Serotonin の酵素抑制化合物に関する研究 (第 II 報)

尾 崎 正 若

(熊本大学医学部第二薬理教室 [主任 瀬辺恵鎧教授])

(昭和34年9月11日受付〔特〕)

緒 言

著者はさきに第 I 報に於て Serotonin (SE) の分解酵素である monoamineoxidase (MAO) と 5-hydroxytryptophan (5HTP) から SE を生成する 酵素 decarboxylase (DCX) との両酵素の inhibitor の screening を行い報告した。この第 I 報では MAO に就いてはラットの肝 homogenate, DCX に就いてはモルモットの腎 homogenate を用いたが Twarog¹⁾, Bogdanski²⁾等の報文にもある様に MAO は脳灰白質, hypothalamus にも存在し Brodie, Shore³⁻⁵⁾の報告では家兎に Iproniazide を投与すれば脳内の SE や norepinephrine (NE) の増量が起こると云う。吉原⁶⁾は中枢及び自律神経系に作用する薬物の SE, histamin 遊離につき興味ある実験を行っている。これらによっても MAO は中枢神経の作用や NE の代謝にも関与している事が推定出来る。一方 Ersparmer⁷⁾は SE を一種の腎 hormon と仮定したが、其の後 SE の抗利尿性、腎血流や chlorine の再吸収能に及ぼす影響についても検索が進められている。この様な観点からも諸種代謝の主役を演ずる肝臓と共に、脳及び腎臓は SE の作用と密接な関連があると思われる。そこで著者は一般実験動物の三臓器の MAO の活性の比較を行って見た。DCX に就いての各動物臓器の比較に就いては West⁸⁾の報告がある。

次に第 I 報では専ら *in vitro* の screening の成績を報じたが、今回は *in vivo* の実験を進めた。即ち、*in vitro* で比較的強力な作用を示した数種の inhibitor を選び、1) ラット又はモルモットに注射した後一定時間後に肝又は腎を剔出して MAO 又は DCX の被抑制度を *in vitro* の場合に準じて測定した。2) MAO の inhibitor をラットに注射した後脳内の SE を定量してその増量により被検物質の *in vivo* の作用を確かめた。又さらにこの実験に 5-HTP の注射も加えて脳内 SE の増量を顕著ならしめた。3) マウスの全身の 5-hydroxyindole acetic acid (5HIAA) の定量を行い MAO inhibitor の投与後には、確かに SE から 5HIAA に到る経路が阻害されている事を認めた。

実験方法及び成績

I. 実験動物臓器の MAO 活性の比較

実験方法：使用した動物は、マウス、ハムスター、ラット、モルモット、麩（肝のみ）、家兎、猫、犬の 8 種類で剔出した脳、肝、腎は夫々 2 倍量の冷蒸溜水を加えて homogenate を作り Dubnoff Incubator を用いて 37°C で振盪し乍ら incubate しその前後に於ける SE の消費量によつて MAO の活性の比較を行った。各 homogenate は pH7.4 磷酸緩衝液 0.5cc と 1000 γ (0.5cc) SE 水溶液に Marsilid, Phenylisopropylhydrazine (PIH) の水溶液と H₂O を加えて全量 3.5cc とし incubation 前後の SE の定量法は *in vitro* の場合と全く同様にした。MAO の活性は動物と臓器の種類によって非常に差違があったので肝ではラット、モルモット以外は 1cc の homogenate を用いて 40 分間 incubate し、脳、腎は 1.5cc の homogenate を用いて 60 分間 incubate した。

実験成績

a) 脳：ラットの脳が最も強い活性を示し、その示した SE の消費量を 100 として他の動物のそれとを比較し inhibitor による抑制度は screening の場合と同様に、% で表わした (第 1 表)。その結果活性の弱い脳が必ずしも inhibitor によって抑制される訳でもなくハムスター等は, inhibitor に対しても感受性が弱い事が判明し, MAO の活性が弱ければ inhibitor に対しても鈍感であった。

第 1 表. 脳.

	活性度 比 較	Marsilid 10 ⁻⁴ M	PIH 10 ⁻⁶ M	PIH 10 ⁻⁶ M
ラット	100	72	100	80
モルモット	66	95	50	23
ハムスター	96	50	45	20
マウス	98	100	100	47
家兎	66	78	50	21
猫	43	100	100	53
犬	83	76	82	38

第 2 表. 肝臓.

	活性度 比 較	Marsilid 10 ⁻⁴ ×2M	PIH 10 ⁻⁶ M
ラット	96~100	42	76
モルモット	92~96	40	94
ハムスター	40	32	62
マウス	22	100	50
家兎	18	41	43
猫	26	100	37
犬	30	60	5
藁	41	25	95

b) 肝臓 (第 2 表)：ラット、モルモットは殆ど同様の活性を示し、他の動物は 2 倍量の homogenate を用いないと SE の消費量が同等程度とならなかった所から上記 2 動物の活性を 100 とし他の動物の肝が等量の SE を消費した場合を 50 として比較した。inhibitor を用いた中では犬の肝が PIH に対し、又藁肝が Marsilid に対し夫々感受性が弱い事が判明した。

c) 腎臓 (第 3 表)：モルモットが最も強く、肝に比してラットの腎は弱く、犬の腎は比較的強い活性を示した。ハムスター、家兎、ラット、猫等は inhibitor に感受性を示さなかった。

第 3 表. 腎臓.

	活性度 比 較	Marsilid 10 ⁻⁴ M	PIH 10 ⁻⁶ M
ラット	35	0	50
モルモット	94	54	0
ハムスター	45	0	0
マウス	44	30	30
家兎	62	0	23
猫	30	83	0
犬	54	5	64

II. MAO inhibitor の実験 (第 4 表)

1. ラットによる実験：体重 200~250g の雄性ラットに被検物質の水溶液を腹腔内注射し一定時間後に肝臓を剔出し直ちに 2 倍量の氷冷 H₂O を加えて homogenate を作り, *in vitro* の実験と同様 pH 7.4 の磷酸緩衝液 0.5 cc, SE 水溶液 1000 γ (0.5cc), H₂O 1.5cc, homogenate 1 cc を混和して 40 分間 incubate しこの間の SE の消費量を比色定量して被抑制度を % で求めた。その結果 Marsilid, Nialamide, PIH, PCP 等は少くとも 5 h 後迄全く抑制され、14 h 後にも未だ殆んど抑制度の減弱を認めなかった。之に反し Harmine MC-2507 の二化合物は *in vitro* ではかなり強い抑制作用を示して居たのに拘らず、この実験では作用が極めて弱い事が判明した。又 Thyroxine は長期投与では MAO の抑制が現われる可能性があるかも知れないが、著者の実験では抑制が認められなかった。尚被検物質の投与量は Marsilid は既に報告があり、対照としてこの量を追試的に定めその他は各物質間で毒性の強弱、最少有効量の差違が認められたが、10mg/kg の同一量で比較した。因に PCP の如きは 2 mg/kg 注射でも 1 h 後 100% の抑制を示している。

2. 犬による実験：体重 15~18kg の犬を使用し Marsilid は 100mg/kg, PIH は 1, 0.5, 0.2mg/kg を毎日 1 回皮下注射し、4 日後に肝を剔出して MAO 抑制度を正常犬を対照として比較した。その結果 Marsilid では 100%, PIH は 80% (1 mg), 65% (0.5mg), 40% (0.2mg) の抑制度を示した。

III. DCX inhibitor の実験 (第 5 表)

モルモット及びラットを使用し, Hydralazine, α -methyl DOPA と PIH 等の被検物質の水溶液を腹腔内注射又は経口投与し一定時間後に腎臓を剔出し、直ちに 20% の homogenate を作り之の 0.5cc に pH 8.0 の磷酸緩衝

第 4 表

	注射量 mg/kg	1 時間	2 時間	3 時間	5 時間	14 時間
1. Marsilid	150	100	100	100	100	100
2. Nialamide	10	100	100	100	100	92
3. Phenylisopropylhydrazine JB-516, PIH	10	100	100	100	100	100
4. Phenylcyclopropylalanine PCP	10	100	100	100	100	86
5. Harmine	10	53	36	22	10	0
6. MC-2507	10	22	15	12	10	13
7. Thyroxine	10	4	0	0	0	0

液0.5cc, 5HTP 2mg (0.5cc), Marsilid 溶液 $10^{-4} \times 7 \text{ M}$ (0.5cc), pyridoxal phosphate 溶液5 γ (0.1cc) 及び H₂O を加えて全量を3.5ccとし, 37 Cで40 m 間 incubate しこの間に生成される SE を定量し, 正常動物のと比較して抑制度を%で求めた. 其の結果は表に示す如くで Hydralazine はモルモットに注射後 1 h では45%の抑制度を示した後は殆んど作用なく α -methyl DOPA は IP 及び PO 何れも相当強い作用を示した. 又ラットの場合は α -methyl DOPA は矢張り強作用を示し PIH は之には及ばないが持続的な効果があり, この物質が MAO の抑制物としても *in vitro*, *in vivo* 共に作用し, 之の生体内各代謝系に及ぼす影響は今後の研究対象として興味深

第 5 表

		投与量 mg/kg	投 与 法	投与後経過時間及び抑制%				
				1	2	3	5	24
モルモット	Hydralazine	150	腹腔内注射 (IP)	45	4	0	0	0
	α -methyl DOPA	50	IP				76	
		100	IP	79	85	85	80	24
		100	経口				68	
		200	"				87	

ラット	$\begin{array}{c} \text{DOPA} \\ \text{OH} \\ \text{OH} \end{array} \text{—} \text{C}_6\text{H}_4 \text{—} \text{CH}_2 \text{—} \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} \text{—} \text{COOH}$	100	IP	0	0	0	0	0
	α -methyl-DOPA	100	IP	50	90	86	75	45
		100	IP 1日1回1週間					89
	PIH	20	IP	40	80	50	35	25

い.

第 6 表

IV. MAO inhibitor 投与による脳 SE の増量 (第 6 表)

1. inhibitor 単独投与による変化: 体重

200g 前後の雄性ラットを選び, Marsilid, Nialamide, PCP, MC-2507 及び Thyroxine 等の水溶液を腹腔内に注射した後 2 及び 14h 後に脳を剔出し直ちに氷冷 0.1N 塩酸を 3 倍量加えて homogenate とし以下 Bogdanski¹⁹⁾ 等の方法に準じて SE を蛍光分光器で定量した. その結果対照の正常脳が 0.4~0.42 γ /g の

SE を含有しているのに比し被検物質を投与したラットの脳は何れも 14h 後には増量を認めたが, 2h 後には MC-2507 [p-Ethylamino-N(2-diethylaminoethyl benzamide hydrochloride)] 及び Thyroxine 投与の例は増量を示さなかった.

2. inhibitor 及び 5HTP 投与による変化: ラットに化合物を注射, 2h 後, 80mg の 5HTP を腹腔内に注射し 2h 後に脳を剔出して, SE を定量した. その結果, PCP に最も著明な増量を認め此の場合の対照の 5HTP のみ注射した例に比し 5 倍量の SE が含有されていた. Nialamide が之に次ぎ Marsilid もかなりの増量が認められ, MC-2507, Thyroxine は対照と同等又はそれ以下の値を示した.

V. MAO inhibitor の 5HIAA 生成に及ぼす影響 (第 7 表)

体重 20g 内外の雄性マウスを用い各化合物を腹腔内注射後 2h 経ってから 2mg の SE を注射し再び 2h 経過後, 尿等の排泄物をも含めてマウスの全身を 100 cc の 0.1N HCl と共に homogenise しガーゼで濾した homogenate 6cc に H₂O 6cc を加えた後, 10% 硫酸亜鉛液 2cc, 1N 苛性ソーダ 1cc を加えて良く混和後冷却遠心沈澱, 脱蛋白された上清 10cc をとって前以て食塩 4g, 6N 塩酸 0.5cc, ether 25cc が入れられてある振盪壺中に入れ振盪混和後 (この間に 5HIAA は ether 中に移行する) 遠沈して ether 層 15cc を別の遠沈管にあげ pH 7.4 の磷酸緩衝液 1.5cc と振盪, 遠沈し

緩衝液層 1cc をとって之に 0.3cc の 12N-塩酸を加え, Activation wave length 310m μ , Fluorescen wave length 350m μ で蛍光により測定した. 其の結果は表の如く PCP が最も強く 5HIAA の生成を阻害し以下 Marsilid, Nialamide, PIH が之に次ぎ MC-2507, Thyroxine には此の場合も作用が無く, この二物質は逸早く分解を受ける等で MAO を抑制しない事が推定出来た.

第 7 表

	注射量 mg/animal	5HIAA 生成総量 α	抑制%
Marsilid	10	80	88
Nialamide	5	60	76
PCP	2	40	94
MC-2507	5	600	4
Thyroxine	10	900	0
PIH	5	70	89
対照	0	620	

総 括 及 び 考 察

I) この実験で一般実験動物の脳、肝、腎の三臓器の MAO 活性は肝が最も強く脳之につき腎が最も弱い結果を得たが、此の酵素を扱う上に於てはモルモット又はラットの肝を用う事が最も有利と考えられる。一般に大動物の方が酵素活性は弱い。inhibitor に対する感受性の点で動物の種類によって差違を示した事は、MAO の活性が之等薬物により単一因子で抑制されるものではなさそうであるし又蕁肝の示す Marsilid に殆んど抑制を認めない成績は、tryptophan の代謝経路を異にしている可能性がある様に想われる。MAO が水溶性で且つ mitochondria に含まれている点迄判っているが今後純粋化に研究も進められる事を期待し度い。

II) 1. 1~4 の inhibitor (第 4 表) は何れも 14h 後にも抑制を示しているのに反し 5 の Harmine は元々さして強い inhibitor ではないけれども時間の経過と共に作用度が減弱する事は inhibitor の働き方に可逆的、非可逆的の二種を區別出来そうである。投与量にもよる事であろうしするが、PIH は既に重症高血圧患者に試用されてその持続的な降圧効果が認められつつあり、MAO の如き重要な生体内酵素を長期に亘って抑制している事が他の代謝や生理機能に及ぼす影響に就いても実験が進められるべきでないかと思う。6 の化合物は生体内で分解を受けて MAO には作用し得ないものと考えられる。又 7 は甲状腺 hormone の過剰状態が恰も生体内 amine の増大時に示す症候と近似しており、甲状腺腫の経過からも長期間投与時の変化が検討せられるべきと思われる。

2. この犬の実験では PIH の 1 mg/kg の連続 4 日間投与で 80% の抑制が見られた事は、比較的弱い活性しか持たない犬の肝としては寧ろ意外でこの物質が生体内に蓄積される可能性が予想出来る。従ってさきに触れた高血圧患者の治療に際してもこの点注意が必要と思う。

III) DCX の inhibitor として *in vivo* にも働らくのは、 α -methyl DOPA と PIH であるが、DOPA は *in vivo* では作用せず CH₃。基の添加がかくも大きく差違を示した事は興味深い。降圧剤として使用されている Hydralazine が短時間ではあるが(排泄も速やかとの報告もある)、他の遮断剂的降圧物質と趣を異にしている作用の説明の一助になり得るかも知れない。Reserpine との関係に於ても MAO、DCX と SE の代謝、或いは NE の代謝は降圧物質実験の上では興味深い。

IV) Marsilid 投与時に於ける脳 SE の増量は既に報じられているが、この脳 SE を定量する方法も inhibitor が果して *in vivo* でも有効でありや否やを確かめ度い場合に有効と思う。特に 5HTP をも同時投与した実験は SE の含量に著明な差が出来るので便利であるし又 SE が中枢神経系に大量含まれた場合の生理実験ひいては SE の作用の検索にも応用出来ると思考する。

V) II 及び IV の実験で予想出来た結果がこの実験でも裏付けられたもので SE から 5HIAA の生成が実際に抑制されている成績が得られている。此の方法でも SE が MAO で酸化を受け、5HIAA に到る経路が明確ともなろうが、NE¹¹⁾を Regitine の如き遮断剤と共に大量投与後に NE の消費量と methoxynorepinephrine の生成量とを経時的に測定し生体内での NE の代謝の経路を探す場合にもこのマウスの実験は応用して、MAO の inhibitor の単独投与のみでは NE 消費の半減時間の延長即ち代謝抑制は起らないが Pyrogallol, Glycocyamine 等と MAO の inhibitor は NE の代謝を抑制する事が判明している。最近 Tabachnick¹²⁾等はラットを用いた実験で Harmala alkaloid の中には経口投与と腹腔注射で脳内 SE 増量と、尿中 5HIAA の排泄量減少とは必ずしも平行していない事を報じている。SE の体内分布から考えると、胃腸管に最も多く或は薬物や栄養物の吸収能に対しても SE が重要な作用を持っている事も考えられるし、或は又 Harmaline 等の持つ独特の化学構造に由来する水や脂肪に対する溶解性にもよるであろう。此の点若干実験を進め度いと思っている。MAO に関連し生体内 amine 類特に SE, NE, Tyramine, DOPamine 等の代謝に就いても今後薬理的に研究が進められる事が予想出来そうである。

結 論

1. 諸種実験動物の脳、肝、腎の MAO 活性に就いて比較し、一般に肝が最も強く脳がこれにつき腎が最も弱く、モルモット、ラット等が犬、猫、家兎に比して活性度強く、Marsilid に対して蕁肝は感受性が極めて弱い。

2. *in vivo* に於ては Maesilid, PIH, PCP, Nialamide は作用するが MC-2507, Thyroxine は MAO の inhibitor としては働かず, ラット脳 SE の増量, マウスの 5HIAA 生成抑制に就いても同様の傾向を示し 3 種の実験を加味する事で MAO の inhibitor が *in vivo* でも働くや否やを確かめ得られる。

3. DCX の inhibitor の中で *in vivo* にも働く物は α -methyl DOPA と PIH の二種で Hydralazine は一過性の効果しか認められなかった。

稿を終るに当たり此の実験は Dept. of Clinical Biochemistry National Heart Institute, N.I.H. で行つたもので終始親切なる指導をして下さつた Dr B. Witkop, Dr. S. Udenfriend に謝意を表し、投稿に際し種々御骨折り戴いた瀬辺教授にお礼申し上げ度い。

文 献

- 1) Twarog, B. M. : Ame. J. Physiol. **175**, 157 (1953).
- 2) Bogdanski, D. : J. Neurochem. **1**, 272 (1957).
- 3) Brodie, B. : Ann. N. Y. Acad. Sci. **65**, 631 (1957).
- 4) Brodie, B. : Science **125**, 1293 (1957).
- 5) Shore, P. A. : J. Clinical. Exp. Pathol. **19**, 56 (1958).
- 6) 吉原 : 日薬理誌 **55**, 103 (1959).
- 7) Erspamer, V. : Arch. Internat. Pharmacodyn. **93**, 293 (1953).
- 8) West, G. B. : J. Pharmacy & Pharmacol. **10**, Supplement 92 (1958).
- 9) Bogdanski, D. : J. Pharmacol. **117**, 82 (1956).
- 10) Tabachnick, I. A. : Proceed. Soc. Exp. Biol. Med. **101**, 435 (1959).
- 11) Witkop, B., Udenfriend, S. and Ozaki, M. : Biochimica Biophysica Acta 印刷中.