

## 実験的 maternal PKU に対する $BH_4$ 投与の影響

澤田 好伴，一色 玄

(大阪市大小児科)

大浦 敏明

(大阪市更生療育センター)

### 研究目的

テトラヒドロピオプテリン ( $BH_4$ ) は、フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr)、トリプトファンの、いわゆる芳香族アミノ酸の水酸化酵素に共通する補酵素である。しかし、組織中の  $BH_4$  の濃度は非常に低いため、これらの水酸化酵素に対して不飽和な状態であると考えられている。したがって、 $BH_4$  の投与により Phe 水酸化酵素をはじめとした芳香族アミノ酸水酸化酵素を活性化することが可能であると考えられる。このことを利用して、maternal PKU の母体に  $BH_4$  を投与して胎児に移行させ胎児肝の Phe 水酸化酵素を活性化することができれば、胎児におよぼされる高 Phe 血の影響を除去でき maternal PKU の治療に応用できると考えられる。今回我々は  $BH_4$  による maternal PKU の胎内治療の可能性について実験動物を用いて検討した。また、正常ヒトにおいても  $BH_4$  が肝 Phe 水酸化酵素を活性化することが可能かどうか検討したので報告する。

### 研究方法

妊娠モルモットを二群に分け、A群は Phe 350 mg/kg 単独腹腔内投与を、B群は  $BH_4$  100 mg/kg 経口投与し 60 分後に Phe 350 mg/kg を腹腔内投与した。採血は 30 分毎に行い、血清 Phe 濃度を bioassay 法で、血清総ピオプテリン濃度を Fukushima ら<sup>1)</sup> の方法で測定した。両群とも Phe 負荷 90 分後に胎仔を取り出し、胎仔血の血清 Phe 濃度および血清総ピオプテリン濃度を母モルモットと同様の方法で測定した。また、母および胎仔モルモットの肝 Phe 水酸化酵素活性を Hasegawa ら<sup>2)</sup> の方法で測定した。コントロールには何も負荷していない妊娠モルモットを使用した。

また、健康正常人男子一名に、(1) Phe 100 mg/kg 単独経口投与、(2)  $BH_4$  10 mg/kg 経口投与し 1 時間後に Phe 100 mg/kg 経口投与、(3)  $BH_4$  50 mg/kg 経口投与し 1 時間後に Phe 100 mg/kg 経口投与をそれぞれ行った。採血は 1 時間毎に行い、血清 Phe 値および Tyr 値を、オルトフタルアルデヒドを用いる蛍光法<sup>3)</sup>にて測定した。これらの実験に用いた  $BH_4$  はすべて R 型を使用した。

### 研究結果

A 群の母モルモットの血清 Phe 濃度のピークは Phe 負荷 60 分後で  $1321.2 \pm 121.2 \mu\text{mol}/\ell$  (N=

5)であった。これに対しB群の母モルモットの血清Phe濃度はPhe負荷後90分まで徐々に増加し90分値は577.5  $\mu\text{mol}/\ell$ , および593.3  $\mu\text{mol}/\ell$  (N=2)とA群に比べ低下していた。しかし、胎仔の血清Phe濃度はA群1103.0 $\pm$ 206.1  $\mu\text{mol}/\ell$  (N=8), B群1121.2 $\pm$ 218.2  $\mu\text{mol}/\ell$  (N=7)と差がなく, コントロールの胎仔の血清Phe濃度127.3 $\pm$ 30.3  $\mu\text{mol}/\ell$  (N=5)に比べ高値であった。また, 血清総ビオプテリン濃度についてはA群では母仔ともにコントロールよりわずかに高値であった。これに対しB群の母モルモットの血清総ビオプテリン値のピークは543.5 nmol/ $\ell$ , 818.9 nmol/ $\ell$ とA群の母モルモットのピークの10倍以上の高値であった。B群の胎仔の血清総ビオプテリン濃度は128.5 $\pm$ 31.8 nmol/ $\ell$  (N=7)と, コントロールの胎仔の血清総ビオプテリン濃度48.4 $\pm$ 4.6 nmol/ $\ell$  (N=5)に比し上昇していた。肝Phe水酸化酵素活性は表1に示すように(A)群の胎仔はコントロールに比し上昇していた。(B)群では, 母モルモットは一匹のみ上昇, 胎仔モルモットについては first litter の胎仔のみ低下していた。

健康正常人に対する投与実験では図1に示すように, Phe単独投与に比べてBH<sub>4</sub>+Phe投与の方が血清Phe値のピークが低下し血清Tyr値のピークが上昇していた。この傾向はBH<sub>4</sub> 10 mg/kg +Phe 100 mg/kg投与の時よりもBH<sub>4</sub> 50 mg/kg +Phe 100 mg/kg投与の時に著明であった。

表1. PheあるいはBH<sub>4</sub>+Phe投与時における母仔モルモットの肝Phe水酸化酵素活性

		N	Phenylalanine hydroxylase activity*	P Value	
Controls	Mothers	4	11.51 $\pm$ 0.35		
	Fetuses	12	2.88 $\pm$ 1.51		
(A) group					
Phenylalanine 350 mg/kg loaded	Mothers	5	17.20 $\pm$ 5.32	N.S.	
	Fetuses	8	5.13 $\pm$ 0.94	P < 0.05	
(B) group					
		① First litter			
		Mother	1	11.90	
Tetrahydrobiopterin 100 mg/kg + phenylalanine 350 mg/kg loaded	Fetuses	3	0.53 $\pm$ 0.04	P < 0.05	
			② Second litter		
		Mother	1	16.50	
		Fetuses	4	1.75 $\pm$ 0.43	N.S.

\*nmol tyrosine formed/min./mg protein

N.S.: Not significant

## 考 按

BH<sub>4</sub>を前投与後にPheを投与した母モルモットは, Phe単独投与した母モルモットに比べて血清Phe値の上昇がおさえられた。これはBH<sub>4</sub>が母モルモットの肝Phe水酸化酵素を活性化したためと考えられる。このようなBH<sub>4</sub>の肝Phe水酸化酵素に対する活性化作用はヒトにおける上

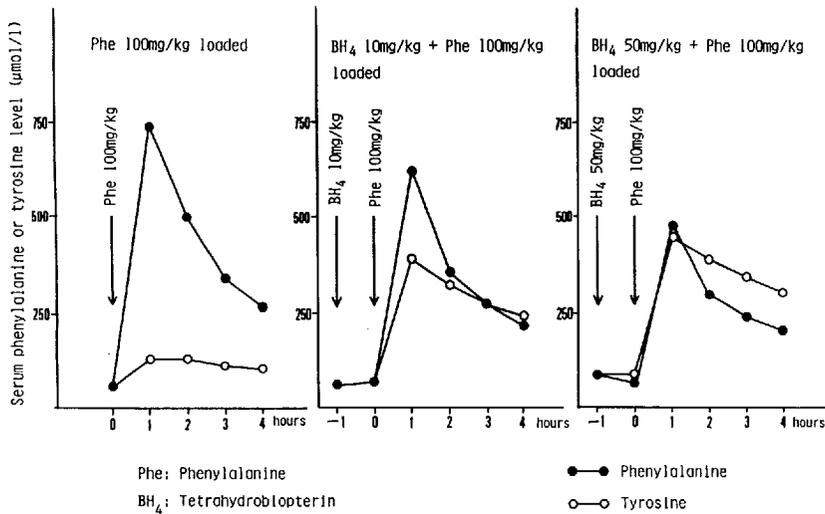


図 1. PheあるいはBH<sub>4</sub>+Phe投与時におけるヒト血清Phe値およびTyr値の変化

記の実験でも確認された。しかし、胎仔モルモットについてはPhe単独投与とBH<sub>4</sub>+Phe投与で血清Phe値に差がなく、BH<sub>4</sub>の胎仔肝Phe水酸化酵素に対する活性化作用については否定的であった。BH<sub>4</sub>+Phe投与の母モルモットの血清総ビオプテリン値のピークに比べて胎仔のそれは $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{8}$ の低値であり、BH<sub>4</sub>の胎盤通過性が不良であると推察された。これが、BH<sub>4</sub>が胎仔に対して効果がなかった原因かもしれない。肝Phe水酸化酵素活性についてはデータに統一性を欠いたが、これは酵素活性測定の際に補酵素として6-methyltetrahydropterinを飽和量加えている点や、低分子の存在が影響した可能性がある。以上の結果がヒトのmaternal PKUに適用できるかどうかは疑問だが、BH<sub>4</sub>による胎児治療の可能性については否定的な結果であった。今後は例数を増やし、BH<sub>4</sub>の投与方法や酵素測定法を工夫して更に検討していきたい。

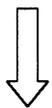
## 文 献

- 1) Fukushima, T. and Nixon, J.C.: Analysis of reduced forms of bioppterin in biological tissues and fluids. *Analyt. Biochem.* 102: 176-188 (1980)
- 2) Hasegawa, H. and Kaufman, S.: Spontaneous activation of phenylalanine hydroxylase in rat liver extracts. *J. Biol. Chem.* 257: 3084-3089 (1981)
- 3) Beeson, J.R. and Hare, P.E.: O-phthalaldehyde: Fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorecamine and ninhydrin. *Biochim. Biophys. Acta* 840: 235-244 (1985)



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 研究目的

テトラヒドロビオプテリン(BH4)は、フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)、トリプトファンの、いわゆる芳香族アミノ酸の水酸化酵素に共通する補酵素である。しかし、組織中のBH4の濃度は非常に低いため、これらの水酸化酵素に対して不飽和な状態であると考えられている。したがって、BH4の投与によりPhe水酸化酵素をはじめとした芳香族アミノ酸水酸化酵素を活性化することが可能であると考えられる。このことを利用して、maternal PKUの母体にBH4を投与して胎児に移行させ胎児肝のPhe水酸化酵素を活性化することができれば、胎児におよぼされる高Phe血の影響を除去できmaternal PKUの治療に応用できると考えられる。今回我々はBH4によるmaternal PKUの胎内治療の可能性について実験動物を用いて検討した。また、正常ヒトにおいてもBH4が肝Phe水酸化酵素を活性化することが可能かどうか検討したので報告する。