

Bilirubin 異性体に関する研究

第 二 編

Bilirubin 異性体の胆汁中への排泄

岡山大学医学部第一内科教室
(主任：長島秀夫教授・指導：小坂淳夫前教授)

丸 山 陸 郎

(昭和52年 9 月 3 日受稿)

緒 言

生体内 bilirubin は Gray ら¹⁾、中島ら²⁾、井沢³⁾により IX_a型のみとされていたが Petryka⁴⁾、Nichols⁵⁾は結晶 bilirubin 中に IX_a型以外に少量の IX_bまたは IX_c型の存在を報告している。他方 bilirubin には I から XVI までの異性体の存在が考えられるが、McDonagh⁶⁾は、市販の bilirubin 中に bilirubin IX_a以外に III_a、XIII_a型が存在するとした。著者も結晶 bilirubin 中に bilirubin IX_a型以外に微量の III_a、XIII_a型が存在すること、これら 3 種の異性体は核磁気共鳴スペクトル上差異を認め、分光化学的性状を異にすることを既に報告した。また Stoll⁷⁾は結晶 bilirubin を Na-amalgam で還元して生成された meso-bilinogen 中に IX_a型以外に III_a、XIII_a型を証明した。更に教室の瀬尾⁸⁾は人糞便中に III_a、XIII_a型の胆汁色素異性体の存在を報告したが、腸管内では腸内細菌叢による bilirubin の還元過程などの諸要素を考慮しなければならない。したがってこれらの型が生体内で生成されるのか、生成されるとすれば肝細胞への取り込み、抱合、排泄などの機序において差異はないかなどの点が問題となるが、これらについては未だ明らかにされていない。これらの点について結晶 bilirubin より精製分離した 3 種の bilirubin 異性体を rat 尾静脈に負荷し、生理的な胆汁への排泄状態を検討した。また人及び rat の胆汁中 bilirubin を分画分離することにより生体内で bilirubin 異性体が生成される可能性があるかについて検討した。

実験動物並びに検索対象

実験動物として Wistar 系 rat と英国 Royal Free Hospital の Billing 博士より供用された heterozygote Gunn rat⁹⁾を使用した。rat はいずれも体重 350～400 g の成熟雄性である。検索対象は肝胆道機能検査正常な 5 名の成人男子である。

実験材料並びに方法

1) ³H-bilirubin

Tritium gas を用いる Wilzbach 氏法¹⁰⁾により第一化学製の結晶 bilirubin より作製した。この ³H-bilirubin の放射活性は、 2.22×10^6 CPM/mg であった。

2) 胆汁採取法

a) rat 胆汁採取法

実験当日絶食させた実験動物を ether 麻酔下に腹部正中線上で開腹し、胆管に polyethylene tube No. 10 (IGARASI 医科工業 K. K. 製) を挿入することにより外胆汁瘻を作製し、これからの胆汁の排泄状態の良好であることおよび実験動物が ether 麻酔より回復していることを確かめた後、胆汁を採取した。胆汁採取は rat の生の胆汁中の bilirubin 異性体構成を検討する場合は、試料負荷は行わず、外胆汁瘻より胆汁を 24 時間採取した。また試料(後述)負荷の場合は注入後 2 時間間隔で 8 時間までのもの、および 8～24 時間までのもの計 5 分画で採取した。この間実験動物には水のみを与えた。

b) ヒト胆汁採取法

Meltzer-Lyon 法で行った。すなわち被検者に早朝空腹時に十二指腸 sonde を嚥下させ、X線透視下に金属球が十二指腸下降脚に達するのを確認した後、A胆汁の流出を確認し olive 油20 ml を注入し B胆汁排出後の C胆汁を採取し速やかに bilirubin の結晶化の試料に供した。

3) 薄層 chromatography

bilirubin 異性体 III_a, IX_a, XII_a の分離精製は Mc-Donagh らの方法⁶⁾に従った。

a) 試料

1) で作製した ³H-bilirubin および採取した胆汁より Ostrow の方法¹⁰⁾で結晶化した bilirubin を試料とした。

b) 固定相と展開液

Kieselgel G nach Stahl art Nr. 7731 (Merck) を用い、20×20 cm のガラス板に厚さ0.5 mm の薄層を作製した。展開液は acetic acid : chloroform (1:99 v/v) を使用した。

c) 展開

試料を chloroform に溶解後、固定相上に0.5 cm 以内の band として塗布、これを原点として一次元上昇法にて室温下 (15~20℃) 暗所で、band が三本に分離する Rf 0.7 付近まで持続的に展開した。分離した各 band を別々にかきとり、chloroform で溶出、0.1 N sodium hydrocarbonate ついで蒸留水で洗浄し予め chloroform で湿らせた東洋濾紙 No. 6 で分別した後減圧乾固した。

4) ³H-bilirubin III_a, IX_a, XII_a の負荷法

3) の方法で分離精製した ³H-bilirubin 異性体を 0.1 N sodium hydroxide 0.3 ml に溶解後、予め採取した Wistar 系 rat の血清 3 ml を加え、更に 0.1 N hydrochloric acid 0.3 ml を加えて中和後、実験動物の尾静脈より 0.5 ml 宛注入した。なお ³H-bilirubin III_a, XII_a 同時負荷の場合は、それぞれ 0.25 ml 宛注入した。

5) 胆汁中 bilirubin の結晶化

採取した胆汁よりの bilirubin 結晶化は、Ostrow ら¹¹⁾の方法によった。即ち胆汁を攪拌し胆汁 1 ml につき 20 mg の ascorbic acid を加え、胆汁の 1/2 量の 5% lead acetate solution を追加し bilirubin を鉛塩として沈澱させ遠沈後の上清を捨て沈澱を蒸留水で 1 回洗浄し、さらに ethanol で 3 回洗浄後、4 倍量の ethanol に攪散し再び遠沈し上清を捨て 3~4 mg の ascorbic acid を加え、bilirubin 分画を 4

倍量の 1 N sodium hydroxide で 20 分間、室温 (15~20℃)、遮光下で加水分解し、これを acetic acid で pH 0.5 に調整し、4 倍量の chloroform で遊離化した bilirubin を抽出する。この際できる中間層は分離し再び chloroform : acetic acid (3:1 v/v) で抽出液が無色になるまで抽出し、この chloroform 抽出液を合せ 1/2 量の 1% ascorbic acid 溶液で 6 回洗浄し、更に等量の 10% 食塩水で 1 回、次いで蒸留水で 4 回洗浄してあらかじめ chloroform で湿らせた東洋濾紙 No. 6 で濾過後、減圧乾固し 1/2 量の methanol を加え、chloroform を蒸発させると bilirubin は橙赤色針状に晶出する。

6) 放射活性測定

Scintilator として toluene 750 ml, ethanol 250 ml に PPO 4 g および POPOP 0.1 g を混じて作製した溶液の 14 ml に試料溶液 0.1 ml を加え、Packard 社製 Tricab Scintillation Counter で 15 分間測定した。試料は、rat 外胆汁瘻より採取された胆汁より 0.1 ml とり測定した。又胆汁より結晶化後、薄層により分画分離された bilirubin は chloroform にて溶出後、減圧乾固し、0.1 N sodium hydroxide に溶解後その 0.1 ml を使用した。

7) bilirubin 異性体の吸光度測定

薄層 chromatography により分離された bilirubin 異性体を再び chloroform 5 ml に溶解後日立 100-10 型光電比色計を用い、各 bilirubin 異性体の吸光極大即ち bilirubin III_a 456 nm, IX_a 454 nm, XII_a 451 nm でその吸光度を測定しその構成比を求めた。

実験成績

1) bilirubin 異性体の結晶析出率

bilirubin III_a, IX_a, XII_a の chloroform 溶液各 10 ml を用いて chloroform-methanol 系による結晶化率を各 4 検体で検討した結果、bilirubin 濃度 28.0~33.6 mg/dl の溶液で、bilirubin III_a 58.6±4.9%, IX_a 59.9±4.6%, XII_a 58.1±4.1%, bilirubin 濃度 14.0~16.8 mg/dl で、bilirubin III_a 53.7±2.9%, IX_a 54.1±5.9%, XII_a 54.2±5.8%, bilirubin 濃度 7.0~8.4 mg/dl で、bilirubin III_a 50.1±3.7%, IX_a 55.4±5.1%, XII_a 55.2±5.3% であり、bilirubin 濃度が大なる程結晶析出率が多い傾向があるが、いずれの濃度においても bilirubin III_a, IX_a, XII_a の三者間に有意な差は認められなかった。

2) ³H-bilirubin 異性体の胆汁中への排泄 (Table 1, Fig. 1)

Table 1-A Recovery of radioactivity into the bile after intravenous loading of ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$.

No.	Total CPM	0-2 hrs.	2-4 hrs.	4-6 hrs.	6-8 hrs.	8-24 hrs.	Total
1.	372366	42.9%	9.4%	7.8%	3.7%	6.4%	70.2%
2.	372366	47.2	15.6	5.2	4.4%	8.6	81.0
3.	171145	50.2	11.3	5.3	1.2	4.7	72.7
4.	171145	43.1	13.0	4.5	1.3	9.4	71.3
5.	193500	46.5	15.7	8.4	1.7	5.8	78.1
Mean $\pm$ S. D.		46.0 $\pm$ 2.7	13.0 $\pm$ 2.4	6.2 $\pm$ 1.6	2.5 $\pm$ 1.3	7.0 $\pm$ 1.8	74.7 $\pm$ 4.1

Abbreviation. CPM: count per minute.

Table 1-B Recovery of radioactivity into the bile after intravenous loading of ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$.

No.	Total CPM	0-2 hrs.	2-4 hrs.	4-6 hrs.	6-8 hrs.	8-24 hrs.	Total
1.	277500	43.2%	13.4%	2.6%	3.1%	8.7%	71.0%
2.	277500	43.5	9.9	6.8	1.4	8.8	70.4
3.	212305	45.8	8.6	5.9	1.0	11.7	73.0
4.	187400	47.6	13.7	3.6	0.8	10.8	76.5
5.	187400	46.5	14.4	5.7	2.2	6.9	75.7
Mean $\pm$ S. D.		45.3 $\pm$ 1.7	12.0 $\pm$ 2.3	4.9 $\pm$ 1.6	1.7 $\pm$ 0.9	9.4 $\pm$ 1.7	73.3 $\pm$ 2.4

Abbreviation. CPM: count per minute.

Table 1-C Recovery of radioactivity into the bile after intravenous loading of ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$.

No.	Total CPM	0-2 hrs.	2-4 hrs.	4-6 hrs.	6-8 hrs.	8-24 hrs.	Total
1.	188125	45.9%	12.8%	4.4%	1.9%	9.1%	74.1%
2.	188125	50.4	14.0	3.6	2.0	8.2	78.2
3.	188125	41.5	15.4	5.2	2.5	8.3	72.9
4.	221200	46.3	9.7	6.8	1.2	8.4	72.4
5.	221200	50.5	14.7	3.8	2.4	8.6	80.0
Mean $\pm$ S. D.		46.9 $\pm$ 3.3	13.3 $\pm$ 2.0	4.8 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 0.3	75.5 $\pm$ 3.0

Abbreviation. CPM: count per minute.

^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 負荷後の胆汁中への放射活性の経時的な排泄状態を調べた結果は Table 1-A の如く、負荷後 2 時間までに負荷量の 42.9~50.2%, 平均 46.0 $\pm$ 2.7% が排泄され 2~4 時間では 9.4~15.7%, 平均 13.0 $\pm$ 2.4%, 4~6 時間では 4.5~8.4%, 平均 6.2 $\pm$ 1.6%, 6~8 時間では 1.2~4.4%, 平均 2.5 $\pm$ 1.3%, 24 時間までに 70.2~81.0%, 平均 74.7 $\pm$ 4.1% が排泄された。 ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 負荷の場合 Table 1-B の如く、負荷後 2 時間で 43.2~47.6%, 平均 45.3 $\pm$ 1.7% が排泄され、2~4 時間では 8.6~14.4%, 平均 12.0 $\pm$ 2.3%, 4~6 時間では 2.6~6.8%, 平均 4.9 $\pm$ 1.6%, 6~8 時間では 0.8~3.1%, 平均 1.7 $\pm$ 0.9%, 24 時間までに 70.4~76.5%, 平均 73.3 $\pm$ 2.4% が排泄された。又 ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 負荷の場合は、Table 1-C の如く最初の 2 時間で 41.5~50.5%, 平均 46.9 $\pm$ 3.3% が排泄され、2~4 時間では 9.7~15.4%, 平均 13.3 $\pm$ 2.0%, 4~6 時間では 3.6~6.8%, 平均

4.8 $\pm$ 1.2%, 6~8 時間では 1.2~2.5%, 平均 2.0 $\pm$ 0.5%, 24 時間までに 72.4~80.0%, 平均 75.5 $\pm$ 3.0% が排泄された。Fig. 1 にその排泄状態を一括して示したが、III $_{\alpha}$ 負荷、IX $_{\alpha}$ 負荷、XII $_{\alpha}$ 負荷共にほぼ同様の排泄パターンを示し、2 時間までの排泄率、24 時間までの排泄率共に三者間に有意差を認めなかった。(P > 0.1)

3) ^3H -bilirubin 異性体負荷後の胆汁中 ^3H -bilirubin 異性体の構成比 (Table 2)

^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 負荷後に得られる胆汁より Ostrow の方法で結晶化した ^3H -bilirubin につき Mc-Donagh の薄層 chromatography を行った結果は Table 2-A の如く、 ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 1.5~3.4%, 平均 2.6 $\pm$ 0.7%, ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 92.5~95.0%, 平均 93.8 $\pm$ 0.9%, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 2.8~4.1%, 平均 3.6 $\pm$ 0.4% であった。同様に ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 負荷後では Table 2-B の如く、 ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 94.7

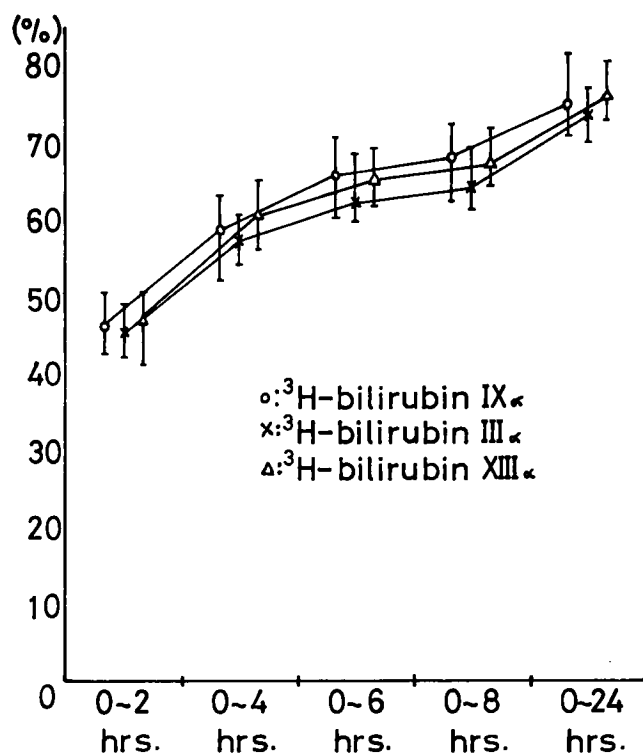


Fig. 1 Recovery of radioactivity into the bile after intravenous loading of ^3H -bilirubin isomers

* 5 Wistar strain rats used for each experiment.

Table 2-A Distribution of ^3H -bilirubin isomers recovered in the bile after intravenous loading of ^3H -bilirubin IX α .

No.	Total CPM	bilirubin III α	bilirubin IX α	bilirubin XIII α
1.	2029	3.2%	93.1%	3.7%
2.	2980	2.4	93.9	3.7
3.	3616	2.7	94.5	2.8
4.	3462	3.4	92.5	4.1
5.	2080	1.5	95.0	3.5
Mean $\pm$ S. D.		2.6 $\pm$ 0.7	93.8 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 0.4

Abbreviation. CPM: count per minute.

Table 2-B Distribution of ^3H -bilirubin isomers recovered in the bile after intravenous loading of ^3H -bilirubin III α .

No.	Total CPM	bilirubin III α	bilirubin IX α	bilirubin XIII α
1.	2203	94.7%	4.1%	1.2%
2.	1267	96.6	2.8	0.6
3.	1824	96.7	3.0	0.3
4.	2554	96.5	3.0	0.5
5.	2230	94.7	4.5	0.8
Mean $\pm$ S. D.		95.8 $\pm$ 0.9	3.5 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.3

Abbreviation. CPM: count per minute.

Table 2-C Distribution of ^3H -bilirubin isomers recovered in the bile after intravenous loading of ^3H -bilirubin XII_α .

No.	Total CPM	bilirubin III_α	bilirubin IX_α	bilirubin XII_α
1.	1002	0.6%	3.8%	95.6%
2.	3050	0.5	2.7	96.8
3.	3230	0.8	3.5	95.7
4.	1429	0.2	2.7	97.1
5.	2147	0.8	3.2	96.0
Mean $\pm$ S. D.		0.6 ± 0.4	3.2 ± 0.4	96.2 ± 0.6

Abbreviation. CPM: count per minute.

Table 2-D Distribution of ^3H -bilirubin isomers recovered in the bile after intravenous loading of a mixture of bilirubin III_α and XII_α .

No.	Total CPM	bilirubin III_α	bilirubin IX_α	bilirubin XII_α
1.	2542	50.0%	3.3%	46.7%
2.	1720	48.5	4.5	47.0
3.	1785	48.8	4.0	47.2
4.	2680	50.9	2.6	46.5
5.	3343	47.2	3.6	49.2
Mean $\pm$ S. D.		49.1 ± 1.3	3.6 ± 0.6	47.3 ± 1.0

Abbreviation. CPM: count per minute.

Table 3-A Distribution of bilirubin isomers in the bile (Wistar strain rat).

No.	bilirubin III_α	bilirubin IX_α	bilirubin XII_α
1.	4.21%	89.38%	6.41%
2.	5.02	89.18	5.80
3.	4.73	89.79	5.48
4.	5.10	89.66	5.24
5.	4.02	90.47	5.51
6.	4.46	90.49	5.05
Mean $\pm$ S. D.	4.59 ± 0.40	89.83 ± 1.96	5.58 ± 0.46

Table 3-B Distribution of bilirubin isomers in the bile (heterozygote Gunn rat).

No.	bilirubin III_α	bilirubin IX_α	bilirubin XII_α
1.	4.32%	90.81%	4.87%
2.	3.80	91.04	5.16
3.	5.47	90.52	4.01
4.	3.76	91.24	5.00
5.	3.54	91.45	5.01
Mean $\pm$ S. D.	4.18 ± 0.68	91.01 ± 0.69	4.81 ± 0.41

Table 3-C Distribution of bilirubin isomers in the bile (normal subject).

No.	bilirubin III_α	bilirubin IX_α	bilirubin XII_α
1.	3.83%	90.86%	5.31%
2.	4.00	90.54	5.46
3.	4.68	89.81	5.51
4.	4.22	90.65	5.13
5.	3.93	91.20	4.87
Mean $\pm$ S. D.	4.13 ± 0.33	90.61 ± 0.76	5.26 ± 0.11

～96.7%, 平均 $95.8 \pm 0.9\%$, ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 2.8～4.5%, 平均 $3.5 \pm 0.7\%$, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 0.3～1.2%, 平均 $0.7 \pm 0.3\%$ であり ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 負荷後では, Table 2-Cの如く, ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 0.2～0.8%, 平均 $0.6 \pm 0.4\%$, ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 2.7～3.8%, 平均 $3.2 \pm 0.4\%$, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 95.6～97.1%, 平均 $96.2 \pm 0.6\%$ であった. 更に Table 2-Dは ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ および ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ を同時に負荷した場合で, その構成比は ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 47.2～50.9%, 平均 $49.1 \pm 1.3\%$, ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 2.6～4.5%, 平均 $3.6 \pm 0.6\%$, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 46.5～49.2%, 平均 $47.3 \pm 1.0\%$ であった.

4) Wistar 系 rat の胆汁中 bilirubin の異性体構成比

負荷をしない場合の Wistar 系 rat の胆汁中 bilirubin 異性体構成比は Table 3-Aの如く, bilirubin III $_{\alpha}$ 4.02～5.10%, 平均 $4.59 \pm 0.40\%$, IX $_{\alpha}$ 89.18～90.49%, 平均 $89.83 \pm 1.96\%$, XII $_{\alpha}$ 5.05～6.41%, 平均 $5.58 \pm 0.46\%$ であり, ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 負荷後の胆汁中 ^3H -bilirubin 異性体構成比 ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 2.6±0.7%, IX $_{\alpha}$ 93.8±0.9%, XII $_{\alpha}$ 3.6±0.4%と比較すると III $_{\alpha}$ ($t = 4.56$, $0.005 > P > 0.001$) IX $_{\alpha}$ ($t = 8.30$, $0.001 > P$) XII $_{\alpha}$ ($t = 4.56$, $0.005 > P > 0.001$) で, 負荷をしない Wistar 系 rat 胆汁中の bilirubin III $_{\alpha}$, XII $_{\alpha}$ 異性体出現率が有意に高率であった.

5) Gunn rat (heterozygote) の胆汁中 bilirubin 異性体構成比

Gunn rat (heterozygote) の胆汁では, Table 3-Bの如く, bilirubin III $_{\alpha}$ 3.54～5.47%, 平均 $4.18 \pm 0.68\%$, IX $_{\alpha}$ 90.52～91.45%, 平均 $91.01 \pm 0.7\%$, XII $_{\alpha}$ 4.01～5.16%, 平均 $4.81 \pm 0.41\%$ であり, 負荷をしない Wistar 系 rat 胆汁中の異性体構成比との間に有意差を認めなかった.

6) 正常ヒト胆汁中 bilirubin 異性体構成比

正常ヒト胆汁では Table 3-Cの如く, bilirubin III $_{\alpha}$ 3.83～4.22%, 平均 $4.13 \pm 0.33\%$, IX $_{\alpha}$ 89.81～91.20%, 平均 $90.61 \pm 0.76\%$, XII $_{\alpha}$ 4.87～5.51%, 平均 $5.26 \pm 0.11\%$ であった.

総括並びに考案

bilirubin 異性体の胆汁中への排泄能に関する文献は少ないが, 近藤ら¹²⁾は oxyferrihem の IX $_{\alpha}$ 型および IX $_{\beta}$ 型を用いた実験で, 両者の胆汁中への排泄は IX $_{\alpha}$ 型が IX $_{\beta}$ 型に比しはるかによく排泄されること

を示したが, tetrapyrrole の構造をとった際には両型の排泄に余り差がないとしている. Wistar 系 rat 尾静脈への ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$, IX $_{\alpha}$, XII $_{\alpha}$ 型負荷後の胆汁中への排泄率は, 負荷後2時間, 24時間共に三者間に有意差はなく, 近藤らの成績を支持するものであった. ^3H -bilirubin 異性体負荷後の胆汁中 ^3H -bilirubin 異性体構成比の検討では, いずれの場合も負荷した型がほぼそのまま出現しているが, ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 負荷後に ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 2.6%, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 3.6%と, 他の型が微量ながら出現し, ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ と ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 同時負荷後の胆汁に ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ が3.6%出現した事は, 実験操作過程あるいは rat 体内において第一編において言及した McDonagh ら^{13, 14, 15)}の異性体間の相互変換が起る可能性を示唆する成績であった. 同様の考えからすれば ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 負荷後に ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ が3.5%, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 負荷後に ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ が3.2%出現した事実も説明し得る. ただ本実験において, ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 負荷後の胆汁に ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ が0.7%, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 負荷後の胆汁に ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ が0.6%出現した事に関しては, 化学構造上の理論では説明できず, 実験誤差と解釈すべきであろう.

次に生の Wistar 系 rat 胆汁中の bilirubin IX $_{\alpha}$ 以外の bilirubin 異性体出現率は, bilirubin III $_{\alpha}$ 4.59%, bilirubin XII $_{\alpha}$ 5.58%であり, ^3H -bilirubin IX $_{\alpha}$ 負荷後の ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$ 2.6%, ^3H -bilirubin XII $_{\alpha}$ 3.6%に比し, 有意に高率であった. このことより, 異性体間の相互変換を考慮に入れてもなお, Wistar 系 rat 体内に, 微量ながら bilirubin III $_{\alpha}$ 及び bilirubin XII $_{\alpha}$ が存在すると考えられた. これら異性体の生体内での生成機序, 生成場所はなお不明であるが, 生成された場合は, ほぼ同様に胆汁中へ排泄されると考えられる.

Gunn rat 及び正常ヒト胆汁中にも微量の bilirubin III $_{\alpha}$, XII $_{\alpha}$ を認めたことより, これら bilirubin 異性体が微量ながら生成されるものと推測された. しかしこれら bilirubin の代謝過程は不明で今後の検討を要するものと考えられた.

結 論

^3H -bilirubin を McDonagh の方法で ^3H -bilirubin III $_{\alpha}$, IX $_{\alpha}$, XII $_{\alpha}$ に分離精製後 Wistar 系 rat 尾静脈に負荷し胆汁中への排泄状態および胆汁中 ^3H -bilirubin 異性体構成比を検討した. また生の Wi-

star 系 rat 胆汁, Gunn rat (heterozygote) 胆汁, 正常ヒト胆汁中の bilirubin 異性体構成についても検討し次の結果を得た。

1) 胆汁への排泄率は負荷後2時間で ^3H -bilirubin IX_α は負荷量の平均46.0%, III_α 45.3%, XII_α 46.9% であり, 24時間までに IX_α 平均74.7%, III_α 73.3%, XII_α 75.5%であった。2時間までの排泄率, 24時間までの排泄率いずれにおいても三者間に有意差を認めなかった。(P>0.1)

2) 胆汁中 ^3H -bilirubin 異性体構成比は, ^3H -bilirubin IX_α 負荷後では, 平均 III_α 2.6%, IX_α 93.8%, XII_α 3.6%, ^3H -bilirubin III_α 負荷後では, III_α 95.8%, IX_α 3.5%, XII_α 0.7%, ^3H -bilirubin XII_α 負荷後では, III_α 0.6%, IX_α 3.2%, XII_α 96.2%であり, ^3H -bilirubin III_α , XII_α 同時負荷の場合は III_α 49.1%, IX_α 3.6%, XII_α 47.3% といずれの場合も負荷した型がほぼそのまま胆汁中へ回収された。

3) 生の Wistar 系 rat 胆汁中の bilirubin 異性体

構成比は平均 III_α 4.59%, IX_α 89.83%, XII_α 5.58% で ^3H -bilirubin IX_α 負荷後と比較して, III_α , XII_α の出現率は有意に高率であった。 III_α ($t = 4.56$, $0.005 > P > 0.001$), XII_α ($t = 6.83$, $0.001 > P$)。

4) Gunn rat (heterozygote) 胆汁中の bilirubin 異性体構成比は平均 III_α 4.18%, IX_α 91.01%, XII_α 4.81%, ヒト胆汁中では, 平均 III_α 4.13%, IX_α 90.61%, XII_α 5.26% であった。

以上より生体内には bilirubin IX_α 以外に微量の bilirubin III_α および XII_α 異性体が存在すると考えられ, それらの胆汁への排泄率は bilirubin IX_α と差がないと考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたって直接御指導をいただいた小坂淳夫岡山大学医学部第一内科前教授ならびに近藤忠亮講師に深く感謝致します。本論文の御校閲いただいた岡山大学医学部第一内科長島秀夫教授に深謝致します。

文 献

- 1) Gray, C. H., Nicholson, D. C. & Nicholaus, R. A.: The IX_α structure of the common bile pigments. *Nature*, **181**: 183, 1958.
- 2) Nakajima, H., Takemura, T., Nakajima, O. & Yamaoka, K.: Studies on heme α -methenyl oxygenase. I., *J. Biol. Chem.*, **238**: 3784, 1963.
- 3) 井沢徹一: 胆汁色素に関する研究. 第II編胆汁中 Bilirubin 異性体の検討, 岡山医学会誌, **87**: 339, 1975.
- 4) Petryka, Z. J.: Identification of isomers differing from IX_α in the early labelled bilirubin of the bile (31515). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**: 464, 1966.
- 5) Nichol, A. W. & Morell, D. B.: Studies on the isomeric composition of biliverdin and bilirubin by mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **184**: 173, 1969.
- 6) McDonagh, A. F. & Assisi, F.: Commercial bilirubin: A trinity of isomer. *FEBS Letters*, **18**: 315, 1971.
- 7) Stoll, M. S. & Gray, C. H.: The oxidation products of crude mesobilirubinogen. *Biochem. J.*, **271**, 1970.
- 8) 瀬尾憲司: 尿中胆汁色素に関する研究. 第II編 糞便中 mesobilirubinogen の性状と臨床的意義, 岡山医学会誌, **87**, 749, 1975.
- 9) Gunn, C. K.: Hereditary acholuric jaundice in the rat. *Canad. Med. Ass. J.*, **50**: 230, 1944.
- 10) Wilzbach, K. E.: Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**: 1013, 1957.
- 11) Ostrow, J. D., Hammaker, L. & Schmid, R.: The preparation of crystalline bilirubin- C^{14} . *J. Clin. Invest.*, **40**: 1442, 1961.
- 12) Kondo, T., Nicholson, D. C., Jackson, A. H. & Kenner, G. W.: Isotopic studies of the conversion of oxophlorins and their ferrihaems into bile pigments in the rat, *Biochem. J.*, **121**: 601,

1971.

- 13) McDonagh, A. F. & Assisi, F. : Direct evidence for the acid-catalysed isomeric scrambling of bilirubin IX_a. J. Che. Soc. Che. Commun., 117, 1972.
- 14) McDonagh, A. F. & Assisi, F. : The ready isomerisation of bilirubin IX_a in aqueous solution. Biochem. J., 129 : 797, 1972.
- 15) McDonagh, A. F. : Thermal and photochemical reactions of bilirubin IX_a. Annals New York Academy of Sciences, 244 : 553, 1975.

Studies on bilirubin isomers
Part 2. Biliary excretion of bilirubin isomers
by
Mutsuo MARUYAMA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Kiyowo Kosaka & Prof. Hideo Nagashima)

Tritiated commercial bilirubin, mixture of bilirubin isomers was separated into bilirubin III α , IX α and XIII α by thin layer chromatography of McDonagh's method and each fraction was further purified by the method. Biliary excretion following intravenous loading of ^3H -bilirubin isomers to Wistar strain rats was serially determined.

Compositions of the isomers in the biles collected from Wistar strain rats, heterozygote Gunn rats and normal human subjects were determined.

The results obtained were as follows.

1) The excretion ratio in 0—2 hours following the loading of ^3H -bilirubin isomers was 46.0% of ^3H -bilirubin IX α , 45.3% of ^3H -bilirubin III α and 46.9% of ^3H -bilirubin XIII α respectively. The biliary excretion within 24 hours following the administration of ^3H -bilirubin isomers was 74.7% of ^3H -bilirubin IX α , 73.3% of ^3H -bilirubin III α and 75.5% of ^3H -bilirubin XIII α respectively. No statistically significant difference among the excretion ratios of the isomers in these hours fractions was calculated. ($p < 0.1$)

2) The compositions of biliary ^3H -bilirubin isomers determined by thin layer chromatograms after separate loading of tritiated III α , IX α and XIII α in the order were III α fraction 95.8%, 2.6% and 0.6%, IX α fraction 3.5%, 93.8% and 3.2% and XIII α fraction 0.7%, 3.6% and 96.2%, respectively. Combined loading of tritiated III α and XIII α isomers resulted in the bile composition of III α 49.1%, IX α 3.6% and XIII α 47.3%. These results suggest a intact recovery of those isomers.

3) The bile composition of the isomers in unloading Wistar strain rat was III α 4.59%, IX α 89.83% and XIII α 5.58%. Contents of III α and XIII α of these rats were significantly increased when compared with those loaded with ^3H -IX α isomer. III α ($t=4.56$, $0.005 > p > 0.001$), XIII α ($t=6.83$, $0.001 > p$).

4) The composition of biliary isomers in heterozygote Gunn rats was III α 4.18%, IX α 91.01% and XIII α 4.81%. Those in normal subjects was III α 4.13%, IX α 90.61% and XIII α 5.26%.

According to the results mentioned above, it is considered that a fairly detectable amount of bilirubin III α and XIII α exist in the native bile of mammals and that their biliary excretion ratio in the unit hours can be the same level of IX α isomer.