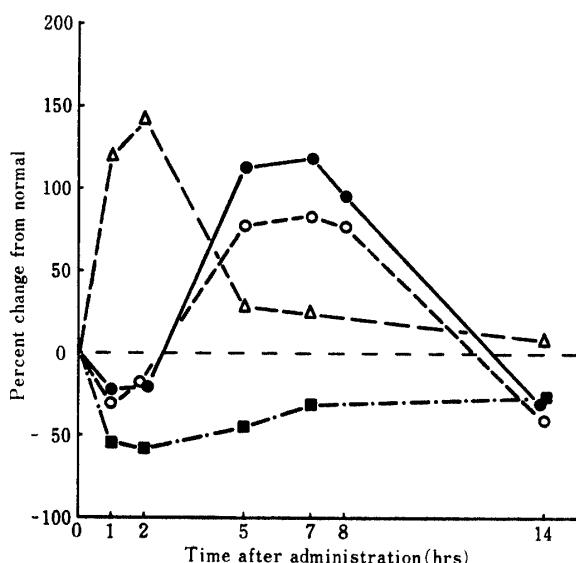


Fig. 5. Pituitary-adrenal responses of rats to lithium chloride (5 mEq/kg).

- Total tryptophan oxygenase activity
- Holo tryptophan oxygenase activity
- △—△ Plasma corticosterone level
- Adrenal ascorbic acid level

もこの前後に最も活発な肝 TO の合成を示すものと思われる。いずれにしろ LiCl 投与による肝 TO 活性の増加も、tranquillizer におけると同様、その大部分が下垂体-副腎系の反応により調節され、一部が未知の機構によるものと考えられる。

しかし下垂体-副腎系の活性化、肝 TO 活性の増大、組織 Try の減少が、LiCl の脳に対する作用に如何に結びつくかはなお今後の問題であろう。

要 約

LiCl のラット肝 TO に及ぼす影響を観察し、次のような結果が得られた。

1. in vitro で LiCl は L-Try 1.0 g/kg で誘導された肝 TO 活性を抑制した。LiCl 1.0 mM の濃度は肝 TO 活性を約 56% 抑制した。
 2. LiCl 5.0 mEq/kg の腹腔内投与により、肝 TO 活性は二相性の変化を示した。投与 1, 2 時間後の活性は低く、その後増加して投与 7 時間後に最高活性を示した。投与直後の活性の低下は LiCl の直接作用と思われる。
 3. LiCl 投与によりアポ酵素のホロ酵素化が強められた。
 4. 副腎摘出ラットの肝 TO 活性は正常ラットの活性に比べて低く、LiCl 投与後の肝 TO 活性の増加も著しく抑制された。それでもホロ酵素活性で、投与 5, 7 時間後に約 30% の増加が認められた。
 5. LiCl 投与により血漿 CS 濃度は急激に増加し、投与 2 時間後に最高濃度を示し、以後急速に正常値にもどった。
 6. LiCl 投与後の副腎 AA は投与 2 時間後に最低濃度を示し、以後次第に回復に向うがその回復はおそらく、投与 14 時間後でも 25% の減少を示していた。
- 以上の結果から LiCl は、直接作用により肝 TO 活性を抑制し、LiCl 投与後の肝 TO の誘導は、その大部分は下垂体-副腎系を介し、一部未知の機構によることが示唆される。

文 献

- 1) Badawy, A. A.-B. and Smith, M. J. H.: The effects of salicylate on the activity of rat liver tryptophan pyrolase in vitro and in vivo. *Biochem. J.*, **123**, 171-174 (1971)
- 2) Chyttil, F.: Activation of liver tryptophan oxygenase by adenosine 3', 5'-phosphate and by other purine derivatives. *J. Biol. Chem.*, **243**, 839-899 (1968)
- 3) Curzon, G. and Bridges, P. K.: Tryptophan me-

- tabolism in depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **33**, 698-704 (1970)
- 4) Curzon, G. and Green, A. R.: Effects of immobilization on rat liver tryptophan pyrrolase and brain 5-hydroxytryptamine metabolism. *Brit. J. Pharmac.*, **37**, 689-697 (1969)
 - 5) Frieden, E., Westmark, G. W. and Schor, J. M.: Inhibition of tryptophan pyrrolase by serotonin, epinephrine and tryptophan analogs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 176-182 (1961)
 - 6) Green, A. R. and Curzon, G.: Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol. *Nature*, **220**, 1095-1097 (1968)
 - 7) Green, A. R. and Curzon, G.: The effect of tryptophan metabolites on brain 5-hydroxytryptamine metabolism. *Biochem. Pharmac.*, **19**, 2061-2068 (1970)
 - 8) Iwata, H., Okamoto, H. and Kuramoto, I.: Effect of lithium on serum tryptophan and brain serotonin in rats. *Jap. J. Pharmacol.*, **24**, 235-240 (1974)
 - 9) Julian, T. A. and Chytel, F.: A two-step mechanism for regulation of tryptophan pyrrolase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **35**, 734-740 (1969)
 - 10) Knox, W. E. and Mehler, A. H.: The conversion of tryptophan to kynurene in liver. I. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurene. *J. Biol. Chem.*, **187**, 419-430 (1950)
 - 11) Maickel, R. P.: A rapid procedure for the determination of adrenal ascorbic acid. Application of Sullivan and Clarke method to tissues. *Anal. Biochem.*, **1**, 498-501 (1960)
 - 12) 宮尾 隆・山崎修一・石黒 茂: ラット肝 tryptophan oxygenase に及ぼす諸種 tranquilizer の影響. 鹿大農学術報告, **No. 29**, 171-181 (1979)
 - 13) 野津隆司・吉川達雄: ラット脳における norepinephrine と dopamine 代謝に対する lithium 塩の作用. 日薬理誌, **72**, 619-625 (1976)
 - 14) 小澤 光・野津隆司・相原弘和・秋山二三雄・笹島道忠: Lithium 塩の 1 回投与および反復投与時の動態と行動薬理学的研究. 日薬理誌, **72**, 433-443 (1976)
 - 15) Poitou, P., Guerinot, F. and Bohuon, C.: Effect of lithium on central metabolism of 5-hydroxytryptamine. *Psychopharmacologia*, **38**, 75-80 (1973)
 - 16) Reinicke, C., Guttmacher, H. and Ulbricht, W.: Influence of nonsteroid anti-inflammatory and immunosuppressive drugs on hepatic tryptophan pyrrolase activity in rats. *Biochem. Pharmac.*, **22**, 195-203 (1973)
 - 17) Samsonva, M. L. and Lapin, I. P.: Antidepressants and liver tryptophan pyrrolase activity. *Biochem. Pharmac.*, **22**, 1499-1507 (1973)
 - 18) Satoh, J.: Activation of liver tryptophan pyrrolase of rat by isocarboxazid in vivo. *Enzyme*, **12**, 124-128 (1971)
 - 19) Schor, J. M. and Frieden, E.: Induction of tryptophan peroxidase of rat liver by insulin and alloxan. *J. Biol. Chem.*, **233**, 612-618 (1958)
 - 20) Shimazu, T.: Role of the hypothalamus in the induction of tryptophan pyrrolase activity in rabbit liver. *J. Biochem.*, **55**, 163-171 (1964)
 - 21) Zenker, N. and Bernstein, D. E.: The estimation of small amount of corticosterone in rat plasma. *J. Biol. Chem.*, **231**, 695-701 (1958)

Summary

The effect of lithium chloride (LiCl) on liver tryptophan oxygenase was investigated in rats. The results are summarized as follows.

1. LiCl, in concentration of 1.0 mM, inhibited by the ratio of 56 percent the activity of tryptophan oxygenase in livers from rats pre-treated with 1.0 g/kg of L-tryptophan.

2. The intraperitoneal injection of LiCl (5.0 mEq/kg) caused a biphasic response in the activity of liver tryptophan oxygenase. The activity of the enzyme was left decreased 1 or 2 hours after the injection, however, thereafter it began to be increasing, reaching its peak 7 hours after the injection. The initial decrease may be due to the direct action of the drug on the enzyme.

3. The conversion of apoenzyme into holoenzyme was accelerated by the injection of LiCl.

4. The holoenzyme activity was noted to be deteriorated by 34 percent in the adrenalectomized rats in comparison with intact animals. The rise in activity after the LiCl injection was markedly depressed in adrenalectomized rats, but an increase of about 30 percent was still found in the holoenzyme-activity, 5 or 7 hours after the injection.

5. The plasma corticosterone level reached its peak 2 hours after the injection of LiCl. It returned to normal value 14 hours later.

6. The adrenal ascorbic acid level reached its minimum 2 hours after the LiCl injection, thereafter it gradually returned to normal, but its returning pace was slow, showing a 25 percent reduction from normal value even 14 hours later.

From these results, it was suggested that LiCl inhibited the activity of liver tryptophan oxygenase by its direct

action, and the induction was supposed to have been modulated chiefly by a pituitary-adrenal system and partly by some unknown mechanism.