



ビリルビン検査

よし だ とし ひこ さわ べ ゆう じ の むら ふみ お
 吉 田 俊 彦 : 澤 部 祐 司 : 野 村 文 夫
 Toshihiko YOSHIDA Yuji SAWABE Fumio NOMURA

血清におけるビリルビン (BIL) の検査は肝胆道疾患の診断、経過観察、重症度、予後判定や黄疸・貧血の鑑別などに用いられてきた。その歴史は約100年にもなる。古くから使用されてきたジアゾ反応性による「直接・間接」の名称は、測定法が大きく進歩した現在でも変わらず使用され続けている。この間、新しい測定法が開発されても、長期にわたって蓄積されてきた臨床的価値によって、ジアゾ反応性に近似した測定値が得られるように配慮されてきた。これは測定値の変化によって判断が変化することを敬遠した結果であるとも思われる。近年ようやく保険診療上の呼称にも改正が行われ、直接ビリルビン (D-BIL) の他にも抱合型ビリルビン (C-BIL) が準用項目として記載され、さらに平成24年度の改定では同列として扱われるようになった。そこで今回は長い歴史の中で転機を迎えたBIL測定に関して、血中における存在様式と、測定法の特徴や変遷を解説し、さらに標準化の動向を示し、今後の展望を考えてみたい。

I. BILの血中における存在様式

BILは主にヘモグロビンの崩壊により生じるヘモグロビンヘムのポルフィリンの開裂によって生成する。ここでBILの構造式と分子内結合状態を図1に示す。非抱合型ビリルビン (UC-BIL) はプロピオン酸のカルボキシル基が解離せず、ピロール環の-C=Oや-NHと水素結合を形成するため、極性基であるカルボキシル基が分子内に包まれた構造となる。それが疎水性を示す。一方、プロピオン酸のカルボキシ

ル基がグルクロン酸によって抱合されたC-BIL (モノグルクロナイド、ジグルクロナイド) は親水性である。このことが、現在でも使用されているBILの名称としての間接ビリルビン (I-BIL) と直接ビリルビンに関係しており、親水性のBILはジアゾ試薬に直接反応するが、疎水性のBILは反応促進剤を加えることにより初めて反応する。何れもアルブミンと可逆的な結合をしている。この他にC-BILがアルブミンと不可逆的な強固な共有結合をした δ -ビリルビン (δ -BIL) も存在する。

II. 種々の測定法とその原理

1883年に Ehrlich¹⁾ が尿中のBIL検出のためにジアゾ法を考案して以来、改良が重ねられた種々のジアゾ法を始め、直接比色法、酵素法、化学酸化法、分画定量法、免疫測定法などが開発されてきた。本項では本邦において主に使用されてきた測定法についてその測定の詳細と問題点について述べる。

1) ジアゾ法

Ehrlichがスルファニル酸と亜硝酸ナトリウムによるジアゾ法でBILを検出後、1916年に Hijimans van den Berghがジアゾ試薬を血清に加えるだけで反応するBILとエタノールを加えて除蛋白後に反応するBILの2種類の存在を報告した²⁾。そして、1937年に Malloyと Evelynによってメタノールを反応促進剤として、酸性下でジアゾ反応を行う方法が発表され³⁾、「直接」と「間接」という名称が使用され始めた。その後、Billingら⁴⁾により、それぞれが

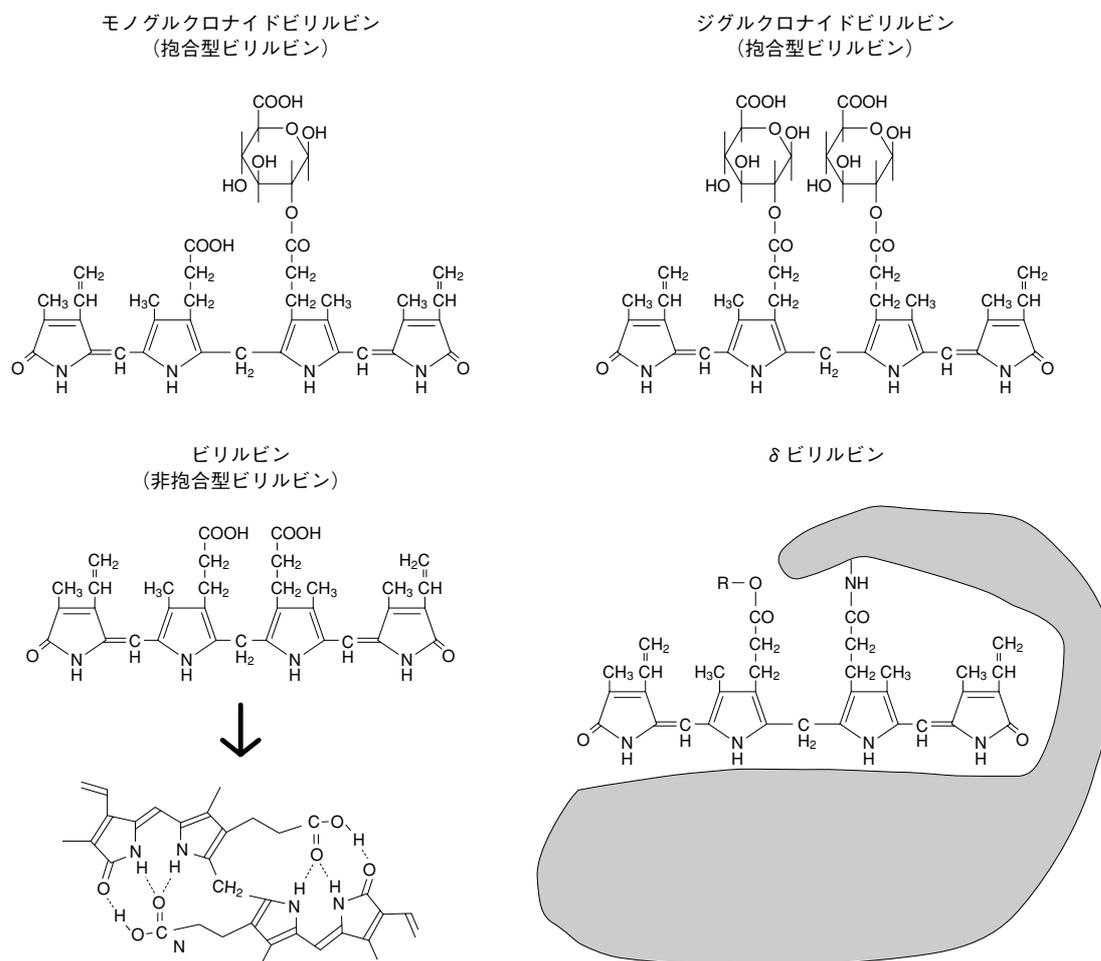


図1 BILの構造式と分子内結合状態

グルクロン酸抱合型、非抱合型として1956年に示された。しかし、この時点でもジアゾ反応性が構造的な分類(抱合型・非抱合型)と完全な一致とはならず、現在でも臨床診断にジアゾ反応性による分類(直接・間接)が使用されている。測定法としてのMalloy-Evelyn法は感度が低く、溶血や蛋白の影響を受け、混濁しやすいなどの問題から種々の改良がなされた。1938年にJendrassikとGrof⁵⁾が反応促進剤として安息香酸ナトリウム-カフェインを用い、ジアゾ反応後、フェーリングのアルカリ溶液を加え、アルカリアゾビリルビンとして測定した(J-G法)。これにより感度・精度ともに向上した。その後、Michaelssonによってカフェインよりも混濁の生じにくいダイフィリン-酢酸ナトリウムを用いる方法が1961年に報告され⁶⁾、特異性が高く、溶血の影響の少ない方法として広く利用された。そして1980年代よりジアゾ試薬に用いられているスルファニル酸と亜硝酸ナトリウムの塩酸溶液に代わっ

て用時調整を必要としない安定化ジアゾニウム塩を用いる方法が普及し、近年までのジアゾ法の主流となった。

2) 直接比色法

BILはそれ自体が黄色色調を有するため、その色調を重クロム酸カリウムを基準液として肉眼により比較し、濃度を概測するMeulengracht法⁷⁾(1919年)があるが、カロチン、脂肪色素、溶血、混濁などの影響を受けるため現在ではほとんど用いられていない。ただ、肉眼ではなく分光光度計を用いた専用の測定機器が発売されており、主に新生児の総ビリルビン(T-BIL)測定用として使用されている。

3) 酵素法

1981年にBILと特異的に反応するビリルビンオキシダーゼ(BOD: EC1.3.3.5)がわが国で精製され⁸⁾、この酵素を用いた測定法が開発された。本法はBIL

がBODによってビリベルジンへと酸化されることによる450nmでの吸光度の減少を測定するものである。UC-BILは緩くアルブミンと結合しており、BODでは酸化されないが、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの陰イオン界面活性剤を加えると、アルブミンと解離し、pH7~8で反応する。またC-BILはさらに緩くアルブミンと結合しているが、酸性pHにおいてSDSなどを加えなくても反応する。この時の酵素法はジアゾ試薬との分画反応性と近似しており、一部のUC-BILがD-BILとして反応したり、 δ -BILの反応挙動が一定しないなどの問題点があった。さらに猪田らはカロチンによって酵素法が偽高値となることを指摘している⁹⁾。1987年にDoumasら¹⁰⁾がpH4.5の条件下ではC-BILと δ -BILのほとんどが酸化でき、UC-BILは反応しないとしている。彼らは報告した方法が最も信頼性が高いD-BIL測定法であることを述べ、従来方法では誤った結果を招くと報告している。

一方、1996年に δ -BILを含まないC-BILのみを特異的に測定する新酵素法が開発された¹¹⁾。この方法は、従来のジアゾ法や酵素法のD-BILとは測定値に乖離を示すことから混乱を招いた。しかし、現在この試薬は保険診療上もC-BILの測定用試薬として認知されており、2種類の製造元から6社によって販売されている。しかしながら試薬の名称が直接ビリルビンを示す、D-BIL測定用試薬として市販されているため、混乱の問題は引き続き残っている。

4) 化学酸化法

酸化剤の酸化力によりBILをビリベルジンにし、黄色色調の減少を450nm付近で測定する。酸化剤として、バナジン酸を利用するもの¹²⁾と、亜硝酸を利用する方法¹³⁾がある。バナジン酸法は反応促進剤として臭化セチルトリメチルアンモニウムとEDTAを用いており、亜硝酸法はテトラデシルトリメチルアンモニウムプロミドを使用している。

5) 分画測定法

血中の存在様式で説明したような構造的に相違なBILを分画測定する方法として、ゲル濾過法やカラムクロマトグラフィー法が行われてきた。1981年にLauff¹⁴⁾らは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC法)で血清BILを4つの分画に分けて、450nmでの

吸光度の面積比率にて定量した。溶出順序の違いから、 α 、 β 、 γ 、 δ と呼ばれ、それぞれが非抱合型ビリルビン： α 、グルクロン酸1分子抱合型ビリルビン： β 、グルクロン酸2分子抱合型ビリルビン： γ 、アルブミン共有結合型ビリルビン： δ として、 δ -BILの存在を明確にした。その後、血清の前処理を必要としない方法を、1986年に足立らが報告¹⁵⁾した。しかしこの方法は有機溶媒で濃度勾配溶出する方法であった。各分画成分の分光学的特性を一定の条件で算出するため、大澤らは単一溶離液による測定法を開発した¹⁶⁾。この方法は充填剤としてポリビニルアルコールゲルを用いた分配と分子ふるい作用を併せ持つ分離カラムを用い、pH6.5の300mMリン酸緩衝液70%とアセトニトリル30%溶液を移動相とした方法であった。この時入手可能な標準物質としてはUC-BILであるNIST SRM916aのみであり、一定条件で求めた各分画成分のモル吸光係数よりUC-BIL換算係数を算出した。

その他、コダック社のWuらによって2つの性質の異なる多層フィルムによって計算式から各分画を求めるドライケミストリーによる方法も開発された¹⁷⁾。

免疫測定法はほとんど使用されていないので詳細は省略する。

Ⅲ. 40年の測定法の変遷(表1)

歴史的な変遷については前項で述べたが、日本における測定法が劇的に変化を遂げたこの40年の経時的な変遷について述べる。日本医師会臨床検査精度管理調査結果によると昭和46年に参加施設数409施設だった当時、反応促進剤としてアルコールを用いた初期のジアゾ法(Evelin-Malloy法など)が84%を占め、ジアゾ法全盛期であった。その後、他のジアゾ法(Jendrassik-Grof法など)が、徐々に増加し、昭和60年には84.1%となり、Evelin-Malloy法などの初期のジアゾ法は12.6%にまで低下した。平成元年には酵素法が登場してきており、特異性の高さから22.1%にまで急速にシェアを伸ばした。この後、化学酸化法が発売されるまでの平成5年には酵素法48.8%、ジアゾ法50.6%とかなりじてジアゾ法が優位であった。平成7年に安価な化学酸化法が急速に伸び23.4%、酵素法が40.7%、ジアゾ法が35.5%と3つの測定法が共存した。しかし、安価が

表1 日本医師会臨床検査精度管理調査結果報告書による
ビリルビン測定における測定法別比率 (%)

	昭和46年	昭和52年	昭和58年	平成元年	平成5年	平成7年	平成13年	平成19年	平成23年
ジアゾアルコール法 (Evelin-Malloy 法など)	84.0	45.5	17.8	5.8	—	—	—	—	—
他のジアゾ法 (Jendrassik-Grof 法など)	11.4	49.5	79.1	70.4	50.0	35.5	13.6	5.4	2.0
分光光度法	1.8	1.5	0.6	0.2	—	—	—	0.1	—
酵素法	—	—	—	22.1	48.8	40.7	41.8	39.3	41.1
化学酸化法	—	—	—	—	—	23.4	44.1	50.6	51.4

売りであったジアゾ法は同じく安価である化学酸化法に押され、急速に衰退していった。平成19年には化学酸化法が過半数を超え50.6%、酵素法はほぼ横ばいで39.3%、ジアゾ法は5.4%となった。日本医師会の調査では、初期の酵素法とC-BILのみを測定できる新酵素法は分類上は同一となっており、詳細な比率は明確ではない。ただ、日本臨床衛生検査技師会の平成23年度精度管理調査による集計では酵素法採用施設のうち、4割弱が新酵素法である。現在、新酵素法を発売しているのは、ユニチカ社製を販売する、三菱化学メディエンス、シスメックス、積水化学、シノテスト、関東化学の計5社と独自に製造・発売している栄研化学である。

IV. 現在のBIL測定における 測定原理別割合

酵素法が41.1%、化学酸化法が51.5%と、ともに微増傾向であるが、ジアゾ法は2.0%と採用施設がきわめて少数となっている。施設の種別によって採用傾向が異なり、大学・研修病院や大病院では酵素法の比率が高く、登録衛生検査所では化学酸化法の比率が高い。これは試薬の価格による傾向であると考えられる。測定値の収束状況については、化学酸化法の中のパナジン酸化法と亜硝酸酸化法は単一メーカーしか発売していないため、極端にCVが小さい。また酵素法はメーカー指定のキャリブレーターを使用している割合が高い(約98%)ことから、これもまたCVが小さい。したがって同一原理の中の収束は進んでいるが、異種原理での測定値解離が問題となる。

V. 測定法の標準化

BIL測定における標準化は、T-BILの測定法とし

て、1985年にアメリカ臨床化学会(AACC)が実用基準法にジアゾ法であるJ-G法を勧告し¹⁸⁾、標準物質としてNISTのSRM916aを用いた。本法は各分画ごとの反応時間に差があるがT-BILとしての測定値の正確性は許容できるとしていた。また δ -BILを反応させるための試薬組成の変更は測定値上昇の原因となるが、その成分の占有率が低い影響がないとされていた。AACCはその他HPLC法についてもふれており、J-G法と良く相関するが、UC-BILを標準とすると他の分画成分とモル吸光係数が違うこと、またこの時点でのHPLC法は硫酸ナトリウムによる塩析操作を行っており、試料の前処理でT-BIL値に負誤差が生じることなどを理由に採用を見送った。

わが国における標準化は1997年に日本臨床化学会(JSCC)の小児臨床化学専門委員会で、小児領域におけるBILの簡易測定装置の正確さを確認するための、2次標準血清作成を主な目的として笠井らによって活動が開始された。その中で、試作した標準血清の値付けをするための測定方法(J-G法)の難しさと、BILの不安定性による測定値の誤差が発生することを報告した¹⁹⁾。その他、専門の臨床医、臨床病理医、検査技師およびメーカーの開発者等によるビリルビン懇話会(代表：河合忠)が発足した。本懇話会では標準化に伴う用語の統一化を図る必要性があると考え、用語の整理を行うと同時に将来に向けての方向性を検討した。

日本臨床衛生検査技師会においても、1997年よりBILの分画測定を指向した標準化(実用基準法の確立と分画標品)が大澤らによって開始された。ここではT-BILの他にD-BILの施設間差の問題も考慮し、4つの分画(UC-BIL、グルクロン酸1分子抱合型ビリルビン、グルクロン酸2分子抱合型ビリルビン、 δ -BIL)が正確に定量できることを目指した。その方法としてHPLC法を検討した。従来のHPLC法は、ODSカラムを用いた逆相クロマトグラフィー

を原理として、各成分の溶出にはアセトニトリルなどの有機溶媒で濃度勾配溶出をし、各成分を分画定量する方法であった。しかし、この方法では分画の各成分が溶出される時の溶媒組成（pH、塩濃度、有機溶媒）が一定でないため、BIL自体の色調で検出する場合に各分画の条件が一定とならない問題が存在していた。そのため標準化委員会では、単一溶離液による方法を検討し、最終的に前述したように単一溶離液による測定法を確立した。また標準物質作製に関連して、生体でのグルクロン酸抱合型ビリルビンのヒト胆汁からの抽出方法が標準委員会委員であった渭原らによって報告²⁰⁾された。この後、2006年から臨床化学会試薬専門委員会として、大澤らによって引き続き標準化が進められたが、測定法の普遍性が良好とはいえ、2011年に標準化のプロジェクトは一時中断することとなった。

VI. 平成 24 年度診療報酬改定と今後の展望

新酵素法は δ -BILを測り込まず、C-BILのみを特異的に測定可能なことから、回復期の肝機能を適正に評価可能とされる。これについては筆者らも、アルコール性肝炎患者の各種試薬によるC-BILのT-BILに対する比率%の経時変化が、新酵素法では病態改善と合致していたことを報告した²¹⁾。このように新酵素法が臨床的に有用である事実は明確であったが、試薬名称を依然として「D-BIL」としていたため、従来の方法との測定値の解離と基準範囲の相違とが普及の妨げとなった。その後、多くの症例検討から、新酵素法の有用性が評価され、そのことを受けたビリルビン懇談会によってC-BILの取り扱いに関する提言がなされたことから、新酵素法が市販されてその数年後（平成12年）にC-BILが算定できるようになった。ただしこの段階では付帯（準用）項目としての算定であったが、先の平成24年度改定によって、直接ビリルビンと並列して記述され、単独の項目として完全に独立した形となった。筆者らの施設では早く（平成10年）からこの新酵素法を採用し、項目名も「C-BIL」とし、明確にC-BILの有用性を臨床側に示してきた。したがって、当施設においては臨床家にC-BILが認知されているものと考えているが、全国的に見れば認知度はまだまだ低

い。今回の改定によって、新酵素法試薬の試薬名が「D-BIL」から「C-BIL」へと変更されるか、あるいは新規測定試薬が「C-BIL」測定試薬と銘打って発売されるようになり、さらに中断している標準化が再開して、分画測定を前提とした形で進展していけば、いよいよC-BILの存在とその測定の有用性が一気に認知されるものと期待される。測定法においてジアゾ法が酵素法や化学酸化法に席卷されたように、BIL検査も、反応性による「直接」・「間接」の分類から物理化学的根拠による構造上の分類である「抱合型」・「非抱合型」へと変わっていく時代が訪れるであろう。

文 献

- 1) Ehrlich P : Sulfodiazobenzol ein Reagens auf Bilirubin, Zentralbl f Klin Med, 4 : 721, 1883.
- 2) Hijmans van den Bergh A A, Muller P : Uber eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin, Biochem Ztschr, 77 : 90, 1916.
- 3) Malloy H T, Evelyn K : The Determination of Bilirubin with the Photoelectric Colorimeter, J Biol Chem, 119 : 481, 1937.
- 4) Billing B A, Cole P G and Lathe G H : The excretion of bilirubin as a Diglucuronide giving the direct van den Bergh reaction. Biochem. J., 65 : 774, 1956.
- 5) Jendrassik L, Grof P : Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins, Biochem Ztschr, 297 : 81, 1938.
- 6) Michaelsson M : Bilirubin Determination in Serum and Urine, Scand J Clin Lab Invest, 13 (Suppl.) : 56, 1961.
- 7) Meulengracht E : The Clinical Importance of the Search for Bile Pigment in Serum, Ugesk Laeg, 81 : 1785, 1919.
- 8) Murao S Tanaka N : A new enzyme "bilirubin oxidase" produced by Myrothecium verrucaria MT-1, Agriv Biol Chem, 45 : 2383, 1981.
- 9) 猪田猛久, 他 : 総ビリルビン測定において酵素法がジアゾ法より高値となる一要因, JJCLA 27 : 666, 2002.
- 10) Dumas B T, et al : Measurement of Direct Bilirubin by Use of Bilirubin Oxidase, Clin Chem, 33 : 1349, 1987.
- 11) 近藤仁司, 他 : 酵素を用いたビリルビンの選択的測定法の検討, 臨床化学, 25 : 20, 1996.
- 12) 徳田邦明, 他 : パナジン酸を用いるビリルビンの新規測定法, 臨床化学, 22 : 116, 1993.
- 13) 小島良, 他 : 亜硝酸酸化法を用いた血清ビリルビンの新規測定法, 臨床化学, 26, 1997.
- 14) Lauff J J, Kasper M E and Ambrose R T : Separation of bilirubin species in serum and bile by high-performance reversed liquid chromatography, J Chromat, 226 : 391, 1981.
- 15) 足立幸彦, 他 : Micronex RP-30 カラムを用いた前処理を

- 必要としない新しい血清ビリルビン分画法, 臨床病理, **34**(補冊): 110, 1986.
- 16) Susumu Osawa, et al : An assay for separating and quantifying four bilirubin fractions in untreated human serum using isocratic high-performance liquid chromatography, *Clinica Chimica Acta* **366** : 146, 2006.
- 17) Wu T W : Delta bilirubin ; the fourth fraction of bile pigments in human serum, *J Chem*, **23** : 241, 1983.
- 18) Doumas B T, et al : Candidate Reference Method for Determination of Total Bilirubin in Serum : Development and Validation, *Clin Chem* **31** : 1779, 1985.
- 19) 笠井泰成 : 総ビリルビン測定用二次標準血清の作成, 臨床化学 **26**(補冊): **86b**, 1997.
- 20) 血清ビリルビン測定法の標準化委員会 : グルクロン酸抱合ビリルビンのヒト胆汁からの抽出法, 医学検査 **47** : 753, 1998.
- 21) 吉田俊彦, 他 : HPLC 法による新しい血清ビリルビン測定試薬の評価 : 生物試料分析 **27** : 139, 2004.