

# 肝疾患時の胆汁酸と bilirubin に関する研究

## 第 1 編

### 肝疾患時における胆汁中胆汁酸と bilirubin 3 分画の臨床的意義

岡山大学第 1 内科教室 (主任: 長島秀夫教授)  
(指導: 小坂淳夫前教授)

西 原 孝 雄

(昭和54年 2 月23日)

Key words: 胆汁酸, bilirubin, 胆汁,  
肝疾患, 肝機能検査

#### 緒 言

血清中の bilirubin と胆汁酸は共に肝細胞に取込まれたのち胆汁中に排泄される。肝細胞に障害が生ずれば、この経路に変化が起ることが推測される。肝内、肝外胆汁うっ滞症では両者は共に血液中に上昇するが<sup>22)</sup>、bilirubin と胆汁酸は肝細胞で共に抱合されるものの、その部位<sup>3)4)</sup>に差があり両者の代謝に差異が生ずる可能性がある。胆汁酸は肝細胞より胆汁中に排泄されるが、胆汁中抱合型胆汁酸分画については、1955年 Sjövall<sup>5)6)</sup> が paper chromatography を用いて肝疾患時に glycine 抱合型胆汁酸と taurine 抱合型胆汁酸の比 (G/T) が低下することを報告し、Turnberg<sup>7)</sup> も肝硬変及び G/T 低下を認め Sjövall の成績を支持した。また Sjövall<sup>6)</sup>、Turnberg<sup>7)</sup>、Vlahcevic<sup>8)</sup> は肝硬変症で胆汁中の deoxycholic acid の著明な低下を認め、大久保<sup>39)</sup> も gas liquid chromatography により胆石症と膵胆道癌で胆のう胆汁中の cholic acid の占有率の減少を報告している。一方、胆汁中 bilirubin 分画については高木<sup>9)</sup> は肝実質細胞障害が高度のもの程 bilirubin glucuronide 分画が減少することを認め、更に渡部<sup>10)</sup>、広畑<sup>11)</sup> はこの際にそれぞれ bilirubin sulfate 及び phosphate が代償的に増加することを報告している。以上のごとく胆汁酸、bilirubin それぞれについては検討されているが、bilirubin と胆汁酸の関連、殊に bilirubin と胆汁酸の抱合型の関連については明らかではない。

この点について肝疾患者の胆汁中の両者の抱合型を中心に對比し、更に一般肝機能検査や肝組織像とも對比検討した。

#### 実験対象及び材料

岡山大学第一内科に入院した急性肝炎 8 例、慢性肝炎 9 例、肝硬変症 9 例、胆のう症 (胆石症 5 例、胆のう炎 3 例、胆のうスキネジー 3 例) 11 例、及び健康者として医学部男子学生 8 例の計 45 例を対象とした。診断は、臨床所見、諸種肝機能検査、並びに肝疾患群は腹腔鏡と肝生検組織診により確立されたものである。材料は早朝空腹時 Meltzer-Lyon 法により十二指腸ゾンデを施行し olive 油刺戟により得られた B 胆汁を用いた。

尚、副腎皮質ホルモン剤、glucuron 酸製剤の投与を受けている症例と、胆のう症を除いて十二指腸ゾンデ施行前後 1 ヶ月以内に胆のう造影で結石や収縮機能不全が認められた症例は対象より除いた。

#### 実験方法

##### 1) 胆汁より粗胆汁酸の抽出

胆汁 1 ml に 20 ml の加温 ethanol を加え、充分振盪し、30℃ で約 30 分間放置後 2000 rpm で 10 分間遠沈した。上清をとり、残渣に加温 ethanol 5 ml を加え振盪し、同様に放置後遠沈した。これを 3 回繰り返し、集めた上清を 80℃ で減圧乾固したものを石油 ether で 3 回洗浄し、60℃ で減圧乾固した。

## 2) 胆汁酸の分画法

薄層 chromatography で taurocholic acid [TC], tauro-deoxy & -chenodeoxy cholic acid [Tdi], glycocholic acid [GC], glyco-deoxy & -chenodeoxy cholic acid [Gdi] を分画分離した。即ち、1) で得られた試料を methanol 0.8ml で溶解し、更に水 0.2ml を加えたものより 0.02ml 毎をとり、20×20cm の plate に固定相として Kieselgel G nach Stahl (Merck No.7731) 0.25mm の薄層を作成し、その一端の 3ヶ所に直径 5mm 以内の spot として付着した。これを展開溶媒 isoamyl alcohol : 酢酸 : 水 (18 : 5 : 3 V/V<sup>12)</sup>) で約 16cm 展開した。(遊離胆汁酸の回収率測定には iso octane : ethyl acetate : 酢酸 : n-butanol [10 : 5 : 2.5 : 2.5 V/V<sup>13)</sup>] を用いた。) 室温 (15~25℃) で乾燥させた後ヨード蒸気で飽和した槽に約 10 分間入れることにより出現する青色 spot のうち、中央に付着した試料により展開された各 spot の両側を他の spot と区別するため、細い針で印をつけた。ヨードを蒸発させ印の部より外側に phosphomolybdic acid : 酢酸 : 濃硫酸 (0.5g : 10ml : 0.5ml<sup>14)</sup>) の溶液を噴霧し、80℃ で 7~10 分間加熱すると胆汁酸の各 spot が現われる。この plate を再びヨード蒸気槽に入れて印の部より内側に spot を出現させ、両横の spot と対比させながら針で印をつけて囲み、ヨードを蒸発させこの部を削り取ったものを各胆汁酸分画とした。

## 3) 胆汁酸の測定

Weber ら<sup>15)</sup>の方法を参考とした。即ち総胆汁酸の測定は 1) の残渣を methanol 0.8ml と水 0.2ml で溶解した溶液を希釈して用い、胆汁酸の各分画の測定は 2) で得られた各胆汁酸分画の kieselgel より胆汁酸を methanol 抽出し、減圧乾固后 methanol 0.8ml と水 0.2ml に溶解した溶液を用いた。

測定材料をそれぞれ 2 本の小試験管に 0.1ml 毎入れ、一方を対照、他方を試料とする。試料に 0.1M. sodium pyrophosphate buffer (pH. 9.5) 1.6ml, 5mM NAD を含む sodium pyrophosphate buffer 溶液 0.1ml, 約 2 α units/ml となるように 4℃ の水で dry cell を homogenize したのち 20,000g 20 分間遠沈して得られた 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (Sigma H 7127 5g) 溶液 0.1ml, 更に 2N. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で pH 9.5 に調整した 5% hydrazine hydrate 溶液 1.0ml を加え、対照には hydroxysteroid dehydrogenase 溶液を除き試料と同様に加えたものを作成した。共に混和しながら恒温槽中で 26℃ で保温した。50 分後に 0.1M. Sodium lauryl sulfate を 0.1ml 毎加え振盪したのち、対照に

3α-hydroxysteroid dehydrogenase 溶液 0.1ml を加え混和した。これを日立分光光度計 UV-200 で 340nm の吸光度を slit 巾 1mm で測定した。対照の吸光度を Ec, 試料の吸光度を Es とした。この他に cholic acid 50γ を含んだ 80% methanol 溶液 0.1ml を標準として同様に測定し、試料と対照の吸光度の差を Est とした。各試料の胆汁酸量は

$$\text{胆汁酸}(\gamma) = \frac{3 \times \text{MW} \times (\text{Es} - \text{Ec})}{6.22} \times \frac{50}{\text{Est}} \times \frac{100}{\text{回収率}(\%)}$$

MW : 個々の胆汁酸の分子量

で計算し、希釈倍数を掛けて胆汁中の濃度を求めた。

## 4) bilirubin 3 分画法

小坂、原<sup>16)</sup>の方法にならい、胆汁酸 1ml に chloroform 2ml を加え混和し 1500rpm で 10 分間遠沈して得られた chloroform 相を間接型 bilirubin とし、chloroform 相を除去后 0.1 N HCl 1ml を加えて弱酸性下で再び 2ml の chloroform を加え混和后遠沈して得られる chloroform を塩型 bilirubin とした。chloroform 相を除去后硫酸で塩析し methanol 10ml を加え、3000rpm で 10 分間遠沈して得られる methanol 相を ester 型 bilirubin とした。

## 5) bilirubin の測定

間接と塩型 bilirubin は chloroform 相より 1ml をとり、methanol 3.5ml, 次いで diazo 試薬 0.5ml を加え混和、15 分後に日立比色計 100-10 型波長 535mμ で測定した。ester 型 bilirubin は methanol 相より 4.5ml をとり diazo 試薬 0.5ml を加え混和后前 2 者と同じく測定した。diazo 試薬は Ehrlich の I 液 10ml と II 液 0.3ml を混和して、その都度作製して用いた。

6) glucuron 酸定量法と ester 型 bilirubin 分画に対する glucuron 酸 mol 比 (MR)

glucuron 酸定量は ester 型 bilirubin 分画を用いて naphthoresorcinol picrate を用いた石館ら<sup>17)</sup>の Na-BH<sub>4</sub> 法で行った。尚、標準曲線はその都度作製し glucuron 酸量を算出した。ester 型 bilirubin 分画の bilirubin-glucuron 酸 mol 比は高木<sup>9)</sup>により算出した。

## 7) 肝機能検査

患者血清を用いて glucuronic oxaloacetic transaminase (GOT), glucuronic pyruvic oxaloacetic transaminase (GPT) を Karmen 法で、alkaline phosphatase (Al-p-ase) を Bessey-Lowry 法で測定し、Thymol 混濁反応 (TTT), Kunkel 氏硫酸亜鉛試験 (ZTT), cholesterol, 総 Bilirubin も測定した。また緒方法<sup>18)</sup>で馬尿酸合成試験を行った。

実験成績

1) 胆汁酸測定における pH と温度の影響, hydrazine hydrate の濃度, 及び sodium lauryl sulfate の使用について

glycochenodeoxycholic acid (GCDC), 40 $\gamma$ を用い hydrazine hydrate, NAD を含む sodium pyrophosphate buffer の pH を変え, 測定への影響を検討した。

結果は Fig. 1 のとおりで, optical density (O.D.) は pH 9.5 で最高を示した。

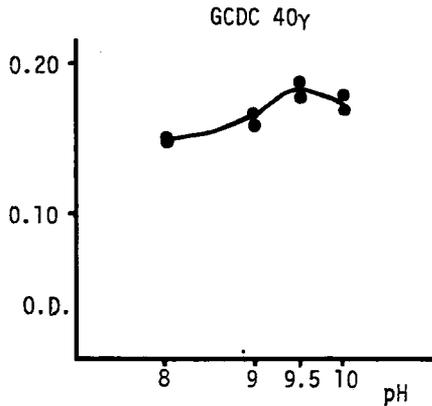


Fig. 1 Influence of pH in bile acid assay

温度の影響を GCDC 40 $\gamma$ について 20 $^{\circ}$ C, 26 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C と変えて時間的経過をみたのが Fig. 2 である。O.D. は 26 $^{\circ}$ C では平衡に達した時 37 $^{\circ}$ C より高値をとり, 20 $^{\circ}$ C より平衡に達する時間が早い。

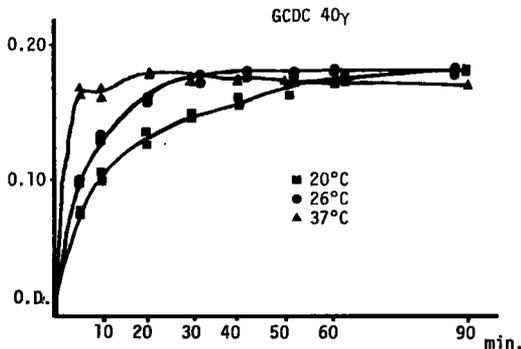


Fig. 2. Influence of temperature in bile acid assay

hydrazine hydrate の濃度について Weber<sup>15)</sup> らの 3.2% 溶液と Hurlock<sup>19)</sup> らの 5% 溶液とを比較した。

Table 1 のとおりで 50 分間の保温では 5% が 3.2% より高値であった。

Table 1. Influence of hydrazine hydrate (HH) to the bile acid assay \*

HH added to the assay	Experiments, O.D.340			Mean
	1	2	3	
3.2 %	0.110	0.100	0.110	0.107
5 %	0.125	0.120	0.125	0.123

\* used 25 $\gamma$  of cholic acid, incubation time: for 50 min.

また, 反応中の溶液に Sodium lauryl sulfate 0.1 ml を加え直ちに混和した後の O.D. の変化は Fig. 3 のとおり sodium lauryl sulfate 添加後少なくとも 15 分間は殆んど吸光度の上昇は認められなかった。

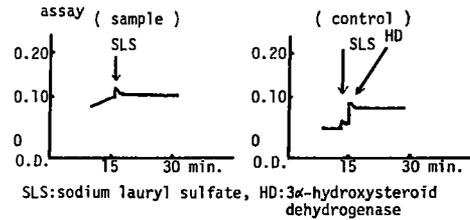


Fig. 3. Influence of sodium lauryl sulfate on bile acid

2) 著者の測定法による胆汁酸の濃度勾配と胆汁に添加した胆汁酸の回収率

cholic acid 0~100 $\gamma$  の範囲内では Fig. 4 のとおり直線性を示した。deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, lithocholic acid 及びこれら胆汁酸の glycine 及び taurine 抱合型の場合も cholic acid と同一の検量線であった。胆汁酸の回収率は table 2 のとおり回収率は 90.3~93.7% 平均回収率は 91.7% であった。各種胆汁酸の回収率に有意の差はない。

3) 健康群, 疾患群の胆汁酸分画の構成

胆汁酸分画を GC, Gdi, TC, Tdi の占有率及び glycine 抱合型と taurine 抱合型胆汁酸の比 (G/T), trihydroxy と dihydroxy 胆汁酸の比 (tri/di) で表わし, 健康群と疾患群を比較すると table 3 のとおりで疾患群では glycine 抱合型胆汁酸分画の占有率は低下ないし低下傾向を, また taurine 抱合型胆汁酸分画の占有率では逆に上昇ないし上昇傾向を認めた。G/T は疾患群で有意の低下を認めた。tri/di は慢性肝炎群に上昇を認めた以外健康群との間に有意差はなかった。

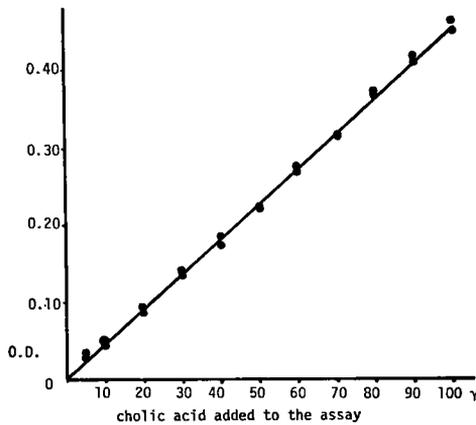


Fig. 4. Linearity of the assay

## 4) 疾患別 G/T と tri/di について

G/T, tri/di を更に glycine 抱合型と taurine 抱合型に分けたのが table 4 である。G/T は健康者群に比較して cholic acid, dihydroxy cholanolic acid とともに疾患群で低下し急性肝炎, 肝硬変症でその低下は強い。tri/di は glycine 抱合型は健康群より慢性肝炎群で上昇を, taurine 抱合型は全疾患群に有意の上昇を認めた。

5) 肝疾患別 bilirubin 3 分画と mol 比について table 5 のとおり, 健康群と各疾患群とは間接型・塩型・ester 型 bilirubin の占有率に特に有意差はなかった。

MR は慢性肝炎, 急性肝炎, 肝硬変症群の順に健康群より有意の低下を示した。

Table 2. Recovery of authentic bile acid in the present assay\*.

Bile acid	recovered ( $\gamma$ )			Mean (%)
Cholic acid	453	470	472	93.0
Taurocholic acid	448	467	469	92.3
Glycocholic acid	430	470	474	91.6
Chenodeoxycholic acid	436	450	469	90.3
Taurochenodeoxycholic acid	442	452	479	91.5
Glycochenodeoxycholic acid	440	461	468	91.3
Deoxycholic acid	450	458	470	91.9
Taurodeoxycholic acid	442	458	464	90.9
Glycodeoxycholic acid	452	460	464	91.7
Lithocholic acid	467	469	470	93.7
Taurolithocholic acid	439	457	460	90.4
	Mean			91.7

\*500  $\gamma$  of bile acid was added to the assay.

Table 3. Bile acid composition in bile of various liver diseases

	TC (%)	T di (%)	GC (%)	G di (%)	G/T	tri/di
Normal n = 8	11.40 $\pm$ 2.81 (5.2-14.4)	18.09 $\pm$ 3.06 (12.8-22.2)	33.36 $\pm$ 3.31 (28.6-38.9)	37.05 $\pm$ 2.85 (34.1-41.3)	2.43 $\pm$ 0.36 (1.94-2.94)	0.82 $\pm$ 0.12 (0.69-1.10)
Acute hepatitis n = 8	21.49 $\pm$ 3.47* (15.8-26.0)	24.28 $\pm$ 3.95* (19.1-33.0)	25.11 $\pm$ 2.11* (21.4-27.9)	29.14 $\pm$ 5.48* (22.0-38.6)	1.23 $\pm$ 0.33* (0.86-1.87)	0.88 $\pm$ 0.14 (0.73-1.17)
Chronic hepatitis n = 9	22.88 $\pm$ 9.51* (6.6-42.7)	20.36 $\pm$ 7.43 (10.1-30.8)	30.16 $\pm$ 10.25* (20.3-49.4)	26.62 $\pm$ 5.68* (19.7-37.4)	1.61 $\pm$ 0.78* (0.68-2.91)	1.21 $\pm$ 0.45* (0.77-2.14)
Liver cirrhosis n = 9	21.00 $\pm$ 2.00* (18.3-24.3)	23.32 $\pm$ 3.27* (17.8-28.1)	26.01 $\pm$ 2.68* (20.7-29.5)	29.66 $\pm$ 3.74* (24.3-37.7)	1.28 $\pm$ 0.23* (1.00-1.70)	0.89 $\pm$ 0.12 (0.71-1.03)
Cholecystopathy n = 11	20.14 $\pm$ 5.90* (10.6-32.7)	20.93 $\pm$ 5.30 (10.6-29.6)	25.76 $\pm$ 5.11* (20.5-35.8)	33.15 $\pm$ 7.84 (23.8-49.7)	1.60 $\pm$ 0.77* (0.98-3.71)	0.87 $\pm$ 0.18 (0.68-1.15)

\*significant with  $P < 0.05$  (compared with normal value)

Mean  $\pm$  S.D.

TC: taurocholic acid, Tdi: taurodihydroxy cholanolic acid, GC: glycocholic acid, Gdi: glycodihydroxy cholanolic acid, G/T: glyco-conjugated bile acid/tauro-conjugated bile acid, tri/di: trihydroxy cholanolic acid/dihydroxy cholanolic acid,

Table 4. Ratios among individual conjugated bile acids in various liver diseases.

	G/T	GC/TC	G di/T di	tri/di	GC/Gdi	TC/Tdi
Normal	2.43±0.36	3.29±1.62	2.12±0.47	0.82±0.12	0.91±0.13	0.66±0.24
Acute hepatitis	1.23±0.33*	1.20±0.25*	1.26±0.40*	0.88±0.14	0.89±0.18	0.90±0.15*
Chronic hepatitis	1.61±0.78*	1.84±1.53*	1.55±0.71*	1.21±0.45*	1.18±0.52*	1.35±0.99*
Liver cirrhosis	1.28±0.23*	1.25±0.18*	1.31±0.34*	0.89±0.12	0.89±0.15	0.91±0.12*
Cholecystopathy	1.60±0.77*	1.43±0.72*	1.84±1.09*	0.87±0.18	0.81±0.25	1.01±0.37*

\* significant with P&lt;0.05 (compared with normal value)

Mean ± S.D.

G/T: glyco-conjugated bile acid/tauro-conjugated bile acid, GC/TC: glycocholic acid/taurocholic acid, Gdi/Tdi: glycodihydroxy cholanolic acid/taurodihydroxy cholanolic acid, tri/di: trihydroxy cholanolic acid/dihydroxy cholanolic acid, GC/Gdi: glycocholic acid/glycodihydroxy cholanolic acid, TC/Tdi: taurocholic acid/taurodihydroxy cholanolic acid,

Table 5. Bilirubin composition in bile of various liver diseases

	Indirect-f. (%)	Salt-f. (%)	Ester-f. (%)	MR
Normal n = 8	3.68±0.89 (2.0-4.7)	7.08±3.44 (2.6-12.7)	89.29±3.91 (83.1-93.9)	1.86±0.12 (1.67-2.05)
Acute hepatitis n = 8	3.44±2.44 (0.8-7.3)	10.03±5.42 (2.9-16.8)	86.55±7.46 (77.5-96.2)	1.33±0.32* (0.81-1.70)
Chronic hepatitis n = 9	3.34±1.69 (0.7-6.0)	9.66±3.21 (4.3-12.7)	87.00±4.31 (82.7-95.0)	1.51±0.32* (1.04-2.01)
Liver cirrhosis n = 9	3.44±1.29 (2.2-5.9)	8.67±2.81 (5.2-14.4)	87.88±3.14 (82.1-92.6)	1.25±0.44* (0.47-1.70)
Cholecystopathy n = 11	4.14±2.11 (1.4-8.1)	9.85±7.24 (3.5-25.1)	86.83±7.60 (73.5-93.8)	1.77±0.19 (1.37-2.05)

\* significant with P&lt;0.05 (compared with normal value)

mean ± S.D.

f.: form, MR: molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin

Table 6. Correlations between bile acid composition and bilirubin composition, and molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin (M.R.), in bile.

Bilirubin Bile acid	Concentration (mg/dl)	Indirect-form (%)	Salt-form (%)	Ester-form (%)	M.R.
Concentration (mg/ml)	r = 0.78 P < 0.01	*	r = -0.56 P < 0.01	r = 0.52 P < 0.01	*
T C (%)	*	*	*	*	r = -0.43 P < 0.01
T di (%)	*	*	*	*	*
G C (%)	*	*	*	*	r = 0.47 P < 0.01
G di (%)	*	*	*	*	*
G / T	*	*	*	*	r = 0.59 P < 0.01
tri / di	*	*	*	*	*

\* not significant

TC: taurocholic acid, Tdi: taurodihydroxy cholanolic acid, GC: glycocholic acid, Gdi: glycodihydroxy cholanolic acid, G/T: glyco-conjugated bile acid / tauro-conjugated bile acid, tri/di: trihydroxy cholanolic acid / dihydroxy cholanolic acid,

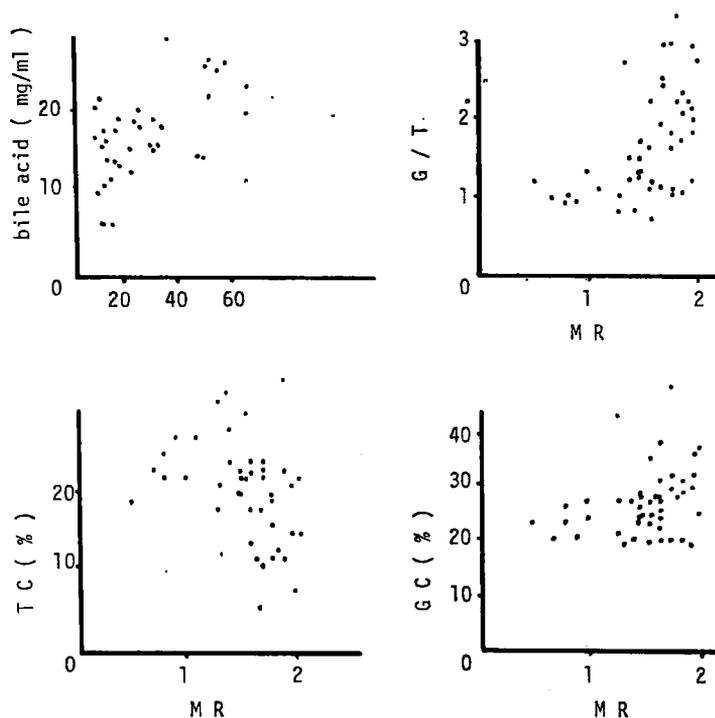
6) 胆汁酸分画と bilirubin 分画及び MR との関連  
胆汁酸濃度と bilirubin 濃度, 塩型及び ester 型 bilirubin 占有率との間に相関を認めた (table 6, Fig. 5).  
しかし, 胆汁酸濃度との間には相関は認めず (Fig. 6),  
一方 ester 型 bilirubin では Fig. 7 のように胆汁酸濃度と ester 型濃度は相関を示した. また, MR は TC 並びに GC の占有率及び G/T と有意の相関を示した.

7) 胆汁酸分画及び mol 比と肝機能検査の関連  
G/T と GOT, GPT, ZTT, 馬尿酸合成試験の間に相関を認めた. また GC の占有率は GOT, GPT と

相関を認めたが, 他の胆汁酸分画と肝機能検査との間に関連は認めなかった. また MR は table 8, Fig. 9 のとおり, GOT, GPT, ZTT, TTT, 馬尿酸合成試験と有意の相関を示した.

#### 8) G/T 低下例の肝組織像

table 9 のとおり G/T 低下例 10 例の肝組織像では肝細胞の大小不同や壊死; kupffer 細胞の肥大, 増殖などが共通して認められる所見であった. G/T とは再生像の所見が比較的関連した動きを示した.



G/T : glycine conjugated bile acid / taurine conjugated bile acid

TC : taurocholic acid                      GC : glycocholic acid

MR : molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin

Fig. 5. Correlations between bile acid composition and bilirubin, and molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin.

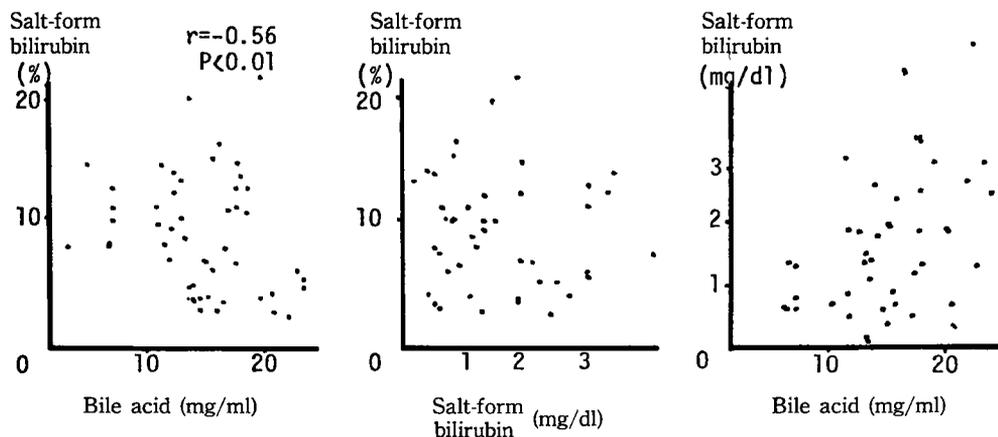


Fig. 6. Correlations between percentage of salt-form bilirubin and bile acid concentration, and concentration of salt-form bilirubin, and between concentration of salt-form bilirubin and bile acid concentration.

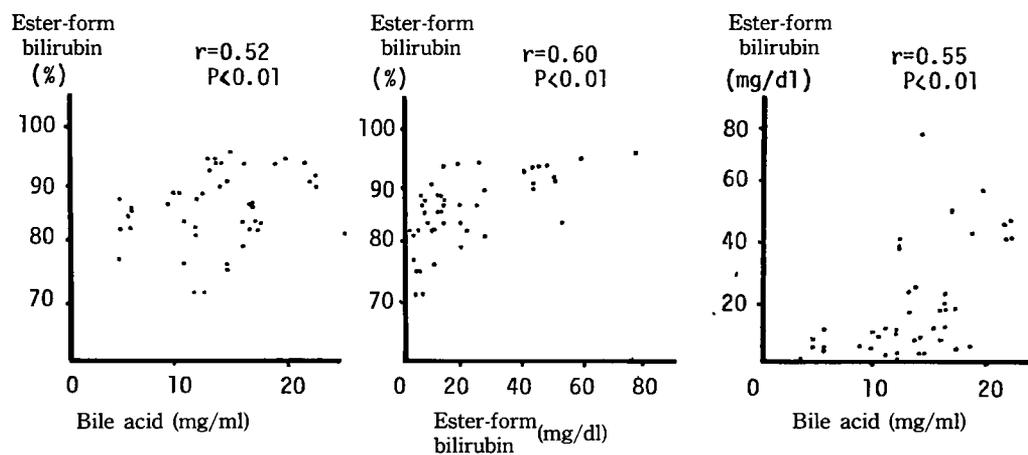


Fig. 7. Correlations between percentage of ester-form bilirubin and bile acid concentration, and concentration of ester-form bilirubin, and between concentration of ester-form bilirubin and bile acid concentration.

C Table 7. Correlations between bile acid composition in bile and liver function tests.

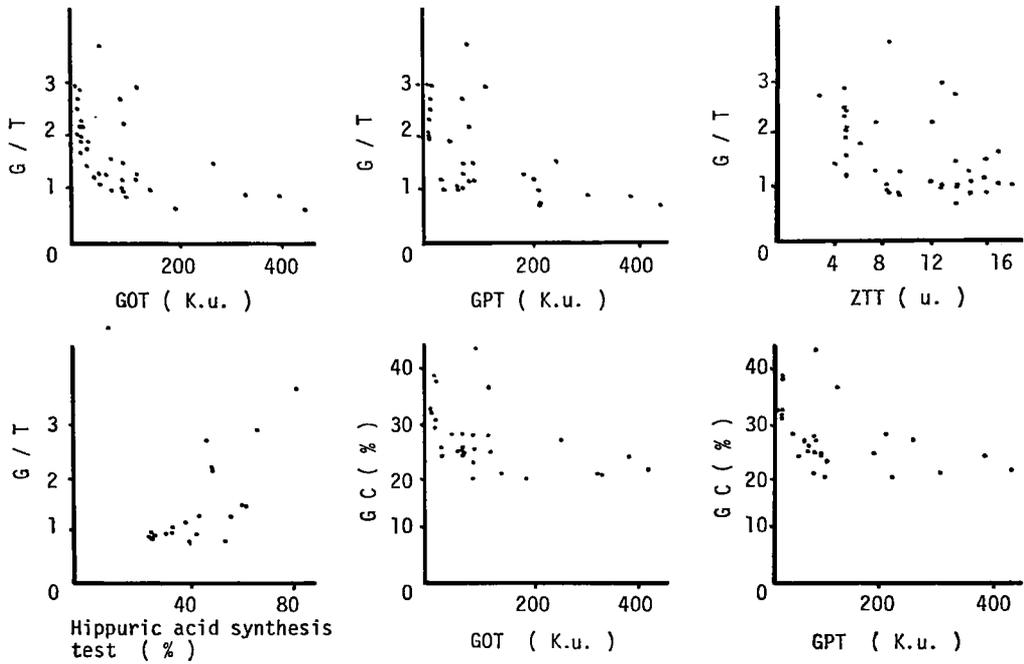
Liver function tests Bile acid	GOT	GPT	Serum Bili-rubin	Al-P-ase	Ch-E-ase	Chole-sterol	TTT	ZTT	Hippuric acid synthe-sis test
G / T	r = -0.51 P < 0.01	r = -0.56 P < 0.01	*	*	*	*	*	r = -0.47 P < 0.01	r = 0.63 P < 0.01
tri / di	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GC (%)	r = -0.30 P < 0.05	r = -0.39 P < 0.05	*	*	*	*	*	*	*

\* not significant

other bile acid composition have no relation with liver function tests

G/T: glyco-conjugated bile acid / tauro-conjugated bile acid, tri/di:

trihydroxy cholanolic acid / dihydroxy cholanolic acid, GC: glycocholic acid



G/T : glycine conjugated bile acid / taurine conjugated bile acid. GC : glycocholic acid.

Fig. 8. Correlations between bile acid composition and liver function tests.

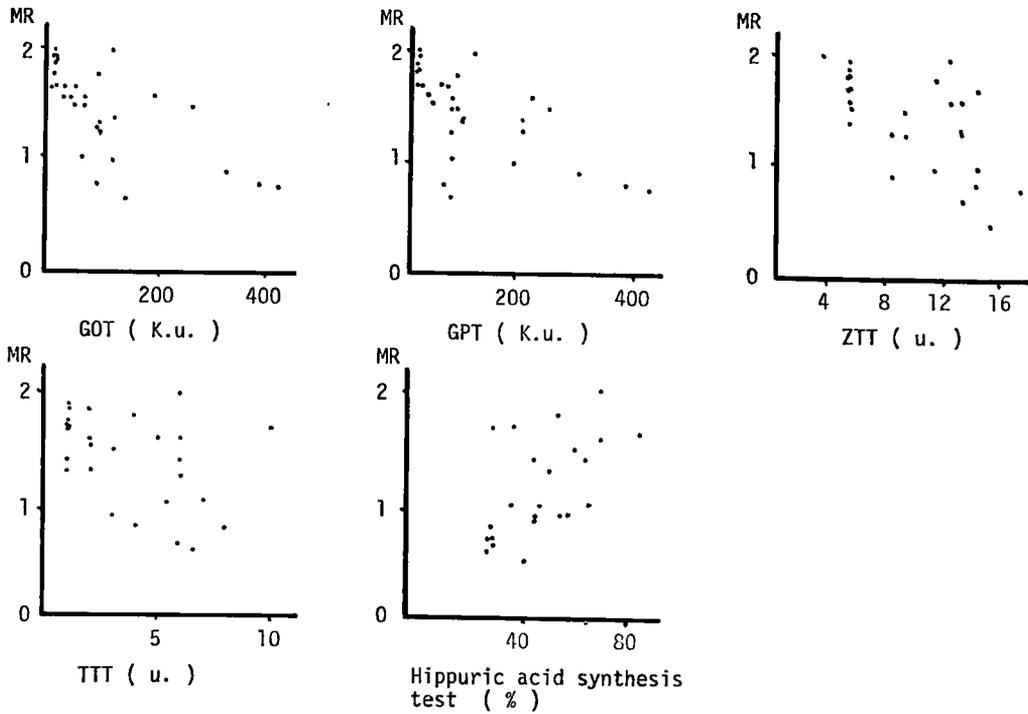


Fig. 9. Correlations between molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin (MR) and liver function tests.

Table 8. Correlations between molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin (MR) and liver function tests.

	GOT	GPT	ZTT	TTT	Al-P-ase
	$r = -0.47$ $P < 0.01$	$r = -0.44$ $P < 0.01$	$r = -0.49$ $P < 0.01$	$r = -0.36$ $P < 0.05$	*

	s-Bilirubin	Cholesterol	Hippuric acid synthesis test
MR	*	*	$r = 0.51$ $P < 0.01$

\* not significant

Table 9. Comparison with bile acid composition in bile and histological findings.

Case number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
G / T	1.05	1.21	1.21	1.26	0.68	1.46	1.09	0.94	0.78	1.03
tri/di	0.87	0.86	1.04	0.86	0.97	0.84	0.92	1.20	1.07	0.92
Distortion of lobular architecture	±	-	-	+	+	-	#	±	-	±
Hepatocyte										
Nucleus Ballooning	+	#	-	+	+	-	-	#	-	-
Irregularity	+	+	+	#	+	#	#	+	-	+
Cell Irregularity	+	±	+	±	-	#	#	±	+	+
Necrosis	-	±	+	±	+	+	+	±	-	+
Degeneration										
Acidophilic body	-	+	±	#	#	+	#	-	#	±
Edematous swelling	-	+	-	#	-	-	-	-	-	-
Fatty metamorphosis	-	#	±	+	#	+	#	±	+	±
Regeneration	±	-	-	+	-	-	+	-	-	±
Sinusoid										
Extension	-	-	#	-	-	-	±	-	+	-
Cell infiltration	+	-	±	+	+	+	#	±	-	±
Kupffer cell										
Hyperplasia	#	#	+	+	#	+	+	±	#	+
Proliferation	#	#	+	+	#	+	#	+	+	+
Bile duct										
Bile thrombus	-	#	-	-	-	-	-	-	-	-
Ductual proliferation	±	-	+	#	+	#	-	#	±	±
Interstitial area										
Cell infiltration Ly.	±	±	±	#	#	#	#	+	-	-
Pl.	#	-	±	+	+	#	#	-	+	+
Destruction of										
Limiting plate	+	-	±	+	#	#	#	-	+	±
Collagen fiber	+	±	-	#	-	-	#	#	+	+
Elastic fiber	+	-	#	+	±	+	#	±	+	±

### 総括ならびに考察

胆汁酸は清水一門<sup>20)</sup>や Wieland 一派<sup>21)</sup>により cholesterol より代謝産物としての経路がかなり明らかにされ、肝細胞の microsome, 細胞質, mitochondria の間を行き来して、 $3\beta$ から $3\alpha$ への水酸基の反転、 $7\alpha$ また $12\alpha$ の水酸化、母核の修飾、側鎖の変化を受けて形成され、主に microsome で glycine 及び taurine と抱合して<sup>4)</sup>胆汁中に排泄される。一方 bilirubin は赤血球の破壊により<sup>22)</sup>、またはヘム化合物などより<sup>23)</sup>生成される。ester 型 bilirubin は肝細胞で形成され<sup>24)</sup>、そのうち bilirubin glucuronide は microsomal の滑面小胞体に存在する glucuronyl transferase により抱合され<sup>3)</sup>胆汁中に排泄される。このように胆汁酸と bilirubin は代謝経路が異り病因による差が推測され両者の関係を中心に検討した。

#### 1) G/T の変化について

ヒト胆汁では glycine 抱合型胆汁酸が主で、諸家<sup>25)</sup>により G/T は異なるが、2.0 から 3.5 の間の値が報告されている。今回健康群に比し G/T の低下を肝疾患群で認めたことは Sjövall<sup>5)</sup> 以来の G/T が肝疾患時に低下するとの成績<sup>26)7)</sup> を支持するものであったが、検体が胆汁のためその絶対量の比較ができないので疾患時に glycine 抱合型が低下するのか、taurine 抱合型が増加するのか、または両者共に低下しその低下の度合いが glycine 抱合型の方が強いのか、共に増加し taurine 抱合型の方がより多く増加するのか不明である。しかし、Sjövall<sup>27)</sup> は健康人に taurine を 1 日 1.5 g 経口投与すると胆汁中の taurine 抱合型が増し G/T が減少するが、glycine を大量に与えても G/T に変化をみないと報告していることや、Encrantz<sup>28)</sup> はヒト新生児の胆汁には taurine 抱合型のみであるが一週間以内に次第に glycine 抱合型が増加してくると報告し、また Poley<sup>29)</sup> は胎児、新生児でこれを支持しており、今回の成績でも馬尿酸合成試験と G/T が良く相関を示したことを考えあわせると肝疾患時には taurine 抱合型に比較して glycine 抱合型が障害されやすいものと思われる。この G/T を GC/TC, Gdi/Tdi と分けてみてもやはり肝疾患群ではその低下を認め、cholic acid に限らず dihydroxy 胆汁酸の中でもこの比は同様に低下していた。胆汁酸の違いによる glycine 及び taurine との抱合はこれら肝疾患時では差がない。即ち胆汁酸の amino 酸抱合がおきる microsomal の酵素はほぼ同様に障害されると推測された。

胆のう症群でも G/T の低下を認めたが、Burnett<sup>30)</sup> が胆石症患者の胆汁は健康群に比し G/T の低下が認められると報告した成績とよく一致した。今回の胆のう症群における G/T の低下は慢性肝炎群と共にその分布は幅広く、G/T 低下症例は transeaminase, ZTT に異常を認めるものが多く肝障害が存在すると考えられた。また胆のう壁の障害の為に各胆汁酸の吸収の度合いの差などが<sup>31)32)33)</sup>報告されており G/T 低下の一因となることも考えられる。

#### 2) trihydroxy cholic acid と dihydroxy cholic acid の比の変化について

肝疾患患者血清中の tri/di の上昇は胆道系の閉塞を示すとの報告<sup>32)</sup>があるが、一般に胆汁中の tri/di 比は血清のそれよりやや低値をとるとされている<sup>34)</sup>。本成績では慢性肝炎群を除く疾患群で健康群と有意差を認めず慢性肝炎で低下するとの中川<sup>26)</sup>らや肝硬変症で低下を認めた Turnberg<sup>7)</sup>らの成績とは一致しなかった。glycine 抱合型と taurine 抱合型に分けた tri/di では主に taurine 抱合型で健康群より有意の上昇を認めた。即ち glycine 抱合型は、肝炎、肝硬変症ではほぼ同程度の障害を受け、Ttri/Tdi の上昇は trihydroxy 胆汁酸の増加、または dihydroxy 胆汁酸の減少となるが、trihydroxy 胆汁酸も dihydroxy 胆汁酸も amino 酸抱合に利用される pool は同一と考えられるから、trihydroxy 胆汁酸が増量するとは思われないので、taurine 抱合型が glycine 抱合型より障害されにくい、dihydroxy 胆汁酸の taurine との抱合が変化したと推測された。黒田<sup>35)</sup>は急性肝炎で deoxycholic acid の減量を認めているが抱合型による差は検討されていない。また Sjövall<sup>6)</sup>も急性肝炎、肝硬変症で、Turnberg<sup>7)</sup>ら Vlahcevic<sup>8)</sup>らは肝硬変症で deoxycholic acid が減少すると報告していることは前述の推測を支持する。Sjövall<sup>6)</sup>はこの際 taurine 抱合型の data は glycine 抱合型と同様であるとしたが、これは paper chromatography で taurine 抱合型の deoxycholic acid と chenodeoxycholic acid を分離できなかった為と思われる。

#### 3) bilirubin 3 分画と mol 比について

bilirubin 3 分画について健康群と肝疾患群との間に有意差はなく、高木の報告と一致した。

MR は ester 型 bilirubin 中の bilirubin glucuronide 分画の占有率を表わすが、急性、慢性肝炎群、肝硬変症群にその低下を認め、肝疾患時の glucuronide 抱合能の低下がうかがわれた。武田<sup>36)</sup>が肝 glucuronyl transferase 活性を測定し肝疾患患者でその活性が低

下するとして報告や高木<sup>9)</sup>の胆汁を用いて肝疾患時にMRが低下し、またMRとZTTとよく相関するとの成績を支持するものであった。また肝細胞壊死を示すと考えられるGOT、GPTとMRは逆相関を示し肝実質障害の良い指標となり得ると思われる。

4) 胆汁酸分画, bilirubin 3分画とMRの関連について

黄疸を伴う肝炎回復期には血清胆汁酸がbilirubinより早期に正常化することが多いとされている<sup>37)</sup>がその逆の場合<sup>38)</sup>もあることが報告されている。これらの報告は総胆汁酸、総bilirubin濃度によるものであり、血清でもあるので胆汁中の両者について検討したところ、胆汁酸濃度と総bilirubin濃度、塩型bilirubin占有率、ester型bilirubin占有率とは良い相関があった。胆汁酸濃度と塩型bilirubin濃度とは相関せず、胆汁酸濃度とester型bilirubin濃度とは相関した。即ち、胆汁酸濃度と総bilirubin濃度の相関の主たるものは胆汁酸濃度とester型bilirubin濃度であった。しかし、MRと胆汁酸濃度は相関せず、これは両者の主抱合の差と理解された。一方、MRがG/Tと相関したことはbilirubinのglucuron酸抱合能と胆汁酸のglycine及びtaurineとの抱合能の障害とは肝疾患時には平行して障害されることが多いことを示している。MRはGC分画及びTC分画とも相関したが、GC及びTCの表示は占有率であり、絶対量ではなくその意義付けは難しいが、GC分画はGOT、GPTと逆相関し、MRもGOT、GPTと逆相関を示したことから、MR及びGC分画の占有率の低下は肝実質細胞障害に基づくものと理解された。TC分画はGOT、GPTと相関せず、胆汁酸のglycine抱合とtaurine抱合の障害の程度には差があることが示された。

5) 胆汁酸分画と肝機能検査及び肝組織像の関連  
G/TがGOT、GPT、ZTTと相関した。この点はG/T低下例の肝組織像が肝細胞壊死やkupffer細胞の増殖を示す例が多かったことから裏付けられた。またG/Tは馬尿酸合成試験とも良く相関し、組織所見で再生像と関連がうかがわれた。GC分画はGOT、GPTとは相関するが、馬尿酸合成試験と相関を示さず、G/TがGC分画より、よりよい肝実質細胞障害の指標と思われた。

## 結 論

肝疾患時における胆汁中の胆汁酸とbilirubinの質的变化を両者の抱合型を中心に急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変症、胆のう症並びに健康者群について対比検

討し、更に肝機能検査及び肝組織像との関連を追求した。また胆汁酸測定法についても改良を加え次の結果を得た。

1) Weberらの胆汁酸測定法のうちhydrazine hydrateの濃度を5%とすることにより吸光度の上昇がみられた。またNADは6.8mMより5mMで充分であることを示した。

2) 胆汁中胆汁酸濃度はbilirubin濃度とester型bilirubin濃度と相関した。またMRはG/T、GC及びTC分画と相関を示した。これらよりbilirubinのglucuron酸抱合能と胆汁酸のglycine及びtaurineとの抱合能の割合は肝疾患時に同程度に障害されることが多いと思われた。

3) 肝疾患時には健康群に比しG/T、GC/TC、Gdi/Tdiが低下した。また総並びにglycine抱合型のtri/diは一定の傾向はないが、taurine抱合型ではtri/diの有意の上昇を認めた。これより肝疾患時にはglycine抱合型のみならず、taurine抱合型胆汁酸も一部障害されると思われた。また胆のう症群でもG/Tは健康群に比し低下を示した。

4) G/T及びGC分配はGOT、GPTと相関し、更にG/TはZTT及び馬尿酸合成試験とも良く相関した。またMRはGOT、GPT、ZTT、TTT、馬尿酸合成試験と相関を示した。このことよりG/TとMRは肝実質障害の良い指標となり得るものと思われた。

5) G/T低下例の肝組織像では肝細胞壊死やkupffer細胞の肥大、増殖を認める例が多く、またG/Tは再生像とよく関連した。これらはG/Tと肝機能検査との関連を裏付けるものであった。

稿を終るに当り、御指導を賜った小坂淳夫学長に深謝致します。また御校閣頂いた長島秀夫教授に深謝致しますと共に、終始御指導御鞭撻を頂いた近藤忠亮講師に深謝致します。

本論文の要旨は昭和49年9月第23回日本消化器病学会中・四国地方会及び昭和51年6月第12回日本肝臓学会総会で発表した。

## 文 献

- 1 . Osborn, E.C., Wootton, I.D.P., Das ilva, L.C. and Sherlock, S.: *Lancet* II 1049, 1959.
- 2 . 牧野 勲：日内会誌 56, 1297, 1967.
- 3 . Heaton, K.W.: *Bile Salts in Health and Disease*. Churchill Livingstone, Edinburgh and London p 18, 1972.
- 4 . Bremer, J. and Gloor, U.: *Acta Chem. Scand.* 9 , 689, 1955.
- 5 . Sjövall, J.: *Ark. Kemi.* 8 , 317, 1955.
- 6 . Sjövall, J.: *Clin. Chim. Acta.* 5 , 33, 1960.
- 7 . Turnberg, L.A. and Grahame, G.: *Gut* 11, 126, 1970.
- 8 . Vlahcevic, Z.R., Buhac, I., Bell, C.C. and Swell, L.: *Gastroenterology* 60, 491, 1971.
- 9 . 高木明一郎：医学研究 39, 255, 1969.
- 10 . 渡部 寛：岡山医会誌 87, 697, 1975.
- 11 . 広畑 衛：岡山医会誌 87, 563, 1975.
- 12 . Hara, S., Takeuchi, M., Tachibana, M. and Chihara, G.: *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 12, 483, 1964.
- 13 . Sundaram, G.S., Singh, H. and Sodhi, H.S.: *Clin. Chim. Acta* 34, 425, 1971.
- 14 . Usui, T.: *J. Biochem.* 54, 283, 1963.
- 15 . Weber, A.M., Chastrand, L., Doyon, G., Gordon, S. and Roy, C.C.: *Clin. Chim. Acta* 39, 524, 1972.
- 16 . 原 嘉之：医学研究 22, 536, 1952.
- 17 . 石館守三, 中島暉躬, 渡辺光夫：第4回グルクロン酸研究会報告集 pp. 5, 1958.
- 18 . 緒方正名, 杉山勝三：岡山医会誌 74, 255, 1962.
- 19 . Hurlock, B., and Talalay, P.: *J. Biol. Chem.* 227, 37, 1957.
- 20 . 穂下剛彦：代謝 10, 1070, 1973.
- 21 . Wieland, H. and Sorge, H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 97, 1, 1916.
- 22 . London, I.M. and West, R.: *J. Biol. Chem.* 184, 359, 1950.
- 23 . Gray, C.H. and Neuberger, A.: *Biochem J.* 47, 87, 1950.
- 24 . 小坂淳夫：東京医事新誌 67, 14, 1950.
- 25 . Grodsky, G.M. and Carbone, J.V.: *J. Biol. Chem.* 226, 449, 1957.
- 26 . 中川昌一, 牧野 勲：*Tokyo Tanabe Quarterly* No. 19, 57, 1973.
- 27 . Sjövall, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100, 676, 1959.
- 28 . Encrantz, J.C. and Sjövall, J.: *Clin. Chim. Acta* 4, 793, 1959.
- 29 . Poley, J.R., Dower, J.C., Owen, C.A. and Stickler, G.B.: *J. Lab. Clin. Med.* 63, 838, 1964.
- 30 . Burnett, W.: *The Biliary System*, Blackwell Scientific Publications. Oxford, p 601, 1965.
- 31 . 村越敏男：福岡医誌 53, 680, 1952.
- 32 . Wheeler, H.D.: *Am. J. Med.* 51, 588, 1971.
- 33 . Ostrow, J.D.: *J. Lab. Clin. Med.* 74, 482, 1969.
- 34 . Nakayama, F.: *L. Lab. Clin. Med.* 69, 594, 1967.
- 35 . 黒田健昭：千葉医会誌 43, 498, 1967.
- 36 . Taketa, K.: *Acta Med. Okayama* 16, 115, 1962.
- 37 . Carey, J.B.Jr: *J. Clin. Invest.* 37, 1492, 1958.
- 38 . Frosch, B. and Wagener, H.: *Nature, Lond.* 213, 404, 1967.
- 39 . 大久保尚男：日外会誌 67, 865, 1968.

**Studies on bile acid and bilirubin in liver disease**  
**Part 1. Clinical significance of biliary bile acids**  
**and three bilirubin fractions in liver diseases**

**Takao NISHIHARA**

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,  
Okayama

(Director : Prof. K. Kosaka & H. Nagashima)

The clinical significance of biliary bile acids and bilirubin concentration in liver diseases was investigated. The relations among bile acids, bilirubins and liver function tests including liver biopsy were studied. The conditions of bile acid measurement by Weber were also criticized. The following results were obtained.

- 1) Weber's method for bile acid measurements was modified, that is; the concentration of hydrazine hydrate from 3.2 % to 5 % and NAD from 6.8 mM to 5 mM; then higher extinction coefficients were obtained and the method was adequate for assay of bile acids.
- 2) The concentration of bile acid correlated with that of bilirubin and of ester-form bilirubin. The molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin (MR) correlated with the ratio of glycine conjugated to taurine conjugated bile acid (G/T), with glycocholic acid fraction and with the taurocholic acid fraction. This suggests that the abilities of conjugation of glucuronic acid to bilirubin and of glycine and taurine to bile acid were damaged at similar levels.
- 3) The ratios of G/T, glycocholic acid to taurocholic acid and glycodihydroxy bile acid to taurodihydroxy bile acid in liver diseases were lower than in healthy subjects. The ratio of trihydroxy bile acid to dihydroxy bile acid (tri/di) in its glycine conjugated form was not significantly altered, but that in taurine conjugated form was elevated in liver diseases, suggesting that the metabolism of bile acid was damaged not only in the glycine conjugated form but also in the taurine conjugated form. The ratio of G/T in the group of cholecystopathy was lower than that of healthy subjects.
- 4) The ratio of G/T and glycocholic acid fraction correlated with GOT and GPT. The G/T ratio correlated with ZTT and hyppuric acid synthesis test. The low G/T ratio and MR suggested liver cell damage.
- 5) Many cases with low G/T ratios showed liver cell necrosis and hyperplasia and proliferation of Kupffer cell in liver biopsy specimens. The G/T ratios correlated with the appearance of regeneration of liver cells. These results suggested a significant correlation between the G/T ratio and liver function tests.