ビリルビン銅複合体によるビリルビンの 新定量法とその臨床的研究 (第 I 報)

東京大学医学部生化学教室 (指導: 島蘭順雄教授)

国立東京第一病院内科 (指導: 小山善之内科医長)

中 川 英 雄

A NEW DETERMINATION METHOD OF BILIRUBIN WITH BILIRUBIN COPPER COMPLEX AND ITS CLINICAL STUDIES (THE FIRST REPORT)

Hideo NAKAGAWA

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Tokyo

(Director: Prof. Yorio Simazono)

Department of Internal Medicine, The First National Hospital of Tokyo

(Director: Dr. Yoshiyuki Koyama M.D.)

概要 今日ビリルビンの定量法には、臨床 Van den Bergh の分画定量法が重視され、ジアゾ化法が広く実施されている。著者はアルカリ性の条件でビリルビンに銅イオンを作用させるとき、860m μ に固有の分光学的特性を示すビリルビン銅塩の生ずること、さらにこの銅塩に蛋白を結合させ“ビリルビン銅蛋白複合体”とすると、同じ分光性を示し極めて安定化することを見出し、この特性を利用するビリルビンの新定量法を考案した。本法の基本反応となるビリルビン銅塩生成はビリルビンにのみ固有のものとみられるので、血清ビリルビンの定量のみならず、従来正確で簡易な定量法のない尿中ビリルビンの定量にも応用出来、その測定精度も極めて高く、黄疸尿のビリルビン量を約 1.0% の偏差で定量しえた。なお本法は間接型ビリルビンとしての総ビリルビン定量法と考えられ、直接間接両型を分画する定量は望みえないが、従来法に比し簡易かつ精度の高い定量法とみなされる。

緒 論

1913 年 Van den Bergh^{1), 2)} はビリルビンに特性の高いジアゾ反応を利用し、尿および血清ビリルビンの定量を試み、血清ビリルビンについては今日広く応用されているアゾビリルビンとしての定量法を確立したが、同じ方法で尿中ビリルビンを定量する試みには失敗した。また彼は血清ビリルビン値と尿中ビリルビンとの相関を調べ、血清中の間接型ビリルビンはその濃度にかゝりなく腎からは濾出されず、尿中に排泄されるビリルビンは直接型ビリルビンで、血清ビリルビンの直接型

値が 2 mg/dl 以上になるとはじめて尿に検出されることなどを指摘した。その後 Lepehne³⁾, McNee⁴⁾ 等もこの事実を確認した結果を報告しているが、尿中ビリルビンの定量的価値を論ずるまでには至っていない。1936 年 Naumann⁵⁾ は Fouchet 試薬⁶⁾ を用い酸化法による尿中ビリルビンの半定量法を考案し、鋭敏なこの方法により健康人の尿にもビリルビンの検出されることを見出し、またその値は 0.3 mg/dl 以下であると報じた。以来この Fouchet 試薬を用いる酸化法は多くの人々により検討と改良がなされ、Harrison⁷⁾, Watson⁸⁾, Hawkinson⁹⁾ および Thoma¹⁰⁾ らによりほぼ確立した定量法が考案され、その定量値の臨床的応用では、特に流

(本論文の要旨は第 111 回日本生化学会関東地方会、第 129、130 回内科学会関東地方会で報告した。)

行性肝炎における早期診断の手がかりともなり、ようやく重視されるに至った。1956~7年Griesら¹¹⁾は尿中ビリルビンをより正確に定量する目的で、まず尿よりビリルビンを沈殿分離し、これにジアゾ化を行ない精度の高い定量値を求めた。この方法は決して簡易とはいへないが、Griesらはこの方法で正常人の尿に排泄されるビリルビン量を調べ、その正常値は0.25mg/2 hrs以下であろうと推定した。1934年Lemberg¹²⁾はビリルビンが銅塩を作ることを報じているが、著者はアルカリ性でビリルビンに硫酸銅を作用させるとき、860 m μ に吸収極大をもつ固有の分光学的特性を示すことに着目、この特性を利用した極めて簡易、かつ精度の高いビリルビンの新定量法を考案した。この新定量法は従来法にみる諸欠点のうれいなく、その臨床的应用においては、黄疸を伴う各種疾患で、特にその尿ビリルビン値に或る条件を設けて観察するとき、臨床的に極めて興味ある知見と、その定量的意義を強調する諸結果をえた。本報ではまず本定量法を詳述し、また本法によるヒト血清ならびに尿中ビリルビンの正常値につき報告する。

実験方法

1) 試薬

a) 10%ペプトン溶液：培地用Proteose-peptone (三光純薬)の10%水溶液で、使用直前に作成する。余分は冷所に保存し使用するも可能であるが、保存期間は2日以内にとどめる。

b) 4%クエン酸ナトリウム溶液：冷所に保存する。

c) 10%水酸化ナトリウム溶液

d) 1%硫酸銅溶液

2) 定量操作

a) 尿中ビリルビンの定量法：被検尿は尿質の如何を問わずなんら処置を施してはならない。尿中ビリルビンは血清ビリルビンに比しはなほだ不安定で、特に光に対する影響が著しいので、採尿後直ちに(2時間以内)定量することが望ましい。例えば、或る尿につき、直射光を避け室温に

放置したものでも、図1に示すごとくビリルビン値の低下が認められる。

被検尿量は表1に示すごとく2.5mlとする。ビリルビン濃度の高い場合は860m μ の吸光度が1.0以上にならぬよう尿量を0.5, 1.0, 2.0mlとその濃度に応じて加減し、その減尿分には水を補充する。

尿を本法条件のアルカリ性にすると常に軽度の白濁を生ずる。これは主にマグネシウム塩による沈殿と考えられるが、これを除くため、(最後の硫酸銅添加で一時的に生ずる水酸化銅様沈殿が溶解するまで充分振盪し)遠心器で2,000 rpm, 15分間遠沈する。管底の沈殿物は白色絮塊様を呈するが、これが本反応の色素を特に吸着するという性質は見受けられない。しかしアルカリで緑色を呈するウロクローム尿よりの、またビリベルジン様色素を含む尿よりの沈殿物には明らかな色素吸

図1. Stability of bilirubin in acid urine (pH 5.8) standing at room temperature.

表1. Quantitative determination of bilirubin in urine (bilirubin copper complex method).

Procedure :

着が認められ、溶液の呈色よりやゝ緑色調の強いものとなつた。遠沈後の上清液は検体、盲検体ともに透明であり、これを吸収セルに移し、波長 860 $m\mu$ で盲検体の吸光度を 0 に合わせ検体の吸光度を読み、既製の検量線よりのビリルビン濃度を求める。なお吸光度の読みは分光光度計で求める。

b) 血清ビリルビンの定量法： 被検血清量は 0.5ml を要する。操作は尿ビリルビンの定量法と全く同様で、被検血清 0.5ml に水 2.0ml を加え、2.5ml の稀釈血清として定量する。反応溶液はほぼ透明であるが、やはり尿の場合と同様に遠沈操作を施した後その吸光度を読む。

3) 検量線の作製： 検量線の作製法は表 2 に示す通りである。ビリルビンは“第一化学”の試薬ビリルビン (10mg) を用いた。

まず水 25ml に 4% クエン酸ソーダ溶液 5ml, 10% ペプトン溶液 10ml を加え、混和後この溶液を 20ml づつ等分し、一方をビリルビン 10mg を封入せる試薬アンプル中に入れ、10% 苛性ソーダ 1ml を加えてビリルビンを完全に溶解する。他の 20ml には苛性ソーダのみを加える。前者をビリルビン標準溶液とし、表のごとく硫酸銅を加えた sample (I), (II) と硫酸銅を加えぬ blank (A), (B) とをそれぞれ調製する。以後の操作は速やかに行なうことが望ましく、適当なビリルビン稀釈系列になるようそれぞれ計算量を混合し、充分混和、反応せしめた後これに遠沈操作を施し、この上清液をとり

表 2. Preparation of calibration curve of bilirubin concentration.
(Bilirubin copper complex method).

<div>Water 25 ml 4% Sodium Citrate 5 ml 10% Polypeptone 10 ml</div> <div>(pH range of reaction 12.0 ~ 12.5)</div>		20 ml		20 ml			
		<div>Bilirubin 10 mg 10% NaOH 1 ml</div>		<div>10% NaOH 1 ml</div>			
10.5 ml		10.5 ml		10.5 ml			
<div>Water 0.5 ml</div>		<div>1% CuSO₄ 0.5 ml</div>		<div>Water 0.5 ml</div>			
Blank (A)		Sample (I)		Blank (B)			
		Sample (II)		Sample (I)			
Extinction values are read at 860 mμ after centrifugation (2000 r.p.m. 15 minutes)							
Mixture Ratios of Sample I & II	(I)	0.05 "	0.10 "	0.20 "	0.30 "	0.40 "	0.50 "
Mixture Ratios of Blank A & B	(A)	0.05 "	0.10 "	0.20 "	0.30 "	0.40 "	0.50 "
Mixture Ratios of Blank A & B	(B)	1.95 "	1.90 "	1.80 "	1.70 "	1.60 "	1.50 "
Extinction (-log T) at 860 mμ		0.177	0.36	0.655	0.95	1.29	1.65
Bilirubin Concentration Calculated (mg/dl)		1.14	2.27	4.55	6.80	9.10	11.35

図 2

波長 860 $m\mu$ で各盲検体の吸光度を 0 に合わせ、各検体の吸光度を読み検量線を作製する。

本反応の呈色は安定で、かつ Beer の法則に良く従う図 2 に示すとき検量線がえられる。

実験結果

1) ビリルビン複合体の分光学的性質： ビリルビンは水に不溶性の色素であるが、アルカリ水溶液にはアルカリ塩を作り極めて良く溶解し、その可視吸収スペクトルは図 3 のごとく 400 ~ 900 $m\mu$ の間に 3 つの吸収ピークを示し、820 $m\mu$ の吸収は軽度ながらビリルビンに固有のものともみなされる。

このビリルビン・アルカリ塩はアルブミンとも良く複合体を形成し、不安定なビリルビン・アルカリ塩を安定化するのである。この吸収スペクトルにも、図 4 に示すごとく、820 $m\mu$ の固有吸

図 3. Absorption spectra of bilirubin and biliverdin in alkaline aqueous solution (pH 12.0 ~ 12.5).

図4. Absorption spectra of bilirubin complexes.

収がみられる。

ビリルビン・アルカリ塩溶液に硫酸銅を加えると、図4に示すごとく860m μ に吸収極大を持つ特異な吸収スペクトルを示し、ビリルビン銅塩の生成が認められる。この銅塩形成はやゝ不安定で、銅は次第に解離し、この際遊離するビリルビンには自動酸化がおり、660m μ 附近に最大吸収を示す緑色のビリベルジンに変化する。従つてこのビリルビン銅塩溶液を放置し、都度この吸収スペクトルを調べると、860m μ の吸収は漸次低下し、これと反比例して660m μ の吸収が漸次増加する傾向が観察される。

このビリルビン銅塩は蛋白とも良く結合し複合体を形成するが、この吸収スペクトルはビリルビン銅塩のもつ860m μ の吸収を保持し、また分光学的にみて極めて安定なビリルビン銅蛋白複合体を形成する。この複合体の安定化は多分抱合蛋白がビリルビン銅塩の解離を抑制しているがためと思われる。

2) 本法基本反応のpH条件

ビリルビンは水に不溶性であるが、pHを8以上にするとビリルビン・アルカリ塩を作つて容易に溶解する。本法のpHを11.0以下にすると図5に示すごとく860m μ の吸収は漸次低下し、またそのpHも固定せず刻々下降するので、本法基本反応のpHには特に12.0~12.5の条件を与えた。この条件では室温で2~3時間放置してもそのpHにみる変化は極めてわずかで、準安定が保たれ、かつ860m μ における吸収は常に一定値を示すので、pHに

図5. Comparison on stabilities of the bilirubin copper protein complex formed at each condition of pH under 11.0 and over 11.5.

対する緩衝剤の必要は全く認められない。また検体2mlに10%水酸化ナトリウム液0.15mlを加えると、血清および尿質の如何を問わず12.0~12.5のpHがえられる。

3) 本法におけるペプトンの役割

ビリルビン銅塩は本法の弱アルカリ条件で蛋白とも良く反応し、安定なビリルビン銅蛋白複合体を生成するが、蛋白として卵アルブミン、血清蛋白およびポリ・ペプトンを用いた場合の各複合体生成と、その安定性につき検討した。図6に示すごとく、まず血清蛋白を用いた場合には、明らかな2相性反応が認められ、この反応の完結とみられる安定化には1時間以上を要した。卵アルブミンの場合には、血清蛋白との反応よりやゝ迅速であるが、やはり2相性に反応が完結し、安定化には約1時間を要するようである。これに対しポリ・ペプトンを用いた場合には、この複合体生成は5分後にはほぼ完結し、前2者に比しその反応性は極めて迅速である。また同時におこるビウレット反応を、この弱アルカリ条件で、より完全ならしめる点からも、ポリ・ペプトンの使用は他の

図 6. Formation velocities of bilirubin complexes and its stability.

一般蛋白の使用に比しより有利と考えられる。またビリルビン銅塩は図に示したように不安定で、経時的に酸化され、波長 $860\text{m}\mu$ の吸光度は漸次低下するが、ビリルビン銅蛋白複合体の安定性はいずれも極めて高く、3, 4 時間までは一定した吸光度がえられる。従つて本法では、この安定なビリルビン銅蛋白複合体を生成する蛋白にポリ・ペプトンを使用した。なお添加するポリ・ペプトンの量は、反応系の余分の銅をペプトンとのビウレット反応で完全に吸収しうる量とし、検体中 2.5% になるよう加えた。

4) 銅イオンの影響とその防止

本定量法で硫酸銅を加える量は、多くては水酸化銅の沈殿を生じ、また銅イオン自身による分光学的影響を招き、少なくともは図 7 に示すごとく、ビリルビン銅塩の吸光度に多少の動揺をもたらす恐れがある。従つて溶液 2 ml に対し 1% 硫酸銅液 0.1 ml の添加を適量とした。

また検体に添加される銅イオン量は、一部はビリルビンと銅塩を作り $860\text{m}\mu$ に固有の吸収を示すが、余分の銅はクエン酸ナトリウムと反応し、 $745\text{m}\mu$ に吸収をもつクエン酸銅塩となり、 $860\text{m}\mu$ の吸収に多少の影響を与える。このため本法では充分量のペプトンを投じ、この余分の銅とビウレット反応を行なわしめ、 $745\text{m}\mu$ の吸収を $550\text{m}\mu$ に移行させることによりこの影響を防止した。図 8 は、硫酸銅の添加量の如何を問わず一

図 7. Formation of bilirubin complex at various copper concentrations.

図 8. Absorption spectra of bilirubin complex and Biuret reaction at various copper concentrations under the addition of albumin.

図 9. Progressive autoxidation of urinary bilirubin under the existence of copper ion for each time (5, 20, 30, 40, 60, 80 and 100 minutes).

定したビリルビン銅蛋白複合体の生成と、余分の銅がその量に比例して卵アルブミンとビウレット反応をおこす様相を示したものである。

さらに銅イオンの影響では、尿中ビリルビンに

予め硫酸銅を作用し、しばらく放置した後、アルカリを投じビリルビン銅塩の生成を行なうときは、図9に示すごとくその生成量にかなりの減少がみられる。これは不安定なビリルビンが銅の触媒で自動酸化をおこしたものとと思われるが、このことから本法操作の硫酸銅の添加は常に最後に行なうことが望ましい。

5) 本定量法と尿中色素共存について

尿中の常在色素は主に血色素から代謝されて生じたもので、ウロクローム、ウロビリリン、ウロボルフィン、ウロエリスリンおよびビリルビン等があげられる。しかし 860m μ に吸収極大を示すビリルビン銅塩の生成反応は、以上の尿中色素は勿論、ビリベルジン、ウロビリノーゲン等にも認められず、ビリルビン特有の反応とみなされる。また以上の尿中色素およびリボフラビン、カロチンあるいはPSP試験、BSP試験、メチレン・ブルー色素を使つての胃液分泌試験等で尿中に排泄される各試験色素自体が本定量法の分光性に如何に影響するかをも検討したが、860m μ の波長が近赤外部に属することより、可視色素自体による影響は全く認められない。従つて尿中諸色素共存の条件でもなお良くビリルビンの直接定量が可能である。

図10は、ビリルビン以外にウロクローム、ウロビリノーゲンを種々の程度に含有する尿から、本

図10. Absorption spectra of samples carried out the Biuret reaction to determine bilirubin from some urines contained bilirubin and allied compounds.

法でそのビリルビンを定量するに、ビリルビン類似のこれら成分が如何に影響するかを検討した成績である。この成績からは、ビリルビンを本法で求める 860m μ の吸収は、ウロクローム、ウロビリノーゲン等の含量とは無関係で、Gmelin反応で調べたビリルビンの定性試験判定量にのみ良く比例することが示され、本法反応がビリルビンにのみ特異的であることを示唆するとともに、以上の2成分の非影響性が明らかにされた。

(6) 尿中アンモニウム・イオンの影響

尿中にはアンモニウム・イオンがかなり含まれ、黄疸尿では特に多いといわれているが、いまビリルビン銅塩生成に水酸化アンモニウムを加えると、図11に示す如く 860m μ の吸収低下と、これに反して 660m μ の吸収増加がみられ、漸次ビリベルジン様の緑色調を呈するようになる。これはビリルビン銅塩の銅がアンモニウム塩として解離し、遊離されるビリルビンに速やかな自動酸化がおこるための変化とみられるが、また一方Collisonら¹³⁾によるビリルビンアンモニウム塩の生成も考えられ、これがビリルビンのナトリウム塩、またカリウム塩等と類似した性質を示すことから、この自動酸化によつて生じた変化とも考えられる。従つてアンモニウム・イオンの共存はビリルビン銅塩に最も大きな影響を与えるものといえる。しかし幸に、このビリルビン銅塩にさらに蛋白を結合させると、図12に示すごとくこのアンモニウム・イオンの影響は全く消失し、安定なビリルビ

図11. Influence of ammonium ion for bilirubin copper complex.

図12. Influence of ammonium ion for bilirubin copper peptone complex.

ン銅蛋白複合体がえられる。このことはビリルビン銅塩に蛋白が複合することにより、この塩形成が安定化したことを示すものと思われる。

7) 尿中のビリルビン定量における本法と在来法との比較

a) 酸化法と本法との比較

酸化法とはビリルビンを酸化薬で酸化し、緑色の安定なビリベルジンとなし、比色定量する方法であるが、この酸化薬には、Fouchetの試薬が広く用いられ、Harrison⁷⁾, Watson⁸⁾らによる極めて簡易な半定量法と、Thoma¹⁰⁾らの分光学的定量法がほぼ確立したものとして今日臨床的にもかなり応用されている。著者はこの酸化法にThoma¹⁰⁾の定量法を選んで検討した。この方法はまず検量線の作製ではBeerの法則に従う直線をえたが、被検尿の試みではコロイド様の濁りを生じ、図13に示すごとく本法に比較しかなりのバラツキを示し正確な定量値は期待出来なかつた。しかしこの方法も稀釈尿を用いる時は割に一致した値をとるようになると思われる。

著者はまたアルカリ溶液中のビリルビンに硫酸亜鉛を作用し、酸化してえられるビリベルジン様呈色を分光学的に定量する酸化法を考案した。方法は表3に示す通りであるが、Thomaの酸化法に比し酸化速度がやゝ迅速で、また生成沈殿物も良く遠沈され、透明な反応液のえられる点等より勝れた方法と思われる。しかしこの色素も沈殿物に一部吸着されるためビリルビン濃度の高い

図13. Comparison of bilirubin copper complex method and biliverdin method.

表3. Quantitative determination of bilirubin in urine.
(Oxidation method by ZnSO_4).

Procedure :

図14. Comparison of determination values of bilirubin in alkaline bilirubin standard solution and in icteric urine.
(The oxidation method catalyzed by ZnSO_4 in alkaline condition).

尿、または沈殿生成の多い尿での値は図14に示すごとく明らかに低下の傾向を示した。さらに論ずれば、ビリルビンが酸化されて生ずるビリベルジ

ン様色素の分光学的性質は、種々の条件で多少の変化を示し一定した酸化物のえられないことから、分光学的方法では余り正確な値は期待出来ないように思われる。

b) ジアゾ化法と本法との比較

ジアゾ化法とは尿中ビリルビンをアゾビリルビンとして定量する方法で、Rabinowitch¹⁴⁾は尿中に投じたビリルビンが高感度で定量されることを報告しているが、このジアゾ反応は尿中にあるのはビリルビンにのみ固有のものではなく^{15) 16) 17)}、尿の常在色素であるウロクロームとも反応をおこし、また時間がたてばビリベルジンとも反応する非特異的なもので、この反応を直接尿で行なう場合には、この補正なしにはビリルビンの絶対値は求めたがい。しかしこの反応は感度が極めて高いことから、Van den Berghの試み以来、相次いで多くの人々により種々の定量法が案出され、1940年Goodson¹⁸⁾、1941年Scott¹⁹⁾、また最近ではGries¹¹⁾らにより改良され、漸次正確な定量値をうることに成功しているが、これらの方法にはいずれにもビリルビンの分離操作があり、またかなりの技術と時間を要する点で、臨床的応用として広く適用されるには至っていない。これに対し本法は、尿の前処理を必要とせず、またビリルビンのみを分離するような操作もなく、尿をそのまま使って出来る極めて簡易な定量法で、しかも30分以内に定量出来、1時間に約10検体の定量もないうる迅速法でもある。またこのビリルビン複合体の示す分光学的安定性も極めて高く、ジアゾ化法にみる条件反応や操作上における考慮の必要もなく、その測定精度は表4に示すごとく、任意黄疸尿につき10回の繰返し定量でえた各吸光度は1.0%の偏差で一致し、ジアゾ化法によるGriesらの1.6%の偏差よりやゝ上回る結果がえられた。従って本法は高精度かつ簡易な点で臨床検査法として充分適用しうる。

8) 回収試験

本法で回収試験を行なつたが、ビリルビン値既知の任意ビリルビン血清をビリルビン値未知の各

表4. Comparison of duplication values obtained by bilirubin copper complex method and azobilirubin method for urinary bilirubin.

Expt. No.	Bilirubin Copper Complex Method (Nakagawa)		Azobilirubin Method
	Sample A	Sample B	Sample C
20			1.368
19			1.420
18			1.388
17			1.436
16			1.416
15			1.400
14			1.404
13			1.440
12			1.416
11			1.400
10		1.25	1.445
9		1.26	1.392
8		1.24	1.430
7	0.196	1.26	1.372
6	0.197	1.23	1.388
5	0.208	1.25	1.399
4	0.204	1.26	1.425
3	0.208	1.23	1.419
2	0.196	1.27	1.431
1	0.198	1.24	1.392
Mean	0.201	1.25	1.409
σ	± 0.002	± 0.013	± 0.0022

The data by azobilirubin method was cited from Klin. Wschrft 35: 81, 1957 reported by Gies.

Determination values showed in optical density (-log T).

任意ビリルビン尿に混合し定量してえた回収率は表5に示すごとく102%の高率を示した。

表5. Recovery test of bilirubin by bilirubin copper complex method.

Unknown Icteric Urines	Volume of Icteric Urine in 2.25 ml. of Solution	Extinction in -log T (a)	Volumes of Urine (U) and Serum (S) in 2.25 ml.	Extinction in -log T (b)	$\beta - \alpha$	Bilirubin Content in the Icteric Serum
U ₁	1.0 ml	0.015	U ₁ 1.0 ml S 0.25 ml	0.155	0.140	882 mg/dl
U ₂	1.0 ml	0.100	U ₂ 1.0 ml S 0.25 ml	0.243	0.143	900 mg/dl
U ₃	1.0 ml	0.225	U ₃ 1.0 ml S 0.25 ml	0.355	0.130	810 mg/dl
Examined bilirubin content in an icteric serum $\beta - \alpha = 0.138 \begin{pmatrix} +0.005 \\ -0.008 \end{pmatrix}$					Mean	863 mg/dl

Recovery rate of the bilirubin content in some icteric urines mixed the constant volume of an icteric serum containing 8.46 mg of bilirubin per 100 ml.

$$\frac{0.138}{0.135} \times 100 \text{ or } \frac{863}{846} \times 100 = 102\%$$

Sample: An icteric serum of which bilirubin content is previously estimated.

○Bilirubin content of the sample (S):
8.46 mg/dl.

○Extinction value of the bilirubin copper complex formed in 2.25 ml of the solution containing 0.25 ml of the sample:
0.135 in-log T.

9) 本定量法による血清および尿中ビリルビンの正常値

a) 血清ビリルビンの正常値:

任意ビリルビン血清を生理的食塩水で稀釈し、モイレングラハト値系列を作り、その各ビリルビン値を本法で求めた結果、図15に示すごとくモイレングラハト値に良く平行した相関値がえられた。こゝで今日正常人血清のモイレングラハト値は4~6とされ、これに相当するビリルビン値は Evelyn-Malloy²⁰⁾の方法では 0.2~0.8mg/dlとされているが、これに対し本法では0.54~0.77mg/dlの値がえられ、その四捨五入値 0.5~0.8mg/dlの値は従来法での値と全く一致した。

図15. Comparison with the Meulengracht's units and the bilirubin concentrations determined by bilirubin copper complex method.

b) 尿中ビリルビンの正常値:

本法で尿中ビリルビンの定量を試みた結果、尿中ビリルビン濃度はその時の尿量にほぼ反比例した値を示すことより濃度値として求めることは当をえないと思われる。従つて著者はつぎの条件を設けた。すなわち早朝空腹時まず膀胱内貯留尿を充分に排泄させ、これより丁度1時間後に自然排尿を行なわせ、その新鮮尿の全部を容器に受け、まずその尿量を測定し、ついでそのビリルビン濃度を求め、この両者から空腹時1時間に排泄されるビリルビン量を算出した。早朝空腹時1時間に尿中に排泄されるビリルビン値を、健常人につき求めてみるとつぎの根拠より約 0.12mg/hr以下と推定された。すなわち、1)多くの健常人につきその尿中ビリルビン値を調べた結果、その濃度は約 0.2mg/dl以下と推定され、また早朝空腹時1時

間に排泄される尿量は多くて約60mlとされることより、その両者を掛けてえられる0.12mg/hrの値は健常人の上限値とみなされること、2)極く軽度の潜在性黄疸患者で、その血清ビリルビン値と尿ビリルビン量との相関を治療経過を追つて観察すると、血清ビリルビン値が1mg/dl前後の値を示す頃より、尿中へのビリルビン排泄量も0.12mg/hr前後となり、比例しながらともに正常値に移行すること、3)球結膜に認めるごく軽度の黄疸色調は、尿中へのビリルビン排泄が0.12mg/hr前後値を示す頃よりほぼ消退すること、等の生理的ならびに臨床的事実に基づいた値である。Griesらも単位時間当りの尿中排泄量を重視し、健常人の空腹時における上限値を0.25mg/2hrsと推定しているが、著者の推定値も期せずしてこれに良く一致した。

考 案

著者はビリルビン銅塩が他の塩形成にみられぬ

図16. Hypothesis of changing mechanism from bilirubin to bilirubin complexes or biliverdin and its complex.

特異的分光性の示すことを認めたが、この銅塩にさらに蛋白を結合させいわゆるビリルビン銅蛋白複合体とするとき、銅の解離による自動酸化がほとんど抑制され、同じ分光性をもつ極めて安定なものとなることを見出した。著者はこれにつき、アルカリ条件で銅はビリルビンの第Ⅱ、第Ⅲピロール核窒素と結合してビリルビン銅塩を作り、また蛋白はビリルビンのプロピオン酸カルボキシル基と結合し、いわゆる三者複合体を生成するものとみなし、この分子内で銅はさらに蛋白のイミダゾール窒素とも比較的強い配位結合をおこすものと考えられ、この結合により解離し易い銅塩形成を補強し、安定なビリルビン銅蛋白複合体を形成するものと想定した (図16)。

本定量法は総ビリルビンの定量法であつて、Hijmans Van den Berghの直接ビリルビン、間接ビリルビンの分画定量については目下のところ期待出来ないが、本法を取入れた分画定量法については今後さらに研究を試みたい。

黄疸とその尿中ビリルビンの定量的考察は、黄疸の実態を詳細に追求せんとする時、常に念頭におよぶの検討事項かと思われる。しかしこの問題が今日なお盲点のまゝ残されている実状は何によるのであろうか。その1つには尿中ビリルビンの本態が充分解明されていないこと、2つには尿中ビリルビンの簡易かつ精度の高い定量法のないこと等に帰因するものゝように思われる。尿中ビリルビンは血清ビリルビンに比し、より不安定なものであることは衆知のことであるが、これが尿という溶媒によるものか、あるいは尿ビリルビン自体によるものかは未だ不明であり、この性質がその定量的考察の進歩をはぐんで来たことも事実である。著者は期せずしてビリルビンの特性反応を見出し、この反応を利用する時、尿中ビリルビンのみならず、あらゆる検体中のビリルビンを直接かつ簡易な方法で定量しうること成功したが、この定量法により黄疸時におけるビリルビンの移動ならびに代謝等がより詳細に窺えうのみならず、未だ充分に検索されていないビリルビン腎クリアランスの問題も漸次解明されるに及び、黄疸

の临床上において、この分野からも黄疸の病態と診断を推知する手がかりを提供しうるものと思われる。

結 論

1) 波長 860m μ に吸収極大を示すビリルビン銅塩の分光学的特性を利用した血清ならびに尿中ビリルビンの新定量法を考案した。

2) 本定量法は在来法に比し簡易かつ安定で、その測定精度は尿中ビリルビンをも 1.0%の偏差で定量しうる。

3) 本定量法は溶血した血清でも、また尿では常在色素のみならず各種介入色素にも影響されず、そのまゝで高精度に定量出来る。

4) 本法による血清ビリルビンの正常値は、在来法による値と全く一致した。

5) 著者は単位時間当りの尿中ビリルビン排泄量を検討し、いわゆる健康者では0.12mg/hr以下の排泄を推定したが、この値はGriesらによつて求められた0.25mg/2 hrsを上限とする推定値に全く一致した。

文 献

- 1) Van den Bergh, A.A.H. et al.: Deut. Arch. f. Klin. Med., 110 : 540, 1913, Der Gallenfarbstoff im Blute, Leiden, 1918. —2) Lichtman, S.S.: Disease of the Liver, gallbladder and bile ducts, Philadelphia, 1942, Lea and Febiger, 906 pp. —3) Lepehne, G.D.: Deut. Arch. f. Klin. Med., 132 : 96, 1920. —4) McNee, J.W.: Brit. med. J., 1 : 52, 1925. —5) Naumann, H.N.: Biochem. J., 30 : 762, 1021, 1936. —6) Fouchet, A.: Journ. de Pharmacie et de Chimie, 17 : 44, 1918. —7) Harrison, D.C.: Biochem. J., 28 : 2056, 1934. —8) Watson, C.J. et al.: J. Lab. clin. Med., 31 : 914, 1946. —9) Hawkinson, V.B.S. et al.: J. Amer. med. Ass., 129 : 514, 1945. —10) Thoma, G.E.: J. Lab. clin. Med., 33 : 1189, 1948. —11) Gries, F.G. et al.: Klin. Wschr., 35 : 81, 1957. —12) Lemberg, R.: Biochem. J., 28 : 1, 978, 1934. —13) Collinson, G.A.: Brit. Med. J., 1 : 1081, 1926. —14) Rabinowitch, I.M.: J. biol. Chem., 97 : 163, 1932. —15) Davis, D.T. et al.: Brit. J. exp. Path., 8 : 316, 1927. —16) Roberts, M.: Brit. J. exp. Path., 9 : 107, 1928. —17) Dastre, & Floresco, Cited by Van den Bergh²⁾. —18) Goodson, W.H. et al.: J. Lab. clin. Med., 26 : 42, 1940. —19) Scott, L.D.: Brit. J. exp. Path., 22 : 17, 1941. —20) Evelllyn, K.A. et al.: J. biol. Chem., 119 : 481, 1937.