直接 bilirubin に関する研究

第2編　Bilirubin sulfate 分画に関する研究

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂教授）

河　合　利　夫

〔昭和47年9月28日受稿〕

緒　　言

Bilirubin sulfate は，1958年 Isselbacher and McCarthy ら[4][5]により報告され，直接型 bilirubin のうち alkali に安定な非 glucuron 酸抱合型直接 bilirubin として注目され，生体内での存在はかなりの学者[9][10][11][12]によって支持されているが，その本態についてはなお疑問をもつ学者[13]もあり，加えてその直接 bilirubin 中に占める割合或いは，その黄疸を伴う肝疾患時の変動等については，明確にされたとは言い難い．そこで著者はこれらの点を明確にするために以下の点検を行った．

検索対象ならびに方法

実験動物：健康成熟 Wister 系雄性 rat 250～300 g を1群5～8匹として使用した．

実験対象：岡山大学医学部第一内科入院中の各種肝疾患患者で腹腔鏡，肝機能検査，肝生検，剖検などを併用して診断を確定した黄疸を有する急性肝炎5例，肝硬変症5例，閉塞性黄疸5例，計15例の尿について検討した．なお実験開始前数日間は活性SH基を有する薬剤及び glucuron 酸の投与は禁止した．

実験方法

① 胆汁採取法

Rat よりの胆汁の採取は開腹によりポリエチレンチューブを総胆管に挿入し，外胆汁瘻を作り経時的に採取した．詳細は第一編記載のごとくである．

② ^{35}S 投与方法

^{35}S 硫酸ソーダ溶液（ダイナボット研究所製）1 mC.1 mℓを蒸溜水で10倍に稀釈し，50μC (0.5 mℓ) を rat の十二指腸部に開腹により確認しつつ注射器にて注入した．

③ Rat 肝障害法

体重 100 g あたり25％四塩化炭素オリーブ油溶液 0.2 mℓをポリエチレンチューブを用いて Rat に経口的に12指腸部に投与した．

④ 肝機能検査法

血清 bilirubin 値，チモール混濁反応（TTT）Kunkel 氏硫酸亜鉛混濁反応（ZnTT）塩化 Cobalt 反応及びケファリンコレステロール絮状反応（CCF），血清 transaminase (GOT, GPT)・alkaline phosphatase・cholinesterase の活性値・を測定した．なお GOT，GPT は Karmen 単位，alkaline phosphatase は，Bessy-Lowry 単位，cholinesterase は，ΔpH で表現した．

⑤ 粗直接 bilirubin 精製法

⑤-1 胆汁よりの粗直接 bilirubin 精製法

坂本[14]の方法に従い胆汁より粗 bilirubin を精製した．詳細は第一編に記載した通りである．

⑤-2 黄疸尿よりの粗直接 bilirubin 精製法

教室小牟田[15]の方法により黄疸尿を硫安で塩析沪別後 methanol 抽出を行ない減圧乾固し，再び methanol 抽出を行なう過程を繰返し，沪別残渣に硫酸根を認めなくなる迄上記操作を行ったのちえられた黄褐色粉末を粗直接 bilirubin とした．

⑥ Bilirubin 測定法

Jendrassik & Cleghorn 氏変法を用い Leitz 製光電比色計 Model M を用い波長535 mμで測定した．測定に用いた Ehrlich 氏 diazo 試薬の組成などは第一編記載のごとくである．

⑦ Paper chromatography

⑦-1 試料，沪紙：胆汁より精製された粗直接 bilirubin を試料とした．沪紙は Schleicher & Schüll Nr. 2043 a を使用した．

⑦-2 展開並びに展開液

試料を0.5 cm以内の spot 又は band として原点につけ，一次元上昇法により室温下15℃～20℃にて展

開前線が20cm以上上昇するまで展開した．展開液は n-butanol : ethanol : H_2O(4 : 1 : 2)を用いた．

⑧　放射能測定

GMcounter (Geiger-Müller counter, Aloka Model TDC-1 日本無線KK製) を使用して測定した．

Radio chromatogram は Paper chromato scanner (Aloka Model PCS-4 日本無線KK製)を使用し自動的に記録した．詳細は第一編記載のごとくである．

⑨　Radioautogram

粗直接 bilirubin をまず paper chromatography で分画し，えられた paper chromatogram について Fuji 工業用X線フィルム non-screen type 200を用い作成した．詳細は第一編記載の通りである．

⑩　硫酸根の測定法

Weber & Schalm[3]の方法に倣い測定した．即ち粗直接 bilirubin を0.1N, NaOH150mℓに溶解し，30分間室温下暗室に放置後6 NHClにてpH 2に調製し，chloroform 180mℓを加え振盪混和後4500回転5分間遠沈し，分離させた chloroform 層を 0.1N HClにて2回洗滌した後蒸発乾固し，残渣を0.1N NaOH1.5mℓに溶解し，更に水6.5mℓを加え12NHClで1 NHClにした後90分間沸騰水で加水分解を行ない，冷却後5 NNaOHにてpH 2.5まで中和し，沪液が透明になるまで遠沈沪別し，沪液に10% $BaCl_2$ 0.3mℓを添加，5分間沸騰後5時間放置し，遠沈して得られた沈渣を0.01NHClにて1回洗滌し，遠沈して得られた沈渣を glycerol : H_2O(1 : 1)5mℓにて十分に混和後 Leitz製光電比色計 Model Mを用い波長470mμ にて濁度を測定した．硫酸根の標準曲線の作製には硫酸ソーダ1% 100 mℓに $BaCl_2$を十分加え $BaSO_4$ を沈澱させ，精製された $BaSO_4$ 量を算出しそれぞれ0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ……10迄のmg%のもののを調整して用いた．

実験成績

①　正常 rat における胆汁中^{35}S排泄曲線

^{35}S硫酸ソーダの腸管からの吸収及び肝臓からの排泄状態を検討する目的で^{35}S注入後外胆汁瘻より分割採取した胆汁について検討した．

胆汁中への 排泄は ^{35}Sを腸管内に注入後5～6分で始まり急激に増加，^{35}S注入後50分で1分あたりの^{35}S排泄量は最高値となり以後減少し，5時間で殆んど一定状態となった．(図1，図2)

Fig. 1　Excretion curve of ^{35}S in bile after injection of ^{35}S sodium sulfate into duodenum of rat

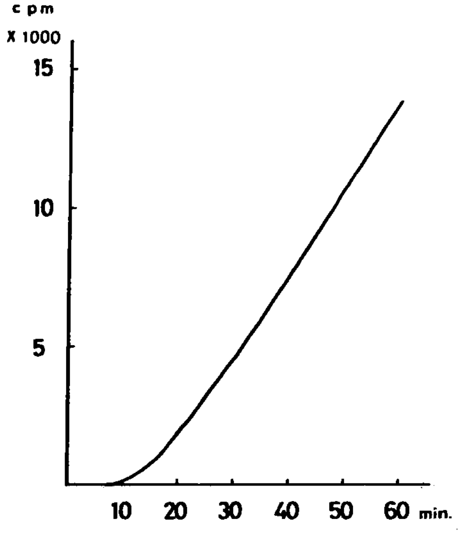
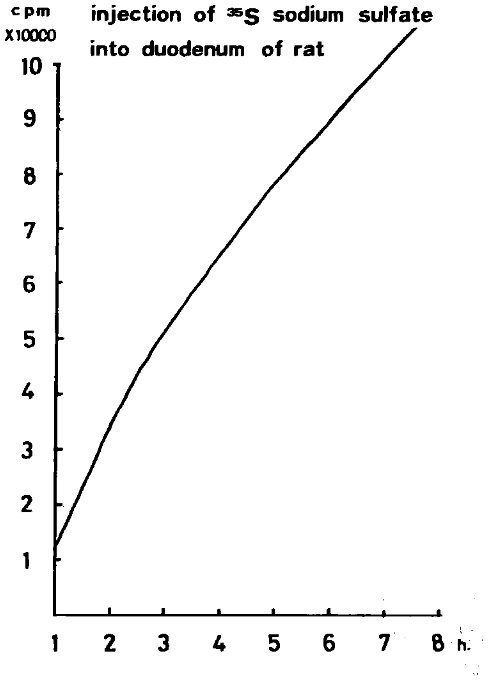


Fig. 2　Excretion curve of ^{35}S in bile after injection of ^{35}S sodium sulfate into duodenum of rat



^{35}S腸管注入後8時間迄で^{35}S注入量の42.1±5.7%が胆汁中に排泄された．又0～5時間迄の胆汁を採取し実験に供したが，これは rat 腸管負荷^{35}Sの29.8±2.4%にあたり8時間迄の排泄量の71.1±5.3%であたる．

② 四塩化炭素肝障害 rat に^{35}S投与した場合の胆汁中^{35}S排泄量の変化

四塩化炭素肝障害 rat の肝機能検査を経時的に行なった成績は表 2, 3 のごとくであった.

つぎに四塩化炭素肝障害後12, 24, 48, 96時間の胆汁を各時点にて5時間採取し, 排泄^{35}S活性を測定し正常 rat 群と比較検討した. なお^{35}S注入は四塩化炭素投与後12, 24, 48, 96時間の時点で, それぞれ1回腸管内に注入した.

その結果正常 rat では 33,900 ～ 64,200 平均51,500 count/min, 障害後12時間では 23,600 ～ 34,000 平均29,300 count/min, 24時間後では 15,900 ～ 54,100 平均37,000count/min, 48時間後では 37,500 ～ 87,600 平均63,000count/min, 96時間後では 88,400 ～ 90,400 平均89,400count/min であった.(図7) また, 採取された胆汁より粗 bilirubin を精製し,その bilirubin 量と^{35}S量の割合を測定すると正常 rat では 23,500 ～ 103,100 平均51,400count/mg, 障害後12時間で 13,400 ～ 24,900 平均19,000count/mg, 24時間後で 12,100 ～ 55,400 平均31,700count/mg, 48時間で 42,000 ～ 125,100 平均76,900count/mg, 96時間で 160,100 ～ 174,900 平均 167,500count/mg であった.(図8)

③ 胆汁中^{35}Sの分布

粗直接 bilirubin の精製過程での^{35}Sの分布は胆汁中に含まれる放射能を100%とした場合,硫安塩析後の沪液中に 4.7%が, methanol 抽出後の残渣中に 7.3%が認められた. 粗直接 bilirubin 中の^{35}S含有率は残りの88.0%であった.(表1)

④ ^{35}S負荷 rat 胆汁中 bilirubin の paper chromatogram とその radioautogram と radiochromatogram

Rat 胆汁中直接 bilirubin の paper chromatogram は (図3) の如く展開前線より第1, 第2, 第3の3 spot に分かれ各 Rf 値は第1 spot 0.32 ～ 0.41第2 spot 0.20 ～0.25, 第3 spot

Table 1 Distribution of ^{35}S-activity in various steps

Step Experiment	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	Average
Bile	%	100%	%	%	%	100%
Filtrate	4.5	6.2	4.2	4.5	4.1	4.7
Residue after methanol extraction	6.0	8.3	7.3	7.2	7.7	7.3
Crude bilirubin	89.5	85.5	88.5	88.3	88.2	88.0

Fig.3 Paper chromatogram of conjugated bilirubin in rat bile and its radioautogram

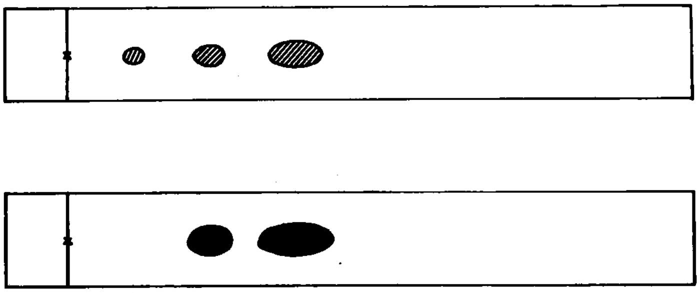
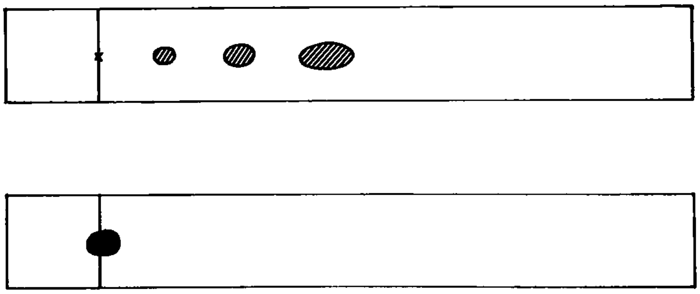


Fig.4 Paper chromatogram of conjugated bilirubin in rat bile and its radioautogram



0.09~0.12であった.

つぎにその paper chromatogram について radioautography を行なってみると第1，第2 spot に相当する部分に放射活性による感光部を認めた.(図3)その他の部分には感光部は認められなかった. 対照として5mlの rat 胆汁に^{35}S を 5 μc/ml硫酸ソーダ溶液として1滴混合し,上記同様に paper chromatogram 並びにその radioautogram を作製したところ，放射活性は原点に止まり，上昇は認められなかった.(図4)

さらに上記の paper chromatogram を用い radiochromatogram を作製した結果は，radioautography と同様で rat 胆汁中の直接 bilirubin を用いた場合には第1 spot, 第2 spot に相当する部位に放射活性の山を認めた.(図5)一方対照実験では原点にのみ放射活性の山が認められた.(図6)

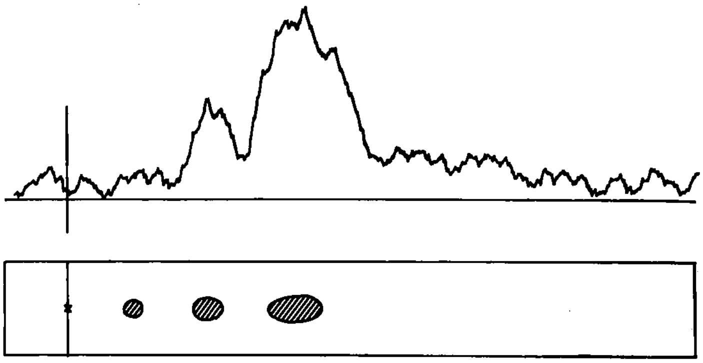
Table 2　Liver function of rats with carbon tetrachloride liver injury

CCl_4 injury	No.	TTT (M.U.)	ZnTT Kunkel U.	CO	CCF
0 h.	1	1.1	1.6	R_2	+
	2	0.8	1.6	R_2	++
	3	1.1	1.6	R_2	+~++
12 h.	1	1.4	6.5	$R_{3\sim4}$	++
	2	1.4	6.5	R_4	++
	3	1.6	2.5	R_4	++
24 h.	1	1.6	2.5	R_1	++
	2	1.6	6.3	$R_{3\sim4}$	++
	3	2.2	5.2	R_3	++
48 h.	1	2.5	7.7	R_5	++
	2	1.4	5.7	R_4	+~++
	3	2.8	5.2	R_4	+~++

Table 3　Liver function of rats with carbon tetrachloride liver injury

CCl_4 injury	No.	GOT KarmenU.	GPT KarmenU.	S Bilirubin mg% T.	D.	Al-p.ase BodanskyU.	Choline E (ΔpH)
0 h.	1	150	35	0.20	0.12	9.2	0.59
	2	81	60	0.39	0.20	8.1	0.62
	3	95	70	0.15	0.09	8.5	0.61
12 h.	1	1800	2000	0.20	0.10		0.57
	2	1800	2100				0.63
	3	1850	2080	0.40	0.30	9.2	0.61
24 h.	1	1780	1750			9.0	0.57
	2	1800	2200	0.43	0.32	7.8	0.55
	3	1800	2100	0.35	0.32		
48 h.	1	1750	2200				0.57
	2	1800	2080	0.43	0.32		0.59
	3	1680	2180	0.32	0.25	9.0	0.57

Fig.5 Paper chromatogram of conjugated bilirubin in rat bile and its radiochromatogram



⑤ 肝疾患患者黄疸尿中の bilirubin sulfate 量について

黄疸尿より精製された粗 bilirubin より Weber & Schalm の方法[13]で硫酸根を測定した結果は表4のごとくであった.

各疾患において直接型 bilirubin 中にしめる硫酸根の重量比は急性肝炎1.82~0.48%平均1.02% 肝硬変症1.83~0.47%平均1.12%機械性黄疸1.43%~0.38%平均0.94%となり，この値は，bilirubin mono sulfate とした場合，それぞれ直接型 bilirubin の 10.01~2.64% 平均5.61% 10.06~2.59%平均6.16%7.87~2.09%平均5.17%であった.

⑥ 肝疾患患者黄疸尿中 bilirubin sulfate 量と肝機能検査成績

⑥-1 血清 bilirubin と bilirubin sulfate (図9)

血清 bilirubin 濃度と

直接 bilirubin に対する bilirubin sulfate 含有率との間には一定した関係は総bilirubinでも直接 bilirubin を対象とした時でも認められなかった.

⑥-2 血清GPTと bilirubin sulfate (図10)

GPTの上昇度と直接 bilirubin 中の bilirubin sulfate の含有率との間には一定した関係は認められなかった.

⑥-3 膠質反応と bilirubin sulfate (図11. 12)

TTT, ZnTTとの間にはやや相関があるかに見えたが前者とは相関係数−0.27, 後者とは−0.46であり危険率前者で10%以上, 後者で5%以上10%以下となりやや後者との相関があると考えられた.

Fig.6 Paper chromatogram of conjugated bilirubin in rat bile and its radiochromatogram

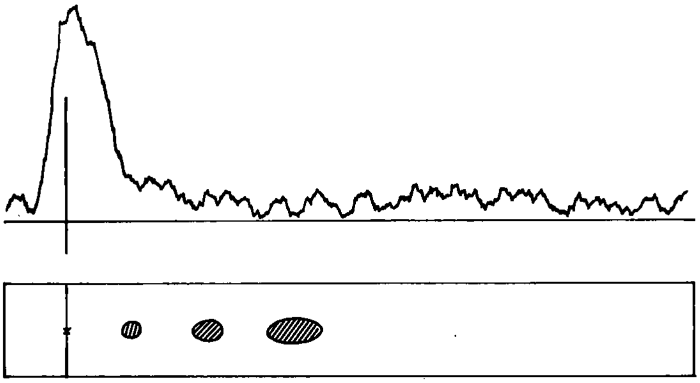
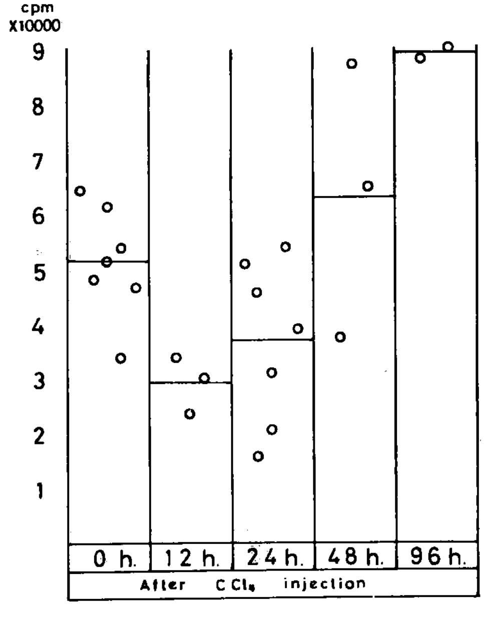


Table 4 Amount of SO_4^{--} in Amount of SO_4 in urinary bilirubin

	No.	Direct bilirubin	Indirect bilirubin	Salt-form bilirubin	SO_4^{--}	SO_4^{--}/Direct bilirubin
Acute hepatitis	1	8.1mg	0.62mg	2.03mg	0.14mg	1.82%
	2	10.7	0.85	1.89	0.11	1.04
	3	18.7	1.53	3.90	0.10	0.56
	4	19.9	1.45	2.48	0.09	0.48
	5	20.2	1.85	3.80	0.24	1.20
Liver cirrhosis	1	15.3	1.20	7.42	0.20	1.83
	2	12.4	0.89	5.28	0.18	1.45
	3	8.8	0.52	1.20	0.04	0.47
	4	21.5	1.93	5.94	0.18	0.85
	5	14.0	1.05	6.02	0.14	0.98
Obstructive jaundice	1	30.4	2.60	8.20	0.43	1.43
	2	28.6	2.02	6.34	0.34	1.20
	3	23.4	1.65	4.58	0.13	0.56
	4	32.0	2.02	5.00	0.12	0.38
	5	41.5	4.11	9.82	0.48	1.15

Fig.7 Amount of ^{35}S activity excreted in rat bile



⑥-4 Alkaline phosphatase と bilirubin sulfate (図13)

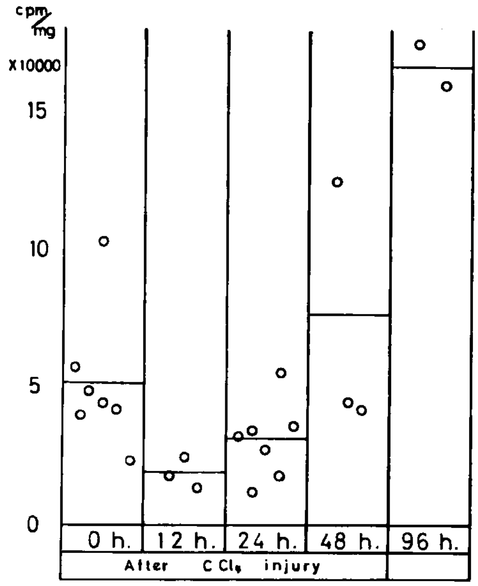
Alkaline phosphatase と, 直接 bilirubin 中の bilirubin sulfate 含有率との間には,一定した関係は認められなかった.

総括並びに考按

Bilirubin sulfate は Isselbacher & Mc Carthy[1] によって始めて発見され, ついで bilirubin sulfate についても色々と議論がある. 猫[2] rat[1] dog[11] 人[11][13] では存在することが確かめられている. しかし硫酸根が bilirubin と結合する部位については異論があり, 初め Isselbacher[2] らは β-glucu-

ronidase を用いた実験結果から bilirubin の α 位の両端の O H基に sulfate 結合しているとしたが，その後 Noir[12] 等はN H基に sulfate 結合し，disulfate であり，胆汁へ bilirubin glucuronide と共に排泄されるとした．一方 Weber & Schalm[13] はbilirubin sulfate 自体には明らかな分析的並びに化学的特性を示した文献がなく，alkali stable bilirubin がすなわち bilirubin sulfate であるとは言

Fig.8 ^{35}S activity of conjugated bilirubin per 1mg of bilirubin in rat bile

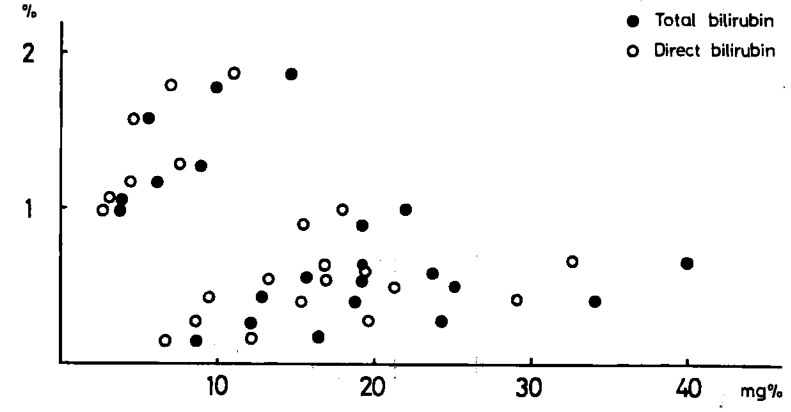


えないこと，alkali stable bilirubin の量は極めて少量であること，人体内では血清成分と胆汁または pigment II との結合によって alkali stable bilirubin が生成されることをあげ，bilirubin sulfate の臨床的意義について否定的見解をとっている．

そこで著者は，まず $Na_2{}^{35}SO_4$ を rat の腸管内に負荷し，予め作製した胆汁瘻より採取し得られた胆汁中 bilirubin への $^{35}SO_4$ の排泄を経時的に測定したところ負荷後 5 ～ 6 分という短時間で既に $^{35}SO_4^{--}$ は胆汁中に出現し，しかも胆汁中に排泄される $^{35}SO_4^{--}$ の88％が bilirubin 分画にみとめられた．Isselbacher[4)5)] らも $^{35}SO_4^{--}$ を経口投与し，すみやかに胆汁中に radio activity を証明したことを報告している．つぎに bilirubin 分画について paper chromatography を行ってえられる 3 つの spot について見ると第 1 並びに第 2 spot に一致して $^{35}SO_4^{--}$ の分配を証明し，その部位に bilirubin と sulfate 結合した bilirubin を証明した．

この第 1，第 2 spot は所謂 pigment II の spot に一致し，Watson ら[11] が pigment II 分画中に bilirubin sulfate が存在することを認めた成績に一致した．ところで pigment II 分画中に証明される事実として Weber[13] らは bilirubin と glucuron 酸及び sulfate の結合物の存在が考えるとし，この可能性を morphine の例をあげ示唆しており，この形のものが存在すれば当然 pigment II と同一分配することを説明する上で極めて有利で，この場合 glucuron 酸と sulfate の結合物のみと考えると bilirubin sulfate は所謂 alkali stable の直接 bilirubin であるから bilirubin と glucuron 酸及び sulfate の両者との結合物の存在の可能性が残るが Schoenfield[17] らが β-glucuronidase を用いて検討したところでは bilirubin glucuronide と bilirubin sulfate とは paper chromatogram 上で分配を異にしており上記の可能性は否定されよう．ところで Schoenfield[17] らは rat に CCl_4 による肝障害をおこさせ

Fig.9 Relation between serum bilirubin and bilirubin sulfate



て bilirubin sulfate 分画の消長を検討したところ，その分画が増加することを認めた，著者の検討では，CCl₄ による障害後12〜24時間ではむしろ正常時より減少し48〜96時間で増加することを認めており，第1番で明らかにした bilirubin phosphate の消長を異にしており注目される．さらに臨床例について Weber & Schalm[13] 法を用いて bilirubin sulfate を測定し，その消長と肝機能検査成績との相関を検討したところ，血清GPT，alkaline phosphatase 活性値との相関は認め難く，膠質反応中ZnTTとやや相関するかに見えたが危険率5％以上であり，bilirubin glucuronide とは異なる成績であった．また急性肝炎，肝硬変症，機械性黄疸における総直接 bilirubin に対する bilirubin sulfate 分画の占有率は疾患別に差が認められなかった．この成績は Gregory & Watson[11] や Weber & Schalm[13] は bilirubin sulfate は成人において臨床的に有意義ではないとする成績を支持するように思われた．

以上の結果より bilirubin sulfate は Isselbacher らの報告の

Fig.10 Relation between serum G P T and bilirubin sulfate

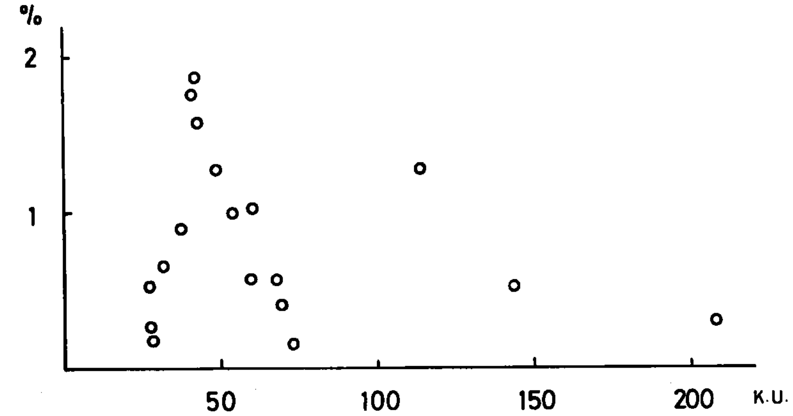


Fig.11 Relaton between T T T and bilirubin sulfate

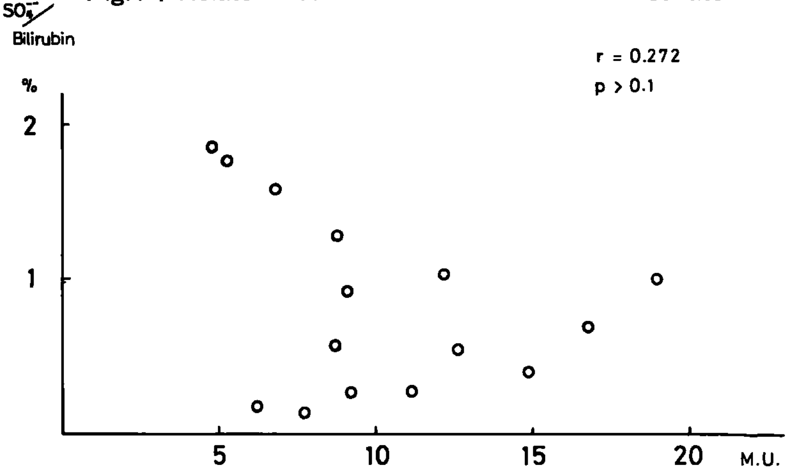


Fig.12 Relation between Zn T T and bilirubin sulfate

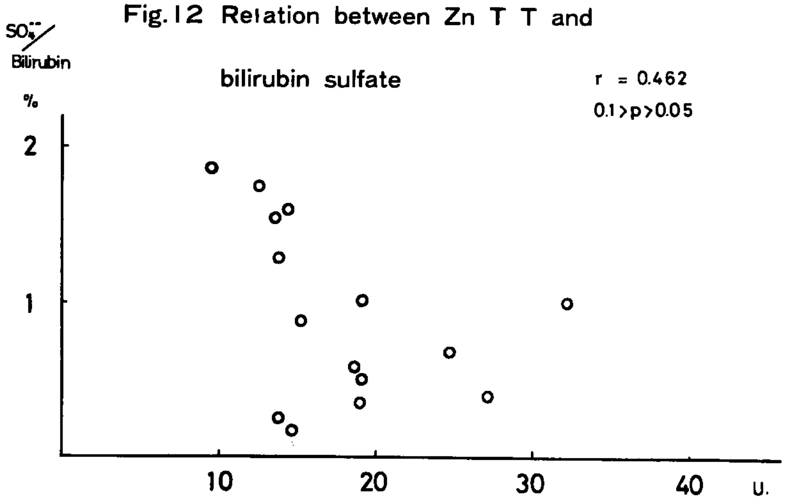
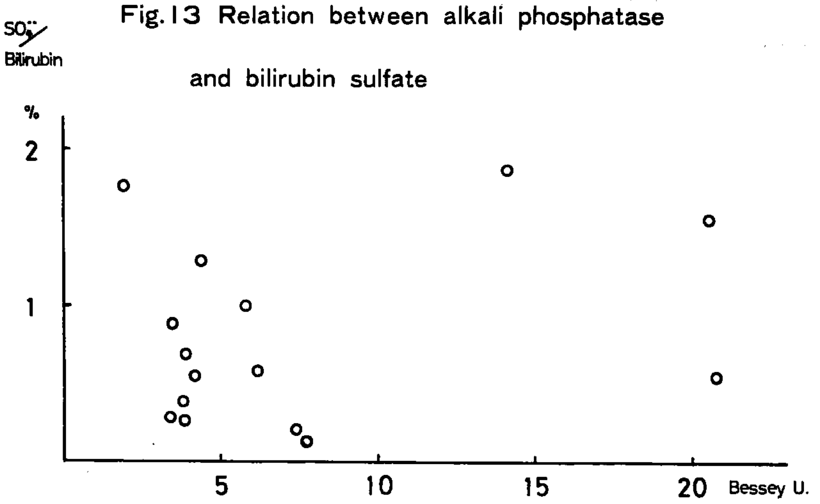


Fig. 13 Relation between alkali phosphatase and bilirubin sulfate



ごとく rat 並びに人ではみとめられた．黄疸尿中より分離した直接 bilirubin 中にしめるその量は bilirubin mono sulfate として算出すると直接 bilirubin の最高10％程度で，Isselbacher, Watson らの10～15％よりやや少い成績であり Noir のいう如く bilirubin disulfate であるとすれば直接 bilirubin の最高５％程度となる．

結　　論

^{35}S-sodium sulfate を rat 十二指腸内に負荷し外胆汁瘻を作成し，採取した胆汁について bilirubin sulfate の存在を検討すると共に急性肝炎，肝硬変症，機械性黄疸例の黄疸尿を用い Schalm & Weber の硫酸根測定法により bilirubin sulfate の臨床的意義についても検討し下記の成績をえた．

1) ^{35}S-sodium sulfate を rat の十二指腸内に負荷し ^{35}S 活性の胆汁中への移行をみると負荷後５～６分よりみとめられ以後８時間迄に投与 ^{35}S 放射活性の42.1％がみとめられた．

2) ^{35}S 活性は rat 胆汁の（粗直接）bilirubin 分画に88％認められた．

3) Paper chromatography により粗直接型 bilirubin 分画を分離し，その radio autogram, radio chromatogram から Rf 0.32～0.41, 0.20～0.25の２spot に一致して ^{35}S 活性が認められた．一方直接 bilirubin と $^{35}SO_4$ とを混合して paper chromatography を行なうと ^{35}S 放射活性は原点にとどまった．

4) Rat の四塩化炭素肝障害時では急性肝実質障害の高度な負荷後12時間では減少し以後増加の傾向が認められた．

5) 臨床例で肝機能検査成績と bilirubin sulfate の直接 bilirubin に占める率との相関を検討したところでは血清反応との間には有意な相関は認められず血清 trans aminase, alkali 性 phosphatase 活性並びに血清総 bilirubin 量，直接 bilirubin 量との間にも一定の相関は認められなかった．

6) Bilirubin sulfate の黄疸尿中の直接 bilirubin 中に占める割合は胆汁中では，bilirubin mono sulfate として測定した場合，平均5.98％（2.09～10.01％）であった．

稿を終るに当り，御指導を賜った近藤忠亮講師に深く感謝致します．

文　　献

1）Billing, B.H. : J. Clin. Path. 8 : 126, 1955
2）Talafant, E.D. : Nature, 178, 312, 1956
3）Schmid, R.: J. Biol Chem., 229, 881, 1957
4）Isselbacher, K.J. and McCarthy, E.A. : J. Clin. Invest., 38 : 645, 1959
5）Isselbacher, K.J. and McCarthy, E.A. : Biochim. Bilphys. Acta, 29 : 658, 1958
6）小坂淳夫：東京医事新誌67：14, 1950
7）近藤忠亮：医学研究，29：1130, 1959
8）河合利夫：未発表
9）Schoenfield, L.J. Grindlay, J.H., Foulk, W. T. and Bollman, J.L. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med, 106 : 438, 1961
10）Ostrow, J.D, Hammaker, L, and Schmid. R.

: J. Clin. Invest. 40 : 1442, 1961
11) Gregory, C.H. and Watson, C.J. : Lab, and Clin. Med. 60 : 17, 1962
12) Noir, B.A. Groszman, R.J. and Walz, A.T. : Biochim. Biophys, Acta, 117 : 297, 1966
13) Weber, A.P. and Schalm, L. : Acta Med, Scand. 177 : 519, 1965
14) Sakamoto, T. : Acta Med. Okayama, 10 : 30, 1956
15) 小牟田清敦：医学研究, 29 : 2778, 1959
16) 原嘉之：医学研究, 22 : 70, 1952
17) Schoenfield, L.T. Bollman, J.L. and Hoffman H.N. : J. Clin, Invent. 41 : 133, 1962

Studies on direct bilirubin

Part 2. Studies on bilirubin sulfate fraction

The first department of internal medicine, Okayama university medical school (Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

Toshio KAWAI

The bile was collected from the rat external bile fistula after the duodenal administration of ^{35}S-sodium sulfate. The exsistence of bilirubin sulfate in the bile was studied. Also clinical significance of bilirubin sulfate was studied useing jaundiced urine obtained from the patients with acute hepatitis, liver cirrhosis and obstructive jaundice. The amount of sulfate was measured by Weber & Schalm's method. The results were as follows :

1) Appearance of ^{35}S-radioactivity into the rat bile was found from 5 to 6 minutes after the duodenal administration of ^{35}S-sodium sulfate. The total amount of radioactivity up to 8 hours was 42.1% of given ^{35}S-radioactivity.

2) Crude direct bilirubin fraction obtained from the rat bile contained 88% of total bile radioactivity.

3) Crude direct bilirubin was fractionated with paper chromatography, then ^{35}S-radioactivity was dectected with radioautogram and radio chromatogram obtained from the paper chromatogram. The ^{35}S-radioactivity was found at two spots of Rf 0.32—0.41 and 0.20—0.25. The radioactivity was localized at the original spots of paper chromatogram obtained from the mixture of direct bilirubin and ^{35}S-sodium sulfate.

4) Amount of bilirubin sulfate decreased at 12 hours when the liver parenchyma was highly damaged after acute carbon tetrachloride poisoning, then increased.

5) No significant corelation was found among the ratio of bilirubin sulfate to direct bilirubin and non-specific colloid reactions, serum transaminases, alkaline phosphatase, total bilirubin and direct bilirubin.

6) Bilirubin sulfate obtained from the jaundiced urine was ranged from 2.09 to 10.0% of the direct bilirubin and averaged 5.98% when bilirubin sulfate was caliculated as bilirubin monosulfate.