

# 直接 bilirubin に関する研究

## 第1編 Bilirubin phosphate 分面に関する研究

岡山大学医学部第1内科教室 (主任: 小坂教授)

河 合 利 夫

[昭和47年9月28日受稿]

### 緒 言

直接 bilirubin の本態が bilirubin の塩もしくはその ester であるとの山岡・小坂らの説は、その後 bilirubin の glucuronide の証明により一部裏付けられたが、生体内の直接 bilirubin が bilirubin glucuronide のみではないことは bilirubin glucuronide 説を提唱した Billing<sup>1)</sup> を始めとして諸家<sup>2) 3) 4) 5) 11)</sup> の認める処であり、Billing<sup>1)</sup> によれば非 glucuron 酸抱合型 bilirubin の存在は全 bilirubin の40%に及ぶこともあるとしている。また教室物部<sup>6)</sup> 河原田<sup>7)</sup> 高木<sup>7)</sup> によれば黄疸尿や血清、胆汁では高率に非 glucuron 酸抱合型 bilirubin が存在していることを認めている。現在迄に報告されている非 glucuron 酸抱合型としては山岡、小坂<sup>8)</sup> の塩型 bilirubin, Isseibacher & Mc Carthy<sup>9)</sup> の biliurbin sulfate, その他 bilirubin と胆汁酸塩<sup>10)</sup> 又は peptide<sup>10)</sup> との分子結合物の存在などが認められているが、教室の近藤<sup>10)</sup> は尿中 ester 型 bilirubin 分面を paper chromatography で検討した際、磷酸 ester 反応陽性の分面が存在することを認め bilirubin と磷酸 ester との結合物も存在することを示唆している。そこで著者は<sup>23</sup>SO<sub>4</sub> を用いた Isseibacher らの bilirubin sulfate に関する実験に倣い<sup>22</sup>P-Sodium phosphate を tracer とし、rat を実験動物に使用し bilirubin 磷酸塩の生成の有無を検討し、これが非 glucuron 酸抱合型 bilirubin の一つであることをみとめたので報告する。

### 実験材料並びに実験対象

動物実験には体重250~300gの健康成熟 Wister 系雄性 rat を1群3~5匹として使用した。

臨床実験対象には岡山大学医学部第一内科入院中の肝硬変症患者で各種肝機能検査、腹腔鏡検査並び

に肝生検により診断が確定された3例と、対照として健康な岡山大学医学部学生で各種肝機能検査に異常の見られなかった3例の計6例を選んだ。

### 実験方法

#### 1. 胆汁採取

術前12時間絶食させ水のみを投与した rat の腹部を ether 麻醉下で正中切開し、胆管に polyethylene tube No.20 (IGARASI 医科工業KK製) を挿入し外胆汁瘻を作製し直ちに腹部を縫合し、以後経時的に胆汁を採取した。

臨床例では早朝空腹時X線透視下に Dreiling 氏2重管を経口的に挿入し先端が十二指腸下向脚に挿入されたことを確認した後、Olive 油20mlを経管的に注入して採取されるB胆汁について検討した。

#### 2. <sup>32</sup>P投与方法

<sup>32</sup>P 磷酸ソーダ溶液 (Dinabot 研究所製) 1mc/ml を蒸留水で10倍に稀釈し、50 $\mu$ c (pH 7.8) を開腹時 rat の十二指腸部に注射器にて注入した。

#### 3. Rat 肝障害法

12時間絶食させた rat に、20%四塩化炭素 olive 油溶液を rat 体重100gあたり0.2ml, polyethylene tube にて胃内に投与した。

四塩化炭素投与後12時間、24時間、48時間に<sup>32</sup>P 磷酸ソーダ溶液をそれぞれ1回腸管に注入し、注入後外胆汁瘻より得られる2~6時間の胆汁を試料とした。又、同時に採血を行なって肝機能検査を施行した。

#### 4. 肝機能検査法

血清 bilirubin 量の測定のほか、肝機能検査として血清膠質反応では Thymol 濁濁試験 (T T T), Kunkel 氏硫酸亜鉛試験 (Z n T T), 塩化 Cobalt 反応 (C o), Cephalin-cholesterol 絮状反応 (C C F) を行ない、更に酵素面では G O T, G P T

(Karman 法) alkaline phosphatase (Bodansky 法) および cholinesterase ( $\Delta$ pH) 値を測定した。

## 5. 粗直接 bilirubin 調製法

### 5-1 胆汁よりの粗直接 bilirubin 調製法

坂本ら<sup>(2)</sup>の方法に従い採取された胆汁を硫酸飽和塩析後吸引濾別し得られる残渣を methanol で抽出し減圧乾固後再び methanol 抽出減圧乾固の過程を数回繰返して得られる褐色粉末を粗直接 bilirubin とした。

### 5-2 粗直接 bilirubin の性状

直接 diazo 反応 Gmelin 反応共に陽性で Ehrlich 氏 aldehyde 反応陰性, Schlesinger 試薬で蛍光を認めない。

## 6. Bilirubin 3 分画法

小坂・原<sup>(3)</sup>の方法に倣い行なった。即ち、粗直接 bilirubin 水溶液 1 ml に chloroform 2 ml を加えて十分に振盪した後 3,000 回転 5 分間遠沈してえられる chloroform 層を間接 bilirubin とした。間接 bilirubin 分画を除去した後、再び 2 ml の chloroform を加え更に 1/10 N HCl を等量添加し十分に振盪した後 3,000 回転 5 分間遠沈してえられる下層の chloroform 層を塩型 bilirubin 分画、上層を ester 型 bilirubin 分画とした。

## 7. Bilirubin 測定法

Jendrassik & Cleghorn 氏変法により測定した。

Ehrlich 氏 diazo 試薬の組成は sulfanil 酸 1 g と 15 ml の濃塩酸を 1,000 ml の蒸留水に溶解した第 I 液と、0.5% 亜硝酸ソーダ水溶液の第 II 液を用い、用時第 I 液 10 ml、第 II 液 0.3 ml を混じたものを diazo 混液として用いた。

## 8. Paper Chromatography

### 8-1 試 料

#### 8-1-1 直接 bilirubin の調製

胆汁より 5-1 により調製された粗直接 bilirubin を cellulose powder (mesch 300) を固定相とし、展開液 n-butanol : ethanol : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2) で室温 (15~25°C) にて逆相 column chromatography を行ない、えられる bilirubin 分画を分画採取したのち減圧乾固して試料とした。

#### 8-1-2 Azo 色素

粗 bilirubin より 8-1-1 の方法で分画分離した直接 bilirubin 分画を 1 ml の蒸留水に溶解し、diazo 混液 0.5 ml 蒸留水 3.5 ml を加え 30 分間放置し azo 色素を作り減圧乾固したものを試料とした。

### 8-2 濾 紙

Schleicher & Schüll · Nr. 2043 a を使用した。

### 8-3 展 開

試料を 0.5 cm 以内の spot 又は巾 0.5 cm 以内の band として原点につけ、一次元上昇法により室温下 (15~20°C) にて展開し、展開前線が 20 cm 上昇した後、室温にて乾燥させた。

### 8-4 展 開 液

粗直接 bilirubin 分画の展開液としては n-butanol : ethanol : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2) を用い、azo 色素の場合には n-butanol : 酢酸 : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2) を用いた。

## 9. Column Chromatography

### 9-1 Column の作成法

Column は径 20 mm の活栓付ガラス管に東洋濾紙製 cellulose powder (mesch 300) を高さ 10 cm にて固定相とした。

### 9-2 展 開

展開液として n-butanol : ethanol : H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 2) を用い逆相 chromatography を行ない fraction collector を用い、20 滴ずつ分割採取し、各 fraction について bilirubin 量並びに総燐量を測定した。

## 10. 放射能測定

### 10-1 Geiger-Müller counter による測定

試料を蒸留水 0.1 ml に溶解したものを所定の試料皿に入れ充分乾燥後、G.M. counter (Geiger müller counter Aloka Model TDC-1 日本無線 KK 製) を使用し測定した。なお障害肝 rat 胆汁 bilirubin 中 ester 型 bilirubin の paper chromatogram では第 3 spot を中心として 1 cm<sup>2</sup> の正方形に切り取り試料皿上に置いて測定した。

### 10-2 Radio Chromatogram

前記の paper chromatography によりえられた、paper chromatogram を用い paper chromatogram scanner (Aloka Model PCS-4 日本無線 KK 製) で自動的に記録した。

### 10-3 Radio autogram

Ester 型 bilirubin 分画並びにその azo 色素を試料とし、paper chromatography を行なってえられた paper chromatogram に Fuji 工業用 X 線フィルム non-screen type 200 を密着させ、20 日間室温下暗室に放置した後、X 線フィルムを Rendol を用い 20°C 5 分間現像し、水洗後 Renfix で 20°C 10 分間定着を行なった。

## 11. 磷酸測定法

Fiske-Subbarow 法<sup>21)</sup>により総磷量を測定した。即ち試料を Micro-Kjeldahl 酸化コルベンにとり、5 N 硫酸 1 ml を加え加熱する。加熱は火焰が直接底に達しない様に 2 cm 程の間隔に保ち (130°C~160°C) 火煙が立ち始めると焰よりはらずし冷却の後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1 滴滴下し加熱を続ける。上記操作を液内容が無色になる迄続け無色になった後 1 分間加熱、冷却の後少量の水を加え沸騰水溶液中に 10 分間放置し、灰化中に生じた Pyro 磷酸を Ortho 磷酸に変える。全内容を定量的に 10 ml 目盛付試験管にうつし、molybden 酸液 1 ml, aminonaphthol sulfone 酸液 0.4 ml を加え、水で 10 ml とし混和の後 20°C~25°C の水溶液中に 15 分保ち生成した molybden 青を直ちに分光光度計 Spectronic 20 (島津製) を用い Filter 660 m $\mu$  で測定した。又別に第 1 化学製基準無機磷酸液について検量曲線を作製した。Molybden 酸液: molybden saures ammonium の 2.5 g/dl 水溶液、水に不溶の NH<sub>4</sub>-Trimolybdate は濾過によって除いた。

Amino naphthol sulfone 酸試薬: 精製した 1.2 4-amino naphthol sulfone 酸 0.5 g と 15 g/dl NaHSO<sub>4</sub> 水溶液 195 ml に溶解し、これに 20 g/dl Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 水溶液 5 ml を加え作成する。

## 実験成績

1. 正常 rat における胆汁中 <sup>32</sup>P 排泄曲線

磷酸ソーダの腸管からの吸収及び肝臓よりの排泄状態を検討する目的で <sup>32</sup>P 磷酸ソーダを十二指腸内に注入後、外胆汁瘻より 30 分迄は排泄される胆汁 2 滴ずつを採取し、以後は 10 時間まで 30 分間隔で胆汁を分割採取し、その 0.1 ml について、それぞれ放射能を測定し、胆汁量と測定値より総排泄 <sup>32</sup>P count 数を計算した。胆汁中への <sup>32</sup>P 排泄は <sup>32</sup>P 磷酸ソーダ腸管注入後 10~15 分で始まり、次第に増加し、4~5 時間で最高値となり、8~9 時間で殆んど一定状態となることが認められ、(図 1, 2) 8 時間迄に胆汁中に排泄される量は <sup>32</sup>P 注入量の平均 1.7% (1.62~1.76%) で、以下の実験に供する胆汁は 2~6 時間迄のそれであるので、その <sup>32</sup>P 排泄量を検討すると注入 <sup>32</sup>P 量の平均 1.12% (0.99~1.35%) にあたり、8 時間までの <sup>32</sup>P 排泄量の平均 65.8% (59.30~76.70%) に相当した。

2. 胆汁中 bilirubin への <sup>32</sup>P の分布

<sup>32</sup>P 腸管投与後 rat 外胆汁瘻より採取した 2~6 時間迄の胆汁を用い、bilirubin 精製過程での <sup>32</sup>P

Fig. 1 Excretion curve of <sup>32</sup>P in bile after injection of <sup>32</sup>P sodium phosphate into duodenum of rat

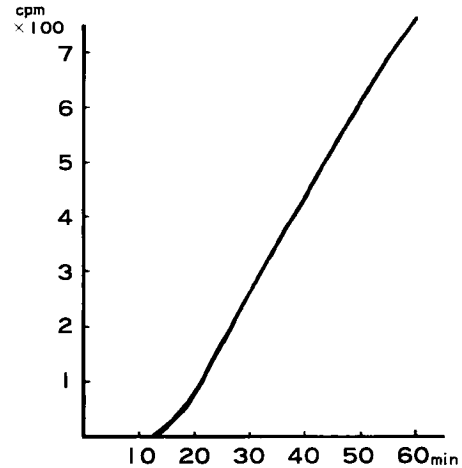
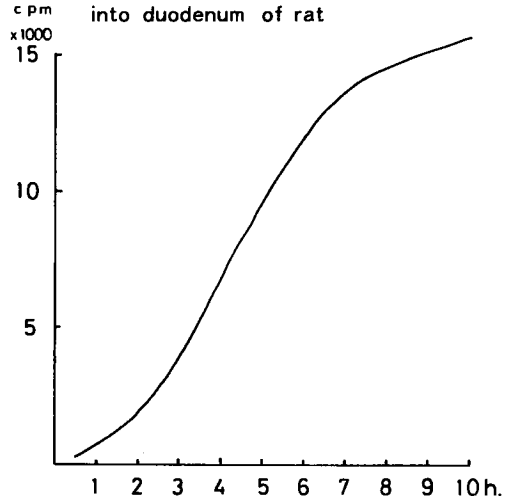


Fig 2 Excretion curve of <sup>32</sup>P in bile after injection of <sup>32</sup>P sodium phosphate into duodenum of rat



分布を検討した。胆汁中に含まれる放射能を 100% とした場合硫酸塩析後の胆汁中に平均 24.7% (21.8~27.1%) が認められ methanol 抽出後の残渣中に平均 2.1% (1.9~2.3%) が認められた。粗 bilirubin 中の <sup>32</sup>P 含有率は残りの平均 73.2% (70.6~76.1%) であった。(表 1 A, B)

3-1 Bilirubin 3 分画中に占める <sup>32</sup>P について。

小坂・原法により胆汁中の bilirubin を間接 bilirubin, 塩型 bilirubin, ester 型 bilirubin の 3 分

Table 1-A Excreted  $^{32}\text{P}$  activity in bile after  $^{32}\text{P}$ -sodium phosphate injection into duodenum of rat

Time	Experiment			Average
	No. 1	No. 2	No. 3	
0 - 8 hrs.	1.62	1.76	1.72	1.70
2 - 6 hrs.	0.99	1.35	1.02	1.12
2-6hrs./0-8 hrs. ratio	61.11	76.70	59.30	65.88

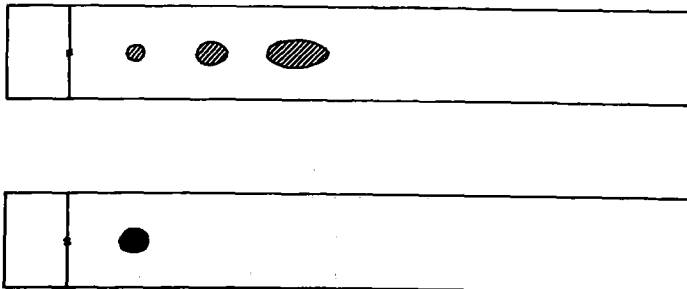
Table 1-B Distribution of  $^{32}\text{P}$  activity in each fraction

Fraction	Step	Experiment			Average
		No. 1	No. 2	No. 3	
Bile	0	100.0	100.0	100.0	100.0
Filtrate	1	25.2	21.8	27.1	24.7
Sediment	1	74.8	78.2	72.9	75.3
Residue	2	1.9	2.1	2.3	2.1
Crude Bilirubin	2	72.9	76.1	70.6	73.2

Distribution of  $^{32}\text{P}$  activity in 3 fractions of bilirubin

	Experiment			Average
	No. 1	No. 2	No. 3	
Ester-form Bilirubin	98.45	99.16	99.19	98.80
Indirect Bilirubin	0.61	0.35	0.36	0.44
Salt-form Bilirubin	1.04	0.49	0.45	0.66

Fig.3 Paper chromatogram and radioautogram of ester-form bilirubin extracted from rat bile



面にそれぞれ分画分離し、各分画中に含まれる放射能を測定したところ、粗 bilirubin 分画を 100% とすると ester 型 bilirubin 分画には、平均 98.90% (98.45~99.19%)、間接型 bilirubin 分画には平均 0.44% (0.35~0.61%)、塩型 bilirubin 分画には平均 0.66% (0.45~1.04%) 含まれており、 $^{32}\text{P}$  放射能は ester 型 bilirubin 分画に局限して存在することがみとめられた。(表 1 A, B)

### 3-2 精製 ester 型 bilirubin 中の $^{32}\text{P}$ 活性

Column chromatography によって、精製された ester 型 bilirubin 分画中の  $^{32}\text{P}$  活性は rat に負荷した全活性の 0.52~1.10%, 平均 0.82% であった。

4-1  $^{32}\text{P}$  腸管注入 rat 胆汁中 bilirubin の paper chromatogram, その radioautogram および radio chromatogram について

実験 8 によりえた胆汁中 bilirubin の paper chromatogram は 図 3 のごとく ester 型 bilirubin は展開前線より第 1, 第 2, 第 3 の 3 spot に別れ、第 1 spot, 第 2 spot の Rf 値は 0.32~0.41, 0.20~0.25 で第 3 spot は Rf 値 0.09~0.12 にあり、他の spot に比し非常に小である。この第 3 spot は近藤、河原田らが磷酸 ester 反応陽性とした spot であるが、paper chromatogram について radio autography を行なってみると、その spot に相当して放射能による感光部を認めた。(図 3) このさい  $^{32}\text{P}$  磷酸ソーダが、bilirubin と混合したために生じた結果を否定する必要があるので rat 胆汁より得た試料に  $^{32}\text{P}$  磷酸ソーダ  $10\mu\text{C}/\text{ml}$  滴を加えた混合液を作り上記と同一の方法により paper chromatography を行ない、えられた paper chromatogram についての radioautogram を作製したところ放射活性はすべて原点にみとめられるのみ

で上昇はみとめられなかった。(図 4)

また、上記の paper chromatogram について radio chromatogram を作製すると radio autography による成績と同様に第 3 spot に相当し放射能の山を認めた。(図 5) 一方、胆汁と  $^{32}\text{P}$  磷酸ソーダ混合液についての、radio chromatogram についても原点に放射活性の山を認めるのみであった。(図 6)

4-2  $^{32}\text{P}$  磷酸ソーダ腸管注入 rat の胆汁中、bilirubin の azo pigment の paper chromatogram, その

FIG.4 Paper chromatogram and radioautogram of ester-form bilirubin extracted from rat bile

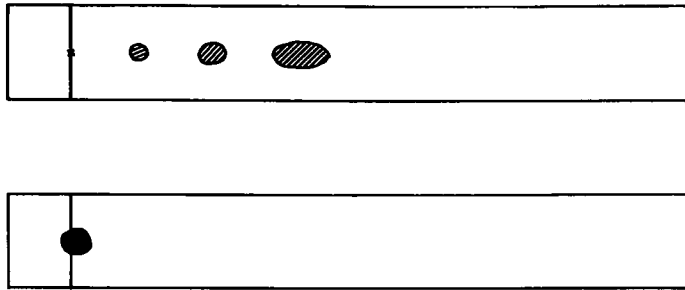


Fig.5 Paper chromatogram and radio chromatogram of ester-form bilirubin extracted from rat bile

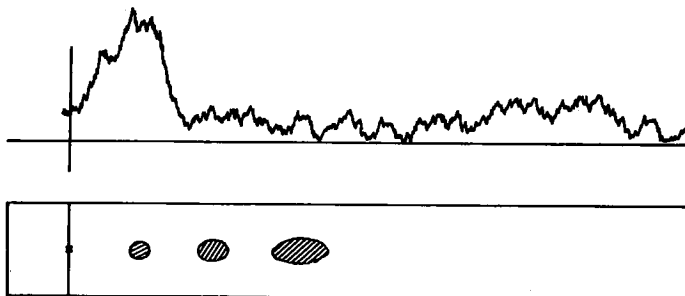
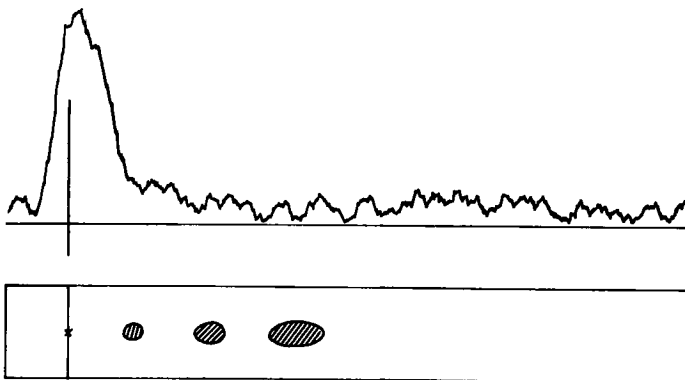


Fig.6 Paper chromatogram of conjugated bilirubin in rat bile and its radio chromatogram



radio autogram および radio chromatogram について.

粗 bilirubin を column chromatography により精製し, その bilirubin に diazo 試薬を加えて作製された azo 色素について paper chromatography を行ない, Rf 値 0.60~0.64, 0.52~0.62, 0.14~0.20 に 3 つの spot をえた.(図7) そこで, さらに, radio autography を行なったところ第3 spot Rf 値 0.14~0.20 の spot に相当する場所のみ放射能による感光部をみとめた.(図7) また, radio chromatogram では radio autogram と同様に, Rf 値 0.18~0.22 の第3 spot に相当し, 放射活性の山を認めた.

5. 四塩化炭素による肝障害 rat に  $^{32}\text{P}$  磷酸ソーダを負荷した際の胆汁中  $^{32}\text{P}$  陽性 bilirubin 分画の変化について.

Rat 胆汁中の Bilirubin 1mg 中に含まれる,  $^{32}\text{P}$  陽性 bilirubin 分画の  $^{32}\text{P}$  放射活性は 図8 の如く肝障害群では正常群に比し高値を示した. すなわち各群の平均値は正常群の 260 count/mg/5 min., 12時間障害群 3510 count/mg/5min. 24時間障害群 4320 count/mg/5 min., 48時間障害群 2510 count/mg/5min. であった.(図8) 各2群間のF検定では(表2)に示す

Table 2 Probability of two groups in average value

	0 hr	12 hrs.	24 hrs.
12 hrs.	F 8.7357 P (0.05) 5.1174		
24 hrs.	F 6.5083 P (0.05) 5.5914	F 0.8956 P (0.05) 5.3177	
48 hrs.	F 19.7526 P (0.01) 10.561	F 4.4998 P (0.05) 4.9646	F 1.2224 P (0.05) 5.8177

ごとく0時間に比し他の3群は5%以下の危険率で有意の上昇を認めたとが、12、24、並びに48時間群のいずれの2群間にも推計学的には有意差は認められなかった。又胆汁中に排泄された粗 bilirubin 中に含まれる総<sup>32</sup>Pと<sup>32</sup>P陽性 bilirubin 分画との放射能の割合は 図9 に見られる如く障害群では、正常群に比し高値を示した。各群の平均値は、正常群の0.71%, 12時間障害群の6.31%, 24時間障害群の

Fig.8 <sup>32</sup>P activity of bilirubin phosphate

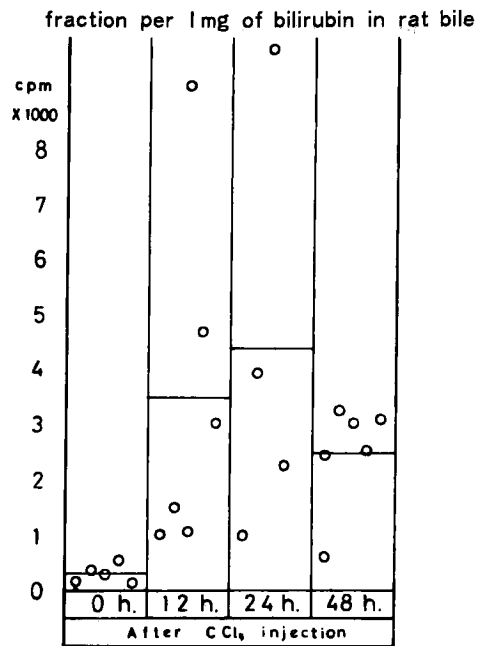


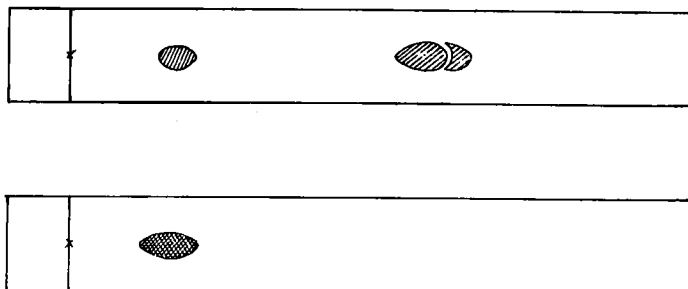
Table 3 Liver function of rats with carbon tetrachloride liver injury

CCl <sub>4</sub> injury	No.	G O T (KarmenU.)		S Bilirubin mg% T. D.		Al-p.ase (Bodansky U)	Choline E (Δ pH)
0 h.	1	150	35	0.20	0.12	9.2	0.59
	2	81	60	0.39	0.20	8.1	0.62
	3	95	70	0.15	0.09	8.5	0.61
12 h.	1	1800	2000	0.20	0.10		0.57
	2	1800	2100				0.63
	3	1850	2080	0.40	0.30	9.2	0.61
24 h.	1	1780	1750			9.0	0.57
	2	1800	2200	0.43	0.32	7.8	0.55
	3	1800	2100	0.35	0.32		
48 h.	1	1750	2200				0.57
	2	1800	2080	0.43	0.32		0.59
	3	1680	2180	0.32	0.25	9.0	0.57

5.10%, 48時間障害群の6.79%であった。(図9)なお本実験に用いた四塩化炭素肝障害 rat について行なった肝機能検査の成績は、表3, 4の

Fig. 7 Paper chromatogram and radioautogram of

azo pigment



如くであった。

6. 人胆のう胆汁中の bilirubin 量と phosphate 量の関係について。

肝硬変症患者並びに健康人学生よりえられたB胆汁から粗直接 bilirubin を抽出し、実験9に記載した通り column chromatography を行ない、fraction collectorにて分画採取し、えた各分画の bilirubin 量と phosphate 量を求める

Fig.9 Ratio of total  $^{32}\text{P}$  to  $^{32}\text{P}$  detected in bilirubin phosphate fraction excreted in rat bile

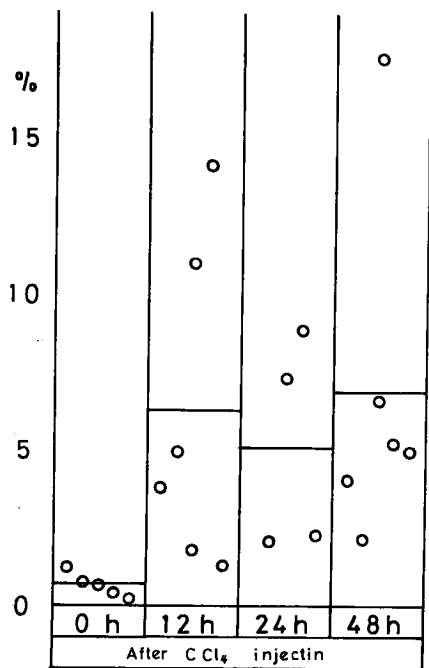


Fig.10 Relaton between amount of bilirubin and phosphor in ester-form bilirubin fractionated by columun chromatography

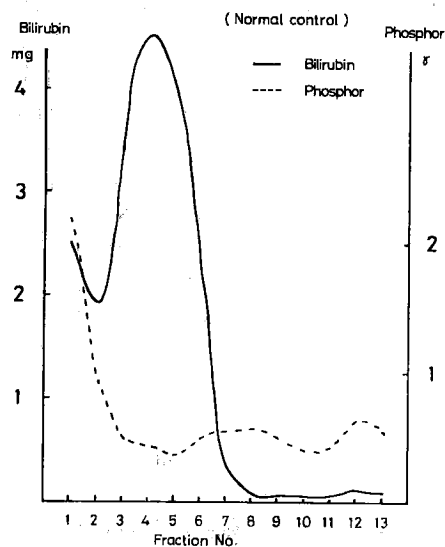
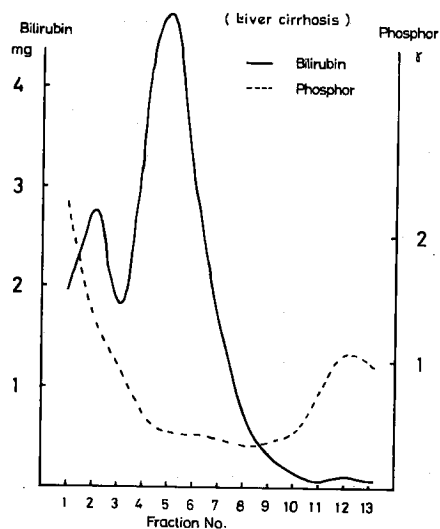


Table 4 Liver function of rats with carbon tetrachloride liver injury

CCl <sub>4</sub> injury	No.	T T T (M. U.)	Z n T T Kunkel U.	C o	C C F
0 h.	1	1.1	1.6	R <sub>2</sub>	+
	2	0.8	1.6	R <sub>2</sub>	#
	3	1.1	1.6	R <sub>2</sub>	+ ~ #
12 h.	1	1.4	6.5	R <sub>3-4</sub>	#
	2	1.4	6.5	R <sub>4</sub>	#
	3	1.6	2.5	R <sub>4</sub>	#
24 h.	1	1.6	2.5	R <sub>1</sub>	#
	2	1.6	6.3	R <sub>3-4</sub>	#
	3	2.2	5.2	R <sub>3</sub>	#
48 h.	1	2.5	7.7	R <sub>3</sub>	#
	2	1.4	5.7	R <sub>4</sub>	+ ~ #
	3	2.8	5.2	R <sub>4</sub>	+ ~ #

Fig.11 Relaton between amount of bilirubin and phosphor in ester-form bilirubin fractionated by columun chromatography



と、図10, 11 に示すごとくで、phosphate 量は bilirubin の第1の山以前に高く、第2の山は低く bilirubin の第3の山にて再び高くなる。この phosphate の動きは column chromatography により、ester 型 bilirubin を精製しない場合に行なった radioautography, radio chromatography の結果とも一致した。なお第3分画の bilirubin 量は、健康人および肝硬変症患者のそれはともにほぼ同程度であったが、phosphate 量は健康人より肝硬変症患者胆汁でより高い値を示し、四塩化炭素肝障害 rat 胆汁を用いた実験と同様な結果を示した。

## 総括並びに考按

Van den Bergh u. Müller<sup>27)</sup>に始まる生体内直接並びに間接 bilirubin の本態については間接 bilirubin は二塩基酸遊離型 bilirubin として諸家の認める処であるが、直接 bilirubin の本態については尚不明の点が多く残されており Billing,<sup>4)</sup> Talafant,<sup>5)</sup> Schmid<sup>6)</sup>らによる bilirubin glucuronide 説も Billing<sup>15)</sup> 自身 alkali stable bilirubin の存在が最高 40% に達する場合のあることを認めており、又 Talafant は山岡・小坂の分離した塩型 bilirubin 分画では glucuron 酸陰性であることを認めている。非 glucuron 酸抱合型 bilirubin としては Isselbacher & Mc Carthy<sup>8)</sup> による bilirubin sulfate, 教室河原田による bilirubin と peptide との結合物,<sup>1)</sup> 近藤<sup>7)</sup> の bilirubin と胆汁酸塩との分子結合物の存在が報告されている。また教室近藤<sup>10)</sup> によって、山岡・小坂の直接 bilirubin 分画中の ester 型 bilirubin 分画中に磷酸 ester 反応陽性分割が含まれていることが指摘されており、これは bilirubin phosphate の存在を示唆するものと思われた。

著者はこの点に着目して先ず実験動物として rat を用い、<sup>32</sup>P 磷酸ソーダを腸管内に負荷し <sup>32</sup>P が胆汁中に排泄される迄の時間を測定したところ 10~15 分と極めて速やかであり、Lester<sup>25)</sup> らが <sup>14</sup>C-bilirubin を rat 腸管内に負荷し <sup>14</sup>C-bilirubin の胆汁中への排泄を検討したさい、最初の陽性は 30 分以内であったとの成績に比較して少々早い <sup>32</sup>P は水溶液とし <sup>14</sup>C-bilirubin は胆汁酸或いは albumin との結合物として負荷されており、溶液の性状にその原因があると考えられたが、さらに <sup>32</sup>P 排泄曲線は 4~5 時間後に最高値に達しており <sup>14</sup>C-bilirubin を用いた Lester らの成績ともよく一致した。胆汁中に排泄された <sup>32</sup>P 量は、負荷後 8 時間迄で負荷量の 1.7% であったが、実験に用いた胆汁は 8 時間迄の排泄量の約 2/3 にあたる負荷後 2 時間 ~ 6 時間のものを使用することとし、該胆汁中の bilirubin 分画中の <sup>32</sup>P 放射活性は ester 型 bilirubin 分画中において 98.7% と限局して存在することを認めた。この ester 型 bilirubin 分画は、所謂残存分画であるため更に paper chromatography で検討した結果、一部の <sup>32</sup>P 陽性部分が bilirubin spot とはずれて存在することが認められた。このため column chromatography を行なって精製した ester 型 bilirubin 分画について同様 paper chromatography を行なっ

てみると教室坂本・近藤・河原田等の報告の如く、3 つの spot がえられ、かつ近藤、河原田の認めたように展開前線より第 3 番目の spot に磷酸 ester 反応が陽性で、この spot に <sup>32</sup>P の限在が認められた。

Bilirubin と <sup>32</sup>P 活性陽性磷酸 ester とが如何なる結合状態であるかについては Isselbacher & Mc Carthy らの報告した bilirubin sulfate と同様に bilirubin phosphate の形をとるものと推定される。

さらに Bilirubin-azo 色素を調製して同様に検討すると <sup>32</sup>P 陽性 spot は R<sub>f</sub> 値の小さい、すなわち比較的移動性の少ない第 3 spot へのみみとめられた。このことは bilirubin phosphate は比較的水溶性は低いと考えられる。

なお Non-bilirubin 分画に認められた <sup>32</sup>P は、胆汁と <sup>32</sup>P 磷酸ソーダ混合液では <sup>32</sup>P 放射能が原点に止まったことから <sup>32</sup>P が何か他のものと結合或いは抱合された状態として排泄されるものが推測され平野<sup>22)</sup> が ether 抽出性 bilirubin について行なった検討成績から推して恐らく脂質と結合しているのではないかと考えられた。

次に bilirubin phosphate 分画が、肝障害時にいかなる変化をきたすかについて、まず四塩化炭素急性肝障害実験における bilirubin phosphate 分画の消長をみると正常 rat 群に比し、四塩化炭素障害 12 時間群では著明な上昇が認められた。

つぎに肝硬変症患者胆汁で bilirubin phosphate 分画の推移を検討した結果でも健康人学生に比し、1.5 倍の上昇が認められた。これらのことは、実験的肝障害時および肝疾患時においては、さきに教室の物部、河原田、高木らによって報告された肝障害時には bilirubin glucuronide 分画が減少するとの成績を併せ考えて代償的に、bilirubin phosphate 分画が増量することを示すものであろう。

Bilirubin phosphate の肝細胞内での生合成の機転については全く不明であるが bilirubin と phosphate の結合様式は磷酸 ester 反応が陽性である点より ester 構造を有するものと思われる。

## 結 論

非 glucuron 酸抱合型 bilirubin 中近藤らにより報告された ester 型 bilirubin 分画中の磷酸 ester 反応陽性分画について検討し、次の結果をえた。

1) <sup>32</sup>P 磷酸ソーダを rat 腸管内に負荷し胆汁よりえられた粗 bilirubin 中の <sup>32</sup>P 放射活性は ester 型



bilirubin に限局してみとめられた。そのさいの<sup>32</sup>Pの胆汁中に始めて証明される時間は10~15分と極めて短時間であり、負荷後8時間迄の<sup>32</sup>P排泄量は、負荷量の1.7%であった。

2) Paper chromatogram, radioautogram, radio chromatogramにより<sup>32</sup>P放射活性がester型 bilirubin 分画中のどの分画に認めるかを検したところ、近藤らが磷酸 ester 反応陽性分画と同定した分画に一致してみとめられた。このことは bilirubin azo 色素についての検討でもみとめられた。

3) Rat の四塩化炭素肝障害時には, bilirubin phosphate 分画は増量し, 肝障害の高度な肝硬変症では健康人に比し胆のう胆汁中 bilirubin phosphate 分画の増加が明らかに認められた。このことは bilirubin glucuronide に対する代償的増量と考えられた。

本論文は、近藤忠亮博士のご指導を頂いた。記して感謝の意を表する。

### 文 献

1. a) Billing, B.H. : Acta Med. Okayama 15 : 185, 1961.
- b) Billing, B.H., Cole, P.G. and Lathe, G. H. : Biochem. J. 65 : 774, 1957.
- c) Billing, B.H. : Clin. Chem. 2 : 267, 1959.
2. Arias, I.M. : Ann. Rev. Med. 17 : 275, 1966.
3. 河原田裕幸 : 医学研究, 37 : 188, 1967.
4. 河原田裕幸 : 医学研究, 37 : 200, 1967.
5. Kondo, T. : Report of 10th Anniv. Symposium on Glucuronic acid, PP 63, 1964.
6. 物部大成 : 岡山医会誌, 71 : 6399, 1958.
7. 高木明一郎 : 医学研究, 39 : 255, 1969.
8. Isselbacher, K.J. and Mc Carthy, E.A. : Biophys Acta, 29 : 658, 1958.
9. 近藤忠亮 : 医学研究, 29 : 1130, 1959
10. 近藤忠亮 : 日消誌, 63 : 513, 1966.
11. 坂本武司・近藤忠亮 : 日消誌, 60 : 478, 1963.
12. Sakamoto, T., Komuta, K., Kondo, T., Hirano, H., Monobe, T. and Kaneda, K. : Acta Med. Okayama, 11 : 81, 1957.
13. 原嘉之 : 医学研究, 22 : 70, 1952.
14. Billing, B.H. and Lathe, G.H. : Biochem. J., 63 : 69, 1956.
15. Talafant, E. : Nature, 178 : 312, 1956.
16. Schmid, R. : J. Biol. Chem. 229 : 881, 1957.
17. Lathe, R. and Schmid, R. : J. Clin. Invest. 42 : 776, 1962.
18. 坂本武司 : Acta Med. Okayama, 10 : 227, 1956.
19. 川口正光, 武田和久, 林慎一郎, 佐野良英, 高木新, 宮田栄一, 北田信吾, 西崎哲一 : 57 : 70, 1968.
20. 行武正躬 : 岡山医会誌, 80 : 969, 1968.
21. Fiske, C.H. and Subbarow, Y. : J. Biol. Chem. 66 : 375, 1925.
22. 平野寛 : 岡山医会誌, 72 : 1723, 1960.
23. Arias, I.M. : Progress in Liver Disease, Vol. 1. PP 190, Publisher Gmne and Stratton. N.Y. and London. 1961.
24. 小坂淳夫 : 東京医事新誌, 67 : 14, 1950.
25. Lester, R., Ostrow, D. and Schmid, R. : Nature, 192 : 372, 1961.

## Studies on direct bilirubin

### Part 1. Studies on bilirubin phosphate fraction

The first department of internal medicine, Okayama  
university medical school ( Director : Prof. Kiyowo Kosaka )

Toshio KAWAI

Characterization of the non-glucuronide conjugated bilirubin fraction showing positive phosphate-ester reaction reported by Kondo was studied. The results were as follows :

1) After  $^{32}\text{P}$ -sodium phosphate was injected into the duodenum of Wister strain rat, bile was collected from the external bile fistula. Crude bilirubin was prepared from the collected bile by Sakamoto's method.  $^{32}\text{P}$ -radioactivity was localized at the ester-form bilirubin fraction of the crude bilirubin.  $^{32}\text{P}$ -radioactivity was detected in the bile during from 10 to 15 minutes after the duodenal injection. Total amount of the excreted  $^{32}\text{P}$ -radioactivity collected up to eight hours after the loading was 1.7%.

2) Localization of the radioactivity at radioautogram and radio chromatogram obtained from the paper chromatogram of the ester-form bilirubin fraction separated by Kondo's method was found at the same spot showing positive phosphate-ester reaction reported by Kondo.

The radioactivity of the azo-pigments yielded from the ester-form bilirubin localized at the spots showing positive phosphate-ester reaction.

3) Amount of bilirubin phosphate fraction increased in the rat bile after carbon tetrachloride poisoning. Amount of bilirubin phosphate fraction in the bile collected from the patients with liver cirrhosis was much more than that from normal subject. This results suggests the bilirubin phosphate fraction increased compensatly when the bilirubin glucuronide fraction was decreased in the liver parenchymal damage.