

ジスルフィラムの生体への影響に関する研究 : ジスルフィラム代謝産物の δ -aminolevulinic acid synthetase 活性に対する影響

新垣, 光雄
長崎県立女子短期大学

加瀬, 綾子
長崎県立女子短期大学

穂吉, 敏男
佐賀医科大学解剖学講座

<https://doi.org/10.15017/7238729>

出版情報 : 福岡医学雑誌. 89 (12), pp.333-338, 1998-12-25. 福岡医学会
バージョン :
権利関係 :



原 著

ジスルフィラムの生体への影響に関する研究
—ジスルフィラム代謝産物の δ -aminolevulinic acid synthetase
活性に対する影響—

長崎県立女子短期大学¹⁾佐賀医科大学解剖学講座²⁾新垣光雄¹⁾・加瀬綾子¹⁾・穂吉敏男²⁾

Studies on the Biological Effects of Disulfiram
—Effect of an active metabolite of disulfiram on the activity
of δ -aminolevulinic acid synthetase—

Mitsuo ARAKAKI¹⁾, Ayako KASE¹⁾ and Toshio AKIYOSHI²⁾¹⁾Nagasaki Prefectural Women's Junior College, Nagasaki 850-0011²⁾Department of Anatomy, Saga Medical School, Saga 849-8501

Abstract The effect of diethyldithiocarbamic acid methyl ester (Me-DDC), a metabolite of disulfiram, on hepatic δ -aminolevulinic acid (ALA) synthetase activity was investigated in male rats. The results obtained were as follows:

- 1) When rats were given intraperitoneally Me-DDC at the dose levels of 0.0625, 0.125, 0.25 and 0.50 mmol/kg, the activity of ALA synthetase showed a maximum level at a dose of 0.125 mmol/kg.
- 2) ALA synthetase activity increased rapidly and reached a maximum level in about 2 hr after the intraperitoneal administration of Me-DDC (0.125 mmol/kg).
- 3) Pretreatment with phenobarbital (an inducer of drug metabolizing enzymes) tended to depress the increase of ALA synthetase caused by Me-DDC, whereas pretreatment with SKF 525-A (an inhibitor of drug metabolizing enzymes) stimulated slightly the Me-DDC-induced increase of the enzyme.
- 4) The apparent Km value of the enzyme for glycine did not change but the Vmax value increased in Me-DDC-treated rats.
- 5) Actinomycin D (a potent inhibitor of DNA-dependent synthesis of RNA), when administered to rats before Me-DDC, completely prevented the induction of ALA synthetase caused by the latter compound.
- 6) Pretreatment with phorone (a glutathion depletor) 4 hr prior to the administration of Me-DDC completely inhibited the Me-DDC-induced increase of ALA synthetase.

緒 言

Disulfiram (Antabuse; N, N, N', N'-Tetraethylthiuram Disulfide, DSF) は aldehyde dehydrogenase (ALDH) 阻害作用を有し、アルコール依存症の

抗酒療法薬として用いられている薬剤である¹⁵⁾。DSF の ALDH 阻害作用は DSF 自身によるのではなく、DSF が生体内で代謝を受けて生じる活性代謝産物によるとされ、活性代謝産物として Diethyldithiocarbamic acid methyl ester (Me-DDC)、特にその酸化体

の Diethylthiocarbamic acid methyl ester (Me-DTC) が推定されている¹⁴⁾。一方, Mays ら¹³⁾ は DSF の究極の活性代謝産物は, Me-DTC が更に代謝と受けて生じる S-methyl-N, N-diethylthiocarbamate sulfoxide であろうと報告している。著者ら¹²⁾ はさきに, DSF の生体に対する影響検索の一環として, ヘム合成系律速酵素の δ -aminolevulinic acid (ALA) synthetase⁶⁾¹²⁾ に対する DSF の影響を検討し, DSF が ALA synthetase 活性を増加させる作用があることを見出すとともに, DSF の主要代謝産物である Diethyldithiocarbamate⁷⁾ (DDTC) についても同様の検討を行い, DDTC にも ALA synthetase 活性を増加させる効果があることを明らかにした。今回, DSF の活性代謝産物の 1 つとみなされている Me-DDC について, ALA synthetase 活性に対する影響を検討するとともに, グルタチオン (GSH) が生体内における解毒作用に重要な働きをしていることから⁹⁾, 肝 GSH 量の変動と ALA synthetase 活性の変化との関連についても検討したので報告する。

実験方法

実験に用いた Me-DDC 及び SKF 525-A は長崎大学薬学部富永義則博士及び昭和大学薬学部吉田武美教授より譲り受けたものである。ホロン (ジイソプロピリデンアセトン), 還元型グルタチオン (GSH), 5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸), フェノバルビタールナトリウム (PB) は和光純薬工業製, アクチノマイシン D (Act. D) はシグマ社製, EDTA は同仁化学研究所製, トウモロコシ油は石津製薬製, イオン交換樹脂 Dowex 1×8 (200~400 メッシュ) はダウ・ケミカル社製を使用した。実験動物には 4~5 週令の Wistar 系雄性ラット (大坪実験動物) を用い, 室温 23±1℃ の環境にて 3~4 日間予備飼育した後, 実験に供した。飼料にはオリエンタル酵母製 MF 固型飼料を用い, 動物は屠殺前の 24 時間は絶食させたが水の摂取は自由に行わせた。Me-DDC 及びホロンはトウモロコシ油に, Act. D 及び SKF 525-A は滅菌蒸留水に溶解してラットへ投与する液を調整した。各投与液の投与は屠殺時間を午後 1 時~2 時と一定にし, その前の一定時間に行った。検索の目的に応じて投与方法は次のように設定した。

① Me-DDC の Dose-Response 実験:

Me-DDC を 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50 mmol/kg の割合で 1 回腹腔内投与し, 3 時間後に屠殺した。

② Me-DDC の Time Course 実験:

Me-DDC (0.125 mmol/kg) を 1 回腹腔内投与し, 1, 2, 3, 6 時間後に屠殺した。

③ Me-DDC 投与による ALA synthetase 活性増加に対する PB 前処置の影響実験:

PB (80 mg/kg) を 24 時間間隔で 3 回腹腔内投与した後, Me-DDC (0.125 mmol/kg) を 1 回腹腔内投与し, その 2 時間後に屠殺した。

④ Me-DDC 投与による ALA synthetase 活性に対する SKF 525-A 前処置の影響実験:

SKF 525-A (40 mg/kg) を 1 回腹腔内投与した後, 1 時間後に Me-DDC (0.125 mmol/kg) を 1 回腹腔内投与し, その 2 時間後に屠殺した。

⑤ ALA synthetase の Km 値及び Vmax 値を求める実験:

Me-DDC (0.125 mmol/kg) を腹腔内投与後 2 時間目に屠殺して得られた肝臓を用いて 25% ホモジネートを調製し, これを粗酵素液としてグリシン (基質) の種々の濃度における反応速度を求めた。

⑥ Me-DDC 投与による ALA synthetase 活性増加に対する Act. D 前処置の影響実験:

Act. D (2 mg/kg) を 1 回腹腔内投与した後, 1 時間後に Me-DDC (0.125 mmol/kg) を 1 回腹腔内投与し, その 2 時間後に屠殺した。

⑦ Me-DDC 投与による ALA synthetase 活性増加に対するホロン前処置の影響実験:

ホロン (2 mmol/kg) を 1 回腹腔内投与した後, 4 時間後に Me-DDC (0.125 mmol/kg) を 1 回腹腔内投与し, その 2 時間後に屠殺した。

なお, ALA synthetase 活性は既報²⁾ にしたがって, 肝臓中 GSH 量の測定は Costa らの方法⁵⁾ にしたがって測定した。実験結果は平均値±標準誤差で示し, 有意差検定は Student's t-test による危険率 5% 以下を有意とした。

結果及び考察

Faiman ら⁸⁾ は 0.25% (w/v) methylcellulose にけ

Table 1 Dose-related effects of Me-DDC on hepatic ALA synthetase activity and GSH content in rats

Treatment	ALA synthetase activity (nmol ALA/g liver/hr)	GSH content (μ mol/g liver)
Control	47.91 $\pm$ 3.56	3.45 $\pm$ 0.13
Me-DDC (mmol/kg)		
0.0625	49.70 $\pm$ 3.89	3.02 $\pm$ 0.18
0.125	104.70 $\pm$ 6.62 ^{a)}	2.59 $\pm$ 0.12 ^{a)}
0.250	82.60 $\pm$ 2.66 ^{a)}	2.11 $\pm$ 0.22 ^{a)}
0.500	63.51 $\pm$ 2.97 ^{a)}	1.53 $\pm$ 0.19 ^{a)}

Rats were injected intraperitoneally with Me-DDC at the doses indicated and killed 3 hr later. Values are means $\pm$ S.E.M. of four to five animals. a) $p < 0.05$, significantly different from controls.

ん濁してratに腹腔内投与したときのMe-DDCのLD₅₀は167 mg/kg (およそ 1 mmol/kg) と報告している。そこで今回の実験では最高投与量をLD₅₀の1/2量とし、4用量(0.0625, 0.125, 0.25及び0.50 mmol/kg)で行った。Me-DDCを腹腔内投与後3時間目に屠殺し、ALA synthetase活性および肝臓中GSH量を測定した結果をTable 1に示す。ALA synthetase活性に対して、0.0625 mmol/kgの用量では影響は認められなかったが0.125, 0.25および0.50 mmol/kgの用量では有意に増加した。しかし、それぞれの活性値は対照群のおよそ210%, 166%, 128%で、投与量の増加とともに活性増加の割合は減少した。一方、肝臓中GSH量は投与量の増加とともに減少し、0.50 mmol/kgの用量では対照群のレベルの50%以下となった。

Dose-response実験からALA synthetase活性に対する影響が最も強く出る用量は0.125 mmol/kgであることが明らかとなったので、投与量を0.125 mmol/kgとし、経時的にALA synthetase活性およびGSH量を測定した結果をTable 2に示す。ALA synthetase活性はMe-DDC投与後急激に上昇し、投与後2時間で最高値に達したのち減少し、投与6時間後にはほぼ対照群のレベルに戻った。一方、肝臓中

Table 2 Time course of the effects of Me-DDC on hepatic ALA synthetase activity and GSH content in rats

Treatment	ALA synthetase activity (nmol ALA/g liver/hr)	GSH content (μ mol/g liver)
Control	42.48 $\pm$ 3.41	3.43 $\pm$ 0.15
Me-DDC		
1 hr	48.72 $\pm$ 7.67	1.81 $\pm$ 0.15 ^{a)}
2 hr	125.07 $\pm$ 7.84 ^{a)}	2.62 $\pm$ 0.15 ^{a)}
3 hr	66.50 $\pm$ 6.36 ^{a)}	2.57 $\pm$ 0.17 ^{a)}
6 hr	45.01 $\pm$ 2.13 ^{a)}	3.25 $\pm$ 0.23

Rats were injected intraperitoneally with Me-DDC (0.125 mmol/kg) and killed at the times indicated. Values are means $\pm$ S.E.M. of four to five animals.

a) $p < 0.05$, significantly different from controls.

GSH量はMe-DDC投与後1時間で最低値を示し、6時間後にはALA synthetase活性と同様にほぼコントロールレベルに復帰した。

Me-DDC投与によるALA synthetase活性の増加が薬物代謝酵素誘導剤のPB³⁾又は薬物代謝酵素阻害剤のSKF 525-A⁴⁾の前処置によって影響を受けるかどうかを検討した結果をTable 3およびTable 4に示す。Me-DDC投与によるALA synthetase活性の増加は、PBを前処置するとやや抑制され、一方、SKF 525-Aを前処置するとやや増加する傾向を示した。DSFのALDH阻害作用はDSFが生体内で代謝を受けて生じる活性代謝産物によるとされ、活性代謝産物としてMe-DDC、特にその酸化体のdiethyldithiocarbamic acid methyl ester (Me-DTC)が推定されている¹⁴⁾。しかし、ALA synthetase誘導能についてみると、Me-DDCの代謝を促進するとMe-DDCによる活性増加がやや抑制されることから、Me-DTCはMe-DDCよりその効果は弱いものと推測される。

Me-DDC投与によるALA synthetaseのstimulation効果に対するAct. D前処置の影響を検討した結果をTable 5に示す。Me-DDC投与によるALA synthetase活性の増加は、Act. D前処置によって完全に抑えられた。この事実、Me-DDCがALA syn-

Table 3 Influence of pretreatment with phenobarbital on the effect of Me-DDC on hepatic ALA synthetase activity in rats

Treatment	ALA synthetase activity (nmol ALA/g liver/hr)
Control	46.45±1.97
Me-DDC	110.49±5.17 ^{a)}
Phenobarbital	109.70±15.48 ^{a)}
Phenobarbital + Me-DDC	84.34±5.45 ^{a)}

Rats were injected intraperitoneally with sodium phenobarbital (80 mg/kg) daily for 3 days, and then received Me-DDC (0.125 mmol/kg, i.p.). The animals were sacrificed 2 hr after the Me-DDC administration. Values are means±S.E.M. of four to five animals.

a) $p < 0.05$, significantly different from controls.

Table 4 Influence of pretreatment with SKF 525-A on the effect of Me-DDC on hepatic ALA synthetase activity in rats

Treatment	ALA synthetase activity (nmol ALA/g liver/hr)
Control	47.77±4.31
Me-DDC	109.68±4.13 ^{a)}
SKF 525-A	125.10±11.39 ^{a)}
SKF 525-A + Me-DDC	123.74±12.88 ^{a)}

Rats were injected intraperitoneally with SKF 525-A (40 mg/kg) 1 hr before administration of Me-DDC (0.125 mmol/kg, i.p.). The animals were sacrificed 2 hr after the Me-DDC administration. Values are means±S.E.M. of four to five animals.

a) $p < 0.05$, significantly different from controls.

thetase 酵素蛋白の生合成過程で transcriptional level で作用していることを示唆している。

酵素活性の変化は酵素蛋白の量的な変化だけでなく酵素と基質の親和性の変化によることも考えられるので、Me-DDC 投与によって ALA synthetase の基質 (グリシン) に対する Km 値が変化するか否かを検討

Table 5 Effect of pretreatment with actinomycin D on the increase in hepatic ALA synthetase activity by Me-DDC

Treatment	ALA synthetase activity (nmol ALA/g liver/hr)
Control	56.68±3.46
Me-DDC	106.22±7.55 ^{a)}
Actinomycin D	41.18±4.38 ^{a)}
Actinomycin D + Me-DDC	48.88±3.64

Rats were injected intraperitoneally with actinomycin D (2 mg/kg) 1 hr before an administration of Me-DDC (0.125 mmol/kg, i.p.). The animals were sacrificed 2 hr after the Me-DDC administration. Values are means±S.E.M. of four to five animals.

a) $p < 0.05$, significantly different from controls.

した (Fig. 1). Fig. 1 より ALA synthetase の基質に対する Km 値及び Vmax 値を求めると、対照群ではそれぞれ 5.40 mM, 62.50 nmol/g liver/hr, Me-DDC 投与群では 5.40 mM, 117.65 nmol/g liver/hr となり、Me-DDC 投与によって Km 値は変化せず Vmax 値だけが增大した。この事実は、Me-DDC 投与による ALA synthetase 活性の増加が酵素と基質の親和性の変化によるのではなく、酵素蛋白の生合成の亢進に基づくものであることを示唆している。Me-DDC 投与による ALA synthetase 活性の増加が酵素蛋白の生合成の亢進に基づくものであることは、蛋白生合成阻害剤の Act. D 前処置によって Me-DDC による活性増加が完全に抑えられることから支持される (Table 5)。

ホロンを前処置して肝臓中 GSH レベルを減少させたときに、Me-DDC による ALA synthetase 活性の増加が如何なる影響を受けるかを検討した結果を Table 6 に示す。

ホロン投与すると、肝臓中 GSH 量が有意に減少するとともに ALA synthetase 活性も著しく減少した。また、ホロン投与により肝臓中 GSH レベルを低下させると、Me-DDC による ALA synthetase 活性の増加が完全に抑制されることが認められた。

GSH は、細胞機能を維持する上できわめて重要な役

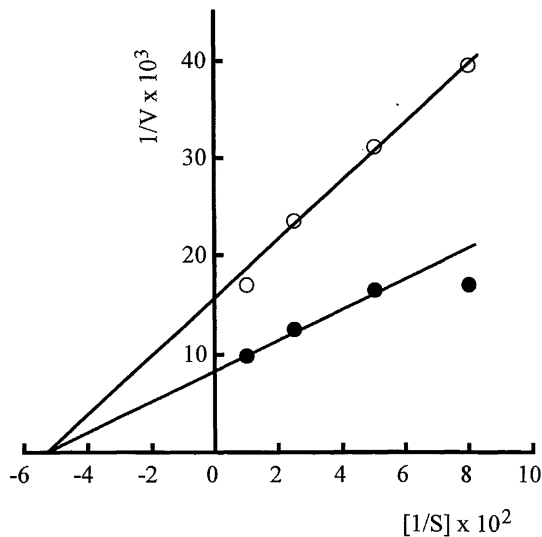


Fig. 1 Lineweaver-Burk Plots of ALA synthetase activity for glycine

Rats were given Me-DDC (0.125 mmol/kg) or corn oil intraperitoneally, and were killed 2 hr later for enzyme assay.

Reaction mixtures contained in a final volume of 2.5 ml, 187.5 μ M of Tris-HCl buffer (pH 7.2), 25 μ M of EDTA, 1 ml of liver homogenates, and varied amounts of glycine.

The open circles (○) represent the mean values of the control rats.

The filled circles (●) represent the mean values of the Me-DDC-treated rats.

S: glycine concentration (mM)

V: ALA formed (nmoles/g liver/hr)

割を果たして、細胞内の GSH 濃度が低下しているような条件下では薬毒物の毒性が容易に発現し、またその程度も強く現れるといわれ、事実、細胞内の GSH 濃度が低下している条件下では、解熱鎮痛剤のアセトアミノフェンなど多くの例で毒性が強く現れることが知られている¹⁰⁾。Kosower ら¹¹⁾ は生体における蛋白合成が効率よく行われるためには十分な GSH レベルが維持される必要があると報告し、Fischer ら⁵⁾ もアセトアミノフェンによる肝蛋白合成の阻害は GSH の枯渇とよく一致すると報告している。ホロン自身は蛋白合成に影響を与えない⁵⁾。これらの事実を総合して考えると、Me-DDC による ALA synthetase 活性の増加がホロンを前処置することによって抑えられるのは、肝臓中 GSH 量の変動が直接的または間接的に

Table 6 Influence of pretreatment with phorone on the effects of Me-DDC on hepatic ALA synthetase activity and GSH content in rats

Treatment	ALA synthetase activity (nmol ALA/g liver/hr)	GSH content (μ mol/g liver)
Control	46.30 $\pm$ 3.04	3.77 $\pm$ 0.08
Me-DDC	108.05 $\pm$ 5.57 ^{a)}	2.41 $\pm$ 0.04 ^{a)}
Phorone	48.73 $\pm$ 1.77	1.57 $\pm$ 0.12 ^{a)}
Phorone + Me-DDC	35.85 $\pm$ 2.11 ^{a),b)}	1.33 $\pm$ 0.04 ^{a)}

Rats were injected intraperitoneally with phorone (2 mmol/kg) 4 hr before an administration of Me-DDC (0.125 mmol/kg, i.p.). The animals were sacrificed 2 hr after the Me-DDC administration. Values are means $\pm$ S.E.M. of four to five animals.

a) $p < 0.05$, significantly different from controls.

b) $p < 0.05$, significantly different from phorone dosed group.

関係していることを示唆している。

総 括

ジスルフィラム (DSF) の生体への影響研究の一環として、今回、DSF の活性代謝産物の 1 つと考えられている Diethyldithiocarbamic acid methyl ester (Me-DDC) について、肝臓におけるヘム合成系律速酵素の δ -aminolevulinic acid (ALA) synthetase 活性に対する影響を検討した。Me-DDC をラットに腹腔内投与し、ALA synthetase 活性に対する Me-DDC の用量-反応関係を見ると、0.125 mmol/kg の用量のとき活性は最も高くなった。また、0.125 mmol/kg の用量で ALA synthetase 活性の経時的変化を見ると、投与後 2 時間で活性は最も高くなることが分かった。Me-DDC による ALA synthetase 活性の増加は、酵素反応の速度論的解析から、酵素と基質の親和性の変化によるのではなく酵素蛋白の量的増加によることが明らかとなった。グルタチオン (GSH) は生体内における解毒作用に重要な働きをしていて、細胞内の GSH 濃度が低下している条件下では薬毒物の毒性が容易に発現し、また、その程度も強く現れるといわれる。そこで、肝 GSH レベルを低下させたときに Me-DDC による

ALA synthetase 活性の変化にどのような影響が出るのかを検討した結果, GSH 枯渇剤のホロンを前処置して肝 GSH レベルを低下させると, Me-DDC による ALA synthetase 活性の増加は完全に抑制されることが分かった。この現象が Me-DDC に特有の現象なのか, 他の ALA synthetase 誘導剤についても同様の現象が見られるのかについては興味の持たれるところであり, 今後の検討課題としたい。

文 献

- 1) 新垣光雄: ジスルフィラムのラット肝 δ -アミノレブリン酸合成酵素活性に対する影響。長崎県立女子短期大学研究紀要。42: 9-14, 1994.
- 2) 新垣光雄: ジスルフィラムのラット肝 δ -アミノレブリン酸合成酵素活性に対する影響, -ジスルフィラムの代謝産物の影響-。長崎県立女子短期大学研究紀要。44: 21-26, 1996.
- 3) 有吉敏彦: 薬物代謝。初版。pp. 226-238, 広川書店。東京。1986.
- 4) Axelrod J, Reichenthal J and Brodie J: Mechanism of the potentiating action of β -diethylaminoethyldiphenylpropylacetate. J. Pharmac. Exptl. Ther. 112: 49-54, 1954.
- 5) Costa LG and Murphy SD: Effect of diethylmaleate and other glutathion depletors on protein synthesis. Biochem. Pharmacol. 35: 3383-3388, 1986.
- 6) De Mateis F and Gibbs A: Stimulation of liver 5-aminolevulinic acid synthetase by drugs and its relevance to drug-induced accumulation of cytochrome P-450. Studies with phenylbutazone and 3,5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine. Biochem. J. 126: 1149-1160, 1972.
- 7) Faiman MD, Dodd DE and Hanzlik RE: Distribution of S^{35} disulfiram and metabolites in mice, and metabolism of S^{35} disulfiram in the dog. Res. Commun. Chem. Path. Pharmac. 21: 543-567, 1978.
- 8) Faiman MD, Artman L and Maziasz T: Diethyldithiocarbamic acid-methyl ester distribution, elimination and LD_{50} in the rat after intraperitoneal administration. Alcoholism. 7: 307-311, 1983.
- 9) Kaplowitz N, Aw TY and Ookhtens M: The regulation of hepatic glutathion. Ann. Rev. Pharmacol. 25: 715-744, 1985.
- 10) 加藤隆一, 鎌滝哲也編: 薬物代謝学。第1版。pp 183-184, 東京化学同人。東京。1995.
- 11) Kosower NS and Kosower EM: The glutathion status of cells. Int. Rev. Cytol. 54: 109-160, 1978.
- 12) Marver HS, Collins A, Tschudy DP and Reichgl M Jr: δ -Aminolevulinic acid synthetase II. Induction in rat liver. J. Biol. Chem. 241: 4323-4329, 1966.
- 13) Mays DC, Nelson AN, Lam-Holt J, Faug AH and Lipsky JJ: S-methyl-N, N-diethylthiocarbamate sulfoxide and S-methyl-N, N-diethylthiocarbamate sulfone, two candidates for the active metabolite of disulfiram. Alcoholism. 20: 595-600, 1996.
- 14) Petersen EN: The pharmacology and toxicology of disulfiram and its metabolites. Acta Psychiatr. Scand. 86: 7-13, 1992.
- 15) Zemaitis MA and Greene FE: Impairment of hepatic microsomal drug metabolism in the rat during daily disulfiram administration. Biochem. Pharmacol. 25: 1355-1360, 1976.

(受付 1998-9-21)