

フェニルアラニン負荷妊娠ラットにおける胎仔心奇形に関する研究

大浦 敏明 周山 逸人 谷 真由実
(大阪市更生療育センター) (大阪市立大学小児科) (大阪市立大学小児科)

I. 研究目的

フェニルケトン尿症の母親から生まれた児には、子宮内発育不全、知能障害、心奇形が高頻度に認められ¹⁾, maternal PKUと呼ばれている。今回我々は、妊娠早期のSD系ラットにフェニルアラニン(以下 phe)を負荷し、embryoの器官形成のcritical stageにおける蛋白合成並びにDNA合成への影響と、新生仔の心奇形発生に及ぼす影響について検討した。

II. 心奇形発生に及ぼす phe の影響に関する研究

1. 方法

ラットでは、胎令第8日頃に心臓原基が出現し、その後約1週間で心血管系が完成するとされている。よって、この胎仔心臓形成期にのみ母ラットに phe を負荷し、出生日の胎仔の心血管異常を検索する方法をとった。

Table 1 に示す方法で、SD系ラット妊娠第8日目～第11日目に、1日3回、8時間毎に、phe の腹腔内投与を行なった。Phe 負荷量及び負荷回数により3群に分けた。対照には生理食塩水を投与した。その後、出生予定日に当る妊娠第21日目にエーテル麻酔下に胎仔を取出し、西村²⁾の方法により胎仔心臓の形態学的検索を行なった。

2. 結果

Phe 負荷時の母ラットの血中 phe 濃度の動きは、2.2 mmol/kg B.W. 負荷では負荷後30分に最高値 0.99 $\mu\text{M}/\text{ml}$ となり、以後漸減した。一方、phe 4.0 mmol/kg B.W. 負荷では、1時間後に最高値 1.48 $\mu\text{M}/\text{ml}$ となり、以後漸減した。

Table 2 に、各群の心奇形発生頻度と奇形の種類を示す。低濃度の phe を負荷した group 1 では、心奇形の発生率は1.2%で対照との間に差はなかった。一方、高濃度の phe を負荷した group 2, group 3 では、各々 8.3%, 13.7%と、対照の1.6%に比し高率に心奇形発生を認めた。Phe 負荷回数の異なる group 2, group 3 の間に有意差はなかった。1腹当りの胎仔数は、高濃度の phe を頻回に負荷した group 2 で 8.3 匹と、対照に比し少ない傾向が認められ、胎内死亡が推察された。出生日の胎仔重量には各群で差を認めなかった。心奇形の種類は、24例中20例が心室中隔欠損症であった。

Table 1 L-Phenylalanine loading

Group	Dose	Day of gestation			
		8	9	10	11
1	2.2 mmol/kg B.W.	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
2	4.0 mmol/kg B.W.	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
3	4.0 mmol/kg B.W.		↓↓↓		
Control	0.9% NaCl	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓

↓↓↓: intraperitoneal injection every 8 hr

Cardiovascular malformation in fetal rats affected by L-phenylalanine

	Group 1	Group 2	Group 3	Control
Dams	7	10	10	11
Dams with fetuses having CHD*(%)	1 (14.3)	5 (50)	6 (60)	2 (18.2)
Fetuses	83	83	102	122
Fetuses with CHD (%)	1 (1.2)	7 (8.3)*	14 (13.7)**	2 (1.6)
VSD*	-	7	12	1
Anomaly of coronary artery	-	-	2	-
Anomaly of aortic arch	1	-	-	1
Anomaly of pulmonary valve	-	-	1	-
Fetuses/Dams	11.9 ± 1.35	8.3 ± 4.60	10.2 ± 2.97	11.1 ± 3.02
Mean weight of fetuses (g)	5.4	5.4	5.2	5.1

*: congenital heart disease *: ventricular septal defect
* p < 0.02 ** p < 0.001 by Student's t-test

III. 胎仔蛋白合成に及ぼす phe の影響に関する研究

1. 方法

胎仔心臓形成の critical stage において、母体高 phe 血症が胎仔蛋白合成に与える影響を以下の方法で検討した。妊娠10日目のSD系ラットに4.0 mmol/kg B.W.の phe を8時間毎に計4回腹腔内注射し、最終投与30分後に ^{14}C leucine を腹腔内に注射、さらにその1時間後に断頭し、大脳、小脳、肝臓、子宮を摘出、そして子宮から embryo を取出した。ここで embryo と呼称した組織には、胚及び羊膜、卵黄嚢、尿膜を含んでいる。そして、摘出した各組織をホモゲナイズし、酸可溶性分画、蛋白分画各々の ^{14}C leucine の放射活性を測定した。各組織への ^{14}C leucine の取込みを、母ラット血漿の放射活性に対する比で表わした。対照には生理食塩水を投与し、同様に検討した。同時に、このときの embryo 組織の遊離アミノ酸濃度の変化を調べた。

2. 結果

Fig 1に、phe 負荷妊娠ラットの大脳、小脳、肝、そして embryo の比放射活性を、酸可溶性分画、蛋白分画各々につき、対照を100%として示す。母ラットの脳組織及び embryo において著明な取込みの低下がみられ、酸可溶性分画においてことに低下が著明であった。

この時の embryo の遊離アミノ酸濃度だが、phe は約12倍、tyrosine は約2倍上昇し、その他のアミノ酸濃度は大多数が低下を示した。そのうち有意の低下を示したのは、aspartate, threonine + serine, valine, methionine, histidine の各アミノ酸であった。

IV. Thymidine kinase 活性に及ぼす phe の影響に関する研究

1. 方法

さらに、DNA合成への phe の影響をみる為、DNA合成の律速酵素の1つである thymidine kinase 活性について検討した。酵素活性の測定方法は、Litteria ら³⁾らの方法に準じた。胎令第11日目の embryo と、生後9日目の幼若ラット各組織を測定に用いた。Embryo の検体は、妊娠10日目の母ラットに phe 4.0 mmol/kg B.W. 又は生理食塩水を、8時間毎に計4回腹腔内注射し、最終負荷1時間後に取出した。幼若ラットに対しては、phe 4.0 mmol/kg B.W. を、生後8日目より8時間毎に計4回皮下注射し、最終負荷1時間後に大脳、小脳、肝臓、心臓を取出した。

2. 結果

Embryo 組織での thymidine kinase 活性は、phe 負荷群では対照の81.7%に低下していたが、統計学的有意差は認められなかった。一方、幼若ラットの大脳、小脳、心臓では各々負荷群で有意に thymidine kinase 活性の低下が認められた。大脳では82.8%、小脳では58.1%、心臓では65.7%に低下していた。

V. 考 案

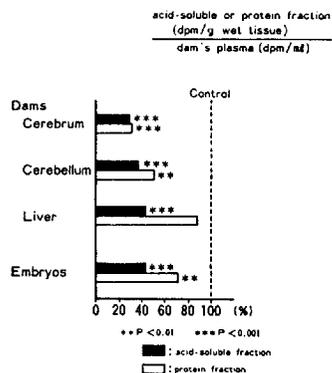
以上の実験結果より、胎仔器官形成の critical stage において、母体の高 phe 血症は、embryo のアミノ酸インバランスを惹起し、その結果胎仔蛋白合成を障害するものと考えられた。一方、phe は thymidine kinase 活性を低下させることで、DNA合成に影響を与えることが推定された。今回の動物実験で、心臓形成期に母体に高 phe 血症が存在した場合、胎仔に実際に心奇形が発生し、その頻度は母体の phe 濃度が高い程高率となることが示されたが、その機序として、このような蛋白合成、核酸合成に対する phe の影響が関与していることが考えられる。

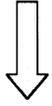
Maternal PKU における胎児への障害のメカニズムを解明し、より有効な予防法を確立する為には、今回行ったような妊娠早期の embryo を用いた、さらに詳細な実験的研究が必要と考えられる。

VI. 文 献

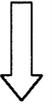
- 1) Lenke, R. B. and Levy, H. L. : Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. N. Eng. J. Med. 20:1202-1208(1980)
- 2) 西村耕一: マウス及びラット胎仔の胸部内臓奇形観察のための顕微解剖法 先天異常 14:28-40(1974)
- 3) Litteria, M. : Increased cerebellar thymidine kinase and DNA during early postnatal development of diethylstilbestrol treated rats. Exp. Neurol. 75:289-298(1982)

Fig.1 Changes in (¹⁴C)leucine uptake into acid-soluble and protein fraction of tissues with phenylalanine loading





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

フェニルケトン尿症の母親から生まれた児には、子宮内発育不全、知能障害、心奇形が高頻度に認められ、maternal PKU と呼ばれている。今回我々は、妊娠早期の SD 系ラットにフェニルアラニン(以下 phe)を負荷し、embryo の器官形成の critical stage における蛋白合成並びに DNA 合成への影響と、新生仔の心奇形発生に及ぼす影響について検討した。