セファデックスカラムによる血清ビリルビンの分画定量法

真 鍋 幸 男*

(1969 年 3 月 29 日受理)

セファデックス LH 20 のカラムと 35 vol% エタノールを用いて血清を流すと、血清中のビリルビンはグルクロナイド型がたん白質とともにさきに、遊離型がたん白質から離れてあとから、しかも定量的に溶出する。血清はあらかじめ 70 vol% エタノールを等容量加えて遠沈し、その上清を用いる。溶出した 2 画分は 452 m μ と 575 m μ の 2 点で測定して溶血誤差の補正を行なう。

エタノールの濃度が低いと遊離型の一部がたん白質と離れずにグルクロナイド型に混入し、高すぎると最初の血清の前処理のときにアルブミンの一部が沈殿してビリルビンも同時にその一部が失われ、いずれも定量性がなくなる。

1 緒 言

血清中のビリルビン (以下 Bil. と略記) は従来ほとんどがジアゾ化による Bil. のアゾ色素を、カップリング促進剤の使い分けによって直接 Bil. (グルクロナイド型) と間接 Bil. (遊離型) とに分けて定量されている。ほかに総 Bil. の定量法として Bil. の特異吸収波長で血清を直接比色する方法^{1)~4)}がある。カラムを用いてグルクロナイド型と遊離型に分ける方法には Billing ら^{5)~8)}の発表があるが、これらは定量性に乏しい。

この報告はセファデックスのカラムを用いて血清中の Bil. をグルクロナイド型と遊離型に分けて、Bil. の特異吸収波長の光で比色定量する新しい方法について述べたものである。

2 装置および試薬

2.1 装 置

クロマト管: 直径 1cm, 長さ約 15cm.
小試験管: 4ml 目盛つき.
分光光度計: 日立 EPS-3T 型自記分光光度計.

2.2 試 薬

カラム充てん剤: セファデックス LH 20.
血清前処理液: 70 vol% エタノール.
溶離剤: 35 vol% エタノール.
緩衝液: 0.08M ペロナールに尿素を 10 g/dl の割合に加える. pH 8.6.
Bil. 標準液: ヘパテスト BS (第一化学製).

* 東京通信病院臨床検査科: 東京都千代田区富士見 2 丁目

3 分 析 法

3.1 カラムの作製

セファデックス LH 20 を 2g とり 35% エタノールを加えてじゅうぶんに膨潤させ、クロマト管に注入してエタノールを自然に流下させ、滴下のやむのを待つ (高さ約 7cm).

3.2 試料の前処理

血清 0.3ml をあらかじめ氷水中にひやしておき、氷冷した 70% エタノール 0.3ml を試験管を振りながら加え、そのまま氷水中に 30 分間放置し室温で 10 分間遠沈してその上清を用いる。

3.3 溶 離

上記の上清 0.3ml をカラムに加え、浸透しおわったら 35% エタノールを次に示す容量に区切ってカラムに加え、そのつど流出がやむのを待って次の容量を加えるようにする。0.5ml—管壁洗浄、流出液は捨てる。1.5ml—流出液は捨てる。2.0ml—流出液を第一画分とする。2.0ml—第二画分とする。各画分はあらかじめ緩衝液 1.5ml を入れた小試験管に受ける。

3.4 測 定

溶離した 2 画分にそれぞれ画線 (4ml) まで緩衝液を加えて混和し、水を対照にして Bil. の特異吸収波長 452 m μ およびオキシヘモグロビンの特異吸収波長 (α -バンド) 575 m μ の光で吸光度 (それぞれ $A_{(452)}\text{Sample}$ および $A_{(575)}\text{Sample}$ とする) を求める。

3.5 標準液

高濃度 Bil. 血清を準備して、これの総 Bil. 量 (mg/dl St.) をヘパテスト BS を基準としてジアゾ法によって求め、この濃度既知の血清を前記 3.2 の要領に従って前処理してその上清 0.3 ml を小試験管にとり、緩衝液 1.5 ml, 35% エタノール 2.0 ml を順次混和して加え、さらに画線まで緩衝液を加えたものの吸光度 ($A_{(452)St.}$, $A_{(575)St.}$) を求める。

3.6 計 算

$$\text{Bil. mg/dl} = \frac{A_{(452)\text{Sample}} - A_{(575)\text{Sample}}}{A_{(452)St.} - A_{(575)St.}} \times \text{mg/dl St.}$$

4 分析法の検討

4.1 溶離剤の濃度

この分析法において重要な点は溶離に用いるエタノールの濃度である。同一の血清について各種濃度のエタノールを用いて前記 3 の要領に従って操作し、各 2 画分に含まれる遊離型 Bil. の量について検討した (Fig. 1)。血清の前処理にはそれぞれ溶離剤の倍濃度のエタノールを等容量血清に加えた。

Fig. 1 Relation between concentration of eluent and content of free Bilirubin in two fractions
(a) Total Bil. in supernatant of treated serum; (b) Free Bil. in 2nd fraction; (c) Free Bil. in 1st fraction

各第一画分の Bil. はたん白質とともに溶離する。このたん白質をたん白分解酵素 (プロナーゼ P, 科研) で加水分解し⁹⁾¹⁰⁾、液を酢酸酸性にしてクロロホルムで抽

出すると、溶離剤の濃度が 30% 以下の場合はクロロホルムに移行する Bil. (遊離型) を少量含んでいるが、35% 以上になると Bil. はすべてが水相に残留した。すなわち溶離剤として 35% 以上のエタノールを用いれば第一画分中の Bil. はすべてグルクロナイド型であるといえる。

各第二画分にはいずれもたん白質は含まれていない。液を直接酢酸酸性にしてクロロホルムで抽出すると、Bil. は全量がクロロホルムに移行して水相はいずれも無色透明となり、Bil. は認められなかった。すなわち第二画分中の Bil. は溶離剤の濃度に関係なくすべて遊離型であるといえる。ただし溶離剤の濃度が 30% 以下および 45% 以上では Bil. の含量が低下した。

すなわち、エタノールの濃度が 30% 以下では、第二画分にとどまるべき遊離型 Bil. の一部が第一画分に混入し、45% 以上では血清の前処理のときにアルブミンの一部が沈殿し、Bil. は両型ともアルブミンと結合している¹¹⁾¹²⁾、第二画分中の Bil. の濃度の急激な低下が起こったと思われる。また Fig. 1 の上方に示すように上清中の総 Bil. がエタノールの終濃度 40% までは濃度に変化がないのに、45% 以上で低下しているのも同様の理由によると思われる。アルブミンが沈殿することについては、各上清を沢紙電気泳動にかけて確かめることができた (Fig. 2)。以上の結果から溶離剤の濃度を 35% と決めた。

4.2 血清の前処理

血清に前処理液を加えるときは、できるだけグロブリンの変性をおだやかに行なうために氷冷する必要がある。これを室温で行なうと¹³⁾第一画分にわずかな濁りが最後まで残り測定不能になることがある。

4.3 溶血誤差の補正

Bil. の濃度の高い血清は採血のときに溶血しやすく、そのためにジアゾ法では不当に高い値を示すことがある。オキシヘモグロビンの 452 mμ における吸収と 575 mμ におけるそれとはほぼ相等しく (誤差 2~3%)、かつ Bil. には 575 mμ に吸収はないので、2 点を測定して差し引くことによって溶血による誤差を補正することができる。またこの緩衝液の組成では Bil., オキシヘモグロビンともに少なくとも 30 分間は吸収に異状を認めなかった。

4.4 標準液

ヘパテスト BS はウシアルブミンに遊離型 Bil. を結

Table I Comparison of analytical data by column and diazo methods

No.	Column method				Diazo method		
	Supernatant of treated serum	Glucuronide	Free	Total†	Direct	Indirect††	Total
1	6.52	3.55	2.97	6.52	4.43	1.91	6.34
2	8.42	4.46	3.89	8.35	5.97	2.38	8.35
3	12.78	6.56	5.95	12.51	8.38	4.26	12.64
4	14.16	6.96	6.62	13.58	9.97	4.12	14.09
5	6.52	2.84	3.52	6.36	4.18	1.98	6.16
6	6.46	2.74	3.21	5.95	3.84	2.41	6.25
7	7.98	3.45	4.46	7.91	5.17	2.84	8.01
8	11.96	4.97	6.69	11.66	7.87	4.20	12.07
9	9.43	4.29	4.83	9.12	6.25	3.18	9.43
Mean	9.36	4.42	4.68	9.10	6.23	3.03	9.26

† Total = Glucuronide + Free; †† Indirect = Total - Direct

Fig. 2 Paper electrochromatogram of supernatant of treated serum

Concn. of ethanol: ① 30 vol%, ② 35 vol%, ③ 40 vol%, ④ 45 vol%

合させたもので、その吸収ピークはかなり長波長側に移動している。またこれをカラムを用いて試料と同様に処理すると、Bil. の一部がたん白質と離れずに第一画分に混入されることがあり、その割合も一定しないのでこれを直接標準液として用いることはできなかった。

4.5 本法とジアゾ法との比較

日常検査法として多く用いられている Malloy-Evelyn

のジアゾ法と本法とを比較した値を Table I に示す。

Table I から明らかなように 2 法の間には総量においてはほとんど差はないが、本法による遊離型の量がすべての血清についてジアゾ法の間接型より大きな値を示した。このことは直接型すなわちグルクロナイド型、間接型すなわち遊離型であるという従来の取り扱いが正しくないことを示している。

5 考 察

本法は Bil. をその特異吸収波長の光で測定したので、Bil. のグルクロナイド型と遊離型の違いによる、あるいはそれらがたん白質と結合しているかいないかによる吸収の強さの変化あるいはピークの移動などに問題が残っているが、グルクロナイド型 Bil. が入手できないので明確な検討を加えることはできなかった。しかしこの分析法における測定条件では、たん白質と結合したグルクロナイド型とたん白質を含まない遊離型の吸収曲線は、ピークの位置およびその形は同じであった。また Table I に示す 2 法の測定値からみて、吸収の強さに差があるとしても臨床上さしつかえない範囲にとどまるものと考えられる。

この分析法は遊離型 Bil. が水に不溶、有機溶媒に易溶で、グルクロナイド型 Bil. が水に易溶、有機溶媒に不溶という特性を利用してその特異性が確かめられているので、従来の諸法よりはさらに真実に近い値を示すものであるといえよう。

終わりに、終始ご指導をいただいた東京大学薬学部田村善蔵教授に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) S. Mites, C. K. Hogg : *Clin. Chem.*, **6**, 421 (1960).
- 2) S. H. Jackson : *ibid.*, **7**, 512 (1961).

- 3) N. Chiamori, R. J. Henry, O. J. Golub : *Chin. Chim. Acta*, **6**, 1 (1961).
- 4) R. G. Martinek : *ibid.*, **13**, 161 (1966).
- 5) P. G. Cole, G. H. Lathe : *J. Clin. Path.*, **6**, 99 (1953).
- 6) P. G. Cole, G. H. Lathe, B. H. Billing : *Biochem. J.*, **57**, 514 (1954).
- 7) B. H. Billing : *J. Clin. Path.*, **8**, 126 (1955).
- 8) B. H. Billing, P. G. Cole, G. H. Lathe : *Biochem. J.*, **65**, 774 (1957).
- 9) 野本正雄, 奈良橋快子 : 理研報告, **35**, 84 (1959).
- 10) 野本正雄, 奈良橋快子, 村上 碩 : 同上, **35**, 154 (1959).
- 11) N. H. Martin : *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1230 (1949).
- 12) T. Darocha, K. Murawski, Z. Szymanowska : *Clin. Chim. Acta*, **7**, 729 (1962).
- 13) 真鍋幸男 : 医学と生物, **78**, 73 (1969).

☆

Determination of free and glucuronide bilirubin in serum by using Sephadex column. Yukio MANABE (Department of Clinical Laboratory, Tokyo Teishin Hospital, Chiyoda-ku, Tokyo)

By an elution of serum on a column of Sephadex LH 20 with 35(vol)% ethanol as the eluent, glucuronide bilirubin in the serum comes out at first accompanying with serum protein and free bilirubin comes out separately afterwards. The separation is quantitative.

As the specificity of this method has been ascertained by making use of the difference in solubility of the two types of bilirubin—i.e., the free type is water-insoluble and organic solvent-soluble while the glucuronide type is water-soluble and organic solvent-insoluble—the proposed method is more reliable than conventional ones.

(Received Mar. 29, 1969)

G. V. Marinetti 編

“Lipid Chromatographic Analysis” Vol. 2

152 mm×228 mm 596 ページ (\$ 27.50) Marcel Dekker, Inc., New York (1969)

近年における生化学のめざましい進歩は方法論としてすぐれた分析法の開発に負うところがはなはだ大きく脂質生化学もまた例外ではない。本書はこのシリーズの第2巻として出版されたもので各種クロマトグラフィーの進歩がステロイド、胆汁酸、プロスタグランジン、脂溶性ビタミンなど対象別にまとめられている。多岐にわたる脂質関連化合物の分離分析を成書としてまとめた試みは本書ははじめてであり、他には類をみない大きな特色といえよう。編者は Rochester 大学の教授をつとめる新進気鋭の脂質生化学者であり、バランスのとれた構成、統一されたスタイルなどに該博な知識ときめ細かい配慮をうかがうことができる。本書は 10 章からなり各章分担執筆の形式がとられているが、いずれも第一線の研究者によってものされ充実した内容が盛り込まれている。

まず第1章ではステロイドのペーパークロマトグラフィーが技術上の問題にも力点がおかれて述べられ、第2章ではステロイドの薄層クロマトグラフィーが Lisboa によってまとめられている。総論が述べられたあとと代表的なステロイド群について豊富なデータが表としてみごとに整理され、著者自身のものも大幅に取り入れられている。続く第3章には胆汁酸の薄層クロマトグラフィーに限られた紙数のうちに要領よくまとめられている。ガスクロマトグラフィーに関してはコレステロールを中心とするステロールが第4章(27 ページ)で、また第

5章では胆汁酸が 98 ページにわたって述べられている。基礎理論に一部内容の重複がみられるが本書がこのような編集スタイルをとっている以上やむを得ないといえよう。第6章で取り扱っているプロスタグランジンの分析は Karolinska 研究所のグループによってはじめられた比較的新しい分野で、今日まとまったものが少ないだけにこの総説は高く評価されるべきであろう。続いてビタミン A, D および E が 134 ページ(第7, 8章)にわたって取り上げられ、とりわけ第7章は充実した内容を盛り誠に圧巻である。第9章の炭化水素は分析の対象として他の生体成分とは性格が異なり、いささか奇異な感じを与えるが脂溶性物質として分析法にも共通する点が少なくないためであろう。最後にガスクロマトグラフィーによるステロイドホルモンの臨床分析(39 ページ)がつけ加えられ、診断の指標とされる代表的なステロイドとその代謝産物について在来分析法との比較、生体試料への応用上の問題点が指摘されている。

本書は冒頭にも述べたように脂溶性物質の分離分析法をとりまとめた成書として誠にユニークな編集内容であり、生体成分を研究対象とする分析化学者にとって好個の参考書となるばかりでなく、生化学、臨床化学の専門家にも技術上のすぐれた指導書として役だつことを信じて疑わない。ここに本書を推薦するしだいである。

(南原利夫)