

急性高フェニールアラニン血症ラットの 代謝に及ぼすインスリンの影響

沖田美佐子 金行孝雄 黒田正清

アミノ酸代謝の中で、必須アミノ酸であるフェニールアラニンの代謝は、その代謝障害がフェニールケトン尿症（PKU）で知られる如く脳障害をひき起す点で深く追求されてきた。現在、フェニールアラニン代謝障害によって起る種々の症状、すなわち知能低下、運動障害、色素欠乏等の原因は、フェニールアラニンの異常な体内蓄積が根本的なものであり、それに基づいて起るチロシン生成不足、蛋白合成障害などが認められている。チロシン生成不足は、チロシンから生成されるメラニン色素とかカテコラミンの生成障害へとつながる。このような一連の代謝障害がすべてフェニールアラニンの代謝障害すなわち肝のフェニールアラニン水酸化酵素活性が欠除あるいは低下していることに基づくものであり、フェニールアラニン摂取量を制限してフェニールアラニンの異常蓄積を防ぐことが、現在のところ代謝異常を是正する唯一の方法となっている。私たちがPKU患者に対して食事療法を行い、その成績を報告¹⁾した。この食事療法は、厳しい蛋白質制限とともに、必須アミノ酸補給の目的で低フェニールアラニン蛋白加水分解物を利用するために、献立作成が非常にむずかしい上に食べづらいものとなり、低栄養状態となりがちである。このような低蛋白食の欠陥を補うことを目的として、Reissら²⁾³⁾は蛋白同化ステロイドの投与を試みた。その結果彼らは蛋白同化ステロイドが血中フェニールアラニン値を選択的に低下せしめることを見出した。しかし、副作用の点でこれの長期継続投与には問題があり、治療法として利用されるには至っていない。一方、インスリンは生体の糖、蛋白、脂質代謝の調節に重要な役割を果しているホルモンであり、蛋白代謝に対しては合成の促進、分解の抑制に働くものである。そこで、インスリンにも蛋白同化ステロイドと同様な効果のあることも考えられ、また、インスリンの持つ種々の酵素の活性促進作用は、アミノ酸代謝に対して何らかの作用を有することが考えられる。

そこで、今回は、フェニールアラニン代謝障害のモデルとして、ラットにフェニールアラニン水酸化酵素の阻害剤であるDL-p-クロロフェニールアラニン(DL-p-CPA)を投与して急性高フェニールアラニン血症動物をつくり、これら動物における血漿中フェニールアラニン、チロシン、カテコラミン値を測定し、また、正常および急性高フェニールアラニン血症ラットにインスリンを注射して、血漿中フェニールアラニン、チロシン、カテコラミン値に及ぼす影響を及ぼすか検討した。

方 法

1. 実験動物

Wistar系雄ラットで体重約200gのものを使用して、これを表1に示す如く4つの群に分けた。高フェニールアラニン血症の作成にあたっては、Liptonら⁴⁾の方法に従って、DL-p-CPAおよびL-Pheを、TritonX-100を添加した生理食塩水中にソニケーターを用いて懸濁させたものをいずれも腹腔内に注射した。インスリンはレギュラーインスリンであるイスジリン（清水製薬製）を、正常群では生理食塩水注射時、高フェニールアラニン血症群ではL-Phe注射

表1 Schedule of Treatment

Group	n	Time(h)		
		0	24	48
Normal	10	Saline	Saline	Saline
Normal/Insulin	9	Saline	Saline	Insulin 0.05IU/100gBW
Acute hyperphenylalaninemia	7	DL-P-CPA 30mg/100gBW	DL-P-CPA 10mg/100gBW	L-Phe 20mg/100gBW
Acute hyperphenylalaninemia/Insulin	7	DL-P-CPA 30mg/100gBW	DL/P-CPA 10mg/100gBW	L-Phe 20mg/100gBW Insulin 0.05IU/100gBW

時に筋注した。採血は最終投与の1時間後にネムブタール麻酔下に心臓穿刺により行った。また、採血前は17時間絶食として水のみ与えた。血液は採血後直ちに氷冷し、血漿を分離したのち各々の測定に供した。

2. 測定法

(1) 血糖

血糖値の測定にはo-トリジン・ホウ酸法を利用した和光純薬製の血糖測定用キットであるBGテストワコーを用いた。

(2) フェニールアラニン, チロシン

いずれも蛍光法を用いたがL-Pheの測定にあたっては、まずDL-p-CPAとの分離のために薄層クロマトグラフィーを行った。血漿を95%エタノールで除蛋白し、その上清を濃縮したのち薄層にスポットし、n-ブタノール、酢酸、水(4:1:1)で展開したものをL-Phe部分をかきとり抽出した。これを McCamanら⁵⁾の方法により測定した。回収率は89.4%であった。L-Tyrは Udenfriendら⁶⁾の方法によった。回収率95.9%。

(3) カテコラミン

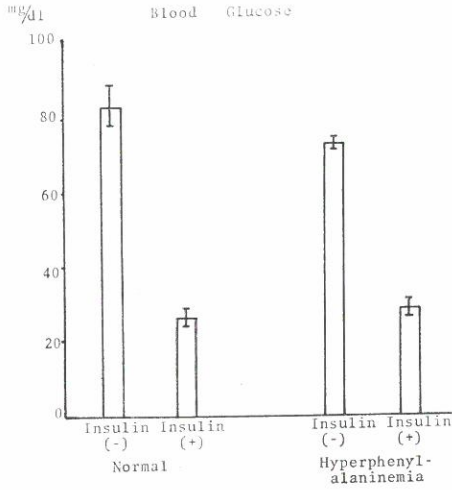
岸川⁷⁾の方法に従った。すなわち、血漿3mlを0.4N過塩素酸で除蛋白し、10,000rpm 10分間遠沈した上清と、沈渣を再び0.4N過塩素酸で洗って遠沈した洗液を合せたものをエーテル・ベンゼン(5:2)で脱脂し水層を採取。この抽出液に0.2MのEDTA 2ナトリウムを加え、4Nアンモニア水でpH 5~6に調整する。これに精製したアルミナ1gを加えたのち1Nアンモニア水でpH8.4とする。次に、マグネティックスターラーで7分間静かに攪拌、静置後上澄液を捨ててアルミナをクロマト管に洗いこみ水で洗ったのち0.2N酢酸で溶出した。溶出液を凍結乾燥後0.05mlの酢酸エチルに溶解し、トリフルオロ無水酢酸を加えてTFE化させる。これに内標準物質としてヘプタクロール・エポキシドを含むn-ヘキサンを加え、その一定量を柳本製ヤナコG-80型ガスクロマトグラフ装置(ECD)に注入し、得られたクロマトグラムより peak height ratio 法で測定した。なお、カテコラミンの抽出過程はすべてコールドルーム内または0°Cで操作し、ガラス器具はすべてシリコン処理したものを使用した。

結 果

1. 血糖値

インスリンの作用の指標として血糖値の変化を調べた結果は図1に示すとおりであった。すなわち、インスリン無投与の場合、正常群(83.8±5.2mg/dl)と高フェニールアラニン血症群(73.3±1.7mg/dl)の間には高フェニールアラニン血症群がやや低い傾向があるが有意差はなかった(P<0.10)。インスリンを注射すると正常群(26.3±2.6mg/dl)、高フェニールアラニ

図1



ン血症群 ($28.6 \pm 2.7 \text{ mg/dl}$) ともにほぼ同じレベルにまで低下した。

2. 血漿中フェニールアラニン, チロシン値

血漿中 Phe 及び Tyr の測定結果を図2に示

した。インスリン無投与の場合、正常群の Phe 値は $1.33 \pm 0.11 \text{ mg/dl}$, Tyr 値は $1.69 \pm 0.13 \text{ mg/dl}$ であった。これに対して、DL-p-CPA, Phe投与群ではPhe値は $34.1 \pm 3.5 \text{ mg/dl}$ で明らかに高値となっている。同時に Tyr 値は $1.30 \pm 0.13 \text{ mg/dl}$ で正常群に比べて有意な低値となった。このような両群に対するインスリン注射の結果をみると、正常群ではPhe値は $1.22 \pm 0.10 \text{ mg/dl}$ で8.3%低下したにすぎず有意な差はなかった。一方、Tyr 値は $0.83 \pm 0.09 \text{ mg/dl}$ で50.9%低下した。これに反して、高フェニールアラニン血症群ではPhe値に有意な減少 ($26.4 \pm 2.3 \text{ mg/dl}$, 22.6%低下) がみられTyr値 ($1.28 \pm 0.08 \text{ mg/dl}$) はほとんど減少しなかった。

3. 血漿中カテコラミン値

カテコラミン測定結果は表2に示したとおりである。ドーパミン(図3)はインスリン無投与の場合、正常群に比べて高フェニールアラニン血症群で増加した。インスリン注射によってはいずれの群も低下し、特に高フェニールアラニン血症群で著明に低下した。ノルエピネフリン(図4)は高フェニールアラニン血症群が低値を示し、インスリン注射では両群ともに著明に低下した。エピネフリン(図5)は高フェニールアラニン血症群が低値であったのはノルエピネフリンと同様である。しかし、インスリンを注射すると正常群では約3倍の増加が認められた。高フェニールアラニン血症群では減少した。

図2

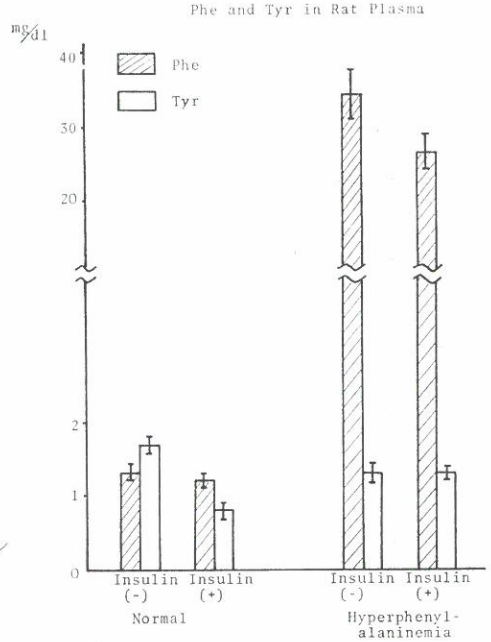
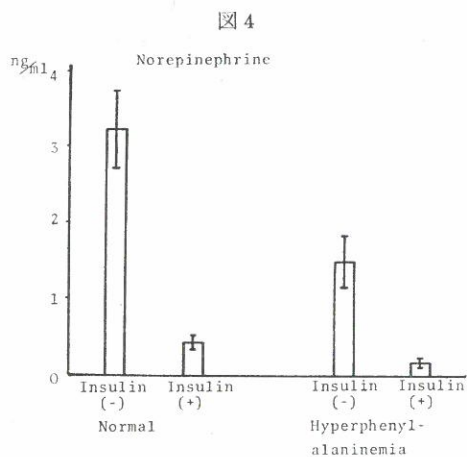
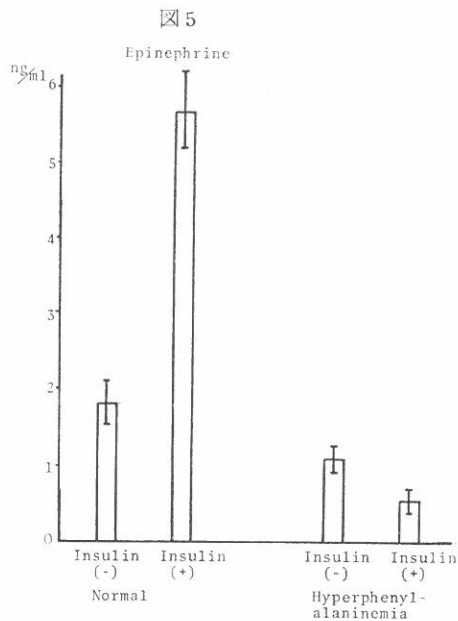
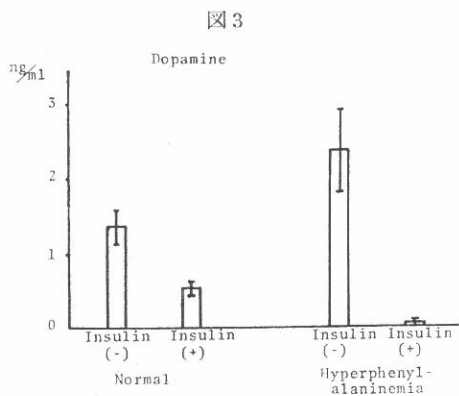


表2 Catecholamine in Plasma

(ng/ml)

	Normal		Hyperphenylalaninemia	
	Insulin (-)	Insulin (+)	Insulin (-)	Insulin (+)
Dopamine	1.36 ± 0.23	0.53 ± 0.10	2.36 ± 0.57	0.03 ± 0.02
Norepinephrine	3.23 ± 0.50	0.42 ± 0.09	1.49 ± 0.34	0.15 ± 0.06
Epinephrine	1.82 ± 0.29	5.69 ± 0.51	1.09 ± 0.17	0.54 ± 0.15

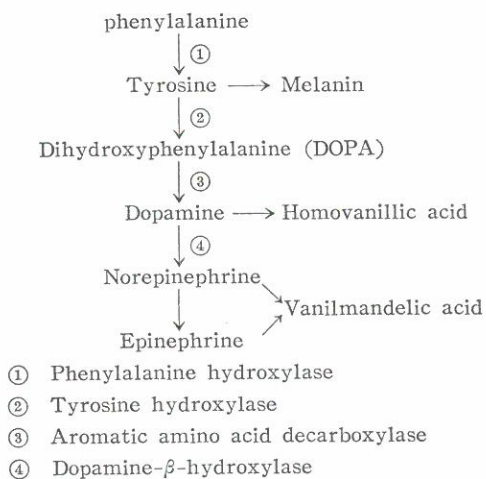
Mean \pm S. E. M



考 察

図6は Phe から Tyr そして Tyr から DOPA を経てカテコラミンの合成，代謝される過程

図6 Metabolism of phenylalanine



を示したものである。ヒトのPKUおよび高フェニールアラニン血症はフェニールアラニン水酸化酵素の活性が欠陥あるいは低下しているものである。今回、DL-p-CPAおよびL-Pheを投与して作成した急性高フェニールアラニン血症ラットの血漿中PheならびにTyrの値はヒトにおけるPKUあるいは高フェニールアラニン血症の状態にほぼ一致した。このような条件下でインスリンを注射してPhe、Tyr値の変化をみた結果は、Phe値が低下しTyr値には低下が認められないことからPheからTyrへの代謝の増加を推測させるものであった。このことはヒトの場合でも、PKU、高フェニールアラニン血症の臨床症状の多様性に示される如く、酵素欠損の度合いには相違があるのでは、といわれていることから考えてもインスリンがPheからTyrへの流れを増加させうることを示唆すると考える。外因性ならびに内因性インスリンが血中遊離アミノ酸値を低下せしめることは多くの研究によって確認されておりTyr、Pheの減少が大であるという報告⁹⁾もある。私たちの成績ではインスリンは正常ラットの血漿Phe値をわずかしき低下させなかったがTyr値を明らかに低下せしめた。血中遊離アミノ酸値の低下は細胞内へのとりこみの増加の結果とすればTyrの細胞内レベルは高まるものと考えられる。このことはTyr欠乏の状態にあるPKU、高フェニールアラニン血症にとっては望ましいものであろう。一般にPKU、高フェニールアラニン血症ではメラニン色素生成障害がみられるが、同様にカテコラミン生成障害も起るといわれている。これら両者はTyrの欠乏とあわせてTyrの代謝障害に基づくものであって、実際高フェニールアラニン血症ではチロシン水酸化酵素活性が低下するという報告¹⁰⁾がある。血漿中カテコラミン値測定の結果は、高フェニールアラニン血症群ではノルエピネフリン、エピネフリンは明らかに低値を示したがドーパミンは逆に増加した。この原因は不明であるが、多量のPheの急性投与も一因かもしれないし、Pheから他の系を経て生成されるとかホモバニリン酸への代謝が阻害されるといったこともありうるのではなからうか。カテコラミン代謝に及ぼすインスリンの影響について検討した結果では、正常群においてエピネフリンの増加を認めた。この結果はこれまでに報告されたものと一致する。¹¹⁾ 高フェニールアラニン血症群ではインスリンによってカテコラミン値はすべて低下し、特にドーパミン値の低下が著明であった。先に、ヒトにインスリンを注射した結果では尿中ホモバニリン酸排泄量はインスリンによって増加するということが認められた¹²⁾が、このことからインスリンによる血中カテコラミン値の低下は代謝回転が速くなった結果とも推測される。カテコラミンの生成および代謝に及ぼすインスリンの影響については、更に生成、代謝に関与する酵素についても追求する必要があるが、現在、カテコラミン生成の律速段階であるTyrからDOPAへの過程に作用するチロシン水酸化酵素の活性に及ぼすインスリンの影響について検討中である。

要 約

1. DL-p-CPAとL-Phe投与により急性高フェニールアラニン血症ラットを作成し、血漿中Phe、Tyrおよびカテコラミン値をしらべ、更に、正常および急性高フェニールアラニン血症ラットにインスリンを注射して、これらの値に及ぼす影響を検討した。
2. 急性高フェニールアラニン血症ラットではPhe値の著明な増加とTyr値の低下およびノルエピネフリンとエピネフリンの低下、ドーパミンの増加がみられた。
3. 急性高フェニールアラニン血症ラットにインスリンを注射するとPhe値は低下したがTyr値には低下が認められず、PheからTyrへの流れの増加が推測された。
4. 正常ラットにインスリンを注射すると、エピネフリンが増加したが、急性高フェニールア

ラニン血症ラットではインスリン注射によりカテコラミン値はすべて低下した。

本論文の要旨は第9回日本栄養・食糧学会中国四国支部大会（1976，高松）にて発表した。

文 献

- 1) 高坂睦年, 藤原恒広, 菊井茂, 徳永五輪雄, 東 漸, 東 徹, 西崎美佐子, 金行孝雄, 小児科診療, 32 : 888-898, 1969
- 2) Reiss, M., Hillman, J. C., Reiss, J., Daley, N., and Haylock, S., J. Ment. Defic. Res., 10 : 116-129, 1966.
- 3) Reiss, M., Sideman, M.B., and Plichta, E.S., J. Ment. Defic. Res., 10 : 130-140 1966.
- 4) Lipton, M.A., Gordon, R., Guroff, G., and Udenfriend, S., Science, 156 : 248-250, 1967.
- 5) Mc Caman, M. W., and Robins, E., J. Lab. Clin. Med., 59 : 885-890, 1962.
- 6) Waalkes, T. P., and Udenfriend, S., J. Lab. Clin. Med., 50 : 733-736, 1957.
- 7) 岸川秀実, 岡山医誌, 87 : 451-462, 1975.
- 8) 大浦敏明, 多田啓也, 北川照男, フェニールケトン尿症—スクリーニングから治療まで—, 金原出版, 東京, 1971.
- 9) Zinneman, H.H., Nuttall, F.Q. and Goetz, F.C., Diabetes, 15 : 5-8, 1966.
- 10) Curtius, H.-CH., Baerlocher, K., and Völlmin, J. A., Clin. Chim. Acta., 42 : 235-239, 1972.
- 11) Wallace, J. M., and Harlan, W. R., Amer. J. Med., 38 : 531-539, 1965.
- 12) 岸川秀実, 沖田美佐子, 金行孝雄, 小林清史, 高坂睦年, 医学と生物学, 90 : 93-96, 1975.

昭和52年3月31日受理