ガスクロマトグラフィーによる血中胆汁酸の定量分析 正常人と肝疾患患者について

北海道大学医学部真下内科（主任 真下啓明教授）

牧 野 勲

THE DETERMINATION OF THE SERUM BILE ACIDS LEVEL OF PATIENTS WITH HEPATOBIILIARY DISEASES WITH GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY

Isao MAKINO

The Second Department of Medicine, Hokkaido University School of Medicine,
Sapporo, Japan

(Director: Prof. Dr. Keimei Mashimo)

概要 GLCで胆汁酸を分析する際、胆汁酸 methylesterの acetate およびTFA誘導体と 1.5% QF-1 カラムの組合せが十分定量性のあることを認め、正常人および肝疾患患者の血中胆汁酸をGLCで定量分析し肝疾患の状態を血中胆汁酸の面から追究した。その結果正常人で0.12—1.46 $\mu\text{g/ml}$ serum, 肝疾患ではいずれも高値を示し、急性肝炎で 160 $\mu\text{g/ml}$ に及ぶ著しい増加を認め、この場合一次胆汁酸のchenodeoxycholic acidとcholic acidの増加が顕著であつた。慢性肝炎は1—10 $\mu\text{g/ml}$ 程度の上昇であつた。肝硬変症は1—10 $\mu\text{g/ml}$ とくにchenodeoxycholic acidの増加が著明である。閉塞性黄疸では7—80 $\mu\text{g/ml}$ かつcholic acidが高値であつた。胆嚢症で無症状時は正常、発作時に血中濃度が上昇する。また従来行なわれている肝機能検査のうちでは血中胆汁酸はtotal bilirubinと相関関係にあり、急性肝炎は閉塞性黄疸より勾配の多い回帰直線となる。血中胆汁酸値は肝疾患の病状とよく平行して変動しすぐれた肝機能検査法の一つであると思われ、今後分析操作の簡素化がのぞまれる。

I. 緒 言

胆汁酸は肝細胞でコレステロールの側鎖が切れて生ずる代謝産物でありglycinおよびtaurinとの抱合酸として胆汁中に排泄される。腸管に排泄された抱合酸は一部腸内細菌で水解され、遊離型となり、その一部は腸壁から再吸収されて再び肝細胞で抱合型となる腸肝循環を行なっている^{2,3)}。このように胆汁酸の代謝は肝を中心として営まれ、肝細胞と密接な関係があるところから胆汁酸を測定することにより、肝の状態を推察し臨床に役立てようとする試みがあつたが従来その測定法である比色法、分配クロマト法、ペーパークロマト法、

珪酸クロマト法は操作が非常に複雑で、かつ誤差が大きい欠点がありそのための実用の段階に至らなかつた。しかし最近薄層クロマトグラフィー（以後TLCと略す）、ガスクロマトグラフィー（以後GLCと略す）が出現し、この方面での胆汁酸分析が開発され著しい進展を示している^{4)~8)14)15)}。とくにGLCの分析は試料が極く微量で良いこと、TLCではできなかったdeoxycholic acidとchenodeoxycholic acidの分離測定が可能なること、操作が比較的容易なこと等数多くの長所を持っており広く利用されている。このGLCを使つての胆汁酸分析は1960年Vanden Heuvel⁹⁾が4種の胆汁酸

methylesterをSE-30カラムで分離に成功したのが最初で、胆汁への応用は1961年Blomstrand¹⁰⁾であった。彼は人間の胆嚢胆汁を分析し閉塞性黄疸の際deoxycholic acidが減少することを報告している。以来肝疾患や胆石胆嚢炎にかんして、胆汁および糞便中の胆汁酸分析が数多く発表されている。一方血中胆汁酸についてはCarey¹¹⁾やRudman and Kendall¹²⁾による紫外吸収率を利用した定量の文献があるがその血中濃度が低く、とくに正常人の場合著しい低値であるため信頼のおける報告は数限られていた。GLCを使用して定量分析を確立したのは1965年Sandberg et al¹³⁾である。彼等は血清を強陰イオン交換樹脂で胆汁酸の抽出と精製を同時に行ない、試料をmethylesterのtrifluoroacetate誘導体にし、QF-1カラムで定量分析することに成功し、正常人の場合胆汁酸の血中濃度はtotalで0.03~0.23mg/dl serum、肝疾患の場合0.39~20.1mg/dlと著しい上昇を来すことを報告している。今回著者はこのSandberg et alの方法にそつて血中胆汁酸を分析し、各胆汁酸の量と比率を求め、これと従来行なわれている肝機能検査と比較検討して肝疾患の状態を血中胆汁酸の面から追求を試みた。

II. 基礎実験

胆汁酸をGLCで分析するためには、胆汁酸の誘導体とカラムの選択が問題となる。臨床実験に先だち胆汁酸のmethylester, methylesterのacetate, およびmethylesterのtrifluoroacetate (以後TFAと略す)の3種の誘導体を作り、一方カラムは1.5%QF-1と0.75%X F 1105を使用し、その分離能と、定量性について検討した。

a) 実験方法

Standardとしてlithocholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, cholic acid, の各胆汁酸をmethanolに溶解し、1 mg/mlの標準液を作製した。methylesterは標準液の一定量を蒸発乾固、残渣を1 mlのmethanolに再び溶しそれに新鮮なdiazomethane-ether溶液を過剰に加え、30分間室温放置しその後etherを蒸発乾固した。acetate

表1. Relative retention time.

	1.5% QF-1		0.75% X F 1105	
	Methylester	Acetate of Methylester	TFA of Methylester	Acetate of Methylester
Lithocholic acid	0.47	0.44	0.67	0.62
Deoxycholic acid	1.00 (23.6分)	1.00 (23.0分)	1.00 (8.6分)	1.00 (15.3分)
Chenodeoxycholic acid	1.13	1.21	1.27	1.26
Cholic acid	2.56	2.65	2.01	1.75
Ursodeoxycholic acid		1.43		
Cholesterol		Acetate 0.24		
	1.5m X 4mm Column Temp. 220 °C	1.5m X 4mm Column Temp. 220 °C	1.5m X 4mm Column Temp. 225 °C	1.5m X 4mm Column Temp. 210 °C

誘導体はmethylesterをビュール試験管にacetoneで移し、溶媒を蒸発除去、それに無水酢酸1—2 mlを加え溶封、恒温槽内で100°C 4時間放置してアセチル化した。その無水酢酸を窒素気流下で除去し一定量のacetoneに溶解した。TFA誘導体はmethylesterを有栓試験管に少量のacetoneで移し溶媒除去後trifluoroacetic anhydride 0.2mlを加え、37°C 30分間放置、その後窒素気流下にて乾固し、一定量の二硫化炭素に溶解した。試料はマイクロシリンジでその2—8 μ lをGLCに注入した。GLCは島津GC-11 II C型水素炎イオン化検出器でカラムは1.5%QF-1と0.75%X F 1105、いずれも担体はchromosorb W60~80meshカラム径4 mm、長さ1.5mのガラスカラム、カラム温度はQF-1で220~225°C、X F 1105で210°C、試料気化温度240°C、キャリアーガスに窒素を用い入口圧2.5kg/cm²、流量100ml/min、感度倍率10³~10⁴、range 0.4~12.8でクロマトグラムを求めた。各分画についてはその面積を三角法で計算した。

b) 結果

QF-1カラム、X F 1105カラム共に胆汁酸はlithocholic acid, deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, cholic acidの順で流出しdeoxycholic acidの保持時間を1.00として他の胆汁酸の相対保持時間を計算し表1に示した。胆汁酸methylester誘導体で分析するとQF-1ではdeoxycholic acidとchenodeoxycholic acidのpeakが重なり、X F

Fig. 1. Separation of standard mixture. The acetylated methylesters of lithocholic, deoxycholic, chenodeoxycholic and cholic acids. Column. 1.5% QF-I 1.5m x 4mm Column temperature 220°C.

Fig. 2. Separation of standard mixture. The tri fluoracetylated methylesters of lithocholic, deoxycholic, chenodeoxycholic and cholic acids. Column. 1.5% QF-I 1.5m x 4mm Column temperature 225°C.

1105では個々のpeakにならない程分解がはげしく、分析には不適であった。methylesterのアセチル

Fig. 3. Standard curve. Relationship between peak area and amount of bile acids. The acetylated methylesters of bile acids. Column. 1.5% QF-I

Fig. 4. Standard curve. Relationship between peak area and amount of bile acid. The tri-fluoracetylated methylesters of bile acids. Column. 1.5% QF-I.

化誘導体およびTFA誘導体にすると初めて満足すべき分離を得たが、そのクロマトグラムを図1、図2に示している。cholic acidまで流出するに要する時間は、QF-1の場合acetateで約80分、TFAで約20分、XF1105の場合、acetateで約40分であったが、分離の度合、baselineの安定性はQF-1の方がすぐれている。次にmethylesterのアセチル化誘導体およびTFA誘導体をQF-1で分析する際の定量性について検討し検量線を作製した(図3、図4)。各胆汁酸は前者の場合0.5~5.0μg、後者の場合0.1~0.5μgで直線性の増加を認めたが、同じ1μgの胆汁酸でもlithocholic acid、

deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, cholic acidの保持時間が長くなる順にその反応性の低下が見られた。以上の結果から今後の分析は全てQF-1カラムを使用し、胆汁酸の試料はmethylesterのacetateまたはTFAを用いた。

III. 臨床実験

上記基礎実験を基にして正常人と肝疾患患者の血中胆汁酸を測定し、これと従来行なわれている肝機能検査と比較検討を行なった。

a) 対象

正常人は19～52才の健康人で男子6名、女子7名計13名について行ない、採血は早朝空腹時に行なった。肝疾患の患者は北大病院入院中の者および札幌近郊病院の入院患者でそのうちわけは急性肝炎12名、慢性肝炎6名、肝硬変症7名、閉塞性黄疸9名、胆嚢症6名、その他5名、計45名について行なった。

b) 実験方法

試薬はether, ethanolは再蒸留しbenzen, acetone, methanol, ethylchlorideは特級を使用、強陰イオン交換樹脂amberlyst A26はロート上で5～10倍容の蒸留水, ethanol, hexan, ethanol, 蒸留水の順で洗浄, その後水中に保存した。中性aluminum oxide (activity grade I)は600°に加熱, 有機物を除き真空デシケーターに保存する。diazomethaneはニトロソメチール尿素から作製した新鮮なものを使用し, 蒸留水は脱イオン水を蒸留した。炭酸アンモニウム始めその他の試薬は全て特級を用いた。実験操作は血清5～10ml (−20°Cにて数カ月凍結保存可能)を蒸留水で1:1に稀釈しそれに1N NaOH数滴落してpH11に調整する。一方陰イオン交換樹脂amberlyst A26を直径1cmのカラム管に約5ml詰め1N NaOH50ml, 次いで1N NaOH80%ethanol溶液50mlを通じ, その後中性になるまで蒸留水で洗う。この中にpH11に調整した血清試料を定量的に移しカラムはさらに95%ethanol20ml ethylchloride-ethanol 1:1 (V/V) 20ml, 80%ethanol20mlを順次流し, その後0.2M(NH₄)₂CO₃80%ethanol 150mlで胆汁酸が流出

する。流出物はFlash-evaporatorで蒸発乾固, その中に0.75%NaOH20mlを加えオートクレーブで圧力1.0kg/cm², 温度120°C4時間加水分解する。水解後試料を分液ロートに移し6N HClでpH1.0に調整後, 等量のetherで3回抽出し, 抽出etherを少量の蒸留水で洗浄, 水層を再び20mlのetherで抽出し脱水芒硝を少量加え水分を切り, ether層をデカンテーションで別の容器にとつて蒸発乾固, 残渣にmethanol 1mlを入れそれに新鮮なdiazomethane-ether溶液を過剰に加え30分間室温放置してメチル化する。再びetherを蒸発乾固, 残渣をbenzene10mlに溶解する。2gのaluminum oxideに蒸留水0.2mlを加えbenzene中に保存したものを直径1cm²のカラム管に詰めその中にbenzeneに溶かした試料を定量的に移し, その後benzene40mlで洗う。胆汁酸methylesterはmethanol-acetone 1:9 (V/V) 40mlで流出する。流出物を窒素気流下で蒸発乾固, acetate誘導体の場合その残渣を少量のacetoneに溶かしてビダー試験管に移し, 溶媒を蒸発乾固, 無水酢酸1～2ml加え溶封する。100°C4時間恒温槽内に放置, その後無水酢酸を窒素気流下にて除去, 残渣を一定量のacetoneに溶解した。TFA誘導体はカラム流出後のmethylesterを少量のacetoneで小有栓試験管に移し溶媒を除去後, trifluoroacetic anhydride 0.2mlを加え37°C30分間放置, その後窒素気流下で乾固し, 一定量の二硫化炭素に溶解した。試料はマイクロシリンジでGLCにかけクロマトグラムを得た。

GLCの条件は基礎実験の場合と全く同じくし測定法も三角法によつた。

c) 結果

1. 回収実験

正常人の血清1.0mlにつき833μgのcholic acidを添加した3例に, 上記操作(試料はacetate誘導体にした)を行ないGLC分析によつて得た回収率は88.6%, 91.6%, 72.3%, 平均84.2%でありまた24-¹⁴C-cholic acidを正常人血清1.0mlにつき10,000cpm, 20,000cpm添加し上記操作(試料は

表 2. Recovery test.

1) Recovery of Unlabeled Cholic acid Added to Serum and Carried through the Entire Procedure.
(Acetate of Bile acid Methyl ester)

No	Serum ml	Amount Added mg	Amount Recovered mg	Recovery %
1.	6.0	5.0	4.43	88.6
2.	6.0	5.0	4.58	91.6
3.	6.0	5.0	3.62	72.3

2) Recovery of $^{24}\text{-C}$ -Labeled Cholic acid Added to Serum and Carried through the Entire Procedure.
(TPA of Bile acid Methyl ester)

No	Serum ml	Added C-Cholic acid cpm	Recovered C-Cholic acid cpm	Recovery %
1.	4.0	40,000	31,200	78.3
2.	3.0	60,000	41,200	69.2

表 3. Bile acid level in normal serum
($\mu\text{g/ml}$ Serum).

No	Name	Sex	Age	Deoxycholic acid	Chenodeoxy- cholic acid	Cholic acid	Total
1.	H. S.	M.	52	0.27	0.21	0.29	0.79
2.	K. Y.	M.	26	0.55	0.55	0.36	1.46
3.	T. K.	F.	22	0.27	0.11	0.10	0.48
4.	G. A.	F.	28	0.15	0.10	0.06	0.31
5.	I. K.	F.	23	0.04	0.08	0.08	0.20
6.	S. M.	M.	32	0.23	0.22	0.07	0.52
7.	T. I.	F.	29	0.01	0.05	0.06	0.12
8.	H. I.	M.	29	0.42	0.30	0.11	0.83
9.	Z. T.	F.	22	0.25	0.13	0.10	0.48
10.	M. I.	M.	30	0.25	0.20	0.16	0.61
11.	T. J.	M.	29	0.01	0.06	0.08	0.15
12.	M. A.	F.	24	0.22	0.25	0.15	0.62
13.	M. Y.	F.	19	0.31	0.25	0.23	0.79

TFA誘導体にした)を行なつての回収率は78.3%, 69.2%平均73.8%でこの実験の定量性がきわめて良好なことを認めた(表2).

2. 正常人の血中胆汁酸

今回13例について正常値を求めた(表3). 正常人の血中胆汁酸はきわめて微量でtotal 0.12~1.46 $\mu\text{g/ml}$ serum, deoxycholic acid 0.01~0.55 $\mu\text{g/ml}$ chenodeoxycholic acid 0.05~0.55 $\mu\text{g/ml}$, cholic acid 0.06~0.36 $\mu\text{g/ml}$, 実際クロマトグラムは図5の如くである.

Fig. 5. Analysis of the trifluoroacetylated methyl esters of bile acids in normal serum.
Column. 1.5% QF-I.

3. 肝疾患患者の血中胆汁酸

急性肝炎ではその急性期に血中濃度がtotalで160 $\mu\text{g/ml}$ に及ぶ著しい増加を見, 症状の軽いものでも数 $\mu\text{g/ml}$ に達している. この際増加する胆汁酸は主として一次胆汁酸のchenodeoxycholic acidとcholic acidであった(図6, 表4).

治療によつて肝機能の改善がみられるとすみやかに血中胆汁酸は激減する. cholic acid/chenodeoxycholic acid (以後C/CDC比と略す) は1.0以

Fig. 6. Analysis of the acetylated methyl esters of bile acids in acute hepatitis patient.
Column. 1.5% QF-I.

表4. Bile acid levels of acute hepatitis ($\mu\text{g/ml}$ Serum).

Name Sex Age	DC.	CDC.	C.	Total.	C/CDC	Kun- kel	Total Bilir.	Al- Phos.	GOT	GPT
1. A. A. ♀ 68 (30/9)	2.07	22.80	47.40	72.27	2.08	9.5	11.4	14.3	350	190
(31/10)	0.03	0.10	0.13	0.26	1.30	5.9	1.8	6.1	25	14
2. A. K. ♂ 32 (6/10)	1.15	12.90	19.10	33.15	1.47	4.5	7.0	43.7	129	190
(24/10)	-	0.33	0.61	0.92	1.96	4.7	1.6	16.9	38	44
3. G. T. ♂ 40 (5/11)	0.40	13.50	38.00	51.90	2.85	7.8	10.8	0.0	500	500
(13/11)	-	0.43	0.29	0.72	0.67	12.4	NG 30		120	380
Steroid 使用										
4. Y. Y. ♂ 47 (10/10)	0.17	3.59	1.93	5.96	0.53	6.7		3.0	420	210
5. T. K. ♂ 21	0.78	0.71	1.74	3.23	2.45		NG 56		290	560
Steroid 使用										
6. I. T. ♂ 32 (24/11)	2.24	16.41	11.90	30.55	0.68	8.0	12.0	13.7	350	190
7. K. H. ♂ 37 (8/11)	1.09	10.10	36.50	47.69	3.57	5.4	7.6	14.6	210	190
8. K. T. ♀ 43	Trace	0.54	0.41	0.95	0.76	1.1	10.6	10.6	254	190
9. N. H. ♂ 8	Trace	4.80	17.10	21.90	2.56	10.3	7.0	20.1	350	190
10. H. T. ♂ 37	1.10	47.50	30.00	78.60	0.63	11.1	17.9	7.3	360	150
11. S. H. ♂ 37	Trace	8.10	10.00	18.10	1.23	1.7	6.4	9.0	350	190
12. S. W. ♂ 26	3.90	67.10	93.00	164.00	1.38	14.0	6.8	39.0	200	200

DC. Deoxycholic acid
CDC. Chenodeoxycholic acid
C. Cholic acid

表5. Bile acid levels of chronic hepatitis ($\mu\text{g/ml}$ Serum).

Name Sex Age	DC.	CDC.	C.	Total.	C/CDC	Kun- kel	Total Bilir.	Al- Phos.	GOT	GPT
1. M. Y. ♀ 43 (14/3)	0.23	1.44	0.44	2.11	0.31	13.1	0.6	6.0	40	
2. N. T. ♂ 55 (15/8)	Trace	0.41	0.89	1.30	2.17	7.9	0.8	19.8	58	28
3. T. T. ♂ 18 (13/10)	Trace	Trace	0.30	0.30	-	8.1	NG 5		63	190
Steroid 使用										
4. T. K. ♂ 36 (31/10)	Trace	1.56	1.59	3.15	1.01	4.9	2.1	6.8	178	143
5. K. K. ♂ 39 (18/11)	Trace	2.97	1.97	4.94	0.66	7.4	0.6		380	240
6. T. W. ♂ 61 (1/3)	1.07	2.67	4.62	8.36	1.73	11.1	17.9	7.3	360	150

DC. Deoxycholic acid
CDC. Chenodeoxycholic acid
C. Cholic acid

Fig. 7. Analysis of the acetylated methylesters of bile acids in portal cirrhosis patient. Column. 1.5% OF-I.

表6. Bile acid levels of liver cirrhosis ($\mu\text{g/ml}$ Serum).

Name Sex Age	DC.	CDC.	C.	Total.	C/CDC	Kun- kel	Total Bilir.	Al- Phos.	GOT	GPT
1. S. T. ♂ 41 (29/9)	0.21	4.10	2.19	6.50	0.53	10.0	2.6	41.9	350	73
(15/10)	0.29	16.10	11.70	28.11	0.73	11.0	13.3		350	105
(Litho 0.02)										
2. I. K. ♀ 32 (25/5)	-	0.88	0.58	1.46	0.66	18.0	0.9	6.5	51	22
(20/10)	Trace	0.27	Trace	0.27	-	22.0	NG 6		137	120
Steroid 使用										
3. W. H. ♂ 48 (20/7)	0.99	2.63	2.29	5.91	0.87	17.0	1.4	9.8	254	91
(28/9)	0.09	1.16	1.04	2.29	0.89	13.5	1.1	6.4	114	70
Steroid 使用										
4. T. Y. ♂ 30	0.09	3.81	3.85	7.75	1.00	9.4	NG 6		40	20
Eck Operation										
5. F. A. ♂ 60	-	0.37	0.18	0.55	0.48	7.2		10.3	26	15
6. S. H. ♂ 34	-	0.67	0.44	1.11	0.66	10.1	1.0	4.0	178	71
7. O. K. ♂ 41	0.20	4.30	3.50	8.00	0.82	21.2	3.8	45.4	270	170

DC. Deoxycholic acid
CDC. Chenodeoxycholic acid
C. Cholic acid

上と 1.0以下の両方の場合があり、一定の関係を求めることができなかった。

慢性肝炎では血中胆汁酸が 1~10 $\mu\text{g/ml}$ で著しい上昇はない。この場合も C/CDC 比は一定の値をとることはなかった(表5)。

肝硬変症では 1~10 $\mu\text{g/ml}$ 前後、その内 1 例は

Fig. 8. Analysis of the acetylated methylesters of bile acids in obstructive jaundice (cholelithiasis). Column. 1.5% QF-I.

表 7. Bile acid levels of obstruction ($\mu\text{g/ml}$ Serum).

Name Sex Age	OC.	CDC.	C.	Total	C/CDC	Kun- kel	Total Bilir. Phos.	ALT	GOT	GPT
1. B. U. ♀ 40 (22/7)	0.24 (Lithe 0.23 + ?)	5.08	8.59	14.12 + ?	1.69	4.4	5.3	21.4	60	40
2. W. Y. ♀ 48	0.88	4.09	9.82	14.79 + ?	2.41	6.5	2.9	35.3	45	32
3. S. Y. ♀ 26	- (Lithe 1.57)	2.75	3.06	7.38	1.11	4.3	3.7	70.0	58	
4. M. K. ♂ 68	0.52	9.15	12.10	21.77	1.32	8.4	36.8	22.0	86	86
5. M. M. ♂ 61	-	8.05	14.25	22.30	1.76	3.4	7.7	16.8	35	126
6. W. K. ♂ 76	-	4.02	9.95	13.97	2.50	7.7	16.9	38.9	156	65
7. K. T. ♂ 59	0.66	4.46	12.80	17.92	2.87	14.0	6.8	32.4	141	88
8. H. K. ♂ 60	1.10	17.10	68.30	86.50	3.99	10.0	21.8	23.2	107	58
9. H. M. ♀ 66	Trace	4.90	25.90	30.80	5.29	3.7	19.6	39.0	116	42

病状が悪化し死の直前 $28.11\mu\text{g/ml}$ まで上昇し、またEckの手術をした1例は肝機能が正常であるのに高値を示していた。肝硬変症の時はchenodeoxycholic acidの増加が著しく、そのためC/CDC

Fig. 9. Analysis of the acetylated methylesters of bile acids in cancer of the gall-bladder patient. Column. 1.5% QF-I.

比が1.0より小さくなる(図7, 表6)。

閉塞性黄疸の場合、閉塞の強いもの程血中胆汁酸は高値で、その値は $7\sim 80\mu\text{g/ml}$ 、とりわけcholic acidが増加しC/CDC比が1.0より大となった。また2例にcholic acidよりも長い保持時間をもつ未同定の大きなpeakが出現し、2例にlithocholic acidのpeakを認めた(図8, 表7)。

胆のう症の患者は無症状時正常、発作時に血中胆汁酸は増加していた(表8)。

その他胆のう癌、肝腫瘍、うつ血肝、Dubin Johnsonについて分析した(表9)。ただ胆のう癌の1例にursodeoxycholic acidと同じ保持時間をもつ大きいpeakを認めた(図9)。

IV. 考 察

1. 回収実験について

著者は血清1.0mlに $833\mu\text{g}$ のcholic acidを添加しacetate誘導体でGLC分析の結果回収率84.2%, $24\text{-}^{14}\text{C}$ -cholic acidを添加しTFA誘導体では73.8%の回収率を得たが、この方法を確立したSandberg et al¹³⁾は ^{14}C ラベル胆汁酸を使用しての回収率が82~96%, $0.35\sim 47.5\mu\text{g}$ の胆汁酸添加では59~87%であったと報告しており、われわ

Fig. 10. The bile acid level of the patient with hepatobiliary diseases.

れの値もこれにはほぼ一致していた。

2. 正常人の血中胆汁酸について

正常人の血中胆汁酸はきわめて低く、従来の非特異的な比色法によつては大きな誤差を生じ、その値は報告者でまちまちで存在を否定する人も多かつた。1956年Carey¹⁶⁾がペーパークロマトで分析し血清には胆汁と同じくdeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, cholic acidが存在し後二

者がその主な胆汁酸であることを確認した。1958年同じくCareyに¹⁷⁾よつて正常値がtrihydroxy acid 0—3.4μg/ml, dihydroxy acid 0—1.9μg/mlと報告されている。しかし分配クロマト法では正常値を求めることができず¹²⁾、またTLCでも定量することは困難である。Sandberg et alは¹⁸⁾正常人18名の血清についてGLC分析を行ないtotal 0.29—2.26μg/ml, deoxycholic acid 0.06—0.43μg/ml, chenodeoxycholic acid 0.10—1.30μg/ml, cholic acid 0.06—0.60μg/mlを報告している。以上の文

表8. Bile acid levels of cholecystopathy (μg/ml Serum).

Name Sex Age	DC.	CDC.	C.	Total.	C/CDC	Kun- kel	Total Al- Bilir.	Al- Phos.	GOT	GPT
1. H. H. ♀ 62	Trace	0.04	0.15	0.19	4.80	6.5	0.6	8.6	33	
2. K. A. ♀ 45	Trace	0.05	0.06	0.11	1.19	4.7	0.8	4.6	32	41
3. K. K. ♂ 46	Trace	0.07	Trace	0.07		10.8	0.7	6.9	41	26
4. T. S. ♂ 47	0.19	3.62	3.30	7.11	0.90	4.6		8.0	138	125
5. S. S. ♀ 38	Trace	0.12	0.14	0.26	1.60	3.8	1.7	13.8	40	89
6. D. W. ♂ 34	0.06	0.56	1.46	2.08	2.54	8.6	1.4	9.6	56	68

DC. Deoxycholic acid
CDC. Chenodeoxycholic acid
C. Cholic acid

表9. Bile acid levels of others (μg/ml serum).

Name Sex Age	DC.	CDC.	C.	Total.	C/CDC	Kun- kel	Total Al- Bilir.	Al- Phos.	GOT	GPT
1. N. Y. ♀ 21	Trace	1.20	1.15	2.35	0.96	9.7	3.0	33.2	210	105
2. G. F. ♀ 56	-	0.77	0.46	1.23	0.60	8.6	0.9	20.0	72	23
3. A. H. ♂ 14	-	0.07	0.06	0.13	0.86				61	65
4. Y. T. ♂ 62	-	1.53	1.57	3.10	1.06	6.4	17.0	22.0	165	115
5. M. R. ♂ 19	-	1.21	0.42	1.63	0.34	7.2	2.8	2.5	6	3

1. N. Y. Cardiac cirrhosis.
2. G. F. Cancer of Liver.
3. A. H. Fatty Liver.
4. Y. T. Cancer of Gall-bladder
5. M. R. Dubin-Johnson

DC. Deoxycholic acid
CDC. Chenodeoxycholic acid
C. Cholic acid

献値に比較してわれわれの分析値はtotal 0.12—1.46 μ g/mlで非常によく一致していた。

3. 肝疾患患者の血中胆汁酸について

表4に示すように急性肝炎の際血清胆汁酸の増加はきわめて著しく、その急性期の値は他の肝疾患ではみられない程上昇する(図10)。また治療で肝機能が改善されると血中値が激減するところから見て、その修復もすみやかに行なわれていると想像される。それに対して慢性肝炎は治療後肝機能が正常になつても血中胆汁酸が高めにとどまる例があり、従来いわれているようになかなか完治しがたいものであるを意味していると思われる。肝疾患時に起こる血中胆汁酸増加は胆汁酸が肝で生成され腸肝循環をしているので、次の三つの要素により決定されと考えられる。

(1) 肝細胞小葉、胆道系の破壊によつて胆汁中胆汁酸の血中への流入。

(2) 門脈系血液中胆汁酸が肝障害により肝を通過して循環系に流入すること。

(3) 肝による胆汁酸生成の障害または質的变化。

単に血中胆汁酸の測定からおのおのの疾患の場合、各因子ががどの程度関与しているかを判定す

ることは困難であるが、Osborn¹⁷⁾の指摘する如く急性肝炎と閉塞性黄疸の場合血中胆汁酸はGOT, GPTよりむしろtotal bilirubinと相関関係にある。従つて、(1)の因子が相当に大きい因子であるといえ、一方Blum and Spritz¹⁹⁾は放射性cholic acidを静注するとLaennec型cirrhosisで短時間の間に抱合型が血中に大部分を占めることはこれを裏書きしている。さらに図11のように横軸にtotal bilirubin縦軸に胆汁酸値を目盛ると、急性肝炎の方が閉塞性黄疸より勾配の高い回帰直線となるを見出した。これはbilirubinと胆汁酸の血中流入態度が両者で異つていられる。従来急性肝炎では肝障害が強く、胆汁再吸収がさほどでないが閉塞性黄疸では肝障害が弱く、胆汁再吸収が強いと想像されていたことに一見矛盾するように見えるが、胆汁酸生成は一般の肝機能と異つているのであろう。Careyは1958年¹¹⁾肝疾患の血清41例についてペーパークロマトで分析し肝硬変症の場合、dihydroxy acidが増加してtrihydroxy-dihydroxy bile acid ratio (以後TBA/DBA比と略すが) 1.0より小さくなり、閉塞性黄疸ではtrihydroxyが上昇してその比が1.0より大となることを報告し、これはRudman and Kendall¹²⁾を始め多くの人達によつて確認されている。彼はこのratioを肝障害の程度や予後の推定に利用し、実際に肝硬変症の患者で他の肝機能があまり重篤でないのにこの比が0.1まで低下し、予後の不良なことを指摘して数日後にこの患者が死亡したと述べている。われわれの実験においても肝硬変症でその比は1.0以下、閉塞性黄疸で1.0以上であつたが、これらの疾患で増加する胆汁酸は一次胆汁酸のchenodeoxycholic acidとcholic acidであり、deoxy cholic acidはわずかに増加するにすぎないことからTBA/DBA比はとりもなおさず、C/CDCの値であつた。また急性肝炎の際C/CDC比は一定しなかつたが、Carey¹⁸⁾はchlorpromazine, carbazoneらによる薬物肝障害、viral hepatitisでも閉塞性の型をとりcholestasisの状態にあるものはTBA/DBA > 1.0と述べている。Rudman et Kendall¹²⁾も血

Fig. 11. Relationship between bile acid level and total bilirubin.

中trihydroxy acidの濃度が高いものはalkali phosphatase値も高い傾向にあるといっている。C/CDC比が疾患で異った値をとる原因は不明であるが、Rudman et Kendall¹²⁾はLaennec肝硬変症の患者でその血清胆汁酸はほとんどがdihydroxy acidで遊離型が多く35%以下がglycinのみと抱合しており、閉塞性黄疸の場合はtrihydroxy acidがdiより多く存在し、そのほとんどが抱合型でglycinおよびtaurinと等量ずつ結合していることを認めた。彼はヒトの肝には胆汁酸抱合酵素と水酸化酵素があつて閉塞性黄疸の場合この酵素系がactiveで胆汁酸は血中に逆流しており、肝硬変症の場合これらの酵素系の活性が減じているためであろうと推定している。またCarey¹⁸⁾も12-hydroxylating酵素の活性が肝硬変症の時低下するためと想像している。次に今回対象とした肝疾患患者のうち幾人かはステロイド療法を行なっているが、ステロイド使用後は肝機能がさほど改善されていないのかかわらず、血中胆汁酸は予想された値より低く出た。例えば肝硬変症におけるIK (20/10), WH (28/9), 急性肝炎ST (13/11), 慢性肝炎TT (30/10)等の例である。ステロイドを投与すると肝細胞の障害は見かけ上改善されるからこれによつて当然血中胆汁酸は減少すると思われるが、それ以上に血中濃度を低下させ、マスクするような働きがあるかどうか今後症例の増加をまつて検討するつもりである。

なお閉塞性黄疸の患者2例にcholic acidの流出後deoxcholic acidに対する相対保持時間3.70をもつ未同定の大きなpeakが出現し、これが胆汁酸であるかどうかTLC等別の方法から検索中である。われわれはまた胆汁酸と発熱との関係に興味をもっており、とくにlithocholic acidにその関心をよせているが、閉塞性黄疸の2例に大きいlithocholic acidのpeakを認めるもこの患者に発熱は伴わなかつた。胆嚢癌患者の1例でursodeoxycholic acidの保持時間に等しい位置にかなり大きいpeakが出現した。Sandberg et al¹³⁾は肝疾患でこれと同様の小さいpeakがあつたことを報告し、また水

沼等²⁰⁾はmongolismとchondrodystrophia faetalisの患児糞便2例をGLC分析し、ursodeoxycholic acidと思われる胆汁酸を分離しており人間に本胆汁酸があつたという報告がないところからみて、興味のある所見であつた。

V. 要 約

GLCで胆汁酸を分析する際、胆汁酸のmethylesterのacetateおよびTFAと1.5%QF-1の組合せが十分定量性のあることを認め、正常人および肝疾患患者の血中胆汁酸をGLCで定量分析し、その量と各胆汁酸の比率を求め同時に従来の肝機能検査と比較検討を行なつた。血清を強陰イオン交換樹脂(Amberlyst A26)に直接適用、胆汁酸の抽出と精製を同時に行ない、加水分解後試料をmethylesterのacetateおよびTFAにし1.5%QF-1カラムで分析を行なつた。血中胆汁酸は正常人でtotal 0.12—1.46 μ g/ml、急性肝炎で著しい増加を認め160 μ g/mlに及び、この場合chenodeoxycholic acidとcholic acidの一次胆汁酸の増加が顕著であり、治療とともに急激にその値を減ずる。慢性肝炎は1—10 μ g/ml程度であつたが急性肝炎とともにC/CDC比は一定した値を得なかつた。肝硬変症は1—10 μ g/ml、とくにchenodeoxycholic acidの増加が著しくそのためC/CDC比< 1.0である。閉塞性黄疸では7—80 μ g/mlかつC/CDC> 1.0となり2例にcholic acidより長い保持時間をもつ未同定のpeakを認めている。胆嚢症で無症状時は正常、発作時に血中濃度が上昇する。

これらの肝疾患時上昇するのは一次胆汁酸が主体であるためTBA/DBA比はとりもなおさずC/CD C比であつた。またステロイド療法を行なうと、胆汁酸値はその肝機能から予想される値より低くでるのを認めた。胆嚢癌患者1例に、従来ヒトにはないといわれているursodeoxycholic acidに相当した保持時間をもつpeakを認め、閉塞性黄疸2例にlithocholic acidのpeakを見出したがその症例に発熱はなかつた。また従来行なわれている肝機能検査のうちでは血中胆汁酸値はtotal bilirubinと相関関係にあり、急性肝炎は閉塞性黄疸より勾

配の高い回帰直線となる。

血中胆汁酸の量は肝疾患の病状とよく平行して変動し、C/CDC比は肝細胞障害または閉塞性障害の鑑別に役立つすぐれた肝機能検査であると思われる、今後分析操作の簡素化がのぞまれる。

文 献

- 1) Bloch, K. et al.: J. biol. Chem., 149 : 511, 1943. — 2) Preziosi, P.: Lipid Pharmacology, Academic Press, New York, London, 1964, p 415. — 3) 今井他・脂質の生化学, 朝倉書店, 東京, 1966, 184. — 4) Hormes, W.L. & Stack, E.: Biochim. biophys. Acta.. (Amst.), 56 : 163, 1962. — 5) Bloomfield, D.K.: Anal. Chem., 34 : 737, 1962. — 6) Hanainen, L. & Brooks, C.J.W.: Biochem. J., 92 : 9P, 1964. — 7) Vanden Heuvel, W.J.A. et al.: Biochim. biophys. Acta. (Amst.), 48 : 596, 1961. — 8) 佐藤他: 日本臨床. 22 : 486, 1964. — 9) Vanden Heuvel, W.J.A.: Biochem. biophys. Res. Commun, 3 : 33, 1960. — 10) Blomstrand, R.: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 107 : 126, 1961. — 11) Carey, J.B., Jr.: J. clin. Invest., 37 : 1494, 1958. — 12) Rudman, D. & Kendall, F.E.: J. clin. Invest., 36 : 530, 1957. — 13) Sandberg, D.H. et al.: J. lipid. Res., 6 : 182, 1965. — 14) Sjövall, J.: Acta. chem. scand., 16 : 1761, 1962. — 15) Kuksis, A. & Gordon, B.A.: Canadian J. Biochem., 41 : 1355, 1963. — 16) Carey, J.B., Jr.: Science, 123 : 892, 1956. — 17) Osborn, E.C. et al.: Lancet, ii: 1049, 1959. — 18) Carey, J.B., Jr.: Gastroenterology, 41 : 285, 1961. — 19) Blum, M. & Spritz, N.: J. clin. Invest., 45 : 187, 1966. — 20) 水沼他: 最新医学, 20 (4) : 886, 1965.