

脳内ホモバニリン酸濃度に及ぼすチロシンの影響

金 行 孝 雄

はじめに

カテコラミン生合成の調節は律速段階酵素チロシン水酸化酵素 (TH) で行われる。¹⁾ THによるドバミン (DA) 生合成調節には多くの因子が関与し、それらの中で基質チロシン濃度も TH の調節因子となる。²⁾ チロシンの投与や肝障害によって引き起こされた血中チロシン濃度の増加は脳内チロシン濃度を増加させる。³⁾ 著者らは脳内チロシン濃度を増加させる目的で肝障害ラットを作製し、脳内チロシン濃度と脳内カテコラミン濃度との関係を検討した。⁴⁾⁵⁾⁶⁾ その結果、ラットは26週間の飼育で肝硬変症を生じ脳内チロシン濃度は有意に増加したが脳内 DA およびノルエピネフリン (NE) 濃度には変化がなかった。しかしながら、チロシンの投与は脳内カテコラミン neuron を活性化することが報告されている。⁷⁾⁸⁾

この実験では、チロシンの投与及びガラクトサミンによる肝障害を作製し脳内チロシン濃度を増加させて、脳内 3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) とホモバニリン酸 (HVA) 濃度を測定した結果を報告する。

実験方法

実験動物

ウィスター系雄ラットを使用した。ラットは12時間の明暗周期 (明期 1:00~13:00) で飼育した。飼育室の温度は24℃、湿度は55%に保った。

実験Ⅰ: 体重約200 gの雄ラットに0.1%トライトンXにけん濁した ℓ -チロシンを体重kg当り200mgを腹腔内に1回投与した。対照群には0.1%トライトンXを投与した。ラットは ℓ -チロシン投与後0, 15, 30, 60及び90分後にト殺した。

実験Ⅱ: 体重約130 gの雄ラットを ℓ -チロシンを5%添加したオリエンタル MF 飼料で3週間飼育した。対照群にはオリエンタル MF 飼料を与えた。

実験Ⅲ: 体重約200 gの雄ラットにガラクトサミン

250mg/kgを最初から3回は4時間おきに、そして、14時間休止の後に最後の3回は1時間おきに腹腔内に投与した。最終投与の24時間後に ℓ -チロシン200mg/kgを腹腔内に1回投与した。対照群には生理食塩水を投与した。ラットは ℓ -チロシン投与の1時間後にト殺した。³⁾

試料の採取は前報⁵⁾と同様に行った。すなわちニアフリージング法によってト殺した。断頭後、脳を取り出し、氷上に置き、線条体、視床下部及び脳幹部を採取した。脳組織は測定するまで-70℃で凍結して保存した。血液試料は断頭した頸部から集めて血清を分離し-20℃で保存した。

分析

脳の各部位の DOPAC 及び HVA の測定は、脳組織を9倍量の0.9%塩化カリウム溶液でホモジネートし、等量の0.1N過塩素酸を加え、10,000X g, 20分間遠心分離を行った。上清の一定量に EDTA, 亜硫酸水素ナトリウム及び PH 3.0 の McIlvaine の緩衝液を加え、酢酸エチル 2 ml で2回抽出を行った。抽出液は合せて37℃のブロックバス中で窒素ガスを用いて蒸発乾固した。残渣は pH 4.1 の0.1Mクエン酸緩衝液に溶解した。アミン代謝産物の分析は電気化学検出器を付けた高速液体クロマトグラフ (医理化工業) で行った。使用したカラムは内径 4 mm, 長さ25cmのハイパーカラム[®] (リクロソルブ RP-18, 5 μ m, Cica-Merk) を用いた。電気化学検出器のポテンシャルは0.8V, 流速は1 ml/min で使用した。移動相は pH 4.1 の0.1Mクエン酸緩衝液を用いた。DOPAC の回収率は84.1 \pm 4.8%, HVA の回収率は89.8 \pm 2.8%で変動係数はそれぞれ5.74%と3.14%であった。

血漿と脳組織のチロシン濃度は Waalkes と Udenfriend の方法を用いた。⁹⁾ 組織ホモジネートのたんぱく質量は Lowry らの方法で測定した。¹⁰⁾

データのまとめは Mean \pm S.D. で表わし、得られた結果は Student's t-test 及び one-way ANOVA で分析した。

実験結果

チロシンの腹腔内投与0, 15, 30, 60及び90分後の血漿及び大脳皮質内のチロシン濃度は対照群に比べて有意に増加した。DOPAC と HVA の濃度は線条体では投与15分後に一過性の HVA level の低下が認められた。視床下部では投与30分後に HVA 濃度の一過性の増加と DOPAC の二双性の増加を認めた (図1)。

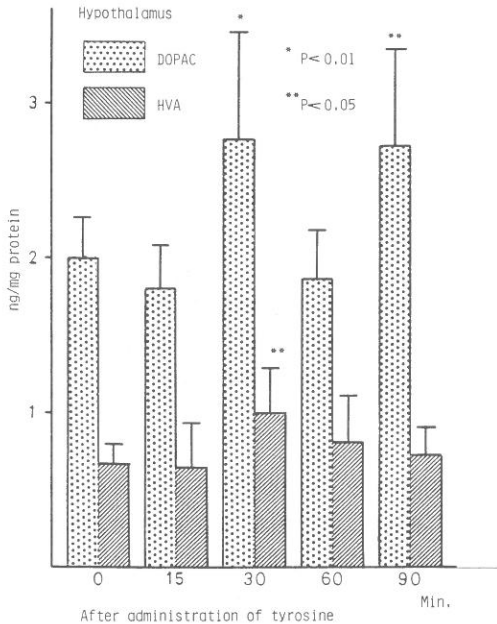


図1 チロシン投与後の視床下部のDOPACとHVA濃度の経時変化
※, ※※. 対照群と比較した。

慢性的に脳内チロシン濃度を増加させる目的で5%チロシン添加飼料で3週間の飼育実験を行った。全飼育期間を通じて体重のgainには有意差を認めなかった。血清 (343.4 ± 20.3 vs. 96.8 ± 24.6 nmol/ml, $P < 0.01$) 及び大脳皮質 (274.1 ± 30.7 vs. 109.1 ± 9.88 nmol/g, $P < 0.01$) のチロシン濃度はいずれも5%チロシン負荷群で増加した。視床下部のDOPACとHVA濃度はいずれも有意に増加した (図2)。しかし、線条体及び脳幹ではDOPAC及びHVA濃度に有意差を認めなかった。

脳内チロシン濃度を増加させる目的でガラクトサミンを用いてラットに肝臓障害を誘発させた。ガラクトサミン投与で血清 GOT (2355 ± 18 vs. 188 ± 108 IU), GPT (947 ± 85 vs. 48 ± 7 IU) 及びアルカリフォスファターゼ (731 ± 284 vs. 431 ± 56 IU) 活性の有意の増加を認めた。ガラクトサミン投与群では血漿のチロシン濃度に有意の

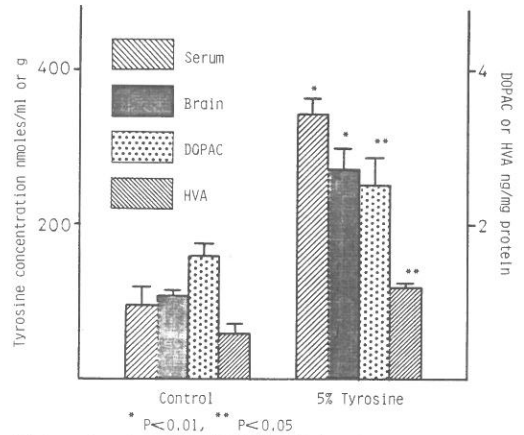


図2 チロシン添加飼料群の視床下部DOPACとHVA濃度
※, ※※. 対照群と比較した。

増加を認めなかったが大脳皮質 (163.7 ± 57.0 vs. 97.4 ± 13.3 nmol/g, $P < 0.02$) で増加した。ガラクトサミン処理後チロシンの負荷により血漿 (205.6 ± 53.7 vs. 110.9 ± 3.4 μ mol/l, $P < 0.01$) 及び大脳皮質 (193.5 ± 46.8 vs. 97.4 ± 13.3 nmol/g, $P < 0.01$) のチロシン濃度が有意に増加した。ガラクトサミン投与群の視床下部でDOPAC濃度のみが増加した (図3)

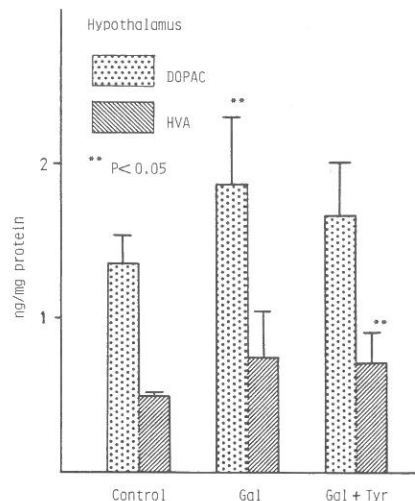


図3 ガラクトサミン処理ラットの視床下部DOPAとHVA濃度
※※. 対照群と比較した。

脳幹ではHVA濃度の有意の増加がガラクトサミン及びチロシン負荷の両群で認められた (図4)。

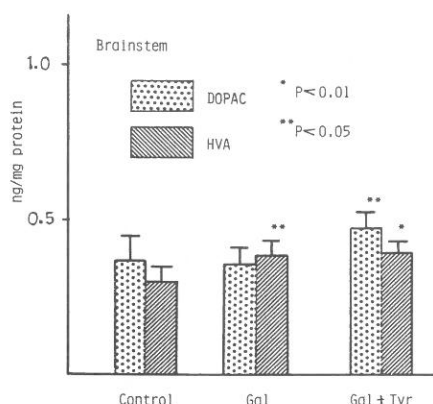


図4 ガラクトサミン処理ラットの脳幹 DOPACとHVA濃度
※, ※※. 対照群と比較した。

考 察

この実験結果から、脳内チロシン濃度の大量の増加は視床下部や脳幹のドーパミン代謝産物 DOPAC や HVA 濃度に影響を与えることを示した。しかしながら、著者らは前報⁶⁾において脳内チロシン濃度を増加させたラット脳において、脳内 DA 濃度が変化しなかったことを報告した。更にこの実験で用いた 5%チロシン添加飼料で飼育したラットでも同様の結果を得た（未発表）。このことから、脳内チロシン濃度の増加は DA 代謝回転を促進すると推定することができる。

脳内各部位によりチロシン濃度には相違があるがチロシンの投与により、脳各部位でほとんど均一の分布を示す。³⁾ 5%チロシン添加飼料で飼育したラット群では

脳内チロシン濃度は対照群に対し約2.5倍であった。しかしながら、チロシンの腹腔内投与群では、チロシンの吸収が悪く、投与量100~300mg/kg, body weightにおいて対照群の約1.5倍で投与後、15-90分間ではほぼ一定の濃度を保った。Oishi らはチロシンメチルエステルの大量投与によって脳内 DA 濃度が増加することを報告している。¹¹⁾ チロシン濃度の変化が DA 代謝に与える影響が少ないのはラット脳の TH活性は生理状態において内在チロシンで約75%²⁾ 飽和されていることによるものである。

この実験結果から、脳部位により、DA代謝に差を認めた。ドーパミン作働性神経を多く含む線条体と少ない視床下部や脳幹でのチロシン濃度の増加による DA 代謝の相違についての生理的意義は不明である。

結 語

脳内チロシン濃度の大量の増加は脳の特定の部位での DOPAC や HVA 濃度に変化を生じさせ、脳内 DA 代謝に影響を及ぼしていると考えられる。

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。

なお、本研究の一部は第56回日本生化学会総会（昭和58年9月29日、於：福岡大学）において発表した。

参 考 文 献

1. Nagatsu, T., Lavitt, M. and Udenfriend, S.: Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910-2917, 1964.
2. 永津俊治: ドーパミン生合成の調節. *代謝* **22**, 99-110, 1985.
3. 金行孝雄: 肝障害による脳内チロシン濃度の変化. *岡山県立短期大学紀要* **27**, 51-57, 1983.
4. Kaneyuki, T. and Shohmori, T.: Influence of malnutrition on brain catecholamine metabolism in young rats. *Bulletin of Okayama Prefectural Junior College* **28**, 41-48, 1984.
5. Kaneyuki, T. and Shohmori, T.: Influence of liver injury on the catecholamine metabolism in rat brain. *Acta Med. Okayama* **38**, 93-99, 1984.
6. Kaneyuki, T., Morimasa, T. and Shohmori, T.: Relationship of tyrosine concentration to catecholamine levels in rat brain. *Acta Med. Okayama* **38**, 403-407, 1984.
7. Sved, A.F. and Fernstrom, J.D.: Tyrosine availability and dopamine synthesis in the striatum: studies with gamma butyrolactone. *Life Sci.* **29**, 743-748, 1981.

8. Oishi, T. and Wurtman, R.J. : Effect of tyrosine on brain catecholamine turnover in reserpine-treated rats. *J. Neural Transm.* **53**, 101-108, 1982.
9. Waalkes, T.P. and Udenfriend, S. : a fluorometric method for estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 733-736, 1957.
10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
11. Oishi, T. and Szab, S. : Tyrosine increase tissue dopamine concentration in the rat. *J. Neurochem.* **42**, 894-896, 1984.

(昭和60年 3 月29日受理)