

# 胆汁 bilirubin に関する研究

## 第 1 編

### 塩型 bilirubin の胆汁への排泄

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂淳夫教授）

三 好 莞 爾

（昭和50年9月3日受稿）

#### 緒 言

血清中には直接 bilirubin と間接 bilirubin が存在することが知られており、生体内直接 bilirubin には小坂<sup>1)</sup>らによれば、ester 型 bilirubin と塩型 bilirubin が存在するという。そのうち、塩型 bilirubin については塩酸酸性下で chloroform に移行して間接 bilirubin となること、生体内で体液が alkali 性に傾くと比較的な増加が認められること<sup>2)</sup>、bilirubin-Na 塩と吸光曲線の上で相似していること<sup>3)</sup>などが知られているほか、肝疾患時には塩型 bilirubin 分画が glucuron 酸配合型の代償として増加を示さないことなどから<sup>4)5)</sup>、塩型 bilirubin の生体内の意義づけについては不明である。そこで胆汁中の塩型 bilirubin を検索することにより、その生理的な意義を明らかにしようとして試みた。

#### 実験動物

Wister 系雄性 rat 200~300g を一群 5 匹とした。また英国 Royal Free Hospital の Billing 博士より供用された雄性の Gunn rat (hetero & homo) 200~300g 5 匹を使用した。実験当日は絶食させた。

#### 実験材料と方法

##### 1. 塩型 bilirubin 精製法

近藤の方法により、十二指腸ゾンデにより採取した人胆汁に硫酸を加えて飽和したのち濾紙に附着する残渣を methanol で抽出した。この methanol 溶液を減圧して乾固した後、水溶液とし近藤<sup>6)</sup>の方法により、イオン交換樹脂 Amberlite IR-4 B column を通した後の流下液を Amberlite IRC 50 column に加えて column に吸着させたのち、1% NaCl 100ml、次いで蒸留水で充分水洗し黄色々素の流下しないこ

とをたしかめたのち ethanol で溶出される分画を減圧乾固したものを塩型 bilirubin とした。

##### 2. 胆汁採取法

Wister 系 rat または Gunn rat を実験当日絶食させ、ether 麻酔下、腹部正中線上で開腹したのち polyethylene 管（イガラシ医科工業製 No.10）を胆管に挿入することにより外胆管胆汁ろうを作成した。胆汁流出の状態が良好なこと、麻酔の影響がないことを確めたのち、1時間までの採取胆汁を対照とし、生理的食塩水で 10mg% 以上の濃度になるように溶解した上記の塩型 bilirubin 水溶液 1ml を rat 尾静脈より注入し、注入後 2 時間間隔で 8 時間まで胆汁を分割採取した。

##### 3. 胆汁 bilirubin 分画法

小坂・原<sup>7)</sup>の chloroform を用いた bilirubin 3 分画法により bilirubin を分画分離した。すなわち胆汁 1ml に chloroform を加えかくはん後、3000 回転で 5 分間遠沈し、分離 chloroform 分画を間接 bilirubin、その上清に等量の 1/10N HCl を加えたのち chloroform 2ml を添加しかくはん後遠沈して分離した chloroform 分画を塩型 bilirubin とし、その上層部分を硫酸塩析したのち methanol に抽出したものを ester 型 bilirubin 分画として測定した。

##### 4. Bilirubin 定量法

胆汁中の bilirubin の測定は、教室山本の方法<sup>8)</sup>により測定した。chloroform 抽出分画中の bilirubin は chloroform 1ml に methanol 3.5ml を加えて azo 色素とした後測定した。

##### 5. 塩型 bilirubin 排泄率の算出法

塩型 bilirubin 負荷前の胆汁中の塩型 bilirubin の濃度と 2 時間の胆汁量より基礎排泄量を求め、負荷

後各2時間の分画の胆汁量と塩型 bilirubin 濃度より求めた塩型 bilirubin 量より基礎排泄量を減ずることにより排泄塩型 bilirubin 量を求めた。ついでこの排泄塩型 bilirubin 量を負荷量で除し、これを排泄率とした。

#### 6. 薄層 chromatography

20×20cmの薄層 chromatography 用のガラス板に Kieselgel G nach Stahl. Art.No.7731を厚さ0.5~1mmに附着させたものを固定相として用い展開は一次元上昇法によった。試料は塩型 bilirubin を rat に負荷した後に採取した胆汁を小坂・原の方法を胆汁に応用した高木<sup>9)</sup>の方法により硫酸塩析後 methanol で抽出し減圧乾固したものをを用いた。すなわち原点より5mm以内に試料を附着させ、室温(10~20℃)で15cm以上展開させた。展開溶媒系としては n-butanol-ethanol-水(4:1:2v/v)を使用した。また各 spot についての同定は methanol 抽出を行ったものについて行った。

#### 7. 定性試験

Ehrlich 氏 diazo 反応, Gmelin 反応, Ehrlich 氏 aldehyde 反応, Schlesinger 反応を行い前2者陽

性のものを bilirubin とした。

#### 実験結果

##### 1. 分離塩型 bilirubin の性状

分離した塩型 bilirubin は水溶性で, Ehrlich 氏 diazo 反応直接陽性, Gmelin 反応陽性で, Ehrlich 氏 aldehyde 反応陰性, Schlesinger 反応陰性であった。その水溶液の吸光曲線の極大は pH3.6で400~430m $\mu$ にあり, 塩型 bilirubin-azo 色素(pH1.4)の吸光極大は555~560m $\mu$ , 酸性 azo 色素(pH1.0)の吸光曲線の極大は560~565m $\mu$ であった。(図1)

##### 2. 塩型 bilirubin 負荷後の胆汁中 bilirubin の吸光極大

塩型 bilirubin 負荷後2時間までの Wister 系 rat の胆汁の吸光曲線は図2でその吸光極大は400~430m $\mu$ であった。ついで同量の1/10NHClを加え塩酸酸性化後 chloroform で抽出した残りの水層についての吸収曲線は400~420m $\mu$ の吸光極大は殆んど消失した。

##### 3. 塩型 bilirubin 負荷後の胆汁中 bilirubin の薄層 chromatography

塩型 bilirubin 負荷後2時間まで採取した Wister

Fig1 Absorption Spectra of Salt-form Bilirubin and Azo-Pigment

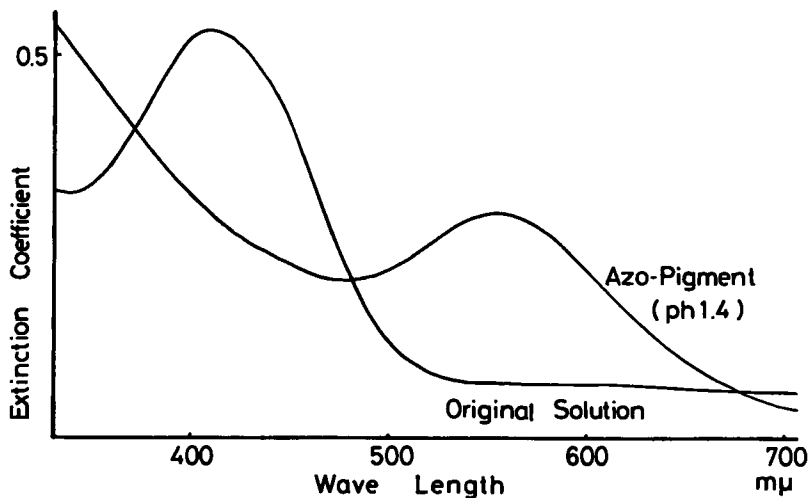


Fig 2 Absorption Spectra of Rat Bile after Salt- form Bilirubin Loading and of Aqueous Phase after extracted with Chloroform from acidified Bile.

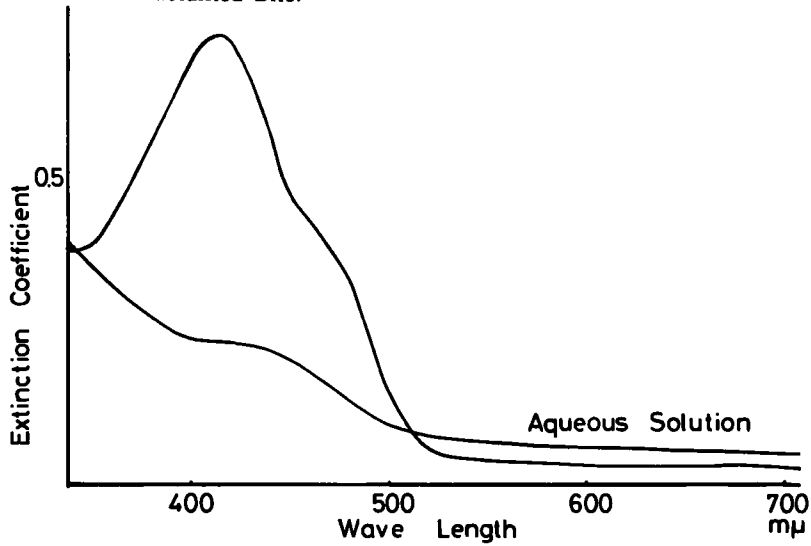
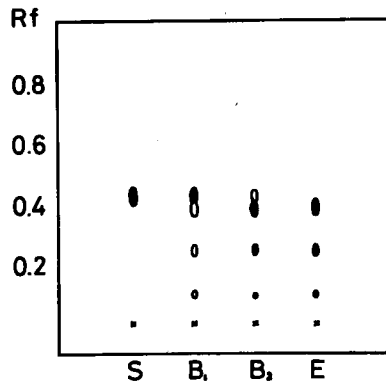


Fig 3 Schematic Representation of Thin- Layer Chromatography.

Fixed Phase : Kieselgel G Art 7731  
 Developing Solvent : BuOH EtOH H<sub>2</sub>O  
 ( 4 : 1 : 2 )  
 Run : 15 cm



S : Salt form Bilirubin  
 B<sub>1</sub> : Methanolic Extract of Bile collected from 0 to 2 hrs  
 B<sub>2</sub> : ibid ( from 2 to 4 hrs )  
 E : Ester-form Bilirubin

系 rat の胆汁を硫酸塩析後 methanol で抽出し減圧乾固したものと、負荷した塩型 bilirubin および精製した ester 型 bilirubin とをそれぞれ試料として薄層 chromatography を行ない、展開 spot の Rf 値で比較すると図 3 の如くで、負荷後 2 時間までの胆汁より抽出した bilirubin の薄層 chromatogram では Rf 0.42±0.03, 0.38±0.03, 0.24±0.03, 0.10±0.03 の 4 spot がみられ、濃度では第 1 spot が一番濃かった。塩型 bilirubin 負荷後 2~4 時間までに採取した胆汁より抽出した bilirubin を試料とした場合でも同じく 4 spot がえられ、第 1 spot が一番濃かったが、負荷後 2 時間の場合よりも、他の 3 spot に比較してやや薄かった。また第 1 spot は塩型bili-

rubin の Rf 値に、また第 2~4 spot は ester 型 bilirubin の Rf 値に一致した。次に第 1 spot を methanol で抽出し、減圧乾固したのち水溶液とし、pH 3.6 で吸光曲線を描くと、その吸光極大は 400~430 m $\mu$  にみとめられ、また N/10HCl で弱酸性とすると、容易に chloroform 層に移行し、塩型 bilirubin の性状を示した。

#### 4. 塩型 bilirubin を負荷した後の胆汁中への同 bilirubin の排泄

a) Wister 系 rat : 塩型 bilirubin 負荷後胆汁中に排泄される塩型 bilirubin の排泄率を経時的に求めると表 1 の如く、負荷後 8 時間までの排泄率は 53.78~87.90% 平均 64.62% であり、その内訳は負荷後 2

Table 1. Percentage of excreted salt-form bilirubin into bile after loading of salt-form bilirubin. (Wister strain rat)

Hours	0-2	2-4	4-6	6-8	Total	Amount of loading salt-form bilirubin (mcg)
Case No. 1.	29.85%	12.43%	11.16%	2.34%	55.78%	145.2
2.	31.80	23.32	16.81	15.97	87.90	135.2
3.	22.00	12.38	11.61	11.19	57.18	171.2
4.	25.84	14.60	13.09	9.28	62.81	171.2
5.	29.22	19.74	7.71	2.77	59.44	197.6
Average	27.74	16.49	12.08	8.31	64.62	

Table 2. Percentage of excreted salt-form bilirubin into bile after loading of salt-form bilirubin. (Heterozygote and homozygote Gunn rat)

Hours	0-2	2-4	4-6	6-8	Total	Amount of loading salt-form bilirubin (mcg)
Case No. 1.	24.00%	12.45%	8.17%	5.46%	50.08%	97.6
2.	24.69	15.84	7.21	6.82	54.56	97.6
3.	34.31	14.98	10.68	5.21	68.18	137.9
4.	23.44	12.47	10.51	8.68	55.10	111.7
5.	18.84	10.56	8.21	5.56	44.17	153.6
Average	25.05	13.26	9.95	6.54	53.81	

時間までの排泄率は平均 27.74%、負荷後 2~4 時間で平均 16.49%、負荷後 4~6 時間で平均 12.08%、負荷後 6~8 時間で平均 8.31% であった。また負荷後 2 時間までの排泄量は負荷後 8 時間までの排泄量の平均 42.9% であった。

b) Gunn rat : 表 2 の如く、負荷後 8 時間までの胆汁中への排泄率は 44.17~65.18% 平均 53.81% で、その内訳は、負荷後 2 時間までは平均 25.05%、負荷後 2~4 時間で平均 13.26%、負荷後 4~6 時間で

平均 9.95%、負荷後 6~8 時間で平均 6.54% であった。また負荷後 2 時間までの排泄量は負荷後 8 時間までの排泄量の平均 46.5% であった。

#### 5. 塩型 bilirubin 負荷後の胆汁中間接 bilirubin と ester 型 bilirubin 濃度

a) Wister 型 rat : 塩型 bilirubin 負荷前後の胆汁中の中間接 bilirubin の濃度の変動は表 3 に示す如く、負荷前 1.14~2.58mg%、平均 1.39mg% で、負荷後 2 時間まで平均 2.69mg%、2~4 時間平均 3.64mg

Table 3. Concentration of excreted indirect bilirubin into bile after loading of salt-form bilirubin. (Wister strain rat)

Hours	Before	0 - 2	2 - 4	4 - 6	6 - 8
Case No. 1.	1.52 mg%	3.03 mg%	3.31 mg%	2.96 mg%	1.41 mg%
2.	1.42	2.97	3.27	4.60	1.40
3.	2.58	3.93	5.84	4.94	2.74
4.	1.44	1.84	2.74	1.51	1.03
5.	1.14	1.47	3.07	2.95	1.84
Average	1.39	2.69	3.64	3.39	1.68

Table 4. Concentration of excreted ester-form bilirubin into bile after loading of salt-form bilirubin. (Wister strain rat)

Hours	Before	0 - 2	2 - 4	4 - 6	6 - 8
Case No. 1.	15.16 mg%	18.62 mg%	18.20 mg%	20.88 mg%	19.05 mg%
2.	17.99	14.60	20.93	28.80	22.37
3.	16.49	16.30	26.71	22.37	15.05
4.	16.82	20.66	19.78	21.07	14.89
5.	19.20	16.95	21.10	18.56	16.08
Average	17.13	17.42	21.34	22.33	17.48

Table 5. Concentration of excreted indirect bilirubin into bile after loading of salt-form bilirubin. (Heterozygote and homozygote Gunn rat)

Hours	Before	0 - 2	2 - 4	4 - 6	6 - 8
Case No. 1.	0.37 mg%	0.93 mg%	1.54 mg%	0.61 mg%	0.71 mg%
2.	0.46	0.87	0.71	0.71	0.56
3.	0.78	0.49	0.88	0.99	0.52
4.	0.35	0.29	0.26	0.51	0.29
5.	0.47	0.77	0.63	0.96	0.52
Average	0.49	0.67	0.80	0.76	0.52

Table 6. Concentration of excreted ester-form bilirubin into bile after loading of salt-form bilirubin. (Heterozygote and homozygote Gunn rat)

Hours	Before	0 - 2	2 - 4	4 - 6	6 - 8
Case No. 1.	2.64 mg%	4.02 mg%	3.40 mg%	3.65 mg%	3.40 mg%
2.	1.24	2.48	3.71	2.17	2.41
3.	2.74	2.95	2.65	3.47	2.82
4.	3.13	3.26	5.16	4.69	2.29
5.	2.68	3.05	2.48	3.24	2.48
Average	2.49	3.15	3.48	3.44	2.68

%, 4~6時間平均3.39mg%, 6~8時間平均1.68mg%であった。塩型 bilirubin 負荷前後の胆汁中の ester 型 bilirubin の濃度は表4の如く, 負荷前15.16~19.20mg%, 平均17.13mg%, 負荷後2時間まで平均17.42mg%, 2~4時間の平均は21.34mg%, 4~6時間平均22.33mg%, 6~8時間平均17.48mg%であった。

b) Gunn rat: Homozygote 2匹, heterozygote 3匹について塩型 bilirubin を負荷した場合の成績には, homozygote と heterozygote の如何を問わず有意の差をみとめなかつたので一括してその成績を示した。塩型 bilirubin 負荷前後の胆汁中の間接 bilirubin の濃度は表5の如く, 負荷後2時間までは平均0.67mg%, 2~4時間平均0.80mg%, 4~6時間平均0.76mg%, 6~8時間平均0.52mg%であった。塩型 bilirubin 負荷後の胆汁中の ester 型 bilirubin の濃度の変化は表6の如く, 負荷前2.49mg%, 負荷後2時間まで平均3.15mg%, 2~4時間3.48mg%, 4~6時間3.44mg%, 6~8時間平均2.68mg%であった。

#### 総括並びに考案

塩型 bilirubin と名付けられた bilirubin は直接 bilirubin の性状を有し, 塩酸酸性下で chloroform に容易に移行し間接 bilirubin の性状を呈するが, 教室吉光<sup>9)</sup>による分光化学的性状からは bilirubin-Na 塩と近似し, 教室近藤<sup>10)</sup>の蛍光分析では Na, K の存在を証明している。これらの成績からこの型の bilirubin の化学構造を直ちに決定することは困難で, その単一性にも問題がある。そこでまず, 近藤<sup>6)</sup>の方法で分離した塩型 bilirubin を rat 尾静脈に静脈注射した後胆汁中に排泄される bilirubin 分画を検討すると, 塩型 bilirubin 負荷後胆汁中の塩型 bilirubin 分画は著明に増量した。そこで塩型 bilirubin 分画のもっとも多量に排泄される負荷後2時間までの胆汁を用い, その吸光曲線を描くと, 塩型 bilirubin のそれに一致し, さらに塩酸酸性化後に chloroform で抽出し, 残液の吸光曲線を描くとその bilirubin の吸光極大が殆んどえられなかつたことから, 本分離法は満足しうる事が明らかになった。さらにその胆汁中の bilirubin を薄層 chromatography で分離すると, 4 spot がえられ, 第1 spot の bilirubin 濃度は極めて高く, この spot は ninhydrin 反応陰性, benzidine 反応陰性で, amino 酸ならびに還元物質の存在は証明されず, その Rf 値は負荷に用いた塩型 bilirubin と同一で, methanol

で抽出した後減圧乾固し, 水溶液としたものは塩酸酸性下で容易に chloroform 層に抽出されること, また水溶液の吸光極大は pH3.6で400~430m $\mu$  にみとめられ, 吉光の報告した塩型 bilirubin のそれに一致し Ehrlich 氏 diazo 反応直接陽性, Ehrlich 氏 aldehyde 反応陰性で, 教室より従来報告された塩型 bilirubin の性状と一致した。Erlinger ら<sup>11)</sup>は rat では負荷 bilirubin 量が大量の場合排泄障害を来しやすいと報告しているが, Arias ら<sup>12)</sup>は rat での抱合型 bilirubin の排泄能力は58.4 $\pm$ 8.4 $\gamma$ /100g 体重/分であるとしており, Van Daimme ら<sup>13)</sup>は Wister 系 rat を用いた実験で ether 麻酔, nenbutal 麻酔下での排泄は麻酔より回復した時に比して極めて低値であるとしている。著者の実験では十分に ether 麻酔の回復をまって行い, 負荷量も Arias らの実験を参考として bilirubin 量として200 $\gamma$ 以下の許容範囲内で行っており, 人為的な条件が加つたとは思われない。ところで抱合型 bilirubin の胆汁への排泄について, 教室近藤ら<sup>14)</sup>は bilirubin sulfate を heterozygote Gunn rat 並びに Wister 系 rat の尾静脈中に負荷した際の胆汁中への排泄を検討し, その排泄率は8時間までに Wister 系 rat は63.7%, Gunn rat では40.8%であると報告したが, 著者の塩型 bilirubin 負荷実験では両者にほとんど差がないか, 僅かに前者が優位であった。Arias<sup>13)</sup>らは Gunn rat に bilirubin glucuronide を負荷した場合, Wister 系 rat と homozygote Gunn rat との間に差がなく, 負荷 bilirubin glucuronide は胆汁中によく排泄されると報告しており, 塩型 bilirubin も肝小胞体の代謝と関係なく容易に胆汁中に排泄されることが分明した。このことは同様 Wister 系 rat および Gunn rat に塩型 bilirubin を負荷し胆汁中の間接型ならびに ester 型 bilirubin の消長を検討した成績で負荷前と殆んど変化をみなかつた成績でも裏付けられる。

#### 結 論

直接 bilirubin の1つである塩型 bilirubin の生体内代謝を明らかにするため, 人胆汁より精製した塩型 bilirubin を用い, これを Wister 系 rat と homozygote ならびに heterozygote Gunn rat の尾静脈に負荷し, 排泄される bilirubin 分画について薄層 chromatography を行い, さらに分光化学的に検討し次の結果をえた。

1) 胆汁中に排泄された塩型 bilirubin はその水溶

液 (pH 3.6) での吸収極大は 400~430 m $\mu$  にあり、その azo 色素 (pH 1.4) の吸収極大は 555~560 m $\mu$  で、ninhydrin 反応陰性、benzidine 反応陰性で、教室従来の塩型 bilirubin の性状と一致した。従って塩型 bilirubin はそのままの形で胆汁中に排泄されると思われた。

2) 天然塩型 bilirubin の胆汁中への排泄は塩型 bilirubin 200 $\gamma$  以下の負荷量では胆汁中への排泄は負

荷後 8 時間までで Wister 系 rat 平均 64.42%, Gunn rat 平均 53.81% でいずれも負荷後 2 時間までが最高排泄値を示し、8 時間まで排泄量のそれぞれ平均 42.9%, 46.5% であり、Wister 系 rat と Gunn rat の塩型 bilirubin の胆汁中への排泄率には有意の差は認めなかった。

稿を終るにあたり御指導いただいた近藤忠亮講師に深謝します。

## 文 献

- 1) 小坂淳夫：ビリルビンに関する研究，第 2 編，直接及び間接ビリルビンの本態に就て．東京医事新誌，68：14-17，1950.
- 2) 滝田齋：小児の血清 Bilirubin 分画に関する研究，第 3 編 Eberlein 法による血清 Bilirubin 分画の検討．日本小児科学会雑誌，69：761-766，1965.
- 3) 吉光正之：胆汁色素に関する研究，第 2 編，天然塩型 Bilirubin の性状．医学研究，25：277-285，1955.
- 4) 河原田裕幸：胆汁色素に関する研究，第 1 編，肝疾患の血清 Bilirubin glucuronide 分画の臨床的意義．医学研究，37：188-199，1967.
- 5) 高木明一郎：Bilirubin glucuronide の研究，第 2 編，胆汁中抱合型 bilirubin 分画と bilirubin glucuronide について．医学研究，39：265-274，1969.
- 6) 近藤忠亮：尿中 Bilirubin に関する研究，第 1 編 Ion 交換樹脂による尿中 Bilirubin の分画分離について．医学研究，29：1122-1129，1959.
- 7) 小坂淳夫・原嘉之：生体 Bilirubin の三分画の分離，日消誌，49：24，1952.
- 8) 山本芳雄：ビリベルデン代謝に関する研究，第 1 編，胆汁中ビリベルデンの定量法に就いて．医学研究，21：1397-1405，1951.
- 9) 吉光正之：胆汁色素に関する研究，第 3 編，結晶 Bilirubin による Bilirubin 曹達塩並に加里塩の性状．医学研究，25：286-293，1955.
- 10) 近藤忠亮：直接 Bilirubin の本態に関する検討．生化学，32：376，1960.
- 11) Erlinger, S. & Dhumeaux, D.: Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes. Gastroenterology, 66: 281-304, 1974.
- 12) Arias, I. M., Johnson, L. & Wolfson, S.: Biliary excretion of injected conjugated and unconjugated bilirubin by normal and Gunn rats. Amer. J. Physiol, 200: 1091-1094, 1961.
- 13) Van Damme, B. & Desmet, V.: The transport capacity for bilirubin in rat liver and its relation to bile flow. Experientia, 25: 813, 1969.
- 14) 近藤忠亮・三好莞爾・広畑衛・渡部寛・西原孝雄：Gunn ダイコクネズミ（ヘテロ）の硫酸抱合型ビリルビンの排泄能．医学と生物学，86：189-194，1973.

**Studies on bilirubin in bile.****Part 1. Excretion of salt-form bilirubin into bile.**

by

**Kanji Miyoshi**

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

(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

Salt-form bilirubin, one of the direct bilirubin, was prepared from human bile. The salt-form bilirubin dissolved with physiological saline was injected into tail vein of Wister strain rat, heterozygote and homozygote Gunn rat; the bile was collected up to eight hours after loading of the salt-form bilirubin. The amount of salt-form bilirubin excreted into bile and its characterization of excreted salt-form bilirubin was studied by thin layer chromatography and photochemically. The following results were obtained;

1) Absorption maximum of the salt-form bilirubin excreted into bile was observed at 400—430 nm, and absorption maximum of its azo-pigment in pH 14 was at 555—560 nm. The salt-form bilirubin showed negative ninhydrin reaction and benzidine reaction, and the nature of excreted salt-form bilirubin was coincided with the former reports from our department. According to qualitative reactions and the absorption maxima, the salt-form bilirubin excreted into bile did not change its nature and conjugation.

2) Up to eight hours collection of bile after loading of the salt-form bilirubin amounted under 200 mcg, it was excreted 64.42% in Wister strain rat and 53.81% in heterozygote and homozygote Gunn rat in the average, respectively. The maximum excretion of the salt-form bilirubin was observed in the first two hours after loading in each groups; these portion occupied at 42.9% and 46.5% of the excreted amount in eight hours, respectively. There was no significant differences between the excretion rate of the salt-form bilirubin in Wister strain rat and heterozygote and homozygote Gunn rat.