

尿中 Bilirubin に関する研究

第 一 編

腎よりの Bilirubin 排泄について

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂 淳夫教授)

山 本 武 彦

[昭和50年5月20日受稿]

緒 言

尿中に認められる bilirubin が主として直接型 bilirubin であることは周知のことである。一方血清中では直接型 bilirubin, 間接型 bilirubin 共に蛋白, 主として albumin と結合^{1,2)}していることが知られており腎よりの bilirubin 排泄には bilirubin と蛋白との結合状態が重要な因子と考えられる。腎よりの bilirubin の排泄部位並びに体液 pH の変化に基づく bilirubin の尿中排泄の変化について教室嶋元³⁾は尿細管と糸球体との血管支配の分離が明らかになるまで使用し, 腎よりの bilirubin 排泄は主として尿細管であること及び腎血液水素 ion 濃度の上昇は尿中 bilirubin の排泄増加を来すことを認めて報告した。一方 Owen⁴⁾並びに Wallace⁵⁾Fulop⁶⁾らは腎 clearance の立場より bilirubin の腎よりの排泄の主たる部位は糸球体であるとした。

そこでこの排泄部位および機序を明確にするため, 腎よりの bilirubin 排泄を比較的生理的な条件で行うことを企図し, ³H-bilirubin を使用し, 尿細管側は腎門脈にて血流をうけ, 糸球体側は腎動脈より血流をうけるガマを用いて本研究を行ない, 満足すべき結果をえたので報告する。

実験材料並びに方法

1. 実験動物

体重280g~190gの雄性ガマ (Rana Clamitans) を用いた。実験時期は3月上旬より4月上旬に行ない, 実験にあたっては1群3~5匹を用い, 実験当日は絶食させた。

2. 実験方法

1 灌流法

麻酔にかえ両耳を結ぶ線より尾方, 頭部を屈曲させて生じる陥凹部 (脊椎骨 I の上方に相当) を注射針にて横断し, ついで腹部正中線にて切開し腎動脈並びに腎門脈を剝離し, 腎動脈側負荷に際しては腎動脈根部に vinyl catheter No. 0 (アトム製) を挿入し, 又腎門脈負荷時には腎門脈に同一 vinyl catheter を挿入した。実験に先立ち腰椎穿刺用圧棒に生理食塩水を満たしその先端を大動脈 catheter に接合しガマ血圧を測定しその血圧よりやや大きい圧力で生理食塩水を滴下した。³H-bilirubin 負荷は vinyl catheter を通しておこなった。

1-2 pHの変動を目的とした灌流液 M/15 磷酸塩緩衝液 pH6.0 及び pH8.0 を pH meter (日立-堀場製 M-5 型, pH meter) を用いて調製し使用した

2 採尿法

直腸結腸移行部を結紮 (肛門部より先端に olive 球をつけて Nelaton catheter を挿入し, 総排泄腔を蒸溜水にて洗滌し, 液が無色又は淡黄色を呈するまで洗滌したのち内腔を 2~3 ml の蒸溜水で満たし, 5 分後吸引を行ない内容液を出来るだけ採取した後, 2 ml の蒸溜水で再度洗滌し, 両液を合わせこれを希釈尿とした。再び 2~3 ml の蒸溜水を総排泄腔に注入し, 5 分後同様の操作で内容液の採取を行ない15分迄同一操作を行なった。

3. ³H-bilirubin 調製法

3-1, ³H-bilirubin は第1化学製の bilirubin を Wilzbach⁷⁾の tritium gas で水素を置換する方法で作製した。

3-2. 直接型³H-bilirubin 調整法

³H-bilirubin を 7% sodium taurocholate 液に溶

解し, Wister 系 rat の十二指腸部に負荷し, 胆管 catheter 法により胆汁を採取し, それより教室小坂・原¹⁾の方法に倣い直接 bilirubin 分画を採取した。即ち採取胆汁を硫酸飽和塩析し, 次いで methanol 抽出を行ない, 遠沈分離して得られる methanol 層を減圧乾固し, 再び水溶液としたのち, chloroform を加えて振とう混和し, 遠沈分離を行ない, chloroform 層に移行した間接型 bilirubin を除去したのち, 上層に 1/10 N HCl を等量加え, 再び chloroform 抽出を行なうことにより塩型 bilirubin を分離し, 残部を ester 型 bilirubin とした。

3-3 bilirubin 負荷時の調整法

³H-bilirubin に 1/10 N NaOH 0.1ml を加え, 溶解したのち, ガマ血清 1ml を加え, これを混和したのち, 1/10 N HCl 0.1ml で中和した。Ester 型 ³H-bilirubin の場合は, ガマ血清 1ml を用いて, これに ester 型 ³H-bilirubin 水溶液 0.2ml を混和しこれを注入液とした。注入液 ³H-bilirubin 濃度は 0.98~5.84 mg/dl (平均 3.56 mg/dl) ester 型 ³H-bilirubin は 1.42~3.17 mg/dl (平均 2.16 mg/dl) であった。

3-4 bilirubin 測定法

Jendrassik & Cleghorn²⁾氏変法を用い, 光電比色計 (Leitz 製, Model M) を用い, 波長 535m μ で測定した。

4. ¹⁴C-inulin 調整法

New England Nuclear Corporation 製の inulin-carboxyl-¹⁴C 水溶液 (0.05 mc/10.0 ml) を蒸留水で 500 倍に希釈し, その 0.2ml を注入した。

5. 放射能測定法

PPO 4g 及び POPOP 0.1g を toluene 750ml, ethanol 250ml に溶解し, これを scintilator とした。測定に当っては scintilator 14 ml に試料溶液 0.1ml を加え, Pacard 製 Tricab scintillation counter を用い, 10 分間測定した。

6. pH 測定法

東洋口紙製の試験紙 BTB 及び methylred を, ガマ末梢血の pH を測定する目的で使用した。

実験成績

1. ガマ腹部大動脈血圧

ガマ腹部大動脈血圧は 24.5~27.5 mmH₂O 平均 26.0 mm H₂O であった。(表 1)

2-1, bilirubin の specific activity

間接型 ³H-bilirubin は 4.69 $\times 10^3$ dpm/mg であり, ester 型 bilirubin は 2.16 $\times 10^3$ dpm/mg であった。

Table 1. Blood pressure of aorta abdominalis

No.	Blood pressure (mmH ₂ O)
1.	24.5
2.	27.5
3.	26.7
4.	26.0
5.	25.3
average	26.0

2-2 尿中遊離³H に関する検討

Wiltzbach 法は³H と水素との置換法であることより, 体内に³H-bilirubin が注入された場合, 体液中の水素と³H との置換が起り, 尿中に遊離³H として排泄されることが考えられるので, bilirubin 非結合型³H について検討した。即ち 5% 酢酸鉛水溶液を採取した尿に尿 1ml 当り 0.1ml 加え, 十分攪拌したのち, 遠沈し, bilirubin 鉛結合物として, 沈澱させ, その上層に遊離³H が含まれるものとして測定した。

Table 2. Relation between the radio activity conjugated with bilirubin and the radio activity in liquid phase

A) Free ³ H-Bilirubin				
Experiment	No. 1	No. 2	No. 3	Average
Total C. P. M.	6454	5666	8889	7003
C. P. M. of Bilirubin	5695	4686	7641	6007
C. P. M. of liquid phase	759	980	1248	996
Percentage of C. P. M. of Bilirubin to total C. P. M.	88.24%	85.03%	86.41%	85.78%
B) Conjugated ³ H-Bilirubin				
Experiment	No. 1	No. 2	No. 3	Average
Total C. P. M.	2654	2996	2338	2663
C. P. M. of Bilirubin	2609	2709	2176	2498
C. P. M. of liquid phase	45	217	162	141
Percentage of C. P. M. of Bilirubin to total C. P. M.	98.94%	90.42%	93.07%	93.81%

結果は表 2のごとく, 間接型³H-bilirubin では 14.97~11.76% で平均 14.22% が遊離の型としてみられ, ester 型³H-bilirubin では 9.58~1.06% 平均 6.19% が遊離³H の型としてみられた。

Table 3. Excretion of direct-bilirubin (ester-form) after loading into portal-vein

Case No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	Average
given total C. P. M.	3412	3412	2961	2961	3186.5
0-5 min	1.98%	1.14%	2.03%	1.60%	1.69%
5-10min	1.46%	1.52%	1.40%	1.40%	1.45%
10-15min	1.83%	1.75%	2.16%	1.32%	1.76%
Total	5.27%	4.41%	5.59%	4.32%	4.90%

3. ³H-bilirubinの腎門脈(尿細管側) 負荷による尿中への排泄

3-1, Ester型³H-bilirubin 負荷における尿中排泄率は表3のごとく, 負荷後0~5分では1.14~2.03%平均1.69%, 5~10分1.40~1.52%平均1.45%, 10~15分1.32~2.16%平均1.96%であった。

15分迄の総排泄率は4.32~5.59%で平均4.90%であった。

3-2, 間接型³H-bilirubin 負荷における尿中排泄率は表4に示すごとく負荷後0~5分0.48~0.65%平均0.57%, 5~10分0.49~0.86%平均0.66%, 10~15分0.46~0.80%平均0.66であった。15分迄の

Table 4. Excretion of free bilirubin after loading into portal-vein

Case No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	Average
given total C. P. M.	91934	91934	91934	91934	91934
0-5 min	0.61%	0.48%	0.65%	0.52%	0.57%
5-10min	0.65%	0.49%	0.86%	0.64%	0.66%
10-15min	0.77%	0.46%	0.80%	0.60%	0.66%
Total	2.03%	1.43%	2.31%	1.76%	1.88%

Table 5. Excretion of direct bilirubin (ester-form) after loading into renal-artery

Case No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	Average
given total C. P. M.	2913	3352	2770	4866	3475.3
0-5 min	0.51%	0.49%	0.72%	0.67%	0.60%
5-10min	0.89%	0.68%	0.89%	0.98%	0.86%
10-15min	1.58%	1.42%	1.56%	1.53%	1.52%
Total	2.98%	2.59%	3.17%	3.18%	2.98%

総排泄率は1.43~2.31%平均1.88%であった。

4. ³H-bilirubinの腎動脈(糸球体側) 負荷による尿中への排泄

4-1, Ester型³H-bilirubin 負荷における尿中排泄率は表5のごとく, 負荷後0~5分0.49~0.72%平均0.60%, 5~10分0.68~0.98%平均0.85%, 10~15分1.42~1.58%平均1.52%であり, 排泄量の漸次増加をみとめた。15分迄の総排泄量は2.59~3.18%で平均2.98%であった。

4-2, 間接型³H-bilirubin 負荷における尿中排泄率は表6のごとく, 負荷後0~5分0.06~0.10%

Table 6. Excretion of free bilirubin after loading into renal-artery

Case No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	Average
given total C. P. M.	99000	77600	99000	88890	91123
0-5 min	0.07%	0.06%	0.10%	0.09%	0.08%
5-10min	0.22%	0.17%	0.19%	0.16%	0.19%
10-15min	0.56%	0.59%	1.01%	1.02%	0.80%
Total	0.85%	0.82%	1.30%	1.27%	1.06%

平均0.08%, 5~10分0.16~0.22%平均0.19%, 10~15分0.56~1.02%平均0.80%であり排泄量の漸次増加をみた。15分迄の総排泄量は0.82~1.30%で平均1.06%であった。

5. ¹⁴C-inulinの腎動脈負荷による尿中排泄について。

表7のごとく負荷後0~5分1.10~1.46%平均1.35%, 5~10分, 1.18~1.47%平均1.31%, 10~15分1.27~1.35%, 平均1.31%であり各分面の排泄量はほぼ一定であった。15分迄の総排泄量は3.83~4.09%で平均3.97%であった。

6. 体液 pH の変動の尿中 ester 型³H-bilirubin 排泄に及ぼす影響について

直接(ester)型 bilirubin は尿細管側からの排泄が糸球体側のそれより優位であった実験結果に基づき, 尿細管側よりの ester 型 bilirubin 排泄に及ぼす pH の影響を検討した。その結果は図1及び表8の通りである。すなわち pH 8.0より pH 6.0へと緩衝液の pH を変えて腎門脈負荷による灌流を行ったところ No. 1, No. 2 の例では pH の低下と共に尿中 bilirubin の排泄量の増加が認められ pH 6.8のさいに排泄量は peak に達した。次に pH 6.0より逆に 8.0へと緩衝液の pH を変えて灌流を行った No. 3,

Table 7 Excretion of ^{14}C -inulin after loading into renal artery into urine.

Case No.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	Average
given total C. P. M.	128575	128575	136904	136904	136904	---
0-5 min	1.38	1.39%	1.10%	1.44%	1.46%	1.35%
5-10min.	1.18%	1.35%	1.47%	1.2%	1.33%	1.31%
10-15min.	1.30%	1.35%	1.27%	1.34%	1.27%	1.31%
total C. P. M. up to 15min.	3.86%	4.09%	3.84%	3.99%	4.06%	3.97%

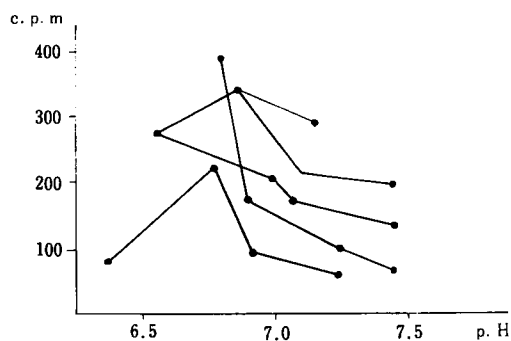
* Numbers are given as the percent of C. P. M. to total C. P. M.

Table 8. Relationship between C. P. M. excreted into urine and plasma pH. (ester-form ^3H -bilirubin)

Case	p H	C. P. M
No. 1	7.2	65
	6.9	104
	6.8	227
	6.4	78
	6.3	65
No. 2	7.2	286
	6.8	325
	6.6	260
No. 3	7.4	65
	7.2	98
	6.9	169
	6.8	455
No. 4	7.4	130
	7.2	156
	7.0	208
	6.8	221
	6.6	260
No. 5	7.4	195
	7.1	208
	6.8	325

No. 4, No. 5 でも、排泄量は pH 6.8 で peak に達した。いずれも正常 pH 7.4 附近より pH の低下と共に尿中排泄 bilirubin 量は増加したが、No. 1 の例のごとく pH 6.4 と極端に pH を低下させた場合はかえって減少をみとめた。また pH 7.4 以上ではいずれの例でも排泄量の減少をみた。

総括並びに考案

Fig 1 Relationship between C. P. M. excreted into urine and plasma pH. (ester-form ^3H -bilirubin)

腎よりの bilirubin の排泄部位については Fulop ら、Wallace らは糸球体を主たる部位としているが教室の藤井、嶋元らは尿管^{10,11)}を主たる排泄部位と考えている。ところで血液中の bilirubin は直接型、間接型を問わず albumin と結合していることが知られており前者の説をとれば血清 albumin と結合した bilirubin がそのまま排泄されるわけで、直接、間接 bilirubin を問わず尿中に証明されることになるが、事実尿中 bilirubin は直接 bilirubin であり、溶血性黄疸時に血中に増加する間接 bilirubin は尿中には証明されないところから肯定し難い。また Fulop らは尿中 bilirubin の測定法として Fouchet の方法を用いており、Wallace らも diazo 反応による bilirubin の測定を行っているが、そのさい 545m μ での吸光係数が著しく低値を示すため light pass 5 cm という無理な測定を行っている。また Wallace らの場合には尿中に diazo 反応陽性を示す non-bilirubin がかなりの量に存在するといっており bilirubin 測定法上の問題も疑問視されており、また creatinine による clearance を対照としているが creatinine は Swanson¹²⁾らによれば尿管よ

りの再吸収もあることが知られており最善の方法とは云いがたい。また Wallace らの成績では腎濾過率 (GFR) の低下した場合にはむしろ bilirubin の clearance 値が上昇することを認めている。このことはむしろ尿細管よりの排泄を支持するようと思われる。ところで、ガマではその血管が糸球体と尿細管とで別べつに分離して分布することが知られており、この点では排泄部位が糸球体か尿細管かという部位的解明を試みる上にはガマはかっこうな動物である。嶋元はこの動物を用いて実験した結果は前述の通り尿細管が主たる排泄部位であるとの結果を伝えているが、そのさいの実験では極めて大量の bilirubin を負荷しており、必ずしも生理的ではなく、またそのさい尿中に排泄される bilirubin 量は極めて微量であったので、呈色反応を試験紙と比較するという精度の低い方法を用いなければならなかった。そこで、本論文ではこの欠点を是正し、改めて bilirubin の腎よりの排泄部位を確認するため、isotope を用い tracer dosis で尿中に排泄された bilirubin 量を測定出来ることに注目して³H-bilirubin による実験を試みた。このさい Wilzbach 法で³H-bilirubin を作成したため液中の水素と³H との置換が起る可能性が考えられ、問題となる。しかし Lester¹³⁾らは Wilzbach 法で調製した³H-bilirubin と¹⁴C-bilirubin との間には生体内負荷使用にさいして誤差は認めがたいとしており、著者も予め³H-bilirubin を含む排泄尿に醋酸鉛を加え、選択的に bilirubin を沈澱させることによって non-bilirubin-³H の存在を検討した結果では間接型 bilirubin の場合で 14.25%、ester 型 bilirubin の場合 6.19% に過ぎない結果をえており、bilirubin と³H はよく結合しているものと考えられ³H-bilirubin を tracer とした実験は十分信頼に値するものと考えられる。さて実験にさいし、負荷 bilirubin 濃度により排泄率が異なることも一応考慮しておく必要がある。Fulop ら、Wallace らは負荷 bilirubin 濃度による排泄率への影響はないとしているが、著者の検討でも bilirubin 濃度による排泄率の変化はみとめていない。本実験において、腎血流量の変化による排泄因子を明確にする条件として¹⁴C-inulin による clearance を測定し、ほぼ一定条件下で実験を行った。さて実験によれば腎動脈負荷の際の経時的観察では尿中への排泄は、負荷 5 分までは直接、間接 bilirubin を問わず排泄率は極く僅かでありその後漸次増加が認められた。このことは生理的に尿細管側と糸球体側の血管の間

に毛細血管吻合が存在する結果と考えられる。一方腎門脈に ester 型 (直接型) bilirubin を負荷した場合には負荷 5 分までに明らかな排泄をみとめ、その後 15 分までほとんどその排泄率は変わらない。一方間接型 bilirubin の負荷時には排泄率は低く、その程度も 15 分まで殆んど変わらない。これらのことは bilirubin とくに直接 bilirubin は腎尿細管より排泄されるとの事実をほぼ証明したものと考えられる。次に血清 bilirubin は主として albumin と結合しているが、bilirubin と albumin とは hydrogen bond で結合されているとされており血液 pH に影響されるものと推定される。そこでこの点を明らかにするため灌流液の pH を変え、腎門脈負荷による ester 型 bilirubin 液の灌流を行なうと酸性側では尿細管よりよく排泄し、pH 6.8 が最高であり alkali 側では排泄の減少が認められた。この成績は嶋元のそれと一致した。山岡¹⁴⁾は生体内 bilirubin のうち間接型は両性 ion もしくは陰性荷電の状態にあり、直接型は陽性荷電の状態に存在するため間接型、直接型 bilirubin の血清蛋白への親和性は血液 pH により異なること、糸球体より尿細管に至る過程にて、血液 pH が酸性に傾くので蛋白と間接型と直接型 bilirubin の結合状態に差を生ずること、などから直接型 bilirubin は容易に尿中に排泄されることになることを説明している。著者の実験結果はこれを裏書きするものと考えられる。

結 論

腎よりの bilirubin 排泄部位が糸球体か尿細管かを確かめるため尿細管と糸球体との血管支配の分離が明らかなガマを実験動物に使用し、間接型ならび直接型³H-bilirubin の排泄部位の解明を灌流法によって検討し次の結果を得た。

1. Wilzbach 法により調製した³H-bilirubin を血液中に溶解した場合 bilirubin と結合した tritium 活性は間接型 bilirubin は平均 85.78% (85.03 ~ 88.24%)、ester 型³H-bilirubin は平均 93.81% (90.42 ~ 98.94%) であった。
2. 尿細管側負荷すなわち腎門脈負荷後 5 分間排泄値は ester 型 bilirubin では平均 1.69%、間接 bilirubin では平均 0.57% (5 分間排泄値) であった。
3. 糸球体側、すなわち腎動脈負荷後 5 分間排泄値は ester 型 bilirubin 平均 0.60%、間接 bilirubin 平均 0.08% (5 分間排泄値) であった。
4. Ester 型 bilirubin の排泄は体液 pH が酸性

側へと移行するにしたがって増量し、pH 6.8で最大に達した。

5. 以上の結果尿中へ排泄される bilirubin の大部分は ester 型 bilirubin であり、その排泄部位は主として腎尿細管で、排泄機序には血液蛋白と bilirubin の結合状態の変動が大きく関与するものと考

えられる。

稿を終るに当りご指導ならびにご校閲を賜りました小坂教授に深甚なる感謝の意を表しますとともに、終始直接ご指導、ご鞭達を戴きました近藤講師に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 木村常三郎：Bilirubin に関する研究. 第3編 Bilirubin と蛋白との結合に関する paper chromatography に依る研究. 医学研究, **25** : 872, 1955.
- 2) 後藤昭一郎：Bilirubinoid と蛋白との結合に関する研究. 第1編 Paper chromatography による Bilirubinoid と血清蛋白との結合に関する研究. 医学研究, **26** : 1998, 1956. 第2編 Bilirubin と蛋白との結合に及ぼす 2, 3 化学剤の影響. 医学研究, **26** : 2009, 1956.
- 3) 嶋元貢：胆汁色素の尿中排泄に関する研究. 第1編 Bilirubin の腎排泄能についての検討. 医学研究, **25** : 294, 1955.
- 4) Owen, E. E. : Observation on the mechanism of bilirubin excretion by the kidney. Bilirubin Metabolism, Bouchier, I.A.D. and Billing, B. H., 233, 1967.
- 5) Wallace, D. K. and Owen, E. E. : An evaluation of the mechanism of bilirubin excretion by the human kidney. J. Lab. & Clin. Med. **64** : 741, 1964.
- 6) Fulop, M. and Brazeau, P. : The renal excretion of bilirubin in dogs with obstructive jaundice. J. Clin. Invest. **43** : 1192, 1964.
- 7) Wilzbach, K. E. : Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas. J. Amer. Chem. Soc. **79** : 1013, 1957.
- 8) 小坂淳夫, 原嘉之：生体 Bilirubin 三分画の分離. 日消誌, **49** : 24, 1952.
- 9) Jendrassik, L. und Cleghorn, R. A. : Photometrische Bilirubinbestimmung. Biochem. Z., **289** : 1, 1937.
- 10) Klaskin, G. : Bile pigment metabolism. Ann. Rev. Med., **12** : 231, 1961.
- 11) Gray, C. H. : Bile pigment in health and disease. Charles. C. Thomas. Springfield, Ill. p53. 1961,
- 12) Swanson, R. E. and Hakim, A. A. : Stopflow analysis of creatinine excretion in the dog. Amer. J. Physiol., **203** : 980, 1962.
- 13) Lester, R. and Klein, P. D. : Biosynthesis of tritiated bilirubin and studies of its excretion in the rat. J. Lab. & Clin. Med., **67** : 1000, 1966.
- 14) 山岡憲二：肝臓の臨床, 胆汁色素. 日内誌, **42** : 531, 1953.

Studies on urinary bilirubin

Part 1. The excretion of bilirubin into urine from the toad's kidney

Takehiko Yamamoto

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

(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

In order to elucidate which is the major functional unit, tubulus or glomerulus, on bilirubin excretion into urine, toad (*Rana Clamitans*) was used for the experiment because the distribution of blood vessels in toads was anatomically well separated to glomerulus and tubulus.

³H-bilirubin was prepared with Wilzbach's method. Crude direct ³H-bilirubin was extracted from the rat bile after injection of ³H-bilirubin dissolved in rat serum into the duodenal canal. Crude direct ³H-bilirubin were fractionated into three bilirubin fractions named indirect, salt-form and ester-form bilirubin by Kosaka-Hara's method. Change of excretion rate of ester-form bilirubin into urine in various blood pH ranged from 6.4 to 7.4 was investigated from the Point of bilirubin-protein binding. The results were as follows ;

1. ³H-radio activity in the urine was bound with the indirect bilirubin at the rate of 85.78 % in average and with the ester-form bilirubin at the rate of 93.81% in average.

2. Ester-form bilirubin was excreted into the urine 1.69% in average by loading it to the renal portal vein, in the other hand, that of indirect bilirubin was 0.57% in average, in the first 5 minutes after loading.

3. Loading bilirubins to the renal artery, ester-form bilirubin was excreted into the urine, 10.60%, in average, indirect bilirubin was 0.08%, in average.

4. Excretion of ester-form bilirubin increased according to lowering blood pH, and reached maximum at pH 6.8 .

5. As the results, most parts of bilirubin excreted into the urine was the ester-form bilirubin. The site of excretion of bilirubin was mainly tubulus and its rate of excretion might depend on affinity between serum protein and bilirubin.