

胆 汁 色 素 に 関 する 研 究

第 1 編

機械性黄疸患者尿より分離された Ester 型並びに塩型直接

Bilirubin と Glucuron 酸との関係に就いて

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

物 部 大 成

〔昭和 34 年 8 月 7 日受稿〕

緒 言

1916年 van den Bergh 並びに Müller¹⁾ が血清 bilirubin の diazo 反応に直接並びに間接及応のあることを提唱して以来, その本態に就いては多数の報告がされて来たが, 最右の解明を与えるものはなかつた. 教室小坂²⁾ は生体内直接 bilirubin を 5% の methanol 性加里を用いて沸騰水中で鹼化し, 或いは酸による加水分解を行い, 間接 bilirubin に変化することに成功した結果直接 bilirubin は中間 methylene 基を挟んで β 位に対照的に存在する propion 酸基が ester 又は alkali 塩の状態にあり, 間接 bilirubin は酸基遊離の状態にあるとした. 原³⁾ は小坂の鹼化法を応用して chloroform 抽出に依る bilirubin 3 分割の定量法を案出し, 尿中に於ける各 bilirubin 分割の分配状態並びに消長を明らかにし, 尿中の bilirubin は殆んど ester 型で, 塩型がこれに次ぎ, 二塩基酸のものは極く微量であることを証明した. 次いで島田⁴⁾ は silica gel による column chromatography を用いて犬の胆嚢胆汁より始めて 3 分割を分離し, 続いて坂本, 八幡並びに近藤等⁵⁾⁶⁾ は ion 交換 chromatography を用い胆嚢胆汁並びに黄疸尿から bilirubin を殆んど失うことなく各分割に分離することに成功した. これ等の分離法により得られた各分割の性状は詳細に検討され, 直接 bilirubin の本態に関する山岡等⁷⁾ の説の妥当なる事が立証された. しかるに最近 Billing, Cole, 並びに Lathe⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ は胆汁及び機械性黄疸患者の血清並びに尿中から逆相分配 chromatography を用い, diazo 直接反応を呈する 2 つの物質, Pigment I 並びに II, を分離し, 更に Billing¹¹⁾ は機械性黄疸患者の血清に ethanol 次いで diazo 試薬

を加えたものから, 上記 chromatography を用い 2 つの azo 色素, Pigment A 並びに B を分離し間接 bilirubin から Pigment A のみを, Pigment I から Pigment A 並びに B 両者を, Pigment II から Pigment B のみを生じたと報告した. 更に進んで Billing 並びに Lathe¹²⁾¹³⁾ は正常胆汁に sulfanil 酸の代りに aniline を用いた diazo 試薬を加えたものから一連の向流分散法を用いて Pigment B を分離し, Pigment B は Pigment A 並びに glucuron 酸各 1 分子より構成されており, β -glucuronidase の作用を受ける事, 及び alkali labile であるという理由のもとに Pigment B は Pigment A の carboxyl 基に於ける ester glucuronide であるとした. 更に Pigment II はそれから Pigment B のみを生ずることから間接 bilirubin の diglucuronide であり, Pigment I はそれから Pigment A 並びに B 両者を生ずることから間接 bilirubin の monoglucuronide であるとした. 同時に Schmid¹⁴⁾ も胆汁及び機械性黄疸患者の血清並びに尿に diazo 試薬を加えたものから Paperchromatography により Pigment B を分離し同じく Billing 等の glucuronide 説を支持したが, 塩酸による加水分解の態度から glucuron 酸との結合は bilirubin の α, α' -hydroxyl 基に於ける ether 結合であるとした. 更に Talafant¹⁵⁾ も胆嚢から Paperelectrophoresis により直接 bilirubin を分離し, 直接 bilirubin は ester glucuronide であるとし, 又 electrophoretic mobility を直接 bilirubin の特性の一つにかかげた. その後 Schmid¹⁶⁾ 並びに Grodsky 等¹⁷⁾ は結晶 bilirubin にモルモット又は鼠の肝 homogenate 及び煮沸肝抽出物又は uridine diphosphate glucuronic acid を加えて培養すると bilirubin glucuronide が

合成されるとなし、肝の microsome 中に uridine diphosphate glucuronic acid から glucuron 酸を間接 bilirubin に移転する酵素系が有ると発表した。そこで以上を参考にして小坂を始めとする教室の業績と Billing その他の bilirubin glucuronide に関する一連の文献を参照し比較するとき、直接 bilirubin の本態に関して両者の間に大きな見解の相違を見るのである。即ち Billing 等は直接 bilirubin は $1/10$ 規定の苛性曹達にて速やかに加水分解されて間接 bilirubin となるとするに反して、小坂等は直接 bilirubin は 5% の methanol 性加里中で炭酸瓦斯通気のもとに 4 分間煮沸して始めて鹼化され間接 bilirubin となり、鹼化に用いた苛性加里及び alcohol での単独作用では斯る変化は起らないとし、又同じ肝組織培養実験に於いても Schmid 等は間接 bilirubin glucuronide が合成されたとするに反し、早くから小坂に所謂 ester 型 bilirubin を生ずると述べている。そこで両者の見解の相違を明らかにする一端として、先ず Billing 等の報告の如く生体内にはたして bilirubin glucuronide が存在するかどうか、又直接 bilirubin は悉く glucuronide であるかどうかを検討するために機械性黄疸患者尿を用い従来教室で発表された直接 bilirubin 分離法により得られた ester 型並びに塩型直接 bilirubin に就き glucuron 酸との関係を検討した。

実験方法

1. 実験材料

1. 1. 粗天然 bilirubin 調製法

1 週間以上 glucuron 酸製剤の投与を中止した機械性黄疸患者尿を用い、岩田¹⁸⁾並びに坂本の方法¹⁹⁾に倣い調製⁸⁾した。

1. 2. 塩型直接 bilirubin 調製法

岩田の方法並びに坂本の ion 交換 chromatography 法⁵⁾を用いて分離した。

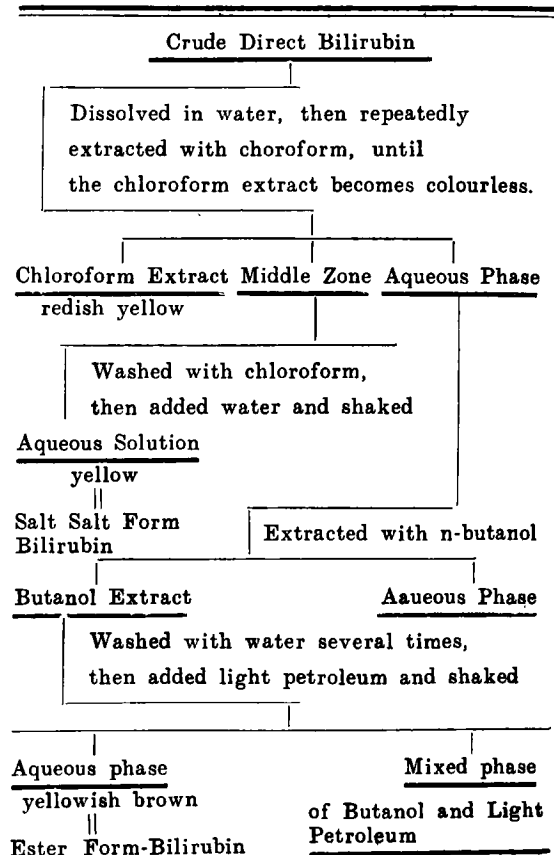
1. 3. ester 型直接 bilirubin 調製法

上記の ion 交換 chromatography 法⁵⁾並びに小坂の沈澱法¹⁹⁾を用いて分離した。

1. 4. butanol 抽出による直接 bilirubin 調製法

Table I に示す如き操作により調製した。即ち粗天然 bilirubin を水に溶解し、次いで chloroform で色素の抽出を認めなくなる迄洗滌し、残部の水層に少量の butanol を加えて振盪すると、黄褐色色素の大部分が butanol 層に移行す。この butanol 層を数回軽く水洗し、8~10倍容量の light petroleum

Table 1.



と共に振盪すると、butanol 中に含まれている飽和水は離れて水層と butanol-light petroleum 混液層とに分れ黄褐色色素は水層に移行する。この黄褐色水溶液を試料に用いた。

1. 5. Ehrlich 氏 diazo 試薬

sulfanil 酸 1 g 及び 15 ml の濃塩酸を 1000 ml の水に溶解したものを I 液とし、0.5% 亜硝酸水溶液を II 液とし、用に臨み I 液 10 ml に対し II 液 0.3 ml を混じ、混液は調製後 5 分以内に使用した。

2. 実験方法

2. 1. 直接 bilirubin の加水分解

原の方法³⁾に従い直接 bilirubin 水溶液に同量の $1/10$ 規定塩酸を加え、これに chloroform を加えて振盪抽出を行つた。

2. 2. 直接 bilirubin の鹼化

小坂の方法²⁾に従い、直接 bilirubin 水溶液に倍量の 5% の methanol 性加里を加え、炭酸瓦斯を通じながら重湯煎上で 4 分間熱し、次いで冷却後試料の $1/5$ 量の氷醋酸を加えて中和し、更に chloroform を加えて振盪抽出を行つた。

2. 3. bilirubin の定量

Jendrassik & Cleghon 法²⁰⁾ により測定した。

2. 4. glucuron 酸同定法

hexuron 酸に対しては naphthoresorcinol 反応²¹⁾, glucuron 酸に対しては mannose-H₂SO₄-thioglycolate 反応²²⁾ により同定した。

2. 5. glucuron 酸の定量

Fishman の naphthoresorcinol 法²¹⁾ により測定した。

2. 6. 吸収曲線測定法

D. K 型 Beckman 自記分光光度計を用いた。

2. 7. Paperchromatography

2. 7. 1. 濾紙

Karl Schleicher & Schüll 会社製濾紙 Nr. 2043 a を用い、濾紙は巾 5 cm 長さ 40 cm の strip として使用した。

2. 7. 2. 展開

濾紙の下縁から 5 cm の所に試料を 0.5 cm 以内の spot として、或いは帯状に附着させ予め少量の展開剤を入れた内径 10 cm, 高さ 45 cm の硝子円筒内に数時間展開剤蒸気で濾紙を飽和させた後、展開剤を濾紙の下端が約 1 cm 浸る程度迄追加して硝子円筒を気密に保つた儘暗所で展開した。展開は 12~14°C の室温下に行い、展開前線が 30~35 cm 上昇した後濾紙を取り出し、spot の場合は 38°C 恒温器中で乾燥させ、帯状の場合は 50% ethanol 水で濾紙が乾燥しない内に手早く色素の抽出を行つた。直接 bilirubin の展開剤としては種々検討した結果 n-butanol-ethanol-water (4 : 1 : 2)¹⁹⁾ 並びに n-propanol-water (4 : 1) が最もよく、amino 酸には sec-butanol-formic acid-water (15 : 3 : 2)²³⁾, 糖並びに uron 酸には Pyridine-ethyl acetate-acetic acid-water (5 : 5 : 1 : 3)²⁴⁾ を使用した。

2. 7. 3. 分別帯の検出

2. 7. 3. 1. bilirubin の呈色

2. 7. 3. 1. 1. Ehrlich 氏 Van den Bergh 氏反応

Ehrlich 氏 diazo 試薬を噴霧後赤紫色斑の発現を認めるものを直接反応陽性とし、更に caffeine 混液を加えた後始めて斯る呈色を認めるものを間接反応とした。

2. 7. 3. 1. 2. Gmelin 反応

風乾濾紙に gmelin 試薬を噴霧すると bilirubin 存在部に紫青色斑が発現する。

2. 7. 3. 2. urobilin の検出

風乾濾紙を紫外線下に検すると urobilin 存在部

位に淡緑黄色の螢光を発し、この部に Schlesinger 氏試薬を噴霧すると前記螢光が増強される。

2. 7. 3. 3. urobilinogen の検出

Ehrlich 氏 aldehyde 試薬を噴霧すると赤色斑を生ずる。

2. 7. 3. 4. amino 酸の検出

直接 bilirubin 水溶液に同量の濃塩酸を加え 100°C, 16時間共栓付試験管中で加水分解したものを脱塩し、更に濃縮して Paperchromatography に用いた。

ninhydrin 反応

0.2% ninhydrin の 80% acetone 溶液を噴霧後 80°C 前後に数分間加熱すると青色斑を生ずる。

2. 7. 3. 5. 糖及び uron 酸の検出

直接 bilirubin 水溶液に同量の 2 規定塩酸を加え 100°C 1時間共栓付試験管中で加水分解したものを脱塩し、更に濃縮して Paperchromatography に用いた。glucuron 酸標準液は glucuronolactone を 1/10 規定苛性曹達に溶解し後同規定の塩酸で中和したものをを用いた。

糖一般に対して、

2. 7. 3. 5. 1. benzidine 反応

Horrocks の benzidine 試薬²⁵⁾ を噴霧後 105°C に 15分間加熱すると褐色斑を生ずるものを陽性とした。

2. 7. 3. 5. 2. aniline hydrogen phthalate 法

Partridge の aniline hydrogen Phthalate 試薬²⁶⁾ を噴霧後 105°C に 5分間加熱して褐色斑を生じたものを陽性とした。

uron 酸に対して

2. 7. 3. 5. 3. naphthoresorcinol 反応²⁷⁾

0.2% naphthoresorcinol ethanol 溶液に 1/10 容量の正燐酸を加えたものを噴霧し、70~80°C の蒸気中で 10~15分間加熱し青色又は紫色斑を生ずるものを陽性とした。

2. 8. Column chromatography

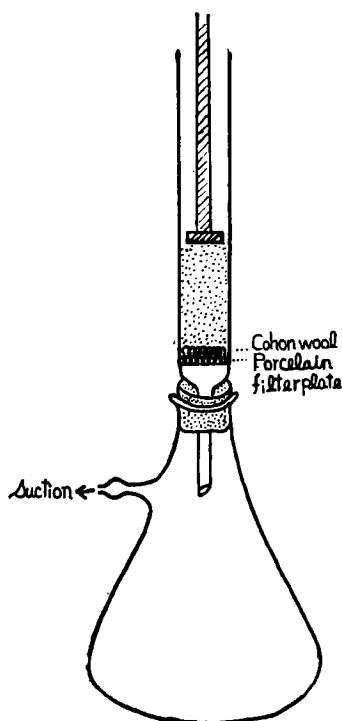
2. 8. 1. 試料

ion 交換 chromatography 法により分離した ester 型 bilirubin 水溶液を用い、粗天然 bilirubin 調製法に順じて ester 型 bilirubin の粉末を作り使用した。

2. 8. 2. Column の作り方²⁸⁾

粉末濾紙 A (東洋濾紙会社製) を n-butanol-ethanol-water (4 : 1 : 2) に懸濁し Fig. 1 のとき吸着管に吸引しながら流し込み、glass 棒で均

Fig. 1.



等に押し固め、columnの高さは約20 cmとし、上記混液を入れたまま一夜放置して、粉末cellulose上の固定相と移動相を十分に平衡化させ使用した。

2. 8. 3. 展開

ester型bilirubinの粉末を上記混液の少量に出来るだけ高濃度に溶解させ、次いで粉末濾紙に吸着させ、それをcolumnの上部に重畳しglass棒にて押し上記混液にて展開し、流下液はfraction collectorに2 ml宛採取した。

2. 8. 4.

各分割液を2分し各々溶媒を減圧蒸発させた後、一方の試料は2 mlのmethanolに溶解しPulfrich光度計で濾光板S₄₃による各fractionの吸光度係数を測定し、更に同一試料2 mlに対して3 mlのdiazo混液を加え30分後S₆₃による吸光係数を測定してbilirubinの濃度を知り、更に他方の試料に蒸留水3 mlを加えFishmanの方法によりglucuron酸を測定し、その分配状態を検討した。

実験成績並びに考按

1. butanol抽出法により得られた直接bilirubinの性状

Butanol抽出法により得られた黄褐色水溶液は紫外線下に蛍光なく、Gmelin試薬により緑色より赤

紫色を呈し、Ehrlich氏diazo試薬を加えると1分以内に赤紫色を呈し、これに濃塩酸を加えると青紫色となつた。本水溶液に亜硝酸曹達、次いで氷醋酸を混ざると緑色を呈した。Ehrlich氏aldehyde試薬を混ざると色調に変化なく、又Schlesinger氏試薬を混ざると蛍光は認められなかつた。pH 7.0に於いて可視部に410~430 m μ に吸収の極大を示した。本液に等量の1/10規定塩酸を混じたものからchloroformに移行する色素は全く認められなかつたが、小坂の方法で鹼化後は殆んどすべての色素がchloroformに抽出された、chloroform層にGmelin試薬を重畳すると緑色より赤紫色に至る色調の出現を認めたが、Ehrlich氏diazo試薬に対して何ら色調の変化なく、倍量のethanolの添加後始めて著明に赤紫色の発現を認め、これに濃塩酸を混和すると青紫色を呈した。更にこのchloroform溶液は可視部に450 m μ に吸収の極大を示した。以上の成績よりbutanol抽出法により得られた黄褐色色素はGmelin反応で緑色より赤紫色を呈し、亜硝酸酸化で緑色となることからtetrapyrrol色素と考えられ、更にdiazo反応で赤紫色を呈し、Ehrlich氏aldehyde反応で全く色調に変化を認めない点よりbilirubinよりmesobilirubinに至るbilirubinoidであり、これは明らかに二塩基酸bilirubinと化学的にも、分光学的にも異つている事が認められ、又鹼化後のchloroform移行性よりして教室従来の見解に従えば本色素はester型bilirubinの総ての特徴を持ち、Ehrlich氏diazo試薬と水溶液中で1分以内にalcoholの添加を必要としないで反応する点より明らかに直接bilirubinの性状を有するものである。

2. 直接bilirubinとglucuron酸との関係

2. 1. 塩型直接bilirubin分割とglucuron酸との関係

黄疸尿から岩田並びに坂本の両分離法により得られた塩型直接bilirubinはnaphthoresorcinol反応陰性で、glucuron酸とは全く関係のない直接bilirubinの一つであると考えられる。

2. 2. ester型直接bilirubin分割とglucuron酸との関係

ion交換chromatographyによるesterによるester型bilirubin分離法から得られた直接bilirubinに就いては坂本並びに近藤から、又沈澱法により得られた直接bilirubinに就いては坂本並びに小牟田から詳細に発表された如く、ester型bilirubinの性

状を悉く具えている直接 bilirubin である。そこで ion 交換 chromatography 法、沈澱法並びに butanol 抽出法により分離された ester 型 bilirubin (以下順次 EB I, II 並びに III と記す) に就き naphthoresorcinol 反応を検するに、EB II に於いては、常に陰性であり、EB I 並びに III に於いては多くの場合陽性で、時に陰性のこともあつた。EB II は塩型直接 bilirubin と共に glucuron 酸とは全く関係のない直接 bilirubin であり、このことは生体内に於いて glucuron 酸抱合が bilirubin を直接化する唯一の mechanism であるとする Billing 等の説に疑いを抱かせるものである。硫酸安門による塩折法で集められた粗 bilirubin 中には尿中の bilirubinoid が悉く含まれていることは吉岡²⁹⁾ 並びに小牟田の実験からも明らかであり、更に ion 交換 chromatography による分離法はこの粗 bilirubin 中の如何なる直接 bilirubin をも殆んど失うことなく三分割に完全に分離し得る理想的な分離法である。従つて本分離法により得られた ester 型 bilirubin 分割中には尿中のすべての ester 型 bilirubin が含まれており、この分割中に時として naphthoresorcinol 反応陰性で glucuron 酸の存在の見られないことがあるのは、glucuron 酸抱合が bilirubin の直接化に必ずしも必要でない証拠とも考えられる。

3. ester 型 bilirubin 分割に及ぼす alkali の影響

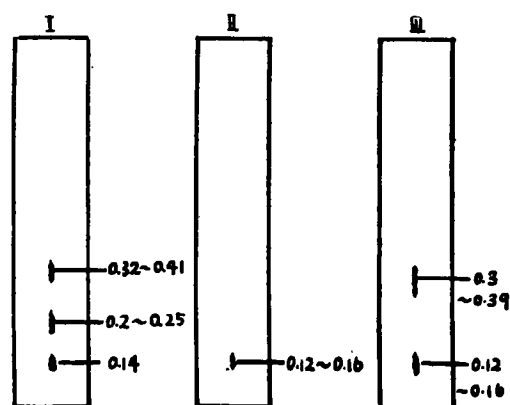
各 ester 型 bilirubin 水溶液に 1/10 規定苛性曹達を同量加え数分間放置後溶液を同規定の塩酸で注意して中和し、chloroform を加え振盪し、色素の chloroform への移行状態並びに移行した色素の性状を検討した。EB II に於いては色素の chloroform 層への移行は全く見られず、残部の水層を小坂の方法で鹼化すると色素は悉く chloroform 層に移行した。次に EB I 並びに III に於いては多くの場合色素の極一部が chloroform 層に移行したが、殆どどの色素は小坂の鹼化法により始めて chloroform 層に移行した。alkali 処理後に chloroform 層に移行した色素の性状をしらべて見ると、chloroform 層は淡黄色を呈し、Gmelin 試薬で緑色より赤紫色を呈し、Ehrlich 氏 diazo 試薬に対して色調の変化なく、倍量の ethanol の添加後始めて赤紫色を呈し、可視部吸収曲線上 450 m μ に吸収の極大を示し、明らかに間接 bilirubin の性状を具備していた。Billing 等が直接 bilirubin の本態を glucuronide に求め、alkali labile をその特性の一つにかかげ、

直接 bilirubin は 1/10 規定苛性曹達で数分間にして加水分解され間接 bilirubin となると述べているが、以上の所見はこれに反して EB II のすべて、及び EB I 並びに III の殆んどが 1/10 規定苛性曹達で何んら影響を受けず小坂の鹼化法により始めて鹼化され間接 bilirubin となる ester 型 bilirubin であつた。このことは先に小坂が 5% の methanol 性加里による鹼化実験に於いて、鹼化に用いた苛性加里及び alcohol での単独では直接 bilirubin は間接 bilirubin に変化しないと述べていることとよく一致する。而し EB I 並びに III には 1/10 規定苛性曹達により加水分解され間接 bilirubin となる alkali labile な直接 bilirubin の存在が一部見られた。この直接 bilirubin は glucuron 酸反応陰性の EB II には存在せず、glucuron 酸反応陽性の EB I 並びに III にのみ見られることよりして glucuron 酸と関係のある直接 bilirubin であり、Billing 等のいう glucuronide とも考えられる。然しながら alkali 処理後に生じた間接 bilirubin 量の測定からその量は全 ester 型 bilirubin の極一部であつた。

4. ester 型 bilirubin 分割の Paperchromatogram
各 ester 型 bilirubin 分割を n-butanol-ethanol-water (4 : 1 : 2) を展開剤として Paperchromatography を行くと、Fig. 2 に示す如く EB I に於いては Rf 0.32~0.41, 0.2~0.25 及び 0.14 に、EB II に於いては Rf 0.12~0.16 に、更に EB III に於いては Rf 0.3~0.39, 及び 0.12~0.16 に各々

Fig. 2. Paperchromatograms of each ester form bilirubin paper: Schleicher & Schüll Nr 2043 a

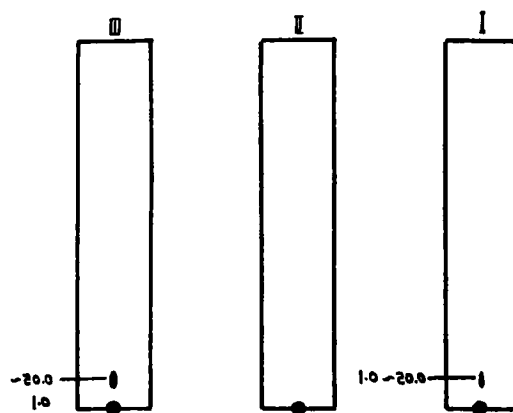
Temperature: 12-14°C
Run: 20-25 cm
Dereloping Solvent
n-butanol, ethanol, water mixture
(4 : 1 : 2)



黄色の spot を得たが, EB I の Rf 0.2~0.25 の spot のみ緑色調を帯びていた. EB I の Rf 0.2~0.25 の spot を除き他は Ehrlich 氏 diazo 試薬を噴霧すると 1 分間以内に赤紫色を呈し, 又 Gmelin 試薬の噴霧により紫青色を呈したが, spot の黄色色調が淡いときは両反応が不明瞭又は陰性であつた. benzidine 反応は各黄色 spot に一致して陽性であつたが, 無処置のまま 105°C 15 分間加熱しても黄色 spot は黄褐色に変化するので判定は不明確であつた. Naphthoresorcinol 反応は各黄色 spot に一致して青色を呈し陽性であつたが, 試薬中に含まれている燐酸のみの使用に於いても同様な発色を呈するのでこれも判定は困難であつた. 燐 molybdén 酸反応は陰性であり, ninhydrin 反応は時として EB I 及び II に於いて Rf 0.07 に陽性を示すことはあつたが, EB III に於いては常に陰性であつた. 次に各 ester 型 bilirubin を濾紙に band 状に附着させ n-butanol-ethanol-water (4 : 1 : 2) を展開剤として Paperchromatography を行い, 各 spot に相当する黄色 band を 50% ethanol 水で抽出すると, EB I の Rf 0.2~0.25 の抽出液を除き diazo 直接反応を呈し, 小坂の方法で鹼化後黄色色素は殆んど chloroform 層に移行し, chloroform 層は diazo 間接反応を呈した. 又各抽出液に 1/10 規定苛性曹達を同量加え数分間放置後, 同規定の塩酸で中和し chloroform への色素の移行状態を検するに, EB I の Rf 0.14, EB II の Rf 0.12~0.16 並びに EB III の Rf 0.12~0.16 の各抽出液に於いては色素の chloroform への移行は全く見られず, EB I の Rf 0.32~0.41, 及び EB III の Rf 0.3~0.39 の各抽出液に於いては大部分の色素が chloroform 層に移行し, chloroform 層は間接 diazo 反応を呈した. 各抽出液の可視部吸収曲線は EB I の Rf 0.14, EB II の Rf 0.12~0.16 並びに EB III の Rf 0.12~0.16 の各抽出液に於いては 410~420 m μ に比較的鋭い吸収の極大を有し, EB I の Rf 0.32~0.41 並びに EB III の Rf 0.3~0.39 の各抽出液に於いては 400~420 m μ に比較的偏平な吸収の極大を有し又 EB I の Rf 0.2~0.25 の抽出液に於いては 640 m μ と 390 m μ に吸収の膨隆を示した. Naphthoresorcinol 反応は EB I の Rf 0.14 並びに 0.2~0.25, EB II の Rf 0.12~0.16, EB III の Rf 0.12~0.16 の各抽出液に於いてはすべて陰性であつたが, EB I の Rf 0.32~0.41, EB III の Rf 0.3~0.39 の各抽出液に於いては著明に陽性であり, 且つ mannose-H₂SO₄-thioglycollate

法も陽性を示した. 又各 ester 型 bilirubin を n-propanol-water (4 : 1) で展開すると Fig. 3 に示

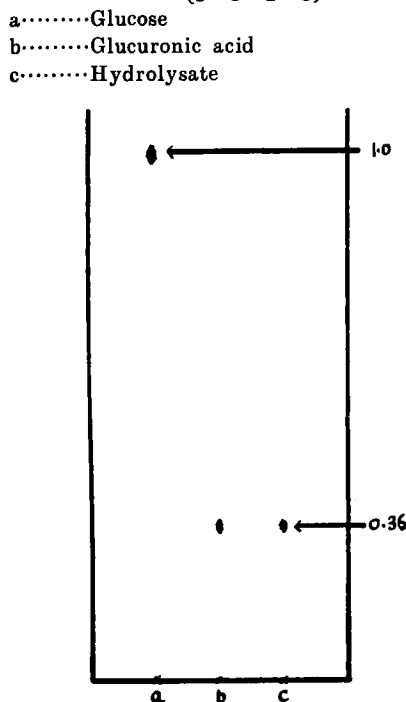
Fig. 3. Developing Solvent n-Propanol, water mixture (4 : 1)



- I : Ester Form Bilirubin isolated by ionexchange Chromatography
 II " " by precipitation method
 III " " by butanol-extract methof

す如く EB I に於いては原点と Rf 0.05~0.1 に, EB II に於いては原点のみに, EB III に於いては EB I と同じく原点と Rf 0.05~0.1 に黄色 spot を得た. 各 spot に相当する黄色 band 抽出液は Gmelin 並びに diazo 直接反応陽性で小坂の方法で鹼化後黄色色素は殆んど chloroform 層に移行し, chloroform 層は diazo 間接反応を呈した. alkali 処理に対しては各 ester 型 bilirubin の原点に止まるものに於いては色素の chloroform 層への移行は見られず, EB I 並びに III の Rf 0.05~0.1 に於いては大部分の色素が chloroform 層に移行した. naphthoresorcinol 反応は各 ester 型 bilirubin の原点に止まるものすべて陰性で, EB I 並びに III の Rf 0.05~0.1 に於いては著明に陽性であつた, そこで naphthoresorcinol 反応陽性の抽出物に 2 規定塩酸を同量加え 100°C 1 時間加水分解したものを pyridine-ethyl acetate-acetic acid-water (5 : 5 : 1 : 3) を展開剤として paper chromatography を行くと, Fig. 4 に見られる如く R_{glucose} 0.36 に naphthoresorcinol 反応陽性の spot を得た. これは glucuron 酸を用いた対照と一致した. 以上の結果からして EB II に於いては全く ester 型 bilirubin のみであるが, EB I 並びに III に於いては ester 型 bilirubin 以外

Fig. 4. Paperchromatogram of the HCl-Hydrolysate of naphthoresorcinol positive spots
Developing Solvent: pyridine, ethyl acetate, acetic acid, water mixture (5 : 5 : 1 : 3)



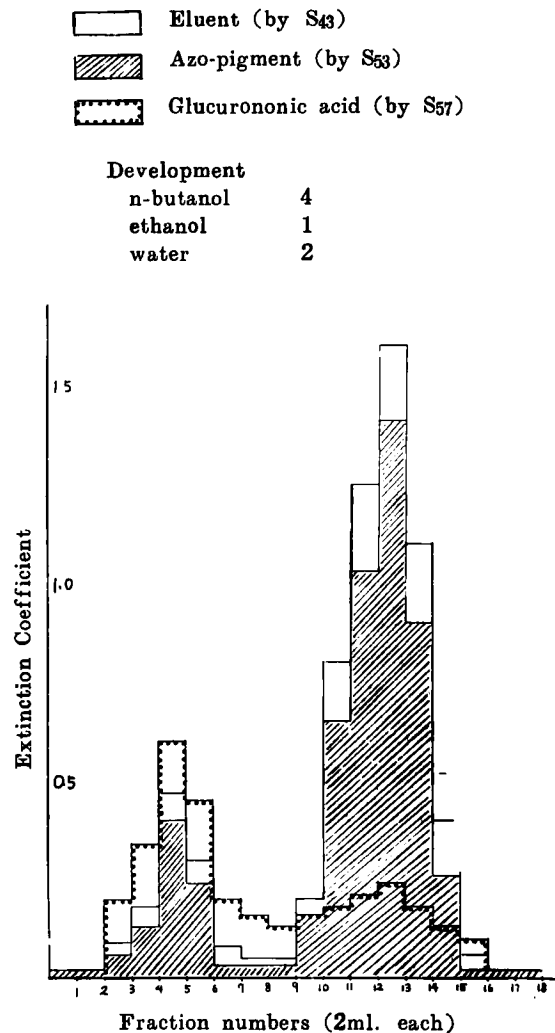
に alkali labile で glucuron 酸と密接な関係のある直接 bilirubin が分離された。

5. ester 型 bilirubin 分割の cellulose column chromatography

Naphthoresorcinol 反応陽性の EB I を用い、n-butanol-ethanol-water (4 : 1 : 2) を展開剤として cellulose column chromatography を行い、流下液を fraction collector で採取し、各採取液中の bilirubin 量をしらべて見ると、Fig. 5 に見られる如く明らかに区別し得る大小 2 つの分割群を得た。これらはすべて Gmelin 並びに diazo 直接反応陽性で、小坂の方法で酸化後色素の殆んどが chloroform に移行し、chloroform 層は diazo 間接反応を呈した。alkali 処理に対しては大分割群に於いては色素の chloroform への移行は見られず、小分割群に於いては大部分の色素が chloroform に移行し、chloroform 層は diazo 間接反応を呈した。naphthoresorcinol 反応は大分割群に於いては陰性で、小分割群に於いては Fig. 5 に見られる如く明らかに陽性で然も bilirubin と glucuron 酸量との間に相関々係が見られた。

以上の所見より Paperchromatography と同じ

Fig. 5. Elution curve of the ester form bilirubin on cellulose Column
Column 18×200 mm



く column chromatography に於いても ester 型 bilirubin 以外に glucuron 酸と関係のある直接 bilirubin を分離し得たが、その量は Fig. 5 に見られる如く ester 型 bilirubin に比して遙かに僅少であつた。

以上総括すると黄疸尿中の直接 bilirubin は塩型直接 bilirubin を除き殆んどが教室の所謂 ester 型 bilirubin であり、極一部に bilirubin glucuronide が存在するものと考えられる。

結 言

機械性黄疸患者尿を用い、従来教室で発表された ester 型並びに塩型直接 bilirubin 分離法により得られた ester 型並びに塩型直接 bilirubin に就き glucuron 酸との関係を検討した。

1. 如何なる分離法に於いても、塩型直接 bilirubin は glucuron 酸反応陰性であつた。

2. Ester 型直接 bilirubin の中、小牟田の沈澱法により得られた ester 型直接 bilirubin は glucuron 酸反応陰性であつた。

3. 坂本の ion 交換 chromatography 法並びに butanol 抽出法により得られた ester 型直接 bilirubin は多くの場合 glucuron 酸反応陽性で、時に陰性のこともあつた。

4. Glucuron 酸反応陽性の ester 型直接 bilirubin 分割から Paper 並びに column chromatography により glucuron 酸と関係のある直接 bilirubin が ester 型直接 bilirubin とは別に分離されたが、そ

の量は極一部に過ぎなかつた。

以上の結果からして Billing 等の bilirubin glucuronide の存在は認めるにしても、その量は全 ester 型 bilirubin の極一部であり殆んどが教室の所謂 ester 型直接 bilirubin であつた。

主 要 参 考 文 献

- 1) Van den Bsrgh, A. A. H. & Müller, P.: *Biochem. Z.* **77**, 90 (1916)
- 2) 小坂 東京医事新誌, **68**, 14 (1951)
- 3) 原: 医学研究, **22**, 536 (1952)
- 4) 島田 医学研究, **24**, 1894 (1954)
- 5) Sakamoto, T. & Yahata, K.: 医学研究, **27**, 373 (1957)
- 6) 坂本, 近藤: 未発表
- 7) 山岡: 日本消化器病学会雑誌, **43**, 1 (1950)
・日本内科学会雑誌, **42**, 531 (1953)
- 8) Cole, P. G. & Lathe, G.: *J. Clin. Path.* **6**, 99 (1953)
- 9) Cole, P. G., Lathe, G. H. & Billing, B. H.: *Biochem. J.* **57**, 514 (1954)
- 10) Billing, B. H.: *J. Clin. path.* **8**, 126 (1955)
- 11) Billing, B. H.: *Biochem. J.* **56** (1954) XXX
- 12) Billing, B. H. & Lathe, G. H.: *Biochem. J.* **63**, 69 (1956)
- 13) Billing, B. H., Cole, P. G. & Lathe, G. H.: *Biochem. J.* **65**, 774 (1957)
- 14) Schmid, R.: *Science* **124**, 76 (1956)
- 15) Talafant, E.: *Chem. Listy*, **50**, 1329 (1956)
- 16) Schmid, R., Hammerker, L. & Axelod, J.: *Arch. Biochem.* **70**, 285 (1957)
- 17) Grodsky, G. M. & Carbone, J. V.: *J. Biol. Chem.* **226**, 449 (1957)
- 18) 岩田 医学研究, **21**, 1270 (1951)
- 19) Sakamoto, T. & Komuta, K.: *Acta Med. Okayama* **11**, 81 (1957)
- 20) Jendrassik, L. & Cleghorn, R. H.: *Biochem. Z.* **296**, 1 (1937)
- 21) Fishman, W. H., Smith, M., Thompson, D. B., Bonner, C. D., Kasdon, S. C. & Homburger, F.: *J. Clin. Invest.* **30**, 7 (1951)
- 22) Dische, Z.: *J. biol. Chem.* **171**, 725 (1947)
- 23) Ahrens, E. H. jung & Craig, L. C.: *J. biol. Chem.* **195**, 763 (1952)
- 24) Fischer, F. G. & Dörfel, H.: *Hoppe-Seyl. Z.* **301**, 224 (1955)
- 25) Horrocks, R. H.: *Nature* **164**, 444 (1949)
- 26) Partridge, S. M.: *Nature* **153**, 270 (1946)
- 27) Partridge, S. M.: *Biochem. J.* **42**, 238 (1949)
- 28) 日本化学会編, 実験化学講座: 2 基礎技術 II.
- 29) 吉岡: 医学研究, **25**, 321 (1955)

Studies on Bile Pigment

Part 1. Relationship between Glucuronic Acid and Direct Bilirubins, Both Ester form and Salt form, Isolated from the Urine of Patients with Mechanical Jaundice

By

Taisei Monobé

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

With the urine of the patient with mechanical jaundice the author isolated direct bilirubins, both ester form and salt form, by the routine techniques employed in our laboratory, and studied the relationship between glucuronic acid and these bilirubins.

1. Regardless of the techniques used in isolating direct bilirubins of salt form the glucuronic acid reaction proves to be always negative.

2. Of the direct bilirubins of ester form, the one isolated by Komuta's precipitation method is negative to the glucuronic acid test.

3. Of direct bilirubins of ester form obtained by the ion-exchange chromatography as well as by butanol extraction method, most of them are positive to the glucuronic acid test but some prove to be negative.

4. By paper and column chromatography it has been possible to isolate from the ester-form direct bilirubin fractions positive to glucuronic acid the direct bilirubin that is related to glucuronic acid aside from the ester-form direct bilirubins, but the quantity is trivial.

From these results the existence of bilirubin glucuronide as contended by Billing et al can be understandable, but its quantity is an extremely small portion of the total ester-form bilirubins, and almost all of them prove to be what we in our laboratory call "ester-form direct bilirubins"
