

馬の黄疸指数測定法に関する研究

森 園 充

Studies on the Measurement of Icterus Index in Horses

Mitsuru MORIZONO

(Laboratory of Veterinary Medicine)

緒 言

血清の黄色調の主体は、血清ビリルビンであり、ほかに carotene や xanthophyll などの carotenoid (lipochrome) も関与する。現在、黄疸指数の測定には、血清の色調を基準重クロム酸カリウム溶液と比色定量する Meulengracht 法が行なわれているが、本法は、肝機能診断の一環として重要な、血清ビリルビン量の動態を容易に知る手段として、その操作が極めて簡単であるために、人医領域においては、潜在性黄疸の発見や、程度の決定、更に経過の観察など、日常の診断に広く用いられている。

しかしながら、獣医領域において、特に草食獣では人の場合と異なり、その血清の色調は、飼料由来の carotenoid の影響が強いために、血清ビリルビンレベルにおける黄疸指数の評価は不十分であるとされ、成書に記載されている正常値も範囲が広く、測定者によりその数値は区々である¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。

馬の黄疸指数測定法については、我が国では山岡⁵⁾(1966)の報告が見られる。それによると、重クロム酸カリウム基準液の濃度を細分化することにより、比色時の誤差を少なくする工夫はされているが、血漿を未処置のまま測定に供しているために、その測定値は従来のものと大差はない。

血清中の carotenoid を除き、黄疸指数を正確にする目的で、人医領域の一部においては Meulengracht 法に準じて、血清の代りに、血清のアセトン可溶分画を供試するアセトン法が行なわれているが、これを家畜に応用し実験した報告は見当たらない。

著者は、草食獣の黄疸指数測定法の正常化を図る目的で、前述のアセトン法を検討した。まず生理的に、ほかの家畜に比べ血清ビリルビン正常値の高い馬を選び、アセトンによるビリルビンの吸光妨害物質の除去作用を、分光学的に調査した。ついで本法により、馬の黄疸指数を実際に測定し、これと併行して測定した血清ビリルビン値との関連において比較検討した結果

若干の興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 供試馬：鹿児島県内で繋養中の健康馬 28 頭を使用した。これを種類別にみると、サラブレッド種を主体とする軽種 14 頭、アングロノルマン種を主体とする中間種 14 頭、また性別においては、♂ 12 頭、♀ 8 頭、♂ 8 頭となり、年令別での観察のため、便宜上 3 才以上 5 才以下と、6 才以上 14 才以下の 2 群に分けると、前者が 10 頭、後者が 18 頭となる。更に県内繋養地別では、鹿児島市 13 頭、国分市 15 頭となる。なお、鹿児島市はいつでも本学繋養のもので、乗馬用が主体をなし、一部農場使役用の挽馬及び実験馬を含む。国分市は、鹿児島県畜産試験場の繁殖馬及び育成馬が主体となっている。

2. 供試血清：静脈血を遠心管に採り、2—4 時間室温に放置後、2500 回転、15 分遠心し、分離した血清を使用した。

3. 可視部吸収曲線の測定：Hitachi Recording Spectrophotometer EPS-3T 型を使用し、2 倍稀釈血清、血清の 50% アセトン可溶分画、ならびに不溶分画について測定した。血清及び可溶分画については水を blank として測定し、不溶分画については、可溶分画を blank として血清の吸収曲線を測る間接的方法によった。溶血血清についても同様な方法で行なった。

4. 黄疸指数の測定：Meulengracht 基準液及び比色計は、エルマ光学製の人用を使用し、つぎのアセトン法により行なった。

アセトン法の術式：小試験管に血清 1 ml を採り、これに同量のアセトン（試薬一級）を加え、転倒混和後、濾紙 (No. 5 A-No. 7) で濾過する。（アセトン原法では、遠心法になっているが、この方法では上清すなわち 50% アセトン可溶分画の採取に際し、管壁及び沈澱層の蛋白凝固片が混入し、測定値を低下させる傾向があるので、著者は濾過法に改めた）。ついで

濾液 (50%アセトン可溶分画) 0.5 ml を Meulengracht 比色計にとり、基準液と比色しながら生理食塩水で稀釈し、色調を同一ならしめ、目盛の数値を2倍 (血清の稀釈倍数) して黄疸指数とする。

5. 血清ビリルビンの定量: Klett-Summerson の光電比色計を使用し、EVELYN-MALLOY⁶⁾法で測定した。直接ビリルビン値は、Diazo 試薬添加後 15 分値をもって算定し、総ビリルビン値は、メタノール添加後 30 分値で算定した。間接ビリルビン値は、最終的に、総ビリルビン値より直接ビリルビン値を減じて算出した。

実験成績

1. 正常血清とアセトン処理分画の可視部吸収曲線

血清はアセトン分画に準ずるため、等量の水を加えて稀釈し、測定に供した。その成績は Fig. 1. に示すとおりである。血清の可視部における吸収曲線 (一点破線で示す) では、380 $m\mu$ より短波長側に向って上昇 slope を形成する A と、415 $m\mu$ 附近に吸収極大

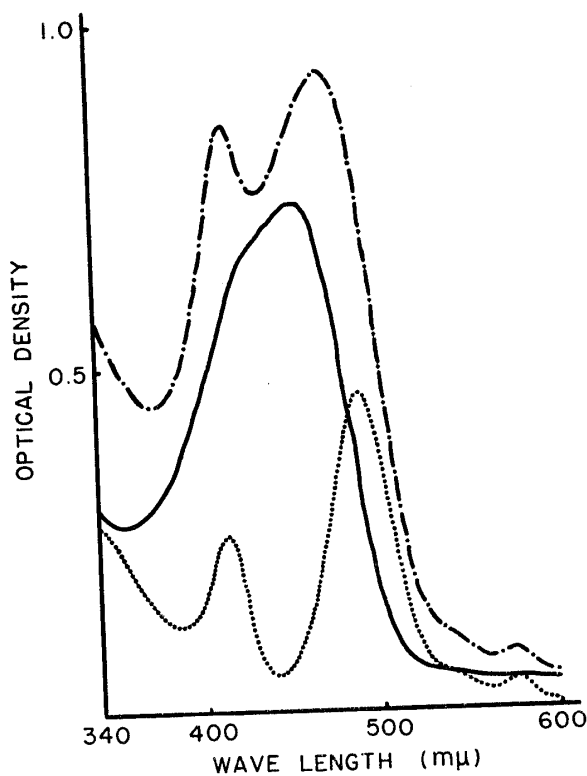


Fig. 1. Spectral absorption curves of the normal equine serum pigment and of the acetone treated fraction

....., Serum
 - · - · - ·, Acetone insoluble fraction
 ———, Acetone soluble fraction

を有す B, 470 $m\mu$ 附近に吸収極大を有する C と、更に、これらに比べると量的に著しく少なく、peak も緩慢であるが、540 $m\mu$ 附近に吸収極大を有する D と、580 $m\mu$ 附近に吸収極大を有する E の、大小 4 つの peak と 1 つの slope から成っている。血清ビリルビンの吸収極大は、454—460 $m\mu$ とされている⁷⁾⁸⁾。本吸収曲線では、ビリルビンの附近は C 物質の短波長側 slope が形成されて、ビリルビンの存在は、明確に指摘できない。つぎに、アセトン不溶分画 (点線で示す) の吸収曲線についてみると、A, B, C, D, E の 5 つの物質が、血清の場合より、その吸収極大値は大巾に減少はしているが、明瞭に現われる。しかしながら、この場合 470 $m\mu$ に吸収極大を有する C は消失し、490 $m\mu$ 附近に吸収極大を有する C' として、新しく出現する。B 及び C' は sharp な peak を形成し、明瞭に分離されている。換言すれば、これらアセトン不溶分画中における A, B, C', D, E の 5 つの物質は、血清中より除去されていることを意味する。可溶分画 (実線で示す) では、これらの関係が更に明確となる。すなわち、B は shoulder を形成して、ごく少量残ってはいるが、C はその痕跡も見えず、ほとんど完全に除去され、454—460 $m\mu$ 附近に吸収極大を有するビリルビンが、左右不均衡ではあるが、単独の peak を形成して、明瞭に現われる。従ってアセトン処理分画において消失した C は、ビリルビンと C' から合成されたものの吸収極大であると考えられる。

2. 溶血血清とアセトン処理分画の可視部吸収曲線

本実験に使用した溶血血清は、正常血清に微量の溶血液を人工的に加えて作ったもので、赤色調はごく稀薄で、肉眼的には正常血清と黄色調の程度の差異は、ほとんど認め難い。測定には、本溶血血清を蒸留水で 2 倍に稀釈したものに、等量のアセトンを加えて、その処理分画を作り、溶血血清は、これに準ずるために 3 倍量の水で稀釈したものを供試した。その測定成績は、Fig. 2. に示すとおりである。溶血血清の可視部吸収曲線は、正常血清の場合と同様に、A, B, C, D, E の 5 つの物質から形成され、ビリルビンの吸収極大は見えない。しかし、この場合は正常血清に比べて基線が上昇し、415 $m\mu$ 附近に吸収極大を有する B 物質が増大して、sharp な peak を形成し、B と C の分離が悪くなり、D と E の吸収極大値も増加して、正常血清の吸収曲線と異なる様相を呈している。アセトン不溶分画では、上記 5 つの物質が明瞭に存在し、B, C' 間の境界が明瞭に分離していることより、これら 5 つの物質は、血清よりほとんど除去され、ビリ

討した。測定法及びビリルビン値の算出法についてはさきに述べたように、EVELYN-MALLOY 法で行なった。その成績は、Table 2. に示す通りである。まず直接ビリルビン値の全平均は、 0.306 ± 0.094 である。種類別・性別・年齢別のいずれにおいても有意差は認められなかった。しかし、繫養地別では、鹿児島市 0.355 ± 0.107 、国分市 0.263 ± 0.068 となり、この両者の間に有意差が認められた。つぎに間接ビリルビン値は、全平均 0.731 ± 0.332 で、繫養地別では、鹿児島市 0.925 ± 0.513 、国分市 0.629 ± 0.227 となり、種類・性別・年齢別のいずれの間にも有意の差は認められない。総ビリルビン値は、全平均 1.111 ± 0.431 である。繫養地別では、鹿児島市が 1.300 ± 0.534 、国分市 0.993 ± 0.246 となり、いずれの場合にも有意差は認められなかった。

5. 黄疸指数と血清ビリルビン値との相関関係の検討

黄疸指数の臨床的意義は、この指数と血清ビリルビン量との間に、強い正の相関関係を有することにある。従って、アセトン法により測定した黄疸指数と血

清ビリルビン値の測定成績を対比し、その相関について検討した。その成績は、Table 3. に示す通りである。すなわち、1) 黄疸指数と総ビリルビン値、2) 黄疸指数と直接ビリルビン値、3) 黄疸指数と間接ビリルビン値、4) 総ビリルビン値と直接ビリルビン値、5) 総ビリルビン値と間接ビリルビン値、6) 直接ビリルビン値と間接ビリルビン値の6項目にわたり検討した結果、2) と 6) にやや強い正の相関を有し、1), 3), 4), 5) においては、強度の正の相関を示し、結局、黄疸指数と血清ビリルビン値との間には、いずれの組合せにおいても、明らかに相関を有している。

以上の関係の中で、特に相関係数 (r) の大きい黄疸指数と総ビリルビン値、及び総ビリルビン値と間接ビリルビン値との関係を利用して、黄疸指数から血清ビリルビン値を簡易に算出する目的をもって、つぎの項目について検討した。なお、総ビリルビン係数ならびにビリルビン比の名称は、著者が提案し名づけたものである。

Table 3. Correlation between Icterus Index and Serum Bilirubin Value

Classification	Coefficient of Correlation (r)
Icterus Index-Total Bilirubin	+ 0.978
Icterus Index-Direct Bilirubin	+ 0.655
Icterus Index-Indirect Bilirubin	+ 0.973
Total Bilirubin-Direct Bilirubin	+ 0.880
Total Bilirubin-Indirect Bilirubin	+ 0.984
Direct Bilirubin-Indirect Bilirubin	+ 0.570

Table 4. *Total Bilirubin Coefficient in Healthy Horses

	Breed		Sex			Age		Total
	Pure Blood	Half Blood	♂	♀	♂	3~5	6~14	
Mean	0.195	0.200	0.203	0.186	0.204	0.190	0.201	0.200
Standard Deviation	0.020	0.016	0.016	0.023	0.019	0.024	0.013	0.014

* Total Bilirubin Coefficient = $\frac{\text{Total Bilirubin}}{\text{Icterus Index}}$ (assumed by the author)

Table 5. *Bilirubin Ratio in Healthy Horses

	Breed		Sex			Age		Total
	Pure Blood	Half Blood	♂	♀	♂	3~5	6~14	
Mean	0.719	0.691	0.764	0.658	0.678	0.695	0.724	0.702
Standard Deviation	0.126	0.080	0.090	0.083	0.068	0.058	0.103	0.106

* Bilirubin Ratio = $\frac{\text{Indirect Bilirubin}}{\text{Total Bilirubin}}$ (assumed by the author)

a) 総ビリルビン係数 Total Bilirubin Coefficient

$$: \frac{\text{総ビリルビン値}}{\text{黄疸指数}}$$

b) ビリルビン比 Bilirubin Ratio

$$: \frac{\text{間接ビリルビン値}}{\text{総ビリルビン値}}$$

その成績は、Table 4., Table 5. に示す通りである。総ビリルビン係数の全平均は、 0.200 ± 0.014 である。繋養地別では、鹿児島市が 0.204 ± 0.010 、国分市が 0.186 ± 0.024 となり、いずれの項目においても有意差は認められない。ビリルビン比については、全平均は 0.702 ± 0.106 となっている。繋養地別では鹿児島市が 0.702 ± 0.017 、国分市が 0.695 ± 0.071 となった。種類・性・年齢・繋養地のいずれの場合にも有意差は認められなかった。

以上の総ビリルビン係数及びビリルビン比の実験成績から、アセトン法による黄疸指数の測定値を得ることにより、馬の血清総ビリルビン値、直接ビリルビン値及び間接ビリルビン値を算出するために、次の式が得られた。

- 1) 黄疸指数 $\times 0.200$ (総ビリルビン係数)
= 血清総ビリルビン値 (mg/dl)
- 2) 総ビリルビン値 $\times 0.702$ (ビリルビン比)
= 間接ビリルビン値 (mg/dl)
- 3) 総ビリルビン値 - 間接ビリルビン値
= 直接ビリルビン値 (mg/dl)

考 察

馬の正常血清可視部には、分光学的に A, B, C, D, E の 5 つの物質が存在し、ビリルビンは、C 物質の吸収帯に包含されている。これらの物質の中、B, D, E の 3 つの物質は、溶血血清において、とくに顕著な増量を示すことより、明らかに、溶血由来の物質と考えられる。

このように、健康馬の血清中に、溶血由来の物質が存在していることは、ヘモグロビンに対する赤血球膜の透過性の昇進によるものなのか、stromatin とヘモグロビンとの結合の破壊によって起ったものなのか、或はまた血清採取時の失直により混入したものであるかは、にわかに断定し難い。しかし、ほかの動物に比べ、生理的に血清ビリルビン値の高い馬においては、その生成材料であるヘモグロビンも多く、ヘモグロビンの産生母体である赤血球の崩壊量も、ほかの動物に比べて、当然多いものと考えられる。従って馬血清中に認められる微量のヘモグロビンは、病的なものでは

なく、むしろ生理的に存在するものではなからうかと考える。

赤血球内に、最も多量に存在する光吸収物質は、酸素ヘモグロビンである。ヘモグロビンの吸収は、紫外部に存在する蛋白質の芳香性アミノ酸によるものと、紫外部に近い部及び可視部に存在する吸収帯の 2 つの異なるものから成り立っている⁹⁾。可視部のヘモグロビンには、 $578 m\mu$ (α 帯)、 $542 m\mu$ (β 帯)、 $414 m\mu$ (r 帯または solet 帯) の 3 つの明らかな吸収帯があり、特に r 帯が高く、その分子吸収係数は 132 であり、成人、胎児、羊、豚、牛、馬、兎、鼯、サンショウウオ、鳥類など種々の種族に一定であるとされている⁹⁾¹⁰⁾。溶血により増量した B, D, E の 3 物質は、ヘモグロビンの吸収帯とよく一致している。すなわち B 物質は、 $414 m\mu$ に吸収極大を有する r 帯 (solet 帯) であり、D 物質は、 $542 m\mu$ に吸収極大を有する β 帯であり、そして E 物質は、 $578 m\mu$ に吸収極大を有する α 帯であると考えられる。

血清の可視部における吸収曲線において、ヘモグロビンの吸収帯を除けば、A と C の 2 つの吸収帯のみが残る。しかし、C はアセトン処理分画の吸収曲線より主としてビリルビンと C' より合成されたものと考えられるので、ここで対象となるのは、A と $490 m\mu$ に吸収極大を有する C' である。

馬の血清中に、carotene が多く含まれていることは、PALMER¹¹⁾(1916) が確認している所であり、xanthophyll は証明されていない。carotenoid 類の可視部及び紫外部吸収スペクトルは、 $430-480 m\mu$ に通常 2-3 の極大をもつ主吸収帯、 $320-380 m\mu$ に現れるシス吸収極大、及び $260-300 m\mu$ の遠紫外部の吸収帯があるといわれる¹²⁾。

馬の正常血清において、 $380 m\mu$ から短波長側に向い、上昇 slope を形成する物質は carotenoid のシス異性体の吸収極大の一部と考えられる。ビリルビンとともに C を形成する $490 m\mu$ に吸収極大を有する C' については、carotenoid の主吸収帯の波長範囲外に存在し、carotenoid としての同定は難しい。しかしながら、馬血清中に多量の carotenoid が認められているにもかかわらず、その吸収帯が定型的に認められない原因については、血清 carotenoid は、植物や飼料中に存在するものと異なり、血清アルブミンと結合し、特に血清のアセトン不溶分画においては凝固蛋白と共存しているので、蛋白や、そのほかの夾雑物の光吸収との合成により、正常よりは多少異なる吸収帯を示すものと考えられる。従って C' は carotenoid の

主吸収帯の波長範囲よりも、やや長波長側に吸収極大を有するが、上述の見解により馬血清 **carotenoid** と考える。

馬血清の可視部には、ヘモグロビン、**carotenoid**、及び **carotenoid** のシス異性体が存在し、これらが血清ビリルビンの吸光を妨害しているものと考えられる。これら妨害物質は、アセトンにより、血清蛋白とともに除かれるが、溶血量の多い場合においては、50%アセトンで肉眼的に赤色調は消失するが、分光学的にヘモグロビンの r 帯 (soret 帯) は完全に除かれぬ。本実験の黄疸指数測定において、肉眼比色をやや困難にさせ、総ビリルビン係数の低下を示すものが、3例見られたが、これらは、おそらく r 帯の妨害に起因するものと考えられる。

アセトン可溶分画は、HYMANS van den BERGH¹³⁾ の diazo 直接反応に強い呈色反応を示すことより、アセトンにより、ほとんど直接型のビリルビンに変化しているものと思われる。本分画は、肉眼的にも明るい黄色となり、Meulengracht 基準液との比色が著しく容易となった。本法により測定した馬の黄疸指数の正常値は、従来のものに比べ、分散の中が狭く、著しく安定した数値を示し、血清ビリルビン量との間に強い相関関係を有するようになり、アセトン法の適正が証明された。

一般に、閉塞性黄疸では直接ビリルビンが増量し、溶血性黄疸では間接ビリルビンが増加し、実質性黄疸 (肝細胞性黄疸) ではその双方が増加するといわれ、その割合は、各症例、病期により異なるものとされ、特に馬においては、溶血性黄疸が肝細胞性黄疸と並び重要な意義を有するといわれている¹⁴⁾。従って、黄疸の病性鑑別のためには、単に総ビリルビン値だけでなく、直接ビリルビン値と間接ビリルビン値の測定が必要である。馬の血清ビリルビン値の正常値で、直接、間接、総ビリルビン値の3項にわたり測定された成績は少なく、我が国においてはその報告を見ない。血清ビリルビンの定量法については、特に検討は行っていないが、著者の EVELYN-MALLOY 法による血清ビリルビンの測定値は、原法に比べ著しく正確になったといわれる JENDRASSIK-CLEGHORN¹⁵⁾ 法の RUSŇAK¹⁶⁾ 変法による ZAKOPAL¹⁷⁾ (1967) の測定値と極めて近似する成績が得られた。

すでに述べたように、ビリルビンの光吸収波長は一定であり、血清ビリルビン量と黄疸指数との間には強度の正の相関を有する。従って血清ビリルビン量の増加する病的な場合には、当然黄疸指数もこれに伴って

上昇するものと考えられる。著者の仮称する総ビリルビン係数は、健康馬を対照とした数値にもとづいて算定されたものではあるが、上述の関係より、病的な場合においても、本係数の数値は、ほとんど変化を示さないものと考えられる。ビリルビン比については、血清ビリルビンの上昇を伴う場合に、これをそのまま適用することは、黄疸の病性鑑別上危険である。しかし、補助的に健康馬との比較において若干の参考には供し得るものと考えられる。

馬の血清ビリルビン値は、年齢とともに増加し¹⁸⁾、疲労した場合も増加する¹⁹⁾、といわれているが、著者の成績では、6才以上のものは、5才以下のものより高い傾向は見られるが、有意な差は認められなかった。更に病的には、原発性の肝臓疾患、溶血性疾患のほか、心機能不全、胃腸疾患、肺炎、出血性疾患、感染症、敗血症などの場合に、二次的に上昇することが知られ¹⁴⁾¹⁷⁾、馬の内科領域におけるビリルビン代謝障害は、意外に多く潜在していることが判る。血清ビリルビンの動態を容易に察知する手段として、或はまた血清トランスアミナーゼ活性値測定の指標として馬の黄疸指数測定の機会を、決して少なくないものと考えられる。

このような見地より、アセトン法による馬の黄疸指数測定法は、著者の仮称する総ビリルビン係数及びビリルビン比とともに、臨床診断上、意義を有するものと考えられる。

摘 要

馬血清中のビリルビンの吸光を妨害する物質をアセトンで除去し、黄疸指数測定に供する実験を行なった結果、つぎの知見をえた。

1. 馬の正常血清可視部には、短波長側より **carotenoid** のシス異性体、ヘモグロビンの r 帯 (soret 帯)、**carotenoid**、ヘモグロビンの β 帯及び α 帯と思われる物質が存在し、ビリルビンは **carotenoid** の吸収帯に包含されている。従って、直接には **carotenoid** がビリルビンの吸光を妨害するが、このほかに、吸収極大値の大きいヘモグロビンの r 帯と **carotenoid** のシス異性体もビリルビンの吸光妨害に関与するものと考えられた。

2. 正常血清におけるこれらの物質は、アセトンにより血清蛋白とともに除去され、アセトン可溶分画にはビリルビンの吸収帯のみが残る。しかしながら、溶血血清では、 r 帯が完全に除去されない。従って、溶血血清においては、ヘモグロビンの r 帯が、ビリルビ

ンの吸光に若干の影響を及ぼすものと考えられた。

3. アセトン法による馬の黄疸指数は、血清ビリルビン量との間に、強度の正の相関を有する。

4. 本実験で得られた各正常値は、つぎの通りである。

- a) 黄疸指数 (アセトン法) 5.8 ± 2.0
- b) 直接ビリルビン値 $0.306 \pm 0.094 \text{ mg/dl}$
- c) 間接ビリルビン値 $0.731 \pm 0.332 \text{ mg/dl}$
- d) 総ビリルビン値 $1.111 \pm 0.431 \text{ mg/dl}$
- e) 総ビリルビン係数 0.200 ± 0.014
- f) ビリルビン比 0.702 ± 0.106

5. 黄疸指数、総ビリルビン係数、ビリルビン比の値から、馬の血清ビリルビン値は、次の方法で簡易に算出することができる。

総ビリルビン値 (mg/dl)

$$= \text{黄疸指数} \times 0.200 \dots \dots \dots (1)$$

間接ビリルビン値 (mg/dl)

$$= \text{総ビリルビン値} \times 0.702 \dots \dots \dots (2)$$

直接ビリルビン値 (mg/dl) = (1) - (2)

6. 以上の所見より、アセトン法による馬の黄疸指数は、著しく正確となった。従って著者の仮称する総ビリルビン係数及びビリルビン比とともに、馬の臨床診断上、極めて意義を有するものとする。

欄筆するにあたり、御指導、御校閲を賜った西山実光教授、種々御教示を仰いだ長野慶一郎博士、野村靖氏ならびに本実験に終始協力された家畜内科学教室専攻学生一同に対し、衷心より感謝の意を表す。

本報告の要旨は、昭和42年4月9日第63回日本獣医学会(東京)で講演したものである。

文 献

- 1) CORNELIUS, C. E. & J. J. KANEKO: *Clinical*

Biochemistry of Domestic Animals, 241~243, Academic Press, New York & London (1963)

- 2) SCHALM, O. W.: *Veterinary Hematology*, 236, 269~270, Lea & Febiger, Philadelphia (1965)
- 3) GIBBONS, W. J.: *Clinical Diagnosis of Diseases of Large Animals*, 219~220, Lea & Febiger, Philadelphia (1966)
- 4) GARNER, R. J.: *J. Comp. Path.*, **63**, 247~253 (1953)
- 5) 山岡貞雄: 獣医技術, **3**(3), 16~17 (1966)
- 6) MALLOY, H. T. & K. A. EVELYN: *J. Biol. Chem.*, **119**, 481~490 (1937)
- 7) COLE, P. G., G. H. LATHE & B. H. BILLING: *Biochem. J.*, **57**, 514~518 (1954)
- 8) DAWSON, R. M. C., D. C. ELLIOTT, W. H. ELLIOTT & K. M. JONES: *Data for Biochemical Research*, 124, Oxford Clarendon Press, London (1959)
- 9) 渡辺裕: 日血誌, **18**(3), 182~191 (1955)
- 10) KURODA, K., Y. MISHIRO & Y. TOSHIDA: *To-kushima J. Expt. Med.*, **6**, 1~9 (1959)
- 11) PALMER, L. S.: *J. Biol. Chem.*, **27**, 27~32 (1916)
- 12) 平山健三・三角荘一: 化学の領域, 増刊**27**, 165~190 (1957)
- 13) HYMANS van den BERGH, A. A. & P. MULLER: *Biochem. Ztschr.*, **77**, 90~103 (1916)
- 14) EIKMEIER, H.: *Berlin u Munch. Tierarztl. Wö-chschr.*, **72**, 48~50 (1959)
- 15) JENDRASSIK, L. & R. A. CLEGHORN: *Biochem. Ztschr.*, **289**, 1~14 (1937)
- 16) RUSNÁK, S.: *Scripta Medica*, **36**, 47~54 (1963)
- 17) ZAKOPAL, J.: *Zbl. Vet. Med.*, **14**(1), 38~54 (1967)
- 18) 桜井信雄・上原伸美・田口邦臣: 日競研報, **1**, 121~127 (1961)
- 19) 白井和哉・一木彦三・竹内啓: 日競研調報, **7**, 13~17 (1960)

Summary

In order to make a renovation in measuring the icterus index of healthy horses, a tentative method of taking away, under the use of acetone, the substances obstructing the absorption by serum bilirubin was experimented by the author, with the following results obtained.

1) Counting from the side of short waves, in the visible portion of normal equine serum, there existed some substances appearing to be cis-isomer of carotenoid, r band of haemoglobin, carotenoid, β - and α -bands of haemoglobin, bilirubin being covered with the absorption band by carotenoid. Of these substances, carotenoid, r -band of haemoglobin and cis-isomer of carotenoid were assumed to be obstructing the absorption by serum bilirubin.

2) The above-mentioned substances could be taken away by adding acetone to the serum, and in the acetone soluble fraction, there remained only the absorption band by bilirubin. But in the haemolytic serum it was not possible to remove r -band of haemoglobin perfectly.

Hence the absorption by bilirubin might be more or less influenced by the r -band in the haemolytic serum.

3) An intensely positive correlation lies between the icterus index of healthy horses measured by adding acetone to the serum and the quantity of serum bilirubin.

4) The normal values obtained in the present experiments were as follows :

- | | |
|---|---------------------------------|
| a) Icterus index (with the addition of acetone) | 5.8 ± 2.0 |
| b) Direct bilirubin | $0.306 \pm 0.094 \text{ mg/dl}$ |
| c) Indirect bilirubin | $0.731 \pm 0.332 \text{ mg/dl}$ |
| d) Total bilirubin | $1.111 \pm 0.431 \text{ mg/dl}$ |
| e) Total bilirubin coefficient | 0.200 ± 0.014 |
| f) Bilirubin ratio | 0.702 ± 0.106 |

5) Serum bilirubin values of horses could be approximately given by the following formulas,

$$\text{Total bilirubin value (mg/dl)} = \text{Icterus index} \times 0.200 \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{Indirect bilirubin value (mg/dl)} = \text{Total bilirubin value} \times 0.702 \dots \dots \dots (2)$$

$$\text{Direct bilirubin value (mg/dl)} = (1) - (2)$$

6) Judging from the above-mentioned results, the icterus index of horses measured by adding acetone to the serum became more accurate than before. Therefore the icterus index, together with the total bilirubin coefficient and the bilirubin ratio assumed by the author may be significant for the clinical diagnosis of horses.