

光療法の基礎的研究

香川医科大学小児科学講座

磯部 健一 真鍋 正博
川出 登大 西 鐘 寿

名古屋市立大学小児科学教室

荻野 高敏 横山 孝

新生児黄疸の光療法におけるビリルビン代謝は、初期には singlet oxygen を介する photo-oxidation が主体と考えられていた。1971年 Ostrow により光療法中の Gunn rats 胆汁中への間接ビリルビンの排泄増加が見出された。これと同じ現象が1974年 Lund & Jacobsen によりヒト新生児においても記載された。この現象は従来のビリルビンの有機化学の常識では説明出来ずこの事実が大いに注目されることとなった。1976年 Bonnett らにより bilirubin IX α (以下 BR と略す) の立体構造が X線回折により解明され、光療法の作用機序として光エネルギーによるビリルビンの立体異性化が注目される様になった。一般に分子内に Z-configuration を有する物質は photochemical に Z \rightarrow E への立体異性化がおこることが知られている。ビリルビンは分子内の3つの bridge のうち Δ^4 と Δ^5 の二重結合が Z-configuration をとっているためこの2カ所で立体異性化がおこり、実際には EZ, ZE, EE の3種類の立体異性体が存在し得る。これらの E-configuration をとるともはや水素結合が形成されなくなるため親水性が増すことになる。McDonagh らはこれら3種類を photobilirubin と命名した。1979年我々はこれを立証するため天然に存在するビリルビンをもそのまま分析する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を開発し、in vitro 及び in vivo の成績よりこれら3種類 [EZ/ZE (peak3), EE (peak0)] の立体異性体以外にこれらと化学的性質を異にする2種類 [peak1, peak2 (unknown pigment)] の photoproducts の存在を証明した。さらに peak 1, peak2, peak3 は逆相系あるいは順相系 HPLC

により各々2種類 (peak1A, 1B, peak2A, 2B, peak3A, 3B) から成ることを見出した。特に光療法中のヒト新生児においては胆汁中へ unknown pigment (peak2) が (ZZ)-BR より著しく排泄される事及び bronze baby syndrome の児の血清中では unknown pigment の総ビリルビン濃度にためる割合が有意に高い事実やこの児の血清の吸収スペクトルが unknown pigment の重合により生じた brown pigment の吸収スペクトルと類似のパターンを示すことより光療法中のビリルビン代謝における unknown pigment の重要性が示唆される。

しかしこの物質の化学構造に関する報告は非常に少ない。従って我々は核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) を用いて unknown pigment (peak2) の化学構造を解析した。さらにこの NMR の結果及び光・熱エネルギーによる各 photoproducts の相互変換に関する検討より我々が理論的に想定した総ての photoproducts の構造が確立されたので、光エネルギーの変化が Gunn rats のビリルビン代謝における立体異性体および構造異性体の各々の占める割合および胆汁、尿中への排泄に及ぼす影響について検討した。

1. peak2A, 2B (unknown pigment) の構造について

(方法) 薄層遠心クロマトグラフィーと順相系 HPLC を組合せることにより、peak2A, 2B の各々の分離精製を行ない、 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ を用いて化学構造について検討した。

(成績及び考案) $^1\text{H-NMR}$ により (ZZ)-BR では化学シフト 6.5, 5.4 ppm 前後に C-18 位の exovinyl 基, 6.6, 5.6 ppm の前後に C-

3位の endovinyl 基のシグナル化が認められたが、peak 2Aではendovinyl基のシグナルが消失し、exovinyl基が存続した。さらに(ZZ)-BRでは認められなかった-CH-CH₃ groupに由来するmethineシグナル(3.24, 3.17 ppm)とmethylシグナル(1.37, 1.34 ppm)や=CH-CH₂-groupによるoletinシグナルが6.12 ppmに、methyleneシグナルが2.90と2.73 ppmにABX型のシグナルとして出現した。また新しいシグナルとしては1.41と1.93 ppmの3級methylも見られた。peak 2Bについてもpeak 2Aと同じ成績が得られた。詳細な結果については既に報告したので省略する。この物質の化学構造としてStollらによって提唱された(EZ)-cyclobilirubinあるいは(EZ)-spirobilirubin lactoneが考えられたが、我々の¹H-NMR, ¹³C-NMRにより最終的に立体構造はEZをとり、C-3位のvinyl基がB環のC-7位との間に環を有する(EZ)-cyclobilirubin(EZ-C)と結論された。なおC-2位およびC-7位のmethyl基の¹H-NMRシグナルがベアーで観測されたことより、C-2位あるいはC-7位のmethyl基がα位およびβ位をとる4種類の異性体である可能性が示された。従って(ZZ)-BR由来のphotoproductsはZE, EZ, EEの3種類の立体異性体の他に構造異性体である4種類のEZ-CとこれらのΔ¹⁵ZがそれぞれΔ¹⁵Eへ変化した4種類のEE-Cの計11種類総てのphotoproductsの立体構造が解明された。

2. 光療法中のGunn ratの胆汁, 尿, 血清中におけるphotoproductsの変動について

(方法) 体重230~288gの成熟Gunn rat 6匹を用い、総胆管および大腿静脈にカテーテルを挿入した。大腿静脈より輸液用電解液(ブドウ糖2.6g/dl, NaCl 90mEq/l, 乳酸ナトリウム20mEq/l)を2.5ml/hrで輸液した。暗室内に静置した後、弱い光(1.4 μW/cm²/nm)で5時間照射し、次いで4時間の暗室内静置の後、強い光(2.25 μW/cm²/nm)にて5時間光照射を行ない、経時的に胆汁, 尿, 血清中のphotoproductsをHPLCにて測定した。

成績及び考案

(i) 胆汁中のphotoproductsについて

一連の実験における各photoproductsの胆汁中への、時間あたりの排泄量を対数目盛で示した(Fig. 1.)。(EZ/ZE)-BR(photo-BR)はGunn rat胆汁中で半減期6.2分で(ZZ)-BRへ復帰することが証明されているので、EZ/ZE-BR値はクロマトグラフ上の(EZ/ZE)-BRは弱い光照射前より1158 ± 307 ng/h (n=6)と少量認められ、開始後3時間で10070 ± 1563 ng/h (n=6)と約10倍増加し、以後5時間までほぼ一定であった。EZ-Cは照射前では180 ± 87 ng/hと極く微量であるが、開始後3時間で872 ± 28 ng/hと約5倍増加し、(EZ/ZE)-BRと同様の傾向を示した。(EE)-cyclobilirubin(EE-C)は光開始前では感度以下あるいは痕跡程度であるが、照射後3時間で各々51 ± 17 ng/h (n=6), 141 ± 54 ng/h (n=6)となり以後ほぼ一定の値を示した。弱い光照射中止後は(EZ/ZE)-BRは経時的に減少し4時間後には4882 ± 1098 ng/h (n=3)とその減少は緩やかであった。中止後4時間でEZ-C, EE-BR, EE-Cは各々230 ± 77 ng/h (n=3), 51 ± 39 ng/h (n=3), 感度以下とほぼ光開始前値にまで減少した。強い光照射開始と共に各photoproductsの排泄量は、弱い光に比し(EZ/ZE)-BRは約2倍、EZ-Cは約4倍増加した。EE-Cは約8倍増加しEE-BRの排泄量に近づいた。以上胆汁中へはin vitroで認められた総てのphotoproductsが排泄されることが明らかとなったが、量的には(EZ/ZE)-BRが優位であった。しかし光エネルギーを増した場合の増加率はEZ-CおよびEE-Cが各々(EZ/ZE)-BR, (EE)-BRを上まわった。

(ii) 尿中のphotoproductsについて(Fig. 2.)

弱い光照射時には(EZ/ZE)-BR, EE-Cは開始後4時間で各々58 ± 24 ng/h (n=6), 22 ± 5 ng/h (n=6)と僅かに増加したが、(EE)-BR, EE-Cは殆んど認められなかった。強い光照射時には(EZ/ZE)-BRとEE-Cは照射後3時間で各々430 ± 132 ng/h (n=5), 222 ± 55 ng/h (n=5)と弱い光照射時に比し約10倍増加した。しかし、(EE)-BRとEE-Cも同様に増加したが量的には僅かであった。尿中へも胆汁

中と同様に総ての photoproducts が排泄されるが量的には胆汁中に比しはるかに少量であることが明らかとなった。また (EZ/ZE)-BR が優位であることも胆汁中と同様であるが、より親水性の EE-C, (EE)-BR, EZ-C が容易に腎から排泄されるため (EZ/ZE)-BR の総胆汁色素に占める割合は胆汁に比して少量であった。

(iii) 血清中の photoproducts について

(ZZ)-BR 濃度は弱い光照射前は 4165 ± 676 (mean \pm SE) $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (n=5), 照射 5 時間後は 3861 ± 563 (mean \pm SE) $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (n=5), 強い光照射前は 3811 ± 581 (mean \pm SE) $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (n=5), 照射 5 時間は 2307 ± 331 (mean \pm SE) $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (n=5) であり, 強い光照射の場合の減少が著明であった。(EZ/ZE)-BR の血清総ビリルビン濃度に対する割合は照射エネルギーの強弱に拘らず僅か 1% 前後しか出現しなかった。さらに EZ-C は強い光照射でも検出感度以下であったが, 外胆汁瘻を結紮して強い光照射を行なうと照射後 5 時間で (EZ/ZE)-BR と EZ-C の血清総ビリルビン濃度に占める割合は, 各々 5.6 ± 0.6 (mean \pm SE) % (n=6), 0.5 ± 0.1 (mean \pm SE) % (n=6) まで増加した。我々が既に報告した光療法中のヒト新生児の血清中で (EZ/ZE)-BR は 1.08 ± 2.7 (mean \pm SD) %, EZ-C は 0.72 ± 0.34 (mean \pm SD) % 出現する事実と今回の Gunn rat の成績から, Gunn rat においてはヒト新生児とは異なり (EZ/ZE)-BR の血中からのクリアランスが良いと結論された。

McDonagh らは Gunn rat の成績より光療法の作用機序は $\Delta^{15}\text{Z}$ における $\text{Z} \rightarrow \text{E}$ への立体異性化が主体であり, 構造異性体は minor pathway としているが, 我々が以前報告した如く, ヒト新生児では光療法により胆汁中へ EZ-C は (EZ/ZE)-BR の約 2.5 倍多く排泄される事実と今回の Gunn rat における胆汁, 尿中, 血清中の各 photoproducts の動態についての成績より, ヒト新生児と Gunn rat における光療法中のビリルビン代謝が異なることが明らかとなった。従ってヒト新生児の光療法中のビリルビン代謝の主要経路は, 胆汁からの (EZ/ZE)-BR, EZ-C の排泄であると云う我々の説が立証された。

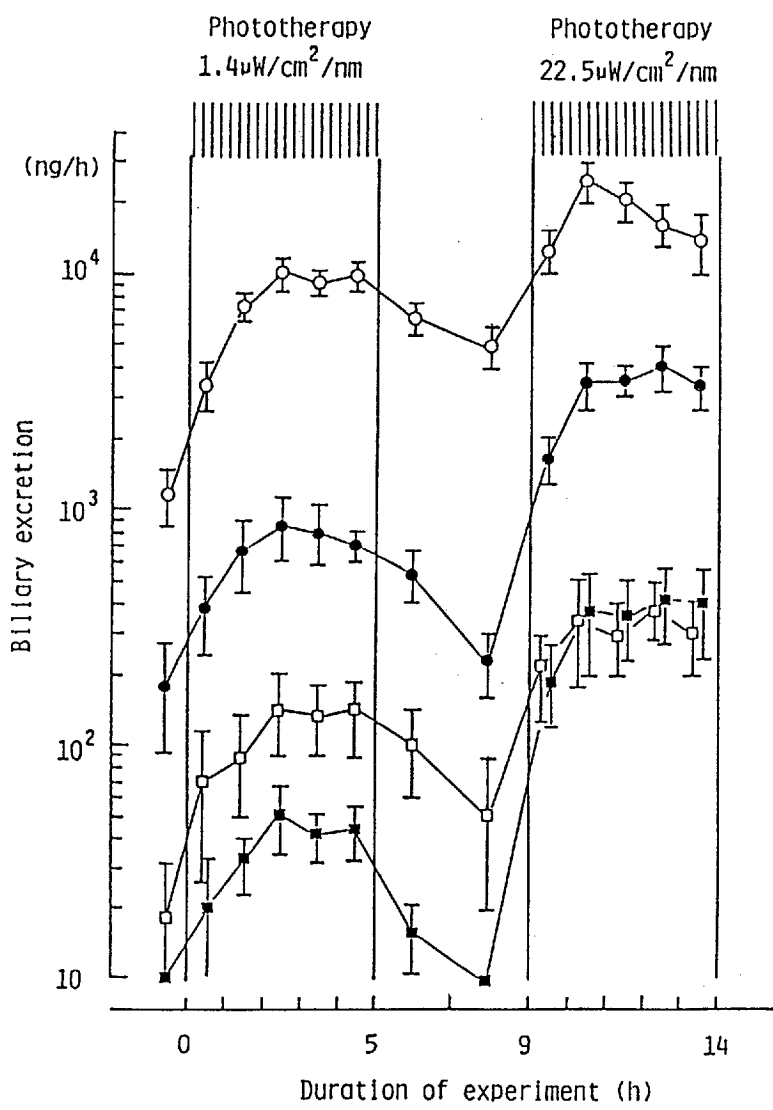


Fig.1. Mean \pm SE biliary excretion patterns of four bilirubin photoproducts by the five Gunn rats exposed to successive periods of low and high illumination

○, (EZ)- and (ZE)-bilirubin IX_α; ●, (EZ)-cyclobilirubin IX_α;
 □, (EE)-bilirubin IX_α; ■, (EE)-cyclobilirubin IX_α

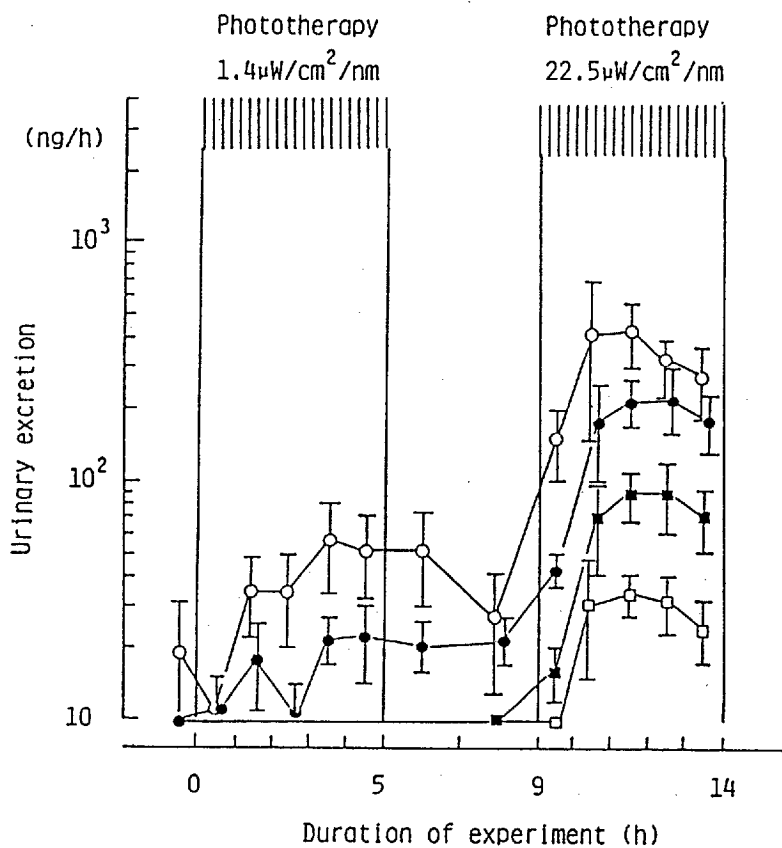
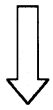
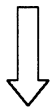


Fig.2. Mean \pm SE urinary excretion patterns of four bilirubin photoproducts by the five Gunn rats exposed to successive periods of low and high illumination. Explanation of the symbols is given in the legend to Fig.1.



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



新生児黄疸の光療法におけるビリルビン代謝は、初期には singlet oxygen を介する photo-oxidation が主体と考えられていた。1971 年 Ostrow により光療法中の Gunn rats 胆汁中への間接ビリルビンの排泄増加が見出された。これと同じ現象が 1974 年 Lund&Jacobsen によりヒト新生児においても記載された。この現象は従来のビリルビンの有機化学の常識では説明出来ずこの事実が大いに注目されることとなった。1976 年 Bonnett らにより bilirubin (以下 BR と略す)の立体構造が X 線回折により解明され、光療法の作用機序として光エネルギーによるビリルビンの立体異性化が注目される様になった。般に分子内に Z-configuration を有する物質は photochemical に Z → E への立体異性化がおこることが知られている。ビリルビンは分子内の 3 つの bridge のうち 4 と 15 の二重結合が Z-configuration をとっているためこの 2カ所で立体異性化がおこり、実際には EZ, ZE, EE の 3 種類の立体異性体が存在し得る。これらの E-configuration をとるともはや水素結合が形成されなくなるため親水性が増すことになる。