

ビリルビン性脳障害の成立機構とその予防に関する 基礎的研究：実験モデル Gunn rat における小脳発 育障害と glutathione S-transferase

(分担研究：核黄疸の予防に関する研究)

柏 俣 重 夫,* 佐 藤 浩,* 浅 岡 一 雄**
仙 波 禮 治,* 慶 野 宏 臣,* 青 野 幸 子*

要 約

われわれは Gunn ラットの発育障害小脳で glutathione S-transferase (GST) 活性が正常の2倍に増加していることを見いだしているが、脳での GST の役割はほとんど解明されていない。ビリルビン(BR)性小脳障害におけるこの酵素の役割を明らかにする目的で本研究をおこなった。光線療法により小脳発育障害の程度を軽くした黄疸ラットを作製し検討した結果、GST 活性増加は BR による酵素誘導ではなくて、小脳低形成による2次的結果であることがわかった。また抗 GST 抗体を用いて GST の小脳での細胞局在を調べたところ、GST は astroglial cell と ependymal cell に局在した。神経細胞と oligodendroglial cell はほとんど染色されなかった。黄疸ラット小脳で GST 活性が上昇するのは反応性 astroglial cell が発育障害の小脳で増加するためとわかった。

見出し語：ビリルビン，Gunn ラット，小脳発育障害，グルタチオン，S-トランスフェラーゼ

研 究 目 的

臨床的あるいは病理学的に核黄疸をとめない、死をまぬがれた場合でも重度な脳性麻痺、精神遅滞を後遺症として残す先天性ビリルビン(BR)代謝異常症、Crigler-Najjar 症候群 I 型の本態は BR:UDP-グルクロン酸転移酵素の遺伝的欠損(Arias, 1979)であるが、持続的高 BR 血症、核黄疸(BR 脳症)、黄疸の遺伝形式(常染色体性劣性)、酵素欠損等が同じである Gunn ラット(柏俣、仙波, 1979)は本症候群の好個な疾患モデル動物と考えられている。しかしながら、げっ歯類の特

徴としてその小脳は生後にいちじるしく発達するため、生後早期に中枢神経系に侵入した非抱合型 BR は Gunn ラットにおいて小脳発育障害(小脳低形成)をひきおこす(柏俣ら, 1984)。脳の特異性とその脆弱性はよく知られているところであり、BR による神経細胞毒性がラット小脳において特徴的に発揮されるということは脳障害の基本的理解に多く貢献する情報をもたらしてくれるものと期待される。

ラット肝において glutathione S-transferase (GST) は生体に侵入する各種異物質あるいは生

* 愛知県心身障害者コロニー、発達障害研究所、周生期学部

(Department of Perinatology, Institute for Developmental Research, Aichi Prefecture Colony)

** 京都大学霊長類研究所、生化学部門

(Department of Biochemistry, Primate Research Institute, Kyoto University)

体内で生じる類縁物質と還元型グルタチオンとの抱合を触媒する解毒酵素として知られている(高橋, 浅岡, 1980)。肝細胞質でBRと結合するリガンディンはGSTのアイソザイムの一つである(Litwack et al., 1971; Habig et al., 1974; Hayes et al., 1979)。最近, GSTが肝のみでなく脳にも存在することが明らかになってきた(Asaoka et al., 1977; Das et al., 1981; Asaoka & Takahashi, 1983a; Theodore et al., 1985)。リガンディンはin vitroでBR毒性を予防する効果があると報告されている(Kamisaka et al., 1975)。われわれはGunnラットの发育障害小脳でGST活性が正常の2倍に増加していることを見いだしている(Asaoka et al., 1986)が、脳でのGSTの役割はほとんど解明されていないのが現状である。本研究はGunnラットでみられるBR性小脳障害と中枢神経系でのこの酵素の役割との関連を明らかにする目的でおこなった。

材料と方法

われわれの研究室で黄疸遺伝子(j)をSprague-Dawley系ラットに導入されたSD-Gunnラットのホモ接合体(j/j)をもちいた。対照としては小脳发育も含め正常に发育するヘテロ接合体(j/+)をもちいた。ラットをクロロホルムで麻酔し、0.25 M しょ糖で還流後、小脳を取り出した。9倍量の0.25 M しょ糖を加えPotter-Elvehjem型ホモゲナイザーを用いて酵素標品を調製した。酵素活性はAsaoka (1977)およびAsaoka and Takahashi (1983b)の方法によって測定した。タンパク量はウシ血清アルブミンを標準にしてLowryら(1951)の方法によって測定した。免疫組織化学はAoki et al., (1985)に記載された方法でおこなった。抗GST抗体は精製ウシ肝臓GST(Asaoka et al., 1984)をウサギに投与して得た。ラット照射および血中BR値の測定はSato et al. (1977)の方法でおこなった。

結果と考察

光線療法により小脳发育障害の程度を軽くした

黄疸ラットを作製しj/jラット小脳のGST活性の上昇が黄疸(BR)によるものか小脳の发育障害の結果であるのかをしらべた。表1にラット仔に照射(生後4-7日, 1日8時間)し、生後15日で断頭と殺して小脳重, 血中BR値, GST活性を測定した値を示す。血中BR値には照射j/jと対照j/jの間で差がなかったが、小脳重は照射群が対照群の約2倍の重さに増加した。一方, GST活性は同腹仔では常に照射j/j群の方が対照j/j群より低い値を示した。GSTの半減期が約2日であることと照射をやめると24時間で血中BR値は対照と同じ高値にもどる(慶野, 私信)ことを考えると、发育障害の小脳におけるGST活性増加はBRによる酵素誘導ではなくて、小脳低形成による2次的結果と考えられる。

次に抗GST抗体を用いてGSTの小脳での細胞局在を検討した(図1)。j/j, j/+ともGSTはastroglial cellとependymal cellに局在した(図1, AとB)。

神経細胞とoligodendroglial cellはほとんど染色されなかった。抗GST抗体による染色はj/jラット小脳でj/+ラットよりも強かった。j/j小脳ではBR毒性により神経細胞が減少し相対的に反応性astroglial cellが増加する(Aono et al., 1985; Aono et al., 1988)のでj/j小脳でのGST活性増加は反応性astroglial cellがふえたことによる上昇とおもわれる。また小脳で神経細胞とastroglial cellのBR毒性に対する感受性が異なるのはGSTが後者に存在してBR毒性を発現しにくくしているのかもしれない。

Abstract

Studies on the mechanism and prevention of bilirubin encephalopathy: Cerebellar hypoplasia and glutathione S-transferase in the Gunn rat as an experimental model

Shigeo Kashiwamata, Hiroshi Sato, Kazuo Asaoka*, Reiji Semba, Hiroomi Keino and Sachiko Aono

The activity of cerebellar glutathione S-transferase was investigated at postnatal day 15 in jaundiced homozygous (j/j) Gunn rats photo-irradiated for 8 h/day from postnatal day 4 through 7 comparing with that in non-irradiated j/j rats. Immunocytochemical localization of the enzyme in the cerebellum was also studied with 15-day-old j/j and heterozygous (j/+) rats using antibodies to bovine liver glutathione S-transferase. Although the plasma bilirubin concentrations showed no significant difference between irradiated and non-irradiated j/j rats, the cerebellar wet weight in the former rats was about two times as high as that in the latter. On the other hand, the enzyme activity was found always lower in irradiated rats than in non-irradiated. These results indicate that the increased activity of cerebellar glutathione S-transferase in j/j rats previously reported (Asaoka et al., *Biomed. Res.*, 7:103-106, 1986) is not ascribed to induction by bilirubin of the enzyme but is a consequence of the cerebellar hypoplasia due to bilirubin. It was also shown immunocytochemically that the enzyme was localized in astroglial cells of the cerebellum and the staining intensity was stronger in j/j rats than in j/+ rats consistent with the earlier observation of the increase in number of reactive astroglial cells in the j/j rat cerebellum.

文 献

- Aoki E., Semba R., Keino H., Katoh-Semba R. and Kashiwamata S. *Biomed. Res.* 6, 145-152, 1985
- Aono S., Sato H., Semba R. Kashiwamata S. and Eng L.F. *J. Neurochem.* 44, 1877-1884, 1985
- Aono S., Kato T., Tanaka R., Sato H., Semba R. and Kashiwamata S. *J. Neurochem.* 1988 (in press)
- Arias I.M. in *Birth Defects Compendium* (Bergsma, D. ed.) 2nd Ed. p. 1036, Alan R. Liss, New York, 1979
- Asaoka K., Ito H. and Takahashi K. *J. Biochem.* 82, 973-981, 1977
- Asaoka K. and Takahashi, K. *J. Biochem.* 94, 1191-1199, 1983a
- Asaoka K. and Takahashi H. *J. Biochem.* 94, 1685-1688, 1983b
- Asaoka K. *J. Biochem.* 95, 685-696, 1984
- Asaoka K., Sato H. and Kashiwamata S. *Biomed. Res.* 7, 103-106, 1986
- Das M., Dixit R., Seth P.K. and Mukhtar H. *J. Neurochem.* 36, 1439-1442, 1981
- Litwack G., Ketterer B. and Arias I. M. *Nature* 234, 466-467, 1971
- Lowry O., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. *J. Biol. Chem.* 193, 263-275, 1951
- Habig W. H., Pabst M. J., Fleischner, G., Gatmaitan Z., Arias I. M. and Jacoby W. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3879-3882, 1974
- Hayes J. D., Strange R.C. and Percy-Robb I. W. *Biochem. J.* 181, 699-708, 1979
- Kamisaka K., Gatmaitan, Z., Moore C. L. and Arias I. M. *Pediat. Res.* 9, 903-905, 1975
- 柏俣重夫, 仙波禮治: 先天異常 19, 265-268, 1979
- 柏俣重夫, 仙波りつ子, 佐藤浩: 蛋白質 核酸 酵素 29, 1679-1694, 1984
- Sato H., Katoh-Semba R. and Kashiwamata S. *Biol. Neonate* 32, 158-165, 1977
- 高橋健二, 浅岡一雄: 代謝 17, 2139-2149, 1980
- Theodores., Singh S. V., Hong T.D. and Awasthi Y.C. *Biochem. J.* 225, 375-382, 1985

表 1.

Effects of photo-irradiation of Gunn rat newborns on the plasma bilirubin concentration and the cerebellar glutathione S-transferase activity

| Genotype | Number of animals | Bilirubin (μM) | Enzyme activity (nmol/min/mg prot.) | Cerebellar wet weight (mg) |
|--------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| j/Δ^* | 7 | 9.1 ± 6.0 | 12.5 ± 2.1 | 138 ± 27 |
| j/Δ + light | 5 | 5.5 ± 6.0 | 11.7 ± 0.8 | 147 ± 20 |
| j/Δ^{**} | 9 | 303 ± 68 | $24.4 \pm 9.0\#$ | $52 \pm 9\#\#$ |
| j/Δ + light | 9 | 289 ± 31 | $17.2 \pm 4.9\#$ | $108 \pm 29\#\#$ |

Rat newborns were photo-irradiated for 8 h per day from 4 through 7 postnatal days at an energy level of 2×10^4 erg/cm² /sec and killed at 15 days of life. Each value represents the average \pm S.D. *Heterozygote. **Homozygote. #, $p < 0.10$. ##, $p < 0.01$.

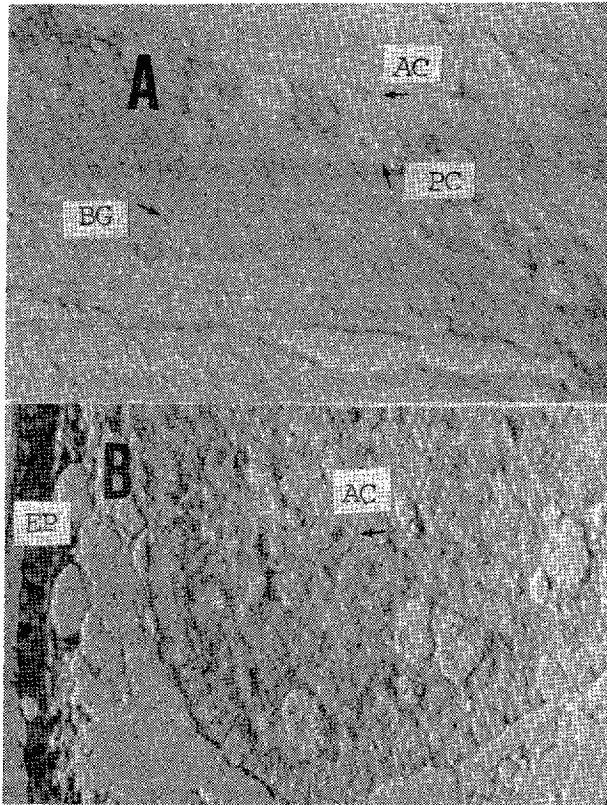
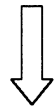


图 1. Immunocytochemical demonstration of glutathione S-transferase (GST) in the cerebellum of 15-day-old Gunn rats. Sections of 3 μm thickness were immunostained with purified antibodies to GST by the PAP method. A, j/Δ rat (x 450). B, j/Δ rat (x 450). AC, astrocyte; PC, Purkinje cell; EP, ependymal cell; BG, Bergmann fiber.



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

われわれはGunnラットの発育障害小脳で glutathione S-transferase(GST)活性が正常の2倍に増加していることを見いだしているが、脳での GST の役割はほとんど解明されていない。ビリルビン(BR)性小脳障害におけるこの酵素の役割を明らかにする目的で本研究をおこなった。光線療法により小脳発育障害の程度を軽くした黄疸ラットを作製し検討した結果、GST 活性増加はBRによる酵素誘導ではなくて、小脳低形成による2次的結果であることがわかった。また抗 GST 抗体を用いて GST の小脳での細胞局在を調べたところ、GST は astroglial cell と ependymal cell に局在した。神経細胞と oli-godendroglial cell はほとんど染色されなかった。黄疸ラット小脳で GST 活性が上昇するのは反応性 astroglia cell が発育障害の小脳で増加するためとわかった。