

岡山医学会雑誌

第87巻9, 10, 合併号 (第970, 971号)

昭和50年10月30日発行

尿中 Bilirubinoid に関する研究

第一編

結核患者尿中 bilirubinoid に及ぼす抗結核剤の影響

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂 淳夫教授)

瀬 尾 憲 司

(昭和50年5月23日受稿)

緒 言

胆汁に排泄され、十二指腸に到達した bilirubin は、小腸、大腸を経て糞便中に排泄されるまでに、腸内細菌叢によって bilirubin から urobilinogen まで還元されることはすでに Baumgärtel (1943) や Watson (1942) らによって報告されている。教室重井,¹⁾ 松井,²⁾ 光田³⁾ らも bilirubin から urobilinogen への還元過程に腸内細菌叢が関与することを認めている。鈴木⁴⁾ は抗生物質を経口投与した場合の尿中に dihydrosobilirubin の出現を認め、これは腸内細菌叢の変化にもとづくものとした。近藤⁵⁾ は腹部症状を伴う脳脊髄神経症の患者尿中に urobilinogen 前段階物質が出現することより腸内細菌叢の変化を推測している。一方結核患者ではしばしば肝障害が存在⁶⁾ し、その程度は結核の重症度と比例すること、さらにそれが抗結核剤の服用量ならびに期間と密接な関係があるとされている。そこで urobilinogen 量が増加する場合にそれが直接、肝障害によるものか、結核自体による腸内細菌叢の変化によるか、抗生剤

である抗結核剤による腸内細菌叢の変化によるかが問題となる。そこでこれらの点に検討を加えるため尿中 bilirubinoid の変化について検索した。

検 査 対 象

対象は国立津山療養所に肺結核症として入院中の20才より70才までの男子10人、女子5人の計15人で、使用抗結核剤別では rifampicin (RFP) 450mg/日単独使用5例、rifampicin 450mg/日と他の抗結核剤使用例5例 (RFP, CPM, INH. 1例, RFP, KM, INH. 1例, RFP, EB, INH. 1例, RFP, KM, INH. 1例, RFP, EB, KM. 2例) 及び SM, PAS, INH. 使用者5例と KM, PAS, INH. 使用者4例と KM, EB, INH. 1例である。薬剤使用法としては RFP (rifampicin) 450mg/日食前1回投与, SM (streptomycin) 1gm/日週2回の筋注法, PAS (para-aminosalicylate) 10g/日分3回投与, INH (isonicotinohydrazide) 0.4g/日分3回投与, KM (kanamycin) 2g/日朝夕1gずつ週2回筋注, EB (ethambutol) 1g/日分2回経口投与, CPM (capreomycin) 1g/日週2回筋注法にて施行した。対照

として20才から40才の健康(肝機能正常な)男子4例, 女子1例の計5例について同様に行った。

実験材料と方法

1) 糞便採取法

糞便を排泄後すみやかに使用するか、使用するまで直射日光をさけ、黒色紙につつま-20℃のフリーザー中にて凍結して保存した。

2) 尿中 bilirubinoid 抽出調整法

教室今井⁹⁾の方法で尿中 bilirubinoid を抽出した。すなわち、糞便を倍量の蒸留水で薄めミキサーで混和後、10% NaOH 溶液で pH 8.0 に調整、30分間放置した後、分液漏斗に移し同量の石油エーテルを加えて十分に振盪したのち、1% HCl で pH 7.0~pH 6.0 とした。これに chloroform を加えてよく振盪したのち分離された chloroform 層を採取した。これを数回くり返し、採取した chloroform 抽出液を十分に水洗したのち濾別し、さらに減圧乾固したものを試料とした。

3) Bilirubinoid 分画分離法

a) Column chromatography による bilirubinoid 分画分離

教室今井の方法(図1)で column chromatogr-

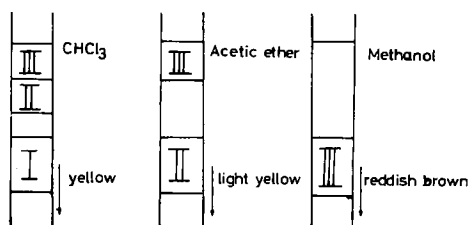


Fig. 1. Separation method of fecal bilirubinoid by column chromatography.

Column was packed at the height of about 10 cm with silica gel in chloroform and developed with chloroform, acetic ether and methanol in the order at room temperature in dark room.

aphyを行った。すなわち、Silica gel (関東化学製) を chloroform でとかして高さ10cm直径12mmのガラス管の下部に綿栓をほどした column に注ぎ高さ10cmの柱を作成し、その上端に2で作成した試料を少量の chloroform に溶解し、1cm以内の高さに加えた。展開は室温(10~20℃)下でアルミ箔で遮光して行った。まず chloroform で展開して流下する黄色の分画を chloroform 分画とし、次に acetic ether, methanol の順に展開液を変えて、それぞれ流下する層を acetic ether 分画, methanol 分画と

して分画採取した。

a) Paper chromatography 法

Column chromatography で分離された chloroform 分画を減圧乾固したものを試料とし、直径6.5cm高さ33cmの硝子円筒に、ゴム栓を施して展開装置となし、濾紙は Schleicher & Schüll No. 2043a を用い、原点は濾紙端より4cmとし、直径5mm以内に附着させた。展開実験は室温にて上昇法により、原点より15cm以上展開した。展開溶媒としては(1) n-butanol, sat. ammonia; (2) acetone: water: ammonia (80:15:5 V/V), (3) propanol: water (7:3 V/V), (4) methanol: water (1:2 V/V) を使用した。

4) 定性試験と定量法

Bilirubin とその誘導体の定性試験として Gmelin 反応, Ehrlich 氏 diazo 反応, Ehrlich 氏 aldehyde 反応, Schlesinger 反応と pentdyopent 反応を行った。還元物質は benzidine 反応, amino 酸は ninhydrin 反応, 胆汁酸は燐モリブデン酸反応を行った。また bilirubin は Jendrassik & Cleghorn 氏変法で、また尿 urobilinogen は教室渡辺⁹⁾の方法で測定した。

5) 吸光曲線測定法

島津製自記分光光度計 (UV 200型) を用いて可視部で吸光曲線を測定した。

6) 肝機能検査

血清 bilirubin は総 bilirubin と直接 bilirubin とにわけて測定した。膠質反応は cephalin-cholesterol 絮状試験 (CCF), Thymol 混濁試験 (TTT), Kunkel 氏硫酸亜鉛濁濁試験 (ZTT), と塩化 cobalt 反応 (CoR) を行った。血清総蛋白量, 血清蛋白分画及びA/G比を測定した。酵素診断には血清乳酸脱水素酵素 L.D.H を Wroblewski 法で、血清 transaminase (GOT, GTP) を Karmen 法で、alkaline phosphatase は Bessy-Lowry 法で測定した。そのほか血清 cholesterol, triglyceride, 尿 urobilinogen についても検査した。

実験成績

1) 抗結核剤使用前後の糞便中 urobilinogen 量

抗結核剤使用前後の糞便中の urobilinogen 量と使用薬剤を8例について検査した成績は表1の如く、6症例は抗結核剤使用前後も略同量の urobilinogen 排泄が見られたが、他の7例では抗結核剤使用後に urobilinogen 量の減少が認められ、urobilin-

Table (1) Change of the amount of excreted fecal urobilinogen before and after antituberculosis drugs.

No.	name	Age	sex	urobilinogen (mg/day)		antituberculosis drugs		
				before	after			
1.	K. Y.	42	male	174.7	102.5	SM	PAS	INH
2.	K. M.	60	male	170.8	144	SM	PAS	INH
3.	Y. K.	46	male	247.5	156	SM	PAS	INH
4.	A. T.	70	male	200	50	RFP	KM	EB
5.	U. S.	71	male	186.5	89		RFP	
6.	F. I.	48	male	176	182		RFP	
7.	S. M.	47	female	240	135		RFP	
8.	S. S.	68	male	192	90		RFP	
average				198.4	118.6			

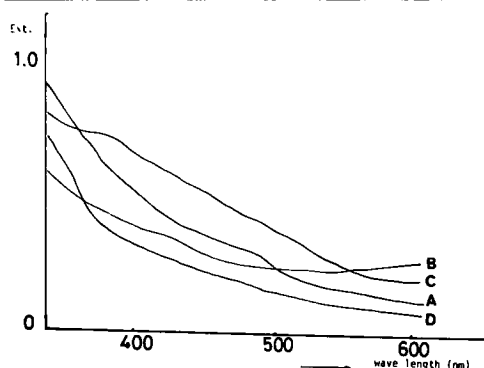


Fig. 2. Absorption curves of chloroform and acetic ether fraction separated from the feces of normal subjects before RFP (rifampicin) administration. Absorption spectra of chloroform fractions, A normal subjects, C before RFP administration. Absorption spectra of acetic ether fractions, B normal subjects, D before RFP administration.

ogen 排泄量は平均で、使用前 198.4mg/日、使用後 118.6 mg/日で推計学的に有意の減少($P < 0.001$)であった。

2) 健康者の糞便中 bilirubinoid について (表 2)

a) Chloroform 分画

Chloroform分画は淡黄色を呈し、その吸光曲線は図2の通り、認むべき吸光の極大をみとめなかった。また、定性反応でも Gmelin 反応 (G. R.), Ehrlich 氏 diazo 反応 (D. R.), Ehrlich 氏 aldehyde 反応 (A. R.), Schlesinger 反応 (S. R.) ともすべて陰性であった。(図 2-A)

b) Acetic ether 分画

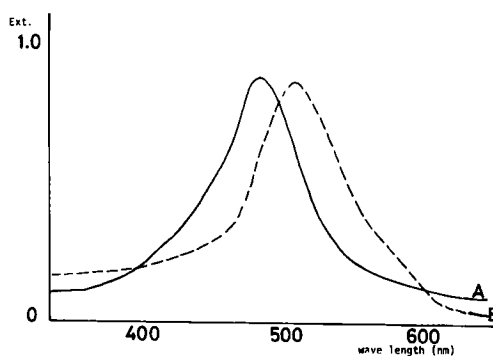


Fig. 3. Absorption curves of methanol fraction.

A: Absorption spectrum of methanol fraction (pH 6.2)

B: Absorption spectrum of methanol fraction after addition of Schlesinger reagent.

淡黄褐色の物質の存在が認められたが、吸収の極大は図 2-B のように目だった極大は無かった。定性反応は G. R., D. R., A. R., S. R. すべて陰性を呈した。

c) Methanol 分画

赤褐色の色調を呈し吸収の極大は図 3-A のように 490nm にあり Schlesinger 試薬を加えることにより吸収の極大は 506nm に移動した。(図 3-B) 定性反応では D. R., G. R., A. R. は陰性であったが Schlesinger 反応では緑色の蛍光を発し陽性であった。

3) 抗結核剤使用前の糞便中の bilirubinoid (表 3)

a) Chloroform 分画

Chloroform 分画は淡黄色を呈し、2 (d) と同様に吸光の極大はなく、定性反応も 2 (a) のそれ

Table (2) Absorption maxima and chemical reactions for bile pigments in chloroform, acetic ether, and methanol fractions in the group of normal subjects.

No.	Name	age	sex	chloroform fraction					acetic ether fraction					methanol fraction				
				Abs. Max. (nm)	D.R.	G.R.	A.R.	S.R.	Abs. Max. (nm)	D.R.	G.R.	A.R.	S.R.	Abs. Max. (nm)	D.R.	G.R.	A.R.	S.R.
1.	M. H.	21	male		—	—	—	—		—	—	—	—	490	—	—	—	+
2.	Y. S.	20	male		—	—	—	—		—	—	—	—	490	—	—	—	+
3.	S. A.	43	female		—	—	—	—		—	—	—	—	490	—	—	—	+
4.	H. S.	33	male		—	—	—	—		—	—	—	—	490	—	—	—	+
5.	M. T.	23	male		—	—	—	—		—	—	—	—	490	—	—	—	+

Abbreviations; Abs. Max. absorption maxima; D. R. Ehrlich's diazo reaction; G. R. Gmelin reaction; A. R. Ehrlich's aldehyde reaction; S. R. Schlesinger reaction.

と同様にすべて陰性であった。(図2-C, 表2.)

b) Acetic ether 分画

淡黄褐色の物質の存在が認められたが, 2 (b)

と同様に吸光の極大は認められず, (図2-D) 定性反

応でも 2 (b) のそれと同様 G. R., D. R., A. R., S. R. すべて陰性を呈した。(表3)

Table (3) Absorption maxima and chemical reactions for bile pigments in chloroform, acetic ether, and methanol fractions in the group before rifampicin (RFP) treatment.

No.	name	age	sex	chloroform fraction					acetic ether fraction					methanol fraction					
				Abs.					Abs.					Abs.					
				Max.	D.	R.	G.	R.	A.	R.	S.	R.	Max.	D.	R.	G.	R.	A.	R.
				(nm)					(nm)					(nm)					
1.	T. H.	24	male	—	—	—	—		—	—	—	—		490	—	—	—	—	+
2.	F. T.	55	female	—	—	—	—		—	—	—	—		490	—	—	—	—	+
3.	S. M.	50	male	—	—	—	—		—	—	—	—		490	—	—	—	—	+
4.	R. I.	69	male	—	—	—	—		—	—	—	—		490	—	—	—	—	+
5.	T. S.	57	female	—	—	—	—		—	—	—	—		490	—	—	—	—	+

Abbreviations; Abs. Max. absorption maxima; D. R. Ehrlich's diazo reaction; G. R. Gmelin reaction; A. R. Ehrlich's aldehyde reaction; S. R. Schlesinger reaction.

c) Methanol 分画

全症例とも褐色の色素が認められ, 2 (c) と同様に吸光の極大は490nmにあり, 定性反応では D. R., G. R., A. R. とともに陰性で S. R. は陽性で, その吸光極大は506nmに移動した。

4) 抗結核剤 RFP 450mg/日, 単独投与群の糞便中 bilirubinoid (表4)

a) Chloroform 分画

吸光曲線は症例1では415nm, 435nm, 480nm,

症例2では415nm, 435nm,

症例3, 4では425nm, 450nm, 症例5では450nmに, それぞれ小さな吸光極大が認められたが定性的には

D. R., A. R., G. R., S. R. すべて陰性であった。

b) Acetic ether 分画

Pentdyopent 反応を施行したが陰性であった。

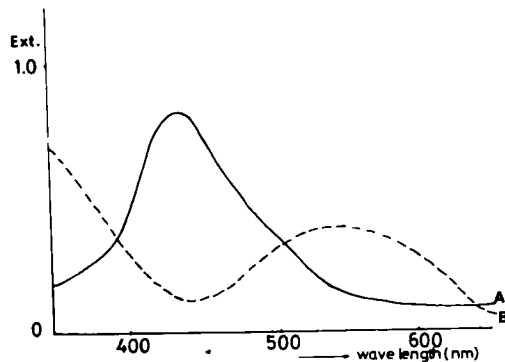
症例1は415nmに吸光の極大があり, G. R. 陽性, D. R. 陽性, A. R. 陽性, S. R. 陰性で dihydro-mesobilirubin と同定した。症例2は415nmに吸光の極大をもち435nmに小さな極大があったが, 定性試験では G. R., D. R., A. R. すべて陰性で bilirubinoid を同定出来なかった。症例3, 4, 5は425nmに吸光極大があり G. R. 陽性, D. R. 陽性で, A. R., S. R. は陰性で mesobilirubin と同定した。この物質の吸光曲線は図4-Aでその azo 色素の pH

Table (4) Absorption maxima and chemical reactions for pigments in chloroform, acetic ether, and methanol fractions in the group of rifampicin (RFP) treatment.

No.	name	age	sex	antituberculosis drug	chloroform fraction				acetic ether fraction				methanol fraction			
					Abs.	D. G. A. S. R. R. R. R.	Abs.	D. G. A. S. R. R. R. R.	Abs.	D. G. A. S. R. R. R. R.						
					Max. (nm)		Max. (nm)		Max. (nm)							
1.	T. H.	24	male	RFP	415 435 480	-----	415	++ ± -	490	-----	+					
2.	F. T.	55	female	RFP	415 435	-----	415 435	-----	490	-----	+					
3.	S. M.	50	female	RFP	425 450	-----	425	++ ---	490	-----	+					
4.	R. I.	69	male	RFP	425 450	-----	425	++ ---	490	-----	+					
5.	T. S.	57	female	RFP	450	-----	425	++ ---	490	-----	+					

Abbreviations; Abs. Max. absorption maxima; D. R. Ehrlich's diazo reaction; G. R. Gmelin reaction; A. R. Ehrlich's aldehyde reaction; S. R. Schlesinger reaction.

Fig. 4. Absorption curve of acetic ether fraction.
A: Absorption spectrum of acetic ether fraction. (pH4.8)
B: Absorption spectrum of acetic ether fraction after addition of Ehrlich's diazo reagent. (pH3.6)



3.6での吸光極大は545nmであった。(図4-B)

c) Methanol 分画

全症例とも褐色の色素が認められ、その吸光極大は490nmにあり、定性反応では G. R., D. R., A. R. ともに陰性, S. R. は陽性で、その吸収極大は508nm

であり, urobilin IXa 又は stercobilin と同定した。
5) RFP と他の抗結核剤併用群の糞便中の bilirubinoid.

a) Chloroform 分画

症例1 (RFP, CPM, INH 使用例) では吸光極大は420nmにあったが、定性反応 D. R., G. R., A. R., S. R. はすべて陰性であった。症例2 (RFP, KM, INH 使用例) では小さな吸光極大が460nmに認められたが、定性反応では D. R., G. R., A. R., S. R. ともすべて陰性であった。症例3 (RFP, EB, INH 使用例) では吸光曲線では425nmと450nmにごく小さな山が認められたが、定性反応は G. R., D. R., A. R., S. R. 共に陰性であった。症例4.5 (RFP, KM, EB, 使用例) では症例2と同様に吸光の極大は460nmにあったが、定性反応は G. R., D. R., A. R., S. R. 共に陰性であった。

b) Acetic ether 分画

症例1と3は吸光極大が425nmにあり、定性反応では G. R., D. R. は陽性, A. R., S. R. は陰性で mesobilirubin と同定した。症例2と5では吸光の極大が415nmに認められ、G. R., D. R. は陽性, A. R. は疑陽性, S. R. は陰性で dihydromeso-

Table (5) Absorption maxima and chemical reactions for bile pigments in chloroform, acetic ether, and methanol fractions in the group of rifampicin (RFP) and other antituberculosis drugs treatment.

No.	name	age sex	combination drugs	chloroform fraction		acetic ether fraction				methanol fraction			
				Abs. Max. (nm)	D. G. A. S. R. R. R. R.	Abs. Max. (nm)	D. G. A. S. R. R. R. R.			Abs. Max. (nm)	D. G. A. S. R. R. R. R.		
1.	T. M.	64 male	RFP CPMINH	420	-----	425	++--			490	----+		
2.	I. Y.	25 male	RFP KM INH	460	-----	415	++±-			490	----+		
3.	F. I.	60 male	RFP EB INH	425 450	-----	425	++--			490	----+		
4.	A. T.	66 male	RFP EB KM	460	-----	425	-----			490	----+		
5.	R. I.	70 male	RFP EB KM	460	-----	415	++±-			490	----+		

Abbreviations : Abs Max. absorption maxima ; D. R. Ehrlich's diazo reaction ; G. R. Gmelin reaction ; A. R. Ehrlich's aldehyde reaction ; S. R. Schlesinger reaction ; RFP Rifampicin ; CPM Capreomycin ; EB Ethambutol ; KM Kanamycin ; INH Isonicotinohydrazide.

bilirubin と同定した。症例4は425nmに小さな吸光極大があったが定性反応 G. R., D. R. A. R., S. R. はすべて陰性であった。

c) Methanol 分画

全例ともに吸光極大は490nmにあって、定性反応は D. R., G. R., A. R. とともに陰性、S. R. のみ陽性で、urobilinIXα 又は stercobilin と同定した。

6) 一次抗結核薬と二次抗結核薬投与群の尿中 bilirubinoid.

a) Chloroform 分画

症例1, 2, 4, (SM., PAS., INH例)と症例5 (KM., EB., INH例)では460nmに吸光の極大があり、症例3 (SM., PAS., INH例)では吸光曲線上450nmに小さな吸光極大があったが、定性反応では G. R., D. R., A. R., S. R., とともにすべて陰性を呈した。

b) Acetic ether 分画

症例1, 2は有意の吸光極大はなく、症例4は410nmに吸光極大があったが、定性反応では G. R., D. R., A. R., S. R. すべて陰性であった。症例3, 5は

425nmに吸光の極大があり、G. R. D. R. 陽性、A. R. は疑陽性、S. R. は陰性で、mesobilirubin と同定した。

c) Methanol 分画

全例とも吸光曲線上490nmに吸光極大があり、S. R. 陽性で、urobilin IXα または stercobilin と同定した。

7) Paper chromatography による検討

健康者に認められない黄色色素が RFP 使用時の chloroform 分画に出現し、吸光曲線上からは胆汁色素を否定しえないため、chloroform 分画 (図5) を減圧乾固したものを試料として paper chromatography を行った。溶媒系 (1) では $R_f=0.9$ 附近に spot をみとめ、対照とした。bilirubin は原点にとどまった。また溶媒系 (2) で展開した結果は原点にとどまった。溶媒系 (3) で展開した結果は $R_f=0.98$ に tailing を有する spot が認められた。溶媒系 (4) で展開すると $R_f=0.80$ 附近に tailing を有する spot を認めた。これら paper chromatogram に用いた試料についての定性反応で

Table (6) Absorption maxima and chemical reactions for bile pigments in chloroform, acetic ether, and methanol fractions in the group of antituberculosis drugs treatment.

No.	name	age sex	combination drugs	chloroform fraction			acetic ether fraction			methanol fraction		
				abs. max. (nm)	D. G. A. S. R. R. R. R.		abs. max. (nm)	D. G. A. S. R. R. R. R.		abs. max. (nm)	D. G. A. S. R. R. R. R.	
1.	I. T.	70 female	SM PAS INH	460	-----			-----		490	----+	
2.	F. S.	21 female	SM PAS INH	460	-----			-----		490	----+	
3.	K. Y.	42 female	SM PAS INH	450	-----		425	++--		490	----+	
4.	M. T.	41 male	SM PAS INH	460	-----		410	-----		490	----+	
5.	M. I.	58 male	KM EB INH	460	-----		425	++--		490	----+	

Abbreviations: Abs Max absorption maxima; D. R. Ehrlich's diazo reaction; G. R. Gmelin reaction; A. R. Ehrlich's aldehyde reaction; S. R. Schlesinger reaction; SM Streptomycin; PAS Paraaminosalicylate; INH Isonicotinohydrazide; KM Kanamycin; EB Ethambutol.

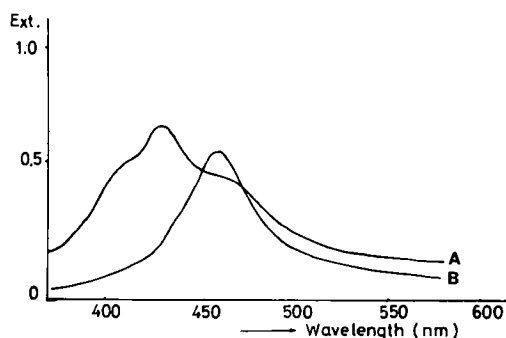


Fig. 5. Absorption spectra of chloroform fraction

A: after RFP administration.

B: Absorption spectrum of RFP in chloroform.

は ninhydrin 反応, 燐 molybdene 酸反応, benzidine 反応とも陰性であった。

8) RFP 使用前及び使用後の肝機能検査成績

肝機能検査成績は表7のごとく, RFP使用前及び使用後の血清 bilirubin, 直接 bilirubin, Al—pase 活性, GOT, GPT, TTT, ZTT, CCF, A/G 比及び cholesterol, triglyceride 量に有意な差は認めなかった。

総括と考案

胆汁中に排泄された bilirubin は腸内細菌叢の働きによって urobilinogen に還元される。従って腸内細菌叢に影響を及ぼすような疾患や薬剤は当然 bilirubin の還元過程に変化を起こすと考えられる。また抗結核剤使用時には肝障害を来しやすいことが大曲⁶⁾、太田⁷⁾らによっても報告されているので肝機能検査成績に異常を認めない患者について検討した。一方教室の鈴木⁸⁾は抗生物質 chloramphenicol (CM), dihydrostreptomycin (DS), chlortetracyclin (AM), tetracyclin (TM) を投与し

Table (7) Results of liver function tests before and after Rifampicin administration.

Case No.	name	age	sex	T. B.		D. B.		Alpase		T. G.		Cholesterol	
				before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1.	T. H.	24	male	0.3	0.3	0	0.1	5	5	128	118	165	170
2.	F. T.	55	female	0.3	0.4	0.1	0.1	7	6	140	130	154	155
3.	S. M.	50	female	0.5	0.4	0.2	0.2	4	4	130	134	150	160
4.	R. I.	69	male	0.4	0.3	0.1	0.1	2.8	3	105	120	165	165
5.	T. S.	57	female	0.7	0.7	0.2	0.1	8	7	108	115	170	180

Case No.	GOT		GTP		LDH		T. P.		A/G		TTT		ZTT		CCF	
	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after	before	after
1.	28	30	8	17	245	260	7.5	7.1	1.6	1.5	3.3	4	4	4	—	—
2.	26	25	19	20	235	230	7.4	7.0	1.3	1.3	3	3	4.2	4.5	—	±
3.	20	24	18	18	245	260	7.4	7.8	1.8	1.5	4	3	5	7	—	—
4.	18	20	40	36	265	260	6.5	7.0	1.0	1.3	1	3	6	7	—	±
5.	31	27	40	36	285	280	7.5	8.1	1.4	1.6	2	4	5	6	—	—

Abbreviations : T.B. total bilirubin (mg/dl), D.B. direct bilirubin, Alpase. alkaline phosphatase (King-King Unit), T.G. triglyceride, T.P. total protein (g/dl)

た患者の糞便中に mesobilirubin, dihydromesobilirubin を認めている。松井³⁾ は肝疾患例の空腸および回腸を Müller-Abott 管で採取し小腸液中の bilirubinoid の検出を行った際に, mesobilirubin, dihydromesobilirubin を証明することがあり, その場合に E. coli が小腸内に侵入していることに重要な意義があるとしている。更に今井⁸⁾ は抗生剤 (CM, AM, TM, DS) 服用中の患者の尿中に dihydromesobilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin を証明するとともにこれら尿濾液を bilirubin に作用させることにより, mesobilirubin より stercobilinogen までのすべての bilirubinoid が生成されることを認めた。

このように抗生剤は腸内細菌叢に影響を与え, bilirubin の還元課程を変化させることが明らかとなった。さらに教室重井⁹⁾ によれば E. coli のみでは bilirubin から urobilinogen までには還元されないとしている。多羅尾¹⁰⁾ らは klebsilla, enterococcus, bacterioides が bilirubin から urobilinogen への代謝に関与していると云っている。RFP は streptomycetes mediterranei の産生する rifamycin 群より化学的に半合成された抗生剤で, Verbrist¹⁵⁾ らは 30 mg/Kg の大量をアフリカ人 100 人に投与した際には, 一過性の血清 bilirubin の排泄遅延が認められるこ

とを報告しているが, 通常の投与量では影響はないとしている。又 Capell¹⁷⁾ らは 600mg 単独投与した際に肝細胞への取り込みを障害することを認めているが, 著者の 450mg/日投与例では高bilirubin 血症を認めず, Verbrist の通常量では影響がないとの成績と一致した。小酒井¹¹⁾ らは試験管実験で腸内細菌 (Klebsiella, proteus など) の発育を抑制する作用を認め, また上野¹²⁾ らも大腸菌 bacterioides などにも抗菌力は弱いと認めている。RFP は経口投与された場合に腸管より吸収され, 胆汁中に高濃度に排泄され, その大部分は desacetyl rifampicin で, 一部分 RFP のまま排泄されることが知られている。このようなことから RFP は腸内細菌叢に影響を与えることが推測されたが, 人体に投与した際の直接的な腸内細菌叢への影響について報告されていないようである。以上のことより, RFP 投与前後の糞便中 urobilinogen 排泄量を測定した所, 投与前値に比較して投与後に有意の減少が認められ, bilirubin の腸管内代謝に変化を及ぼすことが認められた。そこで, 今井の方法により糞便中の bilirubinoid の検出を行った所, acetic ether 分画で RFP 単独使用例 5 例中 2 例に mesobilirubin, dihydromesobilirubin が, RFP と他の抗結核剤併用の 5 例でも mesobilirubin 2 例, dihydromesobilirubin 2

例が, SM., PAS., INH. 使用例に4例中1例と KM., EB., INH. 使用例1例に mesobilirubin が認められた. このように bilirubin より urobilinogen までの中間段階物質が証明されたことは bilirubin から urobilinogen までの中間段階物質を認めた鈴木, 今井, 松井らの成績と一致するものであった.

一方 RFP 単独投与例の糞便中より column chromatography で分画分離される chloroform 分画は黄色色調をもち, 定性的には bilirubinoid の反応はいずれも陰性であるので胆汁色素由来の色素とは考えられないが, 健康者では見られないため, この黄色物質について検討した. まず RFP が chloroform によく溶解¹³⁾することからその存在を疑ったが, RFP の吸光極大は 475nm であることより RFP とは異なるものと思われた. また中川¹⁴⁾らは肝で抱合されたと考えられる rifampicin-glucuronide の水溶液は吸光極大が 410nm と 450nm に軽い shoulder をもつ 435nm の peak であると報告しており, これと糞便中の chloroform 分画の吸光極大とは一致する点もあるが, 435nm の吸光極大が他の極大と同程であることや, 軽度の peak であることより, ただちに rifampicin-glucuronide と云いがたいように思われた. (図5-B) また desacetyl rifampicin の吸光極大は 470nm で, chloroform 分画の吸光極大とは一致しなかった. また paper chromatogram で amino 酸, 胆汁酸, 還元物質はすべて陰性であった.

次に methanol 分画は健康者, 抗結核剤服用者とも吸光極大と定性試験より urobilin IX α 又は stercobilin であった.

以上 RFP 投与前に認められなかった bilirubin より urobilinogen までの中間段階物質を投与後に認めたことより, bilirubin 代謝の面より RFP は腸内細菌叢に影響をあたえることを間接的に証明しえた

と云えよう.

結 論

腸内細菌叢に及ぼす抗結核剤の影響を RFP 単独使用群5例 RFP と他の抗結核剤併用群5例と RFP 以外の抗結核剤使用群5例の計15例の糞便について, それに含まれる bilirubinoid を教室今井の方法により column chromatography と分光化学的分析により同定することにより検討し, 次の結果をえた.

1) 抗結核剤使用前後の糞便中の urobilinogen 量は投与前の平均 198.44mg/日より投与後 118.63mg/日と減少した.

2) RFP 使用前の糞便中には urobilin IX α ないし stercobilin 以外の胆汁色素は証明しえなかった. また使用前後の肝機能検査成績では有意の差はなくことに血清 bilirubin 値の上昇は認められなかった. RFP 単独使用群5例中2例に mesobilirubin, 2例に dihydromesobilirubin が証明され, RFP と他の抗結核剤併用例それぞれ2例に, mesobilirubin, dihydromesobilirubin が認められた. 一次抗結核剤使用の4例中2例と KM., EB., INH. 使用の1例でも mesobilirubin を証明した.

3) RFP 使用群で健康者に認められない吸光極大が chloroform 分画で認められたが, 定性反応と吸光極大の peak より bilirubin の誘導体また, RFP とその誘導体とも異った.

4) RFP 単独投与群で bilirubin より urobilinogen までの中間段階物質が認められたことより RFP が腸内細菌叢に影響をあたえるものと推測された.

(稿を終るにあたり直接御指導いただいた近藤忠亮講師に深く感謝致します)

文 献

- 1) 重井博：腸内細菌による urobilinogen の生成に関する研究，第一編 urobilinogen の生成過程における *E. coli communis* の意義，医学研究，**24**：1436—1449，1954.
- 2) 重井博：腸内細菌による urobilinogen の生成に関する研究，第3編，尿尿内 urobilinogen 分割構成に及ぼす腸内細菌の影響，医学研究，**29**：1463—1475，1954.
- 3) 松井健治：小腸内 Bilirubin 還元に関する研究，第一編，小腸内細菌叢特に *E. coli* の分布について，医学研究，**29**：1077—1087，1959.；第2編小腸内 Bilirubin 還元物質について，医学研究，**29**：1086—1093，1959.；第3編，腸管内 bilirubin 生成に関する検討，医学研究，**29**：1094—1101，1959.
- 4) 光田利弘：腸内細菌叢による bilirubin の還元に関する研究，第一編 Ehrlich's aldehyde 反応陽性を呈する胆汁中の胆汁色素分割の検討，岡山医誌，**71**：7047—7056，1959.
；第2編 *E. coli communis* の胆汁色素還元能について，岡山医誌，**71**：7057—7064，1959.
- 5) 鈴木稔：Dihydromesobilirubin に関する研究，第2編，抗生剤経口投与尿及び病的尿中に urobilinogen 陽性尿に於ける Dihydromesobilirubin の検出，医学研究，**28**：2549—2558，1958.
- 6) 近藤忠亮：腹部症状を伴う脳脊髄神経症 (SMON) 患者尿中の Bilirubinoid，医学と生物学**82**. 163—167，1971.
- 7) 太田康幸・滝谷泰博：抗結核剤使用時の肝機能異常の出現率，肝臓，**6**：133，1965.
- 8) 今井春路郎：腸管内 bilirubin の還元過程について，第一編 尿中 bilirubinoid の分離について岡山医誌，**71**：8813—8318，1958.；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，岡山医誌，**71**：8319—8324，1959.
- 9) 渡辺春生：urobilin 体の定量に関する研究，第一編 Urobilin 体定量法の検討，岡山医誌，**71**：6953—6965，1959.
- 10) 多羅尾和郎・小原侃市・斎藤洋一・小田切繁樹：腸内細菌（菌種別）の Bilirubin 代謝に関する研究，医学のあゆみ，**77**：385—388，1971.
- 11) 小酒井望・小栗豊子・小崎繁昭・小池薫：臨床材料から分離した各種病原菌の Rifampicin 感受性について，診療，**23**：974—978，1970.
- 12) 上野一恵・二宮敬宇・清水弘之・鈴木祥一郎：Rifampicin の嫌気性菌に対する抗菌作用，診療，**23**：994—995，1970.
- 13) 佐野光司，網川延孝：Rifampicin の化学，診療，**23**：928—935，1970.
- 14) 中川英雄・砂原茂一：Rifampicin の人体内代謝とその代謝調節，日内誌，**62**：1162—1163，1973.
- 15) Verbist, L. & Rollier, F.: Pharmacological study of rifampicin after repeated high dosage during intermittent combined therapy. Respiration, **28**: Suppl. 17—28, 1971.
- 16) 大曲春次：抗結核剤の効果に及ぼす肝障害の影響について，長崎医学会誌，**42**：509—528，1967.
- 17) Capelle, P, Dhumeaut, D. Mora, M, Feldmann, G. & Berthelot, P.: Effect of rifampicin on liver function in man, Gut, **13**：366—371，1972.

Studies on fecal bilirubinoid.

Part 1. Influence on antituberculosis drugs on fecal bilirubinoid in lung tuberculosis.

by

Kenji SEO

The first department of internal medicine, Okayama university medical school.

(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

To elucidate the influences on the intestinal fecal flora by antituberculosis drug rifampicin and the combination with other remedies to tuberculosis, fecal bilirubinoids were fractionated by IMAI's column chromatography, and identified with photochemical natures of them. Examined cases with lung tuberculosis were consisted of two groups (A) five cases were administered rifampicin (RFP) only, (B) fifteen cases were given RFP and other antituberculosis drugs, and (C) five normal subjects as control. The results were as follows :

1) After administration of antituberculosis drugs, the amount of fecal urobilinogen decreased significantly from 198.44mg to 118.63mg averaged daily.

2) No significant change was observed in the results of liver function tests, that is, serum bilirubin, nonspecific colloid reactions, GOT, GPT, cholesterol, alkaline phosphatase and triglyceride before and after medication.

3) Mesobilirubin and dihydromesobilirubin were identified in each two cases out of group A and group B. Mesobilirubin was detected in two cases out of four using first choice remedies to lung tuberculosis and a case administered Kanamycin, INH and ethambutol.

4) Absorption maxima of the chloroform fraction colored yellow extracted from the feces of group A were not observed in group C. The yellow pigment did not identified as bilirubinoid or rifampicin and its derivatives with absorption spectra and chemical reactions for the bile pigments.

5) The intermediates of bilirubin to urobilinogen were identified in group A and group B, these results support RFP influences on the intestinal fecal flora from the point of bilirubin metabolism in the intestine.