

Catecholamine Metabolism in Experimental Phenylketonuria of Rat II. Catecholamine Metabolism and Homeothermic Maturation in Offspring of Maternal Phenylketonuria

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/2297/8203

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

II. 母性フェニールケトン尿症より出生した新生仔の カテコールアミン代謝と体温調節機構の成熟

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)

ラットにおいて、母性フェニールケトン尿症 (maternal phenylketonuria, 母性 PKU) が、仔の発育、体温調節機構の成熟、カテコールアミン (catecholamine, CA) 代謝に与える影響について検討した。母性 PKU の実験モデルは、妊娠ラットに対し、食飼中にフェニールアラニンを3%添加すると同時に、フェニールアラニン水酸化酵素の阻害剤である L-para-chloro-phenylalanine を腹腔内投与することにより作成した。仔ラットでは、体重増加不良、脳重量の低下、および、低体温を認めた。しかし、開眼時期や驚愕反射出現時期には、有意な変化は認めなかった。また、脳、副腎、および、心において、CA 含量の低下を認めた。さらに、寒冷暴露負荷 (4°C, 3時間) では、脳、副腎での CA 含量の増加と肩甲間褐色脂肪組織での CA の低下を認めた。このような CA 代謝異常は、母性 PKU の仔において、熱産生の低下をもたらすと同時に、知能障害の原因となる可能性が考えられる。

Key words metarnal phenylketonuria, catecholamine, cold exposure, heat production, L-para-chloro-phenylalanine

母性フェニールケトン尿症 (maternal phenylketonuria, 母性 PKU) は、高フェニールアラニン血症の状態にあるフェニールケトン尿症 (phenylketonuria, PKU) の母体から生まれる児が、本来は発症しない保因者であるにもかかわらず、出生後、知能障害・小頭症・低体重・心奇形などといった異常を呈する疾患概念である¹⁾。PKU は、フェニールアラニン水酸化酵素 (phenylalanine hydroxylase, PH) (ECl, 14, 16, 1) の欠損により、フェニールアラニン (phenylalanine, Phe) からチロジン (tyrosine, Tyr) への合成過程の障害が、その病態の本質ではあるが、すでに第1編で示

したように、PH の阻害は、中枢神経系におけるカテコールアミン (catecholamine, CA) 代謝系へも強く影響を与えることが考えられる。母性 PKU において、この点に関する胎児-新生児期の詳細な研究は少ないが、その発症機序の解明は、病因的にも治療の上にも重要な課題である。そこで、今回は、母性 PKU に最も近い実験条件を設定し、母体の PH の阻害が、胎児-新生児期における神経学的発達・CA 代謝・体温調節能に及ぼす影響について、詳細に検討した。PH 阻害の特異性を調べる意味で、チロジン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase, TH) (ECl, 14, 16, 2) の阻

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

害が仔に及ぼす影響についても、併せて検討した。

材料および方法

I. フェニールケトン尿症 (PKU) 実験モデルの作成

1. 非妊娠ラット

Wistar 非妊娠成熟雌ラットを用い、フェニールアラニン (phenylalanine, Phe) およびフェニールアラニン水酸化酵素 (phenylalanine, hydroxylase, PH) の阻害剤である L-para-chloro-phenylalanine (PCPA) (Sigma, St. Louis, U.S.A.) を以下のごとく組み合わせ、PKUの実験モデルについて比較検討した。①、飲用水に0.2%となるよう Phe を添加した群 (0.2P 群)、②、①に加え、PCPA 20mg/100 g body weight を隔日4回腹腔内投与した群 (0.2PCP 群)、③、ラット用飼料 (オリエンタル酵母, 東京) に3% Phe を添加した群 (3P 群)、④、③に加え、20mg/100 g body weight の PCPA を隔日4回腹腔内投与した群 (3PCP 群) の4群を設定した。

また、チロジン水酸化酵素 (tyrosine, hydroxylase, TH) を阻害した場合と比較するため、チロジン (tyrosine, Tyr) および TH の阻害剤である α -methyl-para-tyrosine (α -MT) (Sigma) を以下のごとく組み合わせた実験モデルについても併せて検討した。⑤、飲用水に0.2%となるよう Tyr を添加した群 (0.2T 群)、⑥、⑤に加え、10mg/100 g body weight の α -MT を隔日4回腹腔内投与した群 (0.2TMT 群)、⑦、ラット用飼料に3% Tyr を添加した群 (3T 群)、⑧、⑦に加え、10mg/100 g body weight の α -MT を隔日4回腹腔内投与した群 (3TMT 群) を設定した。

いずれに対しても、無処置無添加のものを対照群 (C群) とした。

これらのラットをエーテル麻酔下に開腹、下大静脈より採血した後、肝臓を摘出した。静脈血は、直ちに ethylenediaminetetraacetic acid 入り試験管に移し遠心、得られた血漿は -20°C にて保存、Phe および Tyr の測定に供した。また、肝臓は9容の0.15M塩化カリウムを用いてホモジェネート後、16,000 \times gにて15分遠心、上清を用いて PH 活性を測定した。

2. 妊娠ラット

Wistar 系妊娠ラットに Lipton らの方法⁹⁾に従い PCPA を用い、以下の方法で母性 PKU 実験モデルを作成した。

妊娠第2週から第3週にかけ、20mg/100 g body weight の PCPA を隔日6回腹腔内注射した (CP

群)。同処置に加え、ラット用飼料に L-Phe (和光純薬, 大阪) を1%添加投与した群 (1PCP 群)、3%添加投与した群 (3PCP 群)、および、腹腔内注射はせず3% Phe 添加食のみ投与した群 (3P 群) を設定した、無処置無添加食群 (C群) を対照群とした。出生後は母仔同一ケージ内で飼育し、実験終了まで同一食飼の投与を継続した。

同腹ラットの1/3を生後9日目に、1/3を生後22日目に室温下にて、また、残り1/3は生後22日目に 4°C 3時間寒冷暴露後、断頭屠殺し、大脳・副腎・心筋および肩甲間褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) の重量および CA 含量の測定、さらに、寒冷暴露前後の大脳・副腎・心筋・BAT の CA 含量の変動についても測定した。

II. 測定方法

1. フェニールアラニン (Phe) およびチロジン (Tyr) の測定

Phe および Tyr は、アミノ酸自動分析機 LKB-4150 (LKB Biochrom, Cambridge, England) を用いて測定した。

2. フェニールアラニン水酸化酵素 (PH) 活性の測定

McGEE らの方法⁹⁾に従い、以下の方法で測定した。ホモジェネート上清0.2ml を100mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8)、10mM Phe、0.75mM 6,7-ジメチル-5,6,7,8-テトラヒドロプテリン (Sigma)、5.0mM ジチオスレイトール (Sigma) に調整したものを0.8ml と混合、振盪しながら、 25°C で20分インキュベートの後、1.0ml の12% (v/v) 三塩化酢酸を加え反応を終了させ、20分放置。再度、混合した後、3,000rpm で10分遠心、上清1.5ml を用いて Tyr を測定し、PH 活性を求めた。Tyr の測定は、Udenfriend らの方法⁹⁾によった。

3. カテコールアミン (CA) の測定

CA については、第1編と同じく、Shimadzu LC-5A (Shimadzu, Kyoto) を用い、電気化学検出法による高速液体クロマトグラフィー法により測定した。

4. 蛋白濃度の定量

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

III. 仔の発育状態、神経学的発達の観察

以下の項目につき、観察記録した。

1. 体温

電子体温計を用い、腋下にて測定した。

2. 体重

3. 開眼時期

4. 驚愕反射出現時期

IV. 統計学的処理

結果は、平均±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の多重比較を行ない、危険率5%以下をもって有意とした。

成 績

I. フェニールケトン尿症 (PKU) 実験モデルの基礎的検討 (表1)

母性 PKU 実験モデルに先だって、非妊娠ラットを用い、PKU 実験モデル作成の最適条件を検討した。実験群としては、対照 (C群)、0.2% Phe のみを負荷したもの (0.2P 群)、0.2% Phe とフェニールアラニン水酸化酵素 (PH) の阻害剤である L-para-chloro-phenylalanine (PCPA) を与えたもの (0.2PCP 群)、3% Phe を負荷したもの (3P 群)、3% Phe と PCPA を与えたもの (3PCP 群) を作成し、比較した。

血漿 Phe 濃度を見ると、3PCP 群でのみ $700 \pm 302 \mu\text{mol/l}$ と高く、その値はばらつきが多いものの、C 群の $66 \pm 9 \mu\text{mol/l}$ に比し、およそ10倍であった ($p < 0.01$)。しかし、3PCP 群では、血漿 Tyr 濃度も $171 \pm 54 \mu\text{mol/l}$ と C 群の $49 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ の3倍以上に増加していた ($p < 0.01$)。また、PH 活性をみると、

PCPA を使用した 0.2PCP 群および 3PCP 群 それぞれ $1.8 \pm 0.5 \text{nmol/min/g liver}$, $1.6 \pm 0.5 \text{nmol/min/g liver}$ と、C 群における $4.9 \pm 0.3 \text{nmol/min/g liver}$ に比し著明に低下しており ($p < 0.01$)、3P 群でも $3.3 \pm 0.5 \text{nmol/min/g liver}$ と低下していたのに対し、0.2P 群では $8.0 \pm 0.3 \text{nmol/min/g liver}$ と逆に亢進していた ($p < 0.01$)。

一方、TH を阻害する α -MT を用いた実験系では、血漿 Phe 濃度に有意な変化を認めなかった。

これらの結果より、PKU の実験モデルとしては、Tyr が高いことを除けば、3PCP 群が最も適切であったので、母性 PKU 実験モデル作成には、この条件を用いることにした。

II. 母性 PKU 実験モデルより出生した仔の発育、神経学的発達、熱産能に及ぼす影響

PCPA 処置妊娠ラット (CP 群) について、更に1% Phe を飼料に添加したもの (1PCP 群)、3% Phe を添加したもの (3PCP 群)、および、Phe の添加、PCPA 処置ともに行なわない対照群 (C 群) の4群について、出生した仔の発育、神経学的発達、および、寒冷暴露による大脳、副腎の神経物質の変動を調べた。

1. 体重増加 (表2)

Table 1. Effects of L-para-chloro-phenylalanine (PCPA) or α -methyl-para-tyrosine (α -MT) administration together with dietary supplementation of phenylalanine (Phe) or tyrosine (Tyr) on plasma Phe and Tyr levels and hepatic phenylalanine hydroxylase (PH) activity in nonpregnant female rats

Group	n	Phe ($\mu\text{mol/l}$)	Tyr ($\mu\text{mol/l}$)	PH activity (Tyr nmol/min/g liver)
C	4	66 ± 9	49 ± 6	4.9 ± 0.3
0.2P	4	60 ± 11	63 ± 8	$8.0 \pm 0.3 \star$
0.2PCP	4	92 ± 23	63 ± 9	$1.8 \pm 0.5 \star$
3P	4	65 ± 5	58 ± 9	$3.3 \pm 0.5 \star$
3PCP	4	$700 \pm 302 \star$	$171 \pm 54 \star$	$1.6 \pm 0.5 \star$
0.2T	4	68 ± 8	61 ± 8	6.3 ± 1.1
0.2TMT	4	66 ± 5	56 ± 3	$6.7 \pm 0.6 \star$
3T	4	68 ± 14	$92 \pm 11 \star$	4.8 ± 0.7
3TMT	4	75 ± 9	$117 \pm 9 \star$	4.2 ± 0.5

C, control. 0.2P, dietary supplementation of 0.2% Phe. 3P, dietary supplementation of 3% Phe. 0.2PCP, dietary supplementation of 0.2% Phe with 4 times intraperitoneal injection of PCPA (20 mg/100 g body weight) in alternate days. 3PCP, 3% Phe supplementation with PCPA injection as same as 0.2PCP. 0.2T, dietary supplementation of 0.2% Tyr. 3T, dietary supplementation of 3% Tyr. 0.2TMT, dietary supplementation of 0.2% Tyr with 4 times intraperitoneal injection of α -MT (10 mg/100 g body weight) in alternate days. 3TMT, 3% Tyr supplementation with α -MT injection as same as 0.2TMT. n, numbers of animal tested. Values are mean \pm SD. \star , $P < 0.05$; \star , $P < 0.01$ vs control.

3PCP 群では、生後16日目 26.8±1.8 g, 22日目 37.1±2.6 g と、それぞれ対照群の 34.0±3.0 g, 47.6±3.2 g より有意に低かった ($p<0.01$). しかし、他の群では、1PCP 群の生後16日目で 28.9±1.6 g と低かった ($p<0.05$) のを除き、対照との間に有意差は認めなかった。

2. 開眼時期 (図1, 上段)

いずれの群も、生後16日目から17日目にかけて開眼し、対照群との間に有意な差はなかった。

3. 驚愕反射出現時期 (図1, 下段)

いずれの群も、生後17日目から22日目に驚愕反射は出現しており、対照群との間に有意な差はなかった。

4. 体温 (表2)

生後16日目においては、対照群 36.6±0.3°C であったのに対し、3PCP 群では 35.6±0.3°C、3P 群では 36.0±0.4°C と低体温であった ($p<0.01$, $p<0.05$). 生後22日目では、対照群 37.4±0.2°C に対し、3P 群 36.1±0.4°C とやはり低かったが ($p<0.01$), 3PCP 群では 37.2±0.3°C と対照群との間に有意差はなかった。

5. 大脳・副腎・心筋・肩甲間褐色脂肪組織 (BAT) の重量およびカテコールアミン (CA) 含量

大脳の重量については、生後9日目、対照群 580±36mg, 3PCP 群 512±33mg と 3PCP 群で小さい傾向にあったが、有意差は認められなかった。一方、生後22日目では、それぞれ 1085±32mg, 1035±32mg と 3PCP 群で有意に低かった ($p<0.05$). また、CA 含量

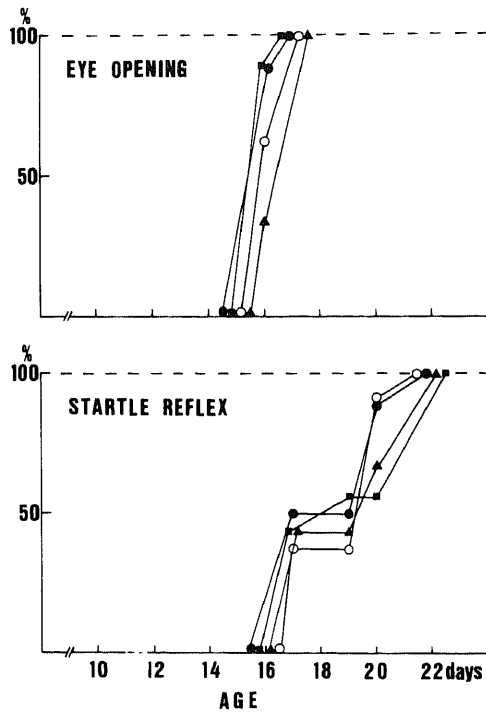


Fig. 1. The time of eye opening (upper panel) and startle reflex appeared (lower panel). ○, C (n=8); ●, CP (n=9); ■, 1PCP (n=9); ▲, 3PCP (n=9). These abbreviations of the experimental groups, see the footnote of Table 2.

Table 2. Body weight and body temperature in offsprings from PKU mother

Age (days)	Group	n	Body weight (g)	Body temperature (°C)
16	C	8	34.0±3.0	36.6±0.3
	CP	9	33.3±1.8	36.6±0.3
	1PCP	9	28.9±1.6☆	36.4±0.2
	3PCP	9	26.8±1.8★	35.6±0.3★
	3P	5	33.6±5.9	36.0±0.4☆
22	C	8	47.6±3.2	37.4±0.2
	CP	9	45.9±5.9	37.0±0.4
	1PCP	9	45.9±3.7	37.6±0.3
	3PCP	9	37.1±2.6★	37.2±0.3
	3P	5	45.5±11.3	36.1±0.4★

C, control. CP, their mothers were injected 20 mg/100 g body weight of PCPA 6 times in alternate days from 2nd to 3rd pregnant period. 1PCP, their mothers were given dietary supplementation of 1% Phe and injected PCPA. 3PCP, given dietary supplementation of 3% Phe and injected PCPA. 3P, given diet containing 3% Phe. n, numbers of animal tested. Values are mean ± SD. ☆, $P<0.05$; ★, $P<0.01$ vs control.

については生後22日目の norepinephrine (NE) 含量が、対照群の 121 ± 5 ng/g brain に対し、 95 ± 11 ng/g brain と 3PCP 群で低かった ($p < 0.05$) (表 3).

副腎の CA 含量は生後 9 日目で、NE が対照群 141 ± 22 ng/gland に対し、 90 ± 9 ng/gland と 3PCP 群で低く ($p < 0.05$)、epinephrine (E) では、有意差は認めないものの、それぞれ 442 ± 67 ng/gland、 360 ± 42 ng/gland と 3PCP 群で低い傾向にあった (表 4).

心重量は、3PCP 群において生後 9 日目、22 日目と

も、それぞれ 69 ± 5 mg、 165 ± 12 mg と C 群の 92 ± 8 mg、 262 ± 20 mg に比し有意に低かった ($p < 0.05$, $p < 0.01$). しかし、心筋の CA 含量を NE で見ると、生後 9 日目、22 日目とも 3PCP 群と対照群との間には、有意な変化を認めなかった. 3P 群の生後 9 日目では C 群に比べ、心重量が 134 ± 7 mg と重く ($p < 0.01$)、NE 含量は低かった ($p < 0.05$). また、生後 22 日目における心筋の NE 含量は、CP 群、1PCP 群で C 群より低かった ($p < 0.05$) (表 5).

Table 3. Cerebral weight and catecholamine content of offsprings from PKU mother

Age (days)	Group	n	Weight (mg)	Norepinephrine (NE) (ng/g brain)	Dopamine (DA) (ng/g brain)
9	C	4	580 ± 36	52 ± 2	128 ± 9
	CP	4	577 ± 27	55 ± 6	125 ± 9
	1PCP	4	565 ± 14	53 ± 7	108 ± 10
	3PCP	4	512 ± 33	53 ± 3	121 ± 6
	3P	4	616 ± 63	59 ± 8	114 ± 18
22	C	4	1085 ± 32	121 ± 5	267 ± 54
	CP	4	1043 ± 35	121 ± 10	270 ± 36
	1PCP	4	1047 ± 35	104 ± 7	259 ± 21
	3PCP	4	1035 ± 32 ☆	95 ± 11 ☆	252 ± 29
	3P	4	1085 ± 12	112 ± 4	319 ± 25

Abbreviations of the groups, see the footnote of Table 2.

n, numbers of animal tested.

Values are mean \pm SD. ☆, $P < 0.05$ vs control.

Table 4. Catecholamine content in the adrenal glands of offsprings from PKU mother

Age (days)	Group	n	Norepinephrine (NE) (ng/gland)	Epinephrine (E) (ng/gland)
9	C	4	141 ± 22	442 ± 67
	CP	4	126 ± 10	382 ± 18
	1PCP	4	118 ± 19	406 ± 113
	3PCP	4	90 ± 9 ☆	360 ± 42
	3P	4	116 ± 14	483 ± 45
22	C	4	548 ± 44	1272 ± 354
	CP	4	433 ± 164	1029 ± 489
	1PCP	4	636 ± 66	1710 ± 183
	3PCP	4	548 ± 65	1126 ± 186
	3P	4	447 ± 256	663 ± 356

Abbreviations of the groups, see the footnote of Table 2.

n, numbers of animal tested.

Values are mean \pm SD. ☆, $p < 0.05$ vs control.

Table 5. Heart weight and NE content of offsprings from PKU mother

Group	9 days of age		22 days of age	
	Weight(mg)(n)	NE(ng/g tissue)(n)	Weight(mg)(n)	NE(ng/g tissue)(n)
C	92± 8 (4)	234±11 (4)	262±20 (8)	318±62 (4)
CP	93± 7 (4)	181±31 (4)	319±40 (9)	190±53 (4)☆
1PCP	97±12 (4)	203±47 (4)	274±20 (9)	183±13 (4)☆
3PCP	69± 5 (4)☆	225±18 (4)	165±12 (9)★	417±61 (4)
3P	134± 7 (4)★	157±16 (4)☆	325±59 (4)	263±50 (4)

Abbreviations of the groups, see the footnote of Table 2.
 NE, norepinephrine. n, numbers of animal tested.
 Values are mean ± SD. ☆, P<0.05; ★, P<0.01 vs control.

Table 6. Brown adipose tissue (BAT) weight and norepinephrine(NE) content of offsprings from PKU mother at 22 days of age

Group	BAT weight (mg) (n)	Total NE (ng/BAT) (n)	NE (ng/mg BAT)
C	104±10 (8)	119±21 (4)	1.13±0.14
CP	124±20 (9)	90± 4 (4)	0.79±0.26
1PCP	98±13 (9)	128±14 (4)	1.27±0.17
3PCP	63±13 (9)★	118±16 (4)	1.64±0.26☆
3P	120±25 (4)	129±21 (4)	1.13±0.14

Abbreviations of the groups, see the footnote of Table 2.
 n, numbers of animal tested.
 Values are mean ± SD. ☆, P<0.05; ★, P<0.01 vs control.

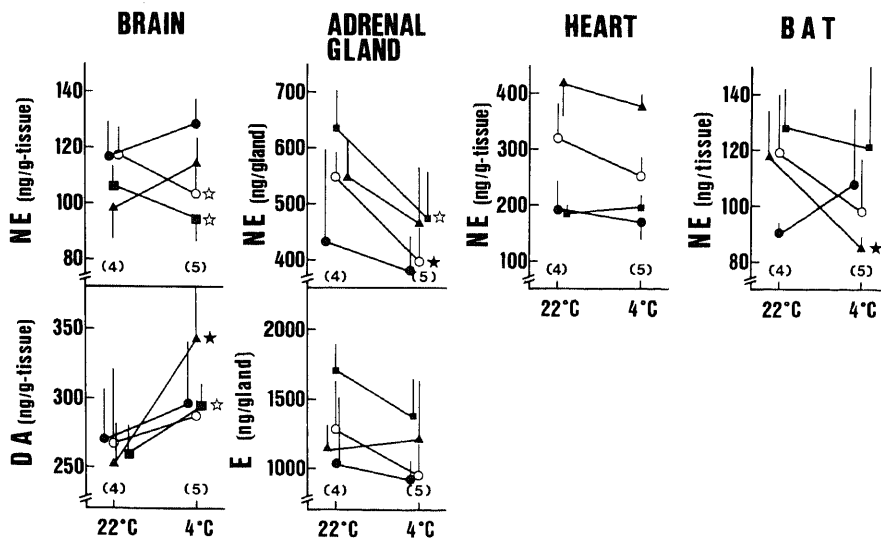


Fig. 2. The effects of cold exposure (4°C, 3 hr) to catecholamine (CA) contents of the brain, adrenal gland, heart and BAT. ○, C; ●, CP; ■, 1PCP; ▲, 3PCP. These abbreviations of the experimental groups, see the footnote of Table 2. The parenthesis in the figures are the number of specimen. ☆, p<0.05; ★, p<0.01 vs CA content at room temperature (22°C).

BAT については、生後22日目での重量が、対照群 $104 \pm 10 \text{mg}$ 、3PCP 群 $63 \pm 13 \text{mg}$ と 3PCP 群で有意に低かったのに対し ($p < 0.01$)、CA 含量は、NE で対照群が $1.13 \pm 0.14 \text{ng/mg BAT}$ 、3PCP 群 $1.64 \pm 0.26 \text{ng/mg BAT}$ と 3PCP 群で高かった ($p < 0.05$) (表6).

6. 寒冷暴露前後の CA 含量の変動 (図2)

大脳では対照群の NE は低下 ($p < 0.05$)、ドーパミン (dopamine, DA) は変動を認めなかったのに対し、3PCP 群の NE には変化を認めず、DA が増加を示した ($p < 0.01$).

副腎では、対照群の NE は低下 ($p < 0.01$)、E には変化がなかったのに対し、3PCP 群では NE、E とも変化は認めなかった.

心筋については両群とも NE に変化なく、BAT の NE は対照群で有意な変化がなかったのに対し、3PCP 群では低下していた ($p < 0.01$).

考 察

母性フェニルケトン尿症 (母性 PKU) の実験モデルとしては、文献的にいくつか知られている。初期には、大量のフェニルアラニン (Phe) を単独で使用していたが⁹⁾、引き起こされる知能障害が永続しないなどの欠点を有していた。続いて、L-para-chloro-phenylalanine (PCPA) を単独⁷⁾ないし Phe との併用で用いた実験モデル²⁰⁾が現われ、最近では、フェニルアラニン水酸化酵素 (PH) に対しより特異性の高い阻害剤である、 α -methyl-phenylalanine を用いたもの⁹⁾¹⁰⁾や phenylacetate¹¹⁾を用いた実験モデルなども見られる。著者は、Chang ら¹²⁾による PCPA 360mg/kg の一回投与に対し、その非特異的毒性を除外するため、約3分の1の量である 100mg/kg を、妊娠第2週のラットに隔日3回腹腔内投与する予備実験を行なったが、この量の PCPA の単独投与だけでは、仔の発育に対する影響は認めなかった。また、Brass らによる新しい実験モデルとして推奨される、食飼中へ $0.5\% \alpha$ -MT および $3\% \text{Phe}$ を併せて投与する方法¹³⁾を用いた予備実験も行なったが、死産の率が高く適当でなかった。従って、今回は、PCPA と Phe を併用による実験モデルを使用した。Vorhees らも、この方法が、現在のところ、母性 PKU の実験モデルとしては、最もふさわしいと述べている¹⁴⁾。

今回著者は、PCPA を用いた種々の母性 PKU 実験モデルをラットで作成し、いくつかの検討を試みたが、母性 PKU の実験モデルとしては、中でも食飼中への $3\% \text{Phe}$ 添加に加え、 $200 \text{mg/kg body weight}$ の PCPA 隔日6回腹腔内注射の組み合わせが、最も適

切であった。この群では、体重および脳・心など、臓器の重量は対照に比して低く、発育障害が認められた。体温については、母性 PKU ラットで、やはり低い傾向にあり、寒冷馴化の際の体温維持に深く関わるといわれている肩甲間褐色脂肪組織 (BAT) についても、その重量は対照より低かった。カテコールアミン (CA) の含量を見ると、脳および副腎ではノルエピネフリン (NE) に低下を認めた。このような変化は、母性 PKU において、CA 系に何らかの異常が存在することを示唆するものと考えられる。ヒトでも、PKU 児の脳において、NE やドーパミン (DA) の含量が低かったとされる McKean の報告¹⁵⁾があるほか、Curtius ら¹⁶⁾や沖田¹⁷⁾は、尿中 CA 代謝産物を測定し、その低下を確認している。しかしながら、逆に、脳内 NE が増加していたというものもあるほか¹⁸⁾、血中では NE、エピネフリン (E) とも変化がなかったという報告もあり¹⁷⁾¹⁸⁾、一定の傾向を見ない。

今回著者は、CA の機能的動態をみる目的で、寒冷暴露前後の CA の変動についても検討した。一般的に、寒冷刺激時の体温調節には、まず、非ふるえ熱産生 (nonshivering thermogenesis, NST) の機構が働き、NST でまかなえない場合に、ふるえによる熱産生が加わるとされている¹⁹⁾。寒冷馴化ラットでは、NST の大部分は BAT がその役割を担っており、しかも、年齢が小さければ小さい程その割合は多く、新生期では約60%にも達すると言われている²⁰⁾。そして、NST による熱産生を調節する主たる因子は CA であり、なかでもとりわけ NE が深く関与していると考えられている。

しかしながら、PKU ラットにおける体温調節に関する実験的な報告は見当たらない。第1編の著者の結果では、母性 PKU ラットでは対照群に比し、寒冷暴露による体温低下は有意に大きかった。また、今回の結果で示したように、寒冷暴露前後での母性 PKU ラットにおける CA 含量の変化は、対照群より、大脳と副腎においては増加を、BAT においては減少を示していた。これは、大脳および副腎での CA の放出障害、また、熱産生の効果器である BAT での CA 消費の亢進の結果とも解釈できる。

このように、胎内での高フェニルアラニン血症は、仔の CA 代謝系、さらには、熱産生能にも大きな影響を及ぼしていることが明らかであるが、知能障害その他の症状の発現との直接的な因果関係については、さらに検討を要する。しかしながら、CA が脳における神経伝達物質のひとつとして、重要な役割を担っていることを考えると、知能障害とも何らかの関

連を有するものと思われる。今後、知能障害の本質が解明されるとともに、知能障害におけるCAの果たす役割が明らかになることが期待される。

結 論

1. ラットにおける母性フェニールケトン尿症(母性PKU)実験モデルとしては、母ラットに対して、食飼への3%フェニールアラニン添加と200mg/kg body weightのL-para-chloro-phenylalanine隔日6回腹腔内注射の組み合わせが、最も効果的であった。

2. 母性PKU仔ラットでは、体重および脳・心など臓器重量が低く、発育障害が認められた。

3. 母性PKU仔ラットの体温は低く、肩甲間褐色脂肪組織重量も低下しており、寒冷暴露における熱産生も低かった。

4. 母性PKU仔ラットでは、脳および副腎のノルエピネフリン含量に低下が認められた。

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、心より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10回日本内分泌学会秋季学術大会(1987年11月、東京)において発表した。

文 献

- 1) Dent, C. E.: Report of Twenty-third Ross Pediatric Research Conference, p32-33, Columbus, Ohio, 1957.
- 2) Lipton, M. A., Gordon, R., Guroff, G. & Udenfriend, S.: p-Chlorophenylalanine-induced chemical manifestations of phenylketonuria in rats. *Science*, **156**, 248-250 (1967).
- 3) McGEE, M. M., Greengard, O. & Knox, W. E.: The quantitative determination of phenylalanine hydroxylase in rat tissues. *Biochem. J.*, **127**, 669-674 (1972).
- 4) Udenfriend, S. & Cooper, J. R.: The chemical estimation of tyrosine and tyramine. *J. Biol. Chem.*, **196**, 227-233 (1952).
- 5) Karrer, R. & Cahilly, G.: Experimental attempts to produce phenylketonuria in animals. A critical review. *Psychol. Bull.*, **64**, 52-64 (1965).
- 6) Kerr, G. R. & Waisman, H. A.: Phenylala-

nine. Transplacental concentrations in Rhesus monkeys. *Science*, **151**, 824-825 (1966).

7) Koe, B. K. & Weissman, A.: p-Chlorophenylalanine. A specific depletor of brain serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **154**, 499-516 (1966).

8) Luse, S. A., Rhys, A. & Lessey, R.: Effects of maternal phenylketonuria on the rat fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **108**, 387-390 (1970).

9) Greengard, O., Yoss, M. S. & DelValle, J. A.: α -Methylphenylalanine. A new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. *Science*, **192**, 1007-1008 (1976).

10) DelValle, J. A., Dienel, G. & Greengard, O.: Comparison of α -methylphenylalanine and p-chlorophenylalanine as inducers of chronic hyperphenylalaninemia in developing rats. *Biochem. J.*, **170**, 449-459 (1978).

11) 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).

12) 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).

13) Brass, C. A., Isaccs, C. E., McChesney, R. & Greengard, O.: The effects of hyperphenylalaninemia on fetal development. A new model of maternal phenylketonuria. *Pediatr. Res.*, **16**, 388-394 (1982).

14) Vorhees, C. V., Butcher, R. E. & Berry, H. K.: Progress in experimental phenylketonuria. A critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **5**, 177-190 (1981).

15) McKean, C. M.: The effects of high phenylalanine concentrations on serotonin and catecholamine metabolism on the human brain. *Brain Res.*, **47**, 469-476 (1972).

16) Curtius, H.-Ch., Baerlocher, K. & Völlmin, J. A.: Pathogenesis of phenylketonuria. Inhibition of dopa and catecholamine synthesis in patients with phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta*, **42**, 235-239 (1972).

- 17) 沖田美佐子: フェニールケトン尿症に対するインスリンの効果. 第一編. カテコールアミン代謝に及ぼす影響. 岡山医誌, 88, 697-707 (1976).
- 18) Butler, I. J., Koslow, S. H., Krumholz, A., Holtzman, N. A. & Kaufman, S.: A disorder of biogenic amines in dihydropteridine reductase deficiency. *Ann. Neurol.*, 3, 224-230 (1978).
- 19) 中山昭雄: 温熱生理学, 第1版, 95-111頁, 理工学社, 東京, 1981.
- 20) Foster, D. O. & Frydman, M. L.: Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 56, 110-122 (1978).

Catecholamine Metabolism in Experimental Phenylketonuria of Rat II. Catecholamine Metabolism and Homeothermic Maturation in Offspring of Maternal Phenylketonuria Akisato Murata, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, 99, 554—562 (1990)

Key words maternal phenylketonuria, catecholamine, cold exposure, heat production, L-para-chloro-phenylalanine

Abstract

The effects of maternal phenylketonuria (PKU) on the physical development, homeothermic maturation and catecholamine (CA) metabolism of the offspring were examined. Experimental PKU was produced by the administration of phenylalanine hydroxylase inhibitor, para-chloro-phenylalanine, together with dietary supplementation of 3% phenylalanine during gestation. The offspring showed a reduced body weight gain, cerebral weight and low body temperature. No significant change was observed in the time of eye opening and the acquisition of the startle reflex. The norepinephrine (NE) contents in the cerebrum, adrenal gland and heart were decreased. After cold exposure (4°C for 3 hours), the NE contents in the cerebrum and adrenal gland were increased but decreased in brown adipose tissue. These alterations in CA metabolism in maternal PKU offspring appear to induce reduced heat production and may be one of the causes of the mental deficit observed in them.