

黄疸患者の皮膚の酸化還元電位と bilirubin の沈着に関する研究

第 2 編

黄疸患者の皮膚に於ける bilirubin の沈着に関する研究

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂教授）

副 手 石 光 鉄 三 郎

〔昭和34年9月8日受稿〕

I. 緒 言

血液中の bilirubin が増加し、その結果皮膚を始めとする諸臓器が黄染する。これが黄疸であるが、その発生病理の相違に依り、黄疸患者の皮膚色調に差異を生ずることは、すでに Th. Brugsch¹⁾ の提唱した所である。

著者は第1編に於いて、皮膚の黄疸色調と皮膚酸化還元電位との間に相関性のあることを述べたが、更に研究を進め黄染の本態につき研究をすゝめることとした。

処で教室藤井²⁾ は各種 bilirubin の蛋白質線維に対する染色について報告を行なつたが、羊毛、絹糸については留り、組織化学的研究は行なっていない。1930年 F. Rosenthal³⁾ が、黄疸に於ける bilirubin の染色部位は弾力線維 (elastin) であつて膠原線維 (collagen) ではないと報じて以来、何らの検討が行なわれないまま、一般にはこの説が信じられていたようで、多くの疑問が残されている。

II. 黄疸患者の皮膚に於ける bilirubin の染色部位に関 する組織化学的検討

組織化学的研究を行なうにあつて、最も留意し、慎重に行わなければならない点は、検索物質の変性及び移動を極力防止することである。その為著者は凍結乾燥⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ 法を採用した。従来一般に行われている paraffin 包埋法に於いては、bilirubin が formalin 固定、水洗、alcohol に依る脱水、chloroform に依る脱 alcohol 等の操作を加える事に依つて、抽出或いは移動の可能性及び変性の危険性を充分受けるものと考えられる。

1. 実験材料並びに方法

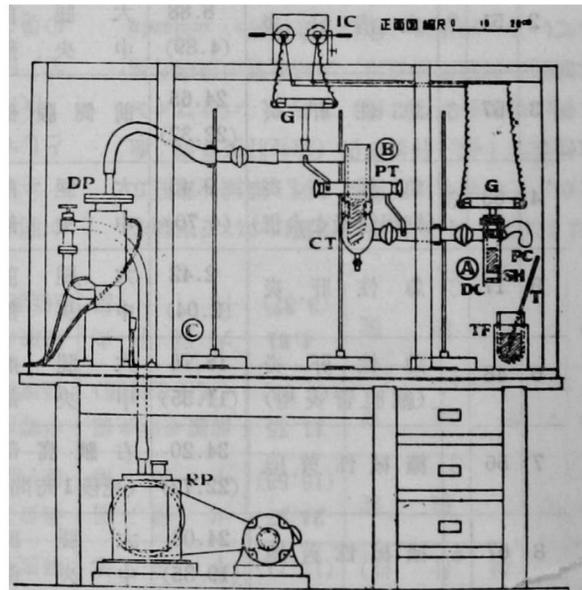
1. 1. 実験材料

岡山大学医学部附属病院小坂内科入院患者の内、著明な皮膚黄疸を認めたもの、前腹壁中央部、または大腿前中央部（1名のみ右腋下部）より採取した皮膚を使用した。

1. 2. 実験器具

岡山大学医学部妹尾教授設計の凍結乾燥器を使用した。その構造は大略図1の通りである。

図1 組織用凍結乾燥装置



① 組織処理装置

DC：乾燥室，SH：資料支持網，PC：パラフィン室，TF：マホウ壺，T：低温々度計

② 吸湿装置

CT：コールド・トラップ
PT：五酸化燃トムツブ

③ 真空装置

DP：油拡散ポンプ，RP：廻転ポンプ，G：ガイスラー管，IC：インダクションコイル

1. 3. 実験方法

標本採取後可及的速く自然乾燥を防止しつつ半米粒大の大きさに切り取り、あらかじめ液体窒素にて充分冷却液化した市販プロパンガス中に、真鍮製の小さな金網にのせて投入し、瞬時に凍結を完了し、予め軟パラフィンを注入し、 -40°C に冷却した乾燥室に、温度の上昇に注意しつつ、手速く入れ、直に吸引乾燥を開始する。乾燥室の温度を徐々に上昇させるが、 -30°C を越さないように注意し、大略 -35°C 前後にて、 10^{-4} mmHg 以上の高度真空にて約20時間乾燥を行なった後、約4時間にて室温まで温度を徐々に上昇させて乾燥を終了し、予め注入してあつた軟パラフィンを 60°C の熱湯にて加熱する。次に完全に融解後取り出し、孵卵器中の硬パラフィンに10分間投入後、型の如く包埋、薄切片とし、脱パラフィン（以下脱パラと略す）後、中性カナダバルサム封入を行ない顕微鏡的観察を行なうと同時に、

Hömatoxylin Eosin 染色, Azan 染色, Weigert 氏染色, Pap 氏銀染法, Perla-Stieda 氏法に依る鉄証明及び酸化法に依る bilirubin 証明を行ない。比較検討を行なつた。bilirubin の組織化学的証明法については、Stein¹¹⁾、岡本¹²⁾¹³⁾、Glenner¹⁴⁾、等多くの報告がなされておるが、著者はその追試を行ない、いずれも満足すべき成績を得なかつた。そこで岡本氏の硝酸塩酸混液法を改良し、その混液を5倍に稀釈し、脱パラを行なつた標本に滴下し、室温にて1時間顕微鏡的観察を行ない、最適時間を決定し、更に2枚の標本につき同様な操作を行ない、1枚は水洗後直にグリセリン封入を行ない、他は水洗後アルコールで短時間脱水を行ない、バルサム封入を行ない、脱パラ後直にバルサム封入を行なつた無処理標本と比較検討を行なつた。

2. 実験成績

表1に記載した如く、小坂内科へ入院した15例

表 1 黄疸患者皮膚の肉眼的所見

番号	年齢	性別	病名	血清 bilirubin 値 mg/dl (直接)	標本採取部位	皮膚肉眼的所見	パラフィン包埋標本切断面肉眼的所見
1	24	♀	溶血性黄疸	6.41 (1.09)	大腿前中央部	明い淡黄色 緑色調なし	メラニン色素層軽度 明るい淡黄色
2	51	♀	血清肝炎	8.88 (4.89)	大腿前中央部	中等度の黄染 緑色調なし	メラニン色素層軽度 中等度の黄染
3	57	♂	急性肝炎	24.65 (22.37)	前側腹部	赤色調を有する 高度の黄染	メラニン色素層著明 高度の黄褐色
4	63	♂	急性肝炎 (細胆管炎を合併)	9.45 (4.70)	大腿前中央部	暗黄褐色、極軽度 の緑色調あり	メラニン色素層著明 褐色調を有する中等度黄染
5	17	♂	急性肝炎	2.42 (2.04)	大腿前中央部	軽度の黄染 緑色調なし	メラニン色素層中等度 褐色調を有する軽度黄染
6	48	♂	急性肝炎 (細胆管炎型)	18.76 (11.35)	大腿前中央部	著明な暗黄黄褐色 軽度の緑調あり	メラニン色素層中等度 暗黄褐色
7	56	♂	機械性黄疸	34.20 (22.72)	右腋窩部 (死後1時間)	著明な黄褐色 軽度の緑色調あり	メラニン色素層中等度 緑色調を有する濃黄色
8	67	♂	機械性黄疸	24.08 (19.35)	大腿前中央部	濃黄染、軽度の 緑色調あり	メラニン色素層著明 緑色調を有する濃鮮黄色
9	69	♂	機械性黄疸	20.09 (11.35)	大腿前中央部	濃黄染、緑色調、 赤色調なし	メラニン色素層著明 濃黄色
10	60	♀	機械性黄疸	12.11 (10.40)	前腹壁中央部	中等度黄染 軽度の緑色調あり	メラニン色素層中等度 緑色調を有せる中等度黄染
11	41	♀	機械性黄疸	11.54 (9.07)	大腿前中央部	褐色調を有する 中等度黄染	メラニン色素層著明 緑色調を有する中等度黄染

12	32	♀	肝硬変 (胆汁性)	21.61 (1981)	前腹壁中央部 (死後3時間)	濃黄褐色 軽度の緑色調あり	メラニン色素層著明 緑色調を有する鮮濃黄色
12'	32	♂	肝硬変 (胆汁性)	20.00 (12.11)	大腿前 中央部	濃鮮黄染 軽度の緑色調あり	メラニン色素層中等度 緑色調を有する鮮濃黄色
13	22	♂	肝硬変	24.27 (15.53)	大腿前 中央部	濃黄染 緑色調, 赤色調なし	メラニン色素層著明 軽度の褐色調を有する濃黄染
14	49	♀	肝硬変	11.35 (6.03)	前腹壁中央部 (死後2時間)	中等度黄染 軽度の緑色調あり	メラニン色素層軽度 緑色調を有する鮮黄染
15	40	♀	肝硬変	4.51 (3.37)	大腿中央 内側	軽度の黄染 極軽度の緑色調あり	メラニン色素層軽度 帯暗緑色の軽度黄染

(内1例は2回)の黄疸患者の皮膚について実験を行なつたが、その病名は肝硬変4例、機械性黄疸5例、溶血性黄疸1例、肝炎5例(急性肝炎2例、血清肝炎1例、細胆型肝炎2例)である。パラフィン包埋標本断面の肉眼的所見は、大略患者の皮膚外見と一致している。表皮に一致して全例薄い melanin 色素顆粒層が認められ、真皮はほぼ一様な明らかな黄染が認められるが、その色調は表の如く、一般に機械性黄疸例には、軽度の緑色調の増加が認められるが、溶血性黄疸例では明るい淡黄色で緑色調は全く認められなかつた。機械性黄疸に比し軽度ではあるが、肝硬変に於いても緑色調が認められた。肝炎例に於いては、ほとんど緑色調を認めなかつた。但し、細胆管炎型2例中1例は汚黄褐色を示し、他も褐色調強く鉄沈着を疑わしめる所見であつた。血清肝炎例に於いては、褐色調の増加が認められた。尚凍結乾燥を行ない、パラフィン包埋後冷暗所に保存した標本の安定性は極めて良好であつて、1年以上経過した標本に於いても、色調の変化は全く認めなかつた。

次に脱パラ後直に中性バルサム封入を行なつた標本について、黄褐色色素顆粒という点に主眼をおき、各標本の顕微鏡的観察すると微細暗褐色色素顆粒が主として表下皮部に一部は真皮乳頭層に著明に認められるが、bilirubin 反応陰性、Pap 氏銀染法陽性で melanin 色素であつた。其他数例に bilirubin でない黄褐色色素顆粒を認めるが、すべて鉄反応陽性であり、これ以外の黄褐色色素顆粒は認めなかつた。この鉄反応陽性黄褐色色素顆粒は、顆粒の大きさ、沈着部位、連続切片との関係より、明らかに人工的と思われる例を除くと、細胆管炎型肝炎2例中2例、機械性黄疸5例の中1例に認められており、これらの例では血清 bilirubin 長に比して皮膚の汚黄褐色調が強く、皮膚の顆粒は siderin であること

が明らかとなつた。

そこで黄疸患者の皮膚には肝臓と異り、色素顆粒としての bilirubin の沈着は存在しない事がわかる。

次に高度黄疸患者の皮膚につき凍結乾燥を行なつて、組織標本として観察すると、10 μ 以下の厚さの場合、皮膚組織(特に真皮)に bilirubin の染着を識別する事はかなりの熟練を要するが、真皮の主要構成物である膠原線維には軽度の黄染が認められる。次に100 μ の厚さとした場合では、真皮全体が明らかに黄染し、岡本氏法の変性に依る bilirubin 証明もまた確実な陽性を示す。老人になるに従い弾力線維増多の傾向を示すが、Hämatoxylin Eosin 染色、Azan 染色、Weigert 氏弾力線維染色、Pap 氏銀染法の所見を総合すると、皮膚(特に真皮)の主要構成物質は膠原線維であつて、弾力線維は常に10分の1以下であり、その際の着色は弾力線維のみ特に染色されているとの所見は全く得られず、また逆に弾力線維のみ黄染が欠除しているとの所見も得られなかつた。

3. 小 括

黄疸患者の皮膚には、bilirubin 以外に、melanin 色素及び siderin の沈着があり、皮膚黄褐色調の一要因となつているが、いずれも顆粒状に存在し、Pap 氏銀染法、Perls-Stieda 氏法に依る鉄証明、岡本氏法の変性に依る bilirubin 証明を行なう事に依り bilirubin との鑑別可能であつた。これに反して、bilirubin は瀰漫性に存在し顆粒状には存在しない。高度黄疸患者の皮膚組織標本に於いて、100 μ の厚さでは黄染著明、10 μ 以下では極軽度、瀰漫性に膠原線維に一致する黄染を認め、かつ特有の線維のみが染色されているような黄染は認めない。また真皮の大部分を占めるものは膠原線維であつて、弾力線維は常に10分の1以下であり、弾力線維のみが染

色されている所見、或は逆に弾力線維のみ黄染が欠除している所見も認めなかつた。

Ⅲ. bilirubin の動物線維に対する染色に関する実験的検討

1. 実験材料並びに方法

1. 1. 実験材料

体重 80~100 g の幼若白鼠尾腱を F. Verzar の方法に従い、ピンセットで抜き出したのを膠原線維とし、更に同線維束を 80°C の生理的食塩中にて 1 分間加熱変性させ、特有の光沢並びに構造を失い、肉眼上半透明無構造になつたものを直ちに冷却し、これを類弾力線維 (elastoid) として使用した。

黄疸患者血清は小坂内科入院患者より採取した。結晶 bilirubin-tween 80 水溶液は、教室井上¹⁶⁾の方法に従い、結晶 bilirubin ソーダ塩は、教室吉光¹⁷⁾の方法に従い、天然塩型 bilirubin 及び天然エステル型 bilirubin は、教室近藤¹⁸⁾の方法に従い調製した。

緩衝液は pH 3.0~5.5 の範囲は McIlvaine 氏緩衝液、pH 6.0~7.5 の範囲は 0.2 M 磷酸塩緩衝液 (Sørensen 氏緩衝液変法)、pH 8.0~11.0 の範囲は Sørensen-Walburn 氏グリココール・苛性ソーダ緩衝液を使用した。

1. 2. 実験方法

黄疸患者血清は 1 cc をそのまま使用し、各種

bilirubin 水溶液は、5 mg/dl の濃度に調製し、この 4 cc に対して、各緩衝液 1 cc を加えて全量 5 cc とした pH 3.0~11.0 の試験管列を作り、これに上記の 2 種類の線維束 (比較を便ならしめる為、同一部位より採取した線維で、太さ、長さの同一な 2 条を用いた) を投入し、遮光し、5°C の電気冷蔵庫中に 5 日間放置後、短時間水洗を行い、白磁皿の上で、自然光下で肉眼的観察を行ない、次で直に膠原線維束を 80°C の熱湯中にて 1 分間加熱変性後冷却し、更に肉眼的比較観察を行なつた。

2. 実験成績

2. 1. 黄疸患者血清に依る両線維に対する bilirubin 染色性の検討

その成績は表 2 の通りである。即ち総血清 bilirubin 値 10 mg/dl 以上 20 mg/dl 以下に於いては、軽度に淡黄染を認め、総血清 bilirubin 値 20 mg/dl 以上の高度黄疸患者血清に於いては、全例に線維束の淡黄染を認めた。両線維の被染色性を比較すると、一般に膠原線維にその優位が認められたが、この黄染の程度は患者血清の示す黄色に比して遙かに淡く、従つて両線維束が血清中にある時は、全く染色していないように見えた。黄染の程度は血清総 bilirubin 値と明らかな相関性を有するが、直接、間接 bilirubin 値の二者に分けて相関性の程度の検討を行なうと、直接 bilirubin 値により有意の相関性を認める。

表 2 黄疸患者血清に依る膠原、類弾力線維染色所見

番号	年齢	性	病名	血清 bilirubin 値 mg/dl (直接)	染色性		
					膠原線維	優劣	類弾力線維
1	70	♂	急性肝炎	30.20 (20.20)	淡黄染	>	微淡黄染
2	22	♂	肝硬変	24.27 (15.53)	微淡黄染	>	痕跡
3	32	♂	胆汁性肝硬変	20.00 (12.11)	同上	>	同上
4	41	♂	肝炎(Ⅱ型)	5.84 (3.37)	痕跡	≧	同上
5	48	♂	肝炎(Ⅱ型)	5.08 (4.32)	微淡黄染	>	同上
6	24	♀	溶血性黄疸	4.89 (0.33)	黄染なし	/	黄染なし
7	40	♀	肝硬変	4.54 (3.37)	痕跡	≧	痕跡
8	17	♂	急性肝炎	2.42 (2.04)	同上	≧	同上
9	24	♂	慢性肝炎	2.23 (0.52)	黄染なし	/	黄染なし
10	49	♀	肝硬変	2.04 (1.66)	同上	/	同上
11	24	♀	慢性肝炎	2.04 (0.90)	同上	/	同上
12	40	♀	肝硬変	1.85 (1.28)	同上	/	同上
13	31	♂	肝硬変	1.66 (1.09)	同上	/	同上
14	36	♂	肝硬変	1.66 (0.71)	同上	/	同上
15	45	♂	肝脳症候群	1.21 (0.87)	同上	/	同上
16	37	♂	急性肝炎	0.71 (0.14)	同上	/	同上
17	38	♀	慢性肝炎	0.52 (0.14)	同上	/	同上

2. 2. 結晶 bilirubin による染色性の検討

結晶 bilirubin-tween 80 水溶液を 5 mg/dl の濃度に調製し、この 4 cc に対して、pH 3.0~11.0 の緩衝液を加えて全量 5 cc とした試験管列に対して両線維束を加え、bilirubin に依る染色性を吟味した成績は表 3 の通りで、染色性は全く認められず、従つて両線維間の被染色性の優劣の決定は出来なかつた。

表 3 結晶 bilirubin tween 80 水溶液に依る 膠原、類弾力線維染色所見

pH	膠原線維			優劣	類弾力線維		溶液所見	
	変性	染色性	緑色調		染色性	緑色調	濃度	沈澱
3.0	卅	-	-		-	-	-	-
4.0	卅	-	-		-	-	-	±
4.5	+	-	-		-	-	+	+
5.0	±	-	-		-	-	卅	卅
5.5	±	-	-		-	-	卅	卅
6.0	-	-	-		-	-	卅	卅
6.5	-	-	-		-	-	卅	卅
7.0	-	-	-		-	-	卅	卅
7.5	-	-	-		-	-	卅	卅
8.0	-	-	-		-	-	卅	卅
8.5	-	-	-		-	-	+	+
9.0	-	-	-		-	-	-	-
9.5	-	-	-		-	-	-	-
10.0	-	-	-		-	-	-	-
10.5	-	-	-		-	-	-	-
11.0	-	-	-		-	-	-	-

2. 3. bilirubin ソーダ塩による染色性の検討

結晶 bilirubin ソーダ塩の 5 mg/dl の水溶液 4 cc に対して、pH 3.0~11.0 の緩衝液各 1 cc を加えて全量 5 cc とした試験管列に両線維束を加えて、bilirubin に対する被染色性を吟味した成績は表 4 の通りである。pH 3.0 及び pH 4.0 於いて、bilirubin は黄色沈澱し、溶液は全く透明となり両者とも被染色性不良であり、更に膠原線維が酸の為に膨化し特有の構造光沢を失い、従つて両者間の被染色性の優劣を論ずることは出来なかつた。pH 4.5 に於いてもなお軽度に膠原線維の膨化が認められるが、染色性は増加し線維の色調は溶液の色調に優り、溶液中に於いても明らかに染色された線維束として認められる。両者間の被染色性については、明らかに膠原線維に優位が認められる。pH 5.0 に至り、膠原線維の膨化はほとんど認められず被染色性は更

表 4 結晶 bilirubin ソーダ塩水溶液に依る 膠原、類弾力線維染色所見

pH	膠原線維			優劣	類弾力線維		溶液所見	
	変性	染色性	緑色調		染色性	緑色調	濃度	沈澱
3.0	卅	-	/	/	-	/	卅	卅
4.0	卅	±	-	=	±	-	卅	卅
4.5	+	+	-	>	+	-	+	卅
5.0	±	卅	-	>	卅	-	+	+
5.5	-	卅	-	>	卅	-	+	+
6.0	-	卅	±	>	卅	±	±	+
6.5	-	卅	+	>	卅	+	±	±
7.0	-	卅	卅	>	卅	卅	-	±
7.5	-	卅	卅	>	卅	卅	-	±
8.0	-	卅	卅	≧	卅	卅	-	-
8.5	-	卅	卅	≧	卅	卅	-	-
9.0	-	卅	卅	=	卅	卅	-	-
9.5	-	卅	卅	=	卅	卅	-	-
10.0	-	卅	卅	≦	卅	卅	-	-
10.5	-	卅	卅	=	卅	卅	-	-
11.0	-	卅	卅	≦	卅	卅	-	-

に増加し、pH 5.5 にて最高に達し以後 pH 11.0 に至るまで大略不変である。注目すべきは pH 11.0 のアルカリ性に至るまで水溶液の色調の変化は全く認められず、美しい黄金色であるにも拘わらず、pH 6.0 より両線維に緑色調が認められ、pH の増加とともに緑色調が増加する。pH 8.0 に至り両線維束は全く濃緑色に染色されている。また両線維間の被染色性の優劣を検討すると、pH 5.0 より pH 11.0 の間に於いて、軽度ながら膠原線維に優位の傾向が認められた。

2. 4. 天然塩型 bilirubin による染色性の検討

天然塩型 bilirubin を 5 mg/dl の濃度とし、この 4 cc に対して pH 3.0~11.0 の緩衝液各 1 cc を加えた試験管列に両線維束を加え、bilirubin に依る染色性を吟味した成績は表 5 の通りである。pH 3.0 に於いて膠原線維は全く膨化し、特有な構造を失っている為、両線維の被染色性の優劣を論じて意味がないが、両線維束は溶液の濃度とほぼ同程度に染色されている。pH 4.0 に於いてもなお軽度の膠原線維の膨化が認められるが、両線維とも明らかに溶液より濃く染色されている。pH 4.5 に於いて膠原線維の膨化の傾向はほとんど認められず、軽度ながら膠原線維の被染色性の優位がみとめられる。染色の程度は pH の増加と共に次第に増加し、

表5 天然塩型 bilirubin 水溶液に依る膠原、
類弾力線維染色所見

pH	膠原線維			優劣	類弾力線維		溶液所見	
	変性	染色性	緑色調		染色性	緑色調	濃度	沈澱
3.0	+	+	-	/	+	-	+	+
4.0	+	+	-	=	+	-	+	+
4.5	±	+	-	≧	+	-	+	+
5.0	-	+	-	>	+	-	±	±
5.5	-	+	-	>	+	±	±	±
6.0	-	+	-	≧	+	±	±	±
6.5	-	+	±	>	+	±	±	-
7.0	-	+	+	>	+	+	±	-
7.5	-	+	+	≧	+	+	±	-
8.0	-	+	+	≧	+	+	±	-
8.5	-	+	+	≧	+	+	±	-
9.0	-	+	+	=	+	+	±	-
9.5	-	+	+	≧	+	+	±	-
10.0	-	+	+	=	+	+	±	-
10.5	-	+	+	=	+	+	±	-
11.0	-	+	+	=	+	+	±	-

pH 7.0 にて最高となり、以後 pH 11.0 に至るまで同程度の濃度を示すが、注目すべきはやはり溶液の色調に変化が認められないにも拘わらず、pH 7.0 に至り両線維束に軽度の緑色調が現われ、pH 7.5~11.0 の間に於いては更に増加し、両線維束が著明な帯緑褐色に染色されている点である。

2. 5. 天然エステル型 bilirubin の染色性の検討

天然エステル型 bilirubin を 5 mg/dl の濃度の水溶液とし、この 4 cc に対して、pH 3.0~11.0 の緩衝液各 1 cc 加えた試験管列に、両線維束を加えて観察した成績は表 6 の通りである。この実験の成績で特に注目すべきは、他の型の bilirubin 水溶液に比して、天然エステル型 bilirubin 水溶液の染色性が極めて強い点である。pH 3.0 に於いて膠原線維は酸の為に膨化し、特有な構造を失う為、両線維間の染色性の優劣を論じ得ないが、両者とも溶液の濃度より明らかに濃く黄褐色に染色されている。pH 4.0 に於いて、膠原線維束の光沢がやや減ずるも膨化の傾向はなく、両線維とも pH 3.0 より更に濃度が増加している。而して軽度ながら膠原線維に染色性の優位が認められる。pH 4.5~5.0 に於いて、線維の変化はほとんど認められない。pH の増加とともに両線維束とも次第に濃度を増加し、

表6 天然エステル型 bilirubin 水溶液に依る
膠原、類弾力線維染色所見

pH	膠原線維			優劣	類弾力線維		溶液所見	
	変性	染色性	緑色調		染色性	緑色調	濃度	沈澱
3.0	+	+	-	/	+	-	-	±
4.0	+	+	-	≧	+	-	-	±
4.5	±	+	-	=	+	-	-	±
5.0	±	+	-	=	+	-	-	-
5.5	-	+	-	>	+	-	-	-
6.0	-	+	-	>	+	-	-	-
6.5	-	+	-	≧	+	-	+	-
7.0	-	+	-	≧	+	-	+	-
7.5	-	+	±	≧	+	±	+	-
8.0	-	+	+	≧	+	+	+	-
8.5	-	+	+	≧	+	+	+	-
9.0	-	+	+	≧	+	+	+	-
9.5	-	+	+	≧	+	+	+	-
10.0	-	+	+	≧	+	+	+	-
10.5	-	+	+	≧	+	+	+	-
11.0	-	+	+	≧	+	+	+	-

pH 7.0 に於いて最高となり以後 pH 11.0 に至るまで不変であるが、水溶液中の bilirubin が強く両線維束に吸着される為、その濃度が著しく低下した。天然エステル型 bilirubin に於いても、中性よりアルカリ性側に於いて溶液の色調に変化なく、緑色調が全く存在しないのにも拘わらず線維の緑色調が認められ、pH 11.0 に於いて明らかな緑黄色を示す。

3. 小 括

両線維は黄疸患者血清に対しては非常に弱い被染色性を示すに反して、結晶 bilirubin 溶液以外の各種 bilirubin 水溶液には、強い被染色性を示す。その順位は、天然エステル型 bilirubin, 天然塩型 bilirubin, 結晶 bilirubin ソーダ塩の順である。pH 3.0~4.0 に於いては膠原線維が膨化し、特有な構造を失う為、両線維間の染色性の優劣を論ずることは不可能であるが、pH 4.5 以上に於いては、軽度ながら膠原線維に染色性の優位の傾向が認められる。また両線維束が良好な被染色性を示した各種 bilirubin 水溶液中に於いては、溶液の色調に変化はないが、溶媒中の pH が中性よりアルカリ性に傾くと、線維のみ著明な緑色調を呈するに至る。

IV. biliverdin の動物線維に対する染色性についての検討

1. 実験方法

純粹結晶 bilirubin より Lemberg, R. & Legge, J. W.¹⁹⁾ の方法に従つて調製した biliverdin 1.5 mg に対して 1/10 規定の苛性ソーダ 2 cc を加え, 更に再蒸溜水 20 cc を加えて完全に溶解後, 1/10 規定の塩酸を加えて中和し, 更に再蒸溜水を加えて, 総量 40cc の bilirubin ソーダ塩水溶液を調製する。

2. 実験成績

2. 1. biliverdin ソーダ塩による染色性の検討

biliverdin ソーダ塩水溶液 4cc に対して, pH 4.0 ~10.0 の緩衝液各 1 cc を加えた試験管列に線維束を投入し, 5°C の氷室中に 5 日間放置後, 観察した成績は表 7 に示す通りである。即ち pH 4.0 に於

表 7 biliverdin ソーダ塩水溶液に依る膠原, 類弾線維染色所見

pH	膠原線維			優劣	類弾力線維		溶液所見		
	変性	染色性	緑色調		染色性	緑色調	濃度	色変調	沈澱
4.0	+	+	+	+	+	+	+++	-	+++
5.0	+	+	+++	>	+	+++	±	-	+
6.0	-	+	+++	>	+	+++	-	-	±
6.5	-	+	+++	>	+	+++	-	-	-
7.0	-	+	+++	>	+	+++	-	-	-
7.5	-	+	+++	>	+	+++	-	-	-
8.0	-	+	+++	>	+	+++	-	-	-
9.0	-	+	+++	>	+	+++	-	-	-
10.0	-	+	+++	>	+	+++	-	-	-

いては, 膠原線維は膨化し有な構造を全く消失し, 且つ biliverdin は完全に沈澱し溶液は全く透明となり, 従つて両線維の染色は全く認められない。pH 5.0 に於いても軽度の緑色沈澱を認めるが, 両線維ともよく緑色に染色されている。pH 5.5 に至り沈澱は全く認められず, 線維は美しい濃緑色に染色され, その程度は溶液の濃度よりはるかに大である。また両線維束間の被染色性の優劣を判定すると軽度ながら膠原線維にその優位が認められる。

2. 2. biliverdin ソーダ塩と bilirubin ソーダ塩を混じた場合の染色性の検討

上記の biliverdin ソーダ塩水溶液 1 cc に対して, 4 mg/dl の bilirubin ソーダ塩水溶液 7 cc を加え,

更に pH 7.5 の緩衝液 2 cc を加えて総量 10 cc とし, これを 2 分して 1 つを対照に取り, これに両線維束を加えて遮光し 5°C の氷室中に保存する。溶液は軽度の緑色調を有する黄色, すなわち帯緑黄色を示した。20 時間後の観察では, 両線維束とも溶液と同様の色調に染色され特別に緑色調の増加を認めず, 溶液も亦対照と色調上の差異を認めなかつた。更に 4 日後観察を行なつた所, 両線維束の緑色調は増加し濃緑色を呈したが, 溶液の色調は対照と全く差異を認めず, 溶液の緑色調の減少傾向は全く認められなかつた。軽度ながら膠原線維に染色性の優位の傾向が認められた。

3. 小 括

biliverdin ソーダ塩水溶液は, bilirubin ソーダ塩水溶液と同程度の染色性を有する。而して両線維に対する染色性では膠原線維において多少の優位を示す。

V. 総括並びに考按

Gassmann²⁰⁾ は aceton 並びに alcohol 抽出を行なつた後 diazo 試薬を用いて, 組織の bilirubin 含量を測定したが, 皮膚のどの部位が最も染着され易いかに就いては何ら検討しなかつた。1930年 F. Rosenthal は Ernst & Forster 法に従つて各種組織, 臓器中の bilirubin 含有量を測定すると共に, 弱アルカリ性 bilirubin 水溶液並びに黄疸血清による膠原, 弾力両線維, 脳等の染色状態を吟味し, 弾力線維が極めて強い bilirubin 親和性を有するに対し, 膠原線維等は親和性が弱く, 従つて黄疸の本態は bilirubin が弾力線維と結合する結果と考えた。

そこで著者は先ず F. Rosenthal の説が正しいかどうかを, 人体皮膚特に黄疸著明な患者の皮膚につき検討した。而してその際皮膚に染着した bilirubin が, 採取より組織切片の作製乃至染色までの操作において変化する事を極力さけるため, 妹尾教授考案になる凍結乾燥器を使用して検討した。その結果皮膚組織は一様に bilirubin により染色され, 真皮の大部分は膠原線維であつて, 特に弾力線維のみ黄染される等の所見は全く得られなかつた。このことは既に F. Rosenthal の説を否定するものであつた。又この際皮膚に黄褐色の顆粒を認めたが, これは bilirubin 顆粒ではなくて, melanin 及び一部では siderin であつた。従つて黄疸時の皮膚は bilirubin により一様に染色されるもので, 特定の線維が染色されるものではないこととなる。

然しながらこの結果より bilirubin が特定線維のみを染色するとの説を全面的に否定する結果にはならないので、幼若白鼠の尾腱の膠原線維を F. Verzář の方法で採取したもの、及び F. Verzář の方法でこれに加熱変性を施した線維につき bilirubin、更には biliverdin を用いてその染色性を検討することとした。処で F. Verzář によれば幼若白鼠腱の膠原線維は、collagen が主成分であるが、これに F. Verzář の方法で加熱変性を施すと elastoid となり、弾力線維の主成分たる elastin と近似し、その染色性その他は殆んど一致するという。而して蛋白質 collagen と elastin は染色性を異にし、前者は酸性色素に、後者は塩基性色素に染色されるという。

教室藤井(俊)は色素としての bilirubin 特に天然 bilirubin の性状に検討を加えているので、藤井(俊)の方法を参照し、結晶 bilirubin を井上の方法で tween 80 を用いて水溶液としたもの、bilirubin ソーダ塩、天然塩型並びにエステル型 bilirubin により、反応溶媒の pH を変えて、両線維の染色状態を追及した。その際 pH が酸性に傾くと膠原線維は膨化し染色性を判定することが困難であつたが、いずれも pH 7.0 附近において最も染色性が強く、その程度は膠原線維においてやゝ良好であつた。更に興味あることは pH をアルカリ性側に傾けると染着した bilirubin のみ biliverdin に変化して行くのがみられた。又 bilirubin ソーダ塩及び天然塩型 bilirubin、ester 型 bilirubin の染色状態をみると、天然 ester 型 bilirubin が他に比し染色性が極めて強かつた。このことは患者血清をもつて染色する場合その染色度は血清 bilirubin 濃度にも関係するが、特に直接 bilirubin の濃度に関係する結果とよく一致している。

斯様にして bilirubin を用い collagen 或いは elastoid を主成分とする線維を染色する場合は、酸性或いは塩基性染料を用いての染色の如く劃然とした差異を認めることは出来なかつたが、むしろ collagen への染着の方が良好であり、而も直接就中 ester 型 bilirubin が優れていたこととなる。而もこの際アルカリ性溶媒中での染色を行なうと、染色後の bilirubin は容易に biliverdin 変化した。

又 bilirubin に代え biliverdin を用いた場合の両線維の染色状態も、bilirubin の場合と同様、同程度であつた。

そこで黄疸時の皮膚の bilirubin による染色は特定部位乃至特定線維のそれではなく、一様に染着す

みもので、その意味で F. Rosenthal の説は信じ難く、蛋白 collagen と elastin 又は elastoid と bilirubin の染着にはむしろ前者が秀れていた。又 Verdinkterus を生じる biliverdin の出現は染着した bilirubin が溶媒の pH の変動により変化して生じたものといえる。

VI. 結 論

黄疸患者皮膚の bilirubin の沈着部位並びに、皮膚緑色調の原因を明らかにする目的をもつて、凍結乾燥法を採用し、組織化学的検索を行なうと同時に幼若白鼠尾腱を使用し、黄疸患者血清及び各種 bilirubin 水溶液に対する collagen、elastoid を主成分とする両線維の被染色性に関する試験管内実験を行ない次の結論を得た。

- 1) bilirubin に染色された皮膚の組織化学的検索には凍結乾燥法を応用し、満足すべき成績を得た。
- 2) 黄疸患者皮膚の bilirubin 染色状態は特定部位乃至線維ではなくて、一様に染色されている。
- 3) collagen、elastoid をそれぞれ主成分とする線維を結晶 bilirubin、bilirubin ソーダ塩、天然塩型及び ester 型 bilirubin のそれぞれの水溶液、黄疸患者血清に依り各種 pH の緩衝液中で染色すると、ester 型 bilirubin に最もよく染色され、いずれも pH 7.0 が至適で、pH がアルカリ性に傾くと染着した bilirubin のみ biliverdin に変化し易い。
- 4) 上記の両線維を bilirubin と同様に biliverdin で染色すると、bilirubin とほぼ同程度に染着した。
- 5) 従つて黄疸時皮膚の染着は F. Rosenthal の唱える如く弾力線維 elastin におけるものでなく、広く皮膚全体にみられ、elastoid よりむしろ膠原線維 collagen に強い。而して皮膚の pH がアルカリ性に傾けば容易に染着した bilirubin は biliverdin に変じ、それによつて Verdinkterus を生ずる事となる。

稿を終るに当り恩師小坂教授の御懇篤なる御指導と御校閲を感謝すると同時に、凍結乾燥法につき御懇篤なる御指導を下された岡山大学医学部病理学教室妹尾教授、大谷助手、吉沢助手、内海助手に深謝する。

主要参考文献

- 1) Brugsch, Th. . Lehrbuch der inneren Medizin, Berlin ; Urban and Schwarzenberg 1102—1104 (1940)
- 2) 藤井(俊)・医学研究, 22巻2号. 143—149(昭27)
- 3) Rosenthal, F. : Klin. Wschr. 9, 1909—1914 (1930)
- 4) Neumann, K. : Handbuch der Histochemie, Gustav Fischer Verlage Stuttgart 1—77(1958)
- 5) 中村 : 真空技術と凍結乾燥, 納谷書店, 東京(昭32)
- 6) 桐野 : 新しい組織学研究法, 医歯薬出版株式会社, 東京, 284—303 (昭30)
- 7) 白木, 山本, 室伏 : 日本精神神経誌, 56巻2号, 111—123 (昭30)
- 8) 中島, 辻井, 直良 : 科学, 20巻5号, 204—211 (昭30)
- 10) 吉沢 : 岡山医学会誌, 71巻3の1号, 971—1008 (昭34)
- 11) Stein, J. . comp. rend soc. biol. 120, 1136—1138 (1935)
- 12) Okamoto, K. : Hyogo J. Med. Sci. 1, 89—100 (1952)
- 13) 岡本, 上田, 前田 : 顕微鏡的組織化学, 医学医院, 東京, 327—332, 503—509 (昭30)
- 14) Glenner, G. : Amer. J. Cli. Path. 27, 1—5 (1957)
- 15) Verzár, F. : Gerontologia 1, 363—378 (1957)
- 16) 井上・生化学, 30巻11号, 69 (昭33)
- 17) 吉光・医学研究, 25巻2号, 74—81 (昭30)
- 18) 近藤・医学研究, 29巻4号, 46—53 (昭34)
- 19) Lemberg, R. & Legge, J.W. : Aust. J. exp. Bil. Med. Sci., 18, 95 (1940)
- 20) Gassmann, F.K. : Klin. Med. 114, 447—480 (1930)

Studies on the Oxidation-Reduction Potential and the Bilirubin
Deposition of Skin in Jaundiced Patients

Part II. Studies on the Bilirubin Deposition of
Skin in Jaundiced Patients

By

Tetsusabro Ishimitsu

The First Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School
(Director : Prof. K. Kosaka)

With the purpose to clarify the deposited region of bilirubin and the cause of green tone in the skin of jaundiced patients, the author made the histochemical observation, employing the freezing-drying and also made the observation on the stainability of both fibers, being chiefly composed by collagen and elastoid, to the serum of jaundiced patient and various bilibubin solutions in vitro, using the tail's tendon of young white rat. And the results were as follows.

1. The author applied the freezing-drying to the histochemical studies on the skin stained by bilirubin and got the satisfactory results.

2. As for the staining condition of bilirubin in the skin of jaundiced patient, it was diffuse, but not the paticular region or fiber.

3. Staining the fiber, being chiefly composed by collagen and elastoid, by each solution of cristallin bilirubin, bilirubin soda salt, natural salt-form and ester-form bilirubin and serum of jaundiced patients in the buffer solutions with various pH value, the stain-

bility was the best on the use of ester-form bilirubin and the best pH value was 7.0, and the deposited bilirubin was easily changed to biliverdin on the shift of pH to alkaline side.

4. Staining the above both fibers by biliverdin as same as bilirubin, its staining deposition was the same degree with that of bilirubin.

5. Therefore, the staining deposition of skin in jaundice was not in the elastin of elastic fiber as put forward by F. Rosenthal, it was diffusely seen in the whole of skin and it was rather strong in the collagenous fiber than elastoid. Shifting the pH of skin to alkaline side, the deposited bilirubin was easily changed to biliverdin and Verdinikterus was occurred from it.
