

ビリルビン毒性

ビリルビンによるガンラット小脳ライソゾームの増加

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部

相 俣 重 夫 佐 藤 浩
慶 野 宏 臣 仙 波 りつ子

徳島大学医学部栄養学科栄養化学教室

山 田 博 明 名 取 靖 郎

常染色体性単純劣性の遺伝形式で高ビリルビン血症をひきおこすガンラットを使いビリルビン毒性の生体内発現について検討した。

ガンラットではビリルビンによって小脳の発育不全がおこるが、¹⁻⁴⁾ その初期変化としてブルキニエ細胞質中に空胞があらわれる。同様な変化は核黄疸のヒト新生児においても観察されており、⁵⁾ 小脳低形成はおこらないもののヒトでもガンラット小脳低形成初期にみられるビリルビン毒性発現と同様なことが生じている可能性がある。

われわれは今までにホモ個体の小脳ではライソゾーム中の酵素であるアリルスルファターゼ活性がヘテロに比べて著しく増加すること⁶⁾、また酵素組織化学的観察により、ライソゾームに局在する酵素である酸性ホスファターゼ活性陽性の細胞が低形成となった小脳にのみ現われることを示した。⁷⁾ 本研究ではパーコール密度勾配遠心分析と電子顕微鏡観察によってホモ個体小脳にあらわれるライソゾームについて検討を行った。

材料と方法

ガンラットはわれわれの研究室の closed colony から得られた生後 20 日齢のものを用いた。小脳ライソゾームの分画は Yamada らの方法⁸⁾ によった。小脳を 0.25 M- γ 糖でホモゲナイズし、核画分を遠心でのぞいた後、その上清を 0.35 M- γ 糖を含む比重 1.08 のパーコール (ファルマシア) 溶液に重層し遠心後分画した。ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素、ライソゾームのカテプシン (B と H) およびアリス

ルファターゼ (A と B) の活性はそれぞれ Pennington⁹⁾、Milsom ら¹⁰⁾、そして Barrett の方法¹¹⁾ で測定し、タンパクの定量には Lowry らの方法¹²⁾ を用いた。電子顕微鏡による観察は、小脳を 2.5% グルタルアルデヒドで前固定、1% オスミウム酸にて後固定し、常法に従ってエポキシ樹脂包埋後超薄切片を作製、JEM-100B 透過型電子顕微鏡で行った。

結 果

生後 20 日齢ガンラット小脳のホモジェネートにおいてカテプシンとアリルスルファターゼのタンパク量当りの活性はホモ個体がヘテロに比べてそれぞれ 1.4、2.0 倍の高値をしめした。密度勾配遠心法による各密度におけるライソゾームの分析はカテプシンを指標とした場合、比重 1.10 と 1.08 に 2 相性の分布をし、ホモとヘテロで分布パターンに差はなかった (図 1)。一方、アリルスルファターゼを指標としてライソゾームの分布をみるとヘテロではカテプシンとよく似た 2 相性のパターンを示したのに対し、ホモではさらにもう 1 つのピークが比重のもつとも軽い分画に認められた。コハク酸脱水素酵素の面からミトコンドリアの分布を調べるとホモ、ヘテロ両個体とも比重 1.07 付近に 1 つのピークとしてみられたが、ホモでは常にピークの高さがヘテロより低く、幅の広い分布であった。大脳では 3 つの酵素の分布パターン、ホモジェネートのタンパク量当りの活性ともに兩個体間に差がなかった。

小脳低形成部位には酸性ホスファターゼ陽性の細胞があらわれるが⁷⁾、その細胞中には多数の

型のライソゾームが存在し、脂質を含むライソゾームも多数観察された。(図2)

考 察

ガンラットホモ個体の低形成をおこした小脳で密度勾配遠心におけるライソゾームの分布パターンをみると、アシルスルファターゼを指標にした場合、比重の軽い分画にヘテロでは認められなかった活性ピークが現われた(図1, (A))。この分画は電子顕微鏡で観察された脂質をふくむ比重の軽いライソゾーム(図2)と思われる。興味あることにライソゾームに含まれる酵素であるアシルスルファターゼとカテプシンは異った分布を示すが、その理由は現在のところ不明である。ミトコンドリアはヘテロに比べてホモの個体で幅広い分布を示す。小脳低形成をおこした個体のブルキニエ細胞では巨大化したり、膨張したミトコンドリアが増加することが観察されているのでその結果と思われる。

参 考 文 献

- Schutta, H. S. and Johnson, L. (1967) *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 26, 377-396
- Sawasaki, Y., Yamada, N. and Nakashima, H. (1976) *J. Neurochem.* 27, 577-583
- Sato, H., Semba, R. K. and Kashiwamata, S. (1977) *Biol. Neonate* 32, 158-165
- Semba, R. K., Aoki, E. and Kashiwamata, S. (1982) *Biomed. Res* 3, 319-329
- 仙波礼治, 山崎義一, 水谷 昭 (1982) 未熟児新生児研究会抄録 126
- Aoki, E., Semba, R. K. and Kashiwamata, S. (1982) *J. Neurochem.* 39, 1072-1080
- Keino, H. (1982) *Cell Tissue Res.* 223, 593-601
- Yamada, H., Hayashi, H. and Natori, Y. (1984) *J. Biochem.* (in press)

- Pennington, R. J. (1961) *Biochem. J.* 80, 649-654
- Milsom, D. W., Rose, F. A., Dodgson, K. S. (1972) *Biochem. J.* 128, 331-336
- Barett, A. J. (1972) *Anal. Biochem.* 47, 280-293
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

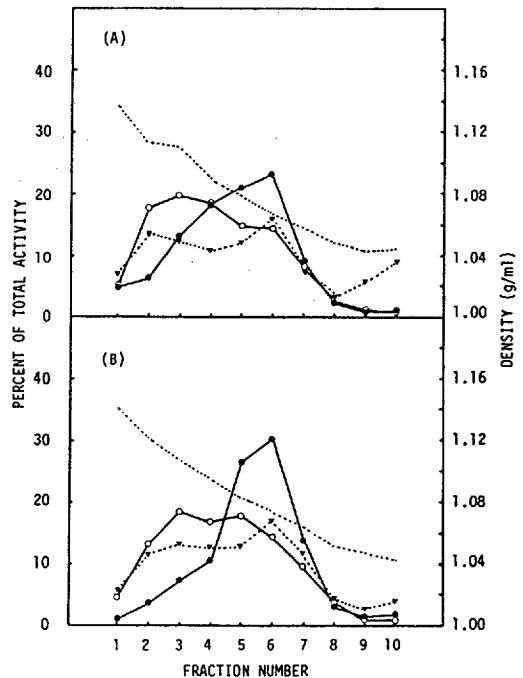


図1. ガンラット小脳ライソゾームのパーコール密度勾配遠心による分画。(A)20日齢ガンラットホモ個体の小脳。(B)同日齢のヘテロ個体の小脳。—○カテプシン, —▲アシルスルファターゼ, ●—●コハク酸脱水素酵素, ----密度勾配。

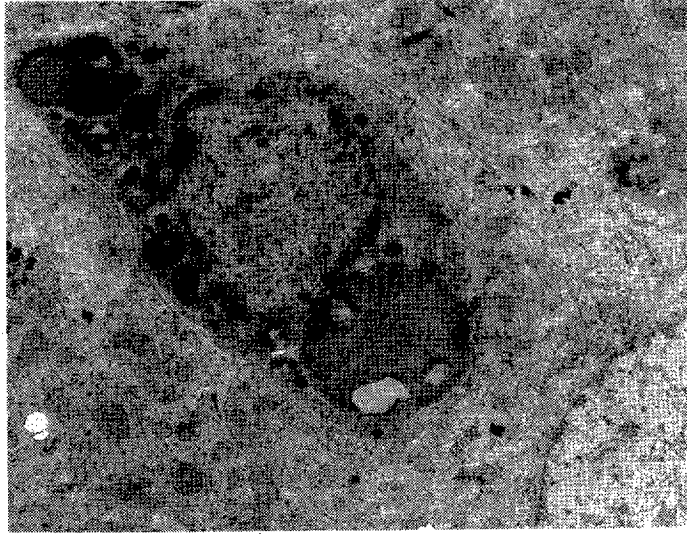


図2. ガンラット小脳低形成部位に現われるライソゾームを含む細胞の電子顕微鏡写真。
20日齢ガンラットホモ個体の小脳虫部Tuberの酸性ホスファターゼ陽性細胞。
11,000倍。



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



常染色体性単純劣性の遺伝形式で高ビリルビン血症をひきおこすガンラットを使いビリルビン毒性の生体内発現について検討した。

ガンラットではビリルビンによって小脳の発育不全がおこるが、その初期変化としてブルキニエ細胞質中に空胞があらわれる。同様な変化は核黄疸のヒト新生児においても観察されており、小脳低形成はおこらないもののヒトでもガンラット小脳低形成初期にみられるビリルビン毒性発現と同様なことが生じている可能性がある。

われわれは今までにホモ個体の小脳ではラインゾーム中の酵素であるアリルスルファターゼ活性がヘテロに比べて著しく増加すること、また酵素組織化学的観察により、ラインゾームに局在する酵素である酸性ホスファターゼ活性陽性の細胞が低形成となった小脳にのみ現われることを示した。本研究ではパーコール密度勾配遠心分析と電子顕微鏡観察によってホモ個体小脳にあらわれるラインゾームについて検討を行った。