

〈特集：酸化ストレス〉

## 低分子抗酸化物質（ビリルビンの抗酸化作用を主に）

山口 登喜夫<sup>1)</sup>、杉本 昭子<sup>2)</sup>

### Anti-oxidative effects of bilirubin as a low molecular antioxidant

Tokio Yamaguchi<sup>1)</sup> and Akiko Sugiyama<sup>2)</sup>

**Summary** Bilirubin, a strong intrinsic antioxidant, quenches Reactive Oxygen Species (ROS) produced by oxidative stress such as inflammation, hypoxia, ischemia-reperfusion, cytokines and psychological stress. Bilirubin production is regulated by the rate-limiting enzyme, heme oxygenase1 (HO-1), which is rapidly induced by ROS. The reaction of bilirubin with ROS should result in the production of many kinds of bilirubin oxidative metabolites (i.e., biopyrrins). These findings indicated that, since oxidative stress is associated with an increase in biopyrrins in human urine, they could prove useful as stress-biomarkers of general oxidative and psychological stress. Biopyrrins can be detected using the anti-bilirubin monoclonal antibody 24G7 from human urine, with several structures of biopyrrins having already been determined. Recently, we found that bilirubin directly scavenges NO radicals and quenches excess oxidants generated during acute graft rejection *in vivo*. Urinary biopyrrins might directly reflect such ongoing events in the graft, suggesting its usefulness as a real-time indicator of graft rejection. In the present study, we attempted to detect nitro-biopyrrins derived from bilirubin oxidation by NO radicals in human urine.

**Key words:** Oxidative stress, Antioxidant, Bilirubin, Biopyrrin, Stress-biomarker

#### I. はじめに

高等動物、とくに細胞レベルから個体にいたるまで酸素は食物を酸化燃焼させてATPなどの生体エネルギーを産生すると同時に、その過程

で漏出した電子と酸素がカップリングして活性酸素となり生体成分をも攻撃する。この活性酸素は、多くの生体成分と反応してその機能や構造を破壊しうる。哺乳類では、呼吸からエネルギー代謝に利用される酸素の約3~10%が、活性

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学 難治疾患研究所  
〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45

<sup>2)</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所  
〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台2-3-10

<sup>1)</sup>Department of Biochemical Genetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

<sup>2)</sup>Department of Molecular Design, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

## 生 物 試 料 分 析

酸素種に変化すると考えられている。したがって、代謝のさまざまな過程で発生する活性酸素やフリーラジカルを確実に消去し無毒化することが生命維持に不可欠である。

多くの活性酸素やフリーラジカルは寿命が極めて短く、さまざまな生体成分と速やかに反応するので、生体防御のためには発生の抑制か発生源での分解処理が必要となる。このため多量の酸素を消費するヒトを初めとする好気的生物は、活性酸素種が発生する組織細胞内局所に高濃度のスカベンジャーである低分子抗酸化物質や抗酸化酵素を有しており、酸素毒性を発生

することのないように、エネルギー代謝におけるレドックス（酸化還元）バランスを保持している。

しかし、各種の疾患では、これら酸化ストレスに対する防御能が破綻して発生する活性酸素種により非特異的に生命機能が破壊されて、結果として病態の発現や増悪の引き金となっているのではないかと考えられている。表1に生体内で発生すると思われる活性酸素種を示した。また、これら活性酸素種に対する生体内の中和消去機構として表2に示す防御システムが幾重にも張りめぐらされている。

表 1 主な活性酸素種の作用と生成系

活性酸素種	作用と生成系
$\cdot O_2^-$ (スーパーオキシドアニオン) * $H_2O_2$ (過酸化水素) $\cdot OH$ (ヒドロキシラジカル) * $\cdot O_2$ (一重項酸素) $ROO\cdot$ (脂質過酸化ラジカル) * $ROOH$ (脂質過酸化物) $RO\cdot$ (脂質アルコキシラジカル) *	一電子還元状態：キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系、ユビセミキノン、シトクロムC、シトクロム P 450、NAPPHオキシダーゼ 二電子還元状態： $\cdot O_2^-$ の不均化反応 (SOD)、 $\cdot O_2^-$ の還元反応 (GSH) ほか 三電子還元状態： $H_2O_2$ のUV、放射線によるラジカル分解、Harber-Weiss、Fenton反応 $^3O_2$ (三重項酸素) の $\pi$ 電子励起状態、光酸化反応 脂質過酸化における連鎖反応開始 脂質自動過酸化における連鎖反応期 $ROOH$ の開裂によって生成する

\*：ラジカル

表 2 生体の抗酸化防御系

	抗酸化ストレス蛋白 (酵素) 抗酸化・ラジカル物質	抗酸化作用 等
蛋白・酵素 脂溶性低分子化合物 水溶性低分子化合物 尿酸 高分子化合物	スーパーオキシジスムターゼ (SOD) カタラーゼ グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) チオレドキシシン (ADF/TRX) アルブミン セルロプラスミン (Crpl) トランスフェリン メタロチオネイン トコフェロール ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) ユビキノン カロチノイド ビリルビン アスコルビン酸 (Vit. C) グルタチオン (GSH) ビタミンK フラボノイド ポリフェノール類 (アントシアニンなど数千種) メラニン、リグニン	$\cdot O_2^-$ の不均化反応 ( $2\cdot O_2^-+2H^+\rightarrow H_2O_2+O_2$ ) $H_2O_2$ の分解 ( $2H_2O_2\rightarrow 2H_2O+O_2$ ) $H_2O_2+2GSH\rightarrow GSSG+H_2O$ $LOOH+2GSH\rightarrow LOH+GSSG+H_2O$ $LOOH+2GSH\rightarrow LOH+GSSG+H_2O$ NF $\kappa$ B活性化、オキシラジカルの消去 $\cdot OH$ 、 $LOO\cdot$ 、 $HOCl$ の消去 $\cdot O_2^-$ の消去、NOのニトロシル (Crpl: GS-NO)の形成 活性酸素の発生源となる $Fe^{2+}$ 、 $Cu^+$ イオンの捕捉 $\cdot OH$ 、 $O_2^-$ の消去、金属の捕捉 $LOO\cdot$ 、 $LO\cdot$ 、 $\cdot OH$ の補護 $LOO\cdot$ 、 $LO\cdot$ 、 $\cdot OH$ の消去 主に $^1O_2$ を消去 $^1O_2$ 、 $\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$ 、 $LOO\cdot$ 、NO、 $ONOO^-$ の消去 $\cdot OH$ 、 $\cdot O_2^-$ 、 $LOO\cdot$ などを消去 $\cdot OH$ 、 $\cdot O_2^-$ 、 $LOO\cdot$ などを消去 $\cdot OH$ を消去、抗 $ONOO^-$ などを消去 $LOO\cdot$ 、 $ONOO^-$ などを消去 $\cdot O_2^-$ 、 $LOO\cdot$ 、 $ONOO^-$ などのラジカル消去 $\cdot O_2^-$ 、 $LOO\cdot$ 、 $ONOO^-$ などのラジカル消去 ほとんどの活性酸素の消去作用を持つ

## II. ビリルビンの抗酸化作用

著者らは、ヘム代謝を研究テーマとしており、とくに生体内低分子抗酸化物質であるビリルビン (BR) の抗酸化作用について独自に開発した抗ビリルビン単クローン抗体 (24G7) を用いて得られた幾つかの知見を概説する。

### a. ヘムからビリルビンへの代謝

ヘム (プロトヘム IX) は、ヘモグロビンやシトクロームP-450などのヘムタンパク質の補欠分子族ある。このヘムはミクロソームの膜酵素であるヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase; HO) により、ビリベルジン (biliverdin; BV) となるが、その過程で一酸化炭素 (CO) と鉄イオン ( $Fe^{2+}$ ) が遊離する<sup>1)</sup>。BVはビリベルジン還元酵素によりビリルビン (bilirubin; BR) となり、その後、肝臓でグルクロン酸抱合された後に胆汁中に排泄される<sup>2)</sup>。このヘムの酵素的分解により、線形テトラピロールであるBV、そしてBRへと代謝されると中央に活性メチレン基が現れ、2つのジピロール環とともに多くの活性酸素種と反応し、それらを消去する自殺的抗酸化物質 (suicidal antioxidant) となる。すなわち、BR自身が活性酸素の攻撃を受けて酸化分解されることにより、BVやその他多くの酸化生成物質に変化する。

BRは、分子量585で、ラクタム5員環のイミノ基とカルボニル基が一对、ピロール環のイミノ基が一对、プロピオン酸のカルボキシル基が一对と、極性基が合計8個と数多くの極性基を持つにもかかわらず、分子内水素結合を形成するために分子全体が非極性基となり、水に不溶であるというユニークな化合物である。今まで一般に、BRはその疎水性のため神経毒性が高く、黄疸の原因として有害な排泄されるべき物質と考えられてきた。事実、ヒトの新生児黄疸では、血中BRはアルブミンなどとの結合能力を超えると、脳血流関門を通過し大脳基底核膜などに沈着して脳神経障害を起こす核黄疸 (kernicterus) の原因物質として有害な物質とされてきた。しかし、BRの生理的有用性については、1987年にStockerらが血中の生理的濃度 (約  $8.5 \mu\text{mol/L}$ ) のBRは、リノレン酸の均一溶液で

の脂質過酸化に関して、生理的な細胞内酸素濃度でビタミンE ( $\alpha$ -トコフェロール) を凌ぐ抗酸化作用を示すことを報告してより<sup>3,4)</sup>、その生理的意義について数多くの研究がおこなわれるようになった。現在は図1に示すように、手術侵襲、細菌毒素 (LPS)、虚血再灌流障害、さらに精神的ストレスなど多くの酸化ストレスにより生成する活性酸素をBRが消去していることが報告されている。

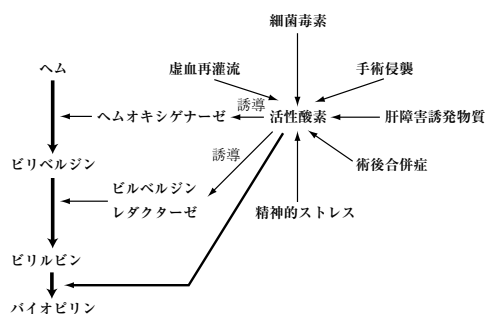
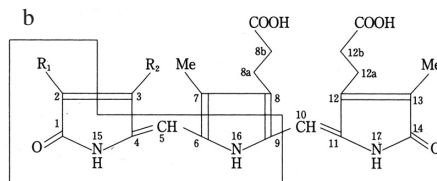
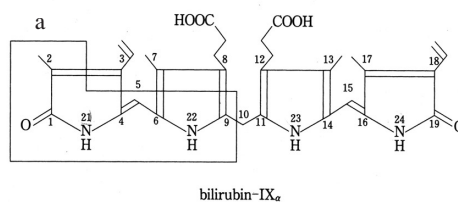


図1 バイオピリン生成の推定機構



...otripyrrin-a :  $R_1 = \text{Me}$ ,  $R_2 = -\overset{b}{\text{C}}\text{H}=\overset{b}{\text{C}}\text{H}_2$   
1,14,15,17-tetrahydro-2,7,13-trimethyl-1,14-dioxo-3-vinyl-16H-tripyrin-8,12-dipropionic acid

biotripyrrin-b :  $R_1 = -\overset{b}{\text{C}}\text{H}=\overset{b}{\text{C}}\text{H}_2$ ,  $R_2 = \text{Me}$   
1,14,15,17-tetrahydro-2,7,13-trimethyl-1,14-dioxo-3-vinyl-16H-tripyrin-8,12-dipropionic acid

図2 a: 抗ビリルビンモノクローナル抗体(24G7)のエピトープ (枠内)  
b: biotripyrrin-a and -bの化学構造

b. バイオピリンの化学構造とビリルビンの *in vitro*での酸化反応

抗BRモノクローナル抗体 (24G7) は、血清の総BR値のみならず、尿中でこのエピトープ (図2a) を分子内に保存する物質を特異的かつ高感度に測定しうる有効な方法である<sup>5,7)</sup>。最初の例として、外科手術患者の尿中あるいは血清中にジアゾ反応陰性で本モノクローナル抗体 (24G7) に交叉反応性を示すBR類縁物質と推定されるものが増加していた<sup>8)</sup>。これらはBRとは異なる物質であり、BRの酸化生成物質 (bilirubin oxidative metabolites) と考えられ、これらを生体内に有るピロール化合物という意味で“バイオピリン (biopyrrin)”と総称することにした。著者らは、当初ヒト尿中に抗BR抗体 24G7が認識するバイオピリンは、少なくともピークとして7種類は存在することをHPLC分析で確認した。尿中に複数のバイオピリンが存在する理由は、①BRの酸化段階が複数ある、②反応時においてBRの立体構造変化に伴い反応部位が異なる、③反応する活性酸素の種類によって反応機構が異なる、などの要因が考えられる。したがって、バイオピリンの化学構造は、生体内で発生する活性酸素の量のみならず、発生時の生体内局所に関して非常に有益な情報 (BRが局在する環境、活性酸素の種類など) をもたらすことと思われる。しかし、ELISAでは検出可

な濃度でも、尿から個別に単離精製しその構造を決定する作業は容易ではなく、最初に構造が決定されたバイオピリンは2種 (biotripyrrin-aとbiotripyrrin-b) のみである (図2b)<sup>9)</sup>。その後、*in vitro*でBRと各種活性酸素との反応を行い生成するBR酸化物の構造を決定し、それをreferenceにして尿中に存在するバイオピリンの構造の同定を行っている。

c. ビリルビンと活性酸素との反応

BRと一重項酸素 ( $O_2$ ) との光増感酸化反応を疎水性溶媒中でトリメチルホスファイト ( $P(OCH_3)_3$ ) を共存させて行くと、従来から知られている主生成物のpropentdyopent類やmethylvinylmaleimide (MVM) が生成するが、それ以外に非常に低収率ながらbiotripyrrin-bが生成することを確認している (図3)。また同様に、*in vitro*でBRとsuperoxide anion ( $O_2^-$ )、 $H_2O_2$ 、nitric oxide、peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) との反応で、さらに数種類のdipyrrole、tripyrrole、tetrapyrroleの各種酸化生成物の生成も確認している。現在はそれらの化学構造を決定し、そのうち数種類の化合物 (dipyrrole-aldehyde、tripyrrole-aldehyde) 及びそれらのニトロ化体がヒト尿中にも存在していることをLC/MS/MSで明らかにしている (発表準備中)。

一例として、BRと $H_2O_2$ との反応生成物を図4に示した。BRと一重項酸素との反応で得られた共通な生成物も含めて9種類の酸化生成物が得られており、なかでも8 (biopyrrin-Ba) と9 (biopyrrin-Bb) のdipyrrole-aldehyde体は、バイ

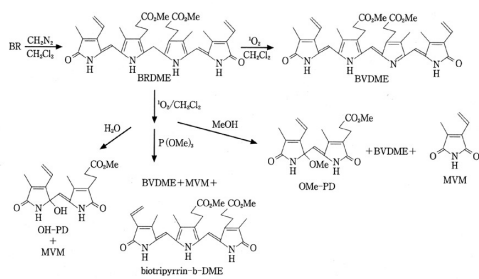


図3 ビリルビンと $O_2$  (一重項酸素) との光増感酸化反応を疎水性溶媒 (塩化メチレン) 中で行い同定されたビリルビン酸化生成物の化学構造; BR: bilirubin, BRDME: bilirubin dimethyl esters, BVDME: biliverdin dimethyl esters, OH-PD: hydroxyl propentdyopent, OMe-PD: methoxy propentdyopent, MVM: methylvinylmaleimide

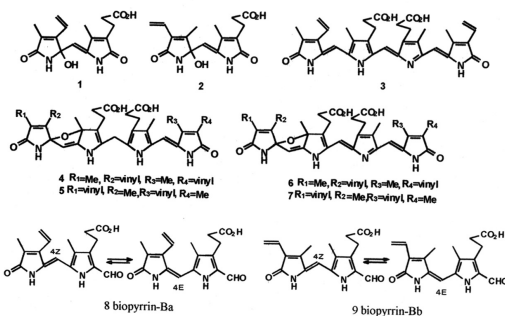


図4 ビリルビンと過酸化水素との反応による酸化生成物

オピリンとしてヒト尿中にも存在を確認している。興味深いことには、この二つの化合物は二つのピロール間のメチル基 (C4位) でE-Z構造変換を常時起こしている構造異性体であった。図5にヒト尿中に存在するこれらbiopyrrin-Baとbiopyrrin-BbのHPLC分析と吸収スペクトルを示した。

### Ⅲ. 酸化ストレスマーカーとしてのバイオピリン

BRは生合成されるため、酸化ストレスに対する

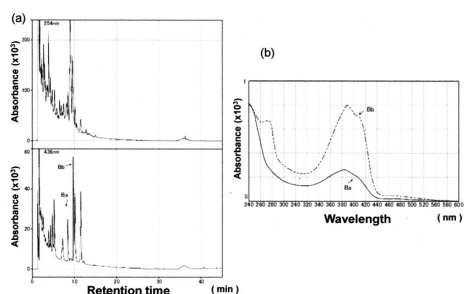


図5 ヒト尿中のbiopyrrin-Baとbiopyrrin-BbのHPLC分析 (upper; 254 nm, lower; 436 nm) (a)とUV-VIS吸収スペクトル(b)

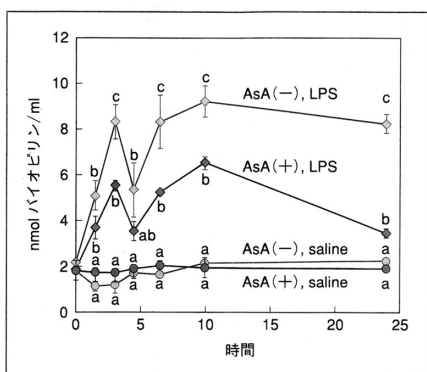


図6 エンドトキシン (LPS) および生理的食塩水投与後のラットの尿中バイオピリン濃度の経時変化  
異なる文字間の値：p<0.05有意差有り (Duncan's multiple range test), LPS：エンドトキシン、AsA：アスコルビン酸、saline：生理的食塩水

る応答としてその合成量が速やかに上昇するものと考えられる。この点が、BRが抗酸化物質として働くことの利点の一つである。すなわち、BR生合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO-1) が、酸化ストレスによって誘導されることはよく知られている<sup>10)</sup>。生体内で酸化ストレス負荷時に生じた活性酸素種をBRが消去してバイオピリンとして検出された報告例のいくつかを次に示す。

a. 遺伝的にアスコルビン酸 (AsA) の生合成能を欠失しているラット (ODS-od/od) を用いて、エンドトキシン (LPS) 負荷後に体内に発生した活性酸素 (おもにNO) のBRによる消去能を抗酸化ビタミンであるAsAと比較した。LPS投与後、BRはラット内で発生した活性酸素を効率良く消去し尿中にバイオピリンとして排泄されているが、その際に水溶性抗酸化ビタミンのAsAが共存するとそれと拮抗的に働いていた (図6)<sup>11)</sup>。

b. さらに、実験的動脈硬化モデルとして、高コレステロール食餌によりウサギに動脈硬化領域を作ると、この領域には、マクロファージ由来の泡細胞 (form cells) が形成された。この領域に抗HO-1抗体と抗BR抗体 (24G7) を用いて組織免疫染色を行うと、このform cellsには酸化ストレスによりHO-1が強く発現されており、その代謝物であるBRが活性酸素種を消去して生成されたバイオピリンが同領域で多量に検出されていた<sup>12)</sup>。

c. ヒトがスピーチストレスなど心理・社会的ストレスを強く受けたとき、バイオピリンがこのストレスの強度によって尿中に増加することが観察されている。このことは、UVや薬物、エンドトキシン投与など明らかに酸化ストレスを発生する場合や器質異常による疾患のみならず、情動の強い葛藤による心理的ストレスにおいても生体内に活性酸素種が発生する可能性を示唆している<sup>13,14)</sup>。

d. また尿中バイオピリン値測定の臨床応用への可能性としては、ラットを用いた臓器移植手術の予後に活性酸素種とくにNOの過剰産生による

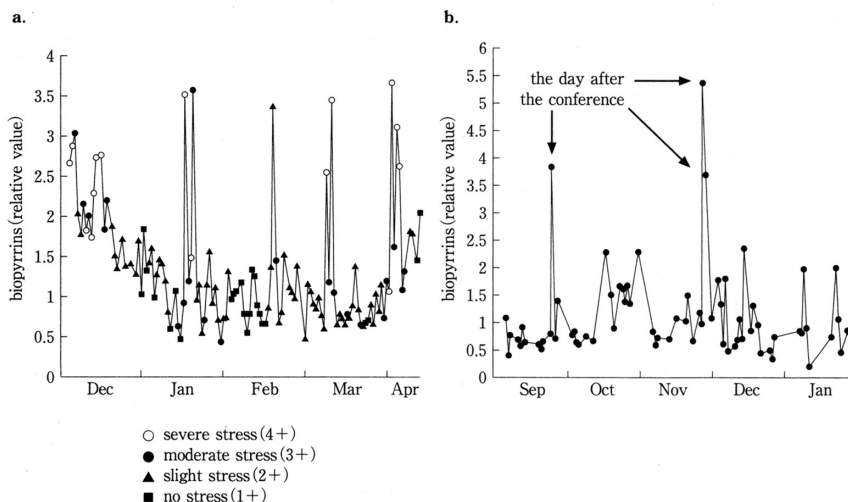


図7 心理的ストレスと尿中バイオピリン濃度との関係  
 a: 被験者の4カ月にわたる自己診断心理的ストレス強度と尿中バイオピリン濃度との関係。(1+) ストレスなし、(2+) 弱いストレス、(3+) 中程度のストレス、(4+) 強いストレス  
 b: 被験者が心理的ストレス・イベントと感じる会議と尿中バイオピリン濃度との関係

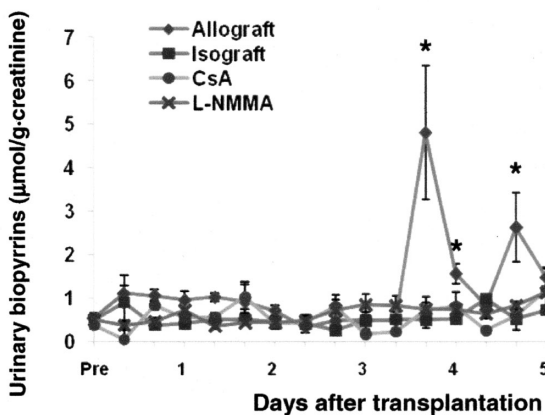


図8 ラットを用いた心臓移植手術後において拒絶反応予測マーカーとしての尿中バイオピリンの動態  
 通常は移植後7日目に拒絶反応が起きる。  
 Allograft: 異系統ラット間での心臓移植で、7日目の拒絶反応が起きるが、既に3日目に尿中バイオピリン値が急激に上昇している。  
 Isograft: 同系統ラット間での心臓移植で、7日目以降にも拒絶反応は起こらず、また尿中バイオピリン値の上昇もみられていない。  
 CsA: 異系統ラット間での心臓移植ではあるが、シクロスポリンA (cyclosporin A) 投与を継続していると、拒絶反応が起こらないとともに尿中バイオピリン値の上昇も観察されていない。  
 L-NMMA: 異系統ラット間での心臓移植ではあるが、術前よりNO合成酵素の阻害剤であるL-NMMA (N<sup>ω</sup>-monomethyl-L-arginine) の投与を継続していると、拒絶反応が起こらないとともに尿中バイオピリン値の上昇も観察されていない。 ★: p<0.05 有意差有り

急激な炎症反応や拒絶反応（術後約7日目）が発生するが、その約3日前に尿中バイオピリンの増加が起きている。このことにより、術後の合併症などの病態発現の予測因子として、尿中バイオピリンの“predictive marker”（予測マーカー）としての応用が今後に期待されている<sup>15,16)</sup>。

#### IV. おわりに

近年、活性酸素やフリーラジカルによる酸化ストレスは、動脈硬化、虚血性脳心血管障害、糖尿病そして癌など、きわめて広範囲の疾患に関与することが明らかにされ、そのメカニズムはかなり詳細にわかってきており活性酸素の関与しない疾患はほとんど無いのではとも言われている。そこで、抗酸化物質による予防治療や健康維持に強い関心が寄せられている。疫学研究でも抗酸化栄養素の摂取が疾病予防に有効であることが示されており、食品中にも多くの抗酸化成分が知られてきている。しかし、健康維持、病気治癒の一助として、何をどれだけ摂取するのが最良かを検定するべき標準的指標（standard index）は無いのが現状である。そこで、個人の適時の生体内レドックス状態を示す standard index としての酸化ストレスマーカーが必要となってくる。ヘム代謝物であるビリルビンは、非常に好都合なことにそれ自身が生体内の強力な低分子抗酸化物質であると同時に、それが体内で酸化されて生成されるバイオピリンは速やかに尿中に排泄されるためリアルタイム型の酸化ストレスマーカーとなりえる。また、外から摂取する抗酸化栄養素と異なり、食事量による変動や日内変動が無いのでビリルビンの血中濃度は通常一定である。ビリルビンは分子内水素結合を形成する特異な分子構造のため、疎水性から親水性への相互変換が可能であり細胞膜の自由な通過により血液循環系に限らず、組織や細胞内にも普遍的に存在する理想的な低分子抗酸化物質である。さらに、ビリルビンは自殺的抗酸化物質であり、酸化されて生成したバイオピリンはビタミンAやC、Eと異なりレドックス循環により還元されてビリルビンには戻らない。したがって、酸化ストレスに応答したビリルビンの酸化は、尿中バイオピリンの正味の増加というシグナルとして現れる。このよう

にビリルビンの低分子抗酸化物質としての多様性は、ある疾患に特異的なバイオピリン、あるいは複数のバイオピリンのプロファイル化によって特定の疾患の鑑別につながるマーカーの開発への可能性を持っている。

#### 文献

- 1) Maines MD: Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical application [Review]. *FASEB J*, 2: 2557-2568, 1994
- 2) Yamaguchi T, Komoda Y, Nakajima H: Biliverdin-IX  $\alpha$  reductase and biliverdin-IX  $\beta$  reductase from human liver: Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 269: 24343-24348, 1994
- 3) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235: 1043-1046, 1987
- 4) Neuzil J, Stocker R: Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for  $\alpha$ -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 269: 16712-16719, 1994
- 5) Shimizu S, Izumi Y, Yamazaki M, Shimizu K, Yamaguchi T, Nakajima H: Anti-bilirubin monoclonal antibody I. Preparation and properties of monoclonal antibodies to covalently coupled bilirubin-albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, 967: 255-260, 1988
- 6) Izumi Y, Yamazaki M, Shimizu S, Shimizu K, Yamaguchi T, Nakajima H: Anti-bilirubin monoclonal antibody II. Enzyme-linked immunosorbent assay for bilirubin fractions by combination of two monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, 967: 261-266, 1988
- 7) Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Komoda Y, Nakajima H: Epitope of 24G7 anti-bilirubin monoclonal antibody. *Biochim. Biophys. Acta*, 1289: 110-114, 1996
- 8) Tsujinaka T, Fujita J, Morimoto T, Ogawa A, Ebisui C, Yana M, Shiozaki H, Monden M, Yamaguchi T, Nakajima H: Increased urinary excretion of bilirubin metabolites in association with hyperbilirubinemia after esophagectomy. *Surg. Today*, 28: 1119-1123, 1998
- 9) Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Nakajima H: Chemical structure of a new family of bile pigments from human urine. *J. Biochem.*, 116: 298-303, 1994
- 10) Keyse SM, Tyrrell RM: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 99-103, 1989
- 11) Yamaguchi T, Hashizume T, Tanaka M, Nakayama

- M, Sugimoto A, Ikeda S, Nakajima H, Horio F: Bilirubin oxidation provoked by endotoxin treatment is suppressed by feeding ascorbic acid. *Eur. J. Biochem.*, 245: 233-240, 1997
- 12) Nakamura M, Fukuchi M, Shioiri H, Sato K, Kitamuro T, Shirato K, Yamaguchi T, Suematsu M, Shibahara S: Increased expression of heme oxygenase 1 and bilirubin accumulation in foam cells of rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 1373-1377, 2001
- 13) Yamaguchi T, Shioji I, Sugimoto A, Yamaoka M: Psychological stress increases bilirubin metabolites in human urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 517-520, 2002
- 14) Miyashita T, Yamaguchi T, Motoyama K, Unno K, Nakano Y, Shimoi K: Social stress increases biopyrrins, oxidative metabolites of bilirubin, in mouse urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349: 775-780, 2006
- 15) Yamamoto M, Maeda H, Hirose N, Radhakrishnsn G, Katare RG, Hayashi Y, Rao P, Lee G-H, Yamaguchi T, Sasaguri S: Bilirubin oxidation provoked by nitric oxide radicals predicts the progression of acute cardiac allograft rejection. *Am. J. Transplant*, 7: 1897-1906, 2007
- 16) Yamamoto M, Maeda H, Hirose N, Yamamoto M, Nakagawa A, Radhakrishnsn G, Katare RG, Sato T, Yamaguchi T, Sasaguri S: Biphasic elevation of bilirubin oxidation during myocardial ischemia reperfusion. *Circ. J.*, 72(9): 1520-1527, 2008