

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19652

研究課題名(和文)ニホンウナギ由来蛍光蛋白質を用いた新しい血清アンバウンド・ビリルビン測定法の開発

研究課題名(英文)A Novel Method for Measuring Unbound Serum Bilirubin Levels Using Glucose Oxidase-Peroxidase and Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein

研究代表者

岩谷 壮太(Iwatani, Sota)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00741430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：核黄疸の原因は新生児期の重篤な高ビリルビン血症であるが、血清中の非抱合型ビリルビン(iDB)、特にアルブミンと結合していないアンバウンドビリルビン(UB)がその発症と関連する。しかし、現在までiDBおよびUBの標準的測定法は確立されていなかった。本研究では、ニホンウナギ由来の蛍光蛋白質を用いることで、血清1μLレベルの微量検体からiDBを直接測定できる方法を確立した。本測定法は、臨床現場でしばしば経験する光線療法や高DB血症、採血手技の際に問題となる溶血によって影響されないことを実証した。くわえて現在までに、新たなUB測定法も考案しているところである(特願PCT/JP2015/074542)。

研究成果の概要(英文)：Increased serum levels of unconjugated bilirubin (UCB), especially in unbound bilirubin (UB), are associated with the development of brain damage in newborns. In current clinical settings, there are no standard methods for serum levels of UCB and UB. UnaG, a fluorescent protein from Japanese eel muscle that specifically binds to UCB was used in this study. UCB levels measured by the UnaG method were highly correlated with those determined by conventional bilirubin oxidase assay. The performance of the UnaG assay was unaffected by phototherapy and the presence of serum conjugated bilirubin or hemoglobin. These results demonstrate the clinical applicability of the UnaG method for measurement of UCB levels in newborn serum. To date, we have established a novel method for measuring UB levels using glucose oxidase-peroxidase and the UnaG assay (Patent PCT/JP2015/074542).

研究分野：新生児

キーワード：unconjugated bilirubin unbound bilirubin measurement method fluorescent protein UnaG

## 1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩に関わらず、核黄疸は依然として新生児の神経学的後遺症の主要因の一つである。特に近年では、早産児の核黄疸症例の報告が増加しており、早産児の黄疸管理の見直しが緊急の課題となっている。

核黄疸の原因は新生児期の重篤な高ビリルビン血症であり、血清中の非抱合型ビリルビン (iDB) なかでもアルブミンと結合していない遊離ビリルビン (UB) の濃度が核黄疸の発症と関連することが明らかになっている。特に早産児では血清アルブミン濃度が低いこと、ビリルビン・アルブミン結合力が正期産児と比して弱いことから UB 濃度の測定が重要である (Morioka I, Iwatani S, et al. Semin Fetal Neonatal Med. 2014)。

iDB の測定については、酵素法および化学酸化法が主流であるが、いずれも総ビリルビン (TB) 濃度と抱合型ビリルビン (direct bilirubin: DB) 濃度の差から間接的に算出するものであり、直接測定する方法は存在しない。さらに、測定方法の違いによる測定値乖離の問題が指摘されている。また、UB については、我々の開発したグルコースオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ (GOD-POD) 法が世界で唯一アメリカ食品医薬品局 (FDA) の承認を得ている状況にあるが (Nakamura H, et al. Clin Chim Acta. 1977) DB やヘモグロビンが測定結果に影響することが臨床で大きな問題となっており、わが国においても全国的に普及するに至っていない。

2013 年、共同研究者である理化学研究所の宮脇チームはニホンウナギの筋肉に存在する緑色蛍光蛋白質が、iDB と結合して蛍光活性を獲得する仕組みを発見した (Kumagai A, et al. Cell. 2013)。注目すべきは、この緑色蛍光蛋白質である UnaG のリガンドが iDB であり、iDB 濃度に依存して緑色蛍光の強度が増大する点である。さらに、この UnaG は iDB と極めて強く結合することから、従来のビリルビン測定法に比して、感度が高いだけでなく、微量検体で正確かつ迅速に定量できることが期待された。

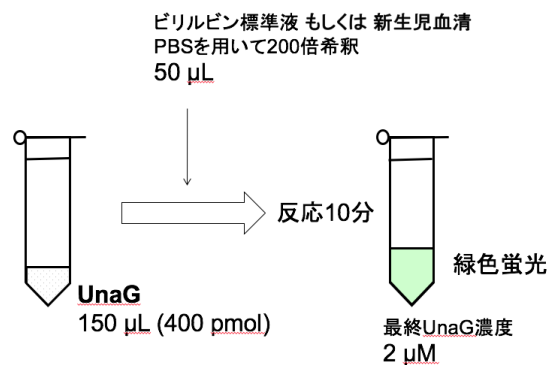
## 2. 研究の目的

- (1) UnaG の蛍光システムを用いた iDB 測定法 (UnaG 法) を確立させること
- (2) UnaG 法と GOD-POD 法を組み合わせることで、新たな UB 測定法 (GOD-POD-UnaG 法) を開発すること

## 3. 研究の方法

ビリルビン標準液 (アローズ社) 倫理委員会の承認および家族の同意のもと得られた新生児余剰血清検体を用いた。

(1) 200 倍希釈した検体 50  $\mu$ L に対して UnaG (理化学研究所より提供) を加え、総容量 200  $\mu$ L の混合溶液を作成した (最終 UnaG 濃度 2  $\mu$ M)。コロナ社製のマイクロプレートリーダー (SH9000) を用いて、励起波長 498nm に対する蛍光波長 527nm の蛍光強度を測定した。ビリルビン標準液における iDB 値と上記方法で得られた蛍光強度から標準線を作成し、各血清における蛍光強度から iDB 値を算出した (UnaG 法)。



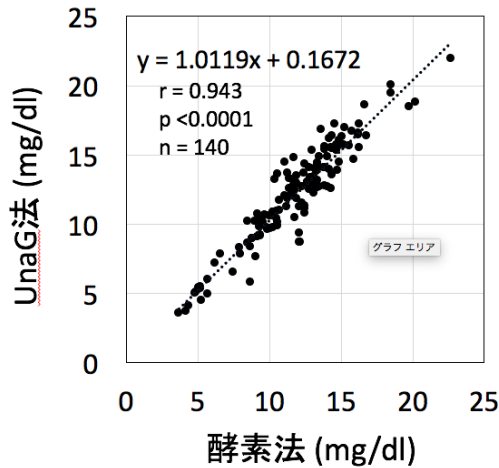
現在臨床現場で用いられている酵素法 (イアトロク DQ T-Bil/D-Bil、三菱化学メディエンス) で測定した iDB 値と UnaG 法で得られた iDB 値との相関性を検討した。くわえて、光線療法、DB、ヘモグロビン、脂肪製剤の測定への影響について調べた。

(2) GOD-POD 法を用いて、グルコース含有緩衝液 1000  $\mu$ L および検体 20  $\mu$ L を混和させたものをペアで作成した。一方には緩衝液、他方には酵素液をそれぞれ 25  $\mu$ L くわえ、いずれも 20 秒後にアスコルビン酸 555  $\mu$ L を混和させた (総容量 1600  $\mu$ L)。作成された 2 検体について、UnaG 法を用いて iDB 濃度を測定し、2 検体における iDB の差 (iDB) を算出した。ビリルビン標準液での iDB および  $iDB/t = K \times [POD] \times [UB]$  の数式から K 値を決定し、新生児血清における UB 値の算出に用いた (GOD-POD-UnaG 法)。

GOD-POD-UnaG 法で求めた UB 値について、従来の GOD-POD 法で測定した UB 値との相関性を検討した。また、両方法で算出した UB 値と iDB/アルブミン (iDB/A) 比との相関性について比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 新生児 92 例から得られた余剰血清 140 検体(光線療法中 35 検体を含む)を解析した。酵素法と UnaG 法における iDB 値は極めて良好な相関を示した ( $R=0.943$ 、 $P<0.001$ )。また、光線療法の有無による差はなかった。



病的新生児 4 例から得られた高 DB 血症 14 検体 (DB 1.0 mg/dL 以上) について、両者で求めた iDB 値は同程度であった。

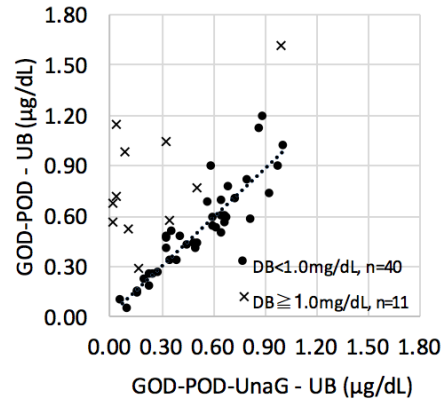
	酵素法 (mg/dL)			UnaG法 (mg/dL)
	TB	DB	iDB	iDB
#1	9.1	1.0	8.1	9.0
#2	14.7	1.2	13.5	15.0
#3	9.6	1.5	8.1	8.7
#4	9.2	2.1	7.0	7.1
#5	3.9	2.4	1.5	0.6
#6	5.5	3.5	2.0	0.8
#7	5.9	4.6	1.3	1.3
#8	6.0	4.7	1.3	1.2
#9	7.9	5.5	2.4	1.7
#10	8.0	6.0	2.0	1.7
#11	12.0	9.6	2.4	1.5
#12	19.7	16.4	3.3	2.1
#13	21.0	17.7	3.3	2.1
#14	25.0	22.0	3.0	2.0

また、ヘモグロビン、脂肪製剤の測定への影響はみられなかった。

以上の結果より、UnaG 法は光線療法および DB、ヘモグロビン、脂肪製剤の有無にかかわらず、直接的に iDB 値を測定可能であることが示された。

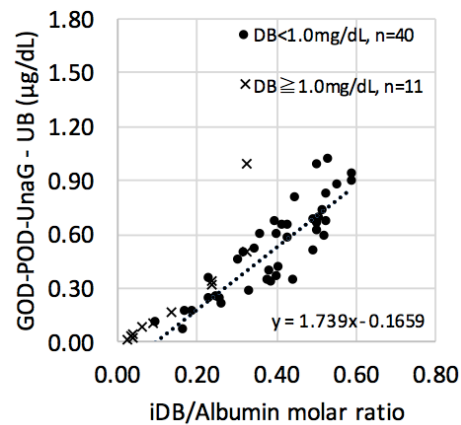
(2) 新生児 35 例から得られた余剰血清 51 検体を解析した。両測定法で求められた UB 値について、低 DB 検体 (DB 1.0 mg/dL 未満、 $n=40$ ) では良好な相関を示したが ( $R=0.902$ 、

$P<0.001$ )、高 DB 検体 (DB 1.0 mg/dL 以上、 $n=11$ ) では相関性が低かった ( $R=0.623$ 、 $P=0.041$ )。

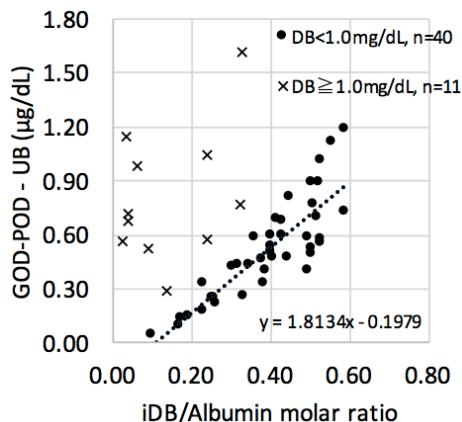


UB 値と iDB/A 比と相関性について、低 DB 検体では GOD-POD-UnaG 法および GOD-POD 法で求めた UB 値と iDB/A 比はいずれも良好な相関関係を示した ( $R=0.874$ 、 $P<0.001$  vs.  $R=0.849$ 、 $P<0.001$ )。一方、高 DB 検体においては GOD-POD-UnaG 法による UB 値と iDB/A 比の相関は良好であったが ( $R=0.894$ 、 $P<0.001$ )、従来の GOD-POD 法による UB 値と iDB/A 比の相関は不良であった ( $R=0.375$ 、 $P=0.255$ )。

#### GOD-POD-UnaG法



#### GOD-POD法



以上の結果より、GOD-POD-UnaG 法では、従来の GOD-POD 法と同様に UB 測定ができるだけでなく、高 DB 血症に影響されることなく UB 値を測定できることが示された。

総じて、我々は UnaG の蛍光システムを用いて新生児血清中 iDB 測定法を確立した (UnaG 法)。くわえて、既存の GOD-POD 法に UnaG 法を組み合わせることで、現状の問題点を克服した UB 測定法を考案した (GOD-POD-UnaG 法)。現在は臨床現場への応用を目指すべく、自動測定装置の開発に着手している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

(1) Ichiro Morioka, Sota Iwatani, Hajime Nakamura, et al. Disorders of bilirubin binding to albumin and bilirubin-induced neurologic dysfunction. *Semin Fetal Neonatal Med.* 20(1), 31-36, 2014

(2) Sota Iwatani, Hajime Nakamura, Ichiro Morioka, et al. Fluorescent protein-based detection of unconjugated bilirubin in newborn serum. *Scientific Reports*, 6, 28489, 2016

(3) Ichiro Morioka, Hajime Nakamura, Sota Iwatani, et al. International Perspectives: Clinical kernicterus in preterm infants in Japan. *NeoReviews*. 17(3), e124-130, 2016

(4) Daisuke Kurokawa, Hajime Nakamura, Sota Iwatani, Ichiro Morioka, et al. Screening for Hyperbilirubinemia in Japanese Very Low Birthweight Infants Using Transcutaneous Bilirubinometry. *J Pediatr.* 168, 77-81, 2016

(5) Miwako Nagasaka, Tomoe Kikuma, Sota Iwatani, Ichiro Morioka, et al. Transcutaneous bilirubin monitoring predicts unexplained late-onset hemolysis in a very low birthweight infant. *BMC Research Notes.* 9, 153, 2016

[学会発表](計 4 件)

(1) Sota Iwatani, Hajime Nakamura, Ichiro Morioka, et al. A Novel Method for Measuring Unbound Serum Bilirubin Levels Using Glucose Oxidase-Peroxidase and Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein. *Pediatric Academy Societies Meeting*, 2015 年 4 月 25 日, San Diego, United States

(2) 岩谷 壮太, 中村 肇, 森岡 一朗ら、ビリルビン誘導蛍光タンパク質 (UnaG) を用い

た新たな新生児血清中の非抱合型ビリルビン濃度測定法、第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集会、2015 年 7 月 10 日、福岡  
(3) 岩谷 壮太, 中村 肇, 森岡 一朗ら、UB アナライザーとビリルビン誘導蛍光タンパク質 (UnaG) を用いた新たなアンバウンドビリルビン測定法の開発、第 60 回日本新生児成育医学会学術集会、2015 年 10 月 23 日、盛岡  
(4) Sota Iwatani, Hajime Nakamura, Ichiro Morioka, et al. A novel measurement method for serum unconjugated bilirubin concentrations using a bilirubin-inducible fluorescent protein. *Pediatric Academic Societies Meeting*, 2016 年 4 月 30 日, Baltimore, United States

[図書](計 1 件)

森岡 一朗, 岩谷 壮太, 早産児の臨床的核黄疸 - 黄疸管理の見直し、小児科、56 巻、10 号、1611-1615 頁、2015

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 血液試料中のアンバウンドビリルビンの測定方法

発明者: 岩谷 壮太, 森岡 一朗, 中村 肇, 宮脇 敦史, 熊谷 安希子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/060327

出願年月日: 2016 年 3 月 30 日

国内外の別: 国内および国外

[その他](計 1 件)

ホームページ

[http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016\\_06\\_21\\_02.html](http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_06_21_02.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩谷 壮太 (IWATANI, Sota)

神戸大学大学院医学研究科・内科系講座小児

科学分野・助教

研究者番号: 00741430

(2) 連携研究者

中村 肇 (NAKAMUTA, Hajime)

神戸大学大学院医学研究科・内科系講座小児

科学分野・名誉教授

研究者番号: 40030978

森岡 一朗 (MORIOKA, Ichiro)

神戸大学大学院医学研究科・内科系講座こども急性疾患学・特命教授

研究者番号: 80437467