

## 黄疸 Gunn ラット小脳とビリルビン存在様式

(分担研究： 核黄疸の予防に関する研究)

柏 俣 重 夫,\* 青 野 幸 子,\* 佐 藤 浩\*  
慶 野 宏 臣,\* 仙 波 禮 治\*

### 要 約

遺伝的に高ビリルビン (BR) 血症を示す Gunn ラットホモ接合体では、種々の条件下で大脳基底核や小脳の限局性黄染 (核黄疸) が観察される。その成立機序を明らかにする最初の試みとして、小脳における核黄疸の臨界期および BR 沈着部位について検討した。displacer を用いた実験より、小脳における核黄疸の臨界期は生後 15 日前後にあること、この時期に BR は内顆粒細胞層の glomerulus に限局的に沈着することが示唆された。次に小脳核黄疸に関連する因子の 1 つとして BR 結合タンパクを検索したところ、ラット小脳には少なくとも 6 つの結合タンパクが見いだされた。分子量はそれぞれ 15k, 17k, 18k, 30k, 31k, 240k であり、そのうち 30k と 31k タンパクは小脳に特徴的に存在する BR 結合タンパクと考えられた。

見出し語： Gunn ラット, 小脳, 核黄疸, ビリルビン結合タンパク

### 研 究 目 的

出生直後の新生児では、血液型不適合などの原因による溶血や肝における BR 抱合系の異常により黄疸が発生する。新生児の強度の黄疸は時として核黄疸を惹起する。交換輸血・光線療法等の医療技術の進歩により典型的な核黄疸は減少したものの、未熟児や低体重出生児の生存率の増加に伴い、血清 BR 値の高度な増加を伴わない予知不能な核黄疸の出現率が増加しており重大な問題となっている。この問題は、これまで主として血清中の BR 存在様式を中心におこなわれてきた核黄疸研究を、“BR 毒性を脳の発達との関連において捉える” という方向に転換していく必要性を示唆するものと思われる。

遺伝的に高 BR 血症を示す Gunn ラット (Gunn, 1938) ホモ接合体 ( $j/j$ ) は、ヒト同様核黄疸を惹起し (Johnson et al., 1959), その成立機序を明らかにするために非常によいモデル動物である。今回、核黄疸成立機序解明への新しいアプローチとして Gunn ラット小脳における核黄疸の臨界期および BR 沈着部位を明らかにすること、さらに核黄疸に関連する因子の 1 つとして小脳における BR 結合タンパクの検索を試みた。

### 材 料 と 方 法

抗炎症剤ブコロームにはアルブミンから BR を遊離させ (Yamamoto et al., 1979), 核黄疸を誘起する作用がある (Semba et al., 1978)。このブコローム (40mg/kg 体重) を生後 7, 11,

\* 愛知県心身障害者コロニー, 発達障害研究所, 周生期学部

15, 21日のj/jラット仔に皮下投与し, 0, 1, 24時間後の血清および小脳内ビリルビン濃度を測定, 小脳における核黄疸の臨界期を決定した。また24時間後に一部の小脳を固定し, 神経細胞およびアストロサイトの指標タンパクである $\gamma$ -エノラーゼ (Schmechel et al., 1980) および $\beta$ -S 100 (Cicero et al., 1970) タンパクに対する抗体を用いて免疫組織化学を行い, BRの沈着している細胞の同定を試みた。

ラット小脳におけるBR結合タンパクの有無を検討するために, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Kashiwamata et al., 1980) およびブロッティング法 (Towbin et al., 1979) を用い, プロット上でタンパク結合性 $^{14}\text{C}$ -BRを検出する方法を考案した。SDS-PAGEで分離した小脳, 大脳, 肝臓タンパクをニトロセルロース膜上にブロットした後, そのブロットを85  $\mu\text{M}$ 牛血清アルブミン, 続いて85  $\mu\text{M}$ 牛血清アルブミン/170  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -BRを含む緩衝液中でそれぞれ1時間インキュベート (室温) した。緩衝液で水洗後, 乾燥させてオートラジオグラフィを行った。

#### 結果および考察

全日齢において, 血清BR値はブコローム投与後1時間以内に急減しており, 少なくとも24時間はその状態が維持されていた (Table 1)。小脳BR濃度は逆に投与後1時間で増加していたが, その後の挙動は日齢により異なっていた (Table 2)。7, 21日齢では小脳BR濃度は24時間後にほぼ投与前の濃度にまで減少していたが, 11日齢ではそのような減少はなく1時間値とほぼ並行した。特筆すべきことに, 15日齢では24時間後における小脳BR濃度はより増加していた。投与後24時間の15日齢小脳では内顆粒細胞層の限局性黄染が認められたが他の日齢では黄染は認められなかった。BR沈着細胞は $\gamma$ -エノラーゼ (顆粒細胞) および $\beta$ -S 100 タンパク (アストロサイト) 抗体陽性細胞とは一致しなかった。以上のことより小脳における限局性黄染の臨界期は生後15日前後

にあること, BRは内顆粒細胞層に存在するglomerulusに沈着していることが示唆された。

この時期には小脳には少なくとも6つのBR結合タンパクの存在が見いだされた (Fig. 1)。分子量はそれぞれ15k(a), 17k(b), 18k(c), 30k(d), 31k(e), 240k(f)であったが, タンパクf以外はすべて核画分のみにもみられた。大脳にはd, eを除くBR結合タンパクが存在し, 肝臓ではa, fのほかにグルタチオンS-トランスフェラーゼのサブユニット1 (Ya), 2 (Yc)にBR結合活性が認められた。小脳BR結合タンパクの性質については現時点では未知な部分が多いが, それらの性格付けは小脳における核黄疸の成立機序を解明するうえで今後の重要な課題となると考えられる。

#### 文 献

- Cicero, T. J., Cowan, W. M., Moore, B. W. and Suntzeff, V. (1970) Brain Res., 18, 25-34.  
Gunn, C. K. (1938) J. Hered., 29, 137-139.  
Johnson, L., Sarmiento, F., Blanc, W. A. and Day, R. (1959) Am. J. Dis. Child., 97, 591-608.  
Kashiwamata, S., Aono, S. and Semba, R. K. (1980) Experientia, 36, 1143-1144.  
Schmechel, D. E., Brightman, M. W. and Marangos, P. J. (1980) Brain Res., 190, 195-214.  
Semba, R., Sato, H. and Yamamura, H. (1978) Arch. Dis. Child., 53, 503-505.  
Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354.  
Yamamoto, T., Adachi, Y. and Kuwahara, I. (1979) Gastroenterol. Japon., 14, 483-491.

#### Abstract

Pathogenic mechanism of cerebellar kernicterus in the jaundiced Gunn rat  
Shigeo Kashiwamata, Sachiko Aono, Hiroshi Sato, Hiroomi Keino and Reiji Semba

Homozygous Gunn rats with lifelong hyperbilirubinemia show kernicterus. The present study was designed to evaluate the critical period of cerebellar kernicterus using jaundiced Gunn rats and bucolome, which is potentially active to displace bilirubin from the serum albumin-bilirubin complex and to produce kernicterus. The critical period was found to be around postnatal day 15 and the deposition of bilirubin was observed mainly in the internal granule cell layer, where the glomerulus-like structure was almost preferentially

pigmented. To search for candidates related to or responsible for the cerebellar kernicterus at the molecular level,  $^{14}\text{C}$ -bilirubin-binding protein (BP) in the rat cerebellum was investigated with a newly developed method to detect BPs by a combination of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting and autoradiography. Six BPs with molecular masses of 15, 17, 18, 30, 31 and 240 kDa were detected in the cerebellum. Of these, 30 and 31 kDa-proteins were shown to be characteristic of cerebellum.

Table 1. Effect of bucolome on the plasma bilirubin level of developing homozygous Gunn rats

Postnatal day	bilirubin concentration (mg/dl)		
	control	time after bucolome treatment (h)	
		1	24
7	7.4 ± 1.2 (14)	2.3 ± 0.3 ( 8)**	3.5 ± 0.5 (11)**
11	8.7 ± 1.7 (12)	1.9 ± 0.5 ( 7)**	3.7 ± 1.0 ( 8)**
15	9.9 ± 1.8 (24)	4.3 ± 1.1 (10)**	6.5 ± 2.0 (28)**
21	5.8 ± 0.7 ( 6)	3.5 ± 1.0 ( 3)*	2.7 ± 0.5 ( 4)**

Results are expressed as the means ± S.D. with the number of animals in parentheses.

\* p<0.005, \*\* p<0.001 compared with the respective controls.

Table 2. Effect of bucolome on the cerebellar bilirubin level of developing homozygous Gunn rats

Postnatal day	bilirubin concentration (nmoles/g of wet weight)		
	control	time after bucolome treatment (h)	
		1	24
7	3.5 ± 0.8 (14)	8.5 ± 0.9 ( 8)***	3.7 ± 0.8 (11)
11	3.4 ± 0.5 (12)	8.9 ± 1.1 ( 7)***	7.8 ± 4.0 ( 8)**
15	3.8 ± 1.3 (24)	11.8 ± 1.5 (10)***	21.5 ± 11.5 (28)***
21	2.0 ± 0.2 ( 6)	8.7 ± 2.0 ( 3)***	2.6 ± 0.5 ( 4)*

Results are expressed as the means ± S.D. with the number of animals in parentheses.

\* p<0.05, \*\* p<0.005, \*\*\* p<0.001 compared with the respective controls.

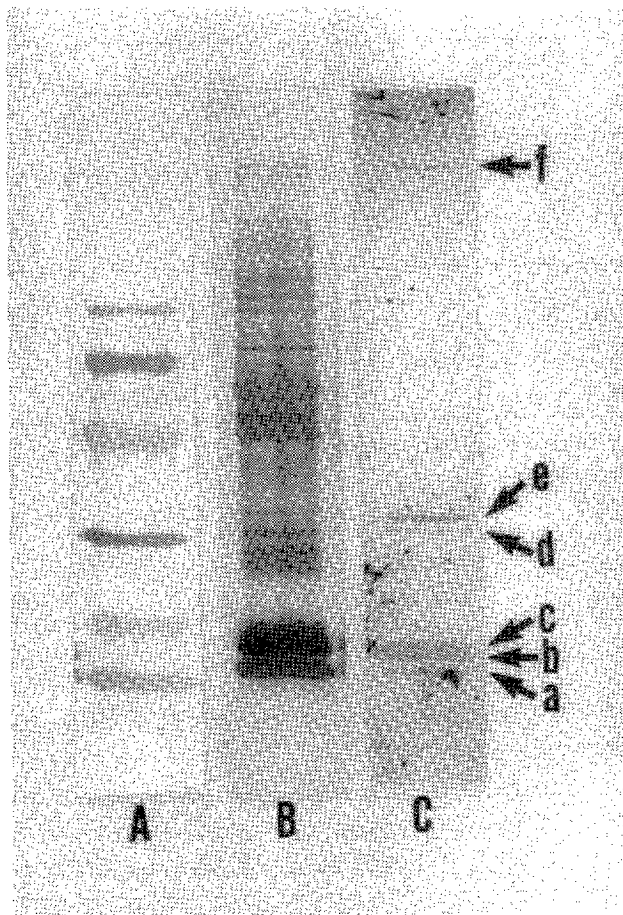
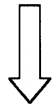
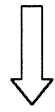


Fig. 1.  $^{14}\text{C}$ -Bilirubin-binding proteins in the rat cerebellum. A and B, 0.1 % amido black-staining; C, autoradiogram. A, standard proteins (from bottom in kDa; 14.4, 20.1, 30.0, 43.0, 67.0, and 94.0); B and C, cerebellar proteins. In C,  $^{14}\text{C}$ -bilirubin-binding proteins are indicated as a to f.



## 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



### 要約

遺伝的に高ビリルビン(BR)血症を示す Gunn ラットホモ接合体では、種々の条件下で大脳基底核や小脳の限局性黄染(核黄疸)が観察される。その成立機序を明らかにする最初の試みとして、小脳における核黄疸の臨界期および BR 沈着部位について検討した。displacer を用いた実験より、小脳における核黄疸の臨界期は生後 15 日前後にあること、この時期に BR は内顆粒細胞層の glomerulus に限局的に沈着することが示唆された。次に小脳核黄疸に関連する因子の 1 つとして BR 結合タンパクを検索したところ、ラット小脳には少なくとも 6 つの結合タンパクが見いだされた。分子量はそれぞれ 15k, 17k, 18k, 30k, 31k, 240k であり、そのうち 30k と 31k タンパクは小脳に特徴的に存在する BR 結合タンパクと考えられた。