## 胆汁 Bilirubin に関する研究

#### 第 2 編

# 家兎胆汁中胆汁色素の性状と その糖質自荷による変動について

岡山大学医学部第一内科教室

(主任:長島 秀夫教授・指導:小坂 淳夫前教授)

#### 三 好 莞 爾

(昭和53年1月30日受稿)

#### 緒 言

家兎(ウサギ)胆汁は緑色胆汁と称され,その含有胆汁色素が biliverdin,bilirubin より構成されていることは周知の通りであり,その biliverdin は生体内で hemoglobin の分解されて生ずる bilirubin 前駆物質(biliverdin が先ず生じ,ついで還元されてbilirubin を生ずる)が主体で,間接 bilirubin の前駆物質であるところから間接 biliverdin とも呼称されるべきものであることは教室の山本(芳)"により,既に報告されているところであり,山本(芳)によれば直接(抱合型) bilirubin が酸化されて生ずる直接(抱合型) biliverdin とも呼称されるべき biliverdin (家兎胆汁中のそれは間接 biliverdin より直接化(抱合型)された biliverdin である場合が大部分であるが)も一部含まれているという.

斯様に家兎の胆汁を研究対象に選ぶことは生体内胆汁色素代謝上に生ずる biliverdin,bilirubinを同時に観察しうるという利点があり,生体内のその代謝過程を検討するために大いに注目されて然るべきであり,既に教室においても,山本(芳),山田ら20研究を見ることが出来る.

著者はこれら先人に継いで、家兎胆汁中の胆汁色素の分析を試みると共に、糖質負荷によるその質的・量的変動から生体内胆汁色素代謝過程の追及を試みた結果、興味ある成績をえたので報告する.

#### 実験動物

体重 2 kg ~ 3 kg の成熟雄性家兎を使用した. 実験方法

1. 外胆汁瘻の作成と流出胆汁の採取.

実験当日絶食とした家兎について,腹部正中線上で開腹した後,総輸胆管内にポリエチレンチューブ(イガラシ医科工業製 No. 10)を挿入して外胆汁瘻を作成した.流出する胆汁は30分毎に分割採取したが,糖質負荷時には負荷前30分と負荷後5時間半まで計12回採取した.

#### 2. 各種糖液負荷法

糖液は 5% %ブドウ糖液, 5% 果糖液および 5% xylitol 液を使用した. それらの糖液の負荷は,家兎耳静脈を通じ体重 $1 \log$  あたり $10 \mod$  の割で行った.

13. 胆汁中の胆汁色素(biliverdin・bilirubin)の測定法

採取した胆汁について胆汁排泄量を測定した後総胆汁色素量,biliverdin,bilirubin 量を教室山本<sup>11</sup>の方法により測定した。なお吸光度の測定は Leitz 分光々度計 (Model M)を用い,総胆汁色素量は波長 $610\,\mathrm{m}\mu$ ,総 bilirubin 量と直接 bilirubin 量は波長 $570\,\mathrm{m}\mu$  で測定した。なお総胆汁色素量測定のためのbiliverdin 基準曲線は biliverdin hydrochloride (Sigma)を用い作成した。

#### 4. glucuron 酸測定法

O-glucuronide および E-glucuronide を naph-thoresorcinol picrate を用いた石館らったよるNa-BH,法で定量した.

なお用いた標準曲線はその都度作成した.

#### 5. ethyl anthranilate azo 色素生成法

Heirwegh らの方法 に做い行った。すなわち,diazo 試薬は ethyl anthranilate 0.1ml に 0.15N 塩酸 10ml を加え、さらに 0.5%NaNO20.3ml を加えて混和した後5分間放置し、これに 1% ammonium sulfamate 0.1ml を添加し、混和後3分間放置したものを使用し、その1ml を予め胆汁1ml に glycine-HCl 緩衝液 (pH2.85)を1ml 加えたものに添加し、30分間室温に放置することにより生じた azo色素に acetyl acetone n-butyl acetate (17:3 v/v)混液2ml を加えて充分振盪し3,000回転で5分間遠沈して、acetyl acetone n-butyl acetate 相に抽出された azo 色素を検査に供した.

#### 6. bilirubin-azo 色素の分画分離法

まずガラス板 $(20 \times 20 \, \mathrm{cm})$  にKieselgel G Nr 7731 (E Merk 製)を固定相とする  $1 \, \mathrm{mm}$  薄層を作成した後,これに(5)の acethyl acetone  $\cdot$ n-butyl acetate 抽出の azo 色素を濃縮しながら,幅  $5 \, \mathrm{mm}$  以内の帯として付着させた.展開液には chloroform  $\cdot$ methanol  $\cdot$ H<sub>2</sub>O $(65:25:3\mathrm{v/v})$ を用い,室温 $(10 \sim 20 \, \mathrm{C})$ 下で一次元上昇法により $15 \, \mathrm{cm}$  以上展開させた.展開された bilirubin  $-\mathrm{azo}$  色素は Heirweghら にならい展開前線より  $\alpha_0$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -azo pigment と呼称した.

#### 7. 胆汁よりの bilirubin 抽出結晶法

Ostrows<sup>5</sup> の方法によった. すなわち胆汁にその 1/5 量の5% lead acetate solution を加えてbilirubin を鉛塩として沈澱させ,遠心沈澱を行ってその上清を捨て,その沈澱を蒸溜水で1回洗浄し,ついで ethanol で3回洗浄後,4倍量の ethanol に拡散し再び遠心沈澱して上清を捨て,これに3~4 mg の ascorbic acid を加え bilirubin 分画を 1N NaOH で溶解し,30分間冷暗所に放置したのち,氷酢酸で pH5.0 に調整したのち,chloroform・氷酢

酸(3:1v/v)で bilirubin を抽出した. この chloroform 抽出液を合せ 1/5 量の1% ascorbic acid solution で洗浄後, 10% 食塩水で洗浄し, ついで蒸溜水で5回以上洗浄したのち, chloroform にひたした濾紙を用いて濾別した chloroform 液を減圧乾固させることによって bilirubin を晶出させた.

#### 8. bilirubin 異性体の分画分離法

McDonagh ら $^{61}$  の方法によった。すなわち薄層を(6)の項と同様にして作成したのち、chloroform: 氷酢酸(99:1v/v)で一次元上昇法で bilirubin がRf値0.7近くまで室温(10~20 $\mathbb{C})$ 下で展開した。

#### 9. 総胆汁色素量に対する glucuron 酸 mol 比

総胆汁色素量は(3)の項に示したごとく総 biliverdin として測定した。従って総胆汁色素に対する glucuron 酸 mol 比(mol 比)は

 $\mathrm{mol}$  比 $=\frac{\mathrm{glucuron}}{\mathrm{総胆汁色素量}(\gamma)} imes rac{582}{194}$ の式より算出した。

胆汁量,胆汁色素濃度と排泄量についてはいずれも負荷前の値が異なるため負荷前値を100とした.

実験成績

#### 1) 胆汁量

glucose 負荷群, fructose 負荷群, xylitol 負荷群の負荷前後の胆汁量の経時的推移は表 1 の通りである. glucose 負荷群では負荷後 1.5 時間より有意の低下が, fructose 負荷群では負荷後0.5時間, 2.5時間, 3.5~5.5時間に有意の低下が, xylitol では負荷後0.5~2時間に有意の低下が認められた. 負荷2時間迄の胆汁量は, 糖質を負荷した 3 群間に有意の差は認めなかった.

#### 2) 胆汁色素濃度と排泄量

3種の糖質負荷前後の胆汁色素濃度と胆汁色素排 泄量の経時的変化は表2の通りである.

Table 1. Bile volume before and after loading of glucose, fructose and xylitol

Fraction		1 (before loading)		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Group N	No.	ml	, <sub>6</sub> ,	2		•	J	·	•	Ů	•	10	**	
5 %	3	5. 0	10Ó	71. 3	70.0	63. 2*	49.0*	57. 7**	45. 5*	52. 2*	48. 2*	44.0*	42.3*	41. 3*
Glucose	3	$\pm 0.6$		±16.0	±6.1	$\pm$ 18. 1	$\pm$ 17. 4	± 12. 3	$\pm$ 18. 4	±20.7	±21.1	± 19. 1	$\pm$ 20. 3	$\pm19.6$
5 %		3. 7	100	55.5*	61. 9	79. 3	85. 4	72. 4*	103. 5	81.8**	87.6**	84: 3***	80.6***	100.6
Fructose	4	±1.1		± 32.7	± 39.8	$\pm$ 28.8	±11.4	± 16.8	± 19.8	±5.3	± 2.9	±1.8	± 5.4	± 22.6
5 %		5. 2	100	55.0*	50. 9***	55. 4***	67. 8*	71. 3	74. 3	73. 5	77. 9	79.8	71. 1	73. 9
Xylitol	4	±1.8		± 27. 2	± 18.3	± 17.9	± 28. 1	$\pm$ 20. 6	±34.3	± 33. 1	± 38.9	± 50. 1	± 38. 1	± 42.7

<sup>\*</sup>p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.005

Table 2. Excreated amount and concentsation of total bile pigmeist before and after loading of glucose, fructose and xylitol

Fraction Group No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	353. 7 γ	100	102. 7	88. 1***	80. 1	68. 1	79. 4	42. 1***	89. 9	84. 4	57. 4	67.6	65. 2
5 % 3	±96.8		±5.1	±2.0	± 18.5	± 26.5	± 18.9	$\pm$ 14. 5	$\pm$ 47.8	$\pm$ 45. 5	$\pm$ 35. 9	$\pm$ 35. 3	±31.5
Glucose	6. 99 mg %	100	152.8	126.7**	* 131. 2	136. 3***	136. 9 ***	95.8	156. 3	160.8*	123. 4	151.2*	154. 9 ***
	±1.1		$\pm$ 39. 4	± 10. 4	± 20. 2	±8.1	±5.3	±9.0	$\pm$ 45. 4	± 39.8	$\pm$ 34. 8	$\pm$ 23. 8	± 14. 1
	158. 0 γ	100	114.6	109. 1	122. 8	133. 8	102. 4	131. 4	92. 2	99.8	100.0	88. 6	105. 6
5 %	±24.5		± 56. 3	±64.9	± 47. 4	$\pm$ 35. 8	±9.2	$\pm$ 45. 5	±8.3	$\pm0.7$	$\pm$ 12. 7	$\pm$ 16.8	$\pm$ 21.4
4 Fructose	4. 57 mg %	100	221.7*	185.4*	161.5	156.0	148.0	127.0	115.7*	114. 1***	119.0	110.8	110.3
	±1.1		$\pm$ 56. 0	± 37.8	± 45.0	± 32.8	± 32. 2	± 26. 0	±8.2	± 4.5	$\pm$ 16. 9	± 23. 9	$\pm$ 36. 2
	243. 3 γ	100	88. 3	102. 2	82. 6	138. 7	116. 1	135. 2	143. 3	139. 6	138. 5	125. 5	134. 5
5 %	±		± 32.5	±27.0	±39.1	± 38. 4	± 38. 5	$\pm$ 55. 9	$\pm$ 43. 2	± 38. 4	$\pm$ 44. 7	$\pm$ 14. 7	$\pm$ 36.8
4 Xylitol	4. 55 mg %	100	217.5	226.3*	241.2*	239.8*	169.1*	224.8	241. 2	296.8	325.9	329.7	370.7
•	±		± 143.7	±87.2	±71.9	±89.7	±47.5	$\pm$ 113.0	± 125.6	± 253.7	± 255.7	± 273.0	±358.0

<sup>\*</sup>p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.005

Table 3. Percentage of total bilirubin to total bile pigment before and after loading of glucose, fructose and xylitol

Fraction		1 (before												
Group	No.		ading) TB/TBP %	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5 %	_	6. 99	41. 3	50. 2	52. 2	61.0**	69.5**	70.8**	74.3**	80.0***	72. 3***	74.8*	74.5*	65. 3
Glucose	3	± 1. 10	±4.3	$\pm$ 10. 7	±6.3	$\pm 3.9$	±7.4	±6.9	$\pm6.9$	±8.0	±14.1	± 10. 4	$\pm$ 10. 4	±13.8
5 %		4. 57	33. 1	35.0	40.0	41. 8	44.0*	49. 3**	51. 0**	56. 5***	48. 8*	51. 4***	53. 4**	51, 0*
Fructose	4	± 1. 13	$\pm$ 4. 9	±7.1	±8.0	$\pm$ 19. 4	$\pm 2.6$	$\pm$ 4.8	$\pm$ 5. 4	$\pm2.6$	±7.8	$\pm$ 5. 3	$\pm$ 7.6	$\pm6.9$
5 %		4. 55	36. 9	43. 5	43. 5	54.6*	61.5*	75. 6**	71.0*	73. 1*	64. 4***	64. 3***	63. 3***	59.0***
Xylitol	4	± 2. 14	±9.8	± 12. 3	± 2.8	±7.2	±11.2	±9.4	± 17. 0	± 15. 2	±7.8	±4.7	±5.5	±3.6

<sup>\*</sup>p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.005 TBP: total bile pigment, TB: total bilirubin

Table 4. Percentage of direct bilirubin to total bilirubin before and after loading of glucose, fructose and xylitol

Fractio Group		(before T.B I		- 4	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5 % Glucose	3		84. 5 ± 12. 3			92. 8 ± 3. 5			89. 0 ± 9. 1	85. 3 ±9. 7			84. 2 ± 10. 2	
5% Fructose	4	1. 48 ± 0. 34		83. 8 ± 10. 1		79.6 ±11.4			90.5 ±1.5	82. 4 ±10. 4	87. 6 ± 6. 1	92. 0 ± 3. 3		93. 0 ±5. 0
5 % Xylitol	4	1.66 ±0.96	91. 0 ± 2. 1		90.3 ±5.1	88.6 ±4.5	89.3 ±6.8	92. 6 ± 4. 1	93. 1 ±1. 9	96. 5* ±3. 1	99.1*** ±0.7			86. 6 ± 9. 4

<sup>\*</sup>p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.005 D.B.: direct bilirubin, T.B.: total bilirubin

胆汁色素排泄量は glucose 負荷群では0.5時間, fructose 負荷群では3時間迄, xylitol 負荷群では負荷1時間に増加が認められ, fructose, xylitol ではそれ以後でも増加が認められた.

胆汁色素濃度は糖質負荷後負荷前よりいづれの群

でも上昇が認められた. なおこれら糖質負荷3群の間には胆汁色素排泄量, 胆汁色素濃度ともに有意の差は認められなかった.

3) 総胆汁色素分画中の bilirubin 分画の占有率 glucose 負荷群, fructose 負荷群, xylitol 負荷 群の負荷前後の総胆汁色素分画中の bilirubin 分画 の占有率は表3の通りである. 3群共に糖質負荷前は bilirubin の占有率は50%以下と biliverdin 優位であったが, glucose 負荷群では0.5時間, fructose 負荷群では負荷後3時間, xylitol 負荷群では負荷後1.5時間で50%以上の占有率を示した.

- 4) 総 bilirubin 分画中の直接 bilirubin 占有率 3種の糖質を負荷した各群の総 bilirubin 分画中の直接 bilirubin 占有率は表4の通りである. 糖質負荷 3群共に糖質負荷前では直接 bilirubin は平均84.5%以上を占めており、glucose. fructose 負荷後ではその占有率には上昇傾向は認めたものの、有意の変化ではなかったが、xylitol 負荷群のみは3.5~4.5時間後に有意の上昇をみとめた.
- 5) 総胆汁色素量に対する glucuron 酸 mol 比糖負荷を行った 3群の成績は表 5 の通りである. 糖負荷直後では 3群共に総胆汁色素量に対する glucuron 酸 mol 比は上昇傾向を示し, glucose 負荷群では負荷後1.5時間, xylitol 負荷群では1.5時間後に負荷前値に復した.
- 6) 胆汁中bilirubin-azo色素に及ぼす糖質の影響前項(5)の成績の通り総胆汁色素に対する glucuron 酸 mol 比の増加のみとめられた糖質負荷 30分迄の胆汁と、対照としての負荷前の胆汁について、azo-pigment をそれぞれ生成した後、Heirwegh らり

の薄層 chromatograph 法により分画分離を行い検討した。その結果分離された azo-pigment の分配状況は 表 6 の通りである。対照群に比較して fructose 負荷群で  $\alpha_3$ -azo pigment の有意の低下, $\delta$ -azo pigment の有意の増加が認められた。 glucose 並びに xylitol 負荷群では  $\alpha_3$ -azo pigment の低下, $\delta$ -azo pigment の増加傾向がみられたが有意ではなかった。なお,xylitol 負荷群では対照群で痕跡程度に みとめられた  $\alpha_2$ と $\beta$ -azo pigmentの出現がみられた.

#### 7) 家兎胆汁中 bilirubin 異性体

Ostrow らの方法。により胆汁中より抽出した bilirubin 結晶約500  $\gamma$  を使用し、McDonagh らのの薄層 chromatograph 法により bilirubin 異性体の分画分離を試みたところ、3帯の黄色層の形成をみとめ、上帯は bilirubin  $\mathbb{M}_{\alpha}$ 、中帯は bilirubin  $\mathbb{M}_{\alpha}$ 、中帯は bilirubin  $\mathbb{M}_{\alpha}$  と診断され、それらの組成は表 7 のごとく、bilirubin  $\mathbb{M}_{\alpha}$  5.09±1.46%、bilirubin  $\mathbb{M}_{\alpha}$  90.30±2.74%、bilirubin  $\mathbb{M}_{\alpha}$  4.64±1.64% であった.

#### 総括ならびに考按

biliverdin は肝酵素により bilirubin に還元され, glucose はこの還元能を増加させることは既に Barry & Levine (1924)により報告されているが, 教

Table 5. Molar ratio of glucronic acid to total bile pigment before and after loading of glucose, fructose and xylitol

Fraction Group	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Group of 5% Glucose Loading	3	1. 38	1.77*	1.60	1, 32	1. 28	1. 39	1. 43	1. 37	1. 40	1. 41	1. 31	1. 33
		±0.04	±0.13	$\pm$ 0. 18	±0.09	$\pm0.07$	$\pm$ 0.15	±0.19	$\pm$ 0.04	±0.10	$\pm$ 0. 21	±0.14	±0.11
Group of		1. 67	1. 93	1. 82	1. 96	1.74	1. 55	1. 56	1. 54	1. 44	1. 47	1. 44	1. 42
5% Fructose Loading	4	$\pm 0.04$	± 0. 13	±0.18	$\pm 0.09$	$\pm 0.07$	±0.15	±0.19	±0.04	$\pm$ 0. 10	±0.21	$\pm$ 0. 14	±0.11
Group of		1. 48	1.78*	1. 56	1. 45	1. 50	1. 50	1. 38	1. 42	1. 35	1. 31	1. 32	1. 26
5% Xylitol Loading	4	±0.13	±0.09	±0.27	±0.24	$\pm$ 0.19	±0.17	±0.20	$\pm0.18$	$\pm$ 0. 17	±0.15	$\pm 0.10$	$\pm0.16$

Statistical significance was calculated between before and after sugar loading in each group p < 0.05 \*\*p < 0.01 \*\*\*p < 0.005

Table 6. Distribution of bilirubin-azo pigments after loading of glucose, fructose and xylitol.

Group	No.			azo-pigment				
	140.	$\alpha_0$	α 2	α 3	β	γ	δ	
Control	3	19.8±3.8%	trace	31.6±5.0%	_	8.9±2.6%	39.7±3.3%	
Glucose	4	19. $3 \pm 3$ . 1	trace	$22.4 \pm 9.7$	_	$8.9 \pm 1.4$	49.4±9.4	
Fructose	4	$19.8 \pm 3.9$	trace	$18.7 \pm 5.8$	_	$8.2 \pm 0.9$	53. $2 \pm 7.0$	
Xylitol	4	$23.3 \pm 6.7$	3.5+1.2%	$20.5 \pm 6.6$	1.2 + 0.3%	$9.8 \pm 4.8$	42. 2±7. 8	

Table 7. Distribution of bilirubin isomers in the rabbit bile.

No.	bilirubin <b>Π</b> α	bilirubin <b>ΧΙ</b> α	bilirubin <b>XI</b> α
1.	6. 58%	87. 90 %	5. 51%
2.	6. 21	90.01`	3. 77
3.	2. 77	95. 59	1. 83
4.	5. 88	88. 57	5. 55
5.	4. 02	89. 47	6. 55
Mean ± S	D 5.09±1.46	90. 30 ± 2.	74 4.64±1.64

室の山本(芳)"(1951),山田(1953)"は家兎に glucose を負荷し,胆汁中の bilirubin,biliverdin の消長を検討した結果から,glucose は生体内で biliverdin より bilirubin への還元能を促進することを認めている。この還元能は Singleton & Laster"(1965)によれば肝臓内の biliverdin reductase によるものであるという。一方教室の兼重ら"(1973)は fructose,xylitol,sorbitolを ratに投与したさいに,肝の redox state は還元型に変化することをみとめている。

また最近胆汁中には、直接 bilirubin としての抱合型 bilirubin の範疇に容る bilirubin glycoside, bilirubin xyloside や bilirubin と dissacharide の結合物などの存在が報告(19) されているし、胆汁の肝細胞よりの排泄には ATP の関与10) も注目されている。

そこで著者は負荷糖質として glucose, fructose xylitol の3種類を選ぶこととした.

#### 負荷糖質量と濃度

教室山田"は家兎胆汁中の胆汁色素について糖質の影響を検討した結果、20% glucose を家兎耳静脈に負荷する方が、5% glucose を負荷する場合より胆汁排泄能力の保持作用が強いとしているが、最も生理的条件に近い投与方法で検討することとして、本実験では5%液を用いた。つぎに投与量では山田"は5% glucose を家兎体重1kg あたり5~10ml静脈内投与している。これは50kg の人で250~500mlとなる適当な投与量と思われるので、本実験での各種糖液の投与量は家兎体重1kg 当り10mlとした。

#### 胆汁採取時間

教室山本",三宅""らの研究では glucose を家兎 耳静脈に投与した場合,胆汁中の胆汁色素に及ぼす 影響が出現するのは負荷後 3 時間以内としているの で,本実験ではこれらを参考としてこれらの実験よ りやや長い負荷後 5.5 時間までの胆汁を採取して観 察することとした.

#### 胆汁量, 胆汁色素濃度とその排泄量

3種類の糖質液をそれぞれ負荷した後の胆汁量は2時間迄はすべて減少傾向を示した. 負荷した糖液量は10ml/Kg家兎体重であるので、その総量は20~30mlである. 一方実験にさいして採取された排泄水分量は平均glucose群17.6ml, fructose群14.1ml, xylitol群16.1mlであるから、排泄水分量は負荷水分量を下廻っており、胆汁量の減少は水分不足のためとは考えられなかった.

一方胆汁色素濃度は糖質負荷3群共に上昇を認め 胆汁色素排泄量としても増加傾向を認める時期もあったが、その増加は有意とは認められないので、胆 汁色素濃度の上昇は胆汁量の減少のためと考えられた。従って糖質による利胆効果は期待しがたい。

総胆汁色素分画中の bilirubin 分画の占有率

家兎の胆汁中には bilirubin と biliverdin が存在している。そのさい bilirubin 分画の占有率は 50%以下であるが、糖質負荷後は glucose 負荷群では0.5時間,fructose 負荷群では 3時間,xylitol 負荷群では1.5時間で50%以上を示した。このことはこれらの糖質の負荷により biliverdin が肝で bilirubinに還元されたと解すべきであるが,この機序が Singleton ら"の証明した biliverdin reductase 活性の上昇によるものか,還元型 glutathione の生成増加"などによるのか,あるいは教室の兼重らりにより証明された肝の redox state が還元型に変化させられたものかいずれかの機序が強く作用したものと考えられる。

胆汁中直接 bilirubin 分画について

糖質負荷により胆汁中直接 bilirubin 分画の変動 は glucose, fructose 負荷では有意に認め難いが, xylitol 負荷では3.5~4.5時間後に有意の上昇をみ とめた. 一方総胆汁色素量に対する glucuron 酸mol 比は各糖質負荷後には共に上昇傾向を示し、とくに glucose, xylitol 負荷群では, 有意の増加をみとめ た. 生体内直接 bilirubin の大部分は bilirubin glucuronide (glucuron 酸抱合型) 13) であるが, 直接 biliverdin の分画については明かでない.糖負荷に より直接 biliverdin は直接 bilirubin に一部還元さ れることは既に証明されており! 直接 biliverdin が biliverdin glucuronide であるとして, その還元に より bilirubin glucuronide となったとしても、総 胆汁色素量に対する glucuron 酸 mol 比には変動は ない筈である. また胆汁中胆汁色素量は糖質負荷前 後で有意の変動をみないことも先に検討したとこる である. 従って mol 比の増加ないし増加傾向は glucuron 酸生成の亢進を促すとしても bilirubin glucuronide 生成の促進を来したものとは解し難く, すなわち先に証明した直接 bilirubin 分画の変動をみとめなかった成績をも裏付けるものと云えよう.

つぎに Heirwegh らの方法に従い bilirubin-azo 色素分画の変動を糖質負荷前後で比較してみると, $\alpha_z$ -,  $\beta$ -azo pigment は xylitol 負 荷時のみにみと められ, $\delta$ -azo pigment は 3 糖質負荷のいずれにおいても増加がみられた. Heirwegh によれば  $\delta$ -azo pigment は bilirubin glucuronide であるが  $\alpha_z$ -azo pigment は bilirubin xyloside であるとのことであるから xylitol 負荷後には3.5~4.5時間という比較的おくれてではあるが,他の糖質負荷後とは異り,直接 bilirubin 分画の上昇をみとめた上記の成績は glucuron 酸抱合型以外の抱合型 bilirubin の増加に 負うためではないかと思われる.

#### 家兎胆汁中 bilirubin 異性体

家兎胆汁中には bilirubin 以外に biliverdin が存在するが,胆汁中の bilirubin を抽出するさいに行う chloroform による抽出過程で biliverdin は微量となり,ついで chloroform にひたした濾紙で濾別することにより殆んど完全に除去され,さらに methanol-chloroform より bilirubin を晶出する段階では完全に biliverdin は除去され,bilirubin 異性体の検討には支障を来たさない.

 irubin 異性体が生体内に存在するとする丸山の成績 を支持するものであった.

#### 結 論

biliverdin より bilirubin への還元過程や bilirubin の抱合機序に及ぼす糖質の影響を biliverdin と bilirubin が胆汁中に共存する家兎に糖質として glucose, fructose, xylitol を選びこれを耳静脈に 負荷することにより検討し次の結果をえた.

- 1)糖質負荷後の胆汁量,胆汁色素濃度と排泄量は 糖質負荷3時間迄では胆汁量は減量,胆汁色素濃 度は増加し,胆汁色素排泄量は増加せず,glucose 負荷群では負荷1時間で有意の減量を認めた.
- 2) 糖質負荷後の総胆汁色素分画中の bilirubin 分画の占有率は各群共漸増し, bilirubin と biliverdin 比は glucose 負荷群で0.5時間, xylitol で1.5時間, fructose で3時間後に逆転した.
- 3)総 bilirubin 分画中の直接 bilirubin の占有率は3群共に糖負荷により増加傾向はみられたが有意ではなかった。

総胆汁色素-glucuron 酸 mol 比は糖負荷直後に 3群とも軽度の上昇が認められ、glucose と xylitol 群では有意であった.

- 4) 糖質負荷後の bilirubin-azo 色素には対照時と 比較して  $\alpha_3$ -azo pigment の減少、 $\delta$ -azo pigment の増加が認められ、fructose 群では有意で あった. xylitol 負荷群で対照群では見られない  $\alpha_2$ 、 $\beta$ -azo pigment が認められた.
- 5) 家兎胆汁中には bilirubin IX α 以外に微量の bilirubin III α, bilirubin III α, o存在が認められた.

稿を終るにあたり御校閲を載いた小坂淳夫岡山大学学 長(前第一内科教授)に深謝します。また直接御指導を 載いた近藤忠亮講師に感謝します。

#### 文 献

- 1) 山本芳雄:ビリベルジン代謝に関する研究. 医学研究, 21:1391-1444, 1951.
- 2) 山田彌一郎:胆汁内胆汁色素に関する研究. 医学研究, 23:438-469, 1953.
- 3) 石館守三, 中島暉躬, 渡辺光夫:グルクロン酸定量法の検討, 第4回グルクロン酸研究会報告集 pp 5-7, 1958.
- 4) Heirwegh, K.P.M., VanHess, G.P., Veroy, P., VanRoy, F.P. & Jansen, F.H.: Heterogenity of bile pigment conjugates as revealed by chromatography of their ethyl-anthranilate azo pigments. Biochem. J., 120:877-890, 1970.
- 5) Ostrow, J. D., Hammaker, L. & Schmid, R.: The preparation of crystalline bilirubin-C. J. Clin. Invest., 40: 1442-1452, 1961.
- 6) McDonagh, A.F. & Assisi, F. :Commercial bilirubin: A trinity of isomers. FEBS Letters., 18:315-317, 1971.
- 7) Singleton, J. W. & Laster, L.: Biliverdin reductase of Guinea pig\_liver. J. Biol. Chem., 240: 4780-4789, 1965.
- 8) 兼重順次, 陶山大輔, 河野宏:肝における Glucose, Fructose, Sorbital, Xylitol の代謝に関する比較研究. 肝臓, 14:253-262, 1973.
- 9) Kuenzle, C.C.: Microheterogenity of complex glucosides of bilirubin from human bile. Experimentia, 31:6266 626—627, 1975.
- 10) 水田実:胆汁酸の利胆作用と胆汁酸製剤, Tokyo Tanabe Quarterly, No. 19:89-94, 1973.
- 11) 三宅至士: 生体内胆汁色素生成に関する研究,第2編,肝臓内胆汁色素生成に及ぼす葡萄糖の影響について,医学研究,21:1288-1294,1951.
- 12) Maruyama, E, Kojima, K., Higuchi, T. & Sakamoto, Y. : Effect of diet on liver glutathione and glutathione reductase. J. Biochem., 63:398-399, 1968.
- 13) Billing, B. H.: A chromatographic method for the determination of the three bile pigment in serum. J. Clin. Path., 8:126-129, 1955.
- 14) 丸山睦郎: Bilirubin 異性体に関する研究, 岡山医会誌, 90:69-77, 1978.

#### Studies on bilirubin in bile

# Part 2. Characterization of bile pigment and influence of sugar loading on bile pigment in rabbit bile

### Kanji MIYOSHI

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyowo Kosaka & Prof. Hideo Nagashima)

Influences of intravenous injection of sugar solution on the reduction process from biliverdin to bilirubin and conjugation of bilirubin in the rabbit liver was studied. 5% solution of glucose, fructose or xylitol was loaded into an auricular vein of the rabbit that contained both bilirubin and biliverdin in the bile. Following results were obtained;

- 1) After loading of sugar solution, decreased bile volume, increased concentration was observed up to 3 hours in each group, and the excreted amount of bile pigments was not increased.
- 2) The bilirubin fraction in the total bile pigments in the bile was gradually increased after loading of sugar solution on each group. The concentration of bilirubin was superior to biliverdin in 30 minutes in glucose group, in 1.5 hours in xylitol group, and 3 hours in fructose group after loading.
- 3) The direct bilirubin fraction in total bilirubin in the bile increased in each group after loading of sugar solution, but not significant. Molar ratio of glucuronic acid to total bile pigments increased immediately after loading of sugar solution. Significant increase was shown in glucose and xylitol loading group.
- 4) The percentage of alpha 3 azo-pigment to total bilirubin azo-pigments decreased and delta azo-pigment increased after loading of sugar solution than the control group. Alpha 2 and beta azo-pigment was observed in xylitol group, these azo-pigments were not shown in the control.
- 5) Small amount of bilirubin  $\mathbf{III}\alpha$  and bilirubin  $\mathbf{XIII}\alpha$  exsists in the rabbit bile.