

岡山医学会雑誌

第87巻5, 6, 合併号(第966, 967号)

昭和50年6月30日発行

胆汁色素に関する研究

第一編

体質性黄疸時の bilirubin 負荷試験に関する検討

岡山大学医学部第一内科(主任:小坂淳夫教授)

井 沢 徹 一

(昭和50年2月13日受稿)

緒 言

1927年 Eilbott¹⁾ Bergmann²⁾により提案された bilirubin 負荷試験は肝疾患時における bilirubin 代謝を検討する検査法として、また生体内に存在する色素をもちいる負荷試験として特異的である。Soffer³⁾ Ljung⁴⁾らは主として Eilbott の言う bilirubin 負荷後の bilirubin 血中停滞率に関する検討を行ないその正常値に関してはかならずしも一致をみなかった。また bilirubin 負荷試験は高価につくことや、注射液の調整がかなり困難をとまうことより、1924年 Rosenthal⁵⁾は bromsulphalein (B. S. P.)、更に 1957年 Fox ら⁶⁾は indocyanin green (I. C. G.) の排泄試験を提唱して bilirubin 排泄状態を間接的に測定しようと試みた。ただし bilirubin は生体内で産生される色素であるが他の色素を用いた排泄試験では肝における抱合機序や排泄機序などがことなるためこれらの色素により bilirubin の代謝をうかがうことには無理がある。従って一般肝機能障害を

ともなわず bilirubin 代謝のみが異常と考えられている体質性黄疸の bilirubin 代謝の研究には bilirubin 負荷による検討は不可欠と思われる。にもかかわらずその有意性に関しては With⁷⁾ Krueger⁸⁾は否定的成績を示しており、一方 Ljung⁴⁾ Tisdale⁹⁾は肯定的成績をあげている。ところでこれらの成績は Eilbott 以来のいわゆる bilirubin 血中停滞率をもとにしたものである。1964年 Billing¹⁰⁾は bilirubin 排泄曲線の数学的解析より肝での bilirubin の摂取、排泄を検討する方法を提唱した。このさい血中 bilirubin は直接、間接型に分画されその分画の排泄機序には差があり、その分画の分離法としては小坂・原¹¹⁾、Cole¹²⁾ら、Schachter¹³⁾ Eberlein¹⁴⁾らの方法が提唱されているにもかかわらず、bilirubin 負荷時の血清 bilirubin 分画の変動に関する報告はない。そこで著者は肝での bilirubin の代謝を検討するため、主として体質性黄疸を対象として、bilirubin 負荷試験を行なって血清 bilirubin 分画の変動をその排泄曲線と共に検討し新しい知見をえたので報告する。

実験対象ならびに方法

1. 検索対象

正常対照群には健康で肝機能正常な男子医学生、
 年齢18才~29才迄の8名を選び、疾患例は Table 1

Table 1. Subjects

Normal	8
Gilbert's syndrome	5
Dubin-Johnson syndrome	8
Rotor syndrome	1
Posthepatic hyperbilirubinemia	3
Liver cirrhosis	1
Chronic hepatitis	1
Shunt hyperbilirubinemia	1

に示す構成で、すべて岡山大学医学部第一内科入院中肝機能検査、諸種肝抱合能検査、色素排泄試験、赤血球寿命、血液像などの検査のほか、腹腔鏡ならびに肝生検組織像、肝生検組織による肝 glucuronyl transferase 活性値測定などにより診断を確定しえた症例である。

2. 負荷 bilirubin 調整法

第一純正化学製 bilirubin 100mg を Billing¹⁹⁾の方法に従い、滅菌した1規定 sodium carbonate 溶液20 mlに溶解後、無菌操作で硝子濾過器(Hario Glass Brand Co, Ltd., 円筒漏斗型, 17 G, 4)にて濾過した液で調製後可及的速やかに使用した。

3. Bilirubin 負荷及び採血方法

調整した bilirubin の sodium carbonate 溶液20 mlを1分かけて正肘静脈より静注し、反対側の正肘静脈より、負荷後3分, 5分, 7分30秒, 10分, 12分30秒, 15分, 17分30秒, 20分, 30分, 60分, 120分と経時的に各5 ml採血した。なお bilirubin 負荷前の食餌は中止させ glucuron 酸製剤の使用は数日前より中止し、かつ当日はすべての服薬を禁止した。

4. 臍 catheter 法による bilirubin 負荷試験

臍静脈を再開通し、X線透視下に肝門脈より catheterを挿入し、一方上臍静脈より catheterをX線透視下に肝静脈に至らしめ、同時に大腿動脈を小児用腰椎穿刺針で穿刺し、術者3名で同時採血するよう準備し、反対側正肘静脈より bilirubin 100mgを静脈注射し、5分, 10分, 15分, 20分, 25分, 30分, 35分, および60分に5 ml宛採血した。

5. Bilirubin 3分画法

小坂・原²¹⁾の方法によった。即ち血清 1 ml に chloroform 2 mlを加え十分振盪後、10分間、2000 r. p.m.にて遠沈して得られる chloroform 層は間接 bilirubinである。さらに残った上層に0.1規定の塩酸1mlを加えて塩酸性とした後、chloroform 2 mlを加えてよく振盪した後、10分間、2000 r. p.m.で遠沈し、下層の chloroform 層に抽出されたものは塩型 bilirubin 分画とし、上層に残ったものを ester 型 bilirubin 分画とし、これを ammonium sulfate で塩析後、methanol 5.0 mlを加えて抽出した後さらに3.5 mlの methanol を加えて抽出した。抽出液に Erlich 氏 diazo 試薬 1 mlを加えた後、全量10 mlになるように methanol を加えた後、bilirubin量を測定した。

6. Bilirubin 測定法

Jendrassik-Cleghorn 氏変法²¹⁾を用い Leitz の光電比色計 model M. 波長535 m μ にて測定した。

7. Glucuron 酸定量法

Ester 型 bilirubin 分画について石館ら²²⁾の NaBH₄をもちいた分画法で E-Glucuronide を naphthoresorcinol picurate 法で測定した。検量曲線は中外製薬の glucuronic acid soda をもちい実験の都度作製した。

8. Ester 型 bilirubin に対する glucuron 酸 mol 比²³⁾

Ester 型 bilirubin に対する glucuron 酸抱合度は下式により mol 比として算出した。

$$\frac{\text{glucuron 酸量}}{\text{ester 型 bilirubin 量}} \times \frac{\text{bilirubin 分子量}}{\text{glucuron 分子量}} = \text{mol 比}$$

bilirubin 分子量=585, glucuron 酸分子量=198
 以下 mol 比とは ester 型 bilirubin 分画における glucuron 酸 mol 比である。

9. C 胆汁中の ester 型 bilirubin に対する glucuron 酸 mol 比

(1) 胆汁採取法

Meltzer-Lyon 法により早朝空腹時に十二指腸 sonde を嚥下させ、X線透視下に、その先端が十二指腸下降脚に達する事を確認した後、A胆汁の排泄をはかった後、olive 油10 mlを注入してB胆汁の排出終了を待ち、得られたC胆汁25 mlを試料とした。

(2) 粗 bilirubin の調整

採取したC胆汁5 mlを ammonium sulfate で飽和塩析すると bilirubin は黒褐色アメ状に析出する。この色素を濾別し methanol で抽出した後、減圧乾固し、ふたたび methanol で抽出し、減圧乾固する。この過程を3回行なった後 steroid 等を除去するた

め ether で数回洗滌したものを粗 bilirubin とした。

(3) Bilirubin 3分画法

小坂・原¹¹⁾の方法により、胆汁 5 ml よりえた粗 bilirubin を 5 ml の水溶液とし、その 1 ml について 5. にのべた操作で各 bilirubin 分画をえた。

(4) Ester 型 bilirubin に対する glucuron 酸 mol 比

Ester 型 bilirubin に対する glucuron 酸 mol 比は 7 の方法によった。

10. β -glucuronidase による ester 型 bilirubin の分解

高木²⁴⁾の方法により、ester 型 bilirubin 0.2 mg につき pH 4.6 に調整した β -glucuronidase, 4000 単位 (東京臓器製) を加え、37°C, 18 時間 incubate することにより遊離される glucuron 酸と bilirubin を分離測定した。遊離 glucuron 酸は高林、石館の方法で、また遊離 bilirubin は chloroform 抽出法¹¹⁾をもちいて定量した。

11. Salicylamide 負荷試験

武田²⁵⁾の方法によった。すなわち被検者を午後 5 時以降絶食させ、午後 10 時に 200 ml の水で salicylamide 1.0 g を服用させ、翌朝 8 時迄の 10 時間尿について、その 1/1000 量の尿を検体とし、濃塩酸で加水分解して得られる総 salicylamide と β -glucuronidase により遊離される salicylamide glucuronide の比を百分率であらわした。

12. 肝 glucuronyl transferase

武田の方法²⁶⁾によった。すなわち腹腔鏡下に Vim Silvermann 針で穿刺した肝組織に等張の 0.154 M KCl 溶液を加えて 0.4% homogenate とし、4-methylumbelliferone を基質とし、過剰の uridine diphosphoglucuronic acid を含んだ incubate system に加え、37°C, 10 分間 incubate した後 chloroform で除蛋白し、2000 r.p.m. で 10 分間遠沈して得られる上清について、 β -glucuronidase 添加上清と、非添加上清を 1 時間、37°C で incubate した後、glycine buffer (pH 10.42) を加えて、日立蛍光比色計 (EPU-2 A 型) で quinine sulfate standard を 50% に調整し両者の蛍光の差をもって μ moles/10 min/100 mg 肝組織で glucuronyl transferase 活性をあらわした。

13. 赤血球寿命

被検者血液 30 ml を A. C. D. 液 20 ml 中で 1 時間、Cr (1 mCi) で標識し、過剰の Cr を ascorbic acid で還元し、静注後経日的に採血し、hematocrit 補正

を行なって、Cr の count 数を WELL type scintillation counter (TOKYO, SHIBATA, ELECTRIC Co., LTD., 型式 UDS-24210) で測定し半減期を求めた。

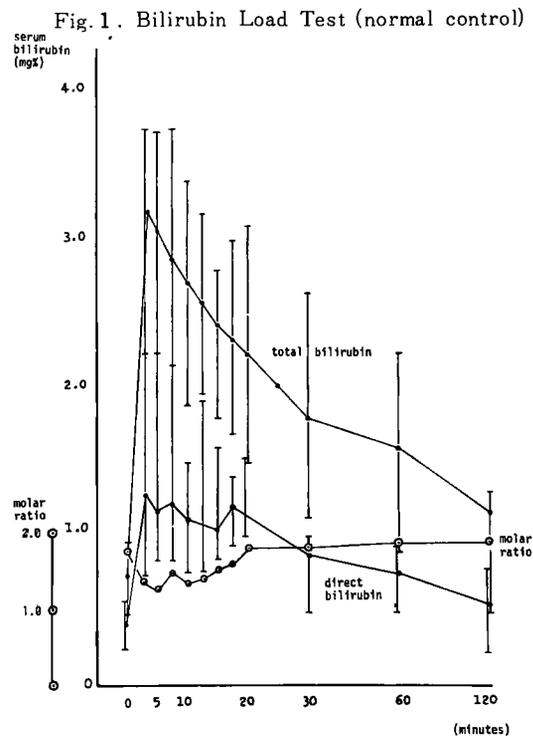
14. 肝機能検査

肝機能検査としては血清 bilirubin 値、血清 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), B. S. P. (30 分値, 45 分値), I. C. G. 試験, alkaline-phosphatase (Bessy-Lowry 単位), Choline-esterase (pH 単位), 膠質反応としては Kunkel 氏硫酸亜鉛試験 (Z. n. T. T.), Maclagan 氏 thymol 混濁試験 (T. T. T.), 血清蛋白中の γ -globulin (Separax 通電分画法) について検索した。

実験成績

1. 正常者群

正常 8 例の bilirubin 排泄曲線は Fig. 1 の如くで bilirubin 負荷前の総 bilirubin 値は、0.44~0.93 mg % (平均 0.72 mg %), 直接 bilirubin 値は 0.26~0.55



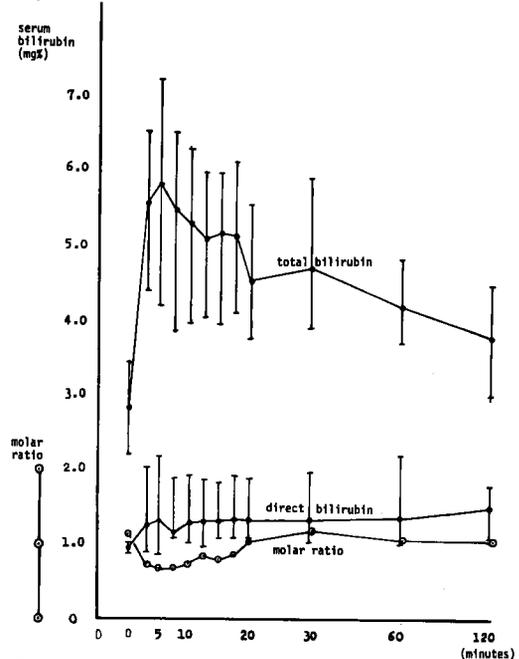
mg % (平均0.38 mg %) であり, ester 型 bilirubin 分画の mol 比は1.65~1.92 (平均1.73) であった. Bilirubin 負荷後の総 bilirubin は 8 例中 5 例で 3 分後に最高値2.20~3.70 mg % (平均3.09 mg %) を示し, 8 例中 2 例では 5 分後に最高値3.00, 3.70 mg % (平均3.35 mg %) を示した. 負荷後の bilirubin 最大上昇量は1.50~2.96 mg % (平均2.54 mg %) であった. また負荷後 2 時間での bilirubin 血中停滞率は 0~14.8% (平均6.1%) であった. 直接 bilirubin 値は 8 例中 4 例では bilirubin 負荷後 3~5 分で1.50~2.20 mg % (平均1.75 mg %) の最高値を示し, 第 2 の peak 0.95~1.88 mg % (平均1.50 mg %) を 12 分30秒~17分30秒にみとめた. また 8 例中 3 例では最高値1.10~1.48 mg % (平均1.29 mg %) の peak を負荷後 10~15 分にみとめた. また 1 例では負荷後 7 分30秒~20 分後に 0.94 mg % の第 2 の peak をみとめた. 一方 mol 比は負荷前1.63~1.92 (平均1.73), 負荷後 3 分で0.74~1.54 (平均1.36), 5 分で1.12~1.66 (平均1.38) と急速に下降した後, 徐々に上昇し, 17分30秒後で1.56~2.00 (平均1.76) と前値への回復がみられ, さらに 120 分後には1.64~2.02 (平均1.82) を示した.

2. Gilbert 症候群

a) Bilirubin 負荷試験

Bilirubin 負荷試験の成績は Fig. 2. に示すごとくで, bilirubin 負荷前の総 bilirubin 値は2.22~3.48 mg % (平均2.83 mg %) と軽度増加がみとめられ, 総 bilirubin 値に対する直接 bilirubin 値の占有率は25~45% (平均34.2%) で mol 比は 0.91~1.44 (平均1.18) であった. bilirubin 負荷後総 bilirubin 値は 5 例中 2 例で 3 分後に, 5 例中 3 例では 5 分後で最高値4.40~7.20 mg % に達し, 以後緩慢に降下し, 120 分後での血中総 bilirubin 停滞率は 27.2~69.7% (平均47.3%) であった. また直接 bilirubin 値は総 bilirubin 値が最高値に達した 3 分および 5 分では0.87~2.20 mg % (平均1.33 mg %) で, 総 bilirubin に対する直接 bilirubin の割合は13~45% (平均24%) であり, 各例での直接 bilirubin の最大上昇は 5 例中 2 例では 5 分後に, 各 1 例ずつ 12分30秒, 15分および30分後にみられ, 0.30~1.20 mg % (平均0.53 mg %) であり, 以後漸減し120 分後には1.09~1.80 mg % (平均1.28 mg %) で正常例でみられた二峰性の peak はみとめられなかった. 一方 mol 比は bilirubin 負荷後 5 例中 1 例では 3 分後, 5 例中 3 例では 5 分後, 5 例中 1 例では 7 分30

Fig. 2. Bilirubin Load Test (Gilbert's syndrome)



Each curves shows the averaged value of 5 cases.

秒後に最低値0.53~0.82 (平均0.65) を示した後, 徐々に前値への復元がみられるが各例とも低値を横ばいし, 正常例でみられたとき bilirubin diglucuronide の場合の mol 比の理論値2.0 に向っての復元傾向はみられなかった.

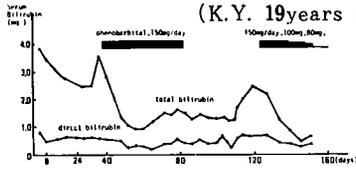
b) Phenobarbital 投与前後の血清 bilirubin 値の変動

Phenobarbital を100~150mg (1日量) 投与下に血清 bilirubin 値の変動を経日的に観察した結果は Fig. 3. に示す如くで, 全例とも投薬後7日以内に bilirubin 値は1.0mg % 以下となったが, 休薬後7日前後に全例に血清 bilirubin 値の再上昇がみられた.

c) Phenobarbital 投与時の bilirubin 負荷試験成績

Phenobarbital 投与により血清 bilirubin 値が正常値を示した時期に bilirubin 負荷試験を行なった成績は Fig. 4. に示すごとくで, 負荷後120 分の総 bilirubin 血中停滞率は症例1および3では0%, 症例2では10.2%, 症例4では15.6% で正常に近い血中停滞率であり, mol 比の bilirubin 負荷前の値

Fig. 3. Course of serum bilirubin after phenobarbital administration. (K.Y. 19years male)



Course of serum bilirubin after phenobarbital administration. (Y.S. 20years female)

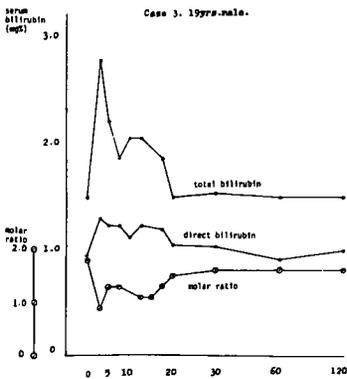
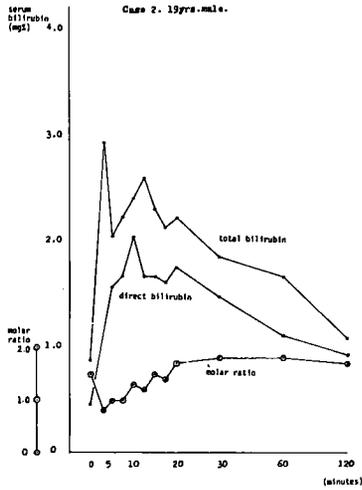
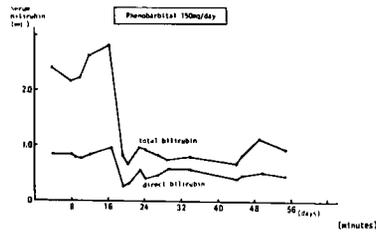
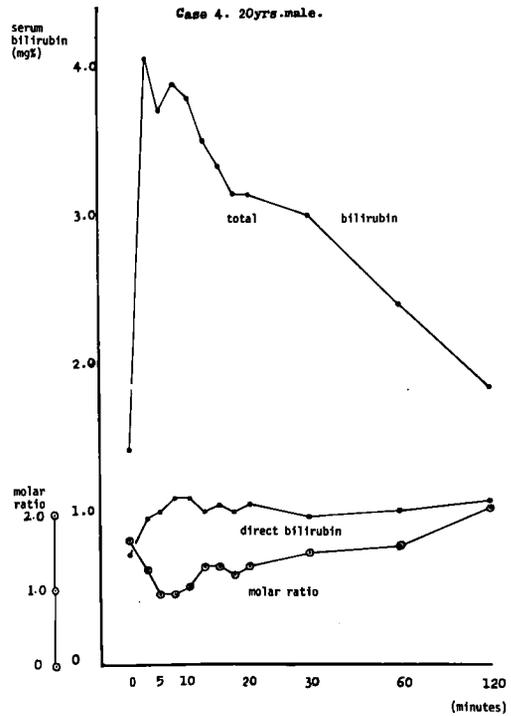
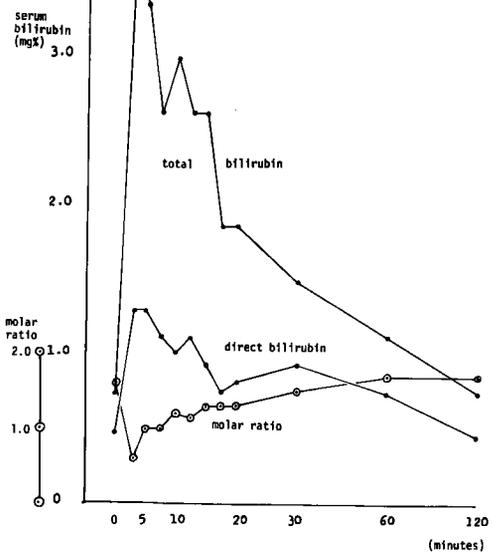


Fig. 4. Bilirubin Load Test during phenobarbital administration. (Gilbert's syndrome) Case. 1. 20yrs. female



は phenobarbital 投与前に比して1.5~1.8 (平均1.63)と上昇し, mol 比の変動は bilirubin 負荷後3分では0.6~0.9 (平均0.76), 5分では1.0~1.3 (平均1.1)と低下し以後緩やかな上昇傾向をみとめ120分後では1.6~1.7 (平均1.67)とほぼ前値まで復元し, 正常例に近い曲線を示した.

d) 肝 glucuronyl transferase 活性値に及ぼす phenobarbital の影響

Phenobarbital 投与前後で測定しえた肝 glucuronyl transferase 活性値は2症例で, phenobarbital 投与前それぞれ92.5と117 μ moles/100mg肝組織/10分で投与後血清 bilirubin 値が2mg%以下となった際のそれぞれの活性値は117 μ moles/100mg肝組織/10分, 151 μ moles/100mg肝組織/10分で, 2例ともに glucuronyl transferase 活性値の上昇をみとめた. 教室での正常値は128~153 μ moles/100mg肝組織/10分であるから正常値にほぼ達したことになる.

e) Phenobarbital の salicylamide の抱合に及ぼす影響

Phenobarbital 投与前および投与後血清 bilirubin 値が2mg%以下となった時に行なった salicylamide 負荷試験の成績は Table 2. に示す如くで投与前後の尿中 total salicylamide に対する salicylamide glucuronide の比 (G/T, %) は正常対照および疾患例とも有意の変動をみとめなかった.

3. Dubin-Johnson 症候群

a) Dubin-Johnson 症候群に対する bilirubin 負

荷試験

Bilirubin 負荷前の血清総 bilirubin 値は2.04~4.82 mg% (平均2.95 mg%) で総 bilirubin 値に対する直接 bilirubin 値の占有率は67.0~92.2% (平均83.5%) であり, mol 比は1.45~2.0 (平均1.73) と高値であった. bilirubin 負荷後の排泄曲線は Fig. 5. に示すように総 bilirubin 値は8例中3例では3分後に, また5分, 7分30秒, 10分, 12分30秒および15分後に各1例づつ最高値を示し, 最高値は3.80~6.30 mg% に達し, 以後高値が続き120分後の血中総 bilirubin 停滞率は29~79% (平均45%) であった. 総 bilirubin が最高値に達した3分~15分での直接 bilirubin 値は2.59~5.17 mg% (平均3.98 mg%) であり総 bilirubin に対する直接 bilirubin の割合は50~87% (平均67.8%) であり, 総 bilirubin, 直接 bilirubin とも高値を変動し, 前値への復元は遷延している. 一方 mol 比は8例中6例が bilirubin 負荷後5分で最低値0.8~1.5 (平均1.1), 8例中1例では bilirubin 負荷後3分で1.0を, また8例中1例では bilirubin 負荷後7分30秒後に1.2を示し, 以後若干の変動を示しながら前値へもどり, bilirubin 負荷後120分後の mol 比は1.52~1.82 (平均1.60) と bilirubin 負荷前値への復元がみられた.

b) Phenobarbital 投与による血清 bilirubin 値の消長

Dubin-Johnson 症候群に対し phenobarbital 150 mg を投与し血清 bilirubin の消長をみた所, 有意の変動をみとめなかった. (Fig. 6.)

Table 2.

Comparison of Salicylamide load test and serum bilirubin concentration before and after administration of phenobarbital

case	before	administration		after	administration	
	G/T (%)	serum bilirubin (mg %)		G/T (%)	serum bilirubin (mg %)	
		total (direct)			total (direct)	
1. Y. S.	72	2.41	(0.72)	72	0.94	(0.56)
2. K. Y.	73	2.84	(0.71)	72	1.03	(0.38)
3. T. O.	77	3.48	(0.87)	75	0.89	(0.40)
4. T. A.	63	2.09	(0.37)	68	0.90	(0.50)
5. Y. T.	64	2.43	(0.96)	60	0.70	(0.32)
normal						
1. T. I.	72	0.68	(0.42)	75	0.60	(0.40)
2. M. T.	68	0.84	(0.50)	70	0.87	(0.50)

*abbreviations used :G/T, Salicylamide glucuronide to total salicylamide.

Fig. 5.
Bilirubin Load Test (Dubin-Johnson Syndrome)

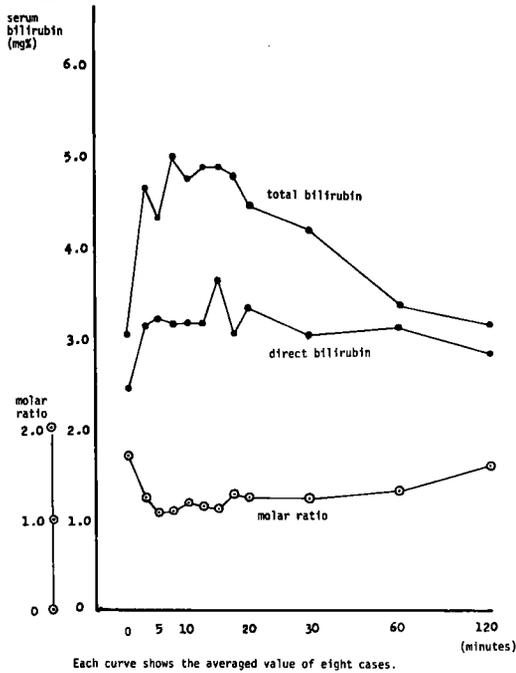
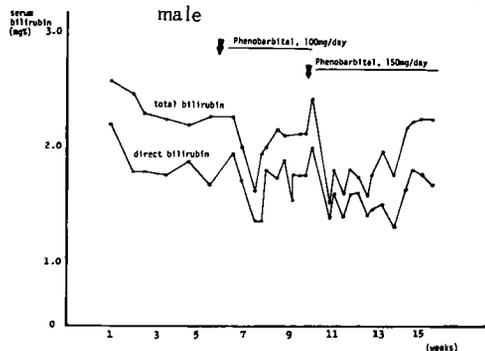


Fig. 6.
Course of serum bilirubin after phenobarbital administration (Dubin Johnson syndrome) 20 yrs, male



c) phenobarbital 投与下の bilirubin 負荷試験
Dubin-Johnson 症候群の一例に対して phenobarbital 投与下に bilirubin 負荷試験を行なった所、直接 bilirubin の変動は第一の peak を bilirubin 負荷後 3~5 分に、また、第二の peak を 12分30秒

に、さらに、25分後に、第三の peak をみとめ phenobarbital 投与前の直接 bilirubin の変動に比較すると多峰性変動が強調されている。また mol 比は投与前に比較してやや全体に上昇傾向をみとめるがその変動型式は不変であった。(Fig. 7.)

4. Rotor 症候群

Bilirubin 負荷試験の成績は Fig. 8. に示す如くで bilirubin 負荷前の総 bilirubin に対する直接 bilirubin の占有率は70%で、負荷前の mol 比は1.24 であった、負荷後総 bilirubin 値は30分で最高値に達しこの際の総 bilirubin 値に対する直接 bilirubin の占有率は87%であり120分での bilirubin 血中停滞率は5.4%であった。

5. 肝炎後過 bilirubin 血症

a) Bilirubin 負荷試験

3例の肝炎後過 bilirubin 血症についての bilirubin 負荷試験の成績は Fig. 9. に示す如くで、bilirubin 負荷前値は総 bilirubin 1.01~1.46 mg % (平均1.16 mg %) で、直接 bilirubin 値は0.48~1.4 mg % (平均0.74 mg %) で総 bilirubin に対する占有率は63%であり、mol 比は1.4~1.7 (平均1.5) であった。bilirubin 負荷後総 bilirubin 値は3例中2例では5分後に、残りの1例は7分30秒後に最高値2.96~3.80 mg % (平均3.36 mg %) に達し、この際の直接 bilirubin 値は0.74~2.80 mg % (平均1.73 mg %) で総 bilirubin に対する占有率は51%と低下し、mol 比は bilirubin 負荷後3分で最低値0.6~0.8 (平均0.7)を示し以後徐々に回復の傾向を示し、bilirubin 負荷後120分での mol 比は1.2~1.8 (平均1.5) と、正常の pattern と Gilbert 症候群の間の変動を示している。また bilirubin 負荷後120分での bilirubin 血中停滞率は10~14% (平均12.8%) であった。

b) 肝炎後過 bilirubin 血症に対する phenobarbital の影響

肝炎後過 bilirubin 血症の1例に対し phenobarbital を100mg/day 投与した際の血清 bilirubin の消長は Fig. 10. のごとくで、有意の血清 bilirubin 値の降下はみられなかった。

c) 肝炎後過 bilirubin 血症に対する phenobarbital 投与下の bilirubin 負荷試験

Phenobarbital 投与中の bilirubin 負荷試験は Fig. 11. の如く phenobarbital 投与前に比し、血清総、直接 bilirubin および mol 比は有意の変動を示さなかった。

6. 肝硬変症

Fig. 7. Bilirubin Load Test (Dubin Johnson syndrome) 20yrs. male.

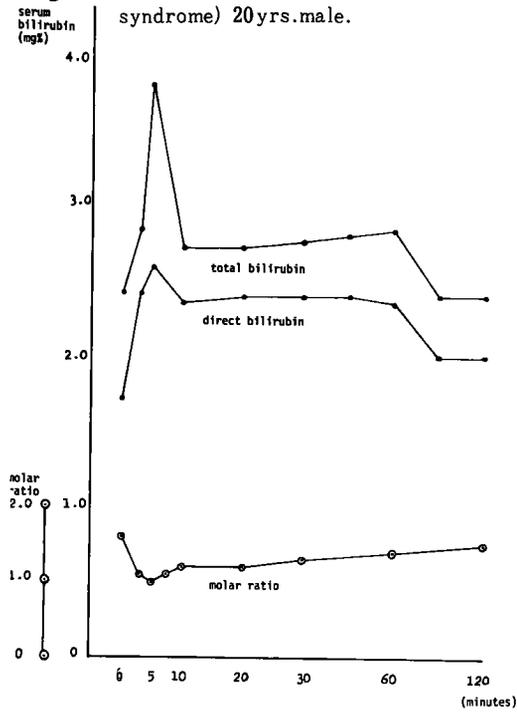


Fig. 8. Bilirubin Load Test (Rotor syndrome)

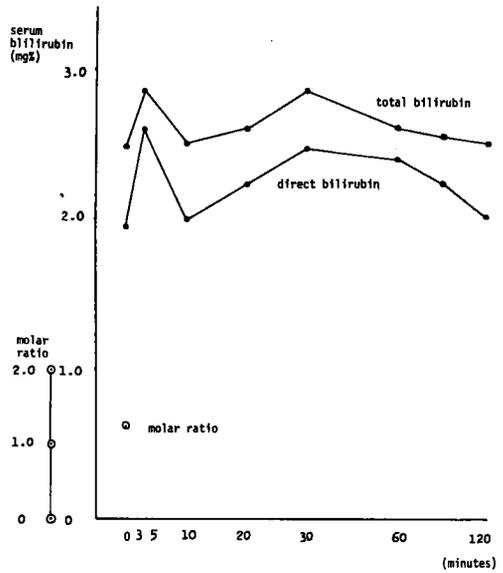


Fig. 7. Bilirubin Load Test (Dubin Johnson syndrome) 20yrs. male. after phenobarbital administration.

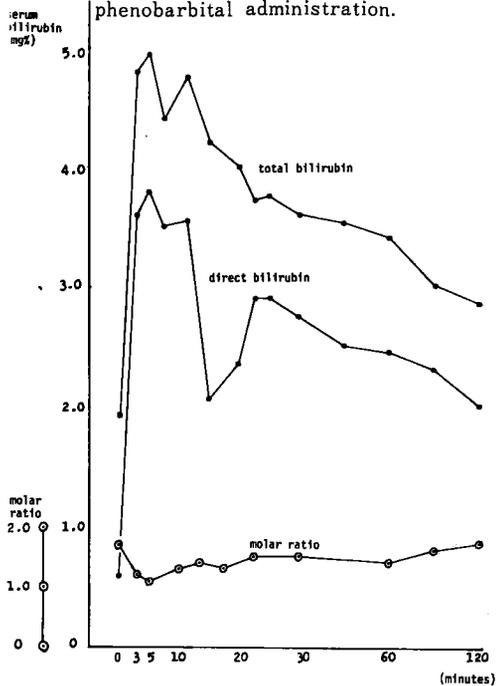
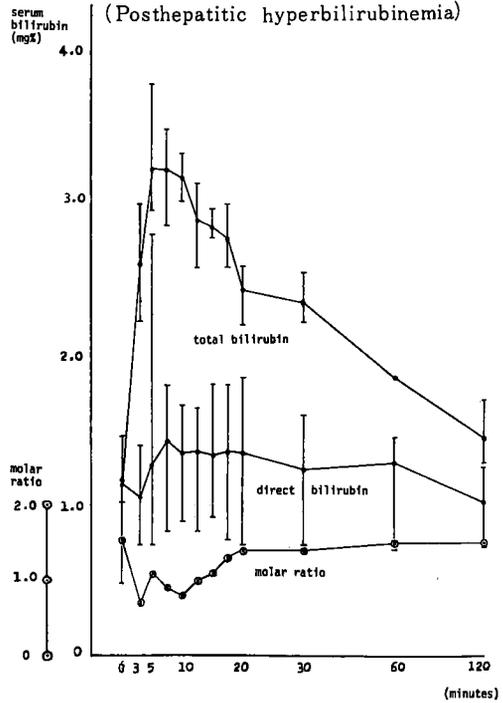


Fig. 9. Bilirubin Load Test (Posthepatic hyperbilirubinemia)



Each curve shows the averaged value of 3 cases.

Fig.10. Course of serum bilirubin after phenobarbital administration. (Posthepatic hyperbilirubinemia) 35 yrs. male.

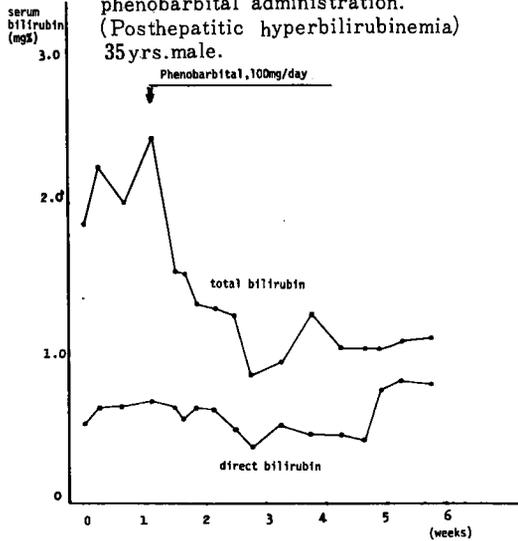


Fig.12. Bilirubin Load Test (Liver cirrhosis)

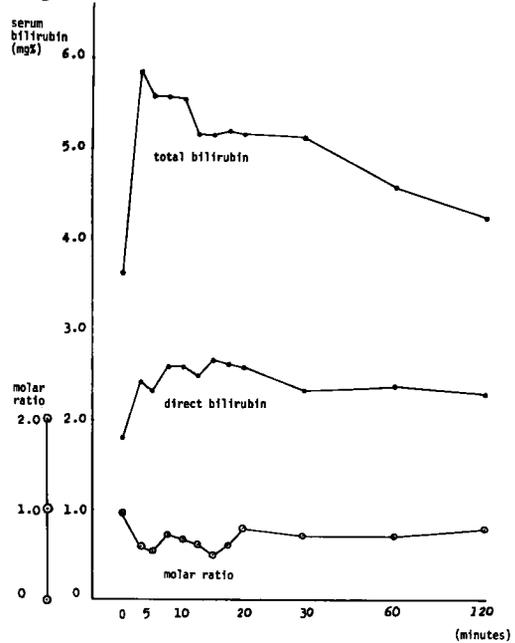
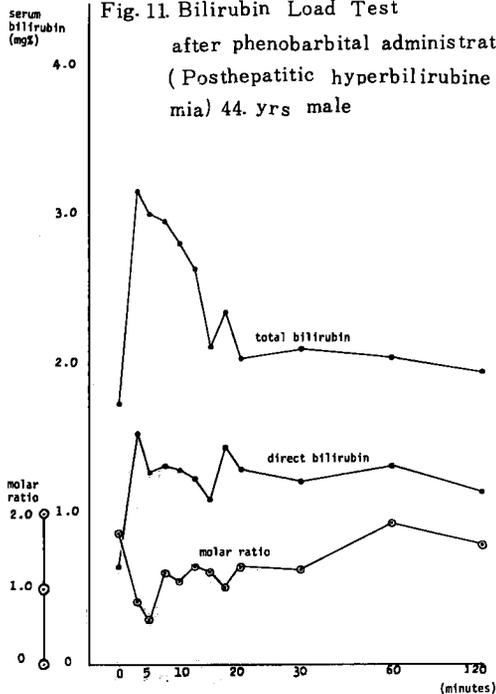


Fig.11. Bilirubin Load Test after phenobarbital administration (Posthepatic hyperbilirubinemia) 44 yrs male

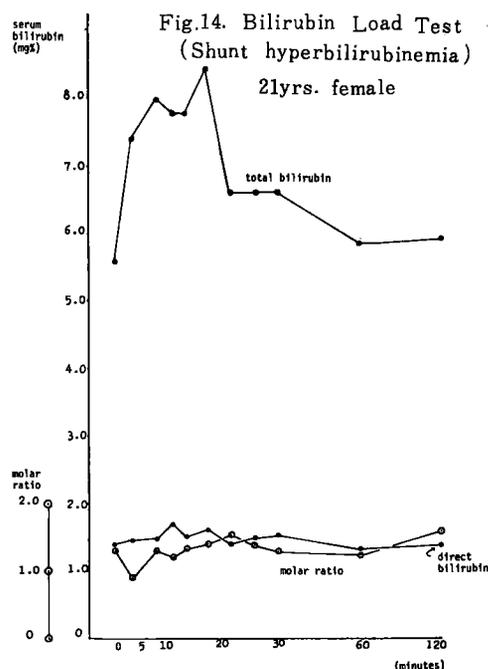
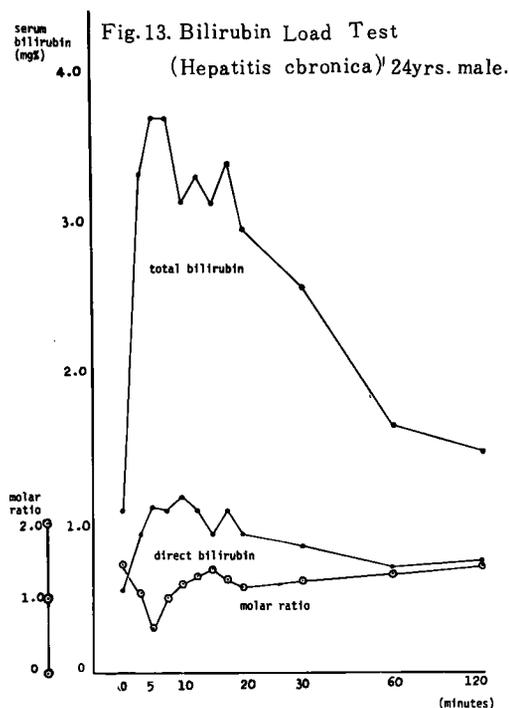


肝硬変症に対する bilirubin 負荷試験の成績は Fig.12. に示す如くで、bilirubin 負荷前の総 bilirubin は3.5mg%，直接 bilirubin は1.8mg%で総 bilirubin に対する直接 bilirubin の占有率は51%であり、mol 比は1.0と比較的低値を示し、bilirubin 負荷後3分で総 bilirubin は最高値5.8mg%を示した。この際の直接 bilirubin 値は2.4mg%で、mol 比は0.5と低値を示した。その後総 bilirubin は緩やかに低下し120分での血中停滞率は30%であった。また直接 bilirubin 値は bilirubin 負荷後7分30秒で2.5mg%と最高値をとり以後は緩やかな下降を示し120分後には2.2mg%を示した。また mol 比は低値を示し0.7以下をとった。

7. 慢性肝炎

慢性肝炎に対する bilirubin 負荷試験の成績は Fig.13. の如くで、bilirubin 負荷前の総 bilirubin 値は1.09mg%，直接 bilirubin 値は0.56mg%で、mol 比は1.4で、bilirubin 負荷前の総 bilirubin 値は5分後で最高値3.70mg%をとり、その際の直接 bilirubin 値は1.11mg%で、mol 比は0.6であった。その後総 bilirubin 値および直接 bilirubin 値は比較的速やかに前値への復元がみられ、総 bilirubin 値の120分での血中停滞率は17%とほぼ正常に近い

図-14



値を示した。また mol 比の復元も正常に近い pattern を示した。

8. Shunt Hyperbilirubinemia

Shunt hyperbilirubinemia の 1 例に対し bilirubin 負荷試験を行なった成績は Fig. 14. の如くで、bilirubin 負荷前値は総 bilirubin は 5.55 mg %, 直接 bilirubin 値は 1.44 mg % で mol 比は 1.4 であり bilirubin 負荷後 7 分 30 秒で総 bilirubin 値は最高値 7.95 mg % をとり、その際の直接 bilirubin 値は 1.49 mg % を示し mol 比は 1.3 であり、以後総 bilirubin 値は緩慢な下降を示し 120 分後の総 bilirubin 血中停滯率は 16.6 % であり mol 比は低値をよこばいした。

9. 臍 catheter 法による bilirubin 負荷試験

a) 肝炎後過 bilirubin 血症

肝炎後過 bilirubin 血症の 1 例に臍 catheter 法による bilirubin 負荷試験を行なった成績は Fig. 15. の如くで、門脈血での mol 比は負荷前 1.2, 5 分後 0.7 と末梢血と同様 bilirubin 負荷初期に降下がみられるが、肝静脈血の mol 比は負荷前 1.3, 5 分後 1.4

とむしろ負荷初期に上昇傾向をみとめた。

b) Dubin-Johnson 症候群

Dubin-Johnson 症候群の 1 例に臍 catheter 法による bilirubin 負荷試験の成績は Fig. 16. の如くで、門脈血での mol 比は負荷前 1.5, 5 分後 0.6 と負荷初期に降下がみられ、徐々に前値への回復傾向をみるが、肝静脈血の mol 比は負荷前 1.2, 負荷後 5 分では 1.7 とむしろ負荷初期に上昇の傾向がみられた。

10. Bilirubin 負荷後初期 mol 比の低下に関する検討

Bilirubin 負荷試験時 mol 比が負荷直後の 3 分, 5 分に負荷前値に比較して低下するが、この成因について 2, 3 検討した。

a) Eberlein 法による検討

Bilirubin 負荷前後の血清をもちい 2 例で検討した成績は Table 3. に示す如くで、間接 bilirubin は負荷後著明に増加し、Pigment II 分画は負荷前よ

Fig.15. Bilirubin Load Test by transumbilical catheter (Posthepatic Hyperbilirubinemia)

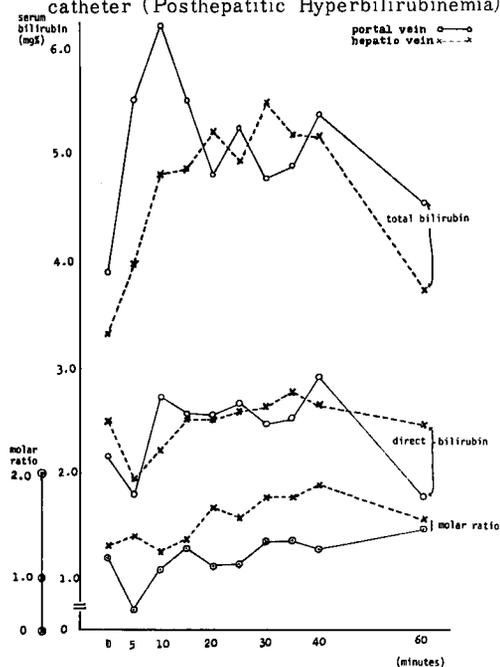
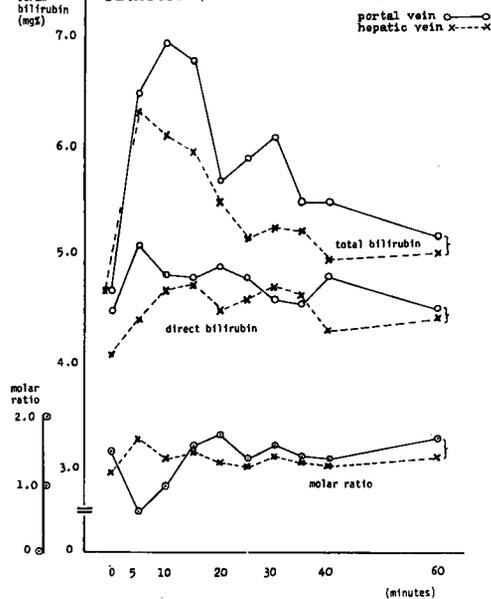


Fig.16. Bilirubin Load Test by transumbilical catheter (Dubin Johnson syndrome)



り負荷後3分で減少をみとめ、Pigment I 分画の上昇がみられた。

b) Alkali 安定型 bilirubin ならびに β -glucuronidase による bilirubin diglucuronide 分画の検討

Bilirubin 負荷前後の血清をもちい4例で検討し

た成績は Table 4. に示す如くで、3例に負荷後3分、5分ともに alkali 安定型 bilirubin の増加、他の1例では5分に増加がみられた。また高木²⁴⁾による β -glucuronidase をもちいた bilirubin glucuronide 遊離法による遊離型 bilirubin 量と、mol比と ester 型 bilirubin 濃度より得られた計算値とを比較すると負荷後3分、5分では計算値を大きく上回る遊離型 bilirubin がえられた。

Table 3. Bilirubin fraction in early depression of molar ratio (Eberlein's method)

No.	Time (min.) after bilirubin load	Pigment I (mg %)	Pigment II (mg %)	Indirect Bilirubin (mg %)	Total Bilirubin (mg %)
1.	before	0.08	0.25	0.48	0.81
	3	1.01	0.23	0.99	2.23
	5	0.76	0.15	1.08	1.99
2.	before	0.31	0.32	0.42	1.05
	3	0.84	0.03	1.43	2.30
	5	0.84	0.39	1.54	2.77

Table 4. Bilirubin fraction in early depression of molar ratio

No.	Time (min.)	Molar ratio	Ester-form bilirubin (mg %)	Alkali stable bilirubin (mg %)	free bilirubin liberated by B-G (mg %)	free bilirubin calculated from molar ratio (mg %)
1.	before	1.70	1.56	0.37	1.19	1.33
	3'	0.80	3.66	0.65	3.01	1.46
	5'	0.60	4.16	0.88	3.28	1.25
2.	before	0.55	1.80	0.43	1.37	0.49
	3'	0.35	4.70	1.60	3.10	0.82
	5'	0.23	5.60	1.25	4.35	0.64
3.	before	1.00	4.00	0.80	3.20	2.00
	3'	0.60	6.60	1.50	5.10	1.98
	5'	0.60	6.60	1.15	5.40	1.98
4.	before	1.88	3.00	0.75	2.25	2.82
	3'	1.12	4.40	0.46	3.94	2.46
	5'	1.69	5.80	1.14	4.66	4.90

* Abbreviation : B-G, β -glucuronidase.

考 察

Eilbott¹⁾ Bergman²⁾によりなされた bilirubin 負荷試験は単に血中停滯率を測定するにとどまり、これによって肝内 bilirubin 代謝の詳細を知ろうとする試みはなされなかった。血清 bilirubin は主として albumin と結合した型で存在することは諸家のみとめる所であり、これが肝細胞膜で bilirubin と蛋白質に分れ、再び特殊な蛋白³⁾と結合し滑面小胞体で抱合を受けた後、毛細胆管へ輸送され排泄される。この機転のうち、如何なる段階が障害されるかによって諸種の bilirubin 代謝異常が惹起される。Gilbert 症候群は肝細胞膜ならびに滑面小胞体中に位置する UDPG bilirubin glucuronyl transferase 活性の低下によるとされている⁴⁾したがって本疾患の場合 bilirubin 負荷試験を行なえば血清中に bilirubin の停滯がおこり且つ直接 bilirubin の生成は遅滯すると考えられる。このことは実験成績からも、負荷後の血清 bilirubin 停滯率、直接 bilirubin の低値および mol 比の低値横ばい現象として確認された。Dubin-Johnson 症候群では、bilirubin 負荷後間接 bilirubin および直接 bilirubin とも多峰性変動を示し、mol 比は早期に正常に近い値を示した。このことは本症候群では肝細胞間隙の拡大ともなう bilirubin の肝細胞と毛細胆管の循環による排泄遅延現象がみられるとの説を裏書きし、さらに本疾患では肝 UDPG bilirubin glucuronyl transferase

活性が正常であることも一致する。Rotor 症候群では負荷後の血中の bilirubin の最高値到達時間は30分と遅延したが120分の停滯率は正常であり、直接 bilirubin の比較的上昇、mol 比は正常域で Dubin-Johnson 症候群とは明らかに異なり、本症候群では肝内 bilirubin の輸送や肝細胞より毛細胆管への排泄障害があるとの説⁵⁾と矛盾しないと思われる。以上のように bilirubin 負荷試験を行ない間接 bilirubin、直接 bilirubin ならびに bilirubin (Ester型 bilirubin 分画) の mol 比を検討することにより先天性 bilirubin 代謝異常を示す3群は容易に鑑別しうるものと思われる。ところで Gilbert 症候群ときわめて類似する肝炎後過 bilirubin 血症では bilirubin 負荷試験では正常の pattern と Gilbert 症候群の中間の変動を示し phenobarbital 投与の影響では有意の血清 bilirubin 値の下降がみられないことから、肝炎後過 bilirubin 血症では肝細胞膜よりのとり込みの異常によると考えるべきであろう。肝硬変症黄疸例では血清 bilirubin 値は bilirubin 負荷後高度に停滯し、mol 比は低値のよこばいを示し、Gilbert 症候群とはほぼ同一の pattern を示した。このことは肝硬変症黄疸例で肝 UDPG bilirubin glucuronyl transferase 活性低下を示すとの所見⁶⁾と一致する。慢性肝炎の無黄疸例での bilirubin 負荷試験では bilirubin 血中停滯はみられず、mol 比は正常に近い変動を示した。また Israel、山本⁷⁾により提唱された Shunt Hyperbilirubinemia では

bilirubinの生成経路が従来とことなるとされているが、bilirubin負荷により血中bilirubinの排泄遅延と、mol比の低値横ばいがみとめられた。すなわちester型bilirubin分画および塩型bilirubin分画の増加はみられていない。その理由はつまびらかでない。次にbilirubin負荷後一時的にmol比の低下が認められたが、これはEberlein法でPigment Iが増加していること、alkali安定型のbilirubinの増加、また β -glucuronidaseをもちいると間接bilirubinの量が、mol比とester型bilirubin濃度よりえられた計算値を上廻ることより間接bilirubinとbilirubin diglucuronideとがmicelle様になり直接bilirubin分画中のester型bilirubin分画に影響をおよぼしたためmol比が低値を示したものと考えられた。次にbilirubin負荷時mol比が一過性に下降することについて、肝炎後過bilirubin血症、Dubin-Johnson症候群各1例に経臍静脈負荷を行ない、肝静脈血、門脈血中のmol比の消長を比較検討したところ、肝静脈血では下降をみず、すでに上昇傾向を示しており、末梢血ないし門脈血にみられる現象で、とくに特異的な現象とはみることができないであろう。なお1968年Catz, Yaffe³²⁾はphenobarbitalが肝UDPG bilirubin glucuronyl transferase活性を賦活することで、新生児黄疸でbilirubinの抱合を促進することを報告して以来Gilbert症候群に対しphenobarbital投与が有効であるとされており、血清bilirubin値が正常に復するのは肝microsome中のUDPG bilirubin glucuronyl transferase活性が誘起されるためと考えられているがこの酵素活性をphenobarbital投与前後で測定した結果では平均27.7%の上昇にすぎず、またsalicylamide抱合能もphenobarbital投与前後で有意の上昇がみられなかったことより、この酵素活性の上昇のみで血清bilirubin値の正常化を説明しうるかどうかには疑問がある。phenobarbital投与ではmicrosome中の諸酵素活性が誘起され、これが薬物代謝解毒機構に関与することも知られておりphenobarbitalがglucuron酸抱合以外の系において処理されることも十分考えられ、近藤ら³³⁾はphenobarbital投与中のGilbert症候群患者胆汁中よりbilirubinの還元物質であるmesobilirubin, dihydromesobilirubinを証明した。またOstrow³⁴⁾がGunn rat胆汁中に存在する黄色色素を検討しこれがbilirubinのphoto-oxidationによるdipyrrole物質であることを報告しており、近藤ら³³⁾もGilbert

症候群のphenobarbital投与中の胆汁中よりこのことを証明している。したがって、phenobarbital投与によるGilbert症候群のbilirubin代謝の正常化はUDPG glucuronyl transferase活性の上昇、microsome系の酸化、還元機構の亢進ならびにbilirubin結合蛋白の代謝への関与などによるものとおもわれる。

結 語

各種黄疸患者を対象にbilirubin負荷試験を行ない、従来のbilirubin排泄曲線に加え、小坂、原¹⁾のbilirubin3分画法を行ないester型bilirubin分画を分離しester型bilirubin分画に対するglucuron酸mol比を測定し黄疸発生機序を検討した。またGilbert症候群に対してはphenobarbital投与の血清bilirubin正常化の機序を検討し次の結論を得た。

1) Gilbert症候群ではbilirubin負荷後の総bilirubin血中停滞が著明で、直接bilirubin値はほとんど上昇せず、mol比は正常より低値を変動した。これはbilirubin glucuronyl transferase活性低下と一致する所見である。

2) Dubin-Johnson症候群ではbilirubin負荷後の総bilirubin血中停滞が著明であるが、直接bilirubinは高値を多峰性に変動し、mol比はほぼ正常範囲の変動を示した。これらの所見はbilirubinの肝細胞と毛細胆管の循環による排泄遅延現象と考えられる。

3) Rotor症候群ではbilirubin負荷後の総bilirubinの血中停滞の程度は著明でなく、直接bilirubinの上昇が認められるが、mol比は正常範囲であった。

4) 肝炎後過bilirubin血症ではbilirubin負荷後の総bilirubin排泄遅延は軽度で、直接bilirubin mol比は正常に近い変動を示した。

5) Gilbert症候群に対しphenobarbitalを投与すると血清bilirubinの正常化がみられ投与中止により再上昇がみとめられる。この際のbilirubin glucuronyl transferase活性の上昇がみられるが、この酵素活性の上昇のみでこの現象を説明できず、microsome系の酸化、還元機構の亢進ならびにbilirubin結合蛋白の代謝への関与などによるものと思われる。

謝 辞

稿を終るにあたり御校閲いただいた恩師小坂淳夫

教授、直接御指導いただいた近藤忠亮講師に衷心より感謝いたします。

文 献

- 1) Eilbot, W.: *Zschr. Klin. Med.* **106**:529, 1927.
- 2) von Bergman, G. und Eilbot, W.: *Zschr. Klin. Med.* **106**:592, 1927.
- 3) Soffer, L.J.: *Arch. Intern. Med.* **53**:808, 1934.
- 4) Ljung, O.: *Nord. Med.* **39**:1459, 1948.
- 5) Rosenthal, F.: *Ergeb. Chir.* **17**:308, 1924.
- 6) Fox, I.J., Brooker, L.G.S., Heselting, D.W. and Wood, E.H.: *Fed. Proc.* **16**:39, 1957.
- 7) With, T.H.: *Acta Med. Scand.* **116**:96, 1943.
- 8) Krueger, H. and Higginson, J.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **107**:43, 1961.
- 9) Tisdale, W.A., Klatskin, E.D. and Kinsella, E.D.: *Amer. J. Med.* **26**:214, 1959.
- 10) Billing, B.H., Maggiore, Q. and Carter, M.A.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **111**:319, 1963.
- 11) 原嘉之: *医学研究*, **22**:536, 1952.
- 12) Cole, P.G., Lathe, G.H. and Billing, B.H.: *Biochem. J.* **57**:514, 1954.
- 13) Schachter, D.: *J. Lab. and Clin. Med.* **53**:557, 1959.
- 14) Eberlein, W.R.: *Pediatrics* **25**:878, 1960.
- 15) 山岡憲二: *日内会誌*, **42**:531, 1953.
- 16) 小坂淳夫: *東京医事新誌*, **66**:14, 1951.
- 17) Arias, I.M. and London, I.M.: *Science* **126**:563, 1957.
- 18) Remmer, H.: *Dtsch med. Wschr.* **92**:2001, 1967.
- 19) Yaffe, S.J., Levy, G., Matsuzawa, T. and Baliah, T.: *New Engl. J. Med.* **275**:1461, 1966.
- 20) Schmid, R.; Bouchier, I.A.D. and Billing, B.H. *Bilirubin metabolism* P 39, 1967.
Blackwell Sci. Pub. Oxford and Edinburgh.
- 21) Jendrassik, L. and Cleghorn, R.A.: *Biochem Zschr.* **289**:1, 1937.
- 22) 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* P 5, 1958.
- 23) 河原田裕幸: *医学研究*, **37**:188, 1967.
- 24) 高木明一郎: *医学研究*, **39**:265, 1969.
- 25) Taketa, K.: *Acta Med. Okayama*, **16**:129, 1962.
- 26) Taketa, K.: *Acta Med. Okayama*, **16**:71, 1962.
- 27) Levi, A.J., Gatmaitan, Z., and Arias, I.M.: *J. Clin. Invest.* **48**:2156, 1969.
- 28) Arias, I.M., Gartner, L.M., Cohen, M., Ezzer, J.B. and Levi, A.J.: *Amer. J. Med.* **47**:395, 1969.
- 29) 小林敏成: *肝臓*, **12**:157, 1971.
- 30) Taketa, K.: *Acta Med. Okayama*, **16**:115, 1962.
- 31) Israels, L.G., Yamamoto, T., Skanderberg, J. and Ziprusky, A.: *Science.* **139**:1054, 1963.
- 32) Catz, C. and Yaffe, S.J.: *Pediat. Res.* **2**:361, 1968.
- 33) 近藤忠亮・井沢徹一・山本武彦: *日消誌*, **67**:874, 1970.
- 34) Ostrow, J.D. and Branham, R.V.: *Gastroenterology.* **58**:15, 1970.

Studies on bile pigment**Part 1. Studies on bilirubin load test in constitutional jaundice.**

First department of internal medicine, Okayama university medical school.

(Director: Kiyowo Kosaka)

Tetsuichi Izawa

Bilirubin load test was performed to differentiate hyperbilirubinemia in various liver diseases. For this purpose, bilirubin excretion pattern, serum direct and indirect bilirubins, and the molar ratio of glucuronic acid to bilirubin in the ester-form bilirubin fraction separated by Kosaka and Hera's method were investigated. Phenobarbital was effective to decrease serum bilirubin in Gilbert's syndrome, so this phenomena was investigated from the point of bilirubin metabolism. The following results were obtained:

1) Serum total bilirubin markedly elevated after bilirubin loading in Gilbert's syndrome, and direct bilirubin was increased significantly, and the molar ratio of glucuronic acid to bilirubin was lower than normal, which was coincided with the low activity of UDPGA bilirubin glucuronyl transferase in liver tissue.

2) Serum total bilirubin after bilirubin loading in Dubin-Johnson syndrome showed high retention, and many peaks were observed in direct bilirubin, which showed high value. Molar ratio fluctuated in normal range.

These findings support the prolonged excretion of serum bilirubin in this disease due to the bilirubin circulation from liver cell to microbili.

3) In Rotor syndrome, retention of serum total bilirubin after bilirubin loading was not so high, and serum direct bilirubin increased and the molar ratio was in normal range.

4) Excretion of serum bilirubin slightly delayed in posthepatic hyperbilirubinemia after bilirubin loading, and serum direct bilirubin and molar ratio showed normal pattern.

5) Phenobarbital administration in Gilbert's syndrome was effective to decrease serum bilirubin, and serum bilirubin increased after stopping the drug administration.

This phenomenon was not only elucidated by the induction of UDPGA bilirubin glucuronyl transferase activity, but the activation of oxidative and redox state of microsomal enzyme system and the normalization of liver cell membrane would be participated in the normalization of serum bilirubin.