

氏 名（本籍）	あま 甘	かす 糟	ひとし 仁
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	医	第 1794	号
学位授与年月日	昭和 61 年 2 月 26 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
最 終 学 歴	昭和 53 年 3 月 岩手医科大学医学部医学科卒業		

学位論文題目 酵素蛍光法による胆汁酸サルフェートの定量法の
確立と急性肝内胆汁うっ滞症におけるその動態に
ついて

（主 査）

論文審査委員 教授 後 藤 由 夫 教授 今 野 多 助

教授 石 森 章

論文内容要旨

胆汁酸の硫酸抱合は胆汁酸の極性を著しく高め、その尿中排泄を容易にすることから、胆汁酸の毒性に対する一種の解毒抱合と考えられている。肝胆道疾患では尿中胆汁酸排泄量が増加しその大部分が硫酸抱合型胆汁酸（胆汁酸サルフェート）であることから、その病態における代謝が注目されてきた。しかしながら胆汁酸サルフェート（SBA）の測定は、現在 gas chromatography や gas chromatography-mass spectrometry などの難解な方法が用いられており、その煩雑性から十分にその臨床的意義について明らかにされているとはいえない。そこで著者は酵素蛍光法を応用した血中及び尿中総 SBA の簡便な定量法を確立し、次いで急性肝内胆汁うっ滞症における SBA の動態について詳細に検討した。

方 法

血清は 0.5 ml をリン酸緩衝液 3~4 ml で希釈し、Sep-Pak C₁₈ cartridge に吸着させる。次に蒸留水 5 ml で脱塩後、90% エタノール 4 ml で胆汁酸画分を抽出した。抽出液はそのまま piperidinohydroxypropyl Sephadex LH-20 (PHP-LH-20), 100 mg に吸着させ、後藤らの方法に準じて遊離型 (F), グリシン抱合型 (G), タウリン抱合型 (T) の各画分に段階的に分離溶出した。次に 90% エタノールでカラムを一度洗浄後、硫酸抱合型 (S) 画分を溶出した。次いで F, G, T 画分は減圧濃縮後酵素蛍光法にて胆汁酸濃度を定量した。S 画分は減圧濃縮した後、塩酸-dimethoxypropane 溶液 1.5 ml にて 3 時間、37°C にて solvolysis し、1 N 水酸化ナトリウム溶液にて中性化後、再び減圧濃縮し酵素蛍光法にて定量した。尿は 0.5 ml を用いて同様に S 画分のみを分離測定した。前処理の過程で生成する各種塩の胆汁酸測定時における蛍光強度に対する影響はほとんど無視できるものであった。また胆汁酸 3-サルフェートを用いた solvolysis の基礎的検討では、いずれの標品も約 2 時間で脱抱合が完了した。グリシン、タウリン抱合型胆汁酸 3-サルフェートの標品を血清及び尿に添加した回収実験では、血清では 80% 以上、尿では 90% 以上の回収率が得られた。再現性、測定感度も十分満足のできるものであった。

次に急性肝内胆汁うっ滞症 (AIHC) における SBA の動態について検討した。対象者は AIHC 8 名であり、臨床経過中に採取した血清 42 検体、尿 11 検体を胆汁酸の分析に用いた。胆汁うっ滞の原因は 3 名が薬剤性によるもの、2 例がウイルス性によるもの（1 例 A 型肝炎、1 例非 A 非 B 型肝炎）、3 例が原因不明であった。入院時の血清総ビリルビン値は 13.0~39.7 mg/dl といずれも高度黄疸例であった。入院時における血清各抱合型胆汁酸濃度 (nmol/ml) は F, G, T, S の順に 3.4 ± 2.9 , 129.6 ± 50.4 , 112.4 ± 50.8 , 23.8 ± 9.2 であり control 群はそれぞれ $3.0 \pm$

1.5, 3.4 ± 2.3 , 0.8 ± 0.3 , 1.2 ± 0.4 であり, G, T, S 胆汁酸の有意の上昇が認められた。組成比では control 群に比べ T 胆汁酸の比率の増加と, S 胆汁酸の比率の減少が有意であった。尿中 SBA 排泄量では control 群の $6.3 \pm 2.7 \mu\text{mol}/\text{日}$ に比べて AIHC 群で $207.7 \pm 63.5 \mu\text{mol}/\text{日}$ と有意に上昇していた。血清 SBA を同時期の血清総ビリルビン値により mild, moderate, severe stage の 3 群に分類して比較すると, 黄疸の stage の進行とともに SBA 濃度は上昇する傾向がみられたが, 総胆汁酸に占める SBA の比率は逆に低下する傾向がみられ, moderate, severe stage では mild stage に比較して有意に低下していた。そこで血清総ビリルビン値と血清非硫酸抱合型胆汁酸 (NSBA) 及び SBA 濃度との関係を表わす近似式を求めると, NSBA とは $y = 10.255x + 59.065$ の 1 次直線式で表わされ, SBA とは $y = 0.675x - 0.003x^2 + 12.062$ の 2 次曲線で表わされた。この事実は黄疸が高度になるに従い血清 SBA 濃度の上昇率が低下する傾向を表わしていた。血中 SBA 濃度と尿中 SBA 1 日排泄量は相関係数 0.8978 で有意の正の相関を示した。SBA の腎クリアランス値は平均 $7.4 \pm 1.6 \text{ ml}/\text{分}$ であった。また SBA の腎クリアランス値と尿中 SBA 1 日排泄量との相関関係はなく, SBA の腎クリアランス値は尿中 SBA 排泄量とは関係なく常に一定の傾向を示した。症例における血清 SBA の変動の観察では, 黄疸の改善に伴う SBA の下降率は NSBA に比べてゆるやかであった。また総胆汁酸に占める SBA の比率は高度黄疸期に低く, 黄疸回復期に上昇する傾向がみられた。AIHC における SBA の動態の特徴として, 尿中 SBA 排泄量は増加がみられるものの, 黄疸が高度になるに従い, 血中 SBA の上昇率が低下していく傾向がみられ, 総胆汁酸に占める比率も低下することから, 高度黄疸時に肝での SBA の生成が低下している可能性が示唆された。また症例における観察で, 血中 SBA の総胆汁酸に占める比率が黄疸回復期で上昇する傾向がみられたが, この理由として黄疸回復期における SBA の胆汁中移行が, NSBA に比べて遅延している可能性が考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

胆汁酸の硫酸抱合は、胆汁酸の水溶性を増強し尿中排泄を容易にする解毒抱合と考えられている。肝胆道疾患では胆汁酸の尿中排泄が増加し、その大部分が硫酸抱合型胆汁酸（SBA）であることから、その病態における代謝が注目されてきた。しかしながらSBAの測定は煩雑なためにその臨床的意義の検討は不充分である。この研究は酵素蛍光法を応用した簡便な尿中及び血中SBAの測定法を確立するとともに、それを用いて急性肝内胆汁うっ滞症におけるその動態を明かにするために行ったものである。

方法としては検体0.5mlよりSep-PaKC cartridge にて胆汁酸画分を抽出し、イオン交換ゲル、PHP-LH-20にて硫酸抱合画分を分離溶出、次いで dimetoxypyropane-HCl溶液にて solvolysis した後、酵素蛍光法にて定量するものである。前処理の過程で生成する塩は蛍光反応にほとんど影響を与えず、SBAの標品を用いた solvolysis の検討では約1時間ではほぼ完全に脱抱合することが確認された。抱合型SBAの標品を用いた回収率の検討では尿90%以上、血清80%以上であり、再現性も十分満足できるものである。この方法により臨床例の検討を行った。

急性肝内胆汁うっ滞症（AIHC）8例の入院時血清胆汁酸は非硫酸抱合型胆汁酸（NSBA） $245.5 \pm 93.1 \mu\text{mol/l}$ 、SBA、 $23.8 \pm 9.2 \mu\text{mol/l}$ であり、両者とも対照に比べて有意に増加していた。総胆汁酸に占めるSBAの割合は対照群（ $17.5 \pm 9.3\%$ ）に比べてAIHC群（ $9.3 \pm 3.7\%$ ）で有意に低下していた。尿中SBA 1日排泄量はAIHC群（ $207.7 \pm 63.5 \mu\text{mol/日}$ ）では対照群（ $6.3 \pm 2.7 \mu\text{mol/日}$ ）に比べて著しく上昇していた。血清42検体を総ビリルビン値によりSBAを比較すると、黄疸が高度なもの程血中SBA濃度は上昇する傾向がみられたが、総胆汁酸に占める割合は減少する傾向がみられた。総ビリルビン値と血清NSBA及びSBAを表わす近似式を求めるとNSBAとは $y = 10.255x + 59.065$ の1次式で表わされ、SBAとは $y = 0.675x - 0.003x^2 + 12.062$ の2次式で表わされた。このことは黄疸の進行に伴ってSBAの血中上昇率が低下することを示している。血中SBA濃度と尿中SBA 1日排泄量には相関関係 $r = 0.8978$ がみられ、高度黄疸時にSBAの腎クリアランスの上昇は認められなかった。以上の結果は黄疸の進行に伴ってSBAの肝での生成率が低下する可能性を示唆するものである、としている。

この研究は硫酸抱合型胆汁酸の測定法を確立し、肝疾患におけるその意義を明かにしたものであり学位授与に値する。