

肝障害による脳内チロシン濃度の変化

金 行 孝 雄

はじめに

Wurtman ら¹⁾は中枢神経系において、チロシンの増加が神経伝達物質“カテコラミン”の代謝に影響を与えることを報告している。しかしながら、脳内でカテコラミン及びその代謝産物は、特異的な脳の部位に局在し、非常に微量であるので、脳内に増加したチロシンがカテコラミンの代謝に及ぼす効果は、まだ、はっきりとは解明されていない。

そこで、脳内カテコラミン代謝に及ぼすチロシンの効果を検討する目的で、著者は脳内チロシン濃度を増加させる試みを行ってきた。

今までに、チロシンの腹腔内投与やチロシン添加食による飼育で、ラット脳内チロシン濃度の増加が認められている。本研究では、重症の肝障害で血中チロシン濃度が増加するという報告があるので²⁾、栄養障害や薬物による肝障害動物の作製を試み、肝障害と脳内チロシン濃度の関係を調べた結果を報告する。

実験方法

実験にはウィスター系雄ラットを使用した。栄養障害による肝障害は初体重約120gのラットをラード38.0%、ショ糖45.375%、カゼイン8%、オリエンタル配合ミネラル4%、コリンフリーオリエンタル配合ビタミン1%、 β -ケースチン0.625%及びセルロース3%の組成からなっている実験食で6ヶ月間自由採食、自由給水で飼育した。対照群にはオリエンタルMF固型飼料が用いられた。薬物の投与方法は以下のとおりである。1) ガラクトサミンは生理食塩水に溶解して水酸化ナトリウムで中性溶液とし、体重約200gのラットに体重kg当り250mg/2.5mlを最初の3回は4時間おきに、そして14時間休止の後に最後の3回を1時間おきに腹腔内に投与し、対照ラットには生理食塩水が用いられた。両群は最終投与の24時間後まで飼育した。2) N, N'-ジアセチルベンチジンは生理食塩水に懸濁し、体重約150gのラットに体重kg当り200mgを腹腔内に1回投与し、対照ラットには生理

食塩水が用いられた。その後、両群はオリエンタルMF飼料で2ヶ月間飼育した。

ラットは断頭により屠殺し、頸部の切り口より血液を採取し、血清を分離した。血清及び肝臓は使用するまで-20℃で保存した。断頭後、速やかに脳を取り出し、氷上でSchubert ら³⁾およびGlowinski ら⁴⁾の方法を参考にし、扁桃核、大脳皮質、線条体、海馬、視床、視床下部、小脳、脳幹に分けて使用するまで-80℃で保存した。

血清及び脳組織のチロシンの定量はWaalkesら⁵⁾のけい光法で行った。血清中のグルタミン酸オギザロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、アルカリ性リン酸分解酵素(ALP)、コリンエステラーゼ(ChE)、ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)、 γ -グルタミルトランスベプチダーゼ(γ -GTP)、総ビリルビン(T-bil)、直接型ビリルビン(D-bil)、間接型ビリルビン(I-bil)、硫酸亜鉛混濁試験(ZTT)、チモール混濁試験(TTT)及び血清タンパク質分画の測定は岡山医学検査センターに依頼した。肝臓中の脂質の測定は前報⁶⁾に従った。

肝臓の組織標本の検索は、ラットの屠殺後、肝臓を摘出し、その一部を10%ホルマリン液で固定した後、パラフィン包埋切片をヘマトキシリン・エオシン及びマロリア・アザンで染色した。

各々の実験群の結果はMean \pm S.D. で表した。対照群と実験群との間の有意差検定はStudent's t-testを用いて行った。

実験結果

図1は実験食群と対照群ラットの体重曲線である。実験食群は実験食で飼育を開始した直後より、明らかな体重増加率の低下が認められた。しかし、6ヶ月後の脳重は、実験食群では 2.05 ± 0.105 g (N=12)であるのに対して、対照群では 2.16 ± 0.107 g (N=6)であって、両群の間に有意差は認められなかった。同様に肝重量も実験食群の 16.91 ± 5.38 gに対して、対照群は14.78

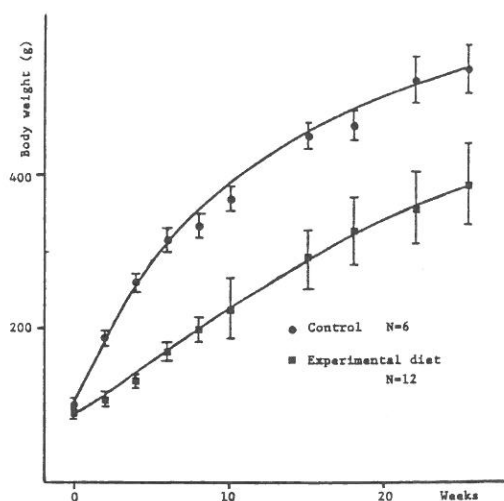
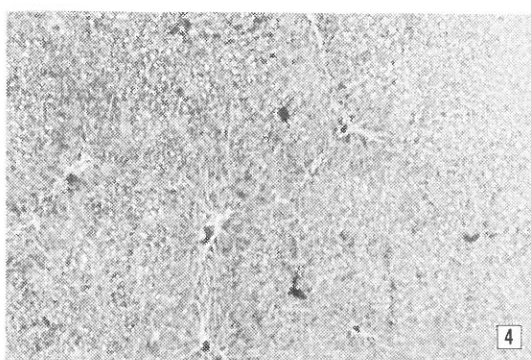
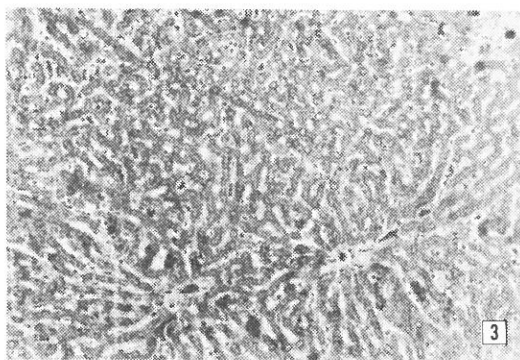
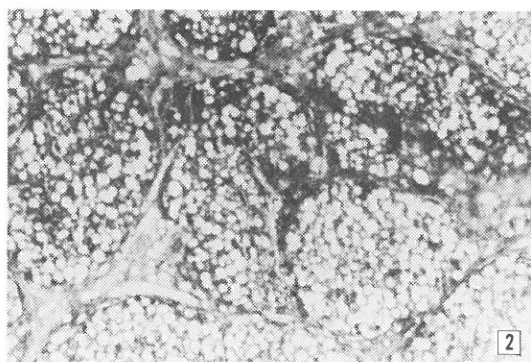


図1 実験食群の体重曲線

± 1.34 g であって有意差は認められなかった。N, N'-ジアセチルベンチジン投与ラットにおいても対照群との間には、体重及び肝重量の差が認められなかった。

表1及び表2に肝機能の生化学的検査の結果を示す。実験食群では α_1 -グロブリンの割合が減少し、 α_2 -グロブリンの割合が増加した。12例中、肝臓の萎縮が認められた3例では、A1-P 活性及び T-bil 量の著しい増加が認められた。しかし、実験食群は個体差が大きいために対照群との間に差を認めなかった。ガラクトサミン投与群ではGOT, GPT及び A1-P の各活性の増加が認められた。N, N'-ジアセチルベンチジン投与群では γ -GTP 活性、ZTT 及び TTTの上昇が認められた。

写真1は実験食ラットの肝臓を示したもので、上段の左から肝の肥大、肝硬変及び肝硬変への移行過程の肝臓を示している。写真2はマロリア・アザン染色の標本で、多数の偽小葉が認められ、肝硬変症の所見を示している。写真3はガラクトサミン投与ラットの肝臓標本で、デッセ腔の膨潤が認められる。写真4は N, N'-ジアセチルベンチジン投与ラットの肝臓標本であり、肝細胞の風船状腫大がみられる。



写真(1) 肝臓の肉眼的所見

写真(2) 実験食による肝硬変症、マロリア・アザン染色×100

写真(3) ガラクトサミン投与ラットの肝臓、ヘマトキシリン・エオシン染色×50

写真(4) N, N'-ジアセチルベンチジン投与ラットの肝臓、ヘマトキシリン・エオシン染色×50

表 1 実験食群の血清たんぱく質分画

※ P < 0.05

	Albumin (%)	α_1 -Globulin (%)	α_2 -Globulin (%)	β -Globulin (%)	γ -Globulin (%)	A/G (%)
Control N=6	54.4 ± 4.4	14.0 ± 3.3	5.8 ± 0.6	18.5 ± 1.2	7.1 ± 2.5	1.2 ± 0.20
Experimental diet N=6	54.3 ± 4.8	9.6 ± 1.9 *	8.2 ± 1.2 *	21.3 ± 3.0	6.6 ± 4.3	1.2 ± 0.24

表 3 肝障害ラットの血清及び線条体のチロシン濃度

※ P < 0.01

	Control N=6	Experimental diet N=6	Control N=6	Galactosamine N=6	Control N=5	N,N'-diacetyl benzidine N=5
Serum (μ moles/l)	93.4 ± 4.7	226 ± 105 *	120 ± 18	270 ± 121 *	99 ± 6.6	110 ± 16
Striatum (nmoles/g)	132 ± 12	325 ± 180 *	113 ± 21	180 ± 60 *	113 ± 33	87 ± 10

表 2 肝障害ラット血清の生化学的肝機能検査

※ $P < 0.05$

	Control N=6	Experimental diet N=12	Control N=6	Galactosamine N=6	Control N=5	N,N'-diacetyl benzidine N=5
GOT (IU)	152 ± 26	193 ± 68	188 ± 108	2,355 ± 18 *	192 ± 120	196 ± 38 (N=3)
GPT (IU)	50 ± 7	51 ± 17	48 ± 7	947 ± 851 *	46 ± 5	72 ± 18 (N=3)
ALP (IU)	159 ± 44	745 ± 703	431 ± 56	731 ± 284 *	—	—
LAP (IU/L)	—	—	—	—	61 ± 6	56 ± 6
γ-GTP(MIU)	—	—	—	—	0.88 ± 0.66	2.3 ± 2.1 *
T-bil (mg/dl)	0.51 ± 0.05	1.54 ± 1.84	—	—	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.01
D-bil (mg/dl)	0.10 ± 0.01	0.50 ± 0.76	—	—	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.01
I-bil (mg/dl)	0.42 ± 0.04	1.03 ± 1.09	—	—	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.00
ZTT (K-U)	—	—	—	—	0.54 ± 0.05	1.5 ± 0.83 *
TTT (M-U)	—	—	—	—	0.34 ± 0.05	0.64 ± 0.27 *

表 4 ガラクトサミン及びN,N'-ジアセチルベンチジン投与ラットの脳内各部位のチロシン濃度
(n moles /g)

※ P < 0.01

	Control N=5	Galactosamine N=5	Control N=5	N,N'-diacetyl benzidine N=5
Amygdala	—	—	111±29	92±10
Cerebral cortex	106±14	192±62 *	112±28	101±31
Striatum	113±21	180±60 *	112±29	88±99
Hippocampus	110±20	209±70 *	113±33	76±18
Thalamus	115±17	202±65 *	111±30	80± 9
Hypothalamus	112±10	182±44 *	109±28	81±18
Cerebellum	153±37	228±68	121±33	95±18
Brain stem	117±12	211±51 *	106±21	84±14

表 5 実験食群ラット肝臓の脂質

※ P < 0.01

	Control N=6	Experimental diet N=6
Total lipid (mg/g)	41.3±3.0	263.3±71 *
Triglyceride (mg/g)	7.1±1.6	238±75 *
Phospholipid (mg/g)	0.1±0.01	0.62±0.12 *
Cholesterol		
Total (mg/g)	4.2±0.33	9.6±2.3 *
Free (mg/g)	2.1±0.10	2.0±0.42
Ester (mg/g)	2.1±0.31	7.6±2.0 *
E/T (%)	50.0±3.8	78.3±5.0

表3は実験食群、ガラクトサミン群及びN,N'-ジアセチルベンチジン群の血清及び線条体チロシン濃度を示している。実験食群とガラクトサミン群では血清及び線条体のチロシン濃度が増加したが、N,N'-ジアセチルベンチジン群では有意の変化が認められなかった。表4はガラクトサミン群とN,N'-ジアセチルベンチジン群の脳内各部位別のチロシン濃度を示したものである。ガラクトサミン群は小脳を除く、すべての部位でチロシン濃度の増加を示したが、N,N'-ジアセチルベンチジン群では変化が認められなかった。

表5は実験食群の肝臓内脂質含量を示したものである。総脂質、トリグリセライド、総コレステロール及びエステル型コレステロールが増加し、リン脂質が減少した。

考 察

栄養性肝障害ラット肝臓の脂質は肝重量の約30%を占めていた。肝の組織学的検索から12匹中明らかな肝の萎縮が認められた3例では、肝硬変症の所見がみられたが、肝障害の程度には著しい個体差があった(写真1)。これらのラットの血中及び脳内のチロシン濃度は有意に増加した。しかし、個体による差が著しかった。栄養性肝障害ラットは更に長期間飼育すると肝硬変症例が増加すると考えられる⁷⁾。その上に、たんぱく質含量を低下させたり、ビタミンフリーカゼインを利用し、より低栄養状態にすると⁸⁾肝障害の程度が強くなると予想される。

ガラクトサミンは急性の肝障害実験によく利用される薬物であり⁹⁾、ガラクトサミン投与によって血中チロシン濃度が増加し、それにともなって脳の各部位のチロシン濃度が増加した。この結果は、チロシンの血中濃度を増加させて脳内各部位のチロシン濃度を一様に上昇させた Morre ら¹⁰⁾の報告と一致した。それに対して、N,N'-ジアセチルベンチジンは発ガン性物質として知られる

と共に人の糸球体腎炎のモデル動物作製のために用いられる物質で、肝臓障害に対する報告は Shimamura ら¹¹⁾の報告が最初である。この物質は腹腔内に1回投与されると2ヶ月後にも吸収されずに腹腔内に残っていることから、吸収及び作用発現に長時間が必要であると考えられる。ZTTとTTTの増加及び肝細胞の風船状膨大化が認められるが、血清及び脳内チロシン濃度の増加が認められない理由については更に検討する必要がある。

以上の結果から、脳内チロシン濃度の増加はガラクトサミンの投与や栄養性肝障害によって生じることが認められた。

結 語

急性的に血清及び脳内チロシン濃度を上昇させるために、ガラクトサミンを利用できることが認められた。また、慢性的なチロシン濃度の増加は、低栄養状態で6ヶ月間飼育した肝障害ラットで認められた。しかし低栄養による肝障害と脳内チロシン濃度には、個体差が非常に著しかった。更に、N,N'-ジアセチルベンチジン投与による肝障害では脳内チロシン濃度が増加しないことから、肝障害の程度は脳内チロシン濃度に影響すると考えられる。

謝 辞

稿を終るに臨み、研究の機会を与えて頂いた岡山県立短期大学小山鷹二学長並びに岡山大学医学部脳代謝研究施設病態生化学部門庄盛敏廉教授に感謝する。また肝臓の組織標本の検索に対して助言を頂いた馬屋原病院森久博司博士に感謝する。

なお、本研究の一部は第55回日本生化学会総会(昭和57年10月、於：大阪大学)において発表した。

参 考 文 献

- 1) Wurtman, R. J., Hefti, F. and Melamed, E. : Precursor control of neurotransmitter synthesis, *Pharmacological Reviews*, 32, 315-335 (1981)
- 2) Rosen, H. M., Yoshimura, N., Hodgman, J. M. and Fischer, J. E. : Plasma amino acid patterns in hepatic encephalopathy of differing etiology, *Gastroenterology*, 72, 483-487 (1977)
- 3) Schubert, J. and Sedvall, G. : Accumulation and disappearance of ³H-5-hydroxytryptamine from *vivo* from ³H-tryptophan in various regions of the rat brain, *Europe. J. Pharmacol.*, 17, 75-80 (1972)

- 4) Glowinski, J. and Iverson, L. L. : Regional studies of catecholamines in the rat brain-I : The disposition of [^3H]-norepinephrine, [^3H]-dopamine and [^3H]-dopa in various regions of the brain, *J. Neurochem.*, 13, 655-669 (1966)
- 5) Waalkes, T. P. and Udenfriend, S. : A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues, *J. Lab. and Clin. Med.*, 50, 733-736 (1957)
- 6) 金行孝雄：実験的肝障害ラットの血漿及び肝臓中の脂質について，岡山県立短期大学研究紀要，24，14-20 (1980)
- 7) 和田和代史：コリン欠乏食飼育ラット肝硬変における門脈圧亢進の原因解析，肝臓，14，481-493 (1973)
- 8) Patek, Jr. A. J., Oken, D. E., Sakamoto, A., de Fritsch, N. and Bevans, M. : Recovery from dietary cirrhosis of the liver in the rat, *Arch. Pathol.*, 69, 168-174 (1960)
- 9) Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. and Decker, K. : Experimental hepatitis induced by d-galactosamine, *Exp. Mol. Pathol.*, 9, 279-290 (1968)
- 10) Morre, M. C., Hefti, F. and Wurtman, R. J. : Regional variations in brain tyrosine levels following tyrosine administration, *J. Neural. Transm.*, 49, 45-50 (1980)
- 11) Shimamura, T., Hayase, K., Wang, C. W., Cotton, J. and Savoca, V. J. : Structural alterations of the liver induced by N, N'-diacetyl benzidine, *Arch Pathol. Lab., Med.*, 103, 327-330 (1979)

昭和58年3月31日