

Title	DOPAの脳細胞への取り込みについて
Author(s)	難波, 仁
Citation	大阪大学, 1961, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28282
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 42 】

氏名・(本籍)	難波仁 なん ば ひとし
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 181 号
学位授与の日付	昭和 36 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	DOPA の脳細胞への取り込みについて
論文審査委員	(主査) 教授 今泉 礼治 (副査) 教授 西沢 義人 教授 須田 正巳

論文内容の要旨

目 的

近年中枢神経系に於ける Catecholamine 類の興奮鎮静に関する役割が注目され Reserpine 鎮静後は DOPA 注入に依ってのみ回復するが、DOPA 注入に依る興奮状態の際には Catecholamine 殊に Noradrenaline が脳内増加を来すものであるといわれ、而も循環血中の Noradrenaline の脳内移行に依るものでない事は一般に Catecholamine が blood-brain barrier を通過出来ないことからでも明らかである。近年になって Noradrenaline は中枢神経に於いてもその前駆物質である DOPA から生成されることが明らかにせられた事から Reserpine 鎮静からの dramatic excitement は脳内 endogenous の Catecholamine に依ることは疑う余地はない。従って DOPA の脳細胞への吸収の生理学的意義が注目される様になって来た。

一方 Amino 酸及び Catechol 体の腸管及び脳細胞への Active transport に関しては多くの報告があるがその移送機構に就いては現在迄の所不明の点が極めて多い。著者はモルモットの脳切片を用いて DOPA の細胞での蓄積に関する研究からその機構の解明を試みた。

方法並びに成績

実験材料として 100mg 前後のモルモット大脳皮質切片を用い Krebs Ringer Phosphate (PH7.0) 中に種々の基質、阻害剤及び DOPA (終末 0.1 μ m/ml) を添加し 30 分間 incubate する。反応終了後氷冷した Ringer で切片を洗滌後 0.4N 過塩素酸で homogenate する。抽出後 DOPA を PH8.0 で 20% 硫酸アルミニウムに吸着し IM 燐酸で脱着後 Trihydroxy indol 法に依り DOPA を測定した。

脳切片を 37°C で DOPA を含む medium 中で反応させると能動的に DOPA が切片中に取込まれる。之を継時的に追求すると 15 分後に可成の蓄積が認められ 30 分後にはほぼ最大に達し、以後一定値を保つことが認められた。0°C に保ったものでは DOPA の細胞内への積極的な取り込みは認められなかった。

I) 各種基質の影響 DOPA の脳細胞への取り込みを各種の基質を加え比較検討した。反応系に Glucose, Mannose, Fructose, Pyruvate を基質として加えると何れの場合にも、無基質の場合に比し DOPA の脳細胞への取り込みは増大する。

II) 各種阻害剤の影響 脳細胞への DOPA の取り込みは種々の阻害剤で阻害されるが、特に KF, CH_2ICOOH , DNP 添加に依る阻害は著明である。

III) 嫌気的条件の影響 Glucose を基質として N_2 飽和下での DOPA の取り込みは好気的条件下での取り込みより低下するが、やはり濃度勾配に逆らって DOPA が細胞内に蓄積するのが認められ、KF の添加に依って著明に阻害することが認められた。

IV) 構造類似物質の影響 DOPA と共に他の構造類似物質を添加してその影響をみると Phenylalanine, Tyrosine に依る阻害が著しく、この二者に何れも Competitive な阻害を示した。他の Amino 酸に依る阻害はそれ程著明には認められなかった。

V) l-型及び dl-型 DOPA を使用し脳切片への取り込みを比較した結果 l-型は dl-型の略2倍の DOPA を積極的に脳切片に取り込むことを観察した。

VI) 塩類溶液中の ion 組成の影響 正常 Ringer 中より Na^+ , K^+ , Mg^{++} を除去すれば何れの場合にも DOPA の取り込みは低下する。特に Na^+ 除去に依る低下は著明であり、 K^+ 除去に依る影響はそれ程著しくない。又高濃度の K^+ 添加に依り DOPA の取り込みは Competitive に阻害された。

VII) Ouabain に依る影響 10^{-4}M 及び 10^{-5}M の Ouabain 添加に依り脳細胞への DOPA の active な取り込みは全く阻害され、 10^{-6}M 及び 10^{-7}M の低濃度でも或る程度の阻害が認められた。

VIII) 細胞内 ion 分布の変化に就いて 正常 Ringer 中では DOPA の有無に依る細胞内外への Na^+ , K^+ の移動には有意の差は認められなかった。又 medium 中から Na^+ を除去すると細胞内から K^+ の漏出が認められた。次に medium 中から K^+ を除去すると Na^+ の細胞外への移動は正常の Ringer に比して低下する。又正常の Ringer に Ouabain を添加することに依って Na^+ , K^+ の active な移動は全く認められなくなった。

総括

以上の実験結果から脳切片に DOPA が積極的に取り込まれる機作の存在することを認めた。即ちこの取り込みは各種基質を添加することに依って促進されるが、同時に阻害剤が存すると蓄積は低下することから DOPA の蓄積が代謝に依って生ずる高エネルギーと共軛して行われると推定した。この際嫌気的条件下でも積極的な DOPA の取り込みが存することは興味深いことである。他方塩類溶液中の ion 組成を変化させることに依り DOPA の細胞への取り込みは種々に変化すること、Ouabain 添加に依り、 Na^+ , K^+ の active な動きは全く認められなくなり、DOPA の取り込みも亦見られなくなることから DOPA の取り込みと Na^+ 及び K^+ の間には何んらかの関連性があるのではないかと考えられる。

論文の審査結果の要旨

近年中枢神経系に於ける Catecholamine 類の興奮鎮静に関する役割が注目され reserpine 鎮静後は3, 4

dihydroxyphenylalanine (以下DOPA と略記) 注入に依ってのみ回復するがこの際には Catecholamine 特に noradrenaline が脳内増加を来す。而もこの増加は循環血中より脳内に移行した noradrenaline に依るものではないことは一般に catecholamine が blood-brain barrier を通過出来ないことからでも明らかである。

一方近年になって noradrenaline は中枢神経に於いてもその前駆物質である DOPA から生成されることが認められ DOPA の細胞への吸収の生理的意義が注目されるに至った。

著者はモルモットの脳切片を用いて DOPA の細胞での蓄積の機構を検討し以下の結果を得た。

脳切片を37°Cで DOPA を含む medium 中で反応させると能動的に DOPA が切片内に取り込まれる。この取り込みは30分後にほぼ最大に達し以後一定値を保つことが認められた。0°Cに保ったものでは DOPA の細胞内への積極的な取り込みは認められなかった。

I) 各種基質及び阻害剤の影響：DOPA の脳細胞への取り込みは glucose, pyruvate 等を基質として加えると増大するが同時に種々の阻害剤を加えるとその取り込みは低下する。特に KF, DNP, CH₂ICO-OH 添加に依る阻害は著明である。

II) 嫌気的条件の影響：glucose を基質として N₂ 飽和下での DOPA の取り込みはやはり濃度勾配に逆らって細胞内に蓄積する。そして KF 添加に依って取り込みは著明に阻害された。

III) 構造類似物質の影響：DOPA と共に他の構造類似物質を添加してその影響を検討した。phenylalanine, tyrosine に依る阻害が著しく、この二者は何れも competitive な阻害を示した。

IV) l-型及び dl-型 DOPA を使用し37°Cでの脳切片への取り込みを比較すると l-型は dl-型の略2倍量の DOPA を積極的に取り込むことを観察した。

V) 塩類溶液中の ion 組成の影響：正常 Ringer 中より Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ を除去すれば何れの場合にも DOPA の取り込みは低下する。特に Na⁺ 除去に依る低下は著明であり K⁺ 除去に依る低下はそれ程著しくはない。又高濃度の K⁺ 添加に依り DOPA の取り込みは competitive に阻害された。

VI) Ouabain に依る影響：10⁻⁴M, 10⁻⁵M の Ouabain 添加に依り DOPA の積極的な取り込みは完全に阻害され 10⁻⁶M 及び 10⁻⁷M の低濃度でも或る程度の阻害が認められた。

VII) 細胞内 ion分布の変化に就いて：正常 Ringer では DOPA の有無に依る細胞膜内外への Na⁺, K⁺ の移動に有意の差が認められなかった。又 medium 中から Na⁺ を除去すると細胞内から K⁺ の漏出が認められた。次に medium 中から K⁺ を除去すると Na⁺ の細胞外への移動は正常の Ringer に比し低下する。又 Ouabain を添加することに依って Na⁺, K⁺ の active な移動は全く認められなくなった。

以上の結果から脳切片に DOPA が積極的に取り込まれる機作の存在することを認めた。即ちこの取り込みは各種基質を添加することに依って促進されるが同時に阻害剤が存すると取り込みは低下することから DOPA の蓄積が代謝に依って生ずる高エネルギーと共軛して行われると推定した。この際嫌気的条件下でも積極的な DOPA の取り込みが存することは興味深いことである。

他方塩類溶液中の ion 組成を変化させることに依り DOPA の細胞への取り込みは種々に変化すること、Ouabain 添加に依り Na⁺, K⁺ の積極的な動きは全く認められなくなり、DOPA の取り込みも又見られなくなることから DOPA の細胞への取り込みと、Na⁺, K⁺ の細胞内外への積極的な移動の間には何んらかの関連性があるのではないかと考えられる。