

c. Malloy-Evelyn 法 (J. Biol. Chem., 119 : 481, 1937)

【原理】 ビリルビンがジアゾ試薬と結合して生ずるアゾビリルビンの赤紫色の呈色を比色するもので、間接ビリルビンの反応促進剤としてアルコールを用いる代表的な方法で、その簡易性のため現在なお用いられている。

【試薬】 ① Ehrlich のジアゾ試薬

I 液：スルファニル酸 (第一化学) 100 mg を濃塩酸 ($d=1.19$) 1.5 ml に溶かし、精製水を加えて 100 ml とする。保存可。

II 液：亜硝酸ナトリウム (第一化学) 0.5 g を精製水 100 ml に溶かす (氷室保存, 2 週間ぐらいにて新調)。または 5% 保存液とし、用時 0.5% 液を作る。

使用液：I 液 10 ml に II 液 0.3 ml を混合する (30 分間以内に使用)。

② ジアゾ盲検試薬：塩酸 1.5 ml に精製水を加えて 100 ml とする。

③ 20 mg/dl ビリルビン標準液 (タンパク含有)：調製は暗室内で、できるだけ遮光した条件で行う。100 ml 容のメスフラスコに精密に秤量した純ビリルビン 20 mg を 0.1 mol/l Na_2CO_3 4 ml を用いて定量的に移し、速やかに (15 分以内に) 完全に溶解させる。これにタンパク溶液 (プール血清または 4% 血清アルブミン溶液など) 80 ml を加えて混和し、フラスコを振りながら 0.1 N HCl 4 ml を加え、タンパク液で正確に 100 ml とする。 -20°C で 1 週間、 -70°C で数ヵ月安定。

【注】 ① ビリルビン標品は、クロロホルム溶液中で、453 nm の分子吸光係数が $60,700 \pm 1,600$ の範囲のものを使用する。

② プール血清は溶血、黄疸、濁りのないもので、生食水で 25 倍に希釈したときの吸収が、415 nm で 0.1 以下、460 nm で 0.04 以下のものを用いる。

③ ビリルビンがアルカリに溶けにくいときは、ビリルビンをまず dimethyl sulfoxide 1 ml に分散させ、0.1 mol/l Na_2CO_3 2 ml を加えて完全に溶かしたのち、上記と同様に操作する。この場合、あとで加える 0.1 N HCl は 2 ml とする。

④ 市販のビリルビン用標準血清として、Bilirubin Control (国際試薬)、Elevated Bilirubin Control Serum (三光純薬) などがあるが、これらは吸収曲線が異なり、ジアゾ反応発色度に各製品間に 10~15% の相違がみられる。

【検量線】 20 mg/dl タンパク含有ビリルビン標準液を標準液作製に用いたプール血清またはアルブミン液でうすめ、15 mg/dl 以下の希釈系列を作り、〔実施〕の総反応と同様に行って、それぞれの吸光度を求め、プール血清も同様に実施して、その吸光度を各標準液の吸光度から差し引いて検量線を作る。15 mg/dl 以下では直線となる。

【実施】

直接反応：① 2 本の試験管に血清 0.1 ml ずつをとり、両管に水 2.15 ml ずつを加える。

② 本試験用にはジアゾ試薬 0.25 ml、盲検用にはジアゾ盲検試薬 0.25 ml を加える。

③ 本試験のジアゾ試薬添加 5 分後に、波長 540 nm で、盲検に対して吸光度 (E_d) を測定する。

総反応：① 2 本の試験管に血清 0.1 ml ずつをとり、両管に水 0.9 ml ずつを加える。

② 本試験用にはジアゾ試薬 0.25 ml、盲検用にはジアゾ盲検試薬 0.25 ml を加えたのち、両管にメタノール 1.25 ml ずつを加える。

③ 本試験のメタノール添加後、室温に 30 分放置し、540 nm で盲検に対して吸光度 (E_t) を測定する。

計算：検量線から、 E_d 、 E_t に対するビリルビン濃度を求め、それぞれ直接ビリルビン、総ビリルビン濃度とする。両者の差が間接ビリルビン濃度。

【注】 ① ビリルビンは光に対し不安定で、また酸化されやすいから、試料は採血後なるべく光にさらさないように分離し、早期に分析する必要がある。溶血は負の影響があり、Hb 濃度 100 mg/dl で総ビリルビン測定値は約 10% 低下する。

② メタノールは、何回も開栓した古いものでは呈色度が低下するから、なるべく新しいものを使用する。反応温度は $22\sim 28^\circ\text{C}$ が望ましい。低温または高温の場合は、水浴を用いて調節する。

③ 直接反応の時間は、5~10 分は適当とされる。総反応の発色は 30~60 分安定である。

④ ビリルビン濃度が 15 mg/dl 以上の場合、5% アルブミン溶液で希釈して測定し、希釈倍数を乗ずる。

⑤ 同一試験管で直接反応に引き続いて総反応を実施するには、次のようにする。試料管 (S) と盲検管 (B) にそれぞれ血清 0.2 ml と精製水 1.8 ml をとり、S 管にジアゾ試薬 0.5 ml、B 管にジアゾ盲検試薬 0.5 ml を加え混和し、5 分後に B を対照に S の吸光度を 540 nm で測定する (E_d)。つづいて両管にメタノール 2.0 ml ずつを加え転倒混和し、30 分放置後に同波長で B を対照に S の吸光度を読む (E_t)。 $1/2E_d$ から直接ビリルビンを、 E_t から総ビリルビンを求める。