

無アルブミン—高ビリルビン血症ラット 及び無アルブミンラットにおけるビリル ビンの脳内移行について

(財)佐々木研究所・化学部

長瀬 すみ, 高橋 正一

非抱合型高ビリルビン血症を呈するGunnラット(1,2)と無アルブミン血症ラット(N-AR, 3)との交配により育成された無アルブミン—高ビリルビン血症ラット(AJR, 4)は, 重篤な核黄疸を呈し生後20日までに死亡する事が判明している。今回我々は, 血清ビリルビンの脳内移行の機序を解明する事を目的として, AJRの血清及び脳中ビリルビン量を測定するとともに, NAR血清中におけるビリルビン結合蛋白の同定を行った。さらにNARをもちいて, ビリルビン注入実験を行いビリルビンの脳内移行の機構を検索した。

材料及び方法

1. 動物—NAR, AJR, Gunnラット及び正常ラットは, コンベンショナルな状態で, 室温23±2℃, 照明(6時~18時)の条件下で飼育した。飼料は, 日本クレア社のCE-2をもちい水と共に自由摂取させた。

2. ビリルビンの測定—血清ビリルビンは, 和光純薬のビリルビンB—テストワコーキットをもちいた。脳中ビリルビンの測定は, 沢崎(5)らの方法によった。血清ビリルビン中の蛋白結合型ビリルビンの測定は, セファデックスG-25カラムにより分離し測定した。

3. NAR血漿中のビリルビン結合蛋白の同定
3-1 セファクリルS-300ゲルクロマトグラフィー—³Hラベルビリルビン(20mCi/mmol)にキャリアービリルビンを加え最終濃度100µg/mlに調整したビリルビン溶液0.1mlにNAR及び正常ラット血清0.9ml加え, 25℃2時間インキュベートした。インキュベート終了後, 試料をセファクリルS-300カラム(1.8×100cm)に添加し, ゲルクロマトグラフィーを行った。

3-2 超遠心法—1mg/ml濃度ビリルビン溶液

0.3mlを2.7mlのラット血漿に加え, 25℃で2時間インキュベートした。インキュベート終了後, 2.5mlをセファデックスG-25カラムにてゲル濾過を行い, 溶出された蛋白結合ビリルビン分画を集め, 密度1.466g/mlのNaBr溶液を用いて密度1.21g/mlに調整後, 超遠心チューブに入れ105,000xg, 16℃で16時間遠心し, 6分画に分画した。各画分のビリルビン濃度, 総脂質, α—フェトプロテイン及び総蛋白量を測定した。

4. 精製リボ蛋白及びアルブミンとビリルビンとの結合—各種濃度(10-1000µg/ml)のビリルビン溶液をリボ蛋白(7.4mg/ml)及びラットアルブミン(10mg/ml)に加え25℃で2時間インキュベート後, 結合型及び遊離ビリルビンをセファデックスG-25カラムを用いて分離し, 結合型及び遊離ビリルビンを測定, 結合定数を算出した。

5. ビリルビン注入実験—ビリルビン溶液は, 50mg/mlのビリルビン溶液を2.5mg/ml濃度になる様5.6mMタウロコール酸溶液を加え, 1M酢酸にてpH8.0に合わせたものを使用した。リボ蛋白及びアルブミン結合ビリルビン溶液の調整は, リボ蛋白又はアルブミン溶液を加え, 25℃2時間インキュベート後, セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーにより, 結合型ビリルビンを得た。ビリルビンの濃度は, 2.5mg/mlとした。ビリルビンの注入方法は, Diamond(6)らの方法にしたがい, ペントバルビタール麻酔下で大腿部静脈に体重100g当たり1mlのビリルビン溶液を30分間一定速度で注入した。注入終了10分後に, 腹部大動脈より採血するとともに脳を採取し, 血清中及び脳中ビリルビン量を測定した。

結果及び考察

AJRの血清ビリルビンの値は, Gunnラット

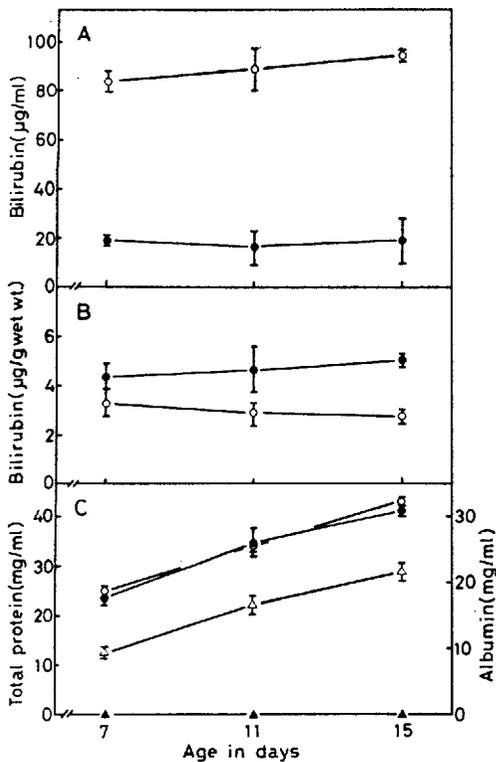


Fig. 1. Bilirubin concentrations in serum and brain of AJR and Gunn rats. Serum and brain were obtained from groups of 3 rats of each strain of the indicated ages. Bilirubin levels of the serum and brain were determined by the diazo method (14) and spectrophotometric method (15), respectively. Total serum protein concentration was determined by the biuret reaction (19). Serum albumin was determined by the single radial immunodiffusion method (18) with rat serum albumin as a standard. (A) Serum bilirubin concentration. (B) Brain bilirubin content. (C) Serum albumin and total protein concentrations. ●, AJR; ○, Gunn rats; ▲ and △, albumin concentrations of AJR and Gunn rats, respectively.

に比べ約75%低かったが、脳中ビリルビン量は、1.2~2.7倍の高値を示した(図1A, B)。この様な状態は、血清ビリルビン量が低い新生児黄疸患者と類似している。また、AJRは、血清中にアルブミンが無いにもかかわらず、血清ビリルビンの約90%は結合型ビリルビンであった(表1)。そこで、無アルブミンラット血清中のアルブミンに代わるビリルビン結合蛋白の同定を、ゲルクロマトグラフィー及び超遠心法をもちいて行った。セファクリルS-300カラムクロマトグラフィーによるNAR血清及び正常ラット血清ビリルビンの溶出パターンを図2に示す。NAR血清蛋白は、I~Nに分画された。正常ラット血清蛋白は、I~III及びアルブミン分画に溶出された。ビリルビンは、NARで蛋白分画IとIIの間に溶出され、正常ラットではアルブミン分画に溶出された。この結果、NAR血清におけるビリルビン結合蛋白としては、リポ蛋白、 α_2 -マクログロブリン、IgM等が考えられた。そこで次ぎに、ビリルビン結合蛋白画分を密度1.21に調整し、超遠心を行った。10週令のNAR血漿では、ビリルビンは上層分画(リポ蛋白分画)に認められたが(図3A)、正常ラットでは、ビリルビンは下層分画に認められた(図3B)。又、結果は示さなかったが8日令のNAR及びAJR血漿も同様な結果が得られた。この結果、NAR及びAJRのビリルビン結合蛋白は、リポ蛋白であり、 α -フェト蛋白の存在する8日令でも、ビリルビンはリポ蛋白質に結合する事が判明した。さらに、ビリルビンがリポ蛋白の蛋白または脂質のどちらに結合しているかを調べた結果、ビリルビンは、リポ蛋白の脂質と結合している事が示唆された(表2)。リポ蛋白及びアルブミンに対するビ

TABLE I. Serum and brain bilirubin contents of AJR and Gunn rats of 15 days old.

Bilirubin ^a	AJR	Gunn rats
Serum total bilirubin (µg/ml)	19.1 ± 6.8 ^b	95.0 ± 3.0
Serum bound bilirubin (µg/ml)	17.6 ± 5.2	90.3 ± 2.4
Brain bilirubin (µg/g wet weight)	5.1 ± 0.2	2.8 ± 0.2

^a The bilirubin content was measured as described in "MATERIALS AND METHODS." ^b Results are expressed as means ± S.D. for 3 rats.

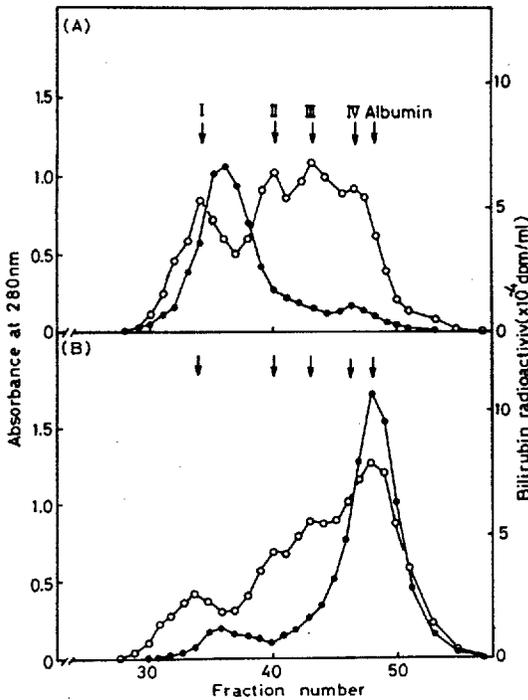


Fig. 2. Sephacryl S-300 gel filtration of plasma of NAR and normal rats labeled with $[^3\text{H}]$ bilirubin. (A) NAR, (B) normal rats. ●, radioactivity; ○, absorbance at 280 nm. The experimental procedure is described in "MATERIALS AND METHODS."

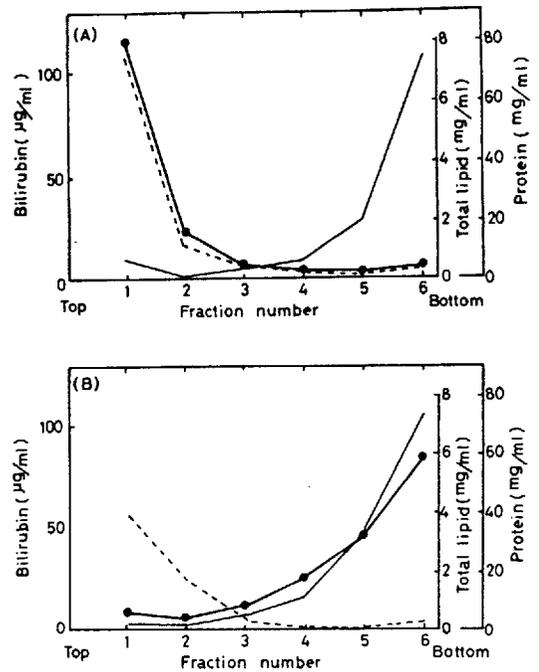


Fig. 3. Distribution of bilirubin in plasma of rats of 10 weeks old on ultracentrifugation. (A) NAR, (B) normal rats. ●, bilirubin; —, protein; ---, total lipid. The experimental procedure is described in "MATERIALS AND METHODS."

リルビンの結合定数を調べた結果(図4), $6.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 及び $7.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ となった。

NAR をもちいた, リポ蛋白及びアルブミン結合ビリルビンを注入した実験の結果を図5に示す。NAR の脳中ビリルビン量は, リポ蛋白ビリルビンとビリルビンのみを注入したラットで差はなかった。しかし, 血清ビリルビン量は, リポ蛋白結合ビリルビン注入群の方が高かった。またアルブミン結合ビリルビン注入群は, 血清ビリルビン量がリポ蛋白結合ビリルビン注入群と変わらないにもかかわらず, 脳中ビリルビン量は半分以下になった。この結果, リポ蛋白結合ビリルビンは, 脳に移行し易いが, アルブミンに結合したビリルビンは, 脳中に移行し難い事が判明した。脳血液関門は, 細胞膜質の一般的特性をそなえており, 非イオン可溶性脂質は, 脳血液関門をわりあい通過できるが, 大分子量の有極有機物は, 抑制される事が知られている(7, 8)。しかし, 我々の実

TABLE II. Binding of bilirubin to purified lipoprotein and apolipoprotein.

	Lipid ^a (mg/ml)	Bound bilirubin ^b (μg/ml)
Lipoprotein	3.09	84.6
Apolipoprotein	N.D. ^c	22.3

^a The lipid content was measured as described in "MATERIALS AND METHODS." ^b One hundred μl of bilirubin solution (1 mg/ml) was mixed with 0.9 ml of lipoprotein (2.21 mg protein in PBS) or apolipoprotein (2.33 mg protein in PBS), and incubated at 25°C for 2 h. Then bound bilirubin was separated from unbound bilirubin by Sephadex G-25 gel filtration. The bilirubin content was measured as described in "MATERIALS AND METHODS." ^c Not detected.

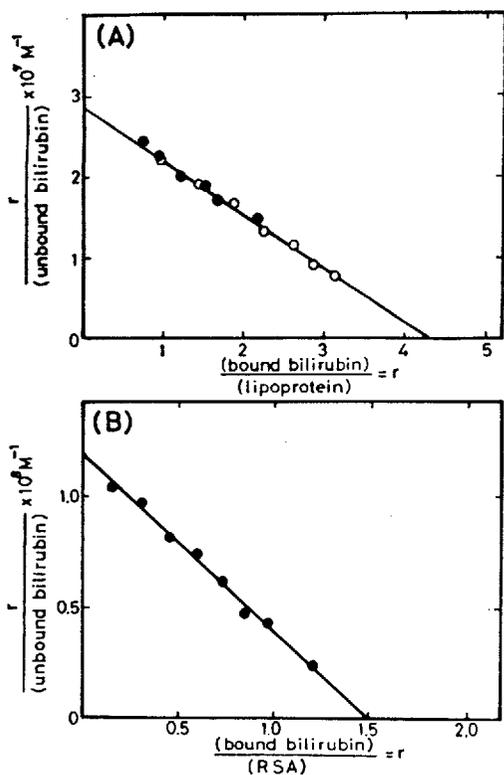


Fig. 4. Scatchard plots of data on binding of bilirubin to lipoprotein and albumin. (A) ●, NAR plasma lipoprotein; ○, normal rat plasma lipoprotein. (B) ●, normal rat serum albumin. The experimental conditions are described in "MATERIALS AND METHODS."

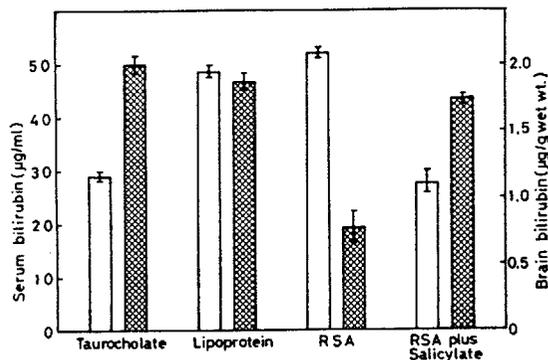


Fig. 5. Effects of lipoprotein and albumin on bilirubin-transport into the brain of NAR infused with bilirubin. □, serum bilirubin; ▨, brain bilirubin. NAR of 6 weeks old were infused with bilirubin (2.5 mg/ml) in various solutions as described in "MATERIALS AND METHODS." Results are expressed as means \pm S.D. for 3 rats.

験結果は、この概念とは異なっていた。アルブミンよりも大きな分子量であるリポ蛋白に結合したビリルビンは、脳血液関門を通過してしまう事実より、脳血液関門の概念は、分子量に依存するのではなく、分子の親和性に支配されている事が示唆される。新生児期におけるビリルビンの動態は、ビリルビンに対する親和性の高い脳成分に、アルブミン以外の蛋白に結合したビリルビンが移行する可能性が考えられた。

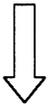
文 献

1. Schmid, R., Axelrod, J., Hammakar, L., & Swarm, R. L. (1958) *J. Clin. Invest.* 37, 1123-1130
2. Johnson, L., Garcia, M. L., Figueroa, E. & Sarmiento, F. (1961) *Am. J. Dis. Child.* 101, 322-349
3. Nagase, S., Shimamune, K., & Shumiya, S. (1979) *Science* 205, 590-591
4. Shumiya, S., & Nagase, S. (1981) *Exp. Anim.* 30, 291-297
5. Sawasaki, Y., Tamada, N., & Nakajima, H. (1976) *J. Neurochem.* 27, 577-583
6. Diamond, I., & Schmid, R., (1966) *J. Clin. Invest.* 45, 678-689
7. Schanker, L. S. (1962) *Pharmacol. Rev.* 14, 501-509
8. Dobbing, J. (1968) in the *Development of the blood brain barrier* (Lajtha, A., & Ford, D. H., eds) pp. 417-425, Elsevier, New York.



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



非抱合型高ビリルビン血症を呈する Gunn ラット(1,2)と無アルブミン血症ラット(N-AR,3)との交配により育成された無アルブミン-高ビリルビン血症ラット(AJR,4)は、重篤な核黄疸を呈し生後 20 日までに死亡する事が判明している。今回我々は、血清ビリルビンの脳内移行の機序を解明する事を目的として、AJR の血清及び脳中ビリルビン量を測定するとともに、NAR 血清中におけるビリルビン結合蛋白の同定を行った。さらに NAR をもちいて、ビリルビン注入実験を行いビリルビンの脳内移行の機構を検索した。