

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15886

研究課題名(和文) 光療法は神経毒性をもたらすか？ビリルビン光学異性体と血液脳関門モデルを用いた研究

研究課題名(英文) Does Phototherapy Cause Neurotoxicity? A Study Using Bilirubin Photoisomer and a Blood-Brain Barrier Model

研究代表者

内田 優美子 (Uchida, Yumiko)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70319721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：幼若Wister ratの脳毛細血管内皮細胞で構成した血液脳関門モデルを作成し、ルミルビンの脳内移行性試験、細胞毒性試験を施行した。ルミルビンはビリルビンを青緑色照射し精製したものを最終濃度が10, 25, 50 μM になるよう、また、対照として非抱合型ビリルビン50 μM を0.1% ヒトアルブミン溶液中に調製した。さらに成人Wister ratの脳毛細血管内皮細胞で作成した血液脳関門モデルで幼若と成人モデルの比較を行った。の脳内移行性試験では幼若モデルにおいてルミルビンは濃度依存性に脳内移行した。しかし、成人モデルでは移行しなかった。一方、ルミルビンの細胞毒性試験では毒性を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児黄疸に対する光療法の有効性は既実証されている。一方、光療法に伴う超低出生体重児死亡率の増加や早産児のビリルビン慢性神経障害などが問題となっている。近年、光療法により産生されるビリルビン光学異性体(ルミルビン)による神経炎症惹起性についての報告があったが、ルミルビンの血液脳関門への移行性を検証した研究は未だない。本研究では幼若ラットを用いたモデルにおいてルミルビンが濃度依存性に血液脳関門を通過することを証明した初めての研究であり、今後、光療法と神経毒性との関係を調べる糸口になりうる研究であったと考える。

研究成果の概要(英文)： Blood-brain barrier models consisting of infant Wister rat brain capillary endothelial cells were created, and lumirubin were tested (1) for passage into the brain and (2) for cytotoxicity.

Lumirubin was purified by exposure to blue-green light to final concentrations of 10, 25, and 50 μM , and 50 μM of unconjugated bilirubin was prepared as a control in 0.1% human albumin solution. The infant and adult models were compared in a blood-brain barrier model created with brain capillary endothelial cells from adult Wister rats. In the brain transfer test, lumirubin levels in the infant model migrated into the brain in a concentration-dependent manner, but not in the adult model. On the other hand, lumirubin showed no toxicity in the cytotoxicity test.

研究分野： 新生児学

キーワード： ビリルビン ビリルビン光学異性体 血液脳関門 細胞毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児、特に早産児の黄疸に対する治療はビリルビンによる神経障害(ビリルビン脳症)を防ぐことである。ビリルビン脳症はアルブミンと結合していない非抱合型ビリルビン(アンバウンドビリルビンと呼ぶ)が脳内に移行し発症する。それを防ぐため、便や尿に排泄されやすいビリルビン光学異性体、ヒトでは主にルミルビンへと変換させる光療法が用いられてきた。しかし、現行の新生児黄疸管理基準に従った治療では早産児ビリルビン脳症を防ぎ得ていない。そのような折、2018年にルミルビンのラット海馬組織への前炎症性サイトカイン(IL-1、TNF-1、IL-6、Cox-2)の mRNA 遺伝子発現を促す作用が報告され、これまで安全と目されていた光療法とその産物であるルミルビンによる神経傷害性について疑念が生じた。しかし、光療法の結果産生されるビリルビン光学異性体は神経に親和性のない水溶性であることからこれまで安全とみなされ、また、精製分離の困難さからルミルビンを含むビリルビン光学異性体の脳神経系への作用はほとんど検証されてこなかった。

2. 研究の目的

光療法により産生される数種のビリルビン光学異性体のうち、ヒトにおいて光療法で最も多く産生されるルミルビンを精製し、血液脳関門モデルを用いルミルビンの移行性を検討する。

3. 研究の方法

ルミルビンの精製

分取薄層クロマトグラフィー(PTLC)、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS/MS)による。

ビリルビン試薬に光照射する(青緑色 Light Emitting Diode ; LED)。

PTLC でルミルビンに相当する band を掻き取り、LC-MS/MS でルミルビンを同定する。

また、当院新生児集中治療室に入院した早産児の光療法中の血清を試料にしてルミルビン濃度を LC-MS/MS 法で測定し、平均血清ルミルビン濃度を算出し、脳移行試験ではこれに相当、あるいは参考にしたルミルビン濃度の試薬を使用する。

ルミルビンの脳移行性

三次元構造を有した血液脳関門モデル(BBB キット^R;ファーマコセル(株))を用い、その経内皮電気抵抗(TEER)を確認。インサート内側(血管腔側)にルミルビン各種濃度(10、25、50 μ M)を別々にインキュベートする。プレートのウェル内(脳実質側)に漏れ出たルミルビン濃度を測定する。透過係数を算出し、脳内移行性を判定する。

正常 TEER(成人モデル)と低 TEER (=血液脳関門として低機能=早産児モデル)で移行性を比較する。

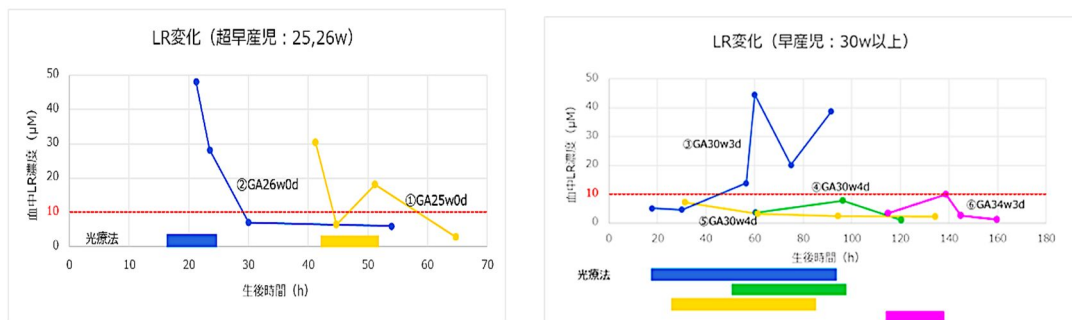
4. 研究成果

研究成果 1: ヒト早産児の黄疸治療(=光療法)による血清ルミルビン濃度の推移

光療法を受けた新生児の血清 LR 濃度は 10 μ M 未満であるという報告があるが、在胎週

数毎、照射時間毎などの詳細なデータはない。そこで光療法を受けた早産児の血清ルミルビン(LR)をLC-MS/MSで測定した。在胎(GA)28週未満(超早産)の早産児は2例ともLRは光療法中に10 μ Mを遥かに上回った(左下図)。また、GA30週以上の早産児4例のうち1例のみ最大45 μ Mと高値を示した(右下図)。高値を示した症例ではいずれも臨床的に尿量低下や消化/排便障害はなかったが、その時間付近で施行した心臓超音波検査で動脈管が開存していた。動脈管開存によって肝、腸管、腎血流が低下したことによるLR血中濃度上昇の可能性を示唆した。結果、従来報告と異なり一時的であるにせよ高いLRに晒される早産児がいることが判った。

これらの結果から血液脳関門モデルに曝すルミルビン濃度を10,25,50 μ Mと設定した。

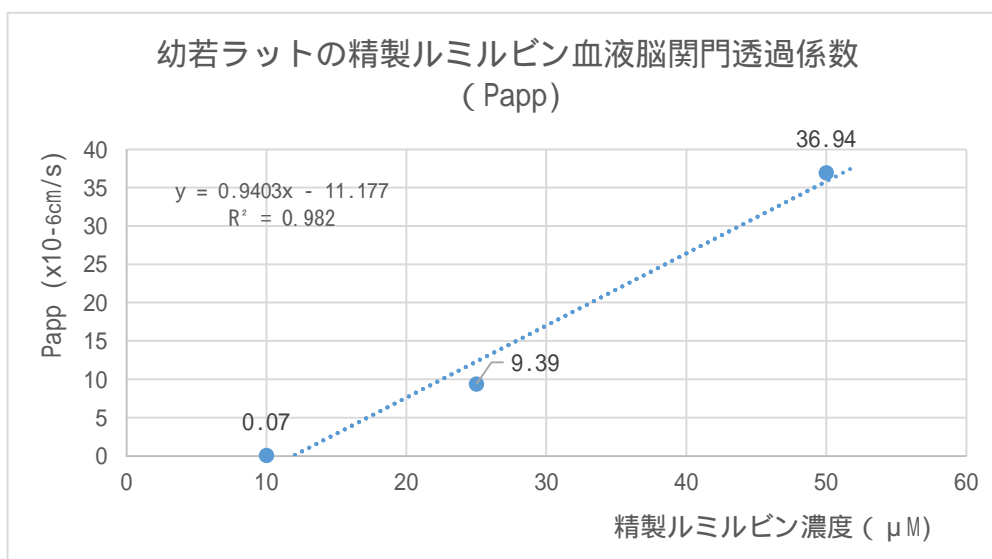


研究成果2：幼若ラットの血液脳関門バリア機能は成獣ラットよりも低い。

In vitro 血液脳関門モデルのバリア機能(タイトジャンクション機能)を定量的に表すため汎用されているパラメーターは経内皮電気抵抗(trans-endothelial electrical resistance: TEER)である。そして、この値が高いほどバリア機能は高いと考えられている。本研究において1週齢ラットと成獣ラットのTEER(cm^2)はそれぞれ12.0 (n=36), 903.7 (n=12)であり、明らかに幼若ラットの血液脳関門バリア機能は低かった。

研究成果3：精製ルミルビンは幼若ラットの血液脳関門モデルを通過する。

3つの異なる精製ルミルビン濃度(10,25,50 μ M)に曝した幼若ラット(n=8)の血液脳関門モデルにおいて、血液脳関門透過係数Papp($\times 10^{-6}\text{cm/s}$)を求めた。一般的にPappが10($\times 10^{-6}\text{cm/s}$)を超えると血液脳関門を通過し得、20を超えると血液脳関門を容易に通過すると考えられている。本研究では濃度が濃いほど血液脳関門を通過した(下図)。一方、成獣ラットにおいても同様に検討したがいずれの濃度においても透過係数はゼロであり、通過しなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yumiko Uchida, Yukihiro Takahashi, Yukihiro Morimoto, Peter Greimel, Asako Tosaki, Akiko Kumagai, Toshiya Nishikubo, Atsushi Miyawaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Noninvasive monitoring of bilirubin photoisomer excretion during phototherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16180-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Yumiko, Takahashi Yukihiro, Kurata Chikara, Morimoto Yukihiro, Ohtani Eishin, Tosaki Asako, Kumagai Akiko, Greimel Peter, Nishikubo Toshiya, Miyawaki Atsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Urinary lumirubin excretion in jaundiced preterm neonates during phototherapy with blue light-emitting diode vs. green fluorescent lamp	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-45147-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田優美子、高橋幸博、釜本智之、中川隆志、利根川仁、西本瑛里、谷 有貴、西久保敏也
2. 発表標題 新生児黄疸に対する光療法器の波長の違いによる尿中UnaG結合ビリルビン排泄の比較
3. 学会等名 第58回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田優美子、高橋幸博、釜本智之、中川隆志、利根川仁、西本瑛里、谷有貴、西久保敏也
2. 発表標題 液体クロマトグラフ質量分析計による蛍光タンパク質UnaGを用いた尿中ビリルビン光学異性体測定法の検証
3. 学会等名 第57回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------