

## Propentdyopent に関する研究

## 第 2 篇

Urobilin IX,  $\alpha$  よりの propentdyopent とその  
臨床的意義に関する検討

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂淳夫教授）

副手 河野 浩 哉

〔昭和 34 年 8 月 28 日受稿〕

## 緒 言

生体内 urobilinogen には mesobilinogen と stercobilinogen の 2 種類があり、その生成機序に就いては C. J. Watson<sup>1)</sup> と Jr. Baumgärtel<sup>2)</sup> の間に対立的な意見がある。教室の鈴木<sup>3)</sup> 次で松井<sup>4)</sup>、光田<sup>5)</sup> 等は明確に C. J. Watson の説の妥当性を証明した。処で両者の区別に就いては従来 mesobiliviolin 反応、硫酸銅反応、旋光性の証明等に依り行われているが、W. Stich<sup>6)</sup> は mesobilinogen 乃至その酸化物たる urobilinogen IX,  $\alpha$  は  $H_2O_2$  に依り propentdyopent を生ずるが、stercobilinogen 乃至その酸化物たる stercobilin は propentdyopent を生じないとの実験を利用して両方の区別法を提唱している。著者は W. Stich の方法が妥当であるか如何かを検討し、mesobilinogen 或は urobilinogen IX,  $\alpha$  よりの propentdyopent の性状を検討すると共に、健康人及び各種疾患患者の尿におけるこれら urobilinogen の消長を検討し興味ある成績をえたので報告する。

## 実験材料並びに方法

## 1. 実験材料並びに測定器具

1. 1. 結晶 urobilinogen IX,  $\alpha$  の製法

H. Fischer<sup>7)</sup> の方法に倣い、700 mg の結晶 bilirubin を N/10 Na OH 10 cc に溶かし、之に 3% sodium amalgam 約 10 g を加え、約 25 分間三角フラスコに入れて振る。其の間、20 g の sodium amalgam を追加した。溶液は黄褐色より次第に灰黄色となり次に灰白色を経て無色に近くなる。之を小ビーカーに入れる。元の三角フラスコを 2~3 回再蒸溜水で洗い、之を同じ小ビーカーに入れる。之に 4 N.  $H_2SO_4$  を加え pH を 5.5 に近づけると白色沈澱

を生ずる。此の場合硫酸の量がすぎると沈澱はレンガ色となる。その際約 10 cc の蒸溜水を加えるがもはや沈澱は生じない。小ビーカーに入れた液は、1 回 20 cc の chloroform で繰返し抽出し、水溶液層が Ehlich 氏 aldehyde の試薬に反応しなくなるまで何回も抽出する。沈澱は、chloroform を加えると消失する。抽出 chloroform は集めると約 200 cc になるが、色調は、灰黄色で、之を約 20 cc の再蒸溜水で洗い之を chloroform に浸した東洋濾紙 No. 6 で濾過し、ナス型コルベンに入れて減圧濃縮する。残渣に 2 cc の ethylacetate を加えて溶かし、更に、約 80 cc の petroleum-ether を加えると、少々灰色を帯びたレンガ色の沈澱を生ずる。之を濾過すると濾液は灰黄色である。之を減圧濃縮すると灰黄色の残渣を生ずる、之が粗 mesobilinogen である。之に、16.5 cc の氷醋酸を加えて<sup>8)</sup>、100°C の重湯煎上で 30 分間環流し、冷却後、 $H_2O_2$  を含有しない 150 cc の ethyl-ether を加え、此の結果得た溶液を、10% HCl で繰返し抽出する。此の酸性抽出液を倍量の蒸溜水で稀釈し、此の urobilin 溶液は再び chloroform を用いて、抽出し、chloroform 溶液が黄色を示さなくなるまで分割的に繰返し抽出する。之を濃縮蒸発し、chloroform が少量になった時に約 30 倍量の petroleum-ether を加え、沈澱を生ぜしめ、之の沈澱を再び chloroform に溶かし、この chloroform-petroleumether の操作を、3~4 度繰返す。沈澱は最後に chloroform に溶かし時計皿に入れ、之を水槽に入れて保ち、溶媒がほとんど蒸発した時に少量の氷冷の acetone を加え、皿の周囲は食塩と氷との混合物で冷却すると暫時の後、urobilinogen IX,  $\alpha$  が析出して来る。著者の収量は 10~20 mg であつた。収量は、操作に要する時間に

関係し、Siedel<sup>8)</sup>等は、24時間に全操作を行うとき最高で30~50 mgであると述べている。かくして得た結晶 urobilin IX,  $\alpha$  は、後述の諸化学的性状を確かめて使用に供した。

### 1. 2. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液の調製

片山化学工業製30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 g を再蒸溜水で稀釈し、100 g とした。之は実験の度に新しくして使用した。

1. 3. pH 6.8 Soerensen 氏磷酸塩緩衝液の調製  
M/15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, M/15 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を夫々同量混じて pH 6.8 に調製した。

### 1. 4. 吸光度の測定

自記分光光度計 Model DK (Beckmann) に依つた。

### 1. 5. 保温法

自動電流遮断保温器により 37°C に保つた。

## 実験成績

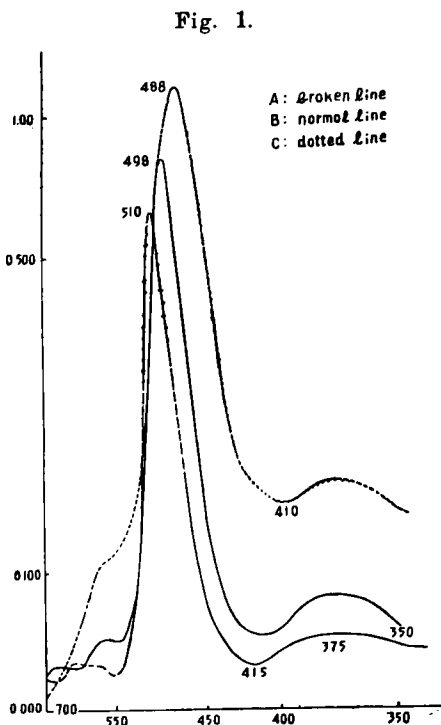
### 1. urobilinogen IX, $\alpha$ の分光像及び定性反応。

#### 1. 1. Chloroform 溶液中に於ける分光像。

Fig. 1 B に示す如く、可視部においては 540~420 m $\mu$  に膨隆を示し、その極大は、498 m $\mu$  を示し、410~340 m $\mu$  に小膨隆を示し、極大 380 m $\mu$  を認めた。

#### 1. 2. Schlesinger 反応の分光像。

肉眼的には、緑々赤色で、紫外線下で緑黄色の螢



光を認める。その分光像は、Fig. 1 A の如く、540 m $\mu$ ~420 m $\mu$  にするどい膨隆を認め極大 510 m $\mu$  を認める。

1. 3. Urobilin IX,  $\alpha$  の Soerensen 氏緩衝液 (pH 6.8) 中の分光像。

Fig. 1 C の如く、可視部では、540 m $\mu$ ~410 m $\mu$  に膨隆を認め、極大 488 m $\mu$  を示し、410 m $\mu$ ~350 m $\mu$  に小膨隆を認め、極大 380 m $\mu$  近傍を示す。

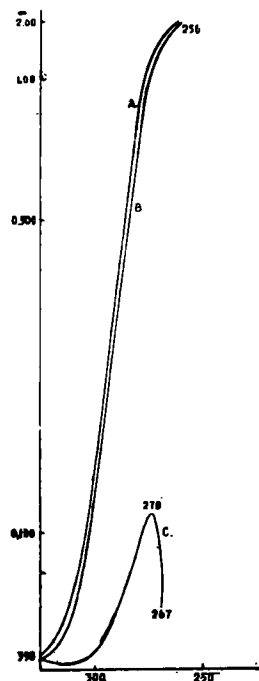
### 1. 4. 9)

Urobilin IX,  $\alpha$  の結晶を dioxane に溶かし、之に濃塩酸を極少量加え加熱すると、瞬間的に堇色を呈して無色となる。

### 2. 紫外部に於ける過酸化水素の吸収像

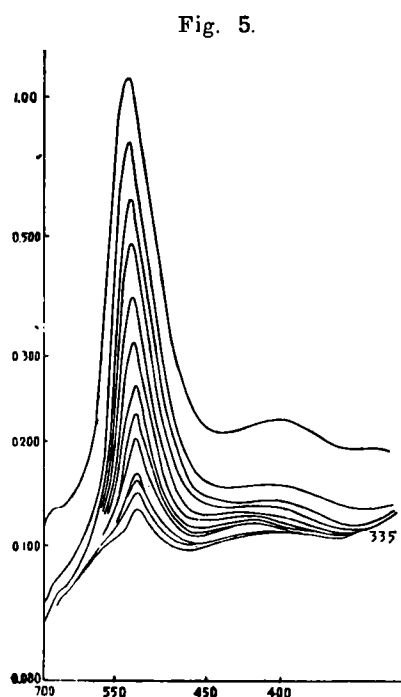
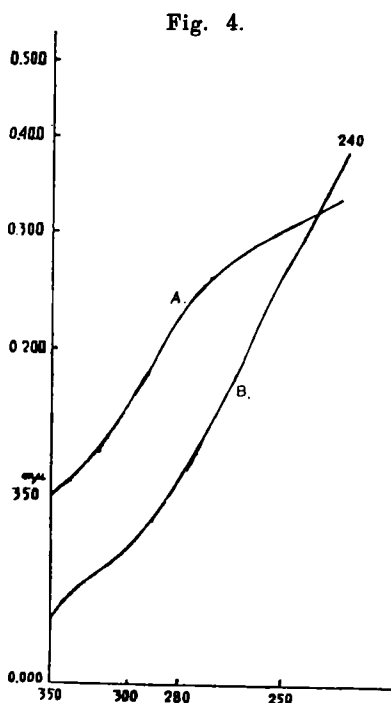
Soerensen 氏磷酸塩緩衝液 (pH 6.8) 5 cc に 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 cc を加え之を経時的に追及した。Fig. 3 A, B, に見る如く、その吸光曲線は、280 m $\mu$  近くより 250 m $\mu$  近傍までほとんど一直線に急激に増加する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加直後 (A) と 135 分後 (B) とほとんど変化しない。そこで 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の量を 0.1 cc とすると、Fig. 3 C の如く極大 270 m $\mu$  を認めた。

Fig. 3.



### 3. 二酸化マンガン紫外部吸収像

Soerensen 氏緩衝液 (pH 6.8) 5 cc に MnO<sub>2</sub> 0.4 g を加えよく振盪した後、東洋濾紙 No. 6 で濾過した。Fig. 4 A の如く、270 m $\mu$  近傍で僅かに上に凸であるが、可視部の吸収はほとんど認めなかつた。



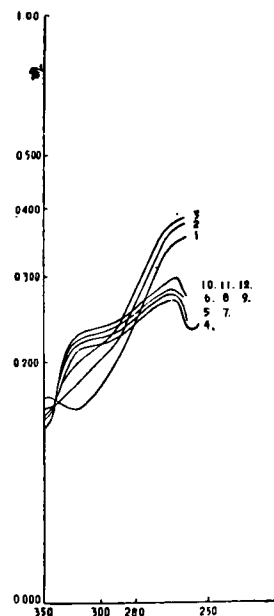
4. 対照液の調整並びにその吸収像

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MnO<sub>2</sub> は共に紫外部に吸収を有するので対照液の吸収像を求めた. pH 6.8 Soerensen 氏緩衝液 5 cc に, 3%過酸化水素溶液 1 cc を加え, 37°C の保温装置中で1時間放置し, 更に, MnO<sub>2</sub> 0.4 g を加え, 同 37°C 中約 2 時間放置し, 溶液中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が完全に分解して, 試験管を振つても発泡しなくなるまで置く. 之を東洋濾紙 No. 6 にて濾過し, 全く透明な液とする. 此の対照液には, 溶媒の pH 6.8 Soerensen 氏緩衝液を用いた, 吸収曲線は, Fig. 4 B の如く, 350 mμ より 240 mμ にかけて, ほとんど一直線に増大する吸光度を認めた. 従つて以下の実験で, MnO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えるときは, 対照にも必ず同様の操作を行うこととした.

5. Urobilin IX, α 溶液の 3%過酸化水素による分解の経時的変化について.

結晶 urobilin IX, α を pH 6.8 Soerensen 氏緩衝液に溶かし, その 5 cc を試験管にとり, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1 cc 加えて, 之を経時的に追求すると表 1 の如き成績を得た. Fig. 5, Fig. 6 参照. 此の実験から, かかる条件下では, 紫外部 315 mμ に吸収を

Fig. 6.



示す物質が, urobilin IX, α の示す 488 mμ における吸光度の減少に対応して生成され, その生成の度合は, 表 1 に見られる如く, 0 分より 15 分にかけては生成が盛んで以後 1 時間より 2 時間に至る間

表 1

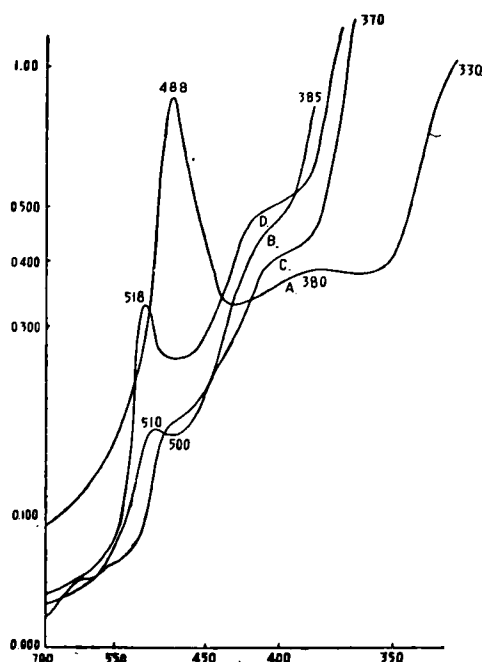
Time (Mins.)	0	5	15	25	35	46	55	65	75	95	105	115
E <sub>488</sub>	1.20	0.76	0.60	0.49	0.38	0.34	0.25	0.23	0.20	0.17	0.16	0.15
E <sub>315</sub>	0.15	0.18	0.20	0.21	0.22	0.23	0.22	0.22	0.24	0.24	0.25	0.25

は生成率は緩徐である。此のことは生じた 315 物質が余分の  $H_2O_2$  によつて破壊されていると考えられる。事実此の 315  $m\mu$  に於ける吸光度は、更に  $H_2O_2$  を加える事によつて減ずるのを確かめた。

6. Urobilin IX,  $\alpha$  溶液の 3%  $H_2O_2$  による分解, propentdyopent の生成。

Urobilin IX,  $\alpha$  の結晶 0.3 mg を Soerensen 氏緩衝液 (pH 6.8) 5 cc に溶解し, 3%  $H_2O_2$  1 cc を加え, 37°C 保温器中に 1 時間置き, 更に  $MnO_2$  0.4 g を加え, 37°C 中に尚 2 時間放置し, 液中の  $H_2O_2$  が完全に分解し, 試験管を振つても,  $O_2$  気泡の生じない様にする。之を東洋濾紙 No. 6 にて濾過する。濾液は, 淡紅褐色を呈し, Fig. 7 A の如く, その吸光曲線は, 可視部においてその極大

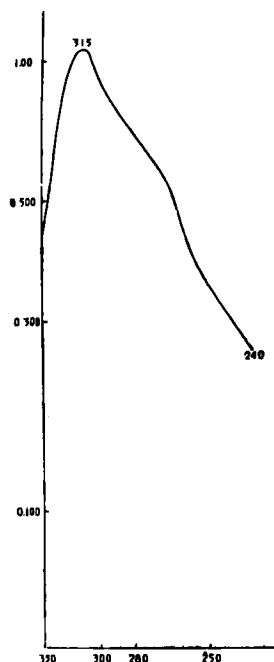
Fig. 7.



は 488  $m\mu$  を示すが,  $E_{488}/E_{380}$  は, urobilin IX,  $\alpha$  のみの pH 6.8 Soerensen 氏緩衝液中に於ける  $E_{488}/E_{380}$  (Fig. 1.1 参照) に比して, 著しく小となつている。紫外部においては, Fig. 8 の如く, 315  $m\mu$  に極大を認める。之の濾液に, sodium dithionite を 2 刀尖加えると無色となり, その吸光曲線は可視部において, Fig. 7 B の如く, 510  $m\mu$  に極大を變じ, その曲線の形を變える。次に, 之に NaOH を加えて強アルカリ性とする, Fig. 7 C に見る如く, 極大は 510  $m\mu$  より更に 500  $m\mu$  近傍にずれ明瞭な極大として認め難い小膨隆となり, 肉

眼的には, 再び淡黄褐色を示す。更に之を煮沸水中に於て, 流動パラフィンを重層して約 2 分間加熱すると, Fig. 7 D に示す如き, 518  $m\mu$  に極大を認め, 紅紅色の pdp. 反応を呈する。又単に 3%  $H_2O_2$  のみを加え操作の途中で  $MnO_2$  を加えない場合に認められた 315  $m\mu$  の極大に比べて著しく明瞭且つ大であつた。(Fig. 8) 従つて, Fig. 8 に見る 315  $m\mu$  の

Fig. 8.



極大は, urobilin IX,  $\alpha$  の分解産物であることが分り, 又 488  $m\mu$  の極大は,  $H_2O_2$  により分解されずに残つてゐることを示す。

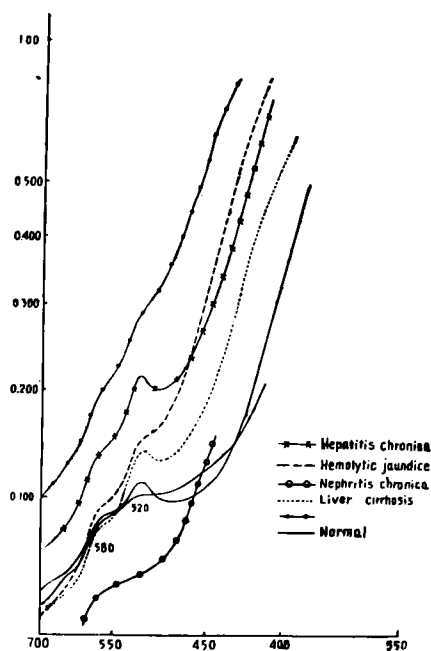
7. 病的尿並びに健康尿における stercobilinogen urobilinogen の含有量。

stercobilinogen, mesobilirubinogen は疾患によつて尿中の含有量が異なる<sup>6)10)</sup> ことは既に知られている。著者は, 前述の 3%  $H_2O_2$  酸化による pdp 反応を種々の尿について行つた。患者はすべて当教室に入院している者で, 表 2 の病名は, 臨床検査並びに肝生検所見により決定されたものであつた。尿の採集は, urobilinogen の時刻差<sup>11)12)</sup> を考へて, 同一時刻採集の新鮮尿を用いた。先ず, 患者尿 5 cc に 3%  $H_2O_2$  1 cc を加え, 37°C に 30 分間保ち, 次に  $MnO_2$  粉末 1 刀尖を加え 30 分~40 分 37°C 下に放置し余剰の  $H_2O_2$  を分解する。之を東洋濾紙 No. 6 にて濾過し, sodium dithionite 2 刀尖, 苛性ソーダの一片を加え, 強アルカリ性となし, 之に流動パラフィンを重層し, 沸騰水中にて, 約 2 分間熱する。

表 2

No.	Disease	pH of urine	Rosin's method (Bilirubin)	E.A.R.	$-\log T_{520}$	$-\log T_{580}$	$\log T_{580}/T_{520}$
1	serum Hepatitis	S	(-)	(-)	$165 \times 10^{-3}$	$110 \times 10^{-3}$	$55 \times 10^{-3}$
2	Hepatitis acuta (serum Hep.)	S	(+)	(-)	$195 \times 10^{-3}$	$95 \times 10^{-3}$	$100 \times 10^{-3}$
3	Hepatitis chronica	S	(±)	(-)	$210 \times 10^{-3}$	$135 \times 10^{-3}$	$75 \times 10^{-3}$
4	Primary liver cancer	S	(±)	(+)	$160 \times 10^{-3}$	$85 \times 10^{-3}$	$75 \times 10^{-3}$
5	The beginning of liver cirrhosis	S	(-)	(卅)	$140 \times 10^{-3}$	$75 \times 10^{-3}$	$65 \times 10^{-3}$
6	Hepatitis chronica (liver cirrhosis)	S	(-)	(±)	$280 \times 10^{-3}$	$195 \times 10^{-3}$	$85 \times 10^{-3}$
7	Hemolytic jaundice	S	(±)	(卅)	$140 \times 10^{-3}$	$80 \times 10^{-3}$	$60 \times 10^{-3}$
8	Hemolytic jaundice	S	(-)	(+)	$150 \times 10^{-3}$	$85 \times 10^{-3}$	$65 \times 10^{-3}$
9	cholecystopathia	S	(-)	(±)	$50 \times 10^{-3}$	$35 \times 10^{-3}$	$15 \times 10^{-3}$
10	essential hypertension with myocarddamage	S	(-)	(±)	$45 \times 10^{-3}$	$30 \times 10^{-3}$	$15 \times 10^{-3}$
11	subacute myelic leucemia	S	(-)	yellowish	$210 \times 10^{-3}$	$155 \times 10^{-3}$	$55 \times 10^{-3}$
12	Nephritis chronica	S	(-)	(-)	$40 \times 10^{-3}$	$25 \times 10^{-3}$	$15 \times 10^{-3}$
13	Purpura rheumatica (albuminuria)	S	(-)	(-)	$50 \times 10^{-3}$	$40 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-3}$
14	healthy person	S	(-)	(-)	$110 \times 10^{-3}$	$85 \times 10^{-3}$	$25 \times 10^{-3}$
15	healthy person	S	(-)	(±)	$100 \times 10^{-3}$	$80 \times 10^{-3}$	$20 \times 10^{-3}$
16	healthy person	S	(-)	(±)	$140 \times 10^{-3}$	$100 \times 10^{-3}$	$40 \times 10^{-3}$
17	healthy person	S	(-)	(-)	$40 \times 10^{-3}$	$20 \times 10^{-3}$	$20 \times 10^{-3}$

Fig. 9.



対照には蒸留水を用いて、分光吸光曲線を画く。Fig. 9にその代表的な数例の吸光曲線を示す。之を見ると、何れの疾患についても、580 mμ 520 mμ 近傍に極大を有し、520 mμ 近傍の極大は propentdyopent 反応に因るものと考えられる。次に、 $-\log T_{520}$ <sup>13)</sup>,  $-\log T_{580}$ ,  $\log T_{580}/T_{520}$  の値を表2で示す。 $-\log T_{520}$  の値のみでは、各種疾患について特

に著しい差を認めないが、 $\log T_{580}/T_{520}$  をとれば明らかに、健康人と肝疾患又他の疾患との間に有意な差を示す。特に Ehlich 氏 aldehyde 試薬にて陽性を示している健康人尿において低値を示す。

#### 総括並びに考按

H. Fischer<sup>7)</sup> の方法に依り mesobilinogen をつくり、これより W. Siedel & Meier<sup>8)</sup> の方法により urobilin IX,  $\alpha$  を製成しておき、これを W. Stich の方法で  $H_2O_2$  に依り酸化して propentdyopent を生成しようと試みた。ただ W. Stich 報告<sup>6)</sup> には  $H_2O_2$  を用いて酸化したとの記載のみで、如何なる濃度で作用時間は幾何か等何らの記載が行われていない。そこで著者は先ずその方法に検討を加えることとし、propentdyopent の証明には第1篇と同様に pdp. 反応と紫外部における吸収極大の証明法とに依つた。特に紫外部の吸収極大を明確にするため urobilin IX,  $\alpha$  及びその Soerensen 氏磷酸塩緩衝液のそれを測定し、380 mμ 附近に極大を証明し、その他酸化に用いる  $H_2O_2$  及びその作用を中絶させるために用いる  $MnO_2$  の吸収極大が紫外部において強い吸収を認めるので、測定時に対照液中にも  $H_2O_2$ ,  $MnO_2$  を入れることを注意した。その結果試料 5 cc に 3%  $H_2O_2$  1 cc を加え、37°C 下1時間放置し、 $MnO_2$  0.4g を加え、37°C 下更に2時間放

置すると urobilin IX,  $\alpha$  の吸収極大を 488, 380 m $\mu$  に認めるが、同時に 315 m $\mu$  に新たな吸収極大を示し、pdp. 反応陽性で 518 m $\mu$  に極大を認めた。H. v. Dobeneck<sup>14)</sup> は urobilin IX,  $\alpha$  より生じた pentdyopent 混合物の吸収極大は  $\frac{528 \sim 515}{522}$  m $\mu$  と記載し、H. Gilder & S. Granick<sup>15)</sup> は H. Fischer & H. v. Dobeneck<sup>16)</sup> のいう 5 · 5' - dihydroxydipyrromethene は 300 m $\mu$  に強い吸収を 350 m $\mu$  に弱い吸収帯を有するとのべ、上記の方法で、urobilin IX,  $\alpha$  より生成した pdp 反応陽性物質は、urobin IX,  $\alpha$  よりの propentdyopent 物質であることは確かである。著者は又、本法を利用し、健康人、各種疾患の者の尿につき、propentdyopent が生成されるか否かを検討した。

### 結 論

W. Stich の提唱した Stercobilin と urobilin IX,  $\alpha$  の区別法として提唱した propentdyopent 証明法を検討すると共に、propentdyopent の証明を pdp 反応のみに拠らず分光化学的検討法をも併せ利用することを提唱し、これを用いて次の結果を得た。

### 文 献

- 1) C. J. Watson: Minnesota Med. 39 (1956), 294, 403, 467.
- 2) Tr. Baumgärtel: Med. Klin. 44 (1947), 231.
- 3) 鈴木: 医学研究, 28 (8), (1958), 2549.
- 4) 松井: 医学研究, 29 (4), (1959), 1094.
- 5) 光田: 岡山医学会雑誌, 投稿中.
- 6) W. Stich: Dtsch. med. Wschr. 13/16 (1946), 137.
- 7) H. Fischer & F. Meyer-Betz.; Hoppe Seyl. Z., 75 (1911), 232.
- 8) W. Siedel & E. Meier: Hoppe Seyl. Z., 242 (1936), 101.
- 9) C. H. Gray: The bile Pigments, Methuen & Co., London. (1953).
- 10) H. Gohr: viertes Freiburger symposion an der med. Univ. Klinik von 27, Juni bis 1, Juli. (1956), 195.
- 11) C. J. Watson et al.: Amer. J. Clin. Path. 14 (1944), 605, 17 (1947), 108.
- 12) 佐藤・菊田・日新医学, 35 (1), (1948), 31~33.
- 13) 重松: 分析化学講座, 比色法, I (日本分析化学会編集), (1956).
- 14) H. v. Dobeneck: Hoppe Seyl. Z. 257 (1942), 1.
- 15) S. Granick & H. Gilder: Advances in enzymology. 7 (1947), 359.
- 16) H. Fischer & H. v. Dobeneck.: Hoppe Seyl. Z. 263 (1940), 125.

## Studies on Propentdyopent

Part II Studies on Propentdyopent from Urobilin IX, $\alpha$  and its  
clinical significance

By

Hiroya Kono

From the First Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School  
(Director: Prof. K. Kosaka)

The author observed on the demonstrative method of propentdyopent as the differential method between stercobilin and urobilin IX, $\alpha$  by W. Stich and put forward the use of photometric observation with the propentdyopent reaction for the identification of propentdyopent. And the results of its use were as follows.

1. Standing for one hour at 37°C. after the addition of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 1/5 dosis of material, then standing for two hours at 37°C. after the addition of Mn O<sub>2</sub>, the formation of propentdyopent was observed, and it displayed the absorption maximum at 315 m $\mu$  and the absorption maximum of the coloured solution by the pentdyopent reaction displayed at 518 m $\mu$ .

2. It was recognized that the value of log T 580/T 520 showed the formation of propentdyopent, i. e. the contained dosis of mesobilirubinogen, on the occasion of positive Ehrlich's aldehyde reaction, employing the above method to human urine.

---