

胆汁中 bilirubin に及ぼす phenobarbital と bucolome の影響

岡山大学医学部第一内科教室 (主任:長島 秀夫教授)

近藤 忠亮 中村 教夫 米井 二郎

(昭和51年9月13日受稿)

緒 言

生体内には直接 bilirubin と間接 bilirubin の2つがある。直接 bilirubin は抱合型 bilirubin で、bilirubin の抱合の場は主として肝臓であることが知られている¹⁾。Bilirubin の肝での抱合に及ぼす薬剤の影響について、Yaffe ら²⁾は bilirubin と glucuron 酸を抱合する UDP glucuronyl transferase の活性が低下している Gilbert 病に phenobarbital を投与することにより過 bilirubin 血症の正常化をみると、これは抱合酵素活性の励起による bilirubin glucuronide の生成増加によると報告した。しかし、抱合型 bilirubin は bilirubin glucuronide のみではない。したがって、phenobarbital の bilirubin glucuronide 以外の抱合型 bilirubin に対する影響は明らかでない。そこで phenobarbital と Gilbert 病の過 bilirubin 血症の正常化に有効であるが、その作用機序が異なる bucolome^{3,4)} を用いて、先天的に bilirubin の glucuron 酸抱合酵素活性の低下または欠除する Gunn rat の胆汁中の抱合型 bilirubin の一つ硫酸抱合型 bilirubin に及ぼすこれら薬剤の影響について検討した。

実験動物

雄性の Gunn rat (heterozygote) 体重300~400 g のものを対照 (無処置) 群、phenobarbital 投与群、bucolome 投与群の3群とし、一群4~5匹として使用した。なお実験当日は絶食とした。

実験方法

1. 薬剤負荷法

Phenobarbital 負荷法: phenobarbital Na 50 mg を蒸留水 5 ml に溶解し、rat 体重 kg あたり 50 mg の割合で rat 大腿部に筋注した。Bucolome 負荷法

: bucolome Na 200 mg を蒸留水 5 ml に溶解したのち、rat 体重 kg あたり 200 mg の割合で rat 大腿部に筋注した。両薬剤ともに投与期間は1日1回で4日間とした。

2. 胆汁採取法

Rat をエーテル麻酔下に腹部正中線上で開腹し、胆管にポリエチレン管を挿入して外胆汁瘻を作成した。胆汁採取はエーテル麻酔より完全に回復したのち遮光した試験管に22時間まで一括して採取した。採取した胆汁については胆汁量、bilirubin 量を測定した。なお、胆汁採取期間中は随時飲水せしめた。

3. Bilirubin 定量と Bilirubin 3分画法

胆汁を生理的食塩水で10倍に稀釈し、その1 ml をとり、これに Ehrlich 氏 diazo 試薬 I 液 10 ml と II 液 0.3 ml を混じた diazo 混液 0.5 ml を加え20分放置後、2.7% 安息香酸カフェイン・ナトリウム液 0.5 ml を添加後10~15分間放置し、ついで酢酸 3.6 ml、塩酸 0.4 ml を添加し光電比色計日立100-10型で波長580 m μ で測定した。Bilirubin 3分画の分画分離は小坂・原の方法¹¹⁾により、胆汁1 ml に chloroform を2 ml 加えて間接 bilirubin を chloroform に抽出したのち、0.1N 塩酸 1 ml で弱酸性とし、塩型 bilirubin 分画を chloroform 2 ml に抽出した。残る上清を硫酸飽和後 methanol で抽出したものを ester 型 bilirubin 分画とした。各分画について各々1 ml をとり methanol 3.5 ml と前述の Ehrlich 氏 diazo 混液 0.5 ml を加え15分後に光電比色計を用いて波長535 m μ で測定した。

4. Glucuron 酸測定法

Glucuron 酸測定は NaBH₄ を用いた石館らの方法⁹⁾ を用いて ester-glucuronide の形で測定した。なお bilirubin-glucuron 酸 mol 比は ester 型 bilirubin 分画について bilirubin の分子量585、glucuron 酸196 として mol 比の形で求めた (以下 mol 比と略)。

5. 硫酸根の測定

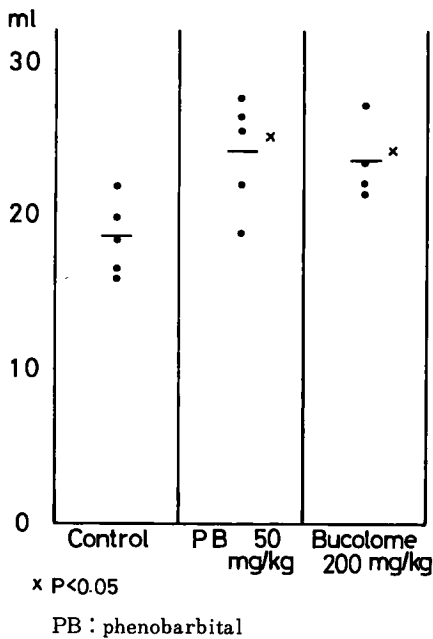
採取した胆汁のうち10 ml をとり Weber & Schalm の方法⁹⁾ にならい測定した. bilirubin-硫酸根 mol 比は直接 bilirubin 量に対する硫酸根量を硫酸根分子量を96として mol 比の形で求めた.

実験成績

1. 胆汁量

対照群, phenobarbital 投与群, bucolome 投与群の胆汁量は図1のごとくであった. 各群の平均値

Fig. 1 Influence of phenobarbital and bucolome on bile volume



と標準偏差は対照群で18.7 ± 2.26 ml, phenobarbital 投与群24.2 ± 3.12 ml, bucolome 投与群23.8 ± 2.21 mlで, 対照群に比較して phenobarbital 群, bucolome 群ともに胆汁量は有意 (P < 0.05) に増加した.

2. Bilirubin 排泄量

22時間までに胆汁中に排泄された bilirubin の総排泄量は図2のごとくで, 平均値と標準偏差は対照群1.60 ± 0.21 mg, phenobarbital 群2.29 ± 0.45 mg, bucolome 群1.78 ± 0.37 mg であった. 対照群に比較して phenobarbital 群では有意の増量 (P < 0.05) がみとめられたが, bucolome 群と対照群との間には有意の差は認められなかった.

3. Bilirubin-glucuron 酸 mol 比

Fig. 2 Influence of phenobarbital and bucolome on excreted amount of bilirubin

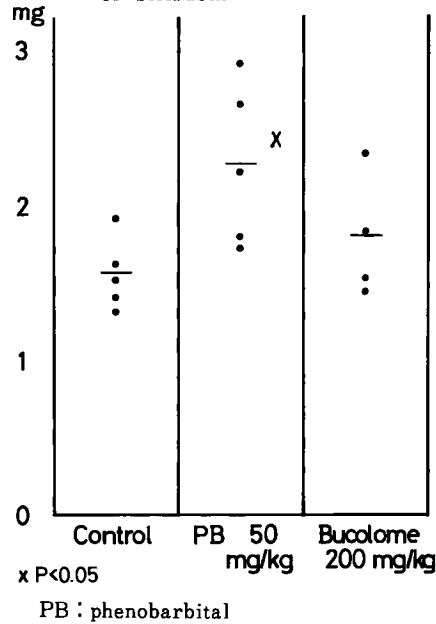
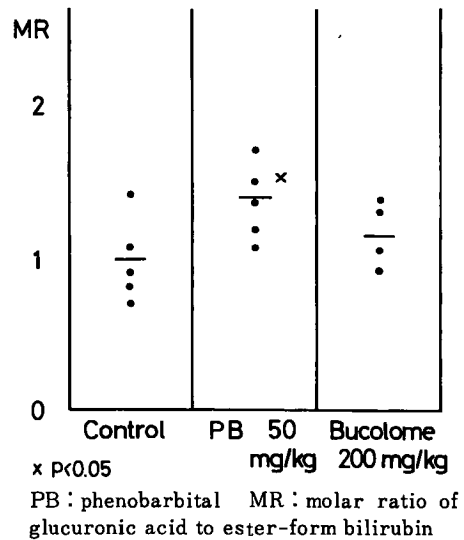
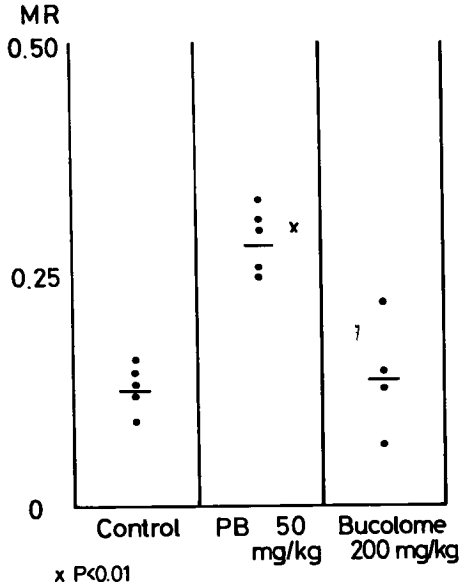


Fig. 3 Influence of phenobarbital and bucolome on molar ratio of glucuronic acid to ester-form bilirubin



Ester 型 bilirubin 分画について mol 比を測定した結果を図3に示した. 平均値と標準偏差は対照群で0.96 ± 0.25, phenobarbital 群平均1.35 ± 0.21, bucolome 群平均1.16 ± 0.20で phenobarbital 投与

Fig. 4 Influence of phenobarbital and bucolome on molar ratio of sulfate to direct bilirubin



x P<0.01
PB: phenobarbital MR: molar ratio of sulfate to direct bilirubin

群で対照群より有意 (P < 0.05) の高値を示した。

4. 直接 bilirubin-硫酸根 mol 比.

対照群, phenobarbital 投与群と bucolome 投与群を一括して図 4 に示した。各群の平均値と標準偏差は対照群 0.13 ± 0.047, phenobarbital 投与群 0.28 ± 0.035, bucolome 投与群 0.13 ± 0.057 で phenobarbital は対照群に比較して有意 (P < 0.01) の増加が認められたが, bucolome 投与群と対照群との間には有意の差はなかった。

総括並びに考按

Bilirubin の抱合ないし胆汁中への排泄に影響を及ぼす薬剤には phenobarbital, bucolome, chloroquine, pamaquine, 3・4-benzpyren や steroid などがある⁴⁾。Phenobarbital や bucolome は体質性過 bilirubin 血症の 1 つ Gilbert 病の過 bilirubin 血の正常化に有効であることが知られている^{3, 4)}。この際 phenobarbital は bilirubin-UDP glucuronyl transferase の活性を上昇し bilirubin glucuronide の生成増加を来たすこと, 胆汁量の増加をみることが報告されている⁵⁾。他方直接 bilirubin は bilirubin glucuronide のみでなく, bilirubin sulfate, bilirubin phosphate などの存在が確認されている⁶⁾。

Gunn rat は先天的に bilirubin-UDP glucuronyl transferase の欠損ないし欠除した動物であるが, Gunn rat (heterozygote) では bilirubin sulfate が存在し, かつ Wistar 系 rat のそれよりも増量していることが教室渡部⁵⁾により報告されている。Bilirubin sulfate は一般的に sulfate transferase により抱合される¹⁰⁾と考えられているが, 直接的な証明はない。そこで肝 microsome の薬物代謝系酵素を助起させる phenobarbital を使用することにより bilirubin sulfate 生成への影響を検討した。また bucolome は利胆効果はあるが上記抱合酵素への影響は少ないとされていることより phenobarbital と比較検討した。まず, 胆汁量については phenobarbital, bucolome 投与群ともに対照群に比較して有意の増加がみとめられ, 従来のこれら薬剤により胆汁量が増加すると成績と一致した^{6, 7)}胆汁中への bilirubin 排泄量は phenobarbital 群で有意の増加, bucolome 群で増加傾向がみられたことも諸家の報告^{6, 7)}と一致するものであった。また, bilirubin glucuronide について bilirubin と glucuron 酸 mol 比の形で検討したところ, phenobarbital 投与群で有意に増加したが, bucolome 群ではやや増加の傾向はみられたが有意ではなかった。このことより山本ら³⁾の成績と同じく phenobarbital は bilirubin と glucuron 酸との抱合を促進するが, bucolome にはその様な作用はないかあっても少ないと考えられた。bilirubin sulfate 分画については phenobarbital 群で対照群より bilirubin-硫酸根 mol 比の有意の増加をみたのに反して, bucolome 群では対照群との間に有意の変動をみとめなかった。このように phenobarbital 投与により bilirubin sulfate が増加したことは bilirubin sulfate が酵素により抱合されることを強く示唆するものと思われた。また phenobarbital と bucolome とはこの点でも差がみとめられた。

結 論

Heterozygote Gunn rat に phenobarbital, bucolome 投与を 4 日間行ったのち, 胆汁中の bilirubin 分画について無処置群 (対照群) と比較検討し, 次の結果をえた。

1. 無処置群に比較して胆汁量の増加が両群にみられた。胆汁中の bilirubin 排泄量は phenobarbital 群で有意の増加が, bucolome 群では増加の傾向がみられた。

2. Bilirubin sulfate 量は phenobarbital 群で無処置群に比較して有意の増加がみとめられたが, bucolome 群では有意の差はみとめられなかった.

3. Bilirubin glucuronide 分画も phenobarbital 群で有意の増加がみられたが, bucolome 群では有意の差はなかった.

文 献

- 1) 近藤忠亮:胆汁色素の腸肝循環 代謝, 10:812-819, 1974.
- 2) Yaffe, S. J., Levy, G., Pharm, D., Matsuzawa, T. and Balich, T.: Enhancement of glucuronide-conjugating capacity in a hyperbilirubinemic infant due to apparent enzyme induction by phenobarbital. *New. Engl. J. Med.*, 275:1461-1466, 1966.
- 3) 西原孝雄・近藤忠亮・小林敏成・広畑衛・山田剛太郎・渡部寛:高度間接 bilirubin 血症と神経症状を伴い薬剤投与が有効であった Gilbert 症の 1 例. *肝臓*, 16:475-481, 1975.
- 4) 山本俊夫・足立幸彦・田中慧:グルクロン酸抱合酵素誘導と高間接ビリルビン血症治療への応用 *日本臨牀*, 30:1842-1848, 1972.
- 5) 渡部寛:硫酸抱合型 bilirubin に関する研究 第 1 編 Heterozygote Gunn rat の胆汁中への硫酸抱合型 bilirubin の排泄能 *岡山医会誌*, 87:687-996, 1975.
- 6) Robinson, S. H., Yonnoni, C. and Nagasawa, S.: Bilirubin excretion in rats with normal and impaired bilirubin conjugation: Effect of phenobarbital. *J. Clin. Invest.*, 50:2606-2613, 1971.
- 7) 近藤忠亮・三好莞爾・広畑衛・渡部寛・瀬尾憲司・西原孝雄・丸山睦郎・中村教夫・田中ゆり: Bucolome の利胆効果 *肝臓*, 11:670-675, 1974.
- 8) 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.
- 9) Weber, A. P. and Schalm, L.: Evidence against "bilirubin sulfate", *Acta. Med. Scand.*, 177:519-526, 1965.
- 10) Arias, I. M.: *Progress in liver diseases* edited by Popper, H. and Schaffner, F., Gtunea Stratton, New York and London, 187-201, 1961.
- 11) 原嘉之:胆汁色素に関する研究 第 1 編 生体 bilirubin 分画の chloroform 抽出性並にその定量法について, *医学研究*, 22:70-84, 1952.

Influence of phenobarbital and bucolome on biliary bilirubin

Tadasuke KONDO, Norio NAKAMURA and Jiro YONEI

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Hideo Nagashima)

Biliary bilirubin conjugates were investigated in heterozygote Gunn rat after loading of phenobarbital or bucolome for 4 days. 50mg of phenobarbital or 200mg of bucolome per Kg of body weight was given intramuscularly once a day. The bile collection by bile duct canulation was started 24 hours after the final drug loading and continued for 22 hours. The following results were obtained:

- 1) Bile volume increased significantly in both groups compared with the control group (no treatment group). The amount of excreted bilirubin increased significantly in the phenobarbital loading group than the control group, but not in the bucolome loading group.
- 2) A significantly increased amount of biliary bilirubin sulfate was observed in the phenobarbital loading group compared with the control group, but not in the bucolome loading group.
- 3) The amount of excreted biliary bilirubin glucuronide increased significantly in the phenobarbital loading group compared with the control group, but not in the bucolome loading group.