

腸管内 bilirubin の還元過程に関する研究

第 2 編

抗生剤内服患者の尿濾液を以てする bilirubin の還元について

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

今井春路郎

〔昭和34年9月23日受稿〕

緒 言

Urobilinogen が腸内細菌叢により bilirubin より生成されることは Fr. V. Müller 以来多くの研究者によつて確認されており, 就中これらの研究を試験管内実験により確認しようとする試みは H. Kämmerer & K. Miller, H. Kleinschmidt, T. Baumgärtel, 教室野呂, 重井らによつてなされている。

著者は第1編において抗生剤服用中の患者の尿を column chromatography により分析し, bilirubin, dihydrobilirubin, mesobilirubin, dihydro-mesobilirubin, urobilin 等を分離証明し, 腸内 urobilinogen の生成は腸内細菌叢により bilirubin より恰も試験管内で bilirubin を膠状 palladium により還元して mesobilirubinogen を生成すると同一の過程を通じ行われるものと考えた。

そこでこの考察を明確にするため, 実験を試験管内に移し, bilirubin の還元過程を追及した結果, 興味ある所見をえたので報告する。

実験材料並に実験方法

1. 実験材料

1.1. 尿濾液の調製

抗生剤服用患者の尿を滅菌しシャーレに採取し, 糞塊中央部より10白金耳の糞を採り, 滅菌生理的食塩水 10cc に混和し, 十分攪拌後滅菌ガーゼにて濾過したものを使用した。

1.2. 磷酸塩 pepton 水調製

Pepton 10g, KH_2PO_4 0.3g, NaHPO_4 6.5g, 蒸溜水 750cc, 以上 100°C 30分間滅菌, pH 7.8 に修正して濾過, 濾液を 15cc 宛試験管に分注し, 100°C 30分間2日にわたり間歇滅菌したものを使用し

た。

1.3. 2.0%滅菌葡萄糖水溶液調製

2.0%葡萄糖液を 100°C 10分間滅菌直ちに冷却す。

1.4. 結晶 bilirubin の natrium塩液調整

Merk 製結晶 bilirubin 25mg を滅菌N/20苛性ソーダ 20cc に溶解させた後, 蒸溜水を加えて 100cc とし, 滅菌N/10塩酸にて pH 7.6 に修正し, 100°C 10分間滅菌し, 直ちに冷却して使用した。

2. 実験方法

2.1. bilirubin に尿濾液を作用させて嫌気性条件下に培養する場合。

滅菌磷酸塩 pepton 水 15cc に 2.0%滅菌葡萄糖水溶液 1cc を加え, 100°C 10分間滅菌し, 直ちに冷却したものに, 滅菌 bilirubin natrium 塩溶液 2.0cc, 滅菌蒸溜水 1.8cc, 尿濾液 0.2cc を加え, 全量 20cc とし, 之に約 1cm の厚さに滅菌流動 paraffin を重層し, 綿栓間に鉛糖紙を挿み, 嫌気培養槽におさめた。培養槽は吸引ポンプで充分排気した後, Kippeの装置により発生させた水素ガスにて充満させ, 残存酸素ガスは予め培養槽におさめてある焦性没食子酸 2g を10%苛性カリ 20cc に溶解した液で吸収させ, 37°C 遮光裡に培養した。

2.2. bilirubin に尿嫌気性培養液を作用させて嫌気性条件下に培養する場合。

尿濾液 0.2cc を磷酸塩 pepton 水 15cc に加え, 上記と同様の嫌気性培養を行い, 24時間後, その培養液 0.2cc を 2.1.の尿濾液に代えて同様嫌気性培養を行った。

2.3. 培養液中の bilirubinoide 分割の分離法

第1編の尿中 bilirubinoide 分割分離法と同様の column chromatographyを行った。

表1 bilirubin に尿濾液を作用させ嫌気性条件下に培養した培養液の分析

培養実験 (濾液添加)						
時間	層	m μ	D.R.	G.R.	A.R.	S.R.
12時間	I	430 450	+直 間	+	-	-
	II	430 410	+直	+	-	-
	III	425	+間	+	-	-
24時間	I	430 450	+直 間	+	-	-
	II	425	+間	+	-	-
	III	410 (425)	±直	±	-	-
36時間	I	450 (430)	+間	+	-	-
	II	425 (410)	+間	+	-	-
	III	415 (425)	+直	+赤	-	-
48時間	I	450 425	+間 +間	+	-	-
	II	415	+直	+赤	-	-
	III	490	-	-	-	+緑
72時間	I	(425) (490)	-	-	-	-
	II	(490)	-	-	-	-
	III	490	-	-	-	+緑

実験成績

1. bilirubin に尿濾液を作用させて嫌気性条件下に培養する場合

1.1. 12時間培養液について

イ) Chloroform 分割部では濃黄褐色の先行部に境界不明瞭な淡黄色部が続いた。前者吸収の極大は 450 m μ , 後者は 430m μ であつた。その定性反応では 450 m μ に吸収極大を有するものは Ehrlich 氏 diazo 反応 (以下 D.R. と略) 間接反応陽性, Gmelin 反応 (以下 G.R. と略) 陽性, Ehrlich 氏 aldehyde 反応 (以下 A.R. と略) 陰性, Schlesinger 蛍光反応 (以下 S.R. と略) 陰性, 430m μ に吸収極大をもつものは D.R. 直接反応陽性, G.R. 陰性, A.R. 陰性, S.R. 陰性で前者は間接 bilirubin, 後者は直接 bilirubin であつた。

ロ) Acetic-ether 分割部は淡黄色で吸収の極大は 430m μ で小なる吸収の極大 410m μ もあつた。その定性反応は D.R. 直接反応陽性, G.R. 陽性, A.R.

表2 bilirubin に尿嫌気性培養液を作用させて嫌気性条件下に培養した培養液の分析

培養実験 (嫌気培養液添加)						
時間	層	m μ	D.R.	G.R.	A.R.	S.R.
12時間	I	430 450	+直 間	+	-	-
	II	415 (430)	+直	+赤	-	-
	III	435 (425)	+直	-	-	-
24時間	I	450 (430)	+間	+	-	-
	II	425	+間	+	-	-
	III	410	-	±	-	-
36時間	I	450 (425)	+間	+	-	-
	II	415	+直	+赤	-	-
	III	410 (490)	±直	±	-	-
48時間	I	450 425	+間 +間	+	-	-
	II	415	+直	+赤	-	-
	III	490 435	- +直	-	-	+緑 -
72時間	I	(430) (425)	-	-	-	-
	II	(425)	-	-	-	-
	III	490	-	-	-	+緑

陰性, S.R. 陰性で直接 bilirubin である。

ハ) Metanol 分割部は淡黄色で吸収の極大を 425 m μ にもつ単一曲線で, 定性反応では D.R. 間接反応陽性, G.R. 陽性, A.R. 陰性, S.R. 陰性で mesobilirubin と考えられる。

1.2. 24時間培養液について

イ) Chloroform 分割部は 12時間と同様間接並に直接 bilirubin であつた。

ロ) Acetic-ether 分割部は淡黄色で 425 m μ に吸収の極大あり, D.R. 間接反応陽性, G.R. 陰性, A.R. 陰性, S.R. 陰性で mesobilirubin であつた。

ハ) Methanol 分割部は淡黄色で, 410m μ に吸収の極大があり, 425m μ の部に小なる吸収の極大あり, D.R. 疑陽性, A.R. 陰性, S.R. 陰性で mesobilirubin 及び不明物質の混入がみられた。

1.3. 36時間培養液について

イ) Chloroform 分割部は 24時間培養のものとはほぼ同様であつた。

ロ) Acetic-ether 分割部も 24時間のものと同様。

表 3 各疾患時の尿の分析

症例	病名	抗 生 剤	chloroform			acetic ether			methanol				
			m μ	D.R.	G.R.	A.R.	m μ	D.R.	G.R.	A.R.	m μ	D.R.	G.R.
1	慢性肝炎 胆嚢症	Chloramphenicol (1日1g 4ヶ月間)	450 +間 425 +間	+	-	+	-	+	+	490 - - -			
2	慢性肝炎 胆嚢症	Achromycin (1日1g 20日間)	450 +間 425 +間	+	-	+	-	+	+	570 > - - - 590 >			
3	再発性肝炎 胆嚢症	Terramycin (1日1g 2ヶ月間)	450 +間 440 +直	+	-	+	-	+	-	490 - - -			
4	肺結核	Gelmycin (1日30g 1ヶ月間)	450 +間	+	-	+	-	+	+	490 - - -			
5	胆嚢症	Achromycin (1日1g 1ヶ月間)	450 +間 425 +間	+	-	+	-	+	+	490 - - -			
6	胆嚢症	Achromycin (1日1g 3ヶ月間)	450 +間 425 +間	+	-	+	-	+	+	490 - - -			
7	遷延性敗血症	Achromycin (1日1g 6ヶ月間)	450 +間 425 +間	+	-	+	-	+	+	490 - - -			
8	遷延性敗血症	Achromycin (1日1g 4ヶ月間)	450 +間 425 +間	+	-	±	-	+	+	564 > - - - 940 >			

ハ) Methanol 分割部は淡黄色で 415m μ に吸収の極大があり、他に 425m μ の部に小なる吸収の山を認めその定性反応は D.R. 直接反応僅かに陽性、G.R. 赤色調陽性、A.R. 陰性、S.R. 陰性で dihydromesobilirubin を主成分と考えた。

1.4. 48時間培養液について

イ) Chloroform 分割部では先行する黄褐色部と之と境界不明瞭な淡黄色部があり、前者は 450m μ に吸収極大をもち D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R. 陰性、S.R. 陰性で間接 bilirubin、後者は 425m μ に吸収極大をもち、D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R. 陰性、S.R. 陰性で mesobilirubin であつた。

ロ) Acetic-ether 分割部は淡黄色で 415m μ に吸収の極大あり、D.R. 直接反応陽性、G.R. 赤色調陽性、A.R. は長時間後陽性、S.R. 陰性で dihydromesobilirubin であつた。

ハ) Methanol 分割部は黄褐色で吸収の極大は 490m μ 、D.R. 陰性、G.R. 陰性、A.R. 陰性、S.R. は緑色の螢光を示し、その亜鉛錯塩は 506m μ に極大を示し、urobilin IX, α 又は stercobilin であると考えられる。

1.5. 72時間培養液について

イ) Chloroform 分割部は黄褐色で吸収の極大は 490m μ 及 425m μ に認めたがその定性反応は D.R.

陰性、G.R. 陰性、A.R. 陰性、S.R. 陰性。

ロ) Acetic-ether 分割部は淡黄褐色で小なる吸収の極大が 490m μ にあつたが定性反応はすべて陰性であつた。

ハ) Methanol 分割部は褐色で、吸収の極大は、490m μ 、D.R. 陰性、G.R. 陰性、A.R. 陰性、S.R. は緑色の螢光を示しその亜鉛錯塩は 506m μ に極大を有し、urobilin IX, α 又は stercobilin であると考えられる。

2. bilirubin に尿嫌気性培養液を作用させて嫌気性条件下に培養する場合

2.1. 12時間培養液について

イ) Chloroform 分割部では濃黄褐色の先行部に境界不明瞭な淡黄色部が続いた。前者の吸収極大は 450m μ 、後者は 430m μ その定性反応は前者では D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R.、S.R. 陰性で間接 bilirubin、後者は D.R. 直接反応陽性、G.R. 陽性、A.R. 陰性で直接 bilirubin であつた。

ロ) Acetic-ether 分割部では 415m μ に吸収極大をもち、他に 430m μ に小さい吸収極大を示した。D.R. 直接反応陽性、G.R. は赤色調を示し、A.R. は長時間観察で陽性を示し、S.R. 陰性で、主として dihydromesobilirubin を、一部は直接 bilirubin の混入が考えられる。

ハ) Methanol 分割部は淡黄色で、435m μ に吸収

極大をもち、他に 425 μ に小さい吸収の山を認める。定性反応では D.R. 直接反応を軽度に認めるが、色素が稀薄なためか、G.R., A.R., S.R. 等は証明出来なかつた。

2.2. 24時間培養液について

イ) Chloroform 分割部は濃黄色で、450 μ に主として吸収の山を示すが、一部 430 μ に小さい吸収の山を認め、D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R., S.R. 陰性で、主として間接 bilirubin と考えられる。

ロ) Acetic-ether 分割部は 425 μ に吸収の極大をもつ単一の曲線を描き、D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R., S.R. 陰性で、mesobilirubin が考えられる。

ハ) Methanol 分割部は淡黄色で 410 μ に吸収の極大があり、D.R. 陰性、G.R. 疑陽性、A.R., S.R. 陰性で、判定が不能であつた。

2.3. 36時間培養液について

イ) Chloroform 分割部は帯褐濃黄色で、吸収の極大は 450 μ にあるが、一部小さい山を 425 μ に認め、D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R., S.R. 陰性で主として間接 bilirubin である。

ロ) Acetic-ether 分割部は黄色調で、415 μ に吸収極大をもつ、単一の曲線を示し、D.R. 直接反応陽性、G.R. 赤色調を示し、A.R. は長時間後陽性、S.R. 陰性で dihydromesobilirubin が考えられる。

ハ) Methanol 分割部は淡黄色で 410 μ に吸収の極大があり、外に 490 μ 附近に小さい山がある。D.R. 直接反応、G.R. 疑陽性、A.R., S.R. 陰性で識別困難。

2.4. 48時間培養液について

イ) Chloroform 分割部は先行する黄褐色部と、これと境界不明瞭な淡黄色部があり、前者は 450 μ に吸収極大をもち、D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R., S.R. 陰性で、間接 bilirubin であり、後者は 425 μ に吸収極大をもち、D.R. 間接反応陽性、G.R. 陽性、A.R., S.R. 陰性で、mesobilirubin が考えられる。

ロ) Acetic-ether 分割部は淡黄色で 415 μ に吸収の極大があり、D.R. 直接反応陽性、G.R. 赤色調を示し、A.R. は長時間後陽性、S.R. 陰性で、dihydromesobilirubin と診定される。

ハ) Methanol 分割部は黄褐色で、後に淡黄色部がおくられて流出する。前者は 490 μ に吸収の極大が

あり、D.R., G.R., A.R. 陰性で、S.R. は緑色の螢光を示し、その亜鉛錯塩は 506 μ に極大を示し、urobilin IX, α 又は stercobilin であると考えられる。後者は 435 μ に吸収極大を示し、D.R. 直接反応軽度陽性、G.R., S.R. 陰性で判定は困難であつた。

2.5. 72時間培養液について

Chloroform 分割部、acetic ether 分割部ともに著しく稀薄で、前者は 430, 425 μ に吸収の極大を、後者は 425 μ にそれを持つが、その極大はいずれも小で、定性反応は液が稀薄なため判定が困難であつた。

Methanol 分割部は淡黄褐色で、490 μ 附近に吸収の極大があり、D.R., G.R., A.R. 陰性で、S.R. は緑色の螢光を示し、その亜鉛錯塩は 506 μ に極大を示し、urobilin を考える。

総括並に考按

Bilirubin に抗生剤服用患者の尿濾液を作用させ、嫌気性条件下で培養し経時的に培養液中の bilirubinoide の分割を分析してみると、培養 12 時間後では間接 bilirubin, 直接 bilirubin, mesobilirubin を、24 時間後では略々同様の分割を、36 時間後では更に dihydromesobilirubin を、48 時間後では更に urobilin を分離証明し、72 時間後では urobilin のみ識別しえた。

以上により bilirubin は尿濾液により還元されて、mesobilirubin, dihydromesobilirubin, urobilin に変化することがわかる。即ち既に第 1 編において推定した通り、bilirubin は腸管内において mesobilirubin, dihydromesobilirubin をへて urobilinogen に還元されることがわかる、尙直接 bilirubin の生成は bilirubin が還元されて生成されると考えるよりも、培養液中の塩類その他と結合し、直接 bilirubin が生成されたものと考えの方が教室従来の研究よりすれば妥当と思われる。

処で尿濾液により bilirubin が還元される場合、T. Baumgärtel は腸管粘膜中の還元酵素により還元されて、mesobilirubinogen の生成されることを強調しているので、尿濾液の少量を磷酸塩 pepon 水中で 24 時間嫌気性培養し、その培養液の一部を bilirubin に作用させて前同様に bilirubinoide の生成状態を追及してみると、12 時間後に間接 bilirubin, 直接 bilirubin, dihydromesobilirubin を、24 時間後間接 bilirubin, mesobilirubin を、36 時間後 di-

hydromesobilirubin を、48時間後間接 bilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin, urobilin を証明し、72時間後には urobilin のみを証明した。斯くて尿濾液に依り bilirubin が順次還元され、その過程は H. Fischer が膠状 palladium を用い、bilirubin を還元して来た過程と同一過程を辿ることが証明され、その濾液中の作用物質は混入する腸粘膜中の酵素ではなく、嫌気性菌であると考えられる。

H. Kämmerer & K. Miller は大腸菌、腸球菌、Vibrio 及び各種の嫌気性菌が、それぞれ単独でなく、共存により bilirubin を urobilinogen に還元するといひ、H. Kleinschmidt は Fraenkel の Gasbacillen 単独並びに或種の嫌気性菌と大腸菌の共存によるとし、T. Baumgärtel は d. putrificus verrucosus によつて培地中の cystin が先ず cystein に還元され、次いで E. coli の脱水素酵素による cystein よりの活性水素が bilirubin に与えられて stercobilinogen が形成されると考えた。教室の重井は T. Baumgärtel の実験を追試し、E. Coli の単独によつて還元は行われぬが、cystein を担体とする脱水素酵素系には疑問を懐いた。

ともあれ腸内細菌叢により bilirubin は恰も試験管内で膠状 palladium により生成されると同様な過程を、順次へて urobilinogen に生成されるもので、urobilinogen 生成に関する2元説は妥当でないと考え

える。

結 論

抗生剤服用患者の尿濾液及びこれを予め24時間磷酸塩 pepton 水中で嫌気性培養した培養液を bilirubin に作用させ、嫌気性条件下で培養し、培養液中の bilirubinoide の分割分離を試み、次の結果をえた。

1. Bilirubin に尿濾液を作用させると、12時間後には間接、直接 bilirubin, mesobilirubin を、24時間後は略々同様で、36時間後には更に dihydromesobilirubin を、48時間後には更に urobilin を分離証明し、72時間後では urobilin のみ識別した。

2. Bilirubin に、予め尿濾液の少量を磷酸塩 pepton 水中で培養した培養液を加えて、培養した結果12時間後に間接、直接 bilirubin, dihydromesobilirubin を、24時間後に間接 bilirubin, mesobilirubin を、36時間後に dihydromesobilirubin を、48時間後に間接 bilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin, urobilin を証明し、72時間後に urobilin のみ識別した。

3. 斯くて尿濾中の嫌気性菌により bilirubin は mesobilirubin, dihydromesobilirubin をへて urobilinogen に還元され、その還元過程は H. Fischer が試験管内で膠状 palladium に依り明かにした過程と同一であつた。

主 要 文 献

- 1) H. Kammerer & K. Miller : Dtsch, Arch, Klin, Med., 141, 318, 1923.
- 2) H. Kleinschmidt : Klin, Wschr, 7, 1823, 1928.
- 3) T. Baumgärtel : Physiologie and Pathologie des Bilirubinstoffwechsels als Grundlagen der Ikterusforschung, Thieme, Stuttgart, 1950.
- 4) 野呂 : 医学研究, 21, 853, 昭26.
- 5) 重井 : 医学研究, 24, 1439, 昭29.
- 6) 山岡 : 日本内科学会誌, 42, 531, 昭28.
- 7) H. Fischer & Orth, H. : Die Chemie d. Pyrrols, Bd II/I, Akadem. Verlagsges, Leipzig, 1937.

Studies on the Reduction Process of Bilirubin
in the Intestine

Part 2

Studies on the reduction of bilirubin by the fecal filtrate
of the patient with the administration of antibiotics

By

Harujiro IMAI

The First Department of Internal Medicine

Okayama University, Medical School

(Director : Prof. K. Kosaka)

Conclusions

The separation of bilirubinoide in the anaerobic cultured solution of bilirubin with the fecal filtrate of the patient taking antibiotics and the cultured solution of the above fecal filtrate in the phosphate pepton solution for 24 hours under the anaerobic condition was attempted. And the results were as follows.

1. Indirect, direct bilirubin and mesobilirubin were separated at the 12th hour, same products at the 24th hour, dihydromesobilirubin and the above products at the 36th hour and urobilin and the above products at the 48th hour after the action of fecal filtrate to bilirubin, but only urobilin was identified after 72 hours.

2. Indirect-, direct bilirubin, dihydromesobilirubin were separated at the 12th hour, indirect bilirubin and mesobilirubin at the 24th hour, dihydromesobilirubin at the 36th hour, and indirect bilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin and urobilin at the 48th hour after the anaerobic incubation of bilirubin with the cultured solution of a small amount of fecal filtrate in the phosphate pepton solution, but only urobilin was identified after 72 hours.

3. Bilirubin was reduced to urobilinogen passing through mesobilirubin, dihydromesobilirubin by anaerobic bacterial flora and its reduction process was same to the reduction process of bilirubin by colloidal palladium, clarified by H. Fischer.
