

## 光増感物質共存下における ビリルビンの光化学反応

(分担研究： 核黄疸の予防に関する研究)

大西 鐘 壽,\* 伊 藤 進,\* 磯 部 健 一\*\*  
越 智 三起子,\* 安 藤 美智子,\* 近 藤 昌 敏\*  
西 田 智 子\*

### 要 約

blue-white lightは、FMNの如き500nm以下に作用波長を有する光増感物質が共存しない場合にはビリルビンの光酸化を惹起せしめる活性酸素の産生を来さないが、FMNが添加されると活性酸素の産生を著しく高める。その処理はビリルビン自体が酸化物質に変化することにより行われる。Theophyllineが添加されると特にbiliverdinの生成が促進される。しかし、類似の化学構造を有するurateは自らが酸化されてその活性酸素の処理に役立っている。一方green lightはその様な作用が弱い故より安全な光源と考えられる。

見出し語： ビリルビン，光化学反応，光増感物質，活性酸素

### 研 究 方 法

ビリルビン(BR)の光化学反応は(1)光異性化反応として酸素が関与しないBR分子がtetrapyrroleのままで(ZE)-BR等を生成する立体異性化反応、並びに(EZ)-cyclo BRを生成する立体兼構造異性化反応<sup>1)</sup>(2)光酸化反応としてperoxyradicalや活性酸素が関与しbiliverdin(BV)やpropentdyopent等のBRの酸化物質が生成される反応<sup>2)3)</sup>の二つに大別される。後者のBRの光酸化反応は、見方を変えれば生体にとって有害な活性酸素やフリーラジカル物質から個体を保護していると考えられ、我々の実験系においてBRの光酸化物質が多く生成される条件の方が生体には不利であると云える<sup>2)</sup>。この理論に基づいてin vit-

roの検討を行った。

①BRの光化学反応のflavin mononucleotide(FMN)共存下でのblue-white lightとgreen lightの差異

光エネルギーによる作用は直接作用と間接作用があるが、光増感物質による作用は間接作用であり、それにより他の物質を変化させ、その過程で強い細胞毒性を有するフリーラジカルや活性酸素(特に<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)が産生される故、光療法の副作用の発現機構として重要である。可視光線を吸収する内因性物質としてはメラニン、ヘム、BR、リボフラビン(B<sub>2</sub>)、ポルフィリンなどがあるが、この内、強い光増感作用を有する物質は、B<sub>2</sub>とポ

\* 香川医科大学小児科, \*同 母子センター

ルフィリンである。B<sub>2</sub>の作用に関しては、Gunn rat において光増感作用により皮膚に水疱形成や壊死が惹起されることが知られている。そのため、FMNを光増感物質として使用し、blue-white lightとgreen light照射時のBRの光化学反応の差異を検討した。

BR・ヒト血清アルブミン(HSA)の複合体溶液(BR 10mg/dl, HSA 2g/dl, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4)にFMNを0.5 mg/dlになるように添加した溶液と無添加溶液の各々1 mlにblue-white lightないしgreen lightを各々20W 4本(80W)で照射した。照射後0, 5, 10, 15, 20分でのBRの光異性体を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。

② FMN共存下におけるBRの光化学反応に及ぼすtheophylline (TH)とurateの影響

新生児医療において種々の薬物が使用されているが、BRとの関係においてはHSAからBRを遊離させる薬物が核黄疸の増強因子として従来専ら問題となってきた。しかるにそれらの薬剤は、HSAに結合した状態においてBRの立体構造をも変化させ照射時のBRの光化学反応を変化せしめることを見出し既に報告した。従ってもう少し複雑な系として、光増感物質の存在下での薬物のBRの光化学反応に及ぼす影響を検討した。THやcaffeineについては、Meiselらが1980年にFMN共存下でBRの照射においてそれらの薬物が共存するとBRの分解が促されることを報告している。そのため、そのBRの減少がその光化学反応のいずれの機構に起因するかを検討すると共に、類似の分子構造を有しラジカル消去作用があり、しかも抗酸化作用のあるurateについても検討した。

BR・HSA複合体溶液(10mg/dl, 2g/dl, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4) 20mlにFMNを5 μg/mlになるように添加し、その各々5 mlに i) 0.05 N NaOH を0.1 mlを加えた対照群, ii) TH 10mgを0.05 N NaOH 10mlに溶解し0.1

ml (20 μg/ml)を加えたTH群, iii) urate 5 mgを0.05 N NaOH 1 mlに溶解し0.1 ml (10mg/dl)加えたurate群, の3種類の溶液を作成した。これらの溶液各1 mlにblue-white light 20W 4本(80W)で照射した。照射後0, 5, 10, 15, 20分後のBRの光異性体濃度及びBV濃度をHPLCで測定した。同時に、TH, urate及びその酸化物質であるallantoinの濃度も測定した。

### 結果及び考察

①無添加溶液におけるblue-white light及びgreen light 20分間照射時の(ZZ)-BRの減少量は、前者は5.3 mg/dl, 後者は3.3 mg/dlであった。しかし、FMNが共存するとその減少量は、blue-white lightの場合は7.4 mg/dlでgreen lightの場合は4.2 mg/dlと、blue-white lightの方が著しく増加していた。照射中の(ZZ)-BRの減少が上述のBRの光化学反応のいずれに起因するかを検討した。(EZ)-cyclo BRと(EE)-cyclo BRの生成の合計をcyclo BRとし、照射前の(ZZ)-BR濃度から照射後の(ZZ)-BR及び(ZE)-BR, (EZ)-BR, cyclo BRの合計の濃度を差し引いた値をphotooxidation productsとして示すと、図上に示す如くである。FMNが共存しないと(ZZ)-BRの減少量は、cyclo BRのblue-white light (□)及びgreen light (□)による生成量に対応していた。丸印のphotooxidation productsの生成は両者の間で差はなかった。一方、FMNが共存すると図下に示す如くblue-white lightにおいてphotooxidation productsの生成(●)が主体となりcyclo BR (■)の生成の占める割合は減少した。しかし、green lightではcyclo BR (□)の生成の方が多くphotooxidation productsの生成(○)はblue-white lightのその約30%と少なかった。

以上の如くin vitroの実験結果ではあるが、blue-white lightは、FMNの様な500 nm以下の波長に作用波長を有する光増感物質が共存しない場合にはBRの光酸化を惹起せしめる活性酸素

の産生を見ないが、 $B_2$ が添加されると活性酸素の産生を著しく高める故、潜在的な危険を秘めている光療法の光源と結論される。一方 green light はその様な作用が弱い故より安全な光源と考えられる。BRは活性酸素の処理に利用されるため血清BR濃度が低濃度時に blue-white light で光療法がなされると活性酸素を処理するBRが涸渇して臓器組織が直接により障害を受けることになると考えられる。

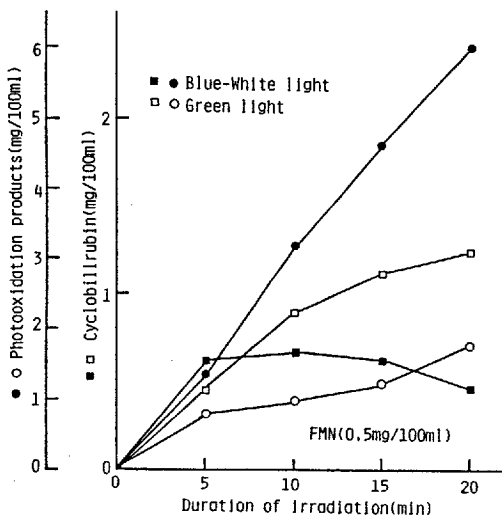
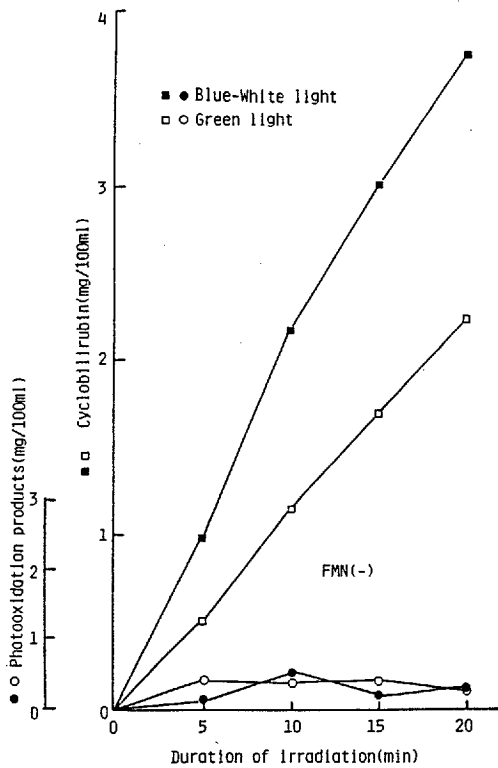
② i) 対照群は、前実験と同様に photooxidation products の著しい増加が認められ20分間で  $5.4 \text{ mg/dl}$  の増加をみた。それと比例して BV が増加した。ii) TH群では、photooxidation products の増加は  $8.7 \text{ mg/dl}$  と対照群と比較して 1.6 倍であった。BV の生成量は対照群の 3.1 倍であった。しかし、TH の濃度は殆ど変化しなかった。iii) urate群では、photooxidation products の増加は  $4.4 \text{ mg/dl}$  であり、対照群の 0.8 倍と逆して減少していた。BV の増加も対照群の 0.67 倍と減少していた。しかも、TH と異なり urate は20分間の照射で  $5 \text{ mg/dl}$  減少し、その酸化物質である allantoin の  $3.7 \text{ mg/dl}$  の増加を見た。

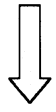
以上の結果より、FMN の光増感作用により生じた  $^1\text{O}_2$  等の活性酸素の処理機構は BR 自体が BV やその他の酸化物質に変化することにより行われる。BR と HSA との複合体溶液の FMN 共存

下における光化学反応では、更に TH が添加されると特に BV の生成反応を主体とする BR の酸化反応が促進される。これは TH 自身は変化せず光増感反応により生成される  $^1\text{O}_2$  等の活性酸素の産生を促す働きを有することによると考えられる。FMN の如き光増感物質の共存下では TH は非常に危険な薬物と考えられる。しかし、類似の化学構造を有する urate は自らが酸化されてその活性酸素の処理に役立っていると結論される。

#### 文 献

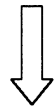
- 1) Onishi, S., Itoh, S. & Isobe, K.: Wavelength-dependence of the relative rate constants for the main geometric and structural photoisomerization of bilirubin IXa bound to human serum albumin. *Biochem J* 236 : 23 - 29, 1986.
- 2) 大西鐘壽, 伊藤 進, 磯部健一, 越智三起子, 近藤昌敏: ビリルビン周生期の活酸素防御機構における新生児黄疸の意義。蛋白質核酸酵素, 33 : 3005 - 3016, 1988.
- 3) Onishi, S., Itoh, S., Isobe, K., Ochi, M., Kunikata, T. & Imai, T. : Effect of the binding of bilirubin to either the first class or the second class of binding sites of the human serum albumin molecule on its photochemical reaction. *Biochem J* 257 : 711 - 714, 1989.





## 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

blue-white light は, FMN の如き 500nm 以下に作用波長を有する光増感物質が共存しない場合にはビリルビンの光酸化を惹起せしめる活性酸素の産生を来たさないが, FMN が添加されると活性酸素の産生を著しく高める。その処理はビリルビン自体が酸化物質に変化することにより行われる。Theophylline が添加されると特に biliverdin の生成が促進される。しかし, 類似の化学構造を有する urate は自らが酸化されてその活性酸素の処理に役立っている。一方 green light はその様な作用が弱い故より安全な光源と考えられる。