

岡山医学会雑誌

第87巻 7,8 合併号 (第968, 969号)

昭和50年 8月31日発行

胆汁色素に関する研究

第 I 編

諸種肝疾患時の胆汁中 bilirubin-phosphate 分画の臨床的意義

岡山大学医学部第一内科学教室 (主任:小坂 淳夫教授)

広 畑 衛

[昭和50年 4月21日受稿]

緒 言

生体内には2種類の bilirubin が存在し¹⁾、肝実質障害による黄疸は主として直接 bilirubin の増加による血清 bilirubin の増量である。直接 bilirubin は間接 bilirubin が肝臓で種々の抱合を受けることにより生成されるもので、胆汁中にはほとんどすべて直接 bilirubin として排泄されるが^{2), 3)}、その大部分(60~90%)が ester 型 bilirubin であり⁴⁾、この ester 型分画の中 glucuron 酸 ester が占める割合は、欧米では80~87%^{4), 5)}、本邦では30~60%⁷⁾であると報告されている。そしてそのほかの直接 bilirubin としては、山岡・小坂の塩型 bilirubin⁸⁾、Isselbacher & McCarthy の bilirubin-sulphate^{9), 10), 11), 12), 13)}、近藤の bilirubin-phosphate^{14), 15)}のほか、bilirubin と amino 酸との抱合¹⁶⁾、胆汁酸との分子結合物などの存在^{17), 18)}が知られている。そして種々の肝実質障害時には肝臓での抱合機能が変化することにより、当然その抱合型の占有率が変化する事が推測される

が、教室の高木は肝実質障害時の胆汁中 bilirubin-glucuronide 分画の消長を検討し、肝実質障害が高度となるに従がい bilirubin-glucuron 酸 mol 比の低下を認めている¹⁹⁾。また河合は²⁰⁾ ³²Pを用いた rat の実験で四塩化炭素による肝障害時に³²Pを有する bilirubin 分画の増加を認めている²⁰⁾。

これらの成績は肝疾患時に肝実質細胞が障害された場合、glucuron 酸抱合以外の他の抱合、あるいは光による分解や酸化・還元などの経路の亢進により代償されることを推測させる。そこで著者は胆汁中の bilirubin-phosphate 分画の占有率を検討し、肝障害時の bilirubin 代謝異常の臨床的意義について検討した。

検 索 対 象

検索対象は、岡山大学医学部第一内科に入院中および外来加療中の肝、胆道系疾患々々で、急性肝炎8例、慢性肝炎10例、肝硬変症8例、体質性黄疸7例 (Gilbert 症候群4例、Dubin-Johnson 症候群3

例),胆のう症12例と,肝・胆道系に異常を認めない他疾患々々者8例,健常者6例の対照例を含む総計59例で,肝疾患々々はすべて腹腔鏡検査,肝生検による組織診,各種肝機能検査により診断の確定しているものである。

実験方法

1. 胆汁採取法

早朝空腹時に十二指腸ゾンデを挿入し, X線透視下にてゾンデの先端が十二指腸下行脚に到達しているのを確認の上,まずA胆汁の排泄を図った後, olive油10mlを注入してB胆汁の排泄を図り,得られたB胆汁を試料としてもちいた。

2. 粗 bilirubin の調整

採取したB胆汁を硫酸にて飽和塩析すると bilirubin は黒褐色のアメ状として析出する。これを東洋汙紙 (No. 6) にて吸引濾別し, 濾紙上の残渣を methanol にて抽出した後, 減圧乾固し, 再び methanol で抽出, 濾過, 減圧乾固する過程を3~5回行なった後, steroid, 脂質系等の除去を目的として数回 ethyl-ether にて洗滌したものを粗 bilirubin とした²¹⁾。

3. 直接 bilirubin の作製

Billing らの逆相 column chromatography を使用した血清 bilirubin 3分画 (間接 bilirubin, Pigment I, II) 分離法^{22), 23)} にならい, 10g の silicone 処理珪藻土を butanol 混液 (50ml n-butanol, 45ml H₂O, 5ml 0.05 M phosphate-buffer pH 6.0) の上層0.5ml にて湿らせた後, 下層を加えてよく攪拌しながら, 直径1.8cm, 長さ20.0cm の glass 管にて, 高さ10.0cm の column を作製した。この column の上端に2. で得られた粗 bilirubin を butanol 混液の下層液0.5ml にて溶解したものを完全に吸着させたのち, butanol 混液の下層液にて室温, 遮光下で展開すると, 上部より間接 bilirubin, Pigment I および Pigment II の3分画が分画分離される。column の先端まで展開したのち column 下端より余剰の溶媒を除去し, 分離された bilirubin 分画を充填材料とともに Pigment I, II 分画を分割して取り出し, 一括して methanol にて抽出したものを減圧乾固し直接 bilirubin とした。

4. column chromatography 及び bilirubin-phosphate 分画の定性。

column は, 直径1.8cm の glass 管に東洋汙紙製の cellulose powder (mesh 300) を高さ10 cm にて

固定相とし, n-butanol : ethanol : H₂O (4 : 1 : 2 v/v) 混液 1ml にて3で得られた直接 bilirubin を溶解し, 十分に column の先端に吸着させた後, 上記の混液を展開液として逆相 chromatography を行ない, ester 型 bilirubin 第3分画中の Rf 0.10分画を抽出した。なおこの Rf 0.10分画の定性には Gmelin 反応, diazo 反応, 磷酸 ester 反応, urobilinogen 反応, Schlesinger 反応, benzidine 反応, 燐 molybden 酸反応, ninhydrine 反応を行なった。

5. bilirubin 測定法。

bilirubin の定量は, Jendrassik & Cleghorn 氏法変法により測定した。

また Ehrlich 氏 diazo 試薬は, 第1液10ml に第2液0.3ml を測定の都度混じて調整し, Leitz 社製光電比色計 Model M を用い波長535m μ で比色した。

6. bilirubin-phosphate 分画占有率の算出法。

占有率の算出は, 総直接 bilirubin 量に対する ester 型 bilirubin 第3分画中の bilirubin-phosphate 分画の bilirubin 量の割り合いを百分率にて求めた。

7. 肝機能検査

肝機能検査としては, 血清 transaminase : GOT, GPT (Karmen 単位) 活性の測定, 膠質反応として Kunkel 氏硫酸亜鉛試験 (ZnTT), thymol 混濁試験 (TTT) を行なった。その他 BSP (45分値) 停滯率, cholesterol 量, K₁₀₀, γ -globulin 量, alkaline-phosphatase (Bessy Lowry 単位) についても測定した。

実験成績

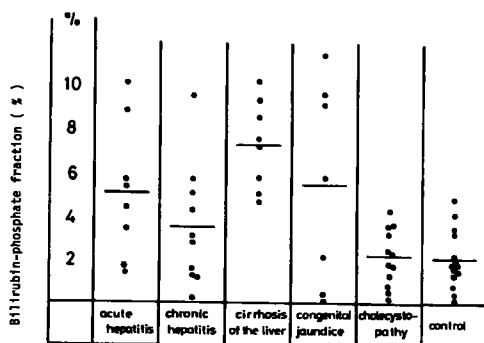
1. bilirubin-phosphate 分画の定性。

bilirubin 第3分画中の Rf 0.10分画は, Gmelin 反応陽性, diazo 反応直接陽性, 磷酸 ester 反応陽性で, urobilinogen 反応ならびに Schlesinger 反応陰性であり, benzidine 反応, 燐 molybden 酸反応 ninhydrine 反応陰性であった。なお同分画について硫酸根測定を行なったが証明されなかった。以上のことからこの分画は, 河合²⁴⁾ の言う bilirubin-phosphate 分画のみであることが確かめられた。

2. 各種肝疾患における bilirubin-phosphate 分画の占有率。

被験者より得られたB胆汁中の総直接 bilirubin 量に対する bilirubin-phosphate 分画の占有率を各種肝・胆道系疾患群別に比較検討すると, 図1のようである。対照例では0.1~4.8%で平均2.1%で, 胆のう症では0.1~4.3%で平均2.2%であった。急性肝

図1 Percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin in various liver diseases



炎恢復期においては1.3~10.2%で平均5.0%, 慢性肝炎では0.2~9.6%で平均3.5%, 肝硬変症では4.6~10.2%で平均7.3%, 体質性黄疸 (Gilbert 症候群 4例, Dubin-Johnson 症候群 3例) では, 前者はその値が高く後者は低いため, 全体としてはばらつきが大きく一定の傾向は認めにくいが平均5.5%であった。

各群間の有意差を検定したものが表1であり, 肝硬変症群は対照群, 胆のう症群に比し危険率0.1%, 慢性肝炎群とは1%の危険率で有意の高値を示した。急性肝炎群は対照群に比較し危険率1%, また胆のう症群に対しては5%の危険率で有意の高値を示した。

3. bilirubin-phosphate 分画占有率と血清 GOT, GPT 活性値との関係

肝疾患々々における血清 transaminase (GOT, GPT) 値は, 急性肝炎例でも検討時期は治癒期に行なっているためか, 高度の上昇は認められず, また慢性肝炎, 肝硬変症などでも中等度上昇や正常範囲内のものなど一定の傾向が見られず, 図2, 図3, に示すごとく bilirubin-phosphate 分画占有率との

間にもまったく相関々は認められなかった。

4. bilirubin-phosphate 分画占有率と alkaline-phosphatase との関係

肝・胆道系疾患々々の血清 alkaline-phosphatase (B. L. u.) と bilirubin-phosphate 分画占有率との間には図4. に示すごとく有意の相関は認められなかった。

5. bilirubin-phosphate 分画占有率と血清膠質反応との関係

全59例について, bilirubin-phosphate 分画の占有率と同一症例の同一時期における血清膠質反応を対比して検討した。図5は分画占有率と Kunkel 氏硫酸亜鉛反応 (ZnTT) との関係を示したもので, 縦軸は ZnTT (Kunkel 単位), 横軸は bilirubin-phosphate 分画占有率 (%) である。bilirubin-phosphate 分画占有率と ZnTT は非常に良い正の相関を示し, 相関係数は $r = 0.62$ で危険率は0.5%以下であった。

図6は, bilirubin-phosphate 分画占有率と Maclagan 氏 thymol 混濁反応との関係を示したもので, ZnTT と同様に bilirubin-phosphate 分画占有率 (%) の上昇と共に TTT 値 (Maclagan 単位) の上昇を認め, 良い正の相関を示した。相関係数は $r = 0.66$ で危険率は0.5%以下であった。

6. bilirubin-phosphate 分画占有率と γ -globulin 量との関係

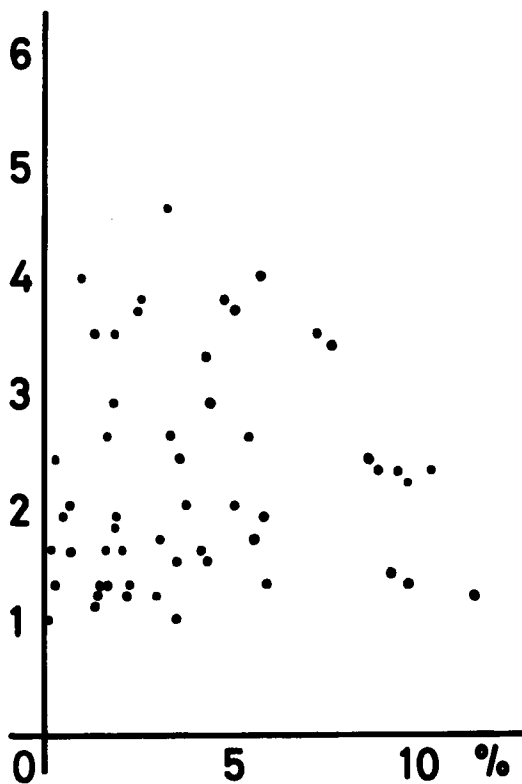
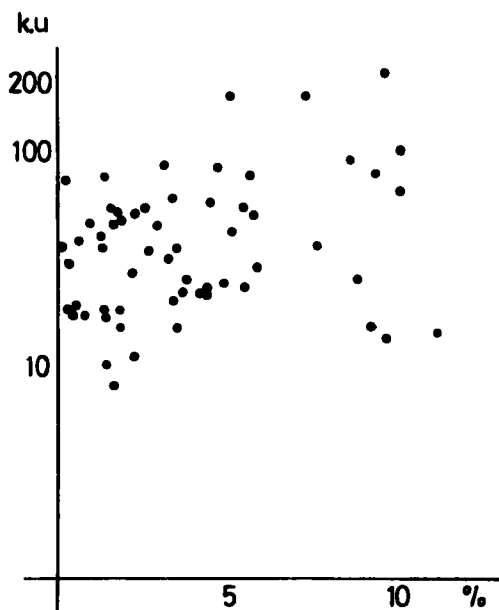
各症例における胆汁中 bilirubin-phosphate 分画占有率と同一時期の血清蛋白中 γ -globulin 量 (g/dl) との関係は, 図7に見られるように相関係数0.50, 危険率0.5%以下ときわめて良い正の相関を示した。特に肝硬変症においてその相関は著明であったが, 図7中の×印の体質性黄疸患者例では γ -globulin 量の増加を認めないのに bilirubin-phosphate 分画占有率の上昇は著明であった。

7. bilirubin-phosphate 分画占有率と cholesterol との関係

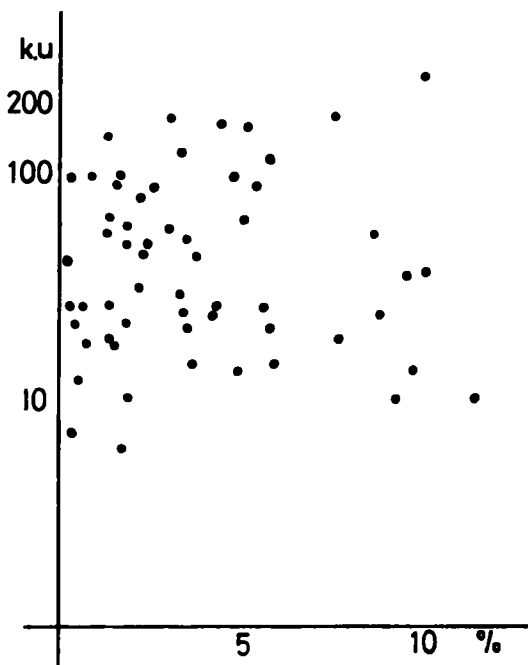
Table 1. Examination on T-distribution of two groups.

P <	T	Control (n=14)	Hepatitis acuta (n=8)	Hepatitis chronica (n=10)	Cirrhosis of the liver (n=8)	Cholecystopathy (n=11)
Control			2.93	1.73	5.93	0.12
Hepatitis acuta	0.01			1.09	1.53	2.55
Hepatitis chronica	—		—		3.02	1.44
Cirrhosis of the liver	0.001		—	0.01		5.28
Cholecystopathy	—		0.05	—	0.001	

☒ 2 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and S-GOT activity (Karmen unit)
Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin,
ordinate S-GOT.



☒ 4 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and alkaline phosphatase (B. L. u.)
Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin,
ordinate alkaline phosphatase.



☒ 3 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and S-GPT activity (Karmen unit).
Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin,
ordinate S-GPT.

図5 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and ZnTT (Kunkel unit).

Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin, ordinate ZnTT and x means patients with constitutional jaundice.

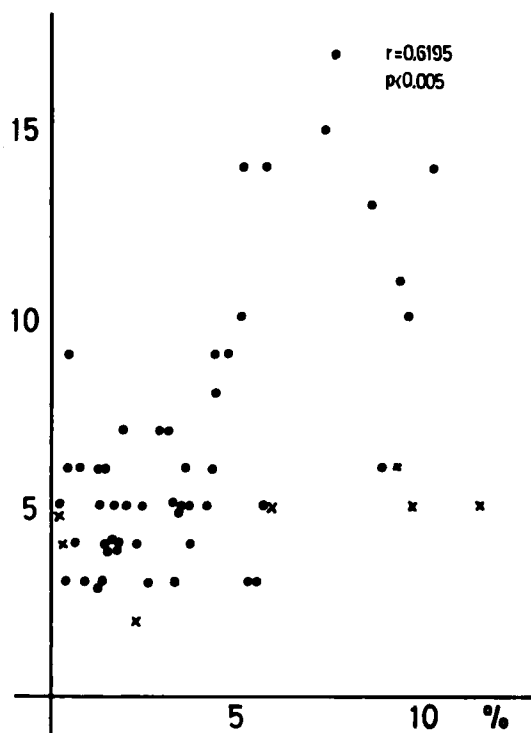
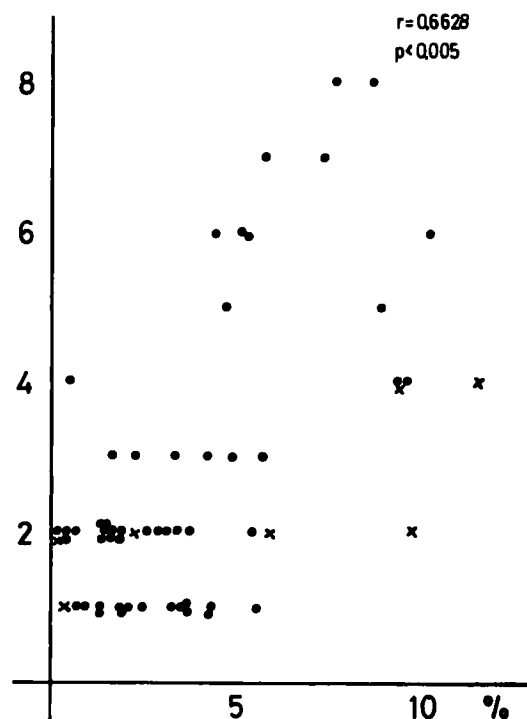


図6 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and TTT (Maclagan unit).

Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin, ordinate TTT and x means patients with constitutional jaundice.



肝疾患々者の血清 cholesterol 量 (mg/dl) と, bilirubin-phosphate 分画占有率との間には図8に示すように一定の傾向は見られず, 有意の相関々係はなかった。

8. bilirubin-phosphate 分画占有率と BSP (45分) 値との関係

各種肝疾患々者における bilirubin-phosphate 分画占有率と, BSP 45分値との間には, 図9に示すごとく正の相関を認め, 危険率は1%以下で相関係数は0.51であった。図9中の×印は体質性黄疸例で, Dubin-Jhonson 症候群4例は, Gilbert 症候群3例

にくらべてはるかに BSP 停滞率が高値であった。

9. bilirubin-phosphate 分画占有率と K_{1cc} との関係

各疾患の ICG 血漿消失率 (K 値) は, 5分, 10分, 15分の血清 ICG 濃度値より半減時間を求める計算式にて血漿消失率 (K_{1cc}) を求めた。図10は縦軸に K_{1cc} 値, 横軸に bilirubin-phosphate 分画占有率を記したものであるが, その間には極めて良い負の相関が認められ, 相関係数は-0.61, 危険率は0.5%以下であった。

図7 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and γ -globulin (g/dl).
Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin, ordinate γ -globulin and x means patients with constitutional jaundice.

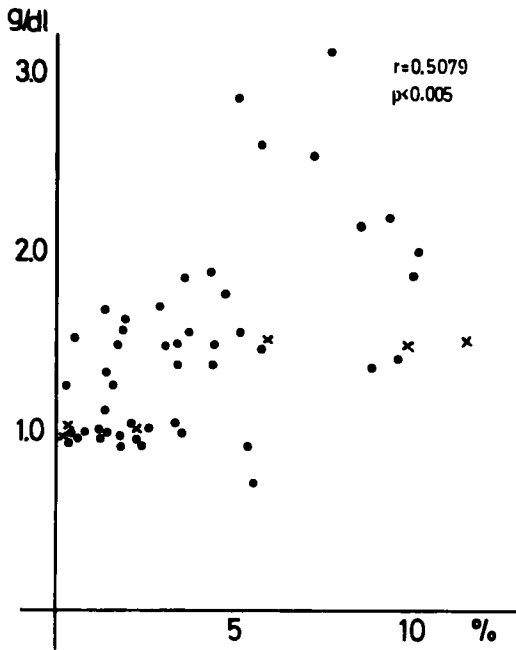


図8 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and concentration of cholesterol (md/dl). Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin, ordinate cholesterol and x means patients with constitutional jaundice.

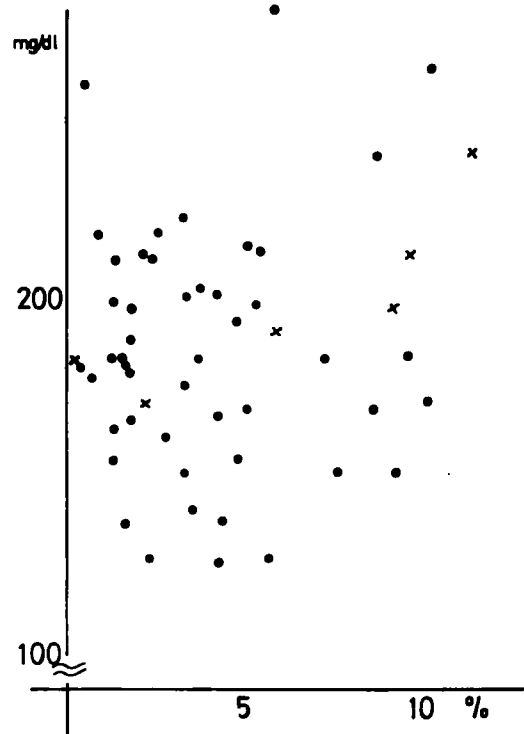


図9 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and BSP retention. Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin, ordinate BSP retention and x means patients with constitutional jaundice.

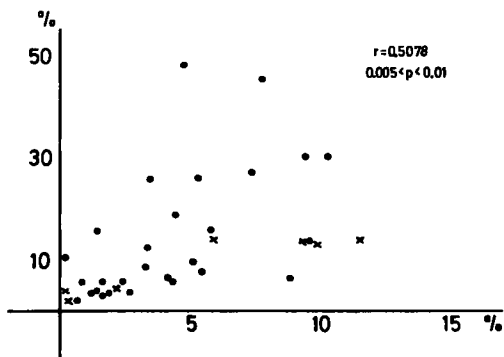
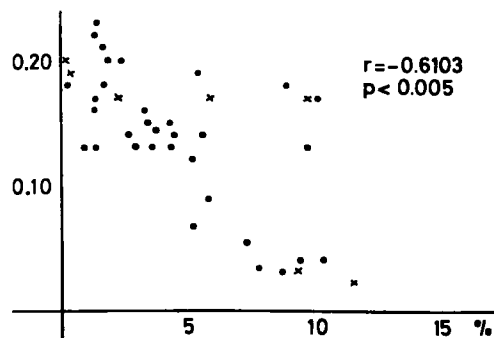


図10 Correlation between bilirubin-phosphate fraction and K_{ICG} . Abscissa means percentage of bilirubin-phosphate fraction in direct bilirubin, ordinate K_{ICG} and x means patients with constitutional jaundice.



総括ならびに考按

Van den Bergh¹⁾らにより提唱された直接型, 間接型 bilirubin の本態については, 山岡・小坂ら^{2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10) 11) 12) 13) 14) 15) 16) 17) 18) 19) 20) 21) 22) 23) 24) 25) 26) 27) 28) 29) 30) 31) 32) 33) 34) 35) 36) 37) 38) 39) 40) 41) 42) 43) 44) 45) 46) 47) 48) 49) 50) 51) 52) 53) 54) 55) 56) 57) 58) 59) 60) 61) 62) 63) 64) 65) 66) 67) 68) 69) 70) 71) 72) 73) 74) 75) 76) 77) 78) 79) 80) 81) 82) 83) 84) 85) 86) 87) 88) 89) 90) 91) 92) 93) 94) 95) 96) 97) 98) 99) 100)}により1950年初めて明らかにされたもので, 彼らは直接型と間接型 bilirubin は化学構造上に差異があり, 間接型 bilirubin は β 位の側鎖の propion 酸基が遊離の二塩基酸 bilirubin で, 直接 bilirubin はその propion 酸基で ester または塩を形成しており, 生体内での直接型 bilirubin は ester 型が大部分であると発表した。その後 Billing³⁾, Talafant²⁷⁾, Schmid²¹⁾らは直接 bilirubin の大部分は glucuron 酸 ester である事を発見し, これによって直接 bilirubin の本態は bilirubin-glucuronide であるとする説が一般化されたが, その後の研究により bilirubin-glucuronide のみがすべての直接 bilirubin ではないことが明らかとなり, Billing 自身も40%程度の bilirubin non glucuronide 分画の存在を認めている。²⁹⁾ Talafant²⁷⁾ は bilirubin-glucuronide が alkali に対して不安定である事を認めているが, Arias³⁰⁾ は非溶血性黄疸患者血清中の直接 bilirubin 中に alkali に安定で, また β -glucuronidase により水解を受けない分画が約40%存在することを報告している。また Watson³¹⁾ も Billing の言う Pigment I, Pigment II のいずれの分画中にも alkali に安定な直接 bilirubin の存在を認め, Talafant²⁷⁾ も山岡・小坂の分離した塩型 bilirubin 分画は glucuron 酸陰性であることを認めている。そこで bilirubin-glucuronide 説のみでは直接 bilirubin の本態が解明され得ないことから, これらの非 glucuron 酸抱合型直接 bilirubin についての追求が行なわれた。その結果 Isselbacher & McCarthy の bilirubin-sulphonate,^{10) 11) 12) 13) 14) 15) 16) 17) 18) 19) 20) 21) 22) 23) 24) 25) 26) 27) 28) 29) 30) 31) 32) 33) 34) 35) 36) 37) 38) 39) 40) 41) 42) 43) 44) 45) 46) 47) 48) 49) 50) 51) 52) 53) 54) 55) 56) 57) 58) 59) 60) 61) 62) 63) 64) 65) 66) 67) 68) 69) 70) 71) 72) 73) 74) 75) 76) 77) 78) 79) 80) 81) 82) 83) 84) 85) 86) 87) 88) 89) 90) 91) 92) 93) 94) 95) 96) 97) 98) 99) 100)}教室河原田¹⁹⁾による bilirubin と peptide との結合物, bilirubin と amino 酸との結合^{11) 12) 13) 14) 15) 16) 17) 18) 19) 20) 21) 22) 23) 24) 25) 26) 27) 28) 29) 30) 31) 32) 33) 34) 35) 36) 37) 38) 39) 40) 41) 42) 43) 44) 45) 46) 47) 48) 49) 50) 51) 52) 53) 54) 55) 56) 57) 58) 59) 60) 61) 62) 63) 64) 65) 66) 67) 68) 69) 70) 71) 72) 73) 74) 75) 76) 77) 78) 79) 80) 81) 82) 83) 84) 85) 86) 87) 88) 89) 90) 91) 92) 93) 94) 95) 96) 97) 98) 99) 100)}らが発表され, さらに教室近藤^{7) 14)}によって山岡・小坂の直接 bilirubin 分画中の ester 型 bilirubin 分画中に磷酸 ester 反応陽性物質が含まれている事が指摘されており, Tenhunen¹⁸⁾らによりその説が支持されている。これらの点に関して教室高木¹⁰⁾は, 肝障害時に bilirubin-glucuronide 分画の減少を認め, 河合²⁰⁾は³²P を用いた実験より, 肝障害時に胆汁中の³²P 放射活性の増加を認め, 胆汁中の bilirubin-phosphate 分画の増加が bilirubin-glucuronide に対する代償的増量であろうと考えた。

そこで著者はヒト各種肝・胆道系疾患における

その胆汁中の総直接 bilirubin に対する bilirubin-phosphate 分画占有率を求めこれが各種肝機能検査とどのように関連性をもつかについて検討を加えた。なお bilirubin-phosphate 分画は ester 型 bilirubin 第3分画にあたり paper column chromatography により ester 型 bilirubin 第3分画を分離する際に胆汁中に平均9.0%存在する¹⁸⁾塩型 bilirubin との混合が問題となるが, Rf 値は塩型 bilirubin 0.75, ester 型 bilirubin 第3分画0.10であり Rf 値が異なることにより重なることなく分離することが出来た。またこの Rf 0.10分画の定性反応は, 成績1. に述べた様に磷酸 ester 反応陽性の直接型 bilirubin であった。

さて各種肝・胆道系疾患々々における bilirubin-phosphate 分画占有率は健康者ないしは肝機能検査の正常な他疾患々々では平均2.1%であり, また胆のう症患者では平均2.2%で対照群と有意の差は認めなかったが, 慢性肝炎患者では平均3.5%と対照群に比してやや増加の傾向を認めた ($P < 0.1$)。また急性肝炎例ではほとんど黄疸の消褪した治癒期の患者胆汁において検討したためか, 平均5.0%と慢性肝炎よりやや高い傾向を認めたにしても有意な差ではなかった ($P < 0.3$) が, 対照に比しては有意の高値を認めた。すなわち肝機能検査上ではほぼ正常に近く回復していてもまだ異常値を示していることが注目される。肝硬変症では平均7.3%と, 対照群, 胆のう症群, 慢性肝炎群に比し有意 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$)な上昇を認めた。一方体質性黄疸患者では平均5.5%であったが非常にばらつきが大きかった。

以上のことから bilirubin-phosphate 分画の直接 bilirubin に対する割合の増加が河合²⁰⁾の動物実験で得た成績と同様に肝障害に因ることが推察されたので, この分画占有率と各種肝機能検査との相関々々係を検討した。まず血清 GOT, GPT 値と bilirubin-phosphate 分画占有率との間では相関性を認めなかったが, GOT・GPT 値は肝細胞の変性・壊死を反映し, 急性肝炎, 慢性肝炎活動型では高く, 肝硬変症患者では必ずしも高値ではなく病期により異なること, また GOT・GPT 値は細胞単位の変性, 壊死にもとづくものであるから, 肝細胞総数に比例すると考えられる bilirubin-phosphate 分画占有率との間に相関が見られなくても, これをもって bilirubin-phosphate 分画占有率が肝障害の程度と関係があるかどうかの判定にはならないであろう。

alkaline-phosphatase (Bessy-Lowry u.) と bilirubin-phosphate 分画占有率との間には有意の相関々係は認められなかった。

一方血清膠質反応のうち、ZnTT, TTT と bilirubin-phosphate 分画占有率との間では、危険率0.5%以下という極めて良い正の相関が見られた。この成績は黄疸血清についての河原田²⁾、黄疸尿についての物部³⁾、肝疾患々者胆汁中の glucuron 酸 mol 比についての高木¹⁾などの成績で glucuron 酸 mol 比の低下と ZnTT, TTT などの反応値とは良く逆相関を示すことが明らかにされた結果と全く逆で、glucuron 酸抱合能が低下した場合には、逆に磷酸抱合が代償していることを示していると思われる。

次に血清蛋白質中の γ -globulin 量との関係を見ると0.5%以下という極めて良い相関が認められ、ZnTT 反応などが γ -globulin 分画と良い相関を示す事からも肯かれる。

cholesterol と bilirubin-phosphate 分画占有率との間には相関は認められなかったが、この事は脂質代謝と胆汁酸生成とに関係する肝細胞機能と、bilirubin の抱合能とはその機序が異なるためによるものと考えられた。

BSP (45分) 値と bilirubin-phosphate 分画占有率との間には、1%以下の危険率で正の相関が認められた。また ICG 血漿消失率 (K_{ICG}) との間についても0.5%以下の危険率で負の相関が見られた。BSP は肝細胞により glutathion 抱合を受けて胆汁中に排泄されるが ICG は肝で全く抱合を受けずに胆汁中に排泄される。従って bilirubin-phosphate 分画占有率は肝実質障害による glucuron 酸などの抱合能の低下のみならず、肝血流量とも関係が深く、肝障害の慢性化機転にも深い関係があり、肝硬変症

において bilirubin-phosphate 分画占有率がいずれの肝疾患よりも高い点など興味深いものがあった。

結 論

各種肝・胆道系疾患々者の胆汁中 bilirubin を Billing の3分画法により分画分離し、さらに column chromatography 法により分画された、近藤らにより報告されている ester 型 bilirubin 分画中の磷酸 ester 反応陽性分量を定量し、総直接 bilirubin 量に対する占有率 (%) について検討し次の結果を得た。

1. bilirubin-phosphate 分画占有率は、肝硬変症群で一番大きく平均7.3%、ついで体質性黄疸群5.5%、急性肝炎群5.0%、慢性肝炎群3.5%、胆のう症群2.2%、対照群2.1%であり、肝硬変症群、急性肝炎群は対照群に比し推計学上それぞれ0.1%、1%の危険率で有意の増加を示した。

2. bilirubin-phosphate 分画占有率と血清膠質反応の ZnTT, TTT とは0.5%以下の危険率で良い正の相関を示し、 γ -globulin 量とも良い相関を示した。

3. bilirubin-phosphate 分画占有率と血清 transaminase, cholesterol, alkaline-phosphatase との間には有意の相関は認められなかった。

4. bilirubin-phosphate 分画占有率と BSP (45分) 値との間には正の相関が認められた。また K_{ICG} との間には、0.5%以下の危険率で負の相関が認められた。

(稿を終るにあたり御指導いただきました近藤忠亮講師に深謝します。)

文 献

- 1) Van den Bergh, A. A. H.: Der Gallenstoff im Blute. Leyden. 1928.
- 2) Schmid, R.: The identification of direct-reacting bilirubin as bilirubin glucuronide. J. Biol. Chem., **229** : 881, 1957.
- 3) Billing, B. H. & Lathe, G. H.: Bilirubin metabolism in jaundice. Amer. J. Med., **24** : 111, 1958.
- 4) Schmid, R.: Some of the metabolic aspects of the newer knowledge on bilirubin metabolism. Gastroenterology., **36** : 161, 1959.
- 5) Billing, B. H., Cole, P. G. & Lathe, G. H.: The excretion of bilirubin as a diglucuronide giving the direct van den Bergh reaction. Biochem. J., **65** : 774, 1957.
- 6) Billing, B. H. & Lathe, G. H.: The excretion of bilirubin as an ester glucuronide, giving the direct van den Bergh reaction. Biochem. J., **63** : 6 p, 1956.
- 7) 小坂淳夫, : 血色素の代謝, その分解について, 最新医学., **16** : 292, 1961.
- 8) 小坂淳夫, : ビリルビンに関する研究 第二篇, 直接及間接ビリルビンの本態に就て, 東京医事新誌, **67** : 14, 1950.
- 9) Isselbacher, K. J. & McCarthy, E. A.: Studies on bilirubin sulfate and other nonglucuronide conjugates of bilirubin. J. Clin. Invest., **38** : 645, 1959.
- 10) Schoenfield, L. J., Bollman, J. L. & Hoffman, H. N.: Sulfate and glucuronide conjugates of bilirubin in experimental liver injury. J. Clin. Invest., **41** : 133, 1962.
- 11) Gregory, C. H. & Watson, C. J.: Studies of conjugated bilirubin. J. Lab. Clin. Med., **60** : 1, 1962.
- 12) Noir, B. A., Groszman, R. J. & Walz, A. T.: Studies on bilirubin sulphate. Biochim. Biophys. Acta., **117** : 297, 1966.
- 13) Weber, A. P. & Schalm, L.: Evidence against bilirubin sulphate. Acta Med. Scand., **177** : 519, 1965.
- 14) 近藤忠亮, : 胆汁色素の呈色反応, 機構, 日消誌., **63** : 513, 1966.
- 15) Tenhunen, R.: Bilirubin and its conjugates. Annls. Med. exp. Biol. Fenn., **43** : suppl. 6, 1965.
- 16) 細川 簡, : 胆汁色素に関する研究, 第2編, Bilirubinの分子化合物に就いて, 医学研究., **26** : 1175, 1956.
- 17) 近藤忠亮, : 尿中 Bilirubinに関する研究, 第2編 Chloroform 移行性直接 diazo 反応陽性物質について, 医学研究., **29** : 1130, 1959.
- 18) 河原田裕幸, : 胆汁色素に関する研究, 第2編 Bilirubin 3分画法の検討, 医学研究., **377** : 200, 1967.
- 19) 高木明一郎, : Bilirubin glucuronideの研究, 第1編, 胆汁中 bilirubin glucuronideの消長と肝障害の関係について, 医学研究., **39** : 255, 1969.
- 20) 河合利夫, : 直接 bilirubinに関する研究, 第1編 Bilirubin phosphate 分画に関する研究, 岡山医誌., **84** : 321, 1972.
- 21) Sakamoto, T.: Studies on bile pigments. 1. Separation of natural indirect bilirubins. Acta Med. Okayama. **10** : 11, 1956.
- 23) Billing, B. H.: The quantitative determination of bile pigments in serum using reverse phase partition chromatography, Biochem. J., **56** : xxx, 1954.
- 23) Billing, B. H.: A chromatographic method for the determination of the three bile pigments in serum. J. Clin. Path., **8** : 126, 1955.
- 24) 山岡憲二, : Bilirubinに関する2. 3の問題. (間接並びに直接ビリルビンの本態並びに其の特性の解析) 日消誌., **48** : 1, 1950.

- 25) 山岡憲二, : 肝臓の臨床. 胆汁色素. 日内会誌., **42** : 531, 1953.
- 26) 山岡憲二, : Bilirubinとその誘導体の代謝, 日本臨床., **16** : 1845, 1958.
- 27) Talafant, E.: Properties and composition of the bile pigment giving a direct diazo reaction. Nature., **178** : 312, 1956.
- 28) Schiff, L., Billing, B.H. & Oikawa, Y.: Familial nonhemolytic jaundice with conjugated bilirubin in the serum. New Eng. J. Med., **260** : 1315, 1959.
- 29) Talafant, E.: The nature of direct and indirect bilirubin. Collection. Czechoslov. Chem. Commun., **19** : 1344, 1954.
- 30) Arias, I.M.: Studies of chronic familial non-hemolytic jaundice with conjugated bilirubin in the serum with and without an unidentified pigment in the liver cells. Amer. J. Med., **31** : 510, 1961.
- 31) Gregory, C.H. & Watson, C.J.: Studies of conjugated bilirubin. II. Problem of sulfates of bilirubin in vivo and in vitro. J. Lab. Clin. Med., **60** : 17, 1962.
- 32) 河原田裕幸, : 胆汁色素に関する研究. 第1編. 肝疾患患者の血清 Bilirubin glucuronide 分画の臨床的意義. 医学研究., **37** : 188, 1967.
- 33) 物部大成, : 胆汁色素に関する研究. 岡山医誌., **71** : 6389, 1959.
- 34) Talafant, E.: Personal communication to Dr. Sakamoto. 1957.

Studies on bile pigments**Part 1. Clinical significance of biliary bilirubin-phosphate fraction in various liver diseases.**

by

Mamoru HIROHATA

The First Department of Internal Medicine,
Okayama University Medical School, Okayama.
(Director: Prof. Kiyowo KOSAKA)

Bile was collected with a duodenal tube from 14 controls and 45 cases with various liver diseases which were consisted of 8 cases with acute hepatitis, 10 cases with chronic hepatitis, 8 cases with cirrhosis of the liver, 4 cases with Gilbert's syndrome, 3 cases with Dubin-Johnson's syndrome and 12 cases with cholecystopathy.

Bilirubin was extracted from the bile and separated with Billing's siliconized Kieselguhr column chromatography. Bilirubin-phosphate fraction showing positive phosphate ester reaction reported by Kondo, was fractionated with cellulose column chromatography as reported by Monobe, and finally its percentage to total direct bilirubin was calculated. Correlations between bilirubin-phosphate fraction and various liver function tests were studied and the following results were obtained.

1) Bilirubin-phosphate fraction was found to be 7.3% in cirrhosis of the liver, 5.5% in constitutional jaundice, 5.0% in acute hepatitis, 3.5% in chronic hepatitis, 2.2% in cholecystopathy and 2.1% in controls. Percentage of bilirubin-phosphate fraction was significantly higher in cirrhosis of the liver than in control, cholecystopathy and chronic hepatitis, and in acute hepatitis than in control and cholecystopathy.

2) There were good correlations among percentage of bilirubin-phosphate fraction, colloidal reaction (ZnTT, TTT) and serum γ -globulin fraction.

3) No significant correlations could be found among percentage of bilirubin-phosphate fraction, serum transaminase (GOT, GPT), cholesterol and alkaline phosphatase.

4) There was a good correlation between percentage of bilirubin-phosphate fraction and BSP retention at 45 minutes.

5) A significant negative correlation was obtained between percentage of bilirubin-phosphate fraction and K_{100} .