

## 医学博士山岡憲二君の「血色素並びに胆汁色素の研究」 に対する授賞審査要旨

肝臓病や或る種の血液疾患には屢々黄疸が現われるが、これは bilirubin が体内に停滞するためである。この bilirubin は血色素の構成々分である protoporphyrin から出来るのであるが、日々二〇億もの崩壊する赤血球から遊離する血色素を基にして、何処でどうして出来るのか生化学的に不明であり、bilirubin を含む胆汁色素の性質の多くもまた不明のままであつた。これらに対する山岡憲二君の研究は、大別すると三つに分けることが出来る。

### 一 胆汁色素の非酵素的生成

胆汁色素は血色素、アスコルビン酸、及び分子酸素の相互作用で試験管内で調製し得るが、これに関し次の新知見を得た。

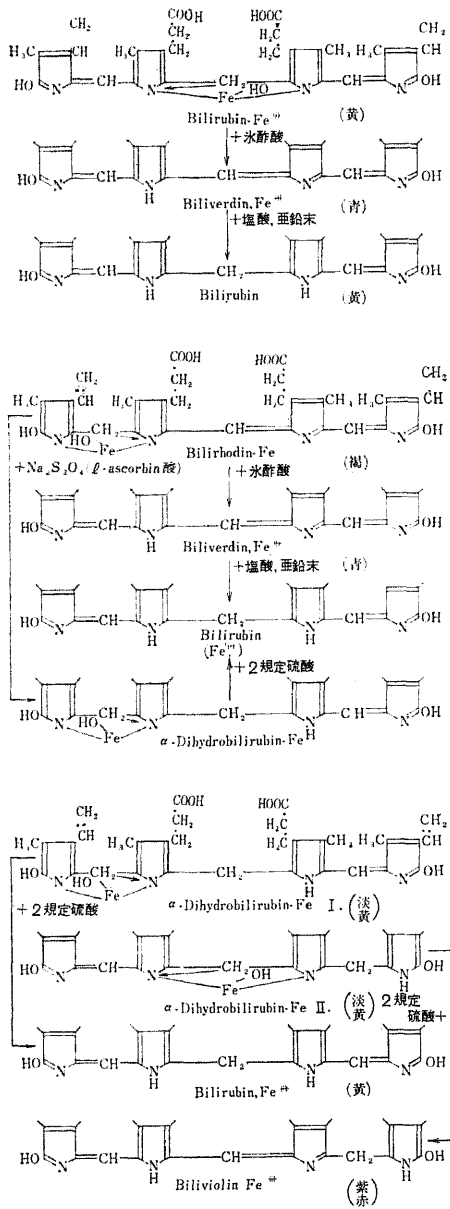
(一) 血色素の globin と鉄の消長、及び生成物の分離並びに検討。反応開始時には globin が健全で鉄は二価であることを要するが、globin は速やかに変性し、これが又胆汁色素生成に必須の条件である。この際鉄は三価となり、その抽出には始め三・五%の塩酸濃度を必要とするが、反応の進行と共に〇・四%でも容易となり、次いで自然に脱落するに至る。生成物としては、従来報告されている verdoheme, biliverdin, biliveroin の外に新たに bilirubin, bilifuscin、及び次に述べる鉄錯塩を column chromatography で分離した。

(二) Hemosiderin の本態の解明。溶血に依る資材過多などの悪条件で、網内系を始めとする組織に沈着し、その過

剰は疾患を意味するが、本態はまだ不明のままであつた。依つて前項の試験管内調製、尿 hemosiderin 顆粒の解析、及び皮下血腫伸張標本の経時的な組織化学的検索から、hemosiderin を bilirubin, bilirodin 及び  $\alpha$ -dihydrobilirubin に水酸化第二鉄と変性 globin が配位したものとし、 $\alpha$ -dihydrobilirubin の鉄錯塩には二つの異性体があることを見出した。これらの化学構造と Berlin blue 反応を中心にした諸反応を、次に図示した。

## 二 胆汁色素の酵素的生成

非酵素的胆汁色素生成は有機化学反応で、これに生物学的裏付けを与えることは困難であつた。このことから、一九四三年以降放棄されている酵素的研究に移つた。



(一) 生体に於ける胆汁色素生成部位の決定。放射能鉄  $^{59}\text{Fe}$  で標識した血色素の臓器毎の分布とその経時的な消長、 $^{59}\text{Fe}$  で標識した血色素の組織や細胞への取込とその経時的な消長の autoradiography に依る追求から、胆汁色素生成の主要臓器は肝臓と腎臓で、肝細胞と腎尿管上皮の胞体で行われると考えられたが、これは酵素活性性の分布とも良く一致し、網内系の関与は何れの場合も僅少であつた。従つて病理学の巨匠 Aschoff によつて提唱され、今日総ての成書に載つている網内系生成説の概念は、生化学の立場からは訂正を要する。

(2) Heme  $\alpha$ -methyl oxygenase。肝の酵素活性は腎のその二倍に達することから、肝の acetone 粉末の pH 七・四の〇・一モル磷酸緩衝液に依る抽出液を材料に用い、〇・四—〇・六中性硫酸飽和で沈澱する蛋白分画を透析し、これを更に hydroxyapatite 及び DEAE-cellulose の二段階の column chromatography で精製した。これは超遠心、Tiselius 電気泳動、及び紫外部吸収スペクトルで単一蛋白体であり、終始四度以下の温度で処理しても、基質の一つである酸素に不安定なため一概にはいえないが、比活性は蛋白当り肝 acetone 粉末抽出液の約一六倍であつた。本酵素は補酵素として NADPH と二価鉄とを要求し、肝細胞の水溶性蛋白分画にのみ在つて、顆粒分画には無いが、核分画には活性化因子が含まれており、アスコルビン酸と副腎皮質ホルモンの共用で誘導され、この誘導は puromycin など蛋白合成阻害剤で抑制される。基質は血色素、myoglobin、及び pyridine-hemin などであるが、血色素はそれ単独よりも、血漿中の haptoglobin と複合体を作つた方が分解され易く、収量も理論値に達し、生理的基質はこの複合体と考えられる。血漿中に haptoglobin を欠くものがあるとされているが、それは見掛上の問題で、産生は常に行われている。Myoglobin は酸素に親和性が強いいためか、それ単独でも容易に分解される。Hemin のアルカリ溶液や protoporphyrin は基質とはならない。反応過程は最終反応生成物の吸収スペクトル、及び酸素消費量の消

Time after Incubation(min.)	△Biliverdin	△Formaldehyde			△Fe	△Product
	$\mu$ moles	$\mu$ moles			$\mu$ moles	$\mu$ moles
		1	2	3		
15	+ 18	+16	+15	+12	+ 28	- 16
60	+ 42	+49	+48	+42	+ 60	- 53
360	+ 50	+73	+67	+63	+ 68	- 62
720	+ 48	+40	+42	+32	+ 82	- 74

- 1 chromotropic acid assay
- 2 diacetyldihydrolutidine assay
- 3 as 2, 4-dinitrophenylhydrazone

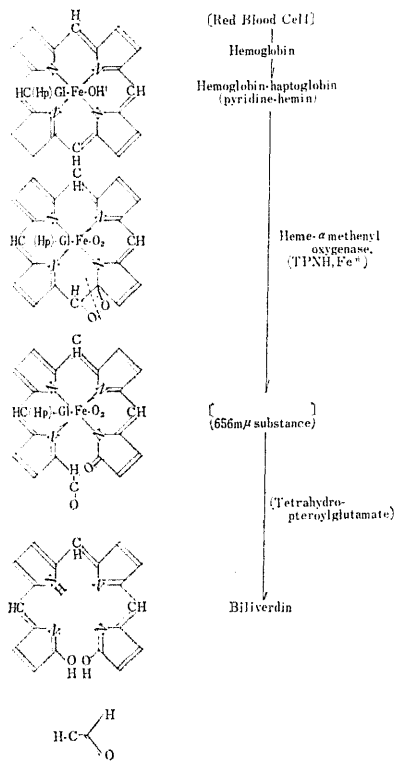
Substrate	Color	Mpt. (°C)	Elementary Analysis (%)			$\lambda$ max (m $\mu$ ) in EtOH	$\epsilon$ mM in EtOH
			C	H	N		
Pyr.-Hemichr.	yellow	123-125	45.38	4.06	23.28	359	32.75
Hb-Hp-Complex	yellow	128-130	45.16	4.23	23.23	359	30.47
Myoglobin	yellow	125-127	45.49	4.30	23.60	359	31.58
Formaldehyde	yellow	162-164	40.00	2.86	26.67	349	23.27

長で追求することが出来るが、白金電極 polarography で heme の一分子の分解には二分子の酸素が必要である。本酵素系は基質の一つである酸素のほか、二価鉄イオンや蛋白の SH 基に親和性を有する化学剤、並びに金属イオンで阻害されるが、反応液に catalase の過量を加えても影響は無い。反応最終生成物は単一で、暗緑色板状の結晶として抽出されるが、その水溶液は不安定で、pH 七・四で四度以下の温度に保つ必要がある。酸で水解すると stoichiometrical に biliverdin, 鉄、及び formaldehyde になり、formaldehyde は反応液中にも chromotropic acid で証明される。反応最終生成物はまた Gmelin 反応のほか各種の aldehyde 反応が陽性で、安定な hydrazone 結晶を生ずるが、基質を異にしてもこれらは色調、融点、元素分析値、可視部吸収スペクトルの極大、及びミリモル吸光系数値をほぼ等しくし、混融試験でも相

互の間に融点降下を示さず、赤外吸収スペクトルも同型で、同一物と看做すことが出来る。

尚 formaldehyde に依るものとは、総ての点で異つてゐる。更に原素分析値と分子量からすれば、hydrazone は単一の pyrrole 核を有するに止るが、これは hydrazone 反応の際に formyl 基の反対側の methenyl で解離が起るためと思われ、β位の vinyl 基に近し methenyl の二重結合が、解離が常に行われるのは、興味が深い。

これらの諸事実から最終反応生成物は、なお鉄を含む formylbiliverdin と同定され、鉄は三個と考えられる。依つてこの酵素は heme の protoporphyrin の α-methenyl に分子酸素を添加し、これを酸化的に開環するものとして、heme α-methenyl oxygenase と命名した。Formylbiliverdin を biliverdin と formaldehyde とに水解する酵素は、tetrahydropteroylglutamate を補酵素として、heme α-methenylformylase と呼ぶこととした。斯く二段階の酵素作用で、血色素から biliverdin が出来ることになつた。

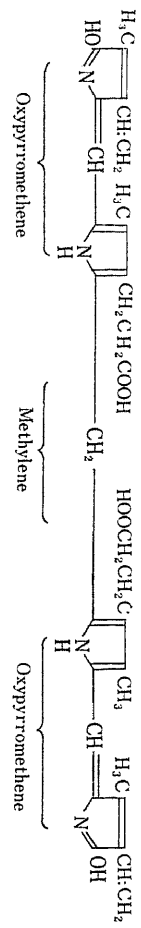


### 三 胆汁色素の性状と代謝

血色素から出来た bilirubin はそのままに、又 bilirubin に還元され、更にその殆どは ester となつて、共に胆汁に混つて腸内に入り、此処で細菌に依る還元を受け、何れも urobilinogen になる。

(一) 直接並びに間接 bilirubin の本態の解明。Diazo 反応からみて bilirubin には直接と間接とがあつて、前者はそのままに反応するが、後者はこれに alcohol か caffeine を加えた後でないと反応が起らず、これらは黄疸の鑑別に用いられている。その本態については、Hijmans van den Bergh の提唱以来、夥しい報告があるにも拘らず、依然として不明のままであつた。然るに三三年後の一九四九年になつて山岡君は、間接 bilirubin は天然のままの二塩基酸であるが、直接 bilirubin はその ester であり、尿には塩となつて存在するもののあることを証明して、本問題を解決した。次いで諸外国に先んじて paper chromatography で直接と間接 bilirubin を、又乾燥胆汁の chloroform 溶液から silica-gel column chromatography で、二塩基酸、ester、及び塩の各分面を分離したが、生体の直接 bilirubin は多元性で、更に数種のものに分けることが出来る。次に alcohol では methanol と ethanol とで bilirubin-azo 色素の性状が異り、caffeine は bilirubin と結合して diazo 反応を陽転させるが、このものと bilirubin 自体とでは、paper chromatography で Rf を異にするから、共に分子化合物を作つて、間接 bilirubin を直接化することゝが判明した。更に diazomethane による bilirubindimethylester を始めとする種々の直接 bilirubin を調製し、これらについて検討を加えた処、diazo 反応は bilirubin 分子中の methylene の態度に關係し、その両翼の oxypropylene の水酸基を除く他の部分に、原子、原子団、又は分子が結合すると、methylene が活性化されて、その

ためにもとも陰性であるへや diazo 反応が陽性になるとの、通則に到達することが出来た。



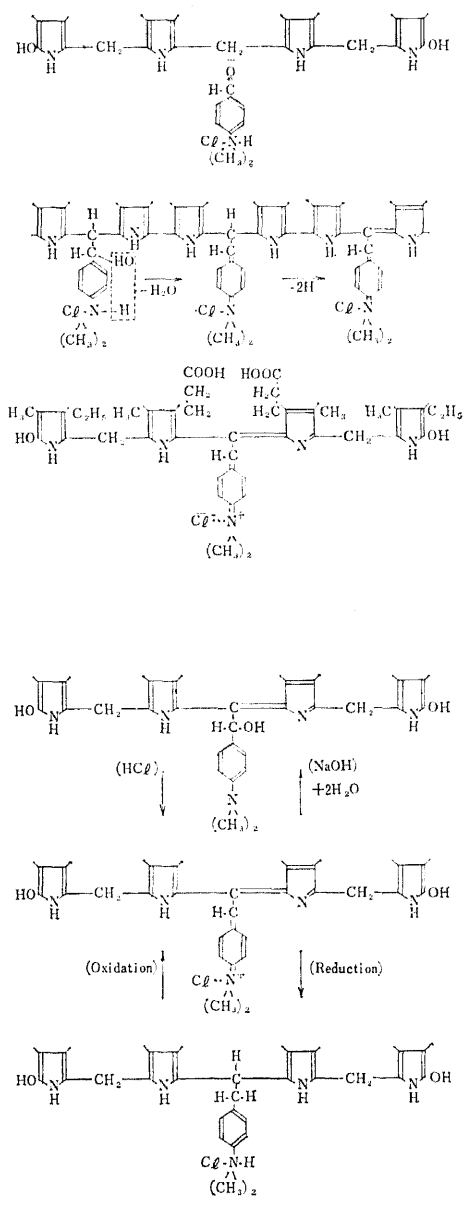
Bilirubin-azo 色素は paper chromatography で bilirubin 分子の変化に伴って R<sub>f</sub>を異にするが、diazo 反応の際 bilirubin は methylene の処で水解されて、その非対称性から neo- 及び isoneo-xanthobilirubinic acid を生じ、diazonium 塩はその断端の methenyl で反応するとおそれるのび、bilirubinazo 色素には二つの異性体があることになり、これもその色調から区別出来た。尚 methylene は二つの pyrrole 核の共通する α 位の側鎖に相当するが、pyrrole の α 位の側鎖の反応力は、これに隣る β 位の側鎖の性質に強く影響されるといわれている。処で bilirubin では β 位の側鎖は対称性の二つの propionic acid となっており、従つてこれより ester 若くは塩への変化が推測され、実験的にこれを証明して、直接並びに間接 bilirubin の本態の、解明となつたのである。

(二) 腸内での還元、吸収、及び肝臓での分解。抗生剤によつて腸内細菌の発育を調節すると、腸内より還元の各段階として、bilirubin, dihydrobilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin, mesobilinogen 及び stercobilinogen が分離され、最後の二つを urobilinogen と呼ぶが、生理的なものは stercobilinogen で、二塩基酸と ester 及び塩とがあり、何れも ether には移行するが、chloroform に移るのは二塩基酸のもののみで、他は鹼化か酸水解の後で

ないと移行しない。Dihydromesobilirubin は二つの異性体があり、urobilinogen と共に直接 diazo 反応を呈し、Ehrlich 氏 aldehyde 反応も陽性である。Bilirubin の吸収は可能程度に止るが、urobilinogen は容易に吸収されて、肝臓で速やかに分解される。この際 bilirubin は出来ず、生理的な尿色素として知られている urochrome B としての mesobilifuscin を生ずるが、これは dipyrrole 物質である。

(四) Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応過程の解明。この反応は日常臨床検査に用いられているが、その呈色過程は解つていなかった。Urobilinogen は bilirubin 分子に八乃至十二個の水素原子がついたものであるから、中央の methylene は当然活性化されている筈である。依つて検定剤の sodium nitroprusside や sodium 1, 2-naphthoquinone-4-sulfonate によってこれを確かめ、これらと Ehrlich 氏試薬との間に反応の競合が起ることから urobilinogen に於けるこれらのものの反応部位が、共通していることを知った。更に Ehrlich 氏 aldehyde 反応が、高濃度の塩酸の存在下に於てのみ起り、還元剤で抑制され、抑制されたものが酸化剤で促進されること等から、反応過程を次の様に推定した。即ち Ehrlich 氏 aldehyde 試薬中の p-dimethylaminobenzaldehyde の塩酸塩が、urobilinogen の中央の methylene に縮合して urobilinogen は urobilin に酸化され、色素は urobilin に p-quinone 型の助色団が共軛した、化学構造を有すると考えられる。これは triphenylmethane 系色素の合成過程に近似し、その化学構造も類似することから、この色素の同定に用いられる諸種の化学反応を試み、これを確めることが出来た。反応式は次の通りである。なお formaldehyde の反応阻害は、urobilinogen の中央の methylene に oxymethyl が導入されるためである。





(四) 腎臓よりの排泄機構の解明。胆汁色素は普通尿細管から排泄されるが、黄疸尿中の bilirubin はその殆どが直接型で、間接型は極く僅かしか無く、その原因を明らかにし得たものは無い。そこで先ず二塩基酸間接 bilirubin は酸性の、また ester 型直接 bilirubin は塩基性の、共に染料としての性質を有することを立証した。そうすると水溶液では、前者は陰性に荷電するか両性イオンとなり、後者は分子中の imino の存在で、陽性に荷電する筈である。

ところで bilirubin は間接も直接も血中では、両性電解質の albumin に吸着されているから、その親和性は medium の水素イオン濃度に支配される。そうすると直接 bilirubin は、pH 七・四の末梢流血中では albumin に親和性が強いが、腎臓での酸性方向への水素イオン濃度の推移と共に、親和性を失って尿中への排泄が容易となる。此際間接

bilirubin は、直接のそれと真反対の過程を辿る。これらは、両 bilirubin に依る蛋白線維の染色性とこれに対する水素イオン濃度の影響、黄疸血清の水素イオン濃度を緩衝液で種々に変え、alcohol で除蛋白後上清中の bilirubin 量を測定すると、その消長は直線ではなくて二等辺三角形に近くなり、水素イオン濃度の推移で血清蛋白との親和性を異にする、二種類の bilirubin があることになること、暮の腎臓を黄疸血清で灌流し、その水素イオン濃度を緩衝液で変えると、酸性側で尿中への直接 bilirubin の排泄が増加すること、及び黄疸患者や動物に塩化安門を与えると、尿中に比較的に直接 bilirubin が増加し、重曹を与えると比較的に間接 bilirubin が増加すること等から、裏付けることが出来る。腎臓からの排泄に当り、bilirubin の一部は dipyrrole の propendyopent に酸化されるが、塩基性が強くて殆ど排泄域の無い urobilinogen からは、この様なものは出来なご。

以上は三百有余の論文より抽出されたもので、その多くは二三篇となつて日本学士院紀要に掲載されている。これは既成の概念を改め、多年の懸案を解決し、先人未到の境地を開拓したもので、この方面に関心を有する諸外国の多数の研究者からも、高く評価されている。研究は終始生化学に基礎を置いているが、その範圍は人の生理、病理、及び臨床方面にも及び、生物学的に重要な過程に、一貫した代謝系を確立したものと見えよう。