

腸内細菌叢による bilirubin の還元に関する研究

第 1 篇

Ehrlich's aldehyde 反応陽性を呈する胆汁中の胆汁色素分割の検討

岡山大学医学部第一内科教室 (主任 小坂教授)

光 田 利 弘

(昭和34年8月28日受稿)

緒 言

生体内の urobilin 体生成の機構に関しては現在三説があり、第一に M. Jaffé (1868) 等の肝臓内生成説、第二に R. Maly (1871) に始まり、H. K. Kämmerer & K. Miller,¹⁾ C. J. Watson 等多くの支持をうける腸管内生成説、第三には Tr. Baumgärtel 等のいう所謂二元説、即ち腸内細菌は bilirubin を stercobilinogen のみに還元し、一方肝組織酵素により bilirubin は mesobilinogen に還元されるというものである。

これ等の諸説は鋭く対立したまま現在に至っているが、特に Tr. Baumgärtel は mesobilinogen は腸内細菌によつて stercobilinogen に還元されることはないとするに対し、C. J. Watson 等は胆汁成分と腸内細菌の二つの因子の存在の下に、Mesobilinogen より stercobilinogen へ還元されるとしている。

一方 C. J. Watson は胆汁中には bilirubin のみを、小腸内に Mesobilirubin を証明したのに反し、Tr. Baumgärtel は胆汁中に mesobilirubin を証明したと報告している。

教室鈴木は抗生剤経口投与中の尿中より、mesobilirubin 並びに dihydromesobilirubin を証明し、同じく松井は Miller-Abbott の sonde を用いて、主として肝胆道系疾患患者の小腸各部の腸液を採取し、dihydrobilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin 等の中間物質を証明し、その出現が E. coli の存在と相関関係にあることから、腸内細菌による bilirubin 還元は、試験管内での膠状 palladium を触媒とする接触還元と同一の段階を経て (Fig. 1) の如く順次 urobilin 体へ還元されるとし

ている。

そこで著者は胆嚢疾患患者のB-胆汁で Ehrlich's aldehyde 反応陽性を呈する計20例について胆汁を精査し、mesobilinogen と stercobilinogen を分離し、更には胆汁中の bilirubin から urobilin 体への中間物質の検出をも試み、これら成績と臨床検査成績との比較検討を行い、上記の生体内 urobilinogen 生成機序の問題点に解明を与えようと企てた。

mesobilinogen と stercobilinogen の鑑別には2~3の方法があるが、ここでは mesobiliviolin 反応²⁾を選び、その判定を正確にする目的で、この chloroform 抽出液を column chromatography を利用し³⁾、各色素を分離し各々の分光学的並びに化学的性状を検討した。

実験材料並びに実験方法

1. 実験材料

十二指腸 sonde 法により25% MgSO₄ 40cc を注入後流出するB-胆汁を無菌的に採取した後、速やかに Ehrlich's aldehyde 反応を行い、陽性を示すものについて検討を行った。

2. 実験方法

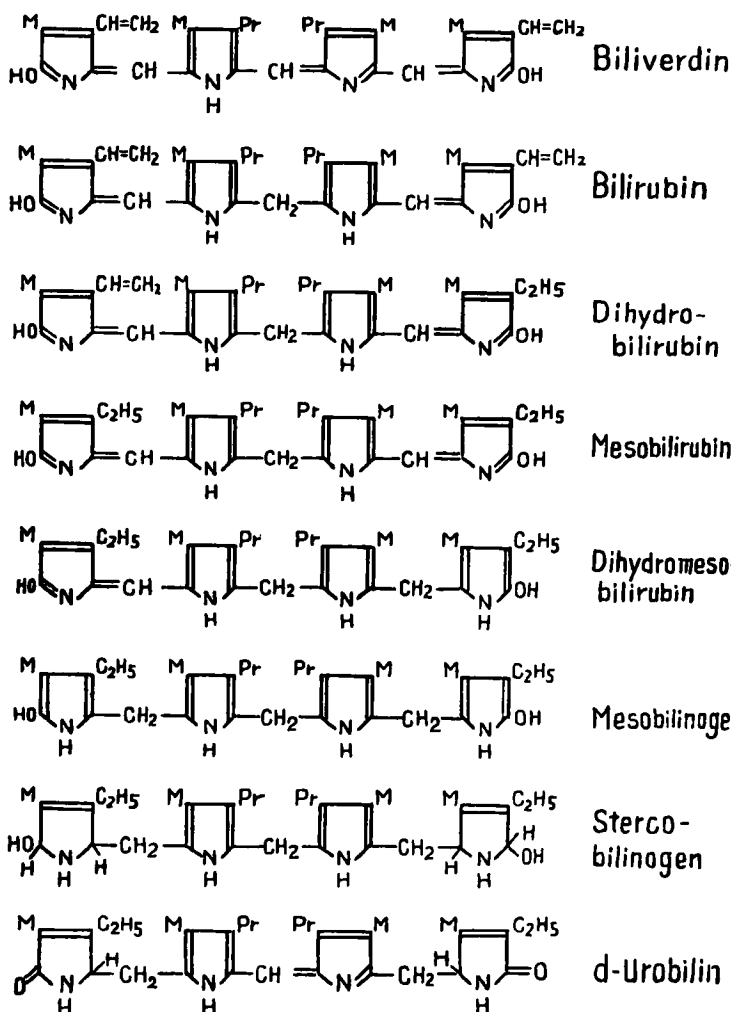
2. 1 胆汁の臨床的検査

採取した胆汁については Ehrlich's aldehyde 反応の他、蛋白反応 (煮沸法)、pH、bilirubin 濃度を測定し、更に1分間 3000 回転の遠心沈澱を行い、沈澱を生標本並びに methylenblau 及び Gram 染色標本について観察した。

細菌の培養には血液寒天培地を用い、38°C、24~48時間培養後の集落を鏡鏡並びに鑑別培地に培えて分離した。

2. 2 mesobiliviolin 反応

Fig. 1 The chemical structure of bile pigments



胆汁を 10cc 試験管にとり、25% HCl 9 cc 及び飽和 FeCl₃ 水溶液 1 cc を加え、混和した後、沸騰水中に浸し、5 分間煮沸し、直ちに流水中に浸して冷却した。

2. 3 mesobiliviolin 反応液中色素の chloroform への抽出

反応液を分液漏斗に移し、蒸留水で 2 倍に稀釈し、等量の chloroform を加えて振盪し、chloroform 層が着色しなくなるまでこれを繰返した。

2. 4 chloroform 抽出液の column chromatography

CHCl₃ 及び silicagel を以て形成した column を調整し、抽出液を注ぐと全色素はその上端に吸着される。これを ethyl acetate を以て展開し、各色素層を観察すると共に、流下する各色素層を分割採取し、若しくは展開率の差の小さいものは固定相を圧出し、ethyl acetate を滴下して乾燥を防ぎつつ、刀

尖にて分離し乾燥させた後、methanol で溶出して爾後の検索を行った。

2. 5 胆汁中胆汁色素の抽出並びに分離

胆汁を分離漏斗にとり 1/10 N-HCl を加えて pH=5 とし、等量の chloroform を加えて充分振盪すると黄色に乳化する。これを遠心沈澱すると下部に透明な黄色の chloroform 相、上部に微かに黄色を呈する水相、両者の中間に白色の粘液を主とする粘稠な少量の層の三層に分れる。

上部の水層をとり chloroform を加えて同様の抽出を繰返し、得た chloroform 相を減圧濃縮し、chloroform 及び silica gel を以て形成した column chromatography を行い、chloroform, ethylacetate 等で展開し順次流下する色素を採取した。

2. 6 分光学的検索

DK型 Beckman 自記分光光度計を用いて各色素の吸光曲線を記録した。

2. 7 定性反応

2. 7. 1 螢光

水銀石英燈を用いて暗室内で観察した。

2. 7. 2 diazo 反応

L. Jendrasik & R. A. Cleghorn

²⁶⁾ の処方によつた。

2. 7. 3 Gmelin 反応

緑色以外の色調の変化も観察した。

2. 7. 4 Ehrlich's aldehyde 反応

W. Hildebrandt ²⁷⁾ の処方によつた。

2. 7. 5 Schlesinger 反応

判定は水銀石英燈下で観察した。

2. 7. 6 塩化第二鉄反応¹⁴⁾

H. Fischer の方法によつた。

2. 7. 7 pentdyopent 反応

教室岩原(定) ²⁸⁾ になつた。

2. 8 偏光度の測定

mesobiliviolin 反応抽出液中の黄～赤～褐色の色素分割について、Franz-Schmidt & Haensch 社製偏光計を用いて測定した。なお光源としては Zeiss 製 natrium lump の「D」光線を用い、17~20°C で測定した。

2. 9 dioxan-HCl 煮沸反応

C. J. Watson ⁴⁾ に倣い、試料を dioxan に溶解し、1~2滴の 10% HCl を加え、沸騰水中で加熱し、10~15分間その色調の変化を観察した。

d-urobilin に於ては、オレンジ色→紫色→青色→緑色に変化する。stercobilin では色調の変化なく、urobilin IX α に於ては紫色を経て5~10分で無色となる。

実験成績

1. 第1例の検索

本例は (Table 1) に示す如く溶血性黄疸患者であつて、胆嚢炎を合併する例である。

B-胆汁は黒褐色を呈し、沈渣に炎症所見を認め、大腸菌を証明し、bilirubin の排泄が高度であると共に、胆汁の Ehrlich's aldehyde 反応は強陽性を示した。

1. 1 第1例の mesobiliviolin 反応

mesobiliviolin 反応を行い、その色素を chloroform に抽出すると chloroform 相は暗青褐色を呈した。

Fig. 2. The column chromatogram of the extract after the mesobiliviolin reaction of case 1.

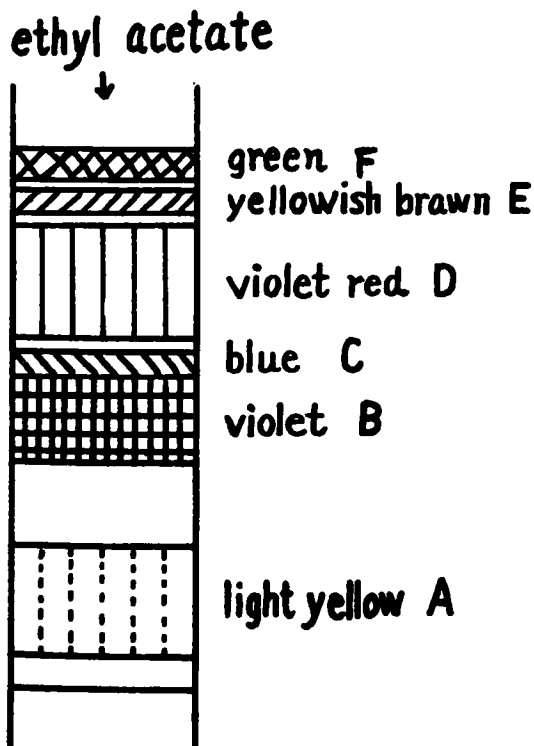


Fig. 3. The absorption curves of each eluent in Fig. 2.

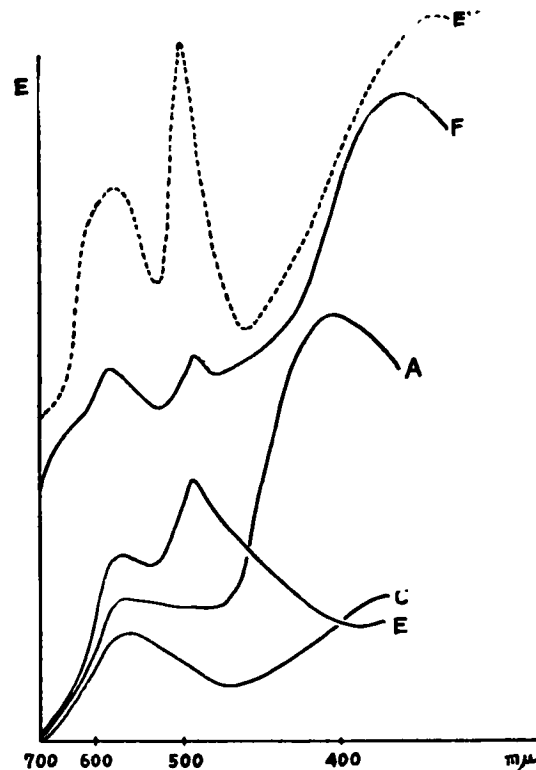


Fig. 4. The absorption curves of each eluent and their zinc acetate in Fig. 2.

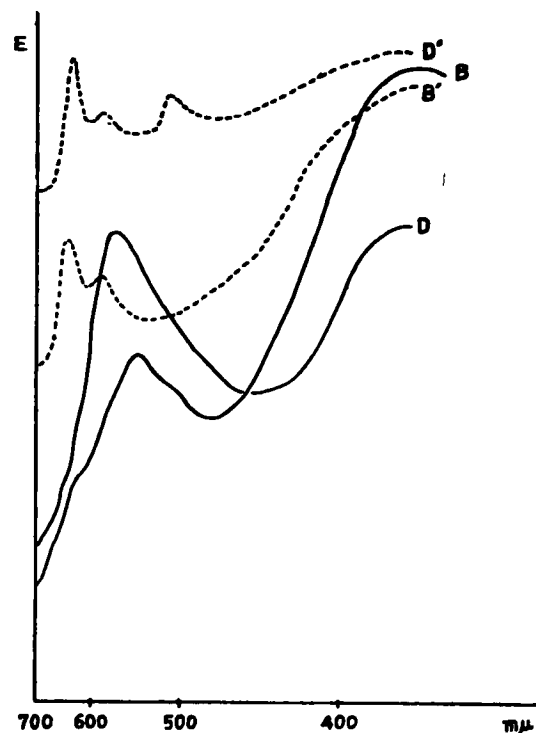


Table 1. The relation between the results of clinical tests and the detection of mesobilinogen and stercobilinogen in each case.

No. of cases	name	complications	chief medication used on the cases	urinary aldehyde reaction	serumbilirubin mg/dl total/direct	pH	aldehyde reac.	protein	bilirubin (mg/dl)	B-bile			M : S *	
										sediment	epithel	gram (-)		
										W.B.C.	R.B.C.			
1	S.Y.	hemolytic jaundice	o	+	2.32 1.09	5.8	##	+	260.5	-	##	##	E. coli	M < S
2	N.N.	hemolyt. j. chr. hepatitis	kemicetin urocidal	±	0.90 0.33	7.0	##	+	216.9	-	-	-	-	M
3	K.O.	livercirrh. chr. nephritis	kemicetin	+	1.24 0.71	7.4	+	##	38.9	+	##	##	E. coli	M
4	T.I.	chr. hepatitis	o	±	0.85 0.71	7.0	+	+	42.3	-	+	+	-	M > S
5	K.M.	chr. pancreat. stom. ulcer	o	-	0.90 0.52	7.4	+	+	86.7	-	##	##	-	M > S
6	S.D.	acute. hep. diabetes	o	-	0.71 0.33	7.4	##	+	5.1	-	+	-	diplo c.	M < S
7	S.D.	acute hep. diabetes	o	-	0.71 0.14	7.6	##	-	19.5	-	-	-	-	M
8	H.H.	chr. hepatitis	o	-	1.09 0.33	7.4	##	-	0	-	+	+	-	M
9	H.H.	chr. hepatitis	prednisolon	-	1.48 0.71	7.2	##	-	0	-	-	-	-	M < S
10	H.H.	chr. hepatitis	prednisolon	-	1.24 0.71	7.4	+	±	7.2	-	+	-	E. coli	M > S
11	T.M.	serum hep.	aureomycin prednisolon	##	6.05 4.68	7.4	±	±	43.4	-	-	-	candida	M
12	I.T.	hemolyt. j. chr. hepatitis	o	-	0.71 0.33	7.2	+	±	20.8	-	+	+	diplo c.	M > S
13	T.T.	serum hep.	o	±	0.71 0.14	7.4	+	±	21.8	-	+	-	-	M > S
14	S.O.	chr. hepatitis	o	-	0.71 0.14	7.0	+	+	20.9	-	##	+	E. coli	M < S
15	T.I.	chr. hepatitis	o	±	0.90 0.33	7.2	±	+	30.4	-	##	+	E. coli	S
16	I.T.	hemolyt. j. chr. hepatitis	o	+	2.04 0.90	6.8	+	+	31.4	+	##	##	E. coli	M > S
17	T.U.	o	lederkyn	-	2.24 1.24	6.8	+	+	14.5	+	##	##	E. coli	S
18	M.T.	livercirrh.	o	+	0.33 0.14	7.2	+	±	20.8	-	##	+	-	M > S
19	S.O.	chr. hepatitis	lederkn	+	1.19 0.52	7.0	##	-	32.3	+	##	-	-	o
20	S.M.	o	achromycin V abcide	-	0.71 0.14	7.2	-	-	21.7	-	-	-	-	M

* M = mesobilinogen

S = stercobilinogen

この色素の吸光曲線は (Fig 3. EX) の通りである。

この chloroform 相を column chromatography により ethyl acetate で展開すると, (Fig. 2)

のとおり A, B, C, D, E, F, の 6 層の美麗な色素層に分離した,

A 層は微量の淡黄色色素であつて, その化学的性状を明らかにし得なかつたが, ethylacetate 溶液で

400 μ に極大を、570 μ に膨隆を有する不明の色素である。(Fig. 3. A)

B層は紫色を呈し、540 μ に極大を、625 μ に膨隆を示し、(Fig. 4. B) 醋酸亜鉛 alcohol を加えると緑青色に変じ、紫外線下で赤色の螢光を発生し、吸光曲線上 625 μ 及び 580 μ に極大を示す。(Fig. 4. B') 即ちこの色素は mesobiliviolin と考えられる。

C層は青色を呈し、甚だ微量且つ不安定であつて、吸光曲線を描く操作に至るまでの1時間余りの間に殆んど無色となり、試みに吸光曲線を描いたが、570 μ に小さな極大をみたのみであつた。(Fig. 3. C) この青色の色素は後述する胆汁中の mesobilirubin の酸化によつて生じた glaucobilin である可能性はあるが、明らかにし得なかつた。

D層以下は展開率小で境界不鮮明となるので silica gel を圧出し分割し乾燥後 methanol で溶出した。

D層は美しい紫赤色を呈し、CHCl₃ 溶液は赤色を呈し、560 μ に吸収の極大を有し、(Fig. 4. D) 醋酸亜鉛 alcohol を加えると桃色となり、緑褐色の螢光を発生し、その吸光曲線は 625 μ 、580 μ 及び 510 μ に吸収の極大を有し、(Fig. 4. D') mesobilirubin 即ち mesobilierythrin (R. Lemerg¹⁵⁾) の性状と略一致する。

E層は黄褐色を呈し、490 μ に尖鋭な極大を、(Fig. 3. E) 570 μ に小なる極大を有し、醋酸亜鉛 alcohol を加えることにより黄緑色を呈し、黄緑色の螢光を発生し、506 μ に吸収の極大が移動した。即ち stercobilin と考えられる。

F層は緑青色を呈し、580 μ 、375 μ 及び 490 μ に吸収の極大を認め、(Fig. 3. F)胆汁中の bilirubin が酸化された biliverdin であり、一部 stercobilin が混入したものである。biliverdin は本例に於ては極めて多量に生じたが、これは胆汁中 bilirubin 量の高値を示すことから当然と考えられるが、chloroform に移行するものは僅かであつて、他は絮状沈澱となつて水相と chloroform 相との中間に残るので、chromatogram に於て上端に吸着される量は少量に過ぎない。

1, 2 第1例の胆汁色素分割

この症例の B-胆汁を塩酸酸性で chloroform に抽出し、これを silica gel-chloroform の column-chromatography により、chloroform で展開すると、(Fig. 5) の如く、最初に流下する黄色色素は、chloroform 溶液に於て 450 μ に吸収の極大を有

Fig. 5. The column chromatograms of the bilepigments in the bile of case 1.

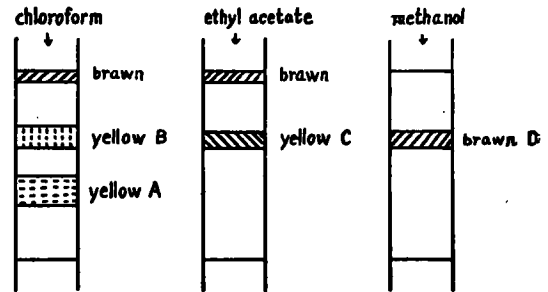
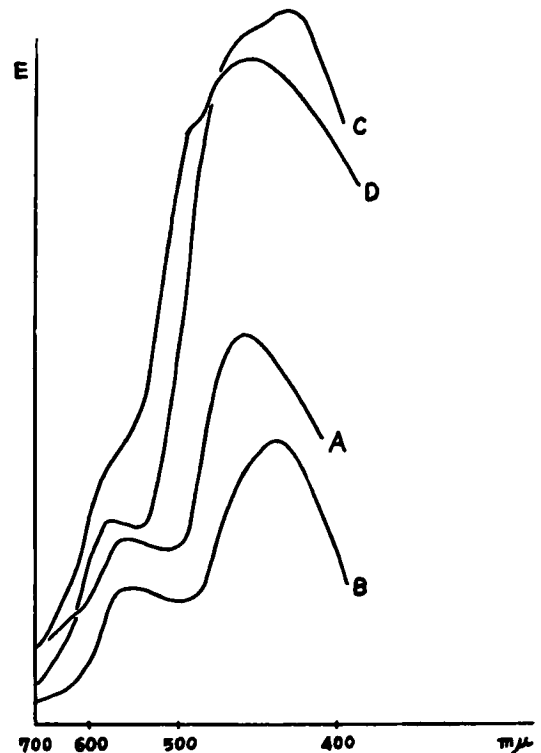


Fig. 6. The absorption curves of the each eluent in Fig. 5.



し。(Fig. 6. A) 直接 diazo 反応陰性、間接 diazo 反応陽性、Gmelin 反応陽性を示し、Ehrlich's aldehyde 反応、Schlesinger 反応、pentdyopent 反応は何れも陰性、塩化第二鉄反応で緑色を呈する。

即ち間接型 bilirubin である。(Table 2.)

続いて流下する黄色層は、chloroform 溶液に於て、425 μ に吸収の極大を有し、(Fig. 6. B) その化学的性状は上記色素 (A) と同様であり、mesobilirubin であつた。

次いで ethyl acetate で展開して流下する黄褐色の色素は、415 μ に吸収の極大を有し、450 μ 、

Table 2. The chemical properties of each eluent in Fig. 5.

	A	B	C	D
color	yellow	yellow	yellow	brown
direct diazo reac.	-	-	+	o
indirect diazo reac.	+	+	o	o
Gmelin reac.	+	+	red	o
aldehyde reac.	-	-	(+)	o
Schlesinger reac.	-	-	-	+
FeCl ₃ reac.	green	green	red	o
pent-dyopent reac.	-	-	-	o
absorption maxima (m μ)	450	425	415	440

570m μ に膨隆を有する。(Fig. 6. C) 直接 diazo 反応陽性, Gmelin 反応で直に赤色を呈し, 塩化第二鉄反応で赤色を呈し, Ehrlich's aldehyde 反応は遅延反応を示し, Schlesinger 反応, pentdyopent 反応は何れも陰性であつたので (Table 2) dihydro-mesobilirubin と考えられる。

最後に上端に吸着された褐色層を methanol で溶出すると, 440m μ に吸収の極大を有し, 490m μ , 570m μ に膨隆を示し, (Fig. 6 D) urobilin 体, 直接型 bilirubin 等の混合物と考えられるが, 微量のため Schlesinger 反応で黄緑色の螢光を認めた以外はその化学的性状を追究出来なかつた。

この際 dihydrobilirubin を証明し得なかつたが, 教室光本の実験の如く, 本物質は bilirubin との分離は極めて困難で, 分別結晶或は column chromatography に於て chloroform と pyridin の混液を展開剤として用うる等の手段を必要とするが, 試料に量的な制約があり, 且つ又不安定な色素であるため展開率の小さい上記方法を選ぶことは許されなかつた。従つてその存在を否定し得ぬとしても, bilirubin 層の吸光曲線に影響を与えない範囲の微量を想定し得るに過ぎない。

以上の各分割に 570m μ 附近に極大若しくは膨隆を認め, ある種の胆汁成分によるものと考えられるがその本態は明らかでない。

2 第2例の検査

第2例は慢性肝炎例で, 肝炎後溶血性黄疸に属し経

過中溶血発作を繰返した例であるが, 検査当時 chloramphenicol, urocidal を投与中であつた。

2. 1 第2例の mesobiliviolin 反応

その mesobiliviolin 反応の chloroform 抽出液の吸光曲線は (Fig. 7) のとおりで, 494m μ 附近に吸収を認めず, column chromatography 上 stercobilin に一致する黄褐色層 (第1例 Fig. 2. E) は認めなかつた。

Fig. 7. The absorption curve of the chloroform extract after the mesobiliviolin reaction of case 2.



Fig. 8. The column chromatograms of the bile pigments in the bile of case 2.

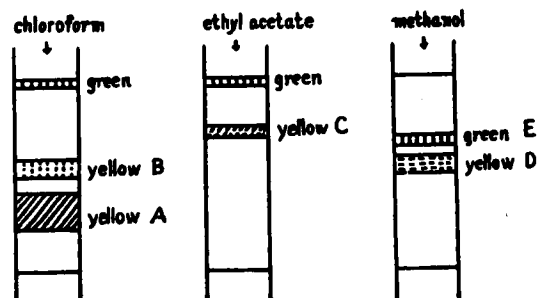


Fig. 9. The absorption curves of the separated bile pigments in case 2.

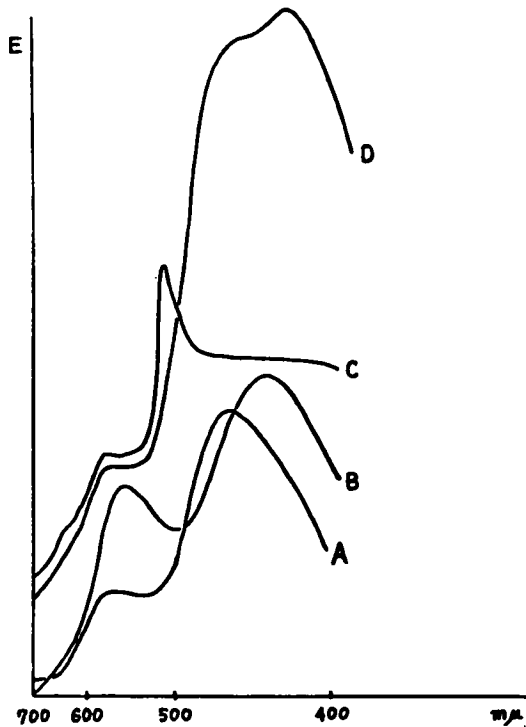


Table 3. The chemical properties of each eluent in Fig. 8.

	A	B	C	D
color	yellow	yellow	yellow	yellow
direct diazo reac.	-	-	-	+
indirect diazo reac.	+	+	-	.
Gmelin reac.	+	+	-	decolorization
aldehyde reac.	-	-	-	decolorization
Schlesinger reac.	-	.	.	-
FeCl ₃ reac.	green	green	-	red
pent-dyopent reac.	-	-	-	-
absorption maxima (mμ)	450	425	510	418

2. 2 第2例の胆汁色素分割の検討

本例のB-胆汁から第1例と同様にして胆汁色素の分割を試みた結果、(Fig. 8, Fig. 9, Table 3)の成績を得た。

即ち bilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin, urobilin 体と考えられる色素を分離した。この際、dihydromesobilirubin と推定する色素(D)は吸光曲線上第1例と同様 418mμ に極大を 570mμ 及び 450mμ に膨隆を認め、且つ Gmelin 反応, aldehyde 反応に於て直ちに脱色して透明となる。これは不純物の混入と、被検液が稀薄であつたことが原因と考えられるが、塩化第二鉄反応で赤色を呈する点、直接 diazo 反応陽性を呈する点、更には吸収の極大から、dihydromesobilirubin と推定して差支えないものとする。緑色のE層は操作中に bilirubin が酸化されて生じた biliverdin である。

3. 第3例の胆汁色素分割の検討

この例に於ては同様の実験に於て、mesobilirubin 及び dihydromesobilirubin に相当する分割を全く見出されなかつた。

4. 第8例及び第17例の胆汁色素分割の検討

この2例に於ても第1例及び第2例と同様の分割、即ち bilirubin, mesobilirubin を検出し、同時に dihydromesobilirubin と考えられる色素を分離した。

5. 各症例の mesobiliviolin 反応の成績

第1例と同様の実験により、第19例を除く19例について mesobiliviolin 反応を実施し、mesobilinogen stercobilinogen の検出の有無を (Table 1) に表示した。この際実験方法の性質上吸光係数から stercobilinogen の絶対量を計算することは不可能であるため、column chromatogram 上の mesobiliviolin 及び mesobilirhodin と stercobilinogen の量的関係を以て、mesobilinogen と stercobilinogen との量的比重を示し、M (mesobilinogen のみで stercobilinogen を認めないもの)、S (stercobilinogen のみ) 及び両者の中間を >< の符号を以て表示した。

6. 各症例の胆汁色素分割の検討

第1, 2, 3, 8, 17例の5例を除く各症例は、B-胆汁の分泌が少量であり、且つ Ehrlich's aldehyde 反応陽性物質も少量であつたため、mesobiliviolin 反応を行つた残余での中間物質の検出は不能であつた。

7. 第17例及び第19例の urobilin 体の旋光度測定及び dioxan-HCl 煮沸検査

第17例では mesobiliviolin 反応 chloroform 抽出液より、column chromatography により得た黄褐色層について偏光度を測定したが、溶出し得た色素

は微量であつて、その偏光度は10種の tube を用いて 0.028 度の右旋性を示すに過ぎず、dioxan-HCl 煮沸法により、黄褐→紫→黄→無色となり、d-urobilin と断定するのは困難であつた。

第19例では前例にかんがみ、多くの試料を得る目的で、mesobiliviolin 反応を行うことなく、胆汁を醋酸々性として沸騰水中に加熱し、Ehrlich's aldehyde 反応陰性となつたのを確かめた後、これを chloroform に抽出し、chloroformsilica gel の column chromatography により充分 chloroform で展開し、黄色色素の完全な流出後、上端に吸着した黄褐色層を methanol で溶出し、これを減圧乾固して実験に用いた。

10種の tube を用いて旋光度は 0.282 度の左旋性を示した。dioxan-HCl 煮沸法では、黄褐→紫→黄と変化し、無色とはならず、又青乃至は緑色を経過しなかつた。従つてこれは urobilin IX α に微量の stercobilin の混在を示すと考えられる。

総括並びに考按

以上の諸成績を各症例について、臨床所見と比較検討すると以下の考察が成立する。

1 Mesobiliviolin 反応について

1. 1 mesobiliviolin 反応と胆道の細菌感染との関係

まず胆汁中に大腸菌を証明した7例中、第3例を除く6例に於て、すべて stercobilinogen の出現をみた。又 Gram 陰性の双球菌を証明した2例に於ても stercobilinogen の出現をみた。candida を証明した第11例には stercobilinogen は証明されなかつた。即ち stercobilinogen の出現は胆道の細菌感染ある場合は殆んど必ず認め、第15、17例を除き多少とも mesobilinogen を証明した。逆に stercobilinogen 陰性で mesobilinogen のみを認めた6例中、candida を証明した第11例と大腸菌を証明した第3例を除く4例には細菌感染をみない。

又、第6、14、の2例に於ては、mesobiliviolin 及び mesobilirhodin の色素層を殆んど認めず、第15、17の2例では全く認めなかつたが、そのうち3例に大腸菌を、他の1例に双球菌を証明し、その炎症症状も他の例に比して著しかつた。

以上の点より、stercobilinogen が mesobilinogen に優位となる傾向は胆道の細菌感染の強弱に比例するものと考えられる。

1. 2 胆汁沈渣所見との関係

細菌を証明し得なかつた10例は、第9例を除き

mesobilinogen が stercobilinogen に比し優勢を示し、炎症所見を全く欠く第2、7、11例に於ては mesobilinogen のみを認めた。又炎症所見のより高度な例は steveobilinogen がより優位となる傾向が認められる。

これらの炎症所見は細菌感染に起因する可能性が強く、明らかに stercobilinogen が mesobilinogen に対し優位となる場合と炎症所見との間に相関関係が認められる。

1. 3 胆汁の pH, Ehrlich's aldehyde 反応, 蛋白, bilirubin 濃度との関係

蛋白の陽性度と stercobilinogen 出現とは平行関係にある。pH は stercobilinogen 出現例に低下する傾向があるが明らかではない。aldehyde 反応の陽性度及び bilirubin 濃度と stercobilinogen 出現とは相関関係は認められない。

1. 4 抗生剤並びに sulfa 剤投与との関係

chloramphenicol, aureomycin, achromycin 等抗生物質投与中の第2、3、11、20例の4例には、すべて stercobilinogen を認めず mesobilinogen のみを認めた。特に第3例に於ては大腸菌の存在を証明し、(但し培養では陰性)沈渣に炎症所見が著明であるに拘らず stercobilinogen 陰性であることは特異であり、前述(1.1)に於て例外となつた1例である。その所以は、抗生剤投与により胆嚢中の細菌の発育が抑制され、胆汁色素の還元に関与する細菌酵素活性の低下乃至は消失が考えられる。

sulfa 剤単独投与中の第17例では、stercobilinogen は少量ではあるが mesobilinogen に比し優位であつて、抗生剤の如き著明な影響を認めなかつた。

1. 5 合併症, 尿 aldehyde 反応, 血清 bilirubin 濃度との関係

これらと stercobilinogen 出現との間の相関関係は認め難い。

2. 胆汁中胆汁色素分劃について

mesobilirubin 等中間物質を認めた4例中、3例(第1、8、17例)は何れも胆汁中に大腸菌を証明し或は沈渣に炎症所見を認めた。第2例のみは炎症所見を有しないに拘らず中間物質を見出したが、胆汁中 bilirubin 値が高度であり、又溶血性黄疸の形で再燃を繰返す肝炎患者である点からも、この1例のみを以て直ちに肝臓乃至は非感染胆道系に於て bilirubin より urobilinogen への還元が行われるとするのは不当と考えられる。

以上 stercobilinogen と mesobilinogen との優

劣の関係が、細菌感染、炎症症状、抗生剤投与の有無等に支配される相対的な関係にあるという事実、又、胆汁中に mesobilirubin 等中間物質を証明した事実、更には stercobilinogen のみを証明した例の存在することから考えて、bilirubin が肝酵素により mesobilinogen へ、又腸内細菌により中間物質を経ず直ちに stercobilinogen へ夫々還元されるという説は妥当ではなく、教室鈴木、今井らの明らかにした様に、胆道中の細菌特に E. Coli により bilirubin から mesobilirubin, dihydromesobilirubin 等を経て遂には stercobilinogen に還元されることが、この実験で明らかとなった。

著者は第2篇に於て、E. coli communis 単独では bilirubin を還元し得ないことを試験管内で証明したが、上記の成績では bilirubin の還元物を認めるにも拘らず、E. coli 以外の菌を証明しなかつた例が多い。これについては教室重井が犬の胆嚢胆汁を、又教室松井が urobilin 体を証明しない健康人胆汁を夫々添加して、E. coli communis により、bilirubin より urobilinogen を得て居ることから、胆汁中に E. coli communis の還元力を促進させる因子のあることを推定しているが、その本態はなお明らかにされていない。

3. D-urobilin について

C. J. Watson 等は胆道特有の微生物感染の存在するとき、mesobilinogen が還元されて右旋性の物質となるといい、これを d-urobilin と名付けた。この点に関しては、全例について検討し得なかつたが、第17, 19例に於て検討した範囲では d-urobilin を証明することは出来なかつた。逆に第19例に於ては僅か

はあつたが明らかに左旋性の stercobilin を得た。この2例以外は他の検討に主力を注いだため追究を行うことが出来なかつたので、各症例中 d-urobilin の存在の可能性は否定出来ないが、(Table 1)での記載には旋光性の問題を除外せざるを得なかつた。

結 論

胆嚢症患者20例の Ehrlich's aldehyde 反応陽性を呈するB-胆汁について mesobiliviolin 反応及び胆汁色素中間物質の検出を試みた結果次の成績を得た。

1. 19例につき mesobiliviolin 反応を実施し、その chloroform 抽出液を column chromatography により各色素を分離し、その各々及び亜鉛醋酸塩の吸光曲線を得た。

2. stercobilinogen が mesobilinogen に優位を占めるか否かは胆道感染特に E. coli の感染乃至は胆道の炎症所見の強弱と強い相関関係を示した。

3. 抗生剤投与中の4例では stercobilinogen を検出せず mesobilinogen のみを証明し、抗生物質が細菌の化学的活性を低下せしめることを推定した。

4. 4例に於て胆汁中に bilirubin, mesobilirubin を証明し、dihydromesobilirubin と考えられる色素を検出した。

以上の事実から生体内の bilirubin から urobilin 体への還元は、肝酵素によることなく、細菌酵素により行われることを明らかにした。

5. 2例に於て urobilin 体の旋光度及び dioxan 煮沸法により、d-urobilin の検出を試みたがその存在を認め得なかつた。

参 考 文 献

- 1) Kämmerer H., & Miller K.: Dtsch. Arch. f. klin. Med., 141, 318, 1923.
- 2) Fischer H. u. Libowitzky H.: Z. physiol. Chem., 258, 255, 1939.
- 3) Eisenreich F.: Klin. Wschr., 26, 474, 1948.
- 4) Watson C. J. & Schwartz S.: Proc. soc. exper. biol. & med., 49, 641, 1942.
- 5) 光本: 未発表.
- 6) 細川: 医学研究, 26, 5, 昭31.
- 7) 鈴木: 医学研究, 28, 8, 昭33.
- 8) 松井: 未発表.
- 9) 今井: 未発表.
- 10) 重井: 医学研究, 24, 7, 昭29.
- 11) 岩藤: 医学研究, 27, 1, 昭32.
- 12) 野呂: 医学研究, 21, 7, 昭26.
- 13) Baumgärtel Tr.: Pathologie u. Physiologie des Bilirubinstoffwechsels als Grndlagen der Ikterusforschung., Stuttgart, ; Tieme, 1950.
- 14) Fischer H.: Die Chemie des Pyrrols., Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1937.
- 15) Lemberg R. & Legge J. W.: Hematin compound and bile pigments., Interscience Publishers Inc. Newyork. 1949.
- 16) Gray C. H.: The bilie pigments., London,

- Methuen & Co. Ltd. 1953.
- 17) Kühn H. A. : Pathologie Diagnostik und Therapie der Leberkrankheiten., Springer-Verlag, 1957.
- 18) Stich W. : Z. physiol. Chem., 292, 178, 1953.
- 19) Baumgärtel Tr. : Klin. Wschr., 30, 44, 1952.
- 20) Watson C. J. & Schwartz S. : Proc. soc. exper. biol. & med., 49, 636, 1942.
- 21) Watson C. J., Schwartz S. & Sborov V. :
ibid., 49, 643, 647, 1942.
- 22) Watson C. J. Schwartz S. & Sborov V. :
J. lab. clin. med., 37, 52, 1951.
- 23) Pruckner F. u. Stern A. : Z. f. physik. Chem., 180, 25, 1937.
- 24) Lowry P. T., Ziegler N. R., Cardinal R. & Watson C. J. : J. biol. chem., 208, 543, 1954.
- 25) Hollan O. R. : Gastroenterology, 16, 418, 1950.
- 26) Jendrassik L. & Cleghorn R. A. : Biochem. Z., 289, 1, 1937.
- 27) Hildebrandt W. : Z. klin. Med., 59, 358, 1966.
- 28) 岩原 : 日内会誌, 40, 3, 昭26.

Studies on the Reduction of Bilirubin by Fecal Flora

Part 1 A Study on the Bile Pigment Fraction in the Bile with the Positive Ehrlich's aldehyde reaction

By

Toshihiro MITSUDA

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

The mesobiliviolin reaction and the intermediate products of bilirubin were observed on the B-bile, with the positive Ehrlich's aldehyde reaction, obtained from 20 cases of cholecystopathy, and the results were as follows:

1. After mesobiliviolin reaction on 19 cases the chloroform extract was separated into each pigment by column chromatography, and the absorption curves of each pigment and their changes on the addition of a saturated alcoholic solution of zinc acetate were observed.
 2. The question whether or not stercobilinogen occupies the position superior to mesobilinogen can be explained by the intensity of bile duct infection, especially the infection by *B. coli*, or by the intensity of the inflammation findings of bile duct.
 3. From the 4 cases treated with antibiotics stercobilinogen could not be detected but only mesobilinogen, suggesting that antibiotics reduce the chemical activity of bacteria.
 4. In 4 cases bilirubin and mesobilirubin could be detected and also a pigment that appears to be dihydromesobilirubin. From these results it has been clarified that the in vivo reduction of bilirubin to urobilinogen is not conducted by liver enzymes but by bacterial enzymes.
 5. On 2 cases the detection of d-urobilin was attempted by means of polarimeter and dioxan-HCl boiling method, but the existence of this pigment could not be observed.
-