

# ビリルビンの光異性体における血清 アルブミンの意義に関する研究

香川医科大学 磯部 健一  
母子センター新生児部  
香川医科大学小児科 伊藤 進

## 研究目的

新生児高ビリルビン血症の光療法における(ZZ)-bilirubin IX $\alpha$  ( $\Delta^4Z$ ,  $\Delta^{15}Z$ をZZと略す)の光化学反応の全貌は図1(a)に示す如くである(以下IX $\alpha$ は本文中では略す)。立体異性体には $\Delta^4E$ の(EZ)-bilirubin,  $\Delta^{15}E$ の(ZE)-bilirubin,  $\Delta^4E$ ,  $\Delta^{15}E$ の(EE)-bilirubinの三種類(以下これら三者を立体異性体と総称する)があるが、ヒト新生児では主として(ZE)-bilirubinの形で胆汁中や尿中へ排泄される。また、立体異性体の一つである(EZ)-bilirubinを經由してcyclizationにより生成される構造異性体、即ち(EZ)-cyclobilirubinと、その立体異性体( $\Delta^{15}E$ )である(EE)-cyclobilirubinがあるが(以下この両者を構造異性体と総称する)、この両者も胆汁中や尿中に排泄される。しかしヒト新生児における光療法の効果の点では(EZ)-cyclobilirubinと(EE)-cyclobilirubinが量的に最も重要な代謝産物である。ところでその(ZZ)-bilirubinの光化学反応においてMcDonaghらは血清アルブミンが重要な働きをしていることを、*in vitro*でヒト、ラット、ウマ等の種々の血清アルブミンを用いて(ZZ)-bilirubinとの複合体のphotolysisを行なう事により証明した。また我々も、ヒト新生児とGunn ratの*in vivo*の系において胆汁中及び尿中へ排泄されたphotoisomerに著しい量的差異が存在することを報告して来た。すなわち、ヒト新生児においては、構造異性体であるcyclobilirubinの排泄が立体異性体のそれよりも多いがGunn ratにおいては、その逆であった。これらの現象の原因を解明する為に、今年度は、ビリルビン・血清アルブミン溶液のphotolysisの*in vitro*の実験を中心に検討を行なった。

(1) ヒトないしラットの血清アルブミンの各々の

ビリルビン複合体溶液に光照射して得られたbi-lirubinのphotoisomerのパターンを検討すると共に*in vitro*の成績と対比し血清アルブミンの意義を明らかにする。

(2) 上記bilirubinのphotoisomer生成のkineticsを解明するため秒単位で実験を行ない主要なステップにおける速度定数を測定した。これにより、(EZ)-cyclobilirubinの生成経路が(EZ)-bilirubinを介するとする我々の説と、McDonaghの(ZZ)-bilirubinより直接single photonで生成されるとする説といずれが正しいかを明らかにする。

(3) 光源の問題として、400~520nmの光エネルギー量を一定にし、480nm以上の長波長の光エネルギー量を増加した場合のbilirubinのphotoisomerのkineticsを検討する。

## 方法及び効果

0.1M sodium phosphate buffer (PH7.4)にヒト血清アルブミンないしラット血清アルブミンを溶解し、0.05N NaOHに溶解したビリルビンを加え各々のビリルビン・血清アルブミン溶液を作成した。(ビリルビン5mg/100ml, 血清アルブミン2g/100ml)

(1) 各々の溶液0.5mlにblue-white light (27.3  $\mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$ )を光照射して0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30分後のbilirubinのphotoisomerを高速液体クロマトグラフィーで分析した。その経時的変化を図2に示した。ヒト血清アルブミンの方が、ラット血清アルブミンに比して(EZ)-cyclobilirubin及び(EE)-cyclobilirubinの生成が遙かに多く、しかもヒト血清アルブミンにおいては(ZE)-bilirubinの生成のみで(EZ)-bilirubinの生成は痕跡程度であった。ラット血清アルブミ

ンにおいては、(ZE)-bilirubin と (EZ)-bilirubin の両者がともに生成され前者が後者の約2倍であった。以上の *in vitro* の結果は我々がヒト新生児及び Gunn rat の光照射で報告して来た *in vivo* の結果と一致し、生体内では血漿中のアルブミンが光療法における (ZZ)-bilirubin の光化学反応に極めて重要な働きをしていることが立証された。

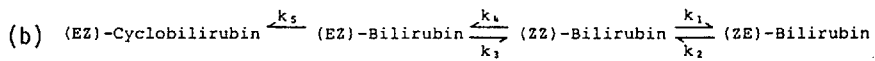
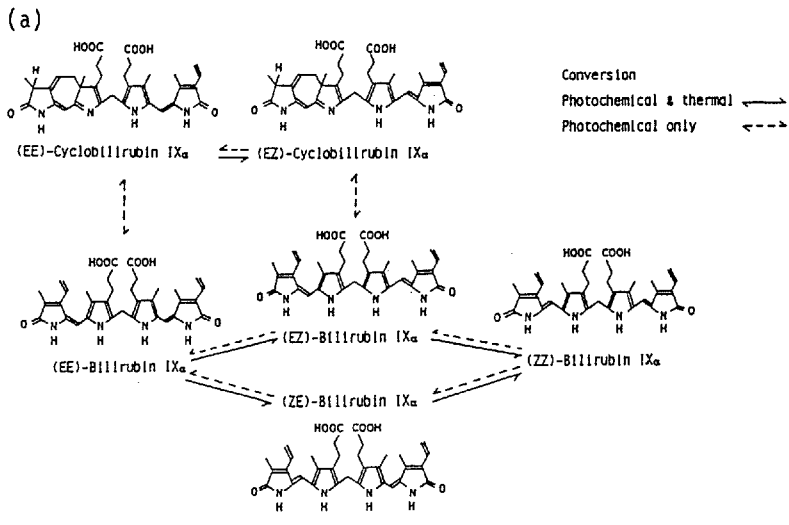
(2) (EZ)-cyclobilirubin の生成機構の検討、(a) (ZZ)-bilirubin のヒト血清アルブミン溶液の photolysis と (b) (EZ)-bilirubin と (ZE)-bilirubin の両者を多量に含んだヒト血清アルブミン溶液の photolysis を秒単位で行なうことにより検討を行なった。図3に示す様に (EZ)-bilirubin から (EZ)-cyclobilirubin の生成速度は、(ZZ)-bilirubin から (EZ)-bilirubin の生成速度より遙かに速いことが明らかになり、我々が報告した経路が正しいことが立証された。また主要な経路 [ 図1(b) ] における速度定数を各々のステップで近似的な微分方程式を立てそれを解くことによりビリルビンとヒトないしラットの血清アルブミン溶液の秒単位の photolysis における各パラメーターを算出し、各々の速度定数を求めた結果を図(b)に示した。ヒト血清アルブミンにおいて (EZ)-bilirubin の生成が悪い理由は、(ZZ)-bilirubin より (EZ)-bilirubin の生成される立体異性化の速度定数 ( $K_4$ ) が、(EZ)-bilirubin より (EZ)-cyclobilirubin への cyclization の速度定数 ( $k_5$ ) や (EZ)-bilirubin より (ZZ)-bilirubin へ復帰する立体異性化の速度定数 ( $k_3$ ) に比して非常に小さいための見かけ上の現象であり、またラット血清アルブミンにおいての、(EZ)-cyclobilirubin

の生成が悪い理由も、ヒト血清アルブミンとラット血清アルブミンの場合を比較することにより説明される。

(3) 上記のビリルビン・ヒト血清アルブミン溶液に20W蛍光灯4本からなる光療法治療器に(a) blue-white light 4本、(b) green light と blue-white light を交互に2本ずつ計4本、(c) green light 4本を取り付け、Minolta Fluoro-Lite Meter 451 (400~520nm の光エネルギー測定) を用い光エネルギーが  $7.1 \sim 7.3 \mu W \cdot cm^{-2} \cdot nm^{-1}$  となる様高さを調節して照射した。換言すれば、(a)から(b)、(c)と green の光が多くなるにつれて480nm以上の光エネルギー量が非常に多い条件下で photolysis を行なった。図4に示す如く480nm以上の光エネルギー量が増加するにつれて (EZ)-cyclobilirubin の生成が増加し、(ZE)-bilirubin の比率が低下した。よって、(EZ)-cyclobilirubin の生成の最大作用波長は、480nm以上の長波長側にあり、(ZE)-bilirubin の最大作用波長は480nmより短波長側にあると考えられる。

#### 今後の方針

400~450nmの光はDNAの断裂等の障害、末梢リンパ球の sister chromatid exchange の増加等の有害作用を有する故、より良い光療法の光源を検討する必要があり、今後単一波長の光源を用いて (ZE)-bilirubin の生成の作用波長と (EZ)-cyclobilirubin の生成の作用波長を検討し、最も効果的でしかも毒性の少ない光源の確立を究極の目的とした。



Rate Constants	Human Serum Albumin	Rat Serum Albumin
$k_1$	$3.34 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$4.15 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
$k_2$	$1.06 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	$1.20 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
$k_3$	$3.02 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$9.34 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
$k_4$	$7.48 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$2.15 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
$k_5$	$2.76 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$9.78 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
	$k \equiv k_4$ ( $\because k \ll k_5$ )	

図1(a) 新生児高ビリルビン血症の光療法における (ZZ)-bilirubin の光化学反応の経路

(b) (ZZ)-bilirubin のヒト血清アルブミン及びラット血清アルブミンとの複合体の光化学反応の各ステップでの速度定数

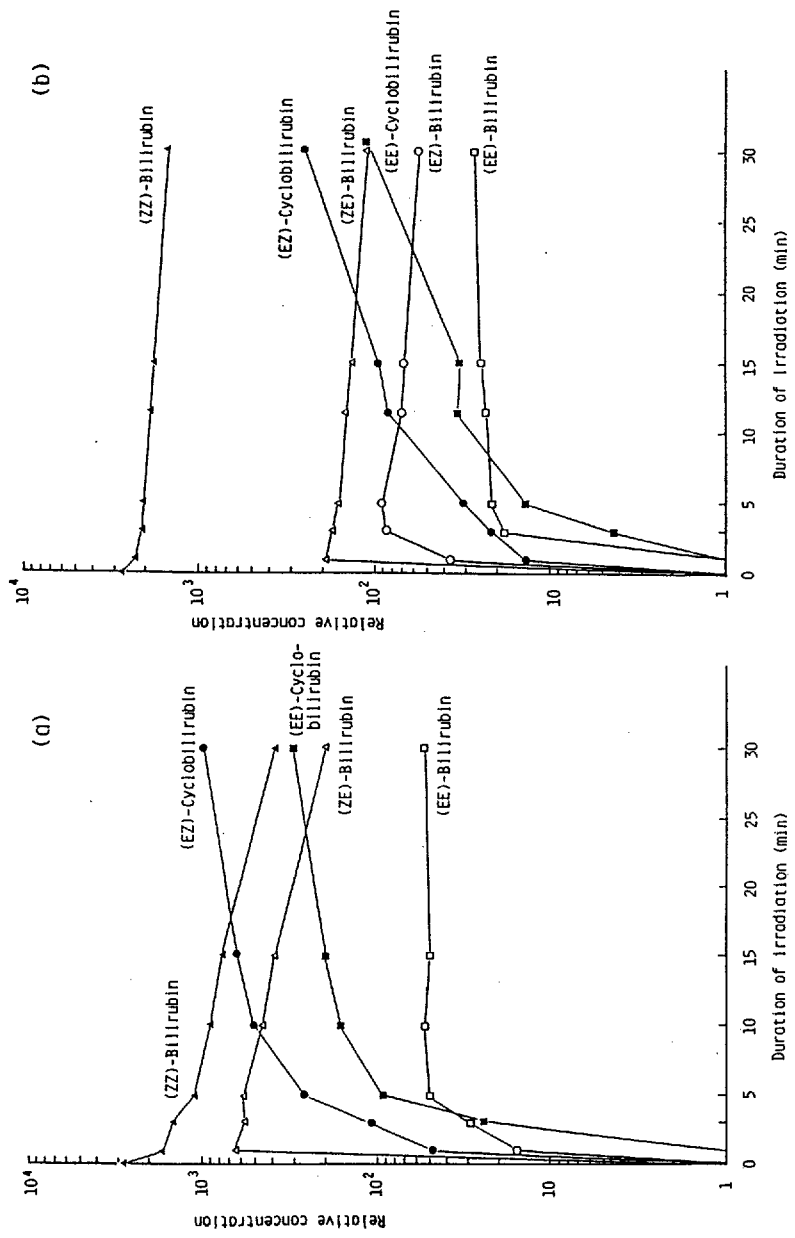


図2 血清アルブミンと(ZZ)-bilirubinとの複合体の photolysis により生成された photoisomer のパターン (a)ラット, (b)ヒト

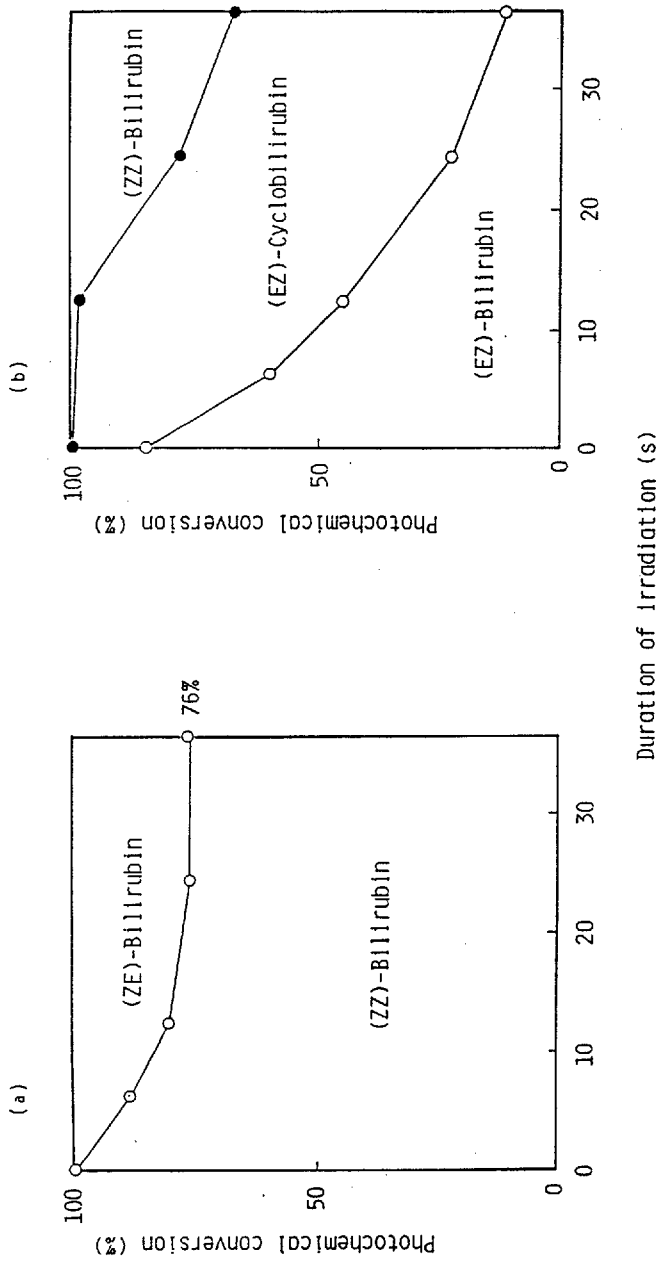


図3(a) (ZZ)-bilirubin とヒト血清アルブミンとの複合体の秒単位の photolysis  
 (b) (EZ)-bilirubin とヒト血清アルブミンとの複合体の秒単位の photolysis

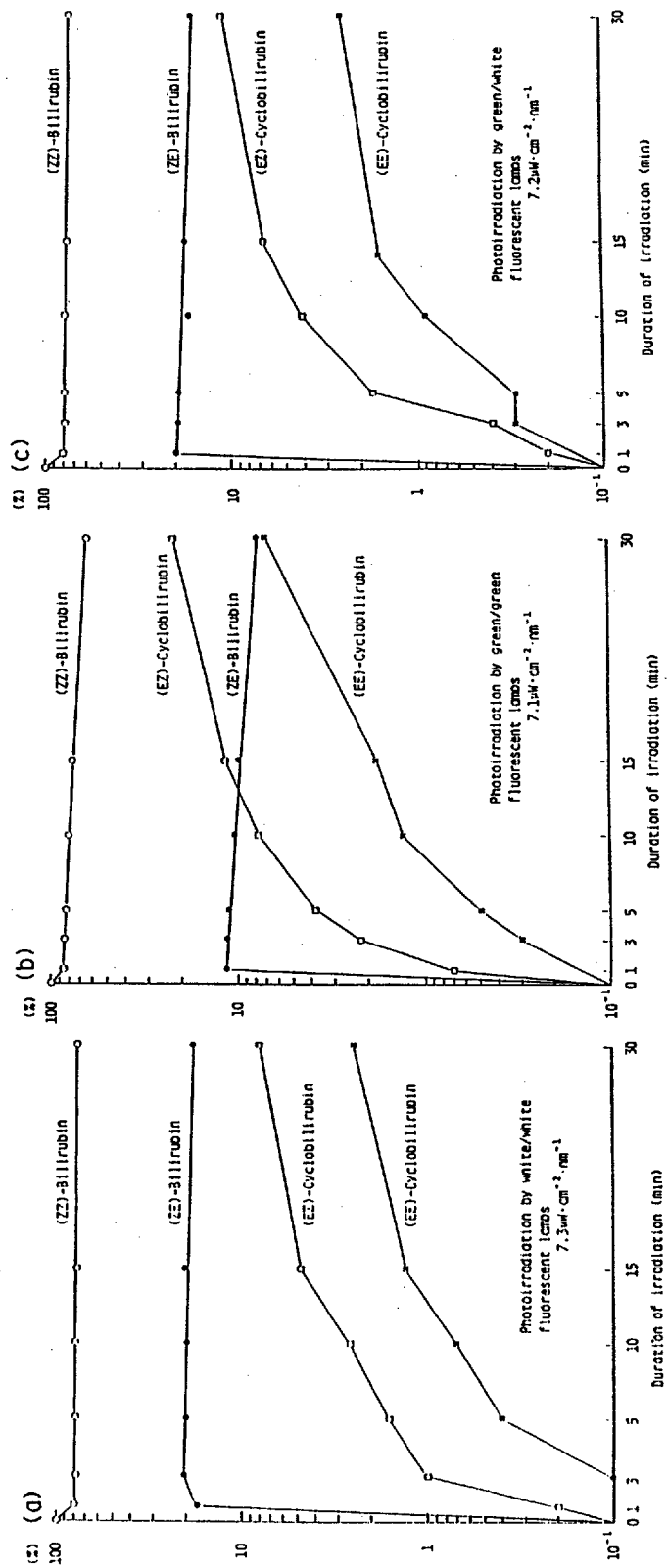
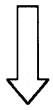


図4 (ZZ)-bilirubin とヒト血清アルブミンとの複合体の photolysis

(a) blue-white light ( 4 本 )

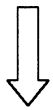
(b) blue-white light ( 2 本 ) と green light ( 2 本 )

(c) green light ( 4 本 )



## 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



### 研究目的

新生児高ビリルビン血症の光療法における(ZZ)bilirubin IX ( 4Z, 15Z を ZZ と略す)の光化学反応の全貌は図 1(a)に示す如くである(以下 IX は本文中では略す)。立体異性体には 4E の(EZ)-bilirubin, 15E の(ZE)-bilirubin, 4E, 15E の(EE)bilirubin の三種類(以下これら三者を立体異性体と総称する)があるが、ヒト新生児では主として(ZE)-bilirubin の形で胆汁中や尿中へ排泄される。また、立体異性体の一つである(EZ)-bilirubin を経由して cyclization により生成される構造異性体、即ち(EZ)-cyclobilirubin と、その立体異性体( 15E)である(EE)-cyclobilirubin があるが(以下この両者を構造異性体と総称する)、この両者も胆汁中や尿中に排泄される。しかしヒト新生児における光療法の効果の点では(EZ)-cyclobilirubin と(EE)-cyclobilirubin が量的に最も重要な代謝産物である。ところでその(ZZ)-bilirubin の光化学反応において McDonagh らは血清アルブミンが重要な働きをしていることを、*in vitro* でヒト、ラット、ウマ等の種々の血清アルブミンを用いて(ZZ)-bilirubin との複合体の photolysis を行なう事により証明した。また我々も、ヒト新生児と Gunn rat の *in vivo* の系において胆汁中及び尿中へ排泄された photoisomer に著しい量的差異が存在することを報告して来た。すなわち、ヒト新生児においては、構造異性体である cyclobilirubin の排泄が立体異性体のそれよりも多いが Gunn rat においては、その逆であった。これらの現象の原因を解明する為に、今年度は、ビリルビン・血清アルブミン溶液の photolysis の *in vitro* の実験を中心に検討を行なった。

(1)ヒトないしラットの血清アルブミンの各々のビリルビン複合体溶液に光照射して得られた bilirubin の photoisomer のパターンを検討すると共に *in vitro* の成績と対比し血清アルブミンの意義を明らかにする。

(2)上記 bilirubin の photoisomer 生成の kinetics を解明するため秒単位で実験を行ない主要なステップにおける速度定数を測定した。これにより、(EZ)-cyclobilirubin の生成経路が(EZ)-bilirubin を介するとする我々の説と、McDonagh の(ZZ)-bilirubin より直接 single photon で生成されるとする説といずれが正しいかを明らかにする。

(3)光源の問題として,400 ~ 520 nmの光エネルギー量を一定にし,480 nm以上の長波長の光エネルギー量を増加した場合の bilirubin の photoisomer の kinetics を検討する。