

胆汁色素に関する研究

第 II 編

胆汁中にみとめられる diazo 陽性非 bilirubin 分面の分光化学的性状と臨床的意義について

岡山大学医学部第一内科学教室 (主任: 小坂 淳夫教授)

広 畑 衛

[昭和50年4月21日受稿]

緒 言

間接 bilirubin が光により容易に、かつ急速に変化し、崩壊あるいは他の物質に変わることが知られている¹⁾²⁾これを臨床的に応用したのが新生児過 bilirubin 血症に対する光療法である³⁾⁴⁾しかし光を照射することにより、bilirubin がいかなる変化を受けて、いかなる物質に変換されていくかについて、近年色々な研究が行なわれている¹⁾²⁾³⁾⁷⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾が、いまだ完全なる解明がなされているとは言い難い。1963年 Schmid⁵⁾は、Gunn rat に光を照射する実験により血清 bilirubin の低下ともない、胆汁中・尿中に diazo 反応陽性物質の増加を認め、bilirubin が光により、より極性の高い水溶性の diazo 反応陽性物質として排泄される可能性を示唆した。1967年 Ostrow⁷⁾は結晶 bilirubin 溶液に光を照射してえられた物質と、Gunn rat の胆汁中に排泄される黄色物質が同一の性質のものであり、ともに diazo 反応陽性であるとしている。

今回著者は、各種肝・胆道系疾患患者の胆汁中の bilirubin 分面を除去した後にえられる水溶性の黄色物質より diazo 反応陽性物質を抽出・測定し、その物質と bilirubin の光分解産物との性状を比較検討すると共に、その臨床的意義についても検討した。さらにこの際えられた azo 色素と、間接 bilirubin および既知の抱合型直接 bilirubin の azo 色素との分光化学的性状を比較検討した。

検索対象ならびに実験方法

(1) 対象

対象は岡山大学第一内科に入院中の各種肝・胆道系疾患患者39例 (急性肝炎6例、慢性肝炎11例、肝硬変症7例、体質性黄疸 (Gilbert 症候群) 6例、胆のう症9例) および対照として肝機能正常な6名の健康な医学部学生の総計45例である。

2) 実験方法

① 胆汁採取法

胆汁採取は、早朝空腹時に十二指腸ゾンデを挿入しX線透視下にゾンデの先端が十二指腸下行脚に到達しているのを確認の上、A胆汁を採取した後、olive 油10 ml にてB胆汁の排泄をはかり、えられたB胆汁10 ml を試料とした。

② 非 bilirubin 分面物質の抽出法

胆汁より非 bilirubin 分面物質を抽出する方法としては、胆汁中の bilirubin 分面を除去する目的で Weber and Schalm⁶⁾の方法にならい、胆汁10 ml に等量の0.1N NaOH を加え約30分間冷暗所に放置して、bilirubin glucuronide を間接 bilirubin に変化させたのち酢酸酸性化 (pH 2.0) で chloroform に抽出し、残余の淡黄色の上清に、Ostrow⁷⁾Noir⁸⁾の方法にならい、約4倍量の ethanol を加え振盪後遠沈濾過し、減圧吸引して前量に復させ、ついでこれを硫酸で塩析し、遠沈後にえられた上清を n-butanol に抽出分離し、この n-butanol 層に8倍量の petroleum ether を加え混和する。さらに少量の蒸溜水を加えて抽出される淡黄色の水層を非 bilirubin 分面物質とした。

結晶 bilirubin より非 bilirubin 分面成分の抽出法は、結晶 bilirubin (Sigma) の10 mg/dl chloroform 溶液100 ml を作製し、20 W 蛍光灯下に磁気攪

拌器をもちいて攪拌しながら2時間以上照射することにより bilirubin 溶液が橙色から暗緑色ないし淡黄色に変色した時点で、胆汁よりの非 bilirubin 分画成分の抽出法と同一の操作を行なった。

③ 各種抱合型 bilirubin の作製法

bilirubin glucuronide は Talafant⁽¹⁾—井沢⁽¹¹⁾の胆汁より acetone 末をもちいた分画分離法で精製した。bilirubin-phosphate 分画は Billing⁽¹²⁾の方法により pigment II を分画分離し、近藤⁽¹³⁾の方法により作製した。bilirubin sulfonate 分画は、Weber and Schalm⁽⁴⁾の方法により、alkali 処理後、塩酸で pH2.0 としたのち、chloroform 抽出したものを減圧乾固し、その水溶部分を用いた。bilirubin dimethylester は Küster⁽¹⁴⁾の diazomethane を用いた方法により調整し、井沢⁽¹¹⁾の方法により分離精製した。

④ 各種 azo 色素の調整法

Ehrlich 氏 diazo 試薬は、スルファニール酸 1g を濃塩酸 15 ml に溶かし、水を加えて 1000 ml にした第 1 液 10 ml と、亜硝酸ナトリウム 0.5g を水 100 ml に溶かした第 2 液 0.3 ml を使用の都度混じて作製し使用した。

結晶 bilirubin と bilirubin dimethylester は chloroform 溶液としたものを 1 ml とり、これに methanol 3.5 ml を加え diazo 混液 0.5 ml を加えて調整した。bilirubin diglucuronide, bilirubin phosphate, bilirubin sulfonate は水溶液 4.5 ml に diazo 混液 0.5 ml を加えて調整した。非 bilirubin 分画成分は、水溶液 4.5 ml に diazo 混液 0.5 ml を加えて調整した。

酸性 azo 色素は上記の diazo 反応液にさらに塩酸 1 ml を加えて調整した。alkali 性 azo 色素は、5 N NaOH 1 ml を加えることにより調整した。pH の測定は堀場社製 pH メーターで測定した。

⑤ 非 bilirubin 分画成分および各種 azo 色素の吸収曲線測定法

島津社製自記分光光度計 UV 200 を用いて、370～700nm の可視部にて測定した。

⑥ 非 bilirubin 分画成分の定性

非 bilirubin 分画成分の定性反応としては、tetrapyrrol の定性反応として Rosin 反応、Gmelin 反応を行ない、amino 酸の定性には Ninhydrin 反応を、胆汁酸の定性には molybden 酸反応、還元物質に対しては Benzidine 反応を、さらに磷酸 ester に対しては molybden 酸反応をもちいて定性した。dipyrrol 物質に対する反応としては pentdypent 反応⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾をおこない定性した。

⑦ 非 bilirubin 分画成分の定量

定量は、試料としてもちいた胆汁 10 ml より生成された azo 色素中に含まれる非 bilirubin 分画成分の azo 色素量を総 azo 色素量に対する百分率として求めた。

⑧ 非 bilirubin 分画成分および各種 bilirubin azo 色素の薄層 chromatogram (T. L. C.)

T. L. C. は Merck 社製 Kieselgel G nach Stahl (No. 7731) を厚さ 0.5 mm の固定層として、n-butanol: ethanol: H₂O (4:1:2 v/v) の溶媒系で室温下 (15～20℃) で 15 cm 以上展開した。試料は可及的少量の methanol に溶解し 5 mm 以内の点または band として薄層上に塗布した。

⑨ 非 bilirubin 分画成分 azo 色素の methyl 化
非 bilirubin 分画成分の azo 色素を減圧乾固後 methanol に溶解し、これに diazomethane の ether 溶液を加え、methyl 化を行なったのち減圧乾固することにより調整した。

3) 肝機能検査

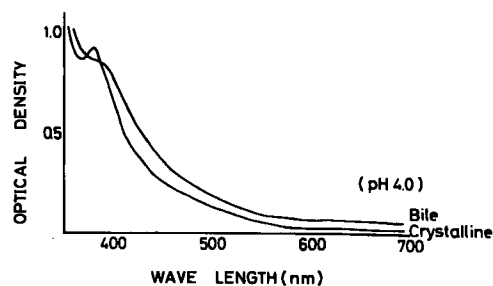
肝機能検査としては、血清 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 値, alkaline phosphatase (Alp) (Bessy Lowry 単位), thymol 濁濁反応 (TTT, Maclagan 氏単位), 硫酸亜鉛試験 (ZnTT, Kunkel 氏単位), γ -globulin 量, cholesterol, indocyanine green (ICG) 血漿消失率 (K_{ICG}) の測定を行なった。

成 績

1) 非 bilirubin 分画成分の吸収曲線

胆汁および結晶 bilirubin より抽出された非 bilirubin 分画成分の水溶液の吸収曲線は (図 1) で、ともに pH 4.0 で 380 nm に膨隆あるいは峰を有する曲線であった。

図 1 Absorption spectra of non bilirubin fraction from bile and crystalline bilirubin.



2) 非 bilirubin 分画成分の定性

胆汁より抽出された非 bilirubin 分画成分および結晶 bilirubin の chloroform 溶液を蛍光灯で照射することによりえられた非 bilirubin 分画成分について定性反応を行なった結果は (表1) のように、

Table 1. Qualitative examination of non-bilirubin fraction.

	crystalline	bile
Ninhydrin reaction	(-)	(-)
Benzidine reaction	(-)	(-)
Molybdic acid reaction	(-)	(-)
Phosphomolybdic reaction	(-)	(-)
Diazo reaction	(+)	(+)
Pentdyopent reaction	(++)	(+)

crystalline: prepared from crystalline bilirubin by photoradiation.
 bile: extracted from human bile by Ostrow's method with minor modification.

amino 酸に対する Ninhydrin 反応, 酸化物に対する Benzidine 反応, 燐酸 ester に対する molybden 酸反応, 胆汁酸に対する燐 molybden 酸反応は両者共にすべて陰性であった。また tetrapyrrol に対する Rosin 反応, Gmelin 反応は陰性であったが, diazo 反応は両者共に陽性で, その吸収曲線は (図2) のごとく550nm に peak を有する曲線であり, 両者間に吸収極大上の差は認められなかった。(pH 2.4)

本物質に対する pentdyopent 反応は, 両者共に直接陽性を呈した。その反応は結晶 bilirubin の蛍光灯照射後の chloroform 溶液より抽出した非 bilirubin 分画成分においてより著明に出現した。その吸収曲線は (図3) のごとく525nm に吸収極大を有する特有の曲線であった。

3) 各種肝・胆道系疾患患者の胆汁中における非 bilirubin 分画

各種肝・胆道系疾患患者の胆汁10 ml 中に含まれる総 azo 色素中の非 bilirubin 分画成分の azo 色素量の百分率は (図4) のようである。健康者6例では最高1.7%, 最低0.3%で, 平均0.78%であった。急性肝炎6例では最高1.5%, 最低0.5%で平均1.15%であった。慢性肝炎11例では最高3.0%, 最低0.05%, 平均1.32%, 肝硬変症7例では最高2.8%, 最低0.5%, 平均1.83%, 胆のう症9例では最高2.6%, 最低0.4%, 平均1.09%, 体質性黄疸6例では最高2.9%, 最低1.2%, 平均1.85%であった。

図2 Absorption spectra of pentdyopent reaction of non bilirubin fraction from bile and crystalline bilirubin.

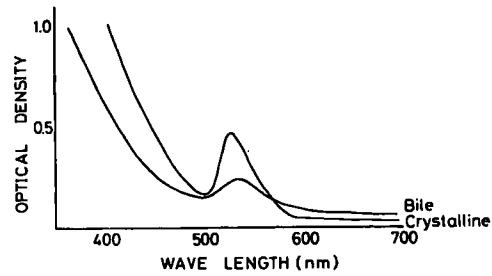


図3 Absorption spectra of azo pigment of non bilirubin fraction from bile and crystalline bilirubin.

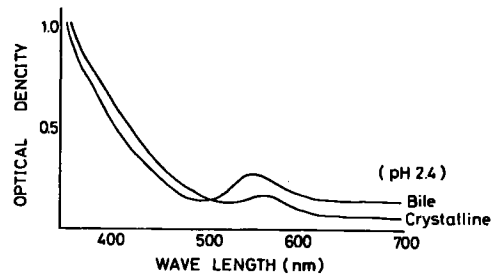
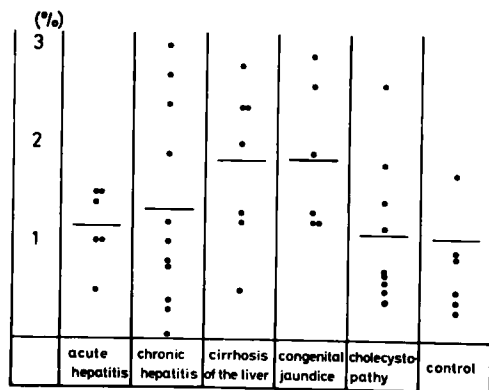


図4 Percentage of non bilirubin fraction of direct bilirubin in various liver diseases.



また各群間の平均値の間の有意差の検定をおこなったのが (表2) である。健康者群に比較して慢性肝炎, 肝硬変症, 体質性黄疸群では有意の高値を示した。一方急性肝炎, 慢性肝炎, 肝硬変症, 胆のう症および体質性黄疸の各群間には有意の差は認められなかった。

Table 2. Examination on T-distribution of two groups.

P < T	Hepatitis acuta (n = 6)	Hepatitis chronica (n = 11)	Cirrhosis of the liver (n = 7)	Cholecystopathy (n = 9)	Constitutional jaundice (n = 6)	Control (n = 6)
Hepatitis acuta		0.3874	1.7969	0.1823	2.0235	0.4429
Hepatitis chronica	—		1.0984	0.5594	1.1109	2.7759
Cirrhosis of the liver	—	—		1.8727	0.0447	2.6384
Cholecystopathy	—	—	—		1.9500	0.7167
Constitutional jaundice	—	—	—	—		2.8823
Control	—	0.02	0.05	—	0.02	

4) 非 bilirubin 分画成分と肝機能検査

総 azo 色素中に占める非 bilirubin 分画 azo 色素の占有率 (以下非 bilirubin 分画成分占有率) と肝機能検査成績の間には、(図5、図6) のように血清 transaminase 値 (GOT, GPT) とは相関は認められなかったが、ZnTT と占有率との間には (図7) のように相関係数0.59, 危険率1%以下で、また TTT との間には (図8) のように相関係数0.45, 危険率5%以下で、 γ -globulin 量とは (図9) のように相関係数0.47, 5%以下の危険率で占有率との間に有

意の相関関係を認めた。その他, cholesterol, Al-P, K_{icc} と占有率との関係は (図10, 図11, 図12) のように有意の相関関係は認められなかった。

5) 各種 azo 色素の pH による吸収極大の変化,

① azo 色素の吸収極大

(表3) のごとく pH2.0 での azo 色素の吸収極大は、間接 bilirubin で540~550nmで、直接 bilirubin のうち bilirubin diglucuronide と bilirubin phosphate は555~560nmに吸収極大を認め、bilirubin sulfonate の吸収極大は535~545nmであった。また

図5 Correlation between non bilirubin fraction and s-GOT activity.

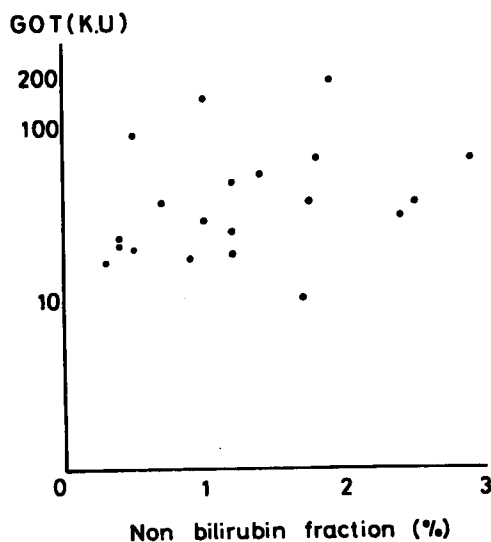
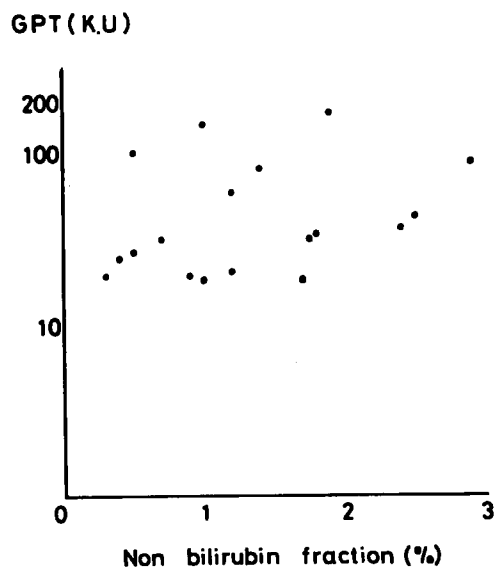
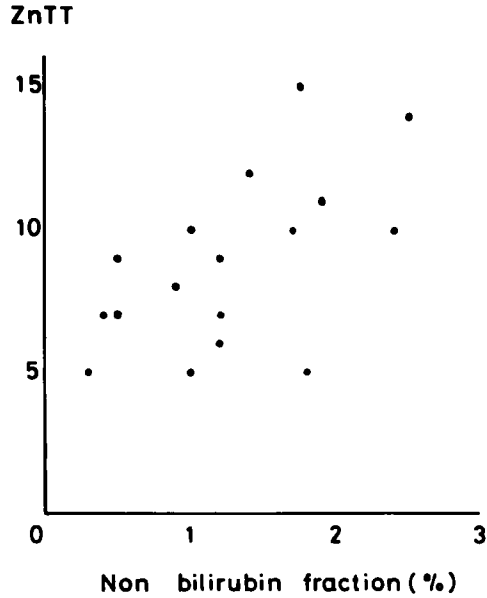


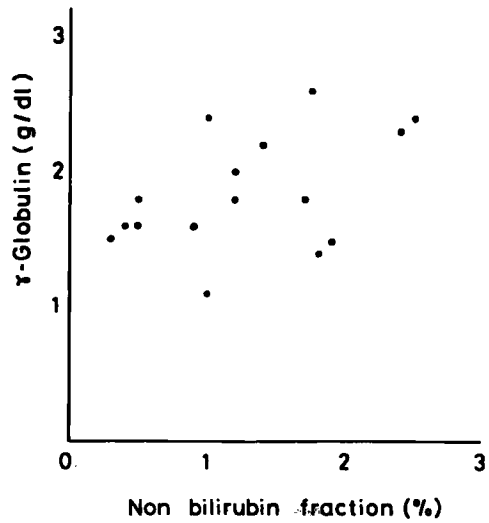
図6 Correlation between non bilirubin fraction and s-GPT activity.



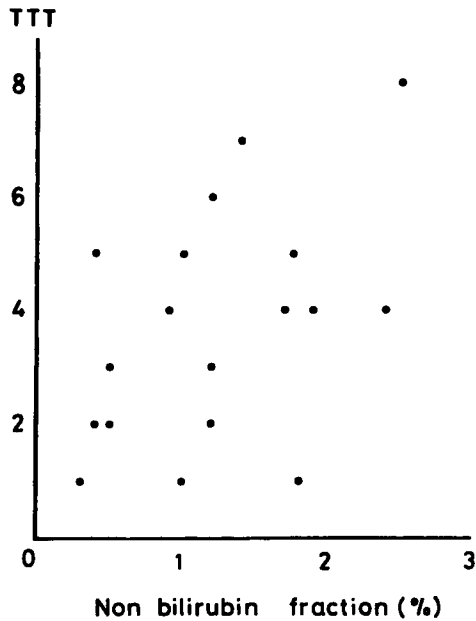
☒7 Correlation between non bilirubin fraction and ZnTT (Kunkel unit).



☒9 Correlation between non bilirubin fraction and γ -globulin.



☒8 Correlation between non bilirubin fraction and TTT (Maclagan unit).



☒10 Correlation between non bilirubin fraction and Al-p (Bessy-Lawry unit).

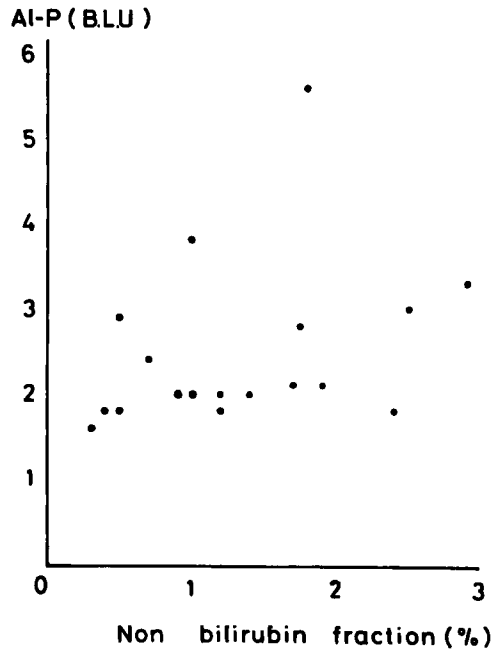


図11 Correlation between non bilirubin fraction and concentration of serum cholesterol.

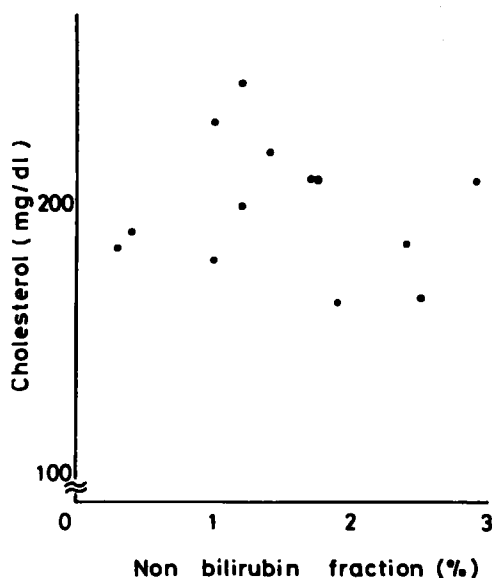


図12 Correlation between non bilirubin fraction and K_{ICG}

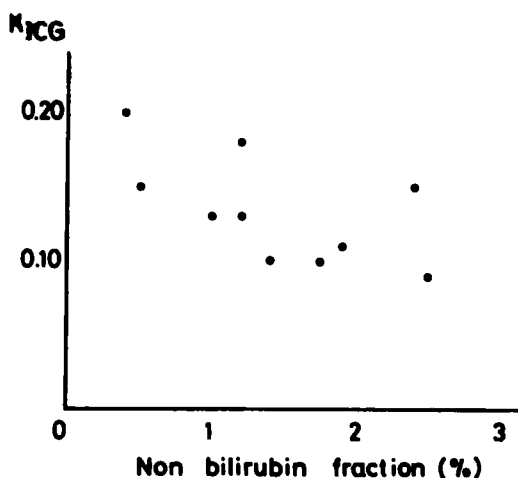


Table 3. Absorptions maximum of various bilirubin azo pigments.

	Acid-azo pigment	Azo pigment	Alkali-azo pigment
1. Indirect bilirubin	575-580	540-550	590
2. Direct bilirubin			
Bili. diglucuronide	560-570	555-560	585
Bili. sulfonate	565-575	535-545	590
Bili. dimethylester	565-575	540-550	590
Bili. phosphate	555-565	550-560	585
3. Non-bilirubin fraction	545-555	545-555	-

Wavelength (nm)

methylation をした bilirubin dimethylester の azo 色素は540~550nm に、非 bilirubin 分画成分の azo 色素は545~555nm その吸収極大を有していた。

② 酸性 azo 色素の吸収極大

酸性 azo 色素の吸収極大の測定はすべて pH 1.0 以下でおこなった。間接 bilirubin は575~580nm にその吸収極大を認め、bilirubin diglucuronide, bilirubin phosphate は560~570nm, 555~565nm にその吸収極大を認め、bilirubin sulfonate と bilirubin dimethylester では565~575nm にその吸収極大を認めた。非 bilirubin 分画成分の酸性 azo 色素は550nm と移動を認めなかった。

③ alkali 性 azo 色素の吸収極大

alkali 性 azo 色素は、pH 12~13 で測定したが、

間接 bilirubin は590nm に、また直接 bilirubin の、bilirubin diglucuronide, bilirubin dimethylester は585nm に、sulfonate と phosphate は590nm に吸収極大が移動した。しかし非 bilirubin 分画成分の alkali 性 azo 色素は alkali 化後その褪色が急速なために alkali 側での吸収極大の測定は不能であった。

6) 各種 azo 色素の薄層 chromatogram (T. L. C.)

(表4) のように、結晶 bilirubin より作製した間接 bilirubin azo 色素の T. L. C. による Rf 値は 0.64~0.70 と 0.46~0.49 であった。塩型 bilirubin は 0.39~0.44 に、ester 型 bilirubin は 0.41~0.48, 0.30~0.35, 0.09~0.12 であった。bilirubin dim-

Table 4. Thin layer chromatogram of various azo-pigments.

azo-pigment	Rf
Indirect bilirubin	0.64—0.70
	0.46—0.49
Salt-form bilirubin	0.39—0.44
Ester-form bilirubin	0.41—0.48
	0.30—0.35
	0.09—0.12
Bilirubin dimethylester	0.68—0.72
Non-bilirubin fraction	0.61—0.63
	0.55—0.57
	0.38—0.45
	0.15—0.17
Non-bilirubin fraction (methylation)	0.41—0.45

ethylester の azo 色素の Rf 値は 0.68—0.72 であった。非 bilirubin 分画成分 azo 色素の T. L. C. による Rf 値は 0.55—0.57, 0.15—0.17 に常に認められる 2 spot と 0.61—0.63, 0.38—0.45 に認められる 2 spot の計 4 spot が出現した。その中一番強い Rf 0.55—0.57 の spot に methylation を行なった後の azo 色素の Rf 値は 0.41—0.45 であった。

考 案

胆汁色素の排泄は、bilirubin が肝臓において glucuronic 酸抱合などの抱合を受けたのち胆汁中に排泄されるのが主経路であるが、この正常の経路が障害、あるいは欠如している場合、胆汁色素を前述の経路以外で体外に排泄する必要が生じる。現在認められているその様な経路²¹⁾²²⁾として、先天性 glucuronyl transferase 欠損を示す non hemolytic jaundiced (Gunn) rat や、ヒトの Crigler-Najjar 症候群において、bilirubin が抱合を受けることなく変化して、より極性の水溶性黄色物質として胆汁中に排泄されることが認められている。その主たる機序は光による酸化であろうとされている。²³⁾ bilirubin に対する光の影響について Ostrow²⁴⁾ は、bilirubin C²⁴⁾ を種々の溶質に溶解させ、光を照射することにより、bilirubin の変化の速度、産生産物の特性について観察し、bilirubin が alkali 性溶液中において容易に変化するが、光を照射することによりさらにその崩壊速度が増大することを認めている。Gray²⁵⁾ も間接 bilirubin の chloroform 溶液に日光を照射する実験より産生される黄色物質の分光化学的性状と paper chromatography の成績より dipyrrol 物質と monopyrrol 物質が存在することを明らかにした。また

大西²⁶⁾ は、新生児過 bilirubin 血症の光療法において尿中に黄色物質の増加を認め、pentdyopent 反応が陽性であることより、dipyrrol 物質であるとし、これは光により bilirubin が biliverdin を経て水溶性の dipyrrol 物質に変化する過程をとるものとしている。

しかし、他方 Mannito ら²¹⁾²²⁾ は bilirubin が光により化学反応をおこして水溶性となるが、これは alkali 基や glutathion などとの結合によるためであるとし、薄層 chromatography で分離したのち、核磁気共鳴スペクトル、質量分析で確認したとしている。著者が胆汁からあるいは結晶 bilirubin の照射後の chloroform 溶液から bilirubin 成分を除去した後に得た非 bilirubin 分画の黄色物質の吸収曲線は 380nm に peak あるいは shoulder を有する曲線であり、Ostrow²⁴⁾ や Krasner²⁷⁾ のいう photodecomposition substance の吸収曲線とほぼ一致した。またこの胆汁あるいは結晶 bilirubin の照射後に抽出される黄色物質の pentdyopent 反応は、明らかに直接反応陽性で、この物質中には dipyrrol 物質が存在することが示された。この黄色物質は diazo 反応は陰性であるとする説もあるが²⁸⁾ 著者の成績ではこの物質の diazo 反応は、既知の azo 色素とは異なり速度も遅く反応力も弱いながらも直接 diazo 反応は陽性であり、550nm に peak を形成し、Schmid, Ostrow の報告に一致した。これらの事実は Gray らの黄色物質が単一物質でないとする成績や、著者らの T. L. C. 上で数種の spot が認められたことよりして diazo 反応陽性黄色物質と陰性のものが存在することが推定される。

ところで bilirubin は glucuronic 酸、硫酸、磷酸、glutathion 等と抱合することにより水溶性が高まり、肝細胞より胆汁中に排泄が容易になることが知られており、Mannito²¹⁾²²⁾ が bilirubin の水溶化は photoaddition だとする説を支持する有利な点かとも思われるが、照射によりえられた黄色水溶性物質についての定性反応では alkali 基や glutathion などすべて陰性であり、彼のいう photoaddition によるものとは考えられなかった。(表 1)

肝・胆道系疾患における非 bilirubin 分画成分の diazo 反応の総直接 bilirubin に対する百分率の平均値は、慢性肝炎・肝硬変症・体質性黄疸群は対照群に比し統計学的に有意の差をなし、先天的に glucuronyl transferase の低下を有する体質性黄疸の場合、また正常なる機能を有する肝細胞数の減少に

よる glucuronyl transferase の低下の存在する慢性肝炎、肝硬変症の場合には非 bilirubin 分画占有率の上昇することが認められた。この理由の一つとして光による bilirubin の分解、あるいはそれと同一の機序にもとづく分解による排泄の増加が考えられ、新生児過 bilirubin 血症の治療法としての光療法がその黄疸の半減期の短縮に明らかに有効であること、また流行性肝炎・閉塞性黄疸による患者の黄疸血清に光を照射することにより血清 bilirubin 値の著明な低下を認めている Blondheim²⁶⁾ の報告などから考えると、肝・胆道系疾患有黄疸患者の場合には、胆汁中に易水溶性の非 bilirubin 分画物質で、diazo 反応陽性成分の増加が考えられ、著者の検討した無黄疸患者の占有率の増加の事実からある程度、肝細胞障害時の bilirubin 排泄機転に代償的に光ないしはそれと同一の作用が関与しているとの事実をえたものといえよう。

bilirubin azo 色素の吸収極大に関しては、間接型 bilirubin と ester 型 bilirubin の azo 色素、および bilirubin dimethylester の azo 色素の吸収極大がそれぞれ異なることは教室金田²⁷⁾ 有地²⁸⁾ により報告されているが、さらに種々の直接型 bilirubin を作製し、この非 bilirubin 分画成分の azo 色素の吸収極大と比較すると、非 bilirubin 分画成分の azo 色素の吸収極大は間接 bilirubin のそれと類似していたが、pH の酸性化によりその吸収極大は移動せず、また alkali 性化ではその褪色が極めて急速で吸収極大の測定は不能であるなど、他の azo 色素に見られない特徴が認められた。

また T. L. C. においても非 bilirubin 分画成分の azo 色素の Rf 値は、既知の bilirubin の azo 色素の Rf 値とは異なる成績を示した。このことは、生じた dipyrrol 物質は bilirubin が diazo 反応にさいし、その中央の methylene 基の部位で切れて生ずる dipyrrol 物質とは異っていることを示しており、また主たる spot である Rf 0.55~0.57 の色素は methylation によりその前後の Rf 値が移動することを考えると、この dipyrrol 物質は propion 酸基が遊離の

型であると思われ、このことは bilirubin が光により崩壊し 5, 5'-diformyl dipyrrolmethane の型をとっているという Ostrow²⁹⁾ の説をあるていど裏付けるものであったが、Gray らが光分解により数種の物質が出来ることを報告しており、T. L. C. にて2つ以上の spot が常に出現することなど、1物質以上の存在が推測され、bilirubin の光による変化は必ずしも一定の過程をとり1物質になるのではないと考えられた。

結 論

各種肝・胆道系疾患患者の胆汁および蛍光燈照射後の結晶 bilirubin より抽出された非 bilirubin 分画成分について検討し、diazo 反応陽性の非 bilirubin 分画の性状とその臨床的意義について次の結果をえた。

1) この成分は、水溶性、diazo 反応陽性の黄色物質で、その吸収曲線は水溶液 (pH2.4) で吸収極大は545~555nmを示し、その酸性 azo 色素の吸収極大も同一であった。

2) 非 bilirubin 分画の azo 色素の T. L. C. では常に2つ以上の spot が出現し、1物質以上の存在が考えられた。また非 bilirubin 分画の azo 色素の T. L. C. による Rf 値は、既知の azo 色素の Rf 値とは異っていること、その1つは methylation により Rf 値が移動することを認めた。

3) 各種肝・胆道系疾患患者の胆汁中におけるこの成分の総 bilirubin 中に占める比率は、慢性肝炎、肝硬変症、体質性黄疸群の順に高値を示し、対照群より有意の増加が認められた。

4) 肝機能検査との間には ZnTT, TTT および γ -globulin 量との間に有意の相関が認められた。

5) 以上のことより肝細胞障害や bilirubin 抱合酵素障害時には非 bilirubin 分画が代償的に増加するものと考えられた。

(稿を終るにあたり御指導いただきました近藤忠亮講師に深謝します。)

文 献

- 1) Cremer, R. J., Perryman, P. W., Richards, D. H. & Holbrook, B.: Photo-sensitivity of serum bilirubin. *Biochem. J.*, **66**, 60 p, 1957.
- 2) With, T. K.: Sensitivity of serum bilirubin to oxygen and light. In bile pigments. Academic Press. New York & London. pp. 351, 1968.
- 3) Cremer, R. J. & Perryman, P. W.: Influence of light on the hyperbilirubinemia of infants. *The Lancet*, **1**. : 1094, 1958.
- 4) Lucey, J. F.: Nursery illumination as a factor in neonatal hyperbilirubinemia. *Pediatrics.*, **44** : 155, 1969.
- 5) Schmid, R. & Hammaker, L.: Metabolism and disposition of C¹⁴-bilirubin in congenital non-hemolytic jaundice. *J. Clin. Invest.*, **42** : 1720, 1963.
- 6) Ostrow, J. D., Hammaker, L. & Schmid, R.: The preparation of crystalline bilirubin-C¹⁴. *J. Clin. Invest.*, **40** : 1442, 1961.
- 7) Ostrow, J. D.: Photo-oxidative derivatives of (C¹⁴) bilirubin and their excretion by the Gunn rat. In *Bilirubin Metabolism*. ed. Bouchier, I. A. D. & Billing, B. H., pp. 117-127, Blackwell, Oxford, 1967.
- 8) Weber, A. PH. & Schalm, L.: Evidence against "Bilirubin sulphate". *Acta Med. Scand.*, **177** : 519, 1965.
- 9) Noir, B. A., Garay, E. R. & Royer, M.: Separation and properties of conjugated bilirubin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **100** : 403, 1965.
- 10) Talafant, E. & Appelt, J.: Preparation of bilirubin diglucuronide concentrates from dog bladder bile. *Clin. Chem.*, **14** : 208, 1968.
- 11) 井沢徹一, 山本武彦, 近藤忠亮.: Bilirubin glucuronide 分画抽出法 (Talafant 法) の検討. *日消誌.*, **67** : 756, 1970.
- 12) Cole, P. G., Lathe, G. H. & Billing, B. H.: Separation of the bile pigments of serum, bile and urine. *Biochem. J.*, **57** : 514, 1954.
- 13) Kondo, T., Kawai, T., Yamamoto, T. & Izawa, T.: Characterization of the ester form bilirubin fraction showing positive phosphate ester reaction. *Gastroenterologica Japonica.*, **4** : 217, 1971.
- 14) Watson, C. J.: Color reaction of bilirubin with sulfuric acids. A direct diazo-reacting bilirubin sulfate. *Science*, **128** : 142, 1958.
- 15) Küster, W.: Über den Bilirubindimethylester. 15 Mitteilung. Über Gallenfarbstoffe. *Z. Physiol. Chem.*, **141** : 40, 1920.
- 16) 井沢徹一: 未発表
- 17) 河野浩哉: Propentdyopent に関する研究. *岡山医誌.*, **71** : 7204, 1959.
- 18) 大西鐘寿, 山川毅: 新生児黄疸の光療法におけるビリルビンの代謝. *日児誌.*, **74** : 159, 1970.
- 19) V. Dobeneck, H.: Die Stokvis-Reaktion (Pentdyopent-Reaktion). *Z. Klin. Chem.*, **4** : 137, 1966.
- 20) Ostrow, J. D.: Photocatabolism of labeled bilirubin in the congenitally jaundiced (Gunn) rat. *J. Clin. Invest.*, **50** : 707, 1971.
- 21) 山下文雄, 安部弘彦, 奥田邦彦: ビリルビン代謝に関する最近の知見(その2). *日本臨床*, **28** : 107, 1970.
- 22) Gray, C. H. Kulczycka, T. & Nicholson, D. C.: The photodecomposition of bilirubin and other bile pigments. *J. Chem. Soc.*, **3** : 288, 1972.
- 23) 大西鐘寿, 藤掛守彦, : 新生児黄疸の光療法および酸素誘導療法について. **日本臨床*, **30** : 1934, 1972.
- 24) Mannito, P.: Photochemistry of bilirubin. *Experimentia.*, **27** : 1147, 1971.

- 25) Mannito, P. & Monti, P.: Photoaddition of sulphydryl groups to bilirubin in vitro. *Experimentia.*, **28** : 379, 1972.
- 26) Ostrow, J.D. & Branham, R.V.: Photodecomposition of bilirubin and biliverdin in vitro. *Gastroenterology.*, **58** : 15, 1970.
- 27) Krasner, J. & Edwards, L.: Photodecomposition products of bilirubin. *J. Med.*, **2** : 205, 1971.
- 28) Callahan, E.W., Thaler, M.M., Karon, M., Bauer, K. & Schmid, R.: Phototherapy of severe unconjugated hyperbilirubinemia; Formation and removal of labeled bilirubin derivatives. *Pediatrics.*, **46** : 841, 1970.
- 29) Brondheim, S.H., Lathrop, D. & Zabriskie, J.: Effect of light on the absorption spectra of jaundiced serum. *J. Lab. & Clin. Med.*, **60** : 31, 1962.
- 30) 金田皎太郎: Bilirubin-azo 色素に関する研究. 第2編, 数種 bilirubinoid の diazo 反応の分光化学的研究. *岡山医誌.*, **75** : 1, 1962.
- 31) 有地澄郎: Monomethoxy-bilirubin dimethylester および dimethoxy-bilirubin dimethylester の性状に関する研究. 第1編. 化学的性状について. *岡山医誌.*, **71** : 7065, 1959.
- 32) Ostrow, J.D.: Photochemical and biochemical basis of the treatment of neonatal jaundice. In *Progress in liver diseases IV.* ed. Popper, H. & Schaffner, F. pp. 447-462, Grune and Stratton. New York and London, 1972.

Studies on bile pigments

**Part 2. Spectrophotometric studies and clinical significance
of non bilirubin fraction with positive diazo reaction in bile.**

by

Mamoru HIROHATA

The First Department of Internal Medicine,
Okayama University Medical School, Okayama.
(Director: Prof. Kiyowo KOSAKA)

Non bilirubin fraction which was extracted from bile of various liver and biliary tract diseases and prepared from crystalline bilirubin after irradiation by fluorescence was studied. Following results about the nature of non bilirubin fraction positive for diazo reaction and its clinical significance was obtained.

1) The material obtained in the fraction was yellowish and soluble in water and showed positive diazo reaction. Its absorption maximum showed 545–555nm in water solution (pH2.4) and unchanged by acidulation.

2) In thin layer chromatogram of this azo pigment of non bilirubin fraction, two to four spots appeared usually. This results suggested that it was not composed from one substance. The Rf values were different from those of already reported azo pigments in thin layer chromatogram and it was confirmed that the Rf value of one of these spots was changed by methylation.

3) Percentage of non bilirubin fraction in total bilirubin in bile of various liver and biliary tract diseases was significantly increased in comparison with that of control subjects. This ratio increased in the order of the group of constitutional jaundice, cirrhosis of the liver and chronic hepatitis respectively.

4) Significant correlations between percentage of non bilirubin fraction in total bilirubin and liver function tests (ZnTT, TTT, γ -globulin) were obtained.

These findings suggested that non bilirubin fraction was increased in the case of hepatic parenchymal damage or the disturbance of the bilirubin conjugation enzyme.