612.357.131

Monomethoxy-bilirubindimethylester 及び dimethoxy-bilirubindimethylester の性状に関する研究

第 2 篇

血清蛋白との結合に関する研究

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂教授）

有　地　澄　郎

（昭和34年8月28日受稿）

緒　　言

Bilirubin と蛋白との結合については，種々の報告があるが，この結合に関する問題は生体内bilirubin の diazo 反応に対する態度，即ち間接及び直接diazo反応の本態についての検討から始まつた．A. A. van den Bergh[1] は，直接 diazo 反応を呈するbilirubin は遊離型であり，間接 bilirubin は蛋白ないし類脂体に結合しているとした．E. Forrai & R. Sivó[2] は限外濾過法により，bilirubin は間接型も直接型も蛋白に結合しているとした．又 H. Bennhold[3] は電気泳動法で bilirubin は総て albumin に結合していると言い，更に K. O. Pedersen & J. Waldenström[4] は，超電気遠心法と Tiselius 式電気泳動法に依る等電点の決定でこれを確認し，蛋白との結合が diazo反応の間接，直接の相違の原因にならないと主張した．同様の見解は，R. L. Gregory & M. Andersch[5] による濾過法，I. Snapper & W. M. Bendien[6] による限外濾過法，電気泳動法及び超電気遠心法，A. Cantarow[7] による限外濾過法，C. H. Gray[8] による電気泳動法により支持された．又 T. B. Coolidge[9] は電気泳動法で，bilirubin は総て albumin に結合しているが，間接 bilirubin は原子価結合を営み，直接 bilirubin は疎に結合しているため両反応型の差を生ずるとした．B. J. Cohn[10] は一部 V_1 分劃の globulin に結合して，色素蛋白として間接 diazo 反応を呈するとも言つている．人工的な結合では N. H. Martin[11] は，albumin の1分子に bilirubin の2～3分子が附き，V_1 分劃の α_1, α_2-globulin にも結合するが β_1―或は γ-globulin には結合しないと言つているが，U. Westphal & P. Gedigk[12] は，N. H. Martin の否定にも拘らず，bilirubin は非常に高濃度になると β-globulin にも結合し得ると言い，斯く血清と結合せしめた bilirubin の diazo 反応は間接であつたと言つている．D. Cora[13] は，bilirubin は蛋白，主として albumin に結合しているが，diazo 反応の両型は蛋白との結合の疎密に関係しないとしている．又C. J. Watson[14] は，間接 bilirubin は globin と結合し，直接 bilirubin はソーダ塩であるとした．

先に教室木村[15]，後藤[16] は paper chromatography 及び濾紙電気泳動法に依りこの問題に触れ，間接並びに直接 diazo 反応と，bilirubin と蛋白との結合の粗密との間には関係はなく，且つ bilirubin と血清蛋白との結合は，分子間における比較的温和な interaction に依るものと述べているが，bilirubin-dimethylester よりその monoether (monomethoxy-bilirubindimethylester) 及び diether (dimethoxybilirubindimethylester) を分離調製した機会に，これ等と血清蛋白との結合に関して，結晶 bilirubin 及び bilirubindimethylester と対比し乍ら検討を加えることにし，以下の実験を行つた．

実 験 方 法

1. 実験材料

1. 1. bilirubindimethylester, monoether, diether

第1篇に述べた方法により調製した．

1. 2. 血清

健康人より早朝空腹時に採血し，型の如く分離し，bilirubin を含まぬ事を確めた後使用した．

1. 3. γ-globulin

日本製薬販売株式会社製を用いた.

1. 4. β-carotine

片山化学工業株式会社製を用いた.

1. 5. 非イオン性界面活性剤

Emasol 3130, Emasol 4130（花王石鹸株式会社製）を用いた.

2. bilirubindimethylester, monoether, diether の血清溶液調製法

これ等 bilirubinoid の chloroform 溶液を試験管に取り，容器を減圧吸引して chloroform を蒸発させ，血清を加えてよく攪拌し電気冷蔵庫中（約2°C）に3日間放置により血清溶液とした.

3. 濾紙電気泳動法

小林式装置を用い，濾紙は Schleicher & Schüll 製 No.2043 a を，電解液には veronal 緩衝液 μ = 0.045, pH 8.5 を使用した. 試料0.01ccを幅4cmの濾紙に線状につけ，6 mA/12cm, 250volt/23cm で，泳動時間5時間である. 尙実験は総て室温で行つた.

4. 蛋白検出法

濾紙電気泳動を終ると，直ちに濾紙を電熱乾燥器で充分乾燥させた後蛋白の検出を行つた. 蛋白の検出には bromphenol blue を用いたが，これは bromphenol blue 0.25g と昇汞5g及び氷醋酸 10cc とを混じ，蒸溜水で2Lとしたもので，これに乾燥した濾紙を約30分間浸した後取出し，洗滌液を2乃至3回取換えながら2%氷醋酸溶液で約10分洗い，室温で乾燥させた.

5. diazo 反応反応速度曲線

5. 1. diazo 試薬の調製

Jendrassik & Cleghorn の処方によつた.

5. 2. 非イオン性界面活性剤による monoether, diether 血清溶液の調製法

monoether, diether の chloroform溶液 1 cc に 10g%の Emasol 4130 の chloroform 溶液 5 cc を加え，80°C の重盪煎中に浸しつつ減圧吸引して chloroformを揮発除去し，これに血清5 ccを加えて血清溶液を調製した.

対照として bilirubin 及び bilirubindimethylester も同じ方法で血清溶液を調製し，diazo 反応につき比較検討した.

5. 3. diazo 反応反応速度曲線

上記血清溶液 4.5cc に diazo 試薬 0.5cc を加えた後，各時間毎の吸光係数を pulfrich の光度計で濾光板 S_{53}と液槽 1.0cm に依り測定し，30分間に達した azo 色素を100%として，これ等 bilirubinoid の反応速度を比較検討した.

実験成績並に考按

1. monoether, diether の血清溶液調製法に関する検討

monoether, diether と蛋白の関係を検討する為に，先ずこれ等の血清溶液を調製する必要がある. monoether, diether の chloroform 溶液より chloroform を温浴上で減圧蒸発し，直ちに血清を加えて充分に攪拌しても，血清に溶解しない.

この為に，これ等の血清溶液調製には検討を要する. 後藤[16]は，bilirubin 及び mesobilirubin を血清に溶解する為には，先ず之等を N/IO 苛性曹達溶液に溶したものに血清を加え，次いで N/IO 硫酸の当量で中和する方法を述べている. 然るに bilirubin dimethylester 及びその monoether, diether はN/IO苛性曹達溶液に溶解しない為に，bilirubin, mesobilirubin の場合の様な方法で之等を血清に溶解せしめる事は出来ない. 血清に対する溶解度に就いて木村[15]は，bilirubin dimethylester が結晶bilirubin に比較して遙に難溶である事を述べ，又細川[17]も mesobilirubindimethylesterが血清に溶け難いと述べているが，monoether, diether も極めて溶け難い. G. Barac[18]は pH 7. 0~7.35 に於ては，bilirubin dimethylester は bilirubin と同様に容易に血清 albumin に溶解すると述べているが，事実はその様にならない. 又細川[17]は bilirubin 及び mesobilirubin 血清溶液の調製法として，之等の chloroform 溶液を減圧蒸溜して chloroform を蒸発せしめ，残渣を減圧乾燥器中で2乃至3日間乾燥し，このものを血清に加えて冷蔵庫中に約24時間放置，これを遠沈して不溶の bilirubin 及び mesobilirubin を沈澱除去し，斯て得たものを血清溶液として使用したと述べている.

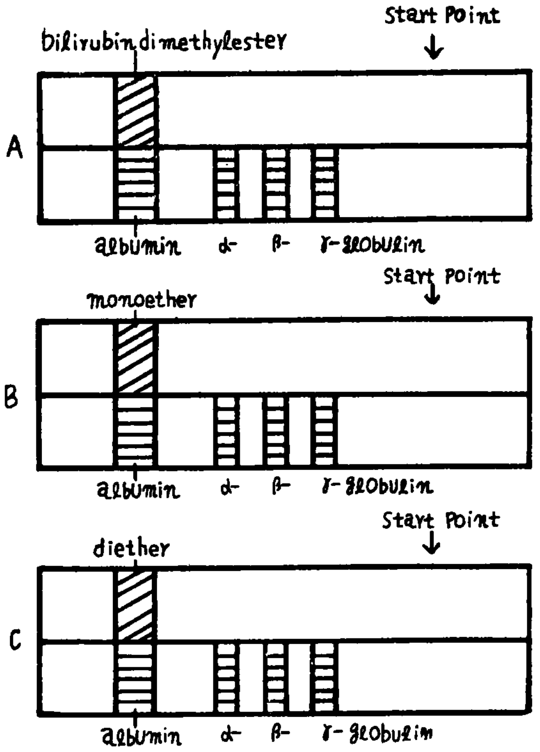
著者は種々検討の結果，bilirubindimethylester 及びその monoether, diether の血清溶液調製法として次の様な方法を行つた. 即ち之等の bilirubinoid の chloroform 溶液を減圧蒸溜して，chloroform を蒸発せしめ，chloroform が完全に蒸発するや否や直ちに血清を加えて充分攪拌し之を電気冷蔵庫中に3日間放置した後，これを遠沈して不溶の部分を沈澱除去し，斯て得たものを血清溶液として使用した.

2. 濾紙電気泳動法による実験

この様にして得た bilirubindimethylester 及び

monoether, diether 溶解血清について pH 8.5 の Veronal 緩衝液を電解液として濾紙電気泳動法を行うと，図表第1に示す様に bilirubindimethylester, moether, diether の別なくいずれも albumin, と共に泳動して，蛋白の他の分劃との結合は認められなかつた.

Fig. 1.



Sample : Healthy person's serum artificially added
A : bilirubindimethylester
B : monoether
C : diether
Filter paper : Schleicher & Schüll No 2043 a
Figures show that artificially added bilirubin dimethylester, monoether and diether removed with albumin but not with other proteins.

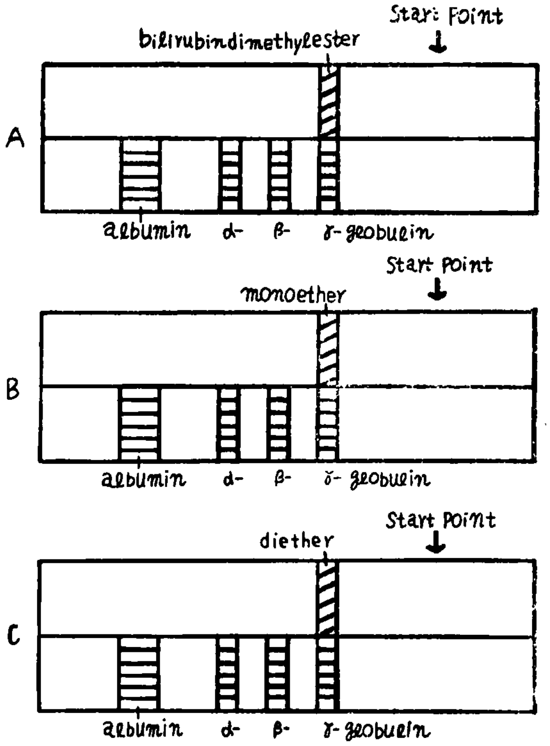
この場合，これ等の bilirubinoid は血清に難溶のために，濾紙上に於ける着色は極めてうすかつた．同時に後藤，木村の方法に倣い，2％蔗糖溶液，1％硫酸安門水溶液を展開剤として一次元上昇法による paper chromatography を行つたが，展開と共にこれ等 bilirubinoid の黄色の spot は褪色し chromatogramm の確立は困難であつた．後藤[16]は結晶 bilirubin の血清溶液について paper chromatography を行い，人工的血清 bilirubin 溶液と，自然の黄疸血清とでは，bilirubin と血清蛋白との結び付きに幾分の差を生ずるが，濾紙電気泳動法では人工的血清 bilirubin 溶液に於ても bilirubin は常に albumin と共に泳動され，他の蛋白分劃との間には結合はなかつた事を認めているが，bilirubindimethylester, monoether, diether の血清溶液についても濾紙電気泳動法では，これと全く同様である事を認めた.

次に之等 bilirubinoid を血清に更に充分溶解させる目的を以て，非イオン性界面活性剤として，Emasol 3130を用いた.

即ち bilirubinoid の chloroform 溶液に 10 g％ Emasol 3130 chloroform 溶液を加え，温浴上で chloroform を減圧蒸発せしめ，これ等の bilirubinoid と Emasol 3130 が粘稠な半流動体の混合物となつたものに，血清を加えると，之等の bilirubinoid は血清に極めて溶解し易くなる．この場合，血清を加えた際の溷濁を起させない為に chloroform を充分吸引除去して置く必要を認めた.

この様に非イオン性界面活性剤を用いて血清溶液とした bilirubindimethylester, monether, diether

Fig. 2.



Sample : Serum+Emasol 3130+
A : bilirubindimethylester
B : monoether
C : diether
Filter paper : Schleicher & Schüll No 2043 a

につき，同条件で濾紙電気泳動法を行うと，図表第2に示す様にこれ等の bilirubinoid はいずれも albumin との結合は解離して，γ-globulin と等距離に泳動された．

結晶 bilirubin 及び β-carotine を非イオン性界面活性剤を用いて，同様な方法で血清溶液として同条件で濾紙電気泳動法を行つた場合にも，結晶 bilirubin 及び β-carotine は γ-globulin と等距離に泳動された．

即ちこれ等総ての色素に於て，非イオン性界面活性剤を用いて血清に溶解した場合には，これ等色素と albumin との結合は解離して γ-globulin 分劃と配位を等しくして泳動される事を認めた．

処で二塩基酸 bilirubin とその塩及び ester 型 bilirubin, mesobilirubin 更に biliverdin は血清蛋白中 albumin と結合して居る事は，多数の教室の業績が示す処である．非イオン性界面活性剤を使用して上記 bilirubinoid を血清溶液とした場合に，albumin とこれ等 bilirubinoid の結合が解離してあらたに γ-globulin と結合するとは考えられない．後藤[16]はその実験成績より，bilirubin と血清蛋白との結合は，vinyl 基や carboxyl 基及び hydroxyl 基を介しての鞏固なものではなく，分子間における比較的温和な interaction に依るものと考えているが，この場合もこれ等 bilirubinoid と albumin との結合は分子間における温和な interaction の為に，非イオン性界面活性剤を用いた場合にその結合は解離し，非イオン性界面活性剤と γ-globulin とが同じ移動率で泳動された為に，非イオン性界面活性剤を介してこれ等 bilirubinoid と γ'globulin が等距離に泳動されたものと考えられる．

これを確認する為に，血清を加えないで，これ等の bilirubinoid に非イオン性界面活性剤のみを加えて燐酸塩緩衝液にて pH 7．4 とし，同条件で濾紙電気泳動法を行うと，図表第3に示す様に之等のbilirubinoid は γ-globulin 分劃と等距離に泳動され，上記の推測の正しい事が確認された．

非イオン性界面活性剤を用いた場合，上記のbilirubinoidが血清蛋白中の γ-globulin 分劃と等距離に移動される事を確認する為に，結晶 bilirubin, bilirubindimethylester, monoether, diether 等の bilirubinoid を Emasol 3130 を用いて γ-globulin に溶解せしめ，燐酸塩緩衝液で pH 7.4 とし濾紙電気泳動法を行うと，図表第4Aに示す様にこれ等の bilirubinoid はいづれも γ-globulin と等距離に泳動された．

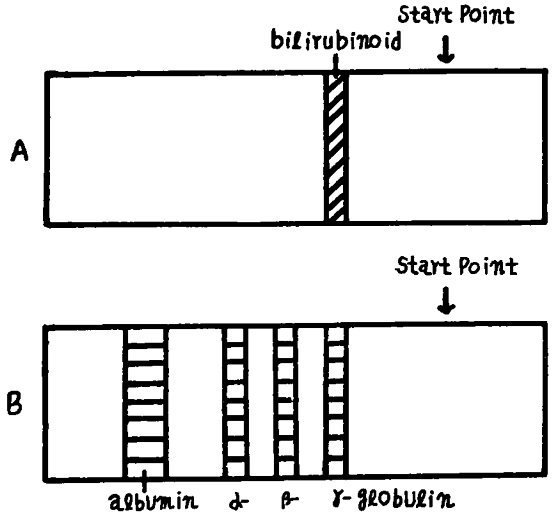
この場合同時に γ-globulin を加えないで，これ等の bilirubinoid を Emasol 3130 を用いてpH 7.4 の燐塩緩衝液に溶解せしめ，濾純電気泳動法を行うと，図表第4Bに示す様にこれ等の bilirubinoid は図表第4Aの γ-globulin と等距離迄泳動された．

この結果からも，非イオン性界面活性剤と γ-globulin が同じ移動率で泳動された事を認め得た．

3．非イオン性界面活性剤による血清溶液の diazo 反応反応速度曲線

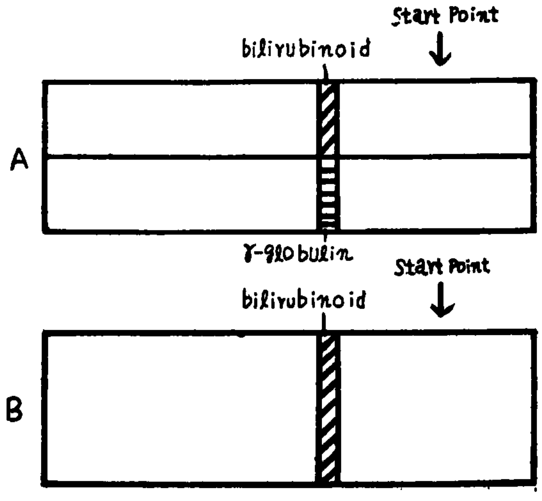
monoether, diether, bilirubindimethylester,

Fig. 3.



Sample A : bilirubinoid+Emasol 3130 (corrected pH 7.4 by phosphate buffer)
B : Contrast (Serum)

Fig. 4.

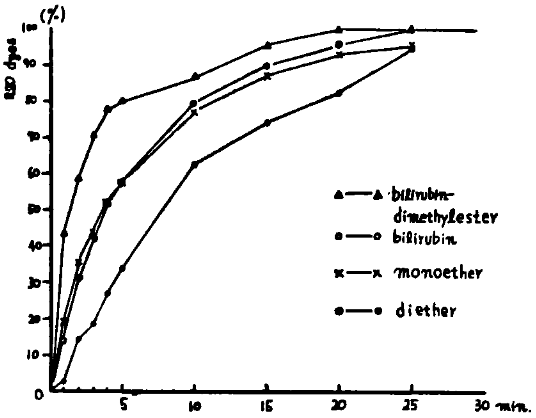


Sample A : γ-globulin+bilirubinoid+Emaso 13130
B : bilirubinoid+Emasol3130

及び結晶 bilirubin を Emasol 4130 を用いて血清に溶解させた場合の diazo 反応の反応速度を比較検討する為に，その azo 色素の生成速度を pulfrich の光度計で経時的に1，2，3，4，5，10，15，20，30分と吸光度係数を測定し，30分間に達した azo 色素を100%として反応速度曲線を作ると，図表第5に示す様である．

Fig. 5.

	bilirubin-dimethylester	bilirubin	monoether	diether
1′	43.1(%)	14.7(%)	19.5(%)	3.6(%)
2′	59.1	31.5	35.7	14.8
3′	70.8	42.0	44.3	18.5
4′	78.5	51.5	52.9	27.1
5′	80.0	57.8	57.7	33.3
10′	86.2	79.8	77.1	62.9
15′	95.5	89.3	88.0	74.0
20′	100	95.6	93.4	82.7
25′	100	100	96.7	96.3
30′	100	100	100	100



即ち bilirubindimethylester では非常に早く azo 色素生成が完了して，直接 diazo 反応の型を示し，結晶 bilirubin, monoether では bilirubindimethylester に比して反応速度は緩やかであり，dietherでは最も緩やかで，これ等はむしろ間接diazo反応の型を示した．

既に第1篇に於ても，bilirubindimethylester は直接 bilirubin であり，monoether, diether は間接 bilirubin である事を認めたが，上記に依つても，之を確め得た．

結　　論

monomethoxy-bilirubindimethylester (monoether), dimethoxy-bilirubindimethylester (diether) と血清蛋白との結合を検討する目的で，pH 8.5 の veronal 緩衝液を電解液とする濾紙電気泳動法を monoether, diether 及び対照として bilirubindimethylester の健康人血清溶液について行い，以下の成績を得た．

1．bilirubindimethylester 及びその monoether, diether はいづれも血清に溶解し難い為に，濃厚な血清溶液は調製し難いが，総て albumin と結合して居た．

2．非イオン性界面活性剤 Emasol 3130 を用いて，これ等 bilirubinoid を血清に溶解させた場合には，これ等と albumin との結合は解離し γ-globulin と等距離に泳動された．結晶 bilirubin 及び β-carotine の場合も全く同様であつた．

即ちこれ等と albumin との結合は鞏固なものではなく，分子間における比較的温和な interaction に依るものと思われた．

3．上記血清の代りに γ-globulin に溶解させた場合にも，これ等 bilirubinoid は γ-globulin と等距離に泳動された．

4．Emasol 3130 を用いて pH 7.4 の燐酸塩緩衝液に溶解した場合にも，これ等 bilirubinoid は γ-globulin と等距離に泳動された．

即ちこれ等の bilirubinoid が γ-globulin と配位を等しくするのは，用いた非イオン性界面活性剤と γ-globulin の移動率が同一の為と思われた．

5．非イオン性界面活性剤 Emasol 4130 を用いて，bilirubindimethylester, monoether, diether を血清に可溶化した場合の diazo 反応の反応速度曲線に於て，bilirubindimethylester は直接型，monoether, diether は間接型を示した．

参　考　文　献

1）Vanden den Bergh, A. A. H. : Der Gallenfarbstoff im Blut, Leipzig, 1918.

2）Forrai E. & Sivó, R. : Biochem. Z., 189, 162, 1927.

3）Bennhold, H. : Erg. inn. Med., 42, 273, 1932.

4）Pedersen, K. O. & Waldenström, J., : Z. Physiol. Chem., 245, 152, 1937.

5）Gregory, R. L & Andersch M. : J. Lab. clin.

Med., 22, 1111, 1937.
6) Snapper, I. & Bendien W. M.: Acta Med Scand., 98, 77, 1938.
7) Cantarow, A.: Amer. J. Dig. Dis., 11, 144, 1944.
8) Gray, C. H. & R. A. Kekwick.: Nature., 161, 274, 1948.
9) Coolidg, T. B.: J. biol. Chem., 132, 119, 1940.
10) Cohn, B. J.: Blood, 3, 471, 1948.
11) Martin, N. H.: J. amer. chem. Soc., 71, 1230, 1949.
12) Westphal, U. & Gedigk P.: Z. physiol. Chem., 283, 161, 1948.
13) Corá, D.: Acta med. Scand., 145, 268. 1953.
14) Watson, C. J.: Blood, 1, 99, 1946.
15) 木村：医学研究25, 106, 昭30.
16) 後藤：医学研究26, 32, 昭31.
17) 細川：医学研究26, 121, 昭31.
18) Barac, G.: Bull. Soc. chim. biol., 28, 633, 1946.

Properties of Monomethoxyl-Bilirubindimethylester and Dimethoxybilirubin Dimethylester

Part 2 A Study on the Combination of Monomethoxy-bilirubindimethylester and Dimethoxy-bilirubindimethylester with Serum Proteins

By
Sumiro ARICHI

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

With the purpose to study the combination of monomethoxybilirubindimethylester (monoether) and dimethoxy-bilirubindimethylester (diether) with serum proteins the author studied monoether and diether useing veronal buffer solution at pH 8.5 as the electrolyte and bilirubindimethylester with normal human serum solution as the control by means of paper electrophoresis; and obtained the following results.

1. As monoether and diether are both difficult to dissolve in serum, it is difficult to prepare a concentrated serum solution but all albumins combined with these two ethers.

2. When these bilirubinoids are dissolved in serum with the use of Emasol 3130, a non-ionic interface activator, these ethers are dissociated from albumins and they spread out to the distance equal to γ-globulin position. In the case of crystalline bilirubin and β-carotine, the results are exactly identical. In other words, the combination of these ethers with albumins seems to be not so persistent but is a relatively mild interactioin between these different molecules.

3. In place of the serum as mentioned above, when the bilirubinoids are dissolved in γ-globulin, likewise they spread out to the same position of γ-globulin.

4. When the bilirubinoinds, with Emasol 3130, are dissolved in a sulfate buffer solution pH 7.4, these are also spread out the distance equal to the position of γ-globulin.

Namely, the reason why these bilirubinoids are distributed in the same position as of γ-globulin seems to lie in the fact that the motility of both non-ionic interface activator and γ-globulin is equal.

5. In the speed curve of the diazo reaction in the case where bilirubindimethylester, monoether, diether are dissolved in serum with non-ionic interface activator, Emasol 3130, bilirubindimethylester presents the direct form while monoether and diether the indirect form.