

尿中胆汁色素に関する研究

第 二 編

糞便中 mesobilirubinogen の性状と臨床的意義

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂 淳夫教授)

瀬 尾 憲 司

[昭和50年5月23日受稿]

緒 言

生体内で老廃赤血球より生成された bilirubin は肝臓で抱合されて胆汁中へ、さらに腸管内に排泄されて細菌叢の作用を受け mesobilirubin より mesobilinogen さらに stercobilinogen へと還元される。ところで生体内で生成される bilirubin は Gray¹⁾ らによれば bilirubin IX α 型のみとされていたが、1966年 Petryka²⁾ は大量の結晶 bilirubin をクロム酸で酸化して生成される pyloric acid を検討することにより bilirubin には IX α 型以外にも少量の IX β または IX δ 型が存在することを報告した。ついで Nichol^{3,4)} らは市販の bilirubin について質量分析を行い Petryka の成績を肯定したが、教室井沢⁵⁾ は胆汁より生成した bilirubin について同様の検討を行いその成績を否定した。その後 McDonagh らは市販 bilirubin について質量分析と薄層 chromatography を行って III α , XIII α の混在を報告し、Stoll は結晶 bilirubin を Na-amalgam で還元して生成された mesobilinogen について、薄層 chromatography, 核磁気共鳴スペクトル, 質量分析を行って IX α 型以外に III α , XIII α 型の混在を認めた。そこで著者はこれらの成績を再検討することを企て肝疾患時の腸管内には mesobilinogen の生成が証明されるとの教室の谷の成績を参考とし、肝疾患患者の糞便を用い mesobilinogen を抽出し、塩化第 2 鉄にて酸化して glaucobilin, mesobiliviolin を生成し、これらの異性体の有無を検討し、上述の疑問を解明したので報告する。

実験材料と実験方法

実験材料

各種肝機能検査、腹腔鏡検査並びに肝生検組織像などによりその診断が確定された慢性肝炎 5 例、肝硬変症 5 例、溶血性黄疸 3 例と対照として健康な医学部学生 5 例の糞便を、排便後直ちに採取し、実験に用いるか、実験との間に時間を要すると思われる場合は排便後直ちに deep freezer (−20~40℃) に保存した。

実験方法

1. 糞便 urobilinogen 定量法

Watson¹³⁾ の方法にならい糞便 10g をとり蒸留水 150ml を加え混和したのち、20% 硫酸第一鉄溶液 100ml と 2.5 N NaOH 溶液 100ml を加え、ミキサーにて攪拌し、冷暗所に 1~2 時間放置したのち、上澄 1ml をとり、酢酸 1ml を加えたのち 20ml のエチルエーテルを加え分液漏斗に入れ、混和後エーテル層 10ml をとり、別の分液漏斗に移し、これに Ehrlich 氏 aldehyde 試薬と飽和酢酸ソーダ液を 1:2 の割合に加えてえられる淡紅色の下層を分離採取し、着色しなくなるまで抽出する。この全量を測定したのち、Pulfrich 氏 stufen photometer により Filter No. 6 (535m μ) を使用し、吸光度係数に 13.6 と全量を 5 で割った数を掛け算することにより urobilinogen 濃度 (mg/dl) を求めた^{7,8)}。

2. Urobilinogen 抽出法

糞便 10g あたり水 150ml を加え混和したのち、20% 硫酸第一鉄溶液 100ml と 2.5 N NaOH 100ml とを徐々に加え、ミキサーにて攪拌したのち、室温暗所に 1 時間放置したのち、濾過し、えられた濾液を酢酸と飽和酢酸ソーダ溶液 4:1 (V/V) の混液で pH 5.5 として、石油エーテルに抽出する。抽出液を水洗後濾別し、減圧乾固させたものを urobilinogen とし

た。

3. 粗 Mesobiliviolin と Glaucobilin 調整法

前項にて得られた urobilinogen をメタノール 10 ml に溶解し、20% (W/V) 塩化第 2 鉄 12N HCl 溶液を 1 ml 加え、沸騰水中で 20 分間 reflux させ、冷却後、水 35 ml を加えたのち、色素が水層になくなるまでくりかえしエーテルにて抽出した。このエーテル層の色素を 2.8N 塩酸に抽出し、次いでクロロホルム層に抽出し、水洗後、濾別したものを減圧乾固した。このものは粗 mesobiliviolin, glaucobilin の混合物質である。

4. 胆汁色素のメチルエステル化法

上記の粗 mesobiliviolin, glaucobilin の混合物をメタノール 10 ml に溶かし、これに三弗化硼素メタノール 5 ml を加え、沸騰水中で 2, 3 分間 reflux させ、冷却後、クロロホルム (20 ml) を加え、水洗、濾別、乾固させたものがメチルエステル化された混合物である。

5. 薄層クロマトグラフィー

Kieselgel G Nr. 7731 (Merk) を使用し、20cm × 20cm のガラス板に厚さ 0.5mm の薄層を作成した。4 の操作でえられた試料をメタノール 1 ml に溶かし、その 0.05ml をとり、spot を作成した。展開は二次元とし溶媒系 1. (methyl acetate : methyl propionate : dichloromethane : carbon tetrachloride, 1 : 1 : 1 : 1 by Vol) と溶媒系 2. (methyl ethyl ketone : 1, 2-dichloroethane, 1 : 2, v/v) を用い室温下で 15cm 以上の展開を行った。

6. 質量分析 (Mass Spectrometry)

Schimazu LKB 9000 Gas chromatography-mass spectrometer を使用し、測定は試料を直接法にて導入し、加熱温度 270℃, イオン化電圧 70 eV にて記載した。

7. 核磁気共鳴スペクトル

(Nuclear Magnetic Resonance, N. M. R.)

試料を deutro chloroform に溶かし、70 mega Hz で Hitachi R-22 high resolution N. M. R. spectrometer を使用し測定した。

8. Glaucobilin 及び Mesobiliviolin の半定量法

二次元薄層 chromatography にて分離した青色 spot (verdin) 及び赤紫色 spot (violin) 分画を充分に乾燥したのち、メタノール 3 ml で溶出し、光電比色計 Hitachi 101 型で verdin は波長 630nm, violin は 565nm で測定した。判定基準は吸光度で 0.01 以下 (±), 0.01~0.05 (+), 0.05~0.1 (2+), 0.1

以上 (3+) の 4 段階とした。

9. 吸光曲線の測定

吸光曲線の測定は島津自記分光光度計 (UV 200) を用い、可視部で測定した。

10. 肝臓機能検査

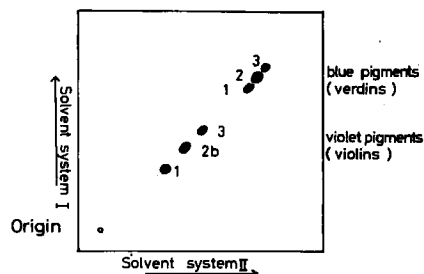
血清を用いて総 bilirubin, 直接 bilirubin, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphatase (Al-Pase) 活性を測定し、膠質反応として thymol 混濁反応 (TTT), Kunkel 氏硫酸亜鉛試験 (ZTT), cephalin-cholesterol 絮状試験 (CCF) 塩化 cobalt 反応 (CoR) を行い、血清総蛋白量 (T. P.), γ -globulin と A/G 比についても測定した。

実験成績

1. 粗 Glaucobilin と Mesobiliviolin の混合物の薄層 chromatogram.

薄層 chromatography により分画分離される青色 spot (verdin) は最高 3 spot で、 $R_f=0.7$ 付近にあり R_f の小さなものより、Stoll にならない verdin 1. verdin 2. verdin 3. と命名した。また赤紫色の spot (violin) は青色 spot 群より R_f が小であり、3 spot が認められ、その R_f より、verdin と同様に Stoll にならない、下より violin 1, 2b, 3. とした。(図 1)

Fig 1 Two-dimensional silica gel coated thin layer chromatogram of a crude preparation of mesobiliviolin and glaucobilin dimethylesters. Solvent system I : methyl acetate, methyl propionate, dichloromethane, carbon tetrachloride, (1:1:1:1 by vol.), Solvent system II : methyl ethyl ketone, 1, 2-dichloroethane (1:2V/V).

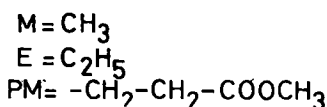
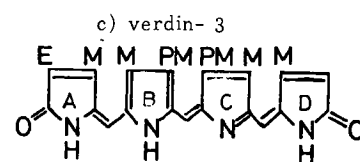
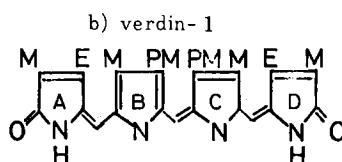
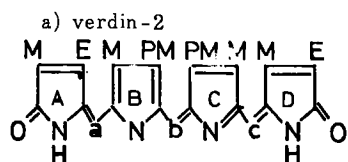


2. 核磁気共鳴スペクトル

verdin 1, 2, 3. の核磁気共鳴スペクトルは表 1 に一括して示した通り、verdin 1 は 16 回積算によりえられたもので、 τ (tau) 値でそれぞれ 3.24, 4.13 ($\equiv$ CH) 6.34 ($-\text{OCH}_3$) 7.09 (β - CH_2) 7.44

Table 1 N. m. r. spectra of verdin dimethylesters, in deuterchloroform, at 90 MHz

chemical shift (τ)	a+c		Two β -CH ₂ $\equiv$ CH ₃	β -CH ₂ $\equiv$ CH ₃	α -CH ₂ $\equiv$ CH ₃	A-ring $\equiv$ -CH ₃	B-ring $\equiv$ -CH ₃	C-ring $\equiv$ -CH ₃	D-ring $\equiv$ -CH ₃	A-ring CH ₃ (of ethyl)	D-ring CH ₃ (of ethyl)
	b bridge $\equiv$ CH ₃	bridges $\equiv$ CH ₃									
verdin- 1 glaucobilin-XIII α dimethylester	3.24	4.13	6.34	7.09	7.44	8.13 (A+D ring)	7.09 (B+C ring)	7.09 (B+C ring)	8.13 (A+D ring)	8.79 (A+D ring)	8.79 (A+D ring)
verdin- 2 glaucobilin-IX α dimethylester	3.24	4.13	6.37	7.12	7.47	8.22 (D+C+B rings)	7.94 (D+C+B rings)	7.94 (D+C+B rings)	7.94 (D+C+B rings)	8.80 (A+D ring)	8.96 (A+D ring)
verdin- 3 glaucobilin-III α dimethylester	3.24	4.12	6.34	7.17 (A+B+C+D rings)	7.46 (A+B+C+D rings)	7.91 (A+B+C+D rings)	7.91 (A+B+C+D rings)	7.91 (A+B+C+D rings)	7.91 (A+B+C+D rings)	8.94 (A+D ring)	8.94 (A+D ring)

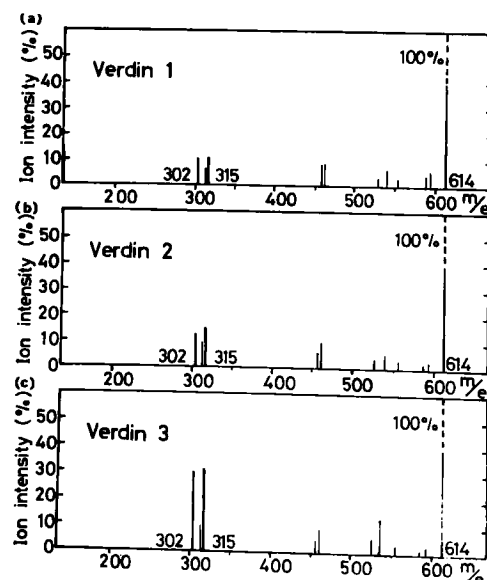


(α -CH₂-) 7.90 (B+C ring の $\equiv$ -CH₃) 8.13 (A+D ring の $\equiv$ -CH₃) 8.79 (A+D ring の CH₃ of ethyl) に peak が認められた. verdin 2 は (CDCl₃) : tau (τ) 3.24, 4.13 ($\equiv$ CH-) 6.37 (-OCH₃) 7.12 (β -CH₂-) 7.47 (α -CH₂-) 7.94, 8.22 ($\equiv$ -CH₃) 8.80 (A ring CH₃ of ethyl) 8.96 (D ring CH₃ of ethyl). verdin 3 は 8 回の積算成績で tau (τ) 値は 3.24, 4.12 ($\equiv$ -CH) 6.34 (-OCH₃) 7.17 (β -CH₂-) 7.46 (α -CH₂-) 7.91 (A+B+D+C ring の $\equiv$ -CH₃) 8.94 (A+D ring の CH₃ of ethyl) に peak が認められた. (単位は tau (τ) で表わした.) すなわち Stoll の報告した glaucobilin XIII α , IX α , III α の核磁気共鳴スペクトルの成績より, verdin 1 は glaucobilin XIII α dimethyl ester, verdin 2 は glaucobilin IX α dimethyl ester, verdin 3 は glaucobilin III α dimethyl ester と同定された.

3 質量スペクトル

verdin 1, 2, 3. とも 614 m/e に親イオン (100%) を認め, 中央 methylene 橋で断裂したと思われる. m/e 302 と 315 の fragment ion の peak が認められた. 以下各 verdin の m/e, 300 以上で, えられた signal は verdin 1: m/e () 内は % ion intensity を示す. 614 (100) 599 (7) 583 (7.8) 555 (4.7) 541 (7.8) 528 (4.7) 467 (9) 315 (11.7) 313 (7.8)

302 (10.6) であった. verdin 2 では 614 (100) 599 (3.2) 583 (4.1) 555 (3.2) 541 (6.4) 528 (3.8) 468 (10) 454 (6.4) 315 (15) 313 (6.8) 302 (13) で verdin 3 は 614 (100) 599 (3.7) 583 (5.1) 555

Fig 2 Normalized histograms of mass spectra of verdins. (C₃₅H₄₂N₄O₆)

(3.7) 541 (14.5) 528 (5.1) 468 (9) 455 (4) 315 (33) 313 (11.1) 302 (30) であり図 (2a, b, c.) のごとくであった。

4. Verdin の出現状態の再現性

Table 2 Reproducebility of proportion of glaucobilin isomers.

No.	1	2	3	4	5
Glaucobilin IX α (OD)	0.045	0.042	0.038	0.044	0.043
Glaucobilin XIII α (OD)	0.015	0.014	0.012	0.015	0.013
XIII α /IX α	0.333	0.333	0.315	0.315	0.325

Table 3. Evaluation of verdins in feces of various liver diseases. Violin was measured at 564 nm and verdin was measured at 630 nm. Absorbance up to 0.01($\pm$), 0.01-0.1(2+), and over 0.1(3+).

No.	Name	Age	Sex	1	violin 2b	3	1	verdine 2	3	urobilinogen mg/100g feces
healthy subjects										
1.	K. I.	20	male	-	-	-	-	-	-	68
2.	U. K.	19	male	-	-	-	-	-	-	102
3.	O. S.	20	male	-	$\pm$	-	-	-	-	62
4.	K. M.	20	male	-	+	-	-	+	-	124
5.	S. I.	20	male	-	+	-	-	+	-	148
chronic hepatitis										
1.	I. H.	46	male	-	-	-	-	-	-	62
2.	M. H.	49	male	-	-	-	-	-	-	87
3.	I. F.	55	female	-	$\pm$	-	-	$\pm$	-	79
4.	N. H.	51	male	-	-	-	-	-	-	60
5.	S. K.	32	male	-	+	-	-	+	-	135
liver cirrhosis.										
1.	I. K.	50	male	-	-	-	-	-	-	118
2.	T. A.	47	male	-	+	-	+	+	-	121
3.	T. S.	47	female	-	+	-	-	+	-	72
4.	H. Y.	46	male	-	+	-	-	+	-	80
5.	I. K.	64	male	-	+	-	-	+	-	186
hemolytic jaundice										
1.	Y. R.	50	female	++	+++	+	+	+++	+	940
2.	M. R.	56	male	+	+++	+	+	++	$\pm$	355
3.	Y. K.	47	female	-	++	+	+	+	+	280

Table 4. Relation between the amount of urobilinogen and detection of verdins and violins separated by thin layer chromatography using the all feces of a day in healthy subjects.

No.	Name	Age	Sex	Urobilinogen mg/day	1	violin 2b	3	1	verdine 2	3
1.	Y. U.	47	male	98	-	trace	-	-	trace	-
2.	M. K.	40	female	50	-	-	-	-	-	-
3.	N. K.	22	male	134	-	trace	-	-	trace	-
4.	K. M.	42	female	84	-	trace	-	-	trace	-
5.	S. I.	27	female	120	-	trace	-	-	trace	-

verdin 1 と verdin 2 の認められた肝硬変症例の糞便を用い、10g あてを使用することにより、同一糞便よりえられた verdin の分布は表 2 に示すごとく、平均 verdin 2 を 1 として表わすと値の上下 4.3 % 以内であった。(表 2)

5. 健康者の糞便を用いた verdin 及び violin の出現状況

糞便 10g を試料とした際の verdin 及び violin の出現は表 3 のごとく verdin 2 が 5 例中 2 例にまた violin 2b は 5 例中 3 例に認められるのみであった。そこで糞便量をふやし排便時採取した全便を用いて検討した。成績は表 4 のごとくで、urobilinogen 量 50mg にては violin 及び verdin の出現をみなかったが 84mg, 98mg, 120mg, 134mg. の urobilinogen 量の糞便を試料としたものでは赤紫色の色調は認められたがなお isomer の分離は出来なかった。(表 4.)

6. 肝疾患患者の糞便を用いた verdin 及び violin の出現状況

糞便 10g を試料とした際の verdin と violin の出現状況は表 3 のごとくで、verdine 2 (glucobilin IX α) は慢性肝炎例 5 例中 2 例、肝硬変症例 5 例中 4 例、溶血性黄疸例では 3 例すべてに認められた。

verdine 1 (glucobilin VIII α) は肝硬変症 1 例、すべての溶血性黄疸例に認められた。verdine 3 (glucobilin III α) は溶血性黄疸例 3 例にのみ認められた。violin 2b は慢性肝炎 5 例中 2 例、肝硬変症 5 例中 4 例、溶血性黄疸例では 3 例すべてに認められた。Violin 1 は溶血性黄疸例 3 例中 2 例に陽性で violin 3 は溶血性黄疸例 3 例のみに認められた。(表 3)

7. 肝疾患患者の糞便中 urobilinogen 量と異性体出現との関係

糞便 10g 中の urobilinogen 量と glucobilin 及び violin 異性体出現との関係を求めた結果は、glucobilin IX α と urobilinogen 量との間では相関係数 0.719, 危険率 1 % 以下で有意の相関が認められ、glucobilin III α とは相関係数 0.820, 危険率 1 % 以下で、また glucobilin XIII α とは相関係数 0.670, 危険率 1 % 以下であった。urobilinogen 量と violin との間には violin 3 との相関係数 0.785, 危険率 1 % 以下 violin 2b とは相関係数 0.693, 危険率 1 % 以下, violin 1 とは相関係数 0.917, 危険率 1 % 以下であった。

8. Glucobilin IX α dimethylester. violin 2b と肝臓機能検査成績との関係.

Table 6 Results of liver function tests of hepatitis chronica, liver cirrhosis, hemolytic jaundice.

No.	Name	Total B. (mg %)	Direct B. (mg %)	Al-Pase K, K, U	GOT	GPT	TTT	CCF ZTT	CoR	T. P (g/dl)	γ -glo. A/G
Hepatitis chronica											
1.	I. H.	1.02	0.41	2.2	196	232	4	6	+++	7	7.2 19.6 1.30
2.	M. H.	0.65	0.33	2.7	63	47	1	7	+	7	7.4 21.2 1.46
3.	I. F.	0.70	0.36	2.9	208	220	1	7	+	5	6.4 18.0 1.40
4.	N. H.	0.81	0.34	2.9	65	60	1	11	+++	6	7.6 15.2 1.06
5.	S. K.	0.71	0.25	2.6	123	294	3	9	±	5	7.6 21.1 1.52
Liver cirrhosis											
1.	I. K.	0.59	0.28	1.4	70	54	3	7	+++	7	5.6 19.6 1.04
2.	T. A.	1.48	0.79	3.0	70	38	2	13	+++	8	6.4 31.8 1.04
3.	T. S.	0.98	0.46	3.6	94	38	1	14	-	4	7.0 25.9 1.30
4.	H. Y.	1.43	0.63	2.8	75	37	3	15	+++	8	6.0 29.9 1.41
5.	I. K.	0.73	0.31	2.1	65	60	1	13	±	6	6.6 28.7 1.13
Hemolytic jaundice											
1.	Y. R.	2.76	0.55	1.7	16	35	2	8	-	5	7.3 18.6 1.32
2.	M. R.	2.81	0.56	3.1	17	12	2	5	-	5	6.7 12.7 2.32
3.	Y. K.	5.65	1.84	1.3	34	31	4	9	±	7	6.6 25.2 1.15

B: bilirubin K, K, U: (King-King Unit)

肝臓機能検査成績は表6のごとくであり、(表6)これらの成績と glaucobilin IX α dimethylester または violin 2b の相関関係を、病因を異にすると考えられる溶血性黄疸をのぞいた慢性肝炎、肝硬変症例との間で検討した結果、ZTT と相関係数 0.750 ($P < 0.05$), γ -globulin (%) とは相関係数 0.772 ($P < 0.01$) でよい相関が認められたが、血清 bilirubin (総・直接型), GOT, GPT, Al -Pase 活性, CCF, TTT, Cobalt 反応, 血漿総蛋白量, γ -globulin 量ならびに A/G との間には相関はえられなかった。

9. Glaucobilin と Glaucobilinester の吸光曲線

Glaucobilin 及びそのエステル化後のそれぞれの吸光極大を測定した後、塩酸を加え、1.0 とし同様に吸光の極大を測定した結果は、図3、表5の通りで、

Fig 3 A : absorption spectra of glaucobilin in methanolic solution, at pH 6.0. (629 - 638 nm)
B : absorption spectra of glaucobilin in methanolic solution, at pH 1.0 after addition of hydrochloric acid. (680 - 686 nm)

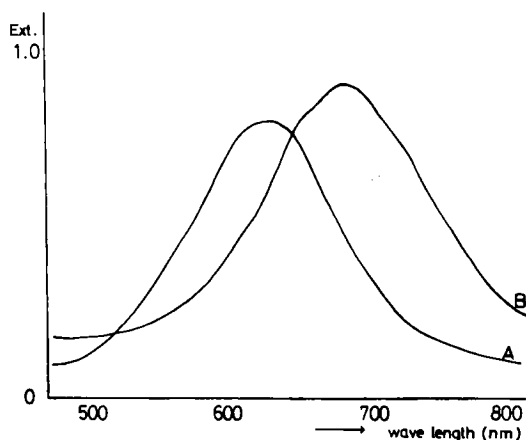


Table 5 Absorption maxima of free types and dimethylester of glaucobilin isomers in methanol at pH 6.0, and at pH 1.0 after addition of hydrochloric acid.

Free	(pH 6.0)	(pH 1.0)
Glaucobilin III α	630.0 (629-634) nm	681.5 (680-683) nm
IX α	630.5 (629-632) nm	682.0 (680-684) nm
XIII α	637.0 (635-638) nm	682.5 (681-685) nm
Dimethylester	(pH 6.0)	(pH 1.0)
Glaucobilin III α	630.5 (629-634) nm	682.5 (681-685) nm
IX α	633.5 (630-635) nm	683.5 (682-685) nm
XIII α	636.0 (633-638) nm	684.0 (683-686) nm

pH 6.0でのメタノール溶液中の glaucobilin III α の吸光極大は 630.0 (629-634) nm, glaucobilin IX α 630.5 (629-632) nm, XIII α 637.0 (635-638) nm, に認められ, glaucobilin III α , IX α , XIII α の順に長波長側に吸光極大の偏位を認めた. 塩酸加メタノール溶液中での吸光極大は glaucobilin III α 681.5 (680-683) nm, glaucobilin IX α は 682.0 (680-684) nm, glaucobilin XIII α は 682.5 (681-685) nm とそれぞれ吸光極大は 680 nm 附近の長波長側に偏位し, glaucobilin III α , IX α , XIII α の順に長波長に吸光極大が偏位した. glaucobilin III α , IX α , XIII α dimethylester メタノール溶液 pH 6.0での吸光極大は, glaucobilin III α dimethylester は 630.5 (629-634) nm, glaucobilin IX α dimethylester は 633.5 (630-635) nm, glaucobilin XIII α dimethylester は 636.0 (633-638) nm と glaucobilin III α , IX α , XIII α dimethylester の順にわずかに長波長側に偏位を認めた. このエステル化された glaucobilin III α , IX α , XIII α dimethylester に塩酸を加え pH 1.0 としたものの吸光極大は III α 682.5 (681-685) nm, IX α 683.5 (682-685) nm, XIII α は 684.0 (683-686) nm と 682-684 nm の長波長側に移動した.

総括並びに考案

Gray,¹⁾ Petryka,²⁾ Nichol³⁾ らの bilirubin 異性体, Stoll⁴⁾ らの mesobilinogen の酸化物の異性体の検出はいずれも市販の bilirubin 結晶を用いた検討であった. 市販の結晶 bilirubin は牛, 豚などの動物胆汁または胆石を精製して作成されたものであって, 人のものではない. 教室井沢は人胆汁より bilirubin を Ostrow の方法により結晶とし diazomethane により methyl 化し, 質量分析を行った結果, 人胆汁中の bilirubin は bilirubin IX α のみ

と判定したが, bilirubin そのものは不安定であることなどよりその成績から異性体の存在を完全に否定することも出来ないように思われた。そこで改めて著者は肝疾患および溶血性黄疸患者の糞便中より urobilinogen を抽出することにより urobilinogen について IX α 型以外の異性体が存在するか如何かを検討した。先ず Stoll らの方法により塩化第二鉄により酸化を行ない glaucobilin, mesobiliviolin を生成し, それを薄層 chromatography により分画分離すると, glaucobilin と同定される青色色素 3 種については核磁気共鳴スペクトル並びに質量スペクトルにより, それぞれ Stoll の云う verdin 1 (glaucobilin XIII α dimethylester), verdin 2 (glaucobilin IX α dimethylester), verdin 3 (glaucobilin III α dimethylester) と一致することが認められた。すなわちこれら 3 種の glaucobilin 異性体を単離することが出来た。なお赤紫色の mesobiliviolin と同定される violin 1, 2b, 3 については共同研究者の教室中村¹²⁾により同様に質量分析, NMR により mesobiliviolin III α , IX α , XIII α dimethylester であることが確かめられている。次に urobilinogen 抽出より異性体検出までには酸化, ester 化などの操作を行うので念のため同一検体での再現性を検討したところ極めて良好な成績であった。またこの分画精製の過程において Mc Donagh らは強酸による異性体の変換を考へてはいるが, 彼ら自身も結晶 bilirubin に異性体の存在を認め報告している。すなわち肝疾患 溶血性黄疸患者の糞便より抽出した urobilinogen を試料として検討すれば微量ながらも IX α 以外の異性体が混在すると考えてよいように思われた。

ところで urobilinogen には stercobilinogen, mesobilinogen 及び d-urobilinogen が含まれており, 塩化第二鉄による酸化は mesobilinogen においては容易であるが, stercobilinogen, d-urobilinogen では困難である。また肝疾患時には mesobilinogen が増量することが古くから知られており, 著者の例でも肝疾患時の urobilinogen についての実験で verdin と violin の異性体出現を証明しえたのは mesobilinogen を用いた実験の結果と解され, これらの異性体の出現頻度と urobilinogen 量との間にはよい相関関係が認められたのはそのためである。一方 stercobilinogen が殆んどを占めている健康者の糞便では異性体の陽性率は低く, 全便を使用した場合にも violin, verdin の出現は痕跡程度にとど

まり, その判定が困難であったのは mesobilinogen が殆んど含まれていなかったためである。次に教室谷^{10) 11)}は mesobilinogen の尿中陽性度と膠質反応との間により相関関係があることを報告しているのので, 著者も精製単離された glaucobilin 及び (mesobiliviolin) IX α dimethylester と肝機能検査成績との関係を慢性肝炎, 肝硬変症例において検討した結果, ZTT, γ -globulin とよい相関関係を認め, 肝実質障害度が高度のもの程陽性度が高いことが認められた。このことも mesobilinogen を試料として, 異性体の同定に成功した結果を裏付けるものであろう。なお glaucobilin dimethylester の吸光極大は pH6.0 では 630nm 附近にあり, 塩酸酸性下 pH1.0 では 680nm へと長波長側に偏位し, III α , IX α , XIII α の順にやや長波長側に吸光極大が認められた。

結 論

慢性肝炎 5 例, 肝硬変症 5 例, 溶血性黄疸 3 例と健康人 5 例の計 18 例についてその糞便中の mesobilinogen の酸化物より異性体を分画分離し, その分光化学的性状, 臨床的意義について検討し, 次の結果を得た。

1) 薄層 chromatography で分離された verdin 3 種は核磁気共鳴スペクトル, 質量スペクトルより glaucobilin III α , IX α , XIII α と同定された。

2) 肝疾患時の糞便中の urobilinogen 量と glaucobilin 異性体の出現とはよい相関が認められた。

3) 糞便 10g を試料とした際 glaucobilin IX α が健康者 5 例中 2 例, 慢性肝炎 5 例中 2 例, 肝硬変症 5 例中 2 例と溶血性黄疸全 3 例に認められ, glaucobilin III α は溶血性黄疸全 3 例, glaucobilin XIII α は肝硬変症 1 例と溶血性黄疸全例に認められた。

4) 以上により生体内で生成される bilirubinoid には IX α 型のみならず III α , XIII α などの異性体が含まれることが明らかとなった。

5) glaucobilin III α , IX α , XIII α の吸光極大は pH6.0 のメタノール溶液中では 630nm 附近に吸光の極大を認め, III α , IX α , XIII α の順に長波長側に偏位し, pH1.0 の塩酸メタノール溶液では 680nm 附近に吸光の極大は偏位し, III α , IX α , XIII α の順に長波長側に動いたが, エステル化前の glaucobilin とエステルの物質の間には特に大きな差はなかった。

6) glaucobilin IX α dimethylester と violin 2b (mesobiliviolin IX α dimethylester) 量と ZTT, γ -globulin の間にはよい相関関係が認められ, 肝実質

障害時の指標として有用性が再確認された。

共鳴スペクトル測定に関し御指導をいただいた医学部薬化学教室 小山鷹二教授, 岩藤章正氏に感謝致します.)

(稿を終るにあたり直接御指導をいただいた近藤忠亮講師に深く感謝致します。又質量分析, 核磁気

文 献

- 1) Gray, C. H. ; Nicholson, D. C. & Nicolaus, R. A. : The IX α structure of the common bile pigments. *Nature*, **181** : 183—185, 1958.
- 2) Petryka, Z. J. : Identification of isomers differing from IX α in the early labelled bilirubin of the bile. (31515). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123** : 464—466, 1966.
- 3) Nichol, A. W. & Morell, D. B. : Tautomerism and hydrogen bonding in bilirubin and biliverdin. *Biochim. Biophys. Acta*, **177** : 599—609, 1969.
- 4) Nichol, A. W. & Morell, D. B. : Studies on the isomeric composition of biliverdin and bilirubin by mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **184** : 173—183, 1969.
- 5) 井沢徹一 : 胆汁色素に関する研究. 第二編胆汁中 Bilirubin 異性体の検討, 岡山医学会誌 **87** : 339—345 1975.
- 6) Mc. Donagh, A. F. & Assisi, F. : Commercial bilirubin : A trinity of isomer. *FEBS Letters*, **18** : 315—317, 1971.
- 7) 渡辺春生 : Urobilin 体の定量に関する研究, 第1編 Urobilin 体の定量に関する研究, 岡山医学会誌, **71** : 6953—6965, 1959.
- 8) 渡辺春生 : Urobilin 体の定量に関する研究, 第2編 加熱時の Aldehyde 反応, 岡山医学会誌, **71** : 6967—6975, 1959.
- 9) Stoll, M. S. & Gray, C. H. : The oxidation products of crude mesobilirubinogen. *Biochem. J.*, **177** : 271—290, 1970.
- 10) 谷幹彦 : Mesobilirubinogenの臨床的意義に関する研究. 第1編 各種肝疾患時に於ける尿中 mesobilirubinogen の意義, 岡山医学会誌, **77** : 1067—1076, 1965.
- 11) 谷幹彦 : Mesobilirubinogen の臨床的意義に関する研究. 第2編 実験的肝障害時に於ける尿中 mesobilirubinogen の意義 : 岡山医学会誌, **77** : 1077—1086, 1965.
- 12) 中村教夫 : 第61回日本消化器病学会, (抄). 1975.
- 13) Watson, C. J. & Hawkinson, V. : *Amer. J. Clin. Path.*, **17**, 108—116, 1947.

Studies on fecal bilirubinoid.

Part 2. Characterization and clinical significance of fecal mesobilirubinogen.

by

Kenji SEO

The first department of internal medicine, Okayama university medical school.

(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

Disturbance of bilirubin metabolism in the intestine in liver diseases was investigated from the oxidation products of mesobilirubinogen. Feces were obtained from five normal subjects, five cases with chronic hepatitis, five cases with liver cirrhosis and three cases with hemolytic jaundice. The oxidation products of mesobilirubinogen were prepared by Stoll's thin layer chromatography after extraction procedure from feces by Watson. The oxidation products were divided into two groups, verdins (glucobilins) and violins (mesobiliviolins).

The verdins were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) spectra and mass spectrometry as glucobilin isomers. The results were as follows ;

1) Glucobilin III α , IX α and XIII α dimethylester were separated by thin layer chromatography and identified with NMR spectra and mass spectrometry.

2) Significant correlation between the appearance of glucobilin isomers and the amount of urobilinogen extracted from feces in liver diseases.

3) Using ten grams of feces, glucobilin IX α was found in two out of five normal subjects, in two cases with chronic viral hepatitis, in four cases with liver cirrhosis and in all cases with hemolytic jaundice. Glucobilin III α was detected only in all cases with hemolytic jaundice, and glucobilin XIII α was positive in a case with liver cirrhosis, and in all cases with hemolytic jaundice.

4) According to these results, it became clear that not only IX α type but III α , XIII α type of bilirubinoid were contained in the human feces.

5) Absorption maxima of glucobilin III α , IX α and XIII α were found at 630nm, 630.5nm and 637nm, and the dimethylester of them were at 630.5nm, 633.5nm and 636nm respectively in methanolic solution at pH6.0. After acidification with hydrochloric acid into pH1.0, absorption maxima of them were moved to longer wave length. These maxima were 681.5nm, 682nm and 682.5nm in free type in the order of glucobilin III α , IX α and XIII α .

6) Significant correlations between the amount of glucobilin IX α dimethylester and ZTT or γ -globulin were found. And it was reaffirmed that the appearance of fecal glucobilin IX α and mesobiliviolin IX α in various liver diseases were important items to determine the degree of the liver parenchymal damage.