

肝疾患時の胆汁酸と Bilirubin に関する研究

第 2 編

肝疾患における血清硫酸抱合型 Bilirubin の臨床的意義

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 長島秀夫教授)

石 川 泰 祐

(昭和55年2月13日受稿)

Key words: 各種肝疾患, 血清硫酸抱合型 Bilirubin,
一般肝機能検査, 血清胆汁酸

緒 言

Bilirubin は肝細胞で抱合されて胆汁中に排泄されるが肝細胞障害が起ればこの経路に障害を生じて肝細胞内胆汁色素うっ滞, 血液側への逆流などが起り高度となれば黄疸となる。この際 bilirubin の抱合型には種々のものがあり glucuron 酸抱合型¹⁾, 硫酸抱合型²⁾, 磷酸抱合型³⁾, glycoside 型⁴⁾などがある。なお硫酸抱合型は種属により存在しないものもあるがヒトには存在する⁵⁾。教室, 河原田と高木はそれぞれ血液と胆汁を用いて bilirubin の主抱合と考えられている glucuron 酸抱合型 bilirubin は肝実質細胞障害が高度となると直接 bilirubin 中の占有率が減少することを認め報告した^{6,7)}。このことは bilirubin glucuronide 以外の抱合型 bilirubin が増加することを示している。教室, 広畑⁸⁾, 河合⁹⁾ は肝実質細胞障害時に bilirubin phosphate が増加することを示し, 渡部¹⁰⁾は胆汁中での bilirubin sulfate の増加を認めている。しかし血液中の硫酸抱合型については肝疾患時にどのように変化するか, また臨床的にはどのような意義があるかは明らかでない。そこで血清中 bilirubin sulfate を分画測定し, 肝機能検査成績と対比することによりその意義を検討した。

実験対象および材料

対象は岡山大学医学部第一内科に入院した各

種肝疾患患者で, 腹腔鏡, 肝生検, 血清生化学的肝機能検査などにより診断された血清総 bilirubin 濃度 2.0mg/dl 以上の急性肝炎25例, 慢性肝炎8例, 肝硬変症8例, 肝硬変症に合併した原発性肝癌16例の計57例である。血清試料は早朝空腹時に採取, 血清を分離, 測定当日まで-20℃にて保存した。

実験方法

1) 血清 Bilirubin 分画法

血清 bilirubin は教室, 米井¹¹⁾の溶媒分画法によった。即ち血清 1ml に chloroform 2ml を加えて振盪混和後3,000回転で5分間遠沈してえられる chloroform 相を間接 bilirubin としてとり, その残部に 0.1N HCl 1ml を加えた後 chloroform 2ml を加えて混和後遠沈してえられた chloroform 相を塩型 bilirubin としてとり, 残部に Weber & Schalm¹²⁾にならぬ塩酸を添加して pH 2.0以下としたのち chloroform 2ml を加えて混和後遠沈することよりえられた chloroform 相を bilirubin sulfate 分画とし, 残部を ester 型 bilirubin とした。

2) Ester 型 Bilirubin 分画に対する glucuron 酸 mol 比 (M.R.) について

石館ら¹³⁾による NaBH₄ を用いた Naphthoresorcinol picrate 法で ester 型 bilirubin 中の glucuron 酸量を求め次式より M.R. を求めた。

Table 1 Correlation coefficients between bilirubin sulfate and other bilirubin fractions

	total bilirubin	direct bilirubin	salt-form bilirubin	ester-form bilirubin	indirect bilirubin	molar ratio
acute hepatitis	0.78**	0.79**	0.08	0.51**	0.54**	-0.25
chronic hepatitis	0.46	0.37	0.61	0.43	0.32	-0.35
liver cirrhosis	0.98**	0.91*	0.93**	0.92*	0.99**	-0.09
hepatoma	0.70**	0.72**	0.47	0.56*	0.61*	-0.09

**P<0.01 *P<0.05

Table 2 Correlation coefficients between bilirubin sulfate and liver function tests

	GOT	GPT	Al-Pase	Ch-Ease	cholesterol	TTT	ZTT	total protein	A/G	bile acid
acute hepatitis	0.05	0.04	-0.08	-0.13	-0.57**	0.08	-0.38	-0.10	0.09	0.26
chronic hepatitis	-0.53	-0.52	-0.49	-0.78*	-0.34	-0.47	0.29	0.07	0.33	-0.16
liver cirrhosis	0.80*	-0.15	-0.21	-0.65	-0.91*	0.59	0.22	0.23	0.13	0.89*
hepatoma	-0.02	0.19	0.37	-0.14	0.48	-0.22	-0.10	-0.22	-0.42	-0.10
total	-0.01	0.12	-0.15	-0.31*	-0.45*	-0.04	0.07	0.16	0.01	0.56*

**P<0.01 *P<0.05

関がみられた。急性肝炎、肝硬変症ともに bilirubin sulfate の直接 bilirubin に対する占有率の方が総 bilirubin に対する占有率より高率であった。

4) Bilirubin sulfate と M.R. との関係

Bilirubin sulfate 濃度と M.R. との関係は Fig. 7 のとおりで両者の間には有意の相関はみられなかった。

5) Bilirubin sulfate と他の Bilirubin 分画との関係

肝疾患別の bilirubin sulfate と他の bilirubin 分画との関係を一括して Table 1 に示した。bilirubin sulfate は急性肝炎と原発性肝癌では塩型 bilirubin, 慢性肝炎ではすべての分画の bilirubin と有意の関係は認められなかったが、その他では各 bilirubin 分画とは有意の関係が認められた。また疾患別にも bilirubin sulfate と M.R. との関係は認められなかった。

6) Bilirubin sulfate と肝機能検査成績との関係

肝疾患別の bilirubin sulfate と肝機能検査成績との関係を一括して Table 2 に示した。急性肝炎では cholesterol, 慢性肝炎では Ch-Ease と負の相関が、肝硬変症では GOT, 血清総胆汁酸と正の, cholesterol と負の相関がみられた。原発性肝癌では肝機能検査成績との間に有意の関係はみられなかった。肝疾患全体では bilirubin sulfate は Ch-Ease, cholesterol と負の, 血清総胆汁酸と正の相関がみられた。

総括ならびに考案

1958年 Isselbacher & McCarthy²⁾ により人において bilirubin sulfate が存在することが実証され Noir ら⁶⁾ は bilirubin sulfate が alkali に安定であり直接 bilirubin のうち10~15%を占めると報告した。一方教室河合¹⁷⁾ は、肝疾患患者

の黄疸尿中の bilirubin から bilirubin sulfate を分画分離し、その実在を証明すると共に肝細胞障害時に代償的に増量するとした。また教室渡部¹⁰⁾は肝疾患患者の胆汁中の bilirubin sulfate を分離し、肝疾患時の bilirubin sulfate の動態について検討し河合と同じく bilirubin glucuronide 分画の直接 bilirubin 中での占有率の減少する場合に増量することを認めている。一方 bilirubin sulfate そのものについては Isselbacher ら²⁾は bilirubin 末端の OH 基と硫酸根が結合したものとし、Noir ら^{18,19)}は NH 基と硫酸根が結合した形であるとした。現在一般的には後者の説が支持されているが化学構造も未だ確立されたものではなく、また Weber & Schalm ら¹²⁾は bilirubin sulfate は正常者の胆汁中には存在しないか、またはほとんど存在しないとするなど bilirubin sulfate は生体の bilirubin 代謝を考える場合意味をなさない主張するものもある。そこで Weber & Schalm¹²⁾と、教室原²⁰⁾の方法をもとにして教室米井¹¹⁾の溶媒分画法を用いて血清 bilirubin より bilirubin sulfate を分画分離・抽出し測定することによりその臨床的意義を検討することにした。人血清中に bilirubin sulfate が存在するか否かについては正常者血清では直接 bilirubin 濃度が極めて低く微量のため検討できなかったが、血清 bilirubin 濃度 2mg% 以上の高 bilirubin 血症を伴う肝疾患例では明らかに bilirubin sulfate が存在することが認められた。この際、溶媒分画法により抽出された bilirubin sulfate 分画が bilirubin sulfate であるか否かが問題となるが、この点については既に教室渡部¹⁰⁾、米井¹¹⁾により bilirubin sulfate であることが確認されているので問題ないと思われる。bilirubin sulfate 濃度は総 bilirubin 濃度の高いもの程高濃度の傾向がみられた。肝実質細胞障害により惹起される黄疸が高度となるにつれて bilirubin sulfate 量も bilirubin glucuronide 量と同様に増加すると考えられた。しかし肝疾患により肝細胞障害の程度が異なることより bilirubin sulfate の増加ないし代償の程度が異なることが推測される。そこで bilirubin sulfate の総 bilirubin また直接 bilirubin 中への占有率について検討したところ

bilirubin sulfate の総 bilirubin 中の占有率は、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変症の順に高率であり、肝疾患の病期の進行に伴い高い占有率をしめることが判明した。同様に bilirubin sulfate の直接 bilirubin 中の占有率、またその相関についてみると総 bilirubin に対するそれと同様の結果がえられ、しかもさらによりよい関係がみられた。この結果は肝実質細胞障害の進行に伴い bilirubin glucuronide 分画の占有率が低下する為に代償的に非 glucuron 酸抱合型 bilirubin の占有率が増加するとの報告を支持するものであった。以上の結果より肝細胞障害時に bilirubin sulfate が黄疸血清中に上昇することが明らかとなったが、この際一般に行われる肝機能検査のいずれがよりよく bilirubin sulfate の増加と関連するかが問題となる、しかし、肝疾患によりまたその stage により bilirubin sulfate 濃度上昇の機序は異なると考えられる。従って肝疾患別、病期別の検討が必要となるが、今回の対象は全て血清 bilirubin 濃度 2mg% 以上の患者に限られていることより肝疾患別に検討した。急性肝炎では肝細胞壊死の表現とされる GOT, GPT, との相関が想定されたが有意の関係はなかった。これは急性肝壊死時に直接 bilirubin が高くなることよりも理解され、むしろ急性肝炎では cholesterol と負の相関が認められたことより cholesterol の生成低下がおこる場合には bilirubin sulfate が上昇し、cholesterol が排泄障害により血中にうっ滞するときには bilirubin sulfate は上昇してもさして強くないことを示している。慢性肝炎では Ch-Ease と負の相関がみられたことは Ch-Ease が肝細胞全体の機能、albumin 合成機能を表わすとされていることより理解できる。肝硬変症では GOT, 胆汁酸と正の相関をし、cholesterol と負の相関がみられた。肝硬変症では GOT が高く肝内 shunt も高率に存在することより肝硬変症の進んだ症例では bilirubin sulfate 濃度は増加すると考えてよく cholesterol 低下をきたすような肝硬変症では bilirubin sulfate 濃度は高くなる。以上のごとく急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変症をつうじて肝細胞合成機能が低下する場合は bilirubin sulfate が増加することが示された。bilirubin glucuronide の場合に

認められた ZTT との相関は bilirubin sulfate では認められなかったが、これは bilirubin sulfate と M.R. との間にも関連がみられなかったことよりも裏付けられた。M.R. との関連では従来の報告は bilirubin sulfate 分画が ester 型 bilirubin 分画として取扱われたため bilirubin sulfate が除かれた ester 型 bilirubin 分画とは質的に異なることによると考えられた。bilirubin glucuronide と bilirubin sulfate が一般的肝機能検査で示標となる検査が同一でなかったことは肝細胞内での両者の抱合部位ないし障害に対する抵抗性の差と理解された。

結 論

血清 bilirubin 濃度 2mg/dl 以上の肝疾患患者について直接 bilirubin の 1 つ bilirubin sulfate の臨床的意義を検討した。対象は急性肝炎25例、慢性肝炎 8 例、肝硬変症 8 例、原発性肝癌16例である。米井の溶媒分画法により bilirubin sulfate を分画し他の各種肝機能検査成績とを対比

することにより bilirubin sulfate の臨床的意義を検討し、次の結果をえた。

1) Bilirubin sulfate が人血清中に存在することが確認された。bilirubin sulfate 濃度は総 bilirubin 並びに直接 bilirubin 濃度と相関し、後者が前者よりよい関係にあった。

2) 総並びに直接 bilirubin 中の bilirubin sulfate 占有率は、急性肝炎7.10%、8.72%、慢性肝炎10.10%、15.26%、肝硬変症10.71%、17.47%の順に高率であった。直接 bilirubin で総 bilirubin より、より高い占有率が認められた。

3) 各種肝機能検査のうち bilirubin sulfate 濃度との相関がみられたのは急性肝炎では、cholesterol、慢性肝炎では Ch-Ease、肝硬変症では GOT、cholesterol、胆汁酸であった。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を頂いた長島秀夫教授および近藤忠亮講師に深謝いたします。

本論文の要旨は第65回日本消化器病学会総会（昭和54年、東京）において発表した。

文 献

1. Billing, B.H. and Lathe, G.H.: The excretion of bilirubin as an ester glucuronide giving the direct van den Bergh reaction, *Biochem. J.* **63**, 6p, 1956.
2. Isselbacher, K.J. and McCarthy, E.A.: Identification of a sulfate conjugate of bilirubin in bile, *Biochem. Biophys. Acta* **29**, 658—659, 1958.
3. 近藤忠亮: 胆汁色素の呈色反応・機構, 日消誌, **63**, 531, 1966.
4. Gordon, E.R.: *The Conjugates of Bilirubin in Jaundice*, ed. C.A. Goresky, and M.M. Fisher, Plenum Press. New York and London. pp. 19—38, 1974.
5. With, T.K.: *Bile Pigments*. Academic Press. New York and London. pp. 373—374, 1968.
6. 河原田裕幸: 胆汁色素に関する研究, 第一編, 肝疾患患者の血清 bilirubin glucuronide 分画の臨床的意義, 医学研究, **37**, 188—199, 1967.
7. 高木明一郎: bilirubin glucuronide の研究, 第一編, 胆汁中 bilirubin glucuronide の消長と肝障害の関係について, 医学研究, **39**, 255—256, 1969.
8. 広畑 衛: 胆汁色素に関する研究, 第一編, 諸種肝疾患時の胆汁中 bilirubin phosphate 分画の臨床的意義, 岡山医学会雑誌, **87**, 563—574, 1975.
9. 河合利夫: 直接 bilirubin に関する研究, 第一編, Bilirubin phosphate 分画に関する研究, 岡山医学会雑誌, **84**, 321—330, 1972.
10. 渡部 寛: 硫酸抱合型 bilirubin に関する研究, 第二編, 各種肝疾患患者の胆汁中 bilirubin sulfate 分画の臨床的意義, 岡山医学会雑誌, **87**, 697—706, 1975.
11. 米井二郎: 直接 bilirubin の肝よりの排泄に関する研究, 第二編, bilirubin sulfate 異性体の性状と rat 胆

- 汁中への排泄, 日消誌, 76, 249—258, 1979.
12. Weber, A.P. and Schalm, L.: Evidence against "Bilirubin Sulfate", *Acta. Med. Scand.* 177, 519—526, 1965.
 13. 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.
 14. 石川泰祐: 肝疾患時の胆汁酸と Bilirubin に関する研究, 第一編, 肝疾患時における血清胆汁酸の臨床的意義, 岡山医学会雑誌, 投稿中.
 15. 西原孝雄: 肝疾患時の胆汁酸と Bilirubin に関する研究, 岡山医学会雑誌, 91, 611—635, 1979.
 16. Noir, B. A., Walz, A. T. and Garay, E. R.: Studies of bilirubin sulfate in human bile, In *Bilirubin Metabolism*, ed. I.A.D. Bouchier & B.H. Billing Blackwell Sci Publ., Oxford and Edinburgh. pp. 99—102, 1967.
 17. 河合利夫: 直接 bilirubin に関する研究, 第二編, Bilirubin sulfate 分画に関する研究, 岡山医学会雑誌, 84, 331—339, 1972.
 18. Noir, B. A., Groszman, R. J. and Walz, A. T.: Studies on bilirubin sulfate, *Biochim. Biophys. Acta* 117, 297—304, 1966.
 19. Noir, B. A., Walz, A. T. and Garay, E. R.: Studies on the bilirubin sulfate conjugate excreted in human bile, *Biochim. Biophys. Acta* 222, 15—27, 1970.
 20. 原嘉之: 胆汁色素に関する研究, 第一編, bilirubin 分画の chloroform 抽出性並びにその定量法について, 医学研究, 22, 70—84, 1952,

Studies on bile acid and bilirubin in liver diseases
Part 2. Clinical significance of serum bilirubin sulfate
in various liver diseases

Yasusuke ISHIKAWA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,
Okayama

(Director : Prof. H. Nagashima)

The clinical significance of serum bilirubin sulfate, one of the direct bilirubin, was evaluated in various liver diseases with over 2 mg/dl of serum bilirubin concentration. The diagnosis included 25 cases of acute hepatitis, 8 cases of chronic hepatitis, 8 cases of liver cirrhosis and 16 cases of liver cirrhosis with hepatoma. Bilirubin sulfate was fractionated by Yonei's solvent partition method. The clinical significance of bilirubin sulfate was assessed by comparison of bilirubin sulfate with the other bilirubin fractions and with non-specific liver function tests. The results were as follows; 1) The existence of bilirubin sulfate was confirmed in human sera. Bilirubin sulfate concentration correlated with serum total bilirubin and direct bilirubin, and the correlation with direct bilirubin was higher than total bilirubin. 2) The percentage of bilirubin sulfate in total and direct bilirubin increased in the order of acute hepatitis, chronic hepatitis and liver cirrhosis. The percentage of bilirubin sulfate was higher in direct bilirubin than in total bilirubin. 3) Bilirubin sulfate showed the following correlation with non-specific liver function tests; with cholesterol in acute hepatitis, with choline esterase in chronic hepatitis and with GOT, cholesterol and bile acid in liver diseases.