

高速液体クロマトグラフィーによる血清ビリルビン 分画の迅速測定法

中村博臣^{®*}， 米田考司， 片山善章^{**}， 喜谷喜徳*

(1987 年 1 月 20 日受理)

高分子の血清タンパクを不可逆的に吸着する安価なガードカラム (Hibar Lichro CART 4-4) を分析カラムの直前に接続し，20 検体ごとあるいはそれ以前でも，クロマトグラムのピークがテイリングを起こし始めるごとにガードカラムを交換することにより，迅速に血清ビリルビンの分画を測定した。この方法は，血清をコール酸ナトリウム溶液で希釈した後，ミリポアフィルターで濾過した濾液を用いて HPLC を行うものである。その結果，Lauff らと同様のビリルビンの4分画のピークが得られた。各分画の5回の測定で相対標準偏差は 5.4~16.7% であった。又，ヒト血清を用いての Lauff 法及び多重層フィルム法との相関係数は 0.863~0.969 と良好な相関が得られた。

1 緒 言

血清ビリルビン (総ビリルビンと直接ビリルビン)¹⁾は主にジアゾ法により測定されてきたが，最近ビリルビン分画を測定すると，更に詳しい診断が可能²⁾ となり，特に胆管閉そく症における手術の予後のモニターとして注目³⁾ を浴びてきた。又，ビリルビン分画の測定により，ジアゾ法による直接ビリルビン値は直接ビリルビンの全量を測定していないとの問題点も指摘された⁴⁾。既にビリルビン分画の測定には種々の方法が報告されてきたが，Lauff らによる HPLC⁵⁾ がレファレンス法としてよく知られている。著者らは Lauff らの方法を追試したが，検体の前処理が煩雑なうえ，前処理中にかなりの分画部分も取り除かれることが分かり良好な結果が得られなかった。そこで前処理の迅速かつ簡略な方法を検討し，①分析カラムと同じ成分の安価なガードカラムを用いて高分子の血清タンパクを除去し，②そのガードカラムを 20 検体ごとあるいはそれ以前でも，クロマトグラムのピークがテイリングを起こし始めるごとにガードカラムを交換することにより，良好な結果を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

コール酸ナトリウム，リン酸二水素カリウム，リン酸一水素カリウム，リン酸 (いずれも特級)，2-メトキシエタノール，2-プロパノール (いずれも HPLC 用) は和光純薬工業製，トリトン X-100 は Rohm & Haas 製を用いた。血清の 11 倍希釈に用いるコール酸ナトリウム溶液は，0.05 M のリン酸二水素カリウムとリン酸一水素カリウムを混合し，pH 6.8 に調整し，最終濃度が 0.2%w/v になるようコール酸ナトリウムを加え，更に 0.05%v/v になるようにトリトン X-100 を加えた後，0.45 μ m のミリポアフィルターで濾過する。HPLC 用のこう配溶離溶媒 1 は 0.05 M のリン酸二水素カリウムをリン酸で pH 2.0 に調整し，最終濃度が 5%v/v になるように 2-メトキシエタノールを加えた後，0.45 μ m のミリポアフィルターで濾過する。こう配溶離溶媒 2 は 2-プロパノールに 5%v/v になるように 2-メトキシエタノールを加え，全量 1 l 当たり 25 ml のリン酸を加えた後，0.45 μ m のミリポアフィルターで濾過する。

2.2 装 置

HPLC 装置は東洋曹達工業製 SP8750 型，検出器として UV-8 model II (東洋曹達工業製)，プリンターは 3390 interator (Hewlett-Packard 製) を用いた。分析カラムは LiChrosorb RP-8 (Merck 製，粒子径 10 μ m，250 mm $\times$ 4.6 mm i. d.)，ガードカラムは Hibar Lichro CART 4-4 (Merck 製) を分析カラムの直前に接続して用いた。

* 名古屋市立大学薬学部薬品分析化学教室：467 愛知県名古屋市瑞穂区田辺通 3-1

** 国立循環器病センター臨床検査部：565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

2.3 HPLC 条件

Lauff らの方法⁶⁾と同じ HPLC 条件で測定した。

3 結果と考察

3.1 前処理の迅速化

血清のビリルビン分画の中にはアルブミンと強く結合したデルタ分画ビリルビン (B_δ) があり, HPLC で分析する前にすべての血清タンパクを除タンパクするとこの B_δ が取り除かれるため, 除タンパクを行わないで分析する必要がある。Lauff らは硫酸ナトリウムにより高分子タンパク (分子量約 400000 以上, 主にグロブリン) のみの沈殿と濾過を繰り返し, 低分子タンパク (主にアルブミン, 分子量 67000) を含む濾液を HPLC で分析した。これにより分析カラムの高分子タンパクとの不可逆的吸着による分離能の低下を防ぎ, かつアルブミンと強く結合した B_δ の分画測定をも可能にした。しかし Lauff らの前処理操作は煩雑で時間もかかるうえに, 沈殿物中に存在するかなりの分画成分をも沈殿除去してしまう。この問題を解決するため, 著者らは分析カラムと同じ充てん剤で安価なガードカラムを用いて高分子タンパクを不可逆的に吸着させ, 前処理操作の迅速化を検討した。ガードカラムとしては分析カラムと同じ成分の Hibar Lichro CART 4-4 を用いた。予試験として, ヒト血清を蒸留水で 10 倍希釈し, その希釈液 10 μ l をガードカラムのみに注入し, 通過液を Ouchterlony 法 (平板内二重拡散法) でグロブリンが取り除かれていることを確認した。血清の希釈液としては, ビリルビン測定試薬 (酵素法) に広く使用されているコール酸ナトリウムを含むリン酸緩衝液 500 μ l で血清 50 μ l を希釈し, 0.45 μ m のミリポアフィルターの濾液 10 μ l を HPLC 装置に注入する。ガードカラムの寿命は分析する血清のタンパク量により異なるが, 20 検体を超えるとクロマトグラムのピークがテイリングを起し始めるので, 20 検体ごとあるいはそれ以前でも, テイリングを起し始めたときにガードカラムを交換した。溶媒及び分析条件は Lauff らと同じ条件を用いた。既に著者らは 300 検体を超える分析を実施しているが, まだ十分使用可能である。

3.2 分画の定量

本法によるヒト血清の分画 (Fig. 1) は, Lauff らと同様 4 分画のピークが得られた。それぞれのピークの同定を Fig. 2 に示した。 α 分画 (B_u : unconjugated bilirubin) は純品のビリルビンを用いて, β , γ , δ 分画は標準物質が入手困難であるので, γ 分画 (δB_e : di-

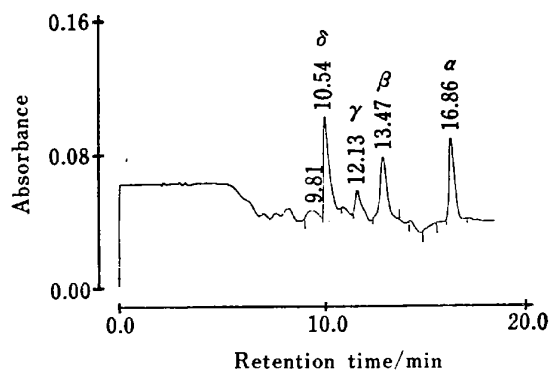


Fig. 1 HPLC chromatogram of human serum
 α , unconjugated bilirubin (B_u); β , γ , conjugated bilirubin (B_e); δ , delta bilirubin.

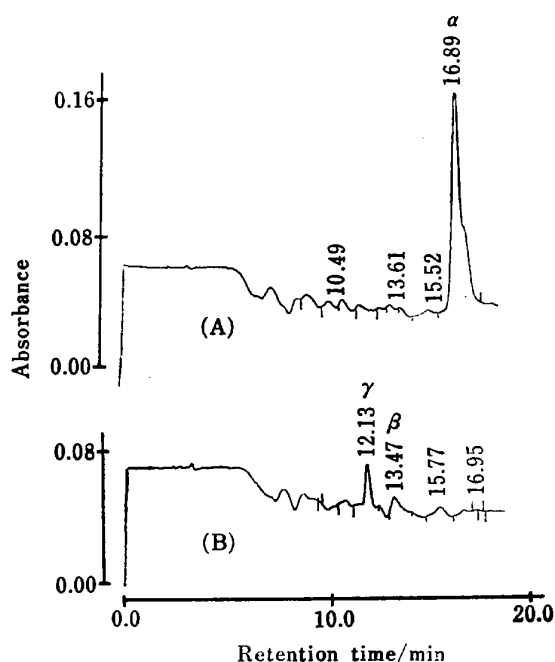


Fig. 2 HPLC chromatograms of bilirubin standard (A) and human bile (B)

Table 1 Reproducibility for the determination of human serum bilirubin in the fractions

	N	X/mg dl ⁻¹	S. D.	R. S. D., %
B_u	5	5.54	0.928	16.6
B_e	5	14.93	0.813	5.4
B_δ	5	4.72	0.652	13.8

R. S. D.: Relative standard deviation; B_u : unconjugated bilirubin; B_e : conjugated bilirubin; B_δ : delta bilirubin

conjugated bilirubin) を多く含み β 分画 (mB_e : mono-conjugated bilirubin) を少量含むヒト胆汁を用いた。 δ 分画 (B_δ : delta bilirubin) については, δ 分画溶液を免疫電気泳動法で抗アルブミン抗体との反応により,

Table 2 Values and correlation between the present method and the Lauff's & the multi-layered film methods for the determination of bilirubin in the fractions

Sample No.	B _u /mg dl ⁻¹			B _e /mg dl ⁻¹			B _s /mg dl ⁻¹		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	1.37	1.22	1.30	2.19	1.81	1.20	1.05	1.59	1.90
2	2.19	3.03	2.18	2.37	1.48	2.36	1.57	1.64	1.56
3	4.87	3.71	3.90	6.56	8.69	6.00	6.13	5.16	7.50
4	7.14	6.03	5.00	5.57	9.33	7.10	8.38	5.74	8.60
5	5.33	2.87	5.10	12.41	15.13	10.30	6.20	5.94	10.00
Linear regression	{ B : $y=1.17x+0.23$ ($r=0.863$) C : $y=1.33x-0.47$ ($r=0.954$)			{ $y=0.71x+0.57$ ($r=0.969$) $y=1.07x+0.04$ ($r=0.949$)			{ $y=1.39x-0.92$ ($r=0.961$) $y=0.76x+0.19$ ($r=0.928$)		

A : present method, B : Lauff's method, C : multi-layered film method ($n=5$, y : the present method)

Table 3 Correlation between the present method and the diazo & the bilirubin oxidase method for the determination of bilirubin in the fractions

	Diazo method		Bilirubin oxidase method	
	r	linear regression	r	linear regression
TBil vs Tarea	0.906	$y=7626x+8175$	0.929	$y=8768x+7147$
Direct bilirubin	0.973	$y=1.36x-0.123$	0.974	$y=1.53x-1.36$

TBil : total bilirubin, Tarea : total area by HPLC ($n=18$, y : the present method)

アルブミンと強く結合している B_s と同定した。この結果、著者らの得たクロマトグラムのピークは Lauff らの結果と良く一致した。各分画の定量は、Lauff らと同様ジアゾ法による総ビリルビン値に対して、HPLC による全分画の総面積に対する各分画の面積を乗じて濃度を求めた（各ビリルビン分画濃度＝総ビリルビン濃度×HPLC 各分画面積/HPLC 総面積）。又、本法でも Lauff らと同様 β 分画と γ 分画を合せて conjugated bilirubin ($B_e = mB_c + dB_s$) とした。

3.3 再現性

胆管閉そく症の黄だん患者の血清を用いて、5 回の測定を行い各分画の再現性を調べた。その結果、相対標準偏差は 5.4～16.7% とほぼ満足できる結果が得られた (Table 1)。

3.4 他法との相関

黄だん患者のヒト血清 5 検体を本法、Lauff 法、多重層フィルム法⁶⁾ (ドライケミストリー) で測定し、比較した。各分画のビリルビン濃度に対する本法と他法との相関係数 (r) は 0.863～0.969 と比較的良好な結果が得られた (Table 2) が、相関式において本法と Lauff 法と傾きが異なっている。Lauff 法では硫酸ナトリウムによる塩析のため、B_s が沈殿除去される由に本法の B_s の濃度が高くなっていると思われる。又、その結果各

分画の濃度は総面積比で求められるため、B_e の濃度は Lauff 法では高くなり本法の B_e の方が低くなっていると考察される。又、従来のジアゾ法⁷⁾ 及びビリルビンオキシダーゼ法⁷⁾ での総ビリルビン値と本法の HPLC による総面積及び直接ビリルビン値を比較した。相関係数 (r) は 0.906～0.974 と良好な値が得られた (Table 3)。

3.5 考 察

従来のジアゾ法及びビリルビンオキシダーゼ法による総ビリルビンと、直接ビリルビン以外のビリルビン分画を本法の HPLC によって、より迅速な測定を可能にし、胆管閉そく症、肝炎、肝がんなどによる黄だんの種類及び各分画を経時的にモニターすることにより、更に的確な診断が得られることが期待できる。

終わりに、黄だん血清を測定していただいた Eastman Kodak 社、J.J. Lauff 博士に厚く感謝します。

(1986 年 10 月、日本分析化学会)
(第 35 年会において一部発表)

文 献

- 1) L. Jendrassik, P. Gröf : *Biochem. Ztschr.*, **297**, 81 (1938).
- 2) 米田考司, 辻 哲, 栢森裕三, 中村まき子, 奈須正人, 藤田誠一, 片山善章, 伊藤敬一 : 日本臨床病理学会第 32 年会講演要旨集, p. 248 (1985).
- 3) 足立幸彦, 山下正巳, 犬房裕子, 尾崎 潔, 大山博正, 中村博臣, 山本俊夫 : 日本臨床, **8**, 91 (1985).

- 4) D. H. Lo, T-W. Wu : *Clin. Chem.*, **29**, 31 (1983).
- 5) J. J. Lauff, M. E. Kasper, R. T. Ambrose : *J. Chromatogr.*, **226**, 391 (1981).
- 6) H. Nakamura, A. Kosaka, Y. Kidani : *Anal. Sci.*, **2**, 203 (1986).
- 7) 栢森裕三, 片山善章 : 臨床検査機器・試薬, **9**, 481 (1986).

☆

A rapid method for fractionating serum bilirubin by HPLC. Hiroomi NAKAMURA*, Koji YONEDA, Yoshiaki KATAYAMA** and Yoshinori KIDANI* (*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Tanabedori, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi 467, **Clinical Laboratory, National Cardiovascular Disease Center, Fujishirodai, Suita-shi, Osaka 565)

A simple and rapid method for fractionating serum bilirubin by means of HPLC has been established by modifying the method of Lauff *et al.* In our procedure, the cumbersome and time-consuming pretreatment of serum in the previous method is replaced by the use of the guard column (Hiber Lichro CART 4-4, Merck). This guard column retains high-molecular weight serum

proteins to protect the analytical column from the irreversible adsorption, and it is changed every 20 samples or whenever the tailing is observed in the chromatogram. The present method requires only the dilution of 50 μ l of serum with 500 μ l of sodium chlorate solution (0.2 w/v% sodium chlorate and 0.05 v/v% Triton X-100 in 0.5 M phosphate buffer, pH 6.8), and subsequent filtration of the mixture through a 0.45 μ m Millipore filter. Ten microliters of the filtrate is injected into the column; the HPLC conditions are the same as described by Lauff. The four fractions of serum bilirubin are obtained. The relative standard deviations for each bilirubin concentration in the fractions are 5.4 to 16.7% ($n=5$). The correlation coefficients with other methods including the Lauff's method are 0.863 to 0.974.

(Received January 20, 1987)

Keyword phrases

fractionation of serum bilirubin by HPLC; pretreatment with the guard column; delta bilirubin; unconjugated and conjugated bilirubins.