

Catecholamine Metabolism in Experimental Phenylketonuria of Rat I . Effects of Maternal Phenylalanine or Tyrosine Hydroxylase Inhibition on Postnatal Maturation of Catecholamine and Amino Acid Metabolism in Rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8202

ラットを用いた実験的フェニールケトン尿症における カテコールアミン代謝

I. 母体フェニールアラニンおよびチロジン水酸化酵素欠損が 仔の発育に及ぼす影響

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

村 田 明 聡

(平成2年6月18日受付)

母体におけるフェニールアラニン水酸化酵素 (phenylalanine hydroxylase, PH) およびチロジン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) の阻害が, 仔における生後のカテコールアミン, サイロキシンおよびアミノ酸代謝成熟過程に与える影響について, ラットを用いて検討した. 妊娠第2週目のラットに, L-para-chloro-phenylalanine 100 mg/kg を隔日3回腹腔内注射するとともに, 飲用水に0.2%の濃度でフェニールアラニンを添加したところ, 仔において低出生体重, 生後の体重増加不良, 脳重量の低下および大脳の TH 活性・副腎のエピネフリンおよび腎のノルエピネフリン含量・血漿および脳の遊離アミノ酸濃度の低下を認めるとともに, 体温調節能の成熟に遅延を認めた. これに対して, 飲用水に対する0.2%のチロジン添加に加え, α -methyl-para-tyrosine 100 mg/kg の投与は, 仔の大脳 TH 活性と血清サイロキシン濃度の低下および大脳ドーパミン含量の増加をもたらしたが, 発育全般に対する影響は認めなかった. これらのことは, 母体の PH の阻害が TH の阻害に比し, カテコールアミン, アミノ酸代謝を含めた仔の発育過程に対し, より重度の障害を与えることを示唆する.

Key words maternal phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, catecholamine

フェニールケトン尿症 (phenylketonuria, PKU) は, Folling¹⁾により, 尿中へのフェニール焦性ぶどう酸の排泄を伴う痴呆性疾患として初めて報告され, Imbecillitas phenylpyruvica と呼ばれた. その後, Jervisにより常染色体劣性形式をとる遺伝性疾患であり, 肝酵素であるフェニールアラニン水酸化酵素 (phenylalanine hydroxylase, PH) (EC1, 14, 16, 1) の欠損による先天性代謝異常として定義された²⁾. 以後, PH 欠損以外に PH の補酵素である tetra-hydrobiopterin や dihydropteridine reductase の欠損によっても同様の症状を呈することが報告され³⁻⁶⁾, 異型フェニールケトン尿症 (atypical phenylketonuria)

と呼ばれており, PH 欠損による古典的 PKU とは区別されている. いずれにせよ, 重度の知能障害を伴うが, 古典的 PKU では, 生後早期より低フェニールアラニン食療法を行ない, フェニールアラニン (phenylalanine, Phe) の血中濃度を正常域にコントロールすることにより, 知能障害を予防することが可能である. しかし, 患者の多くは, 妊孕年令に達する頃にはすでに食事療法を中止しており, 再び, 高 Phe 血症の状態となっている.

Dent⁷⁾は PKU の母親から生まれた知能障害児3例を報告したが, これらの児は, いずれも遺伝子型としては PKU ではなかったものの, 胎児期に胎盤を通し

Abbreviations: α -MT, α -methyl-para-tyrosine; BAT, brown adipose tissue; CA, catecholamine; DA, dopamine; E, epinephrine; NE, norepinephrine; PCPA, L-para-chloro-phenylalanine; PH, phenylalanine hydroxylase; Phe, phenylalanine; PKU, phenylketonuria; T₄, thyroxine; TH, tyrosine hydroxylase; Tyr, tyrosine

て Phe の高い母体血にさらされたため、知能障害がもたらされたと考えられた。以来、Stevenson ら⁸⁾のほか Fisch ら⁹⁾や Lenke ら¹⁰⁾の同様の報告が続き、母性フェニルケトン尿症 (maternal phenylketonuria, 母性 PKU) の概念が築き上げられ、受胎前からの Phe 血中濃度のコントロールの重要性が、その予防策として強調されている。母性 PKU の臨床像としては、子宮内発育遅延・小頭症・先天性心奇形に加え、知能障害・出生後の発育障害が多くみられ、股関節脱臼・斜視などの報告も散見される。Richards によると、児にみられる知能障害は、母親のそれより程度がひどいとも言われている¹¹⁾。妊娠中の母体の高 Phe 血症が、これらの原因と考えられてはいるが、発育障害や知能障害の真のメカニズムについては、未だ不明である。

古典的 PKU は、PH の欠損により Phe から tyrosine (Tyr) への代謝が障害され、血中の Phe の上昇および Tyr の低下がその特徴である¹²⁾。しかしながら、Tyr からさらに合成されるカテコールアミン (catecholamine, CA) やサイロキシン (thyroxine, T₄) にも異常をきたすことは容易に想像される。実際、古典的 PKU においては、脳の CA やセロトニン代謝の障害についても文献的に報告されている¹³⁾。一方、母体 PKU における CA や T₄ に焦点を絞った研究は少ない。

今回著者は、妊娠中の母体における PH およびチロジン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) (EC1, 14, 16, 2) 活性の阻害が、児の CA, T₄, アミノ酸代謝に与える影響について、比較検討した。

材料および方法

I. 実験動物

1. 母体におけるフェニルアラニン水酸化酵素 (PH) およびチロジン水酸化酵素 (TH) の阻害方法

Wistar 系妊娠ラットを用い、妊娠第 2 週目より実験期間中を通し、0.2% L-Phe (Sigma, St. Louis, U.S.A.) または L-Tyr (Sigma) を飲用水として投与したものを、P 群、T 群とした、これらの飲用水に加え、PH または TH を阻害するため、妊娠第 2 週目にそれぞれ 100mg/kg の L-para-chloro-phenylalanine¹⁴⁾ (PCPA) (Sigma) ないし α -methyl-para-tyrosine¹⁵⁾ (α -MT) (Sigma) を隔日 3 回腹腔内投与し、PC 群、TM 群とした。また、飲用水に対する添加は行わず、生理食塩水を腹腔内投与したものを対照群 (C 群) とした。

新生仔ラットは、生後 3 週間、哺乳のため母ラット

と同一ケージにて飼育した。

2. 新生仔ラットの処理

生後 1 週および 2 週目に、同腹ラットの半数分を断頭屠殺により採血、遠心後得られた血漿は直ちに 10mg/ml のズルホサリチル酸を用いて除蛋白、上清を -20°C にて凍結保存し、遊離アミノ酸分析に供した。また脳については、摘出後、重量を測定し、片側の大脳を 1ml の 0.1M 過塩素酸を用いてホモジュネート、4°C、2,500rpm で 10 分間遠心後、上清を -20°C にて凍結保存、CA の測定および遊離アミノ酸分析を行なった。さらに、副腎および腎臓を摘出し、同様の方法でホモジュネート処理し、CA を測定した。また、残りの片側大脳は、1ml の 0.25M 蔗糖を用いホモジュネート、遠心した上清にて TH 活性および蛋白濃度を測定した。

3. 寒冷暴露実験

残りの半数分の新生仔ラットについては、すでに体温調節が確立している生後 4 週目に、室温 (22°C) および寒冷暴露負荷 (5°C, 1 時間) 後に、電子体温計を用いて腋下の体温を測定、さらに、脳、副腎、肩甲間褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) および血液を採取し、上記と同様の方法で処理、CA を測定した。

II. 測定方法

1. カテコールアミン (CA)

CA は、以下の方法で測定した。ホモジュネート上清 0.5ml にトリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) 0.5ml、活性アルミナ (和光純薬、大阪) 50mg、ジヒドロキシベンジルアミン (Sigma) 10ng を添加、30 分静かに振盪した後、遠心、沈殿物を 2ml の蒸留水を用いて 3 回洗浄した。アルミナに吸着された CA は、100 μ l の 0.1M 過塩素酸で溶出させ、その 20 μ l を用い、Shimadzu LC-5A (Shimadzu, Kyoto) にて高速液体クロマトグラフィー法により CA を測定、電気化学検出器 Coulochem 5100A (ESA Inc., Bedford, U.S.A.) にて記録した。

2. アミノ酸の定量

血漿及び脳における遊離アミノ酸濃度は、アミノ酸自動分析機 LKB-4150 (LKB Biochrom, Cambridge, England) にて測定した。

3. TH 性の測定

TH 性の測定については、Nagatsu らの方法¹⁶⁾に従い、以下に行なった。ホモジュネート上清 200 μ l に 1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 100 μ l, 1mM L-Tyr 150 μ l, 10mM 硫酸第一鉄アンモニウム (和光純薬) 10 μ l, 1M2-メルカプトエタノール (和光純薬) に溶解した 10mM 6-メチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ

テブリン (Sigma) 50 μ l を加え、37°Cで20分間インキュベートした後、氷冷 0.5M過塩素酸 3.0ml を加え、10分後に氷冷 1 M炭酸カリウム (和光純薬) 1.8 ml 添加し、遠心した。遠心上清を二重カラム (上部、アンバーライト CG-50 pH 6.1, 0.5ml; 下部、活性アルミナ 0.5g) に通し、5ml の蒸留水で 5 回洗浄した。活性アルミナに吸着した L-ドーパを 0.5M酢酸 1.0 ml に溶出し、Johnson ら¹⁰⁾の方法で L-ドーパを定量した。TH 活性は、産生された L-ドーパ量 (nmol/hr/mg protein) で示した。

4. 蛋白の定量

蛋白濃度は、tonein TP 法 (Otsuka Assay Lab., Tokushima) にて定量した。

5. T₄の定量

血清 T₄の定量は、Eiken T₄RIA kit (栄研化学, 東京) を用い、ラジオイムノアッセイ法により行なった。

6. 統計学的処理

結果は、平均 \pm 標準偏差で示し、平均値の差の検討は一元配置分散分析後、Scheffé の多重比較を行なっ

た。危険率 5%以下をもって有意とした。

成 績

I. 母体 PH および TH 阻害が新生仔に与える影響

1. 体重および脳重量

生下時体重は、コントロールの C 群では 5.6 \pm 0.2g であったのに対し、PH を阻害した PC 群では 5.0 \pm 0.5g と有意に低く (p<0.01)、生後 4 週齢における体重も、それぞれ 78 \pm 7g, 63 \pm 4g と PC 群で低いままであった (p<0.01)。これに対し、単に Phe を与えた P 群、および、Tyr を与えた T 群においては生下時より生後 2 週齢まで有意に対照より重かった (p<0.01) (表 1)。

脳の重量も、PC 群では 2 週齢において 778 \pm 64 mg と C 群における 877 \pm 46mg に比し低かったのに対して (p<0.01)、P 群、T 群では 1 週齢で C 群よりも高かった (p<0.01)。すなわち、Phe および Tyr の負荷は、仔の子宮内および生後の発育を明らかに促進していた (表 2)。

Table 1. Body weight gain

Group	Birth weight		1 w of age		2 ws of age		4 ws of age #	
	g	(n)	g	(n)	g	(n)	g	(n)
C	5.6 \pm 0.2	(4)	10.3 \pm 0.6	(6)	28.7 \pm 2.0	(6)	78 \pm 7	(5)
P	6.7 \pm 0.1	(12)★	15.5 \pm 0.5	(6)★	38.2 \pm 1.2	(6)★	88 \pm 6	(5)
PC	5.0 \pm 0.5	(14)★	9.4 \pm 0.7	(6)	26.5 \pm 2.7	(6)	63 \pm 4	(5)★
T	6.4 \pm 0.3	(15)★	13.1 \pm 1.4	(6)★	33.4 \pm 1.7	(6)★	74 \pm 3	(5)
TM	5.6 \pm 0.2	(13)	11.4 \pm 0.9	(6)	29.2 \pm 0.9	(6)	77 \pm 3	(5)

C, no supplementation to drinking water and saline injection.

P, 0.2% phenylalanine (Phe) solution was given as drinking water.

PC, 0.2% Phe and para-chloro-phenylalanine injection.

T, 0.2% tyrosine (Tyr) as drinking water.

TM, 0.2% Tyr and α -methyl-para-tyrosine injection.

#, The rats 4 weeks of age are different litters from those aged 1 and 2 weeks.

n, numbers of animal tested.

Values are mean \pm SD. ★, P<0.01 vs control.

Table 2. Weight of the cerebrum

Group	1 w of age		2 ws of age		4 ws of age	
	mg	(n)	mg	(n)	mg	(n)
C	368 \pm 33	(6)	877 \pm 46	(6)	1109 \pm 26	(5)
P	477 \pm 7	(6)★	965 \pm 33	(6)☆	1124 \pm 54	(5)
PC	364 \pm 14	(6)	778 \pm 64	(6)★	998 \pm 17	(5)
T	452 \pm 25	(6)★	886 \pm 25	(6)	1131 \pm 39	(5)
TM	385 \pm 15	(6)	825 \pm 20	(6)☆	1026 \pm 100	(5)

Abbreviations of the groups, see the footnote of Table 1.

n, numbers of animal tested.

Values are mean \pm SD. ☆, P<0.05; ★, P<0.01 vs control.

2. 大脳のチロジン水酸化酵素 (TH) 活性 (表 3)

2 週齢における大脳の TH 活性は, PC 群 232 ± 35 pmol/hr/mg protein, C 群 600 ± 178 pmol/hr/mg protein と PC 群で C 群に比し有意に低かった ($p < 0.01$). また, T 群および TM 群においても 2 週齢で, それぞれ 227 ± 132 , 280 ± 100 pmol/hr/mg protein と低かったが ($p < 0.01$, $p < 0.05$), いずれも一過性で 4 週齢では C 群との間に有意な差を認めなかった.

3. 組織におけるカテコールアミン (CA) 含量 (図 1)

大脳の norepinephrine (NE) 含量は, 1 週齢, 2 週齢それぞれ C 群が 44 ± 3 , 132 ± 8 ng/g brain であったのに対し, PC 群ではそれぞれ 56 ± 12 , 154 ± 15 ng/g brain と高かった ($p < 0.01$). しかし, この群での副腎 epinephrine (E) 含量は, 1 週齢 293 ± 41 ng/gland, 2 週齢 663 ± 72 ng/gland と C 群のそれぞれ 354 ± 21 , 969 ± 131 ng/gland に比し低く, また, 腎 NE 含量については, 1 週齢 2.2 ± 0.7 ng/kidney と C 群の 4.0 ± 0.9 ng/kidney に比し低かった ($p < 0.01$). 一方, TM 群 2 週齢の副腎 E および腎のドーパミン (DA) は, ともに低下していた ($p < 0.05$).

4. 血清 T_4 濃度 (表 4)

血清 T_4 を見ると, 1 週齢, 2 週齢とも P 群では C 群より高値をとる傾向が認められたが, 有意なものではなかった. また, T 群および TM 群では 4 週齢において, ともに $2.4 \pm 0.3 \mu\text{g}/100\text{ml}$ で, C 群の $3.3 \pm 0.5 \mu\text{g}/100\text{ml}$ に比し低値であった ($p < 0.05$). 一方, PC 群における血清 T_4 には, 有意な変化は認められなかった.

5. 血漿および脳の遊離アミノ酸の変動

血漿アミノ酸は, 1 週齢の P 群で C 群に比し 160% と増加していたが, 他の群では明らかな変化は認めなかった. しかしながら, 2 週齢における PC 群は対照

の 54% と低下を示しており, 4 週齢には正常化していた (図 2).

一方, 脳の遊離アミノ酸は, 生後 1~2 週においては変化なく, 生後 4 週目の PC 群において, 総アミノ酸および taurine, phosphoethanolamine, aspartate, γ -aminobutyric acid を含む主要アミノ酸およびアミン類が, C 群におけるレベルの 55% に減少していた (図 3).

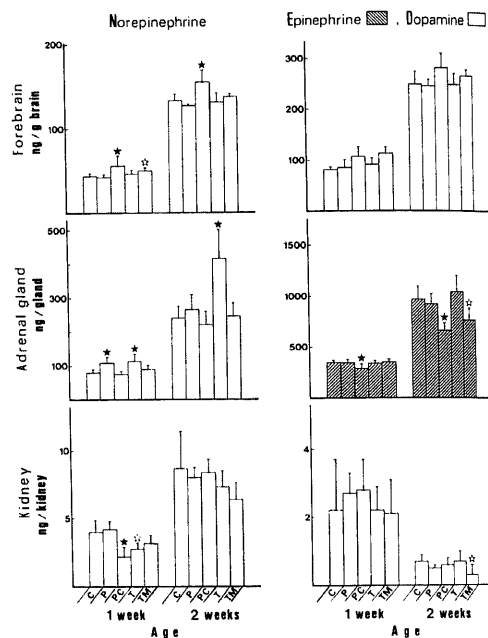


Fig. 1. Catecholamine contents in the forebrain (upper panel), adrenal gland (middle panel) and kidney (lower panel) at 1 and 2 weeks of age. Left panels, norepinephrine; right panels, dopamine (□) or epinephrine (▨). Abbreviations of the experimental groups, see the footnote of Table 1. ☆, $p < 0.05$; ★, $p < 0.01$ vs control.

Table 3. Tyrosine hydroxylase (TH) activity in the brain

Group	TH activity (pmol/hr/mg protein)		
	1 week (n)	2 weeks (n)	4 weeks (n)
C	531 ± 254 (6)	600 ± 178 (6)	112 ± 26 (5)
P	419 ± 207 (6)	734 ± 189 (6)	116 ± 20 (5)
PC	234 ± 86 (6)	232 ± 35 (6)★	123 ± 4 (5)
T	519 ± 87 (6)	227 ± 132 (6)★	107 ± 15 (5)
TM	527 ± 81 (6)	280 ± 100 (6)☆	116 ± 35 (5)

Abbreviations of the groups, see the footnote of Table 1.
n, numbers of animal tested.
Values are mean \pm SD. ☆, $P < 0.05$; ★, $P < 0.01$ vs control.

II. 母体の PH, TH 活性阻害が子の体温調節機構成熟に与える影響 (図4)

生後4週において、室温22°Cにおける体温は各群間に差は認めなかったが、5°Cに1時間の寒冷暴露を行った後では、C群が36.0±1.4°Cであったのに対し、PC群では33.6±0.6°Cと有意に低かった (p<0.05)。

T群および TM群においてもC群より低い傾向にあったが、有意なものではなかった。これら低体温をきたした群では、寒冷暴露後の大脳 DA 濃度が増加していた。また、PC群で副腎 NE 含量の減少、BAT 重量の低下を、PC群、TM群の BAT の NE 含量の増加を認めたことは、これらの群における BAT での

Table 4. Serum thyroxine concentration

Group	Thyroxine (μg/100 ml)		
	1 week (n)	2 weeks (n)	4 weeks (n)
C	1.2±0.2 (6)	2.7±0.4 (6)	3.3±0.5 (5)
P	1.7±0.3 (6)	3.6±0.5 (6)	2.8±0.4 (5)
PC	1.3±0.7 (6)	2.8±1.0 (6)	3.1±0.5 (5)
T	1.3±0.2 (6)	2.8±0.6 (6)	2.4±0.3 (5)☆
TM	1.0±0.7 (6)	2.2±0.2 (6)	2.4±0.3 (5)☆

Abbreviations of the groups, see the footnote of Table 1.
n, numbers of animal tested.
Values are mean ± SD. ☆, P<0.05 vs control.

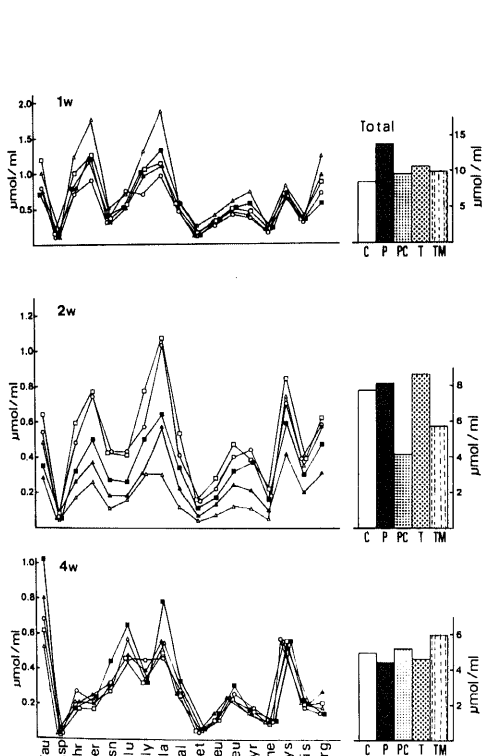


Fig. 2. Total (right column) and free amino acid and taurine (left panel) concentrations in plasma at 1, 2 and 4 weeks of age. Group C (□, ○); group P (■, △); group PC (▨, ▲); group T (▩, □); group TM (▧, ■). Abbreviations of the experimental groups, see the footnote of Table 1.

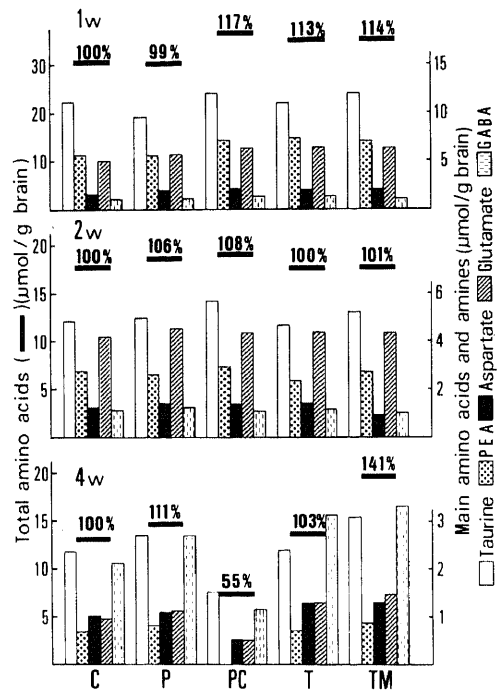


Fig. 3. Total amino acid (horizontal bar) and main physiological amine (vertical column) concentrations in the brain at 1, 2 and 4 weeks of age. (□), taurine; (▨), phosphoethanolamine; (■), aspartate; (▩), glutamate; (▧), γ-amino-butyric acid (GABA). Numbers on the horizontal bar, per cent of the control level (100%) of total amino acids. Abbreviations of the experimental groups, see the footnote of Table 1.

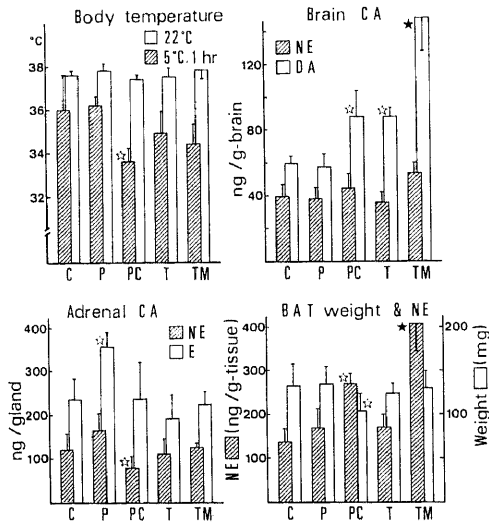


Fig. 4. Changes in body temperature (left upper panel), catecholamine (CA) contents in the brain (right, upper), adrenal gland (left lower) and brown adipose tissue (BAT) (right lower) and BAT weight (right lower) after cold exposure (5°C, 1 hr) at 4 weeks of age. Symbols of open (□) and shaded (▨) column are indicated in each panel. NE, norepinephrine; E, epinephrine; DA, dopamine. ☆, $p < 0.05$; ★, $p < 0.01$ vs control.

熱産生の亢進を示唆するものと思われる。

考 察

今回の結果は、ラットの妊娠第2週における母体のフェニールアラニン水酸化酵素 (PH) の阻害はチロジン水酸化酵素 (TH) の阻害に比べ、仔の生後の発育に対しより大きな障害をもたらすことを示している。母体の PH 活性を阻害した PC 群では、仔に低出生体重、体重増加不良、脳発育不良を呈していたが、これらの所見は、母性 PKU の臨床症状の特徴と一致するものである⁷⁾。さらに、今回の実験では、PC 群に熱産生の障害も認められたが、母性 PKU における仔の熱産生に関する報告は、動物実験においても見当たらない。PC 群に比べると、TH 活性を阻害した TM 群は CA および T_4 代謝に対して、それ程大きな影響を与えてはいなかった。L-para-chloro-phenylalanine (PCPA) は、PH のみならずトリプトファン水酸化酵素をも阻害することは、よく知られており¹⁸⁾、これが α -MT に比し PCPA の障害性がより強い理由の一つなのかもしれない。しかし、必須アミノ酸である Phe の生理的役割自体が Tyr のそれよりも、発育や

発達に対し、より本質的である可能性もある。

今回著者は、PH 活性自体の測定は行なっていないが、PCPA および α -MT の作用に関する基礎データは、文献的に明らかにされている¹⁸⁾¹⁹⁾。Chang らによれば、ラットに対して PCPA 360 mg/kg を1回投与すると、肝臓の PH 活性が24時間後には90%不可逆的に阻害されると言われている²⁰⁾。著者は、PCPA の酵素活性阻害作用が6日間継続する¹⁹⁾とされていることより、文献的に指摘されている PCPA の非特異的な毒性²¹⁾²²⁾を除外する目的で、約3分の1の量である、100mg/kg を妊娠第2週に隔日3回投与した。

妊娠中の PCPA、Phe の併用および α -MT、Tyr の併用処置が、仔の発育や CA、アミノ酸代謝に長期にわたる影響を及ぼすことは、興味深い。PC 群においては、生後間もない時期の大脳 CA の小さな変化が、体温調節能が確立されているはずの生後4週目にも関わらず、中枢神経系、副腎、肩甲間褐色脂肪組織を含む体温調節機構に大きな障害を及ぼしていた。また、血漿および脳でのアミノ酸濃度は、それぞれ生後2週および4週目で低下していた。高フェニールアラニン血症は、未成熟なラットにおいても成人ラットと同様、脳における他の必須アミノ酸の低下をもたらすと言われている²³⁾。

母性 PKU における症状のうち、最も問題とされる知能障害の成因については、種々の検討がなされているが、知能障害の本質を追求することは困難であり、現象面のみでみるしかない。PKU 患者の脳においては、DNA、RNA、蛋白の減少²⁴⁾²⁵⁾などといった生化学的変化を認めるが、これは、ポリリボソームの解離²⁶⁾²⁷⁾と関連し、脳における蛋白合成障害を示唆するものと考えられる。また、病理学的に観察される脱髄の所見は、ミエリンの形成障害をその原因として考えさせる²⁸⁾³¹⁾。これらの現象を引き起こす一次的な要因として、高濃度で血中に存在する Phe ないしはその代謝産物自体³²⁾、あるいは、他のアミノ酸も含めたアミノ酸不均衡の関与³³⁾³⁵⁾などが推察され、さらに、二次的に影響を受けるであろう CA¹³⁾、トリプトファン³⁶⁾³⁷⁾、セロトニン³⁸⁾などの変化が関わっている可能性もある。

著者は、今回用いた処置により観察された PCPA の長期にわたり仔に及ぼす効果に関しては、以下のよう考える。すなわち、新生仔ラットへの Phe 投与が、まず、脳におけるポリリボソームの解離をきたし、モノソーム型のリボソームを増やす³⁹⁾。これらのモノソーム型リボソームは、脳における蛋白合成には利用されることなく、細胞質内に不活性の状態で存在

することが、知られている²⁰⁾。Phe によってもたらされるこれらの変化には、年齢依存性があり、幼若ラットでは感受性が高いが、成人ラットでは抵抗性を有することから、もし、これらの変化が胎児期の脳に起こるとすれば、多くの系に影響を与え、蛋白合成の障害に基づく様々な異常をきたすのではなからうか。

しかしながら、その確かなメカニズムの解明には、さらに検討を要するものと思われる。

結 論

妊娠中の母体におけるフェニールアラニン水酸化酵素 (PH) およびチロジン水酸化酵素 (TH) の阻害が、新生仔に与える影響を調べ、次の結論を得た。

1. 母体における TH の阻害では、仔のカテコールアミンや T₄ の低下が認められた。

2. 母体における PH の阻害は仔において、低体重、脳重量低下、エピネフリン、ノルエピネフリンの低下、および、血漿、脳におけるアミノ酸濃度の低下など、広範囲な影響が見られた。

3. PH の阻害によって、仔の体温調節機構の成熟に障害が認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に、深く感謝致します。また、直接の御助言と多大なる御指導をいただきました佐藤保助教授に対し、厚く御礼申し上げます。さらに、御指導、御協力いただいた金沢大学小児科学教室諸兄に対し、重ねて御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 4 回国際先天代謝異常学会 (1987 年 5 月、仙台) において発表した。

文 献

- 1) Fölling, A.: Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechsellomalie in Verbindung mit Imbezillität. *Z. Physiol. Chem.*, **227**, 169-176 (1934).
- 2) Jervis, G. A.: The genetics of phenylpyruvic oligophrenia. (A contribution to the study of the influence of heredity on mental defect.) *J. Ment. Sci.*, **85**, 719-762 (1939).
- 3) Jervis, G. A.: Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **82**, 514-515 (1953).
- 4) Smith, I., Clayton, B. E. & Wolff, O. H.: New variant of phenylketonuria with progressive neurological illness unresponsive to phenylalanine restriction. *Lancet*, **1**, 1108-1111 (1975).
- 5) Kaufman, S., Holtzman, N. A., Milstien, S., Butler, I. J. & Krumholz, A.: Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase. *N. Engl. J. Med.*, **293**, 785-790 (1975).
- 6) Kaufman, S., Berlow, S., Summer, G. K., Milstien, S., Schulman, J. D., Orloff, S., Spielberg, S. & Puschel, S.: Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of biopterin. A variant form of phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.*, **299**, 673-679 (1978).
- 7) Dent, C. E.: Report of Twenty-third Ross Pediatric Research Conference, p32-33, Columbus, Ohio, 1957.
- 8) Stevenson, R. E. & Huntley, C. C.: Congenital malformations in offspring of phenylketonuric mothers. *Pediatrics*, **40**, 33-45 (1967).
- 9) Fisch, R. O., Doeden, D., Lansky, L. L. & Anderson, J. A.: Maternal phenylketonuria. Detrimental effects on embryogenesis and fetal development. *Am. J. Dis. Child.*, **118**, 847-858 (1969).
- 10) Lenke, R. R. & Levy, H. L.: Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 1202-1208 (1980).
- 11) Richards, B. W.: Maternal phenylketonuria. *Lancet*, **1**, 829 (1964).
- 12) Tourian, A. & Sidbury, J. B.: Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. In J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein & M. S. Brown (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, 5th ed. p270-286, McGraw-Hill, New York, 1983.
- 13) McKean, C. M.: The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism in the human brain. *Brain Res.*, **47**, 469-476 (1972).
- 14) Lipton, M. A., Gordon, R., Guroff, G. & Udenfriend, S.: p-Chlorophenylalanine-induced chemical manifestations of phenylketonuria in rats. *Science*, **156**, 248-250 (1967).
- 15) Udenfriend, S., Zaltzman-Nirenberg, P. & Nagatsu, T.: Inhibitors of purified beef adrenal tyrosine hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 837-845 (1965).

- 16) Nagatsu, T., Oka, K., Numata, Y. & Kato, T.: A simple and sensitive fluorescence assay for tyrosine hydroxylase activity. *Anal. Biochem.*, **93**, 82-87 (1979).
- 17) Johnson, J. C., Gold, G. J. & Clouet, D. H.: An improved method for the assay of dopa. *Anal. Biochem.*, **54**, 129-136 (1973).
- 18) Koe, B. K. & Weissman, A.: p-Chlorophenylalanine. A specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **154**, 499-516 (1966).
- 19) Delvalle, J. A. & Greengard, O.: The regulation of phenylalanine hydroxylase in rat tissues in vivo. The maintenance of high plasma phenylalanine concentrations in suckling rats. A model for phenylketonuria. *Biochem. J.*, **154**, 613-618 (1976).
- 20) Chang, N., Kaufman, S. & Milstien, S.: The mechanism of the irreversible inhibition of rat liver phenylalanine hydroxylase due to treatment with p-chlorophenylalanine. The lack of effect on turnover of phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2665-2668 (1979).
- 21) Delvalle, J. A., Diemel, G. & Greengard, O.: Comparison of α -methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalaninemia in developing rats. *Biochem. J.*, **170**, 449-459 (1978).
- 22) Lane, J. D., Schöne, B., Langenbeck, U. & Neuhoff, V.: Characterization of experimental phenylketonuria. Augmentation of hyperphenylalaninemia with α -methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta*, **627**, 144-156 (1980).
- 23) McKean, C. M., Boggs, D. E. & Peterson, N. A.: The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentrations of essential amino acids in brain. *J. Neurochem.*, **15**, 235-241 (1968).
- 24) Brass, C. A., Isaacs, C. E., Mcchesney, R. & Greengard, O.: The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development. A new animal model of maternal phenylketonuria. *Pediatr. Res.*, **16**, 388-394 (1982).
- 25) Spero, D. A. & Yu, M. C.: Effect of maternal hyperphenylalaninemia on fetal brain development. A biochemical study. *Exp. Neurol.*, **79**, 641-654 (1983).
- 26) Wong, P. W. K., Fresco, R. & Justice, P.: The effect of maternal amino acid imbalance on fetal cerebral polyribosomes. *Metabolism*, **21**, 875-881 (1972).
- 27) Copenhaver, J. H., Vacanti, J. P. & Carver, M. J.: Experimental maternal hyperphenylalaninemia. Disaggregation of fetal brain ribosomes. *J. Neurochem.*, **21**, 273-280 (1973).
- 28) Alvord, E. C., Stevenson, L. D., Vogel, F. S. & Engel, R. L.: Neuropathological findings in phenyl-pyruvic oligophrenia (Phenylketonuria). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **9**, 298-310 (1950).
- 29) Crome, L. & Pare, C. M. B.: Phenylketonuria. A review and a report of the pathological findings in four cases. *J. Ment. Sci.*, **106**, 862-883 (1960).
- 30) Loo, Y. H., Hyde, K. R., Lin, F. H. & Wisniewski, H. M.: Cerebral biochemical abnormalities in experimental maternal phenylketonuria. Gangliosides and sialoglycoproteins. *Life Sci.*, **37**, 2099-2109 (1985).
- 31) Hirano, S., Takagi, Y., Kanamatsu, T. & Nakai, K.: Effects of hyperphenylalaninemia in the fetal stage on the postnatal development of fetal rat brain. *Neurochem. Res.*, **10**, 1071-1081 (1985).
- 32) MacInnes, J. W. & Schlesinger, K.: Effects of excess phenylalanine on vitro and in vivo RNA and protein synthesis and polyribosome levels in brains of mice. *Brain Res.*, **29**, 101-110 (1971).
- 33) Carver, M. J., Copenhaver, J. H. & Serpan, R. A.: Free amino acids in foetal rat brain. Influence of L-phenylalanine. *J. Neurochem.*, **12**, 857-861 (1965).
- 34) Kerr, G. R. & Waisman, H. A.: Dietary induction of hyperphenylalaninemia in the rat. *J. Nutr.*, **92**, 10-18 (1967).
- 35) 周 逸人: 母性フェニールケトン尿症ならびに母性ヒスチジン血症の発症機転に関する実験的研究. *阪市医誌*, **26**, 137-144 (1977).
- 36) Aoki, K. & Siegel, F. L.: Hyperphenylalaninemia. Disaggregation of brain polyribosomes in young rats. *Science*, **168**, 129-130 (1970).
- 37) Siegel, F. L., Aoki, K. & Colwell, R. E.: Polyribosome disaggregation and cell-free protein synthesis in preparations from cerebral cortex of

hyperphenylalaninemic rats. *J. Neurochem.*, 18, 537-547 (1971).

38) Woolley, D. W. & Hoeven, T. H.: Serotonin deficiency in infancy as one cause of a mental defect in phenylketonuria. *Science*, 144, 883-884

(1964).

39) Taub, F. & Johnson, T. C.: The mechanism of polyribosome disaggregation in brain tissue by phenylalanine. *Biochem. J.*, 151, 173-180 (1975).

Catecholamine Metabolism in Experimental Phenylketonuria of Rat I. Effects of Maternal Phenylalanine or Tyrosine Hydroxylase Inhibition on Postnatal Maturation of Catecholamine and Amino Acid Metabolism in Rats Akisato Murata, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juzen Med. Soc.*, 99, 545—553 (1990)

Key words maternal phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, catecholamine

Abstract

The effects of the inhibition of maternal phenylalanine (Phe) or tyrosine (Tyr) hydroxylase on the postnatal maturation of catecholamine, thyroxine and amino acid metabolisms were examined in young rats. The three intraperitoneal injections of 100 mg/kg L-para-chloro-phenylalanine during the second gestational week together with 0.2% Phe solution as drinking water produced a marked reduction, in body weight at birth, body weight gain, brain weight, cerebral Tyr hydroxylase activity, adrenal epinephrine, renal norepinephrine and free amino acids in the plasma and brain as well as delayed maturation of thermoregulation in the offspring. In contrast, the administration of 100 mg/kg α -methyl-para-tyrosine with 0.2% Tyr supplementation did not affect the general growth, but only decreased cerebral Tyr hydroxylase and serum thyroxine level, while cerebral dopamine was increased. These results indicate that maternal Phe hydroxylase inhibition induces a more severe growth failure, including catecholamine and amino acid metabolism, than Tyr hydroxylase inhibition in postnatal development.