

## ビリルビン・アルブミン結合に関する研究 —アンバウドビリルビン測定に及ぼすアスコルビン酸の影響—

(分担研究： 核黄疸の予防に関する研究)

中 村 肇\*

### 要 約

研究者らはビリルビン・アルブミン溶液及び患者血清を用いて、アスコルビン酸がアンバウドビリルビン測定値にどの程度抑制的に影響するかをアスコルビン酸オキシダーゼを添加することにより、その変化を検討した。

ビリルビン・アルブミン溶液にアスコルビン酸を添加すると、添加アスコルビン酸量に応じて、アンバウドビリルビン濃度は低く測定された。これらアスコルビン酸添加ビリルビン・アルブミン溶液にアスコルビン酸オキシダーゼを添加したところ、アスコルビン酸オキシダーゼ1 Uではアスコルビン酸が10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下ではその影響を10%以下に、2 Uではアスコルビン酸が30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下ではその影響を10%以下にできた。しかし、新生児黄疸血清での検討では、アスコルビン酸濃度が20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の例ではアスコルビン酸オキシダーゼ添加によっても全く変化せず、Vitamin Cの点滴静注を受けていない症例ではその差を無視できるが、点滴静注を受けている症例ではそれよりも高値を示すためアンバウドビリルビン測定にはアスコルビン酸オキシダーゼを添加して行う必要がある。

見出し語： 新生児黄疸，アンバウドビリルビン，アスコルビン酸

### はじめに

研究者らは1983年来、新生児特に極小未熟児の核黄疸発症予防の目的で血清総ビリルビン値だけでなくペルオキシダーゼ法による血清アンバウドビリルビン値の測定も同時に行い、臨床的に応用してきた。本法は微量の検体で、短時間にアンバウドビリルビンの測定が可能であるが、過酸化水素とペルオキシダーゼによる反応系を応用していることから、検体中にアスコルビン酸が混在していれば、その反応を阻害的に作用することが知られている。

そこで、研究者らはビリルビン・アルブミン溶液及び患者血清を用いて、アスコルビン酸がアンバウドビリルビン測定値にどの程度抑制的に影響するかをアスコルビン酸オキシダーゼを添加して反応させることにより、アンバウドビリルビン値の測定を行いその変化を検討した。

### 研究 方 法

1) 結晶ビリルビン (Sigma) およびヒト血清アルブミンFraction V (Sigma) を用い、Phosphate buffer に溶解し、ビリルビン濃度が10  $\text{mg}/\text{dL}$ 、アルブミン濃度が4  $\text{g}/\text{dL}$ になるように

\* 神戸大学医学部小児科

調整した。このビリルビン・アルブミン溶液にアスコルビン酸濃度が0, 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにアスコルビン酸を添加した。これらの溶液について、アローズ社製UBアナライザーを用いて、アンバウドビリルビンの測定を行った。通常の酵素液による測定に加え、アスコルビン酸の影響を除外するため反応溶液中に各種濃度のアスコルビン酸オキシダーゼ (Sigma) を予め添加し、1分後にアンバウドビリルビン値の測定を行った。添加したアスコルビン酸オキシダーゼの量は0から3.0単位になるようにし、添加量によるアンバウドビリルビン測定値の変化を調べた。

2) 黄疸血清におけるアスコルビン酸オキシダーゼ添加による血清アンバウドビリルビン値の変化

神戸大学医学部付属病院母子センターに入院した成熟新生児および未熟児24例 (54検体) を対象とした。うち12例はアスコルビン酸の点滴静注を受けていた。それぞれの血清について、通常のペルオキシダーゼ試薬とアスコルビン酸オキシダーゼ1.0単位を添加したペルオキシダーゼ試薬とにより血清アンバウドビリルビン濃度の測定を行った。両者の比較はpaired-t testによった。また、血清アスコルビン酸濃度の測定はヒドララジン法によった。

## 研究結果

1) ビルルビン・アルブミン溶液へのアスコルビン酸添加の影響 (図1)

ビリルビン・アルブミン溶液に各種濃度のアスコルビン酸を添加し、アンバウドビリルビン濃度を測定したところ、添加したアスコルビン酸量によりアンバウドビリルビン濃度は低下し、アスコルビン酸濃度が20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上になると、アンバウドビリルビン濃度はアスコルビン酸非添加時に比べて、20%–30%低く測定された。これらアスコルビン酸添加ビリルビン・アルブミン溶液にアスコルビン酸オキシダーゼを添加したところ、アスコルビン酸オキシダーゼ1 Uではアスコルビン

酸が10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下ではその影響を10%以下にできた。また、アスコルビン酸オキシダーゼ2 Uではアスコルビン酸が30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下ではその影響を10%以下にできた。

2) 新生児血清中のアスコルビン酸濃度

Vitamin C非点滴静注群では13.9  $\pm$  8.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Vitamin C点滴静注群では35.8  $\pm$  17.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった (図2)。

3) 黄疸血清におけるアスコルビン酸オキシダーゼ添加による血清アンバウドビリルビン値の変化 (図3)

黄疸血清にアスコルビン酸オキシダーゼ1 Uを添加して測定したアンバウドビリルビン値と非添加時のアンバウドビリルビン値を比較したところ、血清アスコルビン酸濃度が50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では両者間に有意な差を認めた。20–50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では有意差はなかったがアスコルビン酸オキシダーゼ添加により上昇した例も見られた。20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満の例ではアスコルビン酸オキシダーゼ添加によっても全く差がみられなかった。

## 考察

脳内にビリルビンが移行し核黄疸を発症する。その予知する方法として、血清総ビリルビンの測定だけでは不十分であることから、研究者らはアルブミン非結合型ビリルビンすなわちアンバウドビリルビン測定の臨床的有用性について報告してきた<sup>1)</sup>。血清中のビリルビン・アルブミン結合状態を知るための方法が種々考案されてきたが、現在研究者らが用いているペルオキシダーゼ法に基づくUBアナライザーによる方法<sup>2)</sup>は微量の検体で、かつ迅速に測定することが可能であるから、ひろく臨床的にも用いられるようになってきた。

ペルオキシダーゼ法による本法では、血清中に存在するアスコルビン酸により反応が抑制されることから、アンバウドビリルビン値はみかけ上低値を示すことが考えられる。アスコルビン酸を特異的に分解するアスコルビン酸オキシダーゼを用

いて予めアスコルビン酸を分解したのち、アンバウドビリルビン値を測定し、アスコルビン酸オキシダーゼ添加と非添加でアンバウドビリルビン値の差について検討した。その結果、血清アスコルビン酸濃度が $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であると、アンバウドビリルビン測定には影響しないことが明らかとなった。新生児、未熟児の血清アスコルビン酸濃度は通常 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であるのでアスコルビン酸による影響は無視できるが、アスコルビン酸を点滴静注に入れた場合にはその影響を無視できない。

この問題は測定試薬の中にアスコルビン酸オキシダーゼを加えることにより解決できるが、その至適量についてはさらに検討されねばならない。

#### 文 献

1. 中村 肇, 船戸正久, 内藤達男他: 極小未熟児における血清 Unbound bilirubin 測定の臨床評価. 日児誌, 89: 655-662, 1985.
2. 中村 肇, Shimabuku R: 新生児黄疸の管理と血清 unbound bilirubin 測定の自動化. 医学のあゆみ, 125: 647-648, 1983.

Effects of ascorbate oxidase on unbound bilirubin concentrations of bilirubin - albumin solutions with various concentrations of ascorbate.

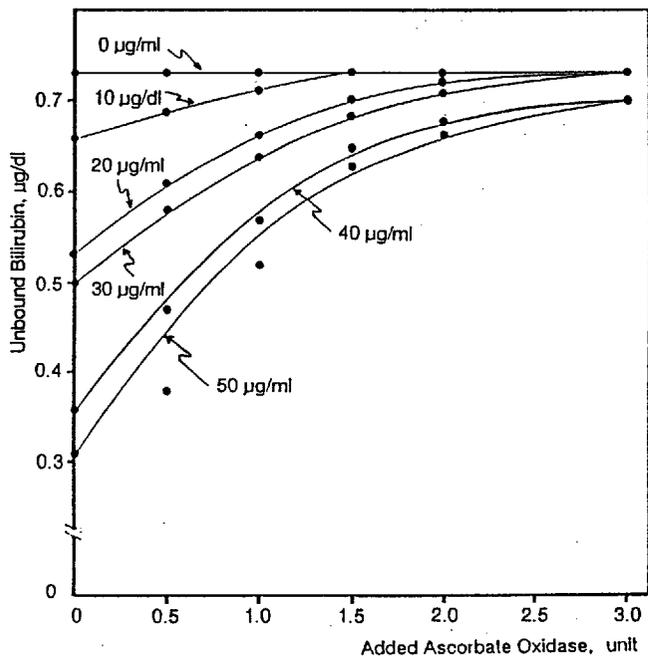


図1.

Serum ascorbate concentrations  
in newborn infants with intravenous  
infusion of ascorbate.

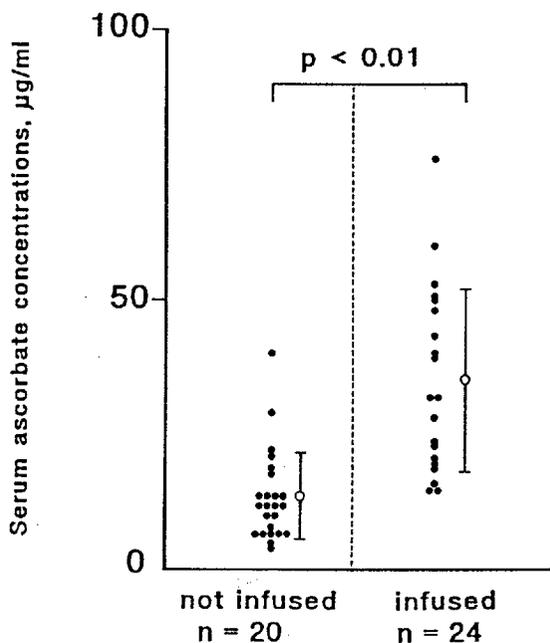


图2.

Effects of ascorbate oxidase on unbound bilirubin  
concentration of sera with various concentrations  
of ascorbate.

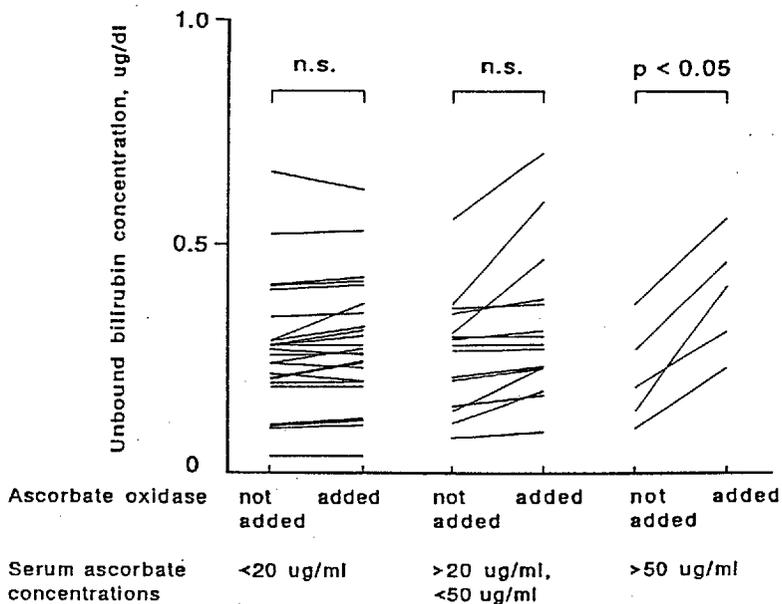
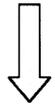
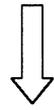


图3.



## 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

研究者らはビリルビン・アルブミン溶液及び患者血清を用いて、アスコルビン酸がアンバウドビリルビン測定値にどの程度抑制的に影響するかをアスコルビン酸オキシダーゼを添加することにより、その変化を検討した。

ビリルビン・アルブミン溶液にアスコルビン酸を添加すると、添加アスコルビン酸量に応じて、アンバウドビリルビン濃度は低く測定された。これらアスコルビン酸添加ビリルビン・アルブミン溶液にアスコルビン酸オキシダーゼを添加したところ、アスコルビン酸オキシダーゼ 1U ではアスコルビン酸が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下ではその影響を 10%以下に、2U ではアスコルビン酸が 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下ではその影響を 10%以下にできた。しかし、新生児黄疸血清での検討では、アスコルビン酸濃度が 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  未満の例ではアスコルビン酸オキシダーゼ添加によっても全く変化せず、VitaminC の点滴静注を受けていない症例ではその差を無視できるが、点滴静注を受けている症例ではそれよりも高値を示すためアンバウドビリルビン測定にはアスコルビン酸オキシダーゼを添加して行う必要がある。