

# Gunn rat (Hetero) の胆汁中非 bilirubin-diazo 反応陽性分画

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂 淳夫 教授)

近藤 忠亮・広畑 衛

瀬尾 憲司・渡部 寛

(昭和50年4月25日受稿)

Bilirubin が肝臓より胆汁中に排泄されるには肝細胞で glucuron 酸などと抱合されることが必要とされている<sup>1)</sup>

この抱合機転が障害されれば、その他の機序により bilirubin を胆汁や尿に排泄させることが必要となる。その一つに bilirubin が水溶性の dipyrrolyl 物質となって胆汁中へ排泄される経路があることが報告されている<sup>2)</sup>

ところでこの水溶性の dipyrrolyl 物質には Ehrlich 氏 diazo 反応陽性物質が含まれていることが知られているので、著者は先天的に bilirubin 抱合酵素の活性が低いことが知られている hetero の Gunn rat を用いて、bilirubin 抱合機能低下時に胆汁中に非 bilirubin-diazo 反応陽性分画が、どの程度に存在するか、またこの分画と bilirubin の glucuron 酸抱合能との関連についても検討した。

## 実験動物と方法

実験動物は Wister 系 rat と Gunn rat (hetero) とを使用した。

胆汁採取は実験当日絶食にさせた rat をエーテル麻酔下に腹部正中線上で開腹し、胆管にポリエチレン管を挿入して外胆汁瘻を作成し、胆汁の排泄状態が良好であること、エーテル麻酔より回復したことを確認したのちに行ない、8時間まで採取した。

非 bilirubin 分画抽出法: 胆汁に同量の 0.1N NaOH を加えたのち室温下暗所に30分間放置し、塩酸を添加して pH 2.0 とし、chloroform 50 ml を加え分液漏斗で十分に振盪したのち、chloroform 相を流下させ、再び chloroform 50 ml を加えて抽出後、流下させたのちの水層を Ostrow<sup>3)</sup> にならない硫酸塩析後 n-butanol 10 ml に抽出し下層の水層を除去し、えら

れた butanol 層に4倍量の石油エーテルを加えて振盪したのち蒸留水 5 ml を加えて十分振盪し、静置して水層に抽出される黄色色素を非 bilirubin 分画とした。なお azo 色素の調製、ならびに測定には、上記によりえられた水溶液 4 ml に Ehrlich 氏 diazo 試薬 1 ml を加え15分以上放置することにより azo 色素を生成させ、光電比色計日立101型を用い波長 540 m $\mu$  で測定した。

胆汁 bilirubin 測定: 胆汁を生理的食塩水で10倍に稀釈し、その 1 ml をとり、これに Ehrlich 氏 diazo 試薬 0.5 ml を加え20分放置後 2.5% ナカ液 0.5 ml、ついで蒸留水 3.0 ml を添加したものを前記光電比色計で波長 540 m $\mu$  で測定した。

Bilirubin 3分画の分画分離: 小坂・原の方法により、胆汁に chloroform を加えて間接 bilirubin 分画を抽出し、さらに 0.1N 塩酸で弱酸性とした後、塩型 bilirubin 分画を chloroform 抽出し、上清を methanol 抽出したものを ester 型 bilirubin とした。glucuron 酸測定は NaBH<sub>4</sub> を用いた石館らの方法<sup>4)</sup> で測定した。bilirubin・glucuron 酸 mol 比は ester 型 bilirubin 分画について bilirubin の分子量 585、glucuron 酸 196 として mol 比の形で求めた (以下 mol 比と略)。

Pentdyopent 反応: 検体水溶液 3 ml に 2N NaOH および Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 5 mg を加えて沸騰水中で5分間加熱したのちただちに流水で冷却した。赤桃色を示すものを陽性とした。

## 実験成績

1. 非 bilirubin diazo 反応陽性分画の性状

吸光曲線: 水溶液 (pH 2.4) での吸光曲線は図 1 で、545~555 m $\mu$  に吸光極大が認められた。非 bili-

図1 Absorption spectra of non-bilirubin diazo-positive fraction.

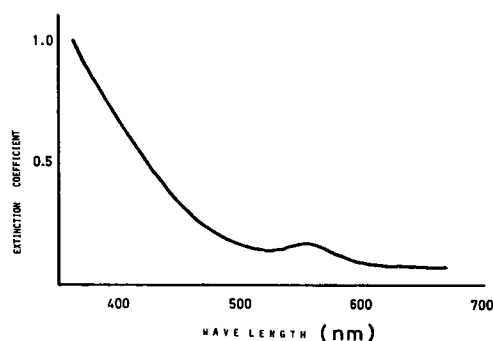


図2 Relation between molar ratio of glucuronic acid to bilirubin (M. R.) and percentage of non-bilirubin diazo-positive fraction to total bile azo-pigments (NBAPF).

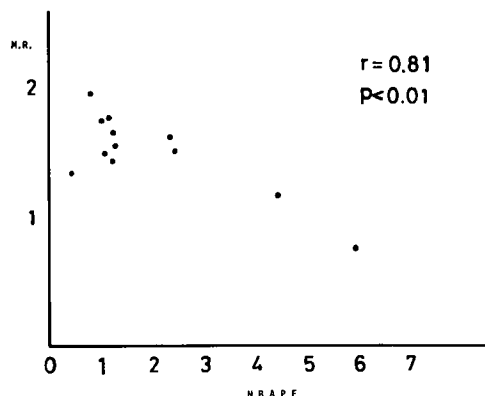


Table 1. Percentage of non-bilirubin diazo-positive fraction to total bile azo-pigments (NBAPF/TBAP), molar ratio of glucuronic acid to bilirubin (M. R.) and bile bilirubin concentration (B. C.).

Wister strain rat				Gunn rat (Hetero)			
No.	NBAPF/TBAP(%)	M. R.	B. C. (mg %)	No.	NBAPF/TBAP(%)	M. R.	B. C. (mg %)
1.	1.07	1.48	17.10	1.	1.00	1.74	6.98
2.	1.23	1.42	9.80	2.	1.49	—	11.35
3.	1.23	1.64	13.64	3.	1.28	1.54	10.44
4.	0.43	1.33	5.73	4.	1.15	1.76	10.63
5.	0.76	1.94	12.19	5.	2.41	1.50	8.00
				6.	4.41	1.16	8.73
				7.	2.33	1.61	10.17
				8.	5.93	0.75	9.99
average	0.944	1.562	11.692	average	2.50	1.437	9.536

rubin 分画の pentdyopent 反応は陽性であった。

2. 非 bilirubin diazo 反応陽性分画の総胆汁 diazo 反応陽性色素に対する百分率 (以下占有率)。

表1のごとく Wister 系 rat 群では占有率は0.43~1.23%平均0.94%で, Gunn rat (hetero)群では1.00~5.93%平均2.50%であった。両群の平均値では後者が高値を示したが有意の差は認められなかった。

3. 占有率と bilirubin glucuron 酸 mol 比。

両者の関係を示したのが図2で相関係数は0.81, 危険率1%以下で有意の相関が認められた。

4. 胆汁中 bilirubin 濃度と mol 比, 占有率。

表1にみられるごとく胆汁中 bilirubin 濃度と mol 比との間には一定の関係はみられず, また胆汁中 bilirubin 濃度と占有率の間にも一定の関係はみられなかった。

## 考 案

新生児黄疸の光療法<sup>2)</sup>では bilirubin が数種の dipyrrolyl 物質となり胆汁や尿に排泄されることが知られているが, そのすべてが Ehrlich 氏 diazo 試薬に反応して azo 色素を生成するわけではなく陰性のもも存在する<sup>3)</sup>ここでは胆汁中の bilirubin 測定に diazo 試薬を用いる場合にどの程度 bilirubin 以外のものが陽性反応を示すかをまずその比 (占有率と呼ぶ) を求め検討した。Wister 系 rat では占有率は1%前後で, Gunn rat のそれは平均2.5%であったが, その成績には大きなばらつきがあるため前者に比較して有意とは断定されなかった。そこで bilirubin の主たる抱合である glucuron 酸抱合能を知る示標として著者らは mol 比を求め, それと上述の

占有率との関係を検討してみると、両者の間にはよい相関々係があり、bilirubin の glucuron 酸抱合能が低下するほど占有率が高いことが認められた。一方胆汁中 bilirubin 濃度と mol 比、占有率との間には一定した関係が認められなかったことより、胆汁中に排泄される抱合型 bilirubin 量の低下にもとづく見掛け上の増加ではなく従来より知られている肝細胞障害時の硫酸抱合、磷酸抱合<sup>6)</sup>などと同様にこの非 bilirubin diazo 反応陽性物質の排泄が亢進していることが分る。ところで、Gunn rat (homo) では胆汁中には抱合型 bilirubin はないか、あっても微量であることが知られていて非 bilirubin 黄色物質が主とされている。この黄色物質は Ostrow ら<sup>3)</sup>により bilirubin の光分解産物と性状がきわめて類似することが認められている。著者らの非 bilirubin 分画の azo 色素の吸光曲線と極大は Ostrow らの成績と一致しており、pentdyopent 反応陽性であることより dipyrnyl 物質と考えられた。すなわち、bilirubin の glucuron 酸抱合能の低下した場合には胆汁中には bilirubin より分解した水溶性の dipyrnyl 物質の生成の亢進がみられるものと考えられた。

## 結 論

胆汁中の非 bilirubin 分画を分画分離して Ehrlich 氏 diazo 試薬で azo 色素を作成し、この分画の胆汁中総 azo 色素に占める割合 (占有率) と bilirubin の glucuron 酸抱合能との関係を検討し次の結果をえた。

(1) Wister 系 rat の占有率は平均 0.94%、Gunn rat (hetero) では平均 2.50% で後者が前者より高値を示したがその測定値にばらつきがあり有意ではなかった。

(2) 占有率と bilirubin・glucuron 酸 mol 比との間にはよい相関関係が認められた。(r=0.81, P < 0.01)

(3) 胆汁中 bilirubin 濃度と mol 比、占有率との間には一定の関係は認められなかった。

(4) 以上のことより bilirubin 抱合障害時には他種抱合機転の代償的亢進とともに bilirubin が dipyrnyl 物質となって排泄される経路が亢進することが認められた。

## 文 献

- 1) 近藤忠亮：胆汁色素の腸肝循環，代謝，10：812—819，1973。
- 2) 大西鐘寿・山川毅：新生児黄疸の光療法におけるビリルビン代謝，日小会誌，74：159—171，1970。
- 3) Bouchier, I. A. D. and Billing, B. H.: Bilirubin metabolism. Blackwell Scientific Publications, Oxford and New York, 1967, PP. 117—127.
- 4) 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，5—7，1958。
- 5) Gray, C. H., Kulczycka, A. and Nicholson, D. C.: The photodecomposition of bilirubin and other bile pigments. J. Chem. Soc. (Perkin), 3：288—294，1972。
- 6) 河合利夫：直接 bilirubin に関する研究，岡山医会誌，84：321—330，331—339，1972。

**Studies on non-bilirubin fraction showing positive diazo-reaction in  
heterozygote Gunn rat bile.**

**Tadasuke Kondo, Mamoru Hirohata, Kenji Seo and Yutaka Watanabe.**

The first department of internal medicine, Okayama university medical school.

(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

Non-bilirubin fraction was extracted from the bile obtained from Wister strain rats and heterozygote Gunn rats, and separated by Ostrow's method with minor modification. Azo-pigments were prepared with the non-bilirubin fraction after addition of Ehrlich's diazo reagent. Significance of non-bilirubin fraction showing positive diazo reaction (NBAPF) was studied on the basis of the relation between the percentage of NBAPF to total bile azo pigments (proportion of NBAPF) and molar ratio of glucuronic acid to the ester-form bilirubin. The following results were obtained ;

1) Averaged proportions of NBAPF were 0.94% in Wister strain rats and 2.50% in heterozygote Gunn rats, respectively. The latter proportion was higher than the former but not significant due to the wide variation of the measured values of the latter group.

2) Good correlation between the proportion of NBAPF and the molar ratio of glucuronic acid to the ester-form bilirubin was observed.

3) No significant correlation was observed between the bilirubin concentration in the bile and the molar ratio of glucuronic acid to the ester-form bilirubin or the proportion of NBAPF.

4) These results suggest when the conjugation of bilirubin and glucuronic acid in the liver was impaired, both the excretion of dipyrrolyl substance yielded from bilirubin and other conjugation mechanism increase compensatory.