

胆汁の電気泳動分析所見からの一考察

三橋百合子*、植田 伸夫**

* 帝京短期大学、** 村上記念病院

One consideration from electrophoresis analysis findings of bile

Yuriko Mitsuhashi*, Nobuo Ueta**

要 旨

Bile were analyzed by the method of clinical chemistry and the existence form of lipids in bile was examined by the electrophoresis.

Bile acid, bile-pigment, phospholipid and cholesterol were normal components of bile but relative amount of each components was quite different in each bile samples.

Cholesterol in bile was moved to + electrode on the electrophoresis, even though the cholesterol itself had no electric charge.

This finding means that the cholesterol in bile was conjugated by some negative charged substance but the substance was not bile acid.

胆汁を臨床化学的方法で分析し、胆汁中の脂質の存在様式を電気泳動法で検討した。

胆汁酸、胆汁色素、リン脂質それにコレステロールは胆汁の常在成分であるが、それぞれの含有量は個々の胆汁によって大変異なっていた。

胆汁中のコレステロールはそれ自体電荷を持たないが、電気泳動上+極の方向に泳動された。

この知見は胆汁中のコレステロールは胆汁中のある陰性荷電物質と会合していることを示している。だがそれは胆汁酸ではない。

緒 言

胆汁は膵液とともに十二指腸に分泌され、腸でのリパーゼの働きを助け中性脂肪の分解の役割を担っている。かつては、リヨン胆汁など検査材料として扱われたこともあるが、超音波検査等の登場により今日では疾患の検査対象として利用されることはほとんどない。

しかし、肝臓からの直接の分泌物だけに、肝細胞の情報を得るには最適な材料の一つであると考えられる。ことに肝細胞の胆管側の細胞膜の情報を得られる可能性が大きいと思われる。そのような観点から、胆汁を得る機会があったので、胆汁成分の電気泳動的分析を行い得られた知見を報告する。

材料および方法

1) 材料

手術時に肝外胆管あるいは肝内胆管に挿入されたチューブより採取された胆汁を使用。種類は胆嚢胆汁、胆管胆汁等で検体数は21検体である。

2) 測定法

各成分の測定はヒトの血清および尿濃度を測定する試薬を使用し自動分析装置（コバスマラS）で測定した。電気泳動法はヒトの血清の電気泳動法に準じ、支持体にはアガロースゲルを使用した。また血清での染色法がキット化されていない成分（胆汁酸、遊離脂肪酸、ビリルビン）については独自で確立した染色方法でおこなった。

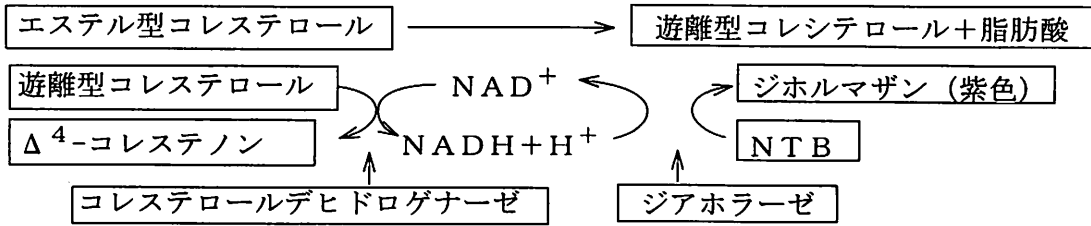
3) 各測定法の原理

総蛋白質はピロガロールレッド・モリブデン酸法（和光純薬）、総コレステロールはコレステロール酸化酵素/ペルオキシダーゼ法（シスメックス）、リン脂質はホスホリパーゼD/コリン酸化酵素法（シスメックス）、中性脂質はグリセロール酸化酵素/ペルオキシダーゼ法（シスメックス）、遊離脂肪酸はアシルCoAシンセターゼ/ペルオキシダーゼ法（シスメックス）、胆汁酸は3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素/ジアホラーゼ法(第一化学)を使用した。

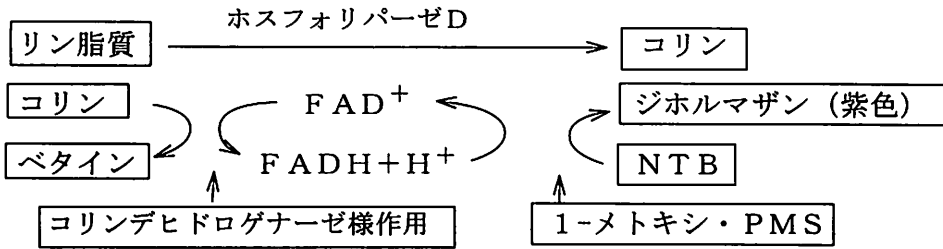
4) 電気泳動法

手技に関しては血清の電気泳動法に準じて行った。

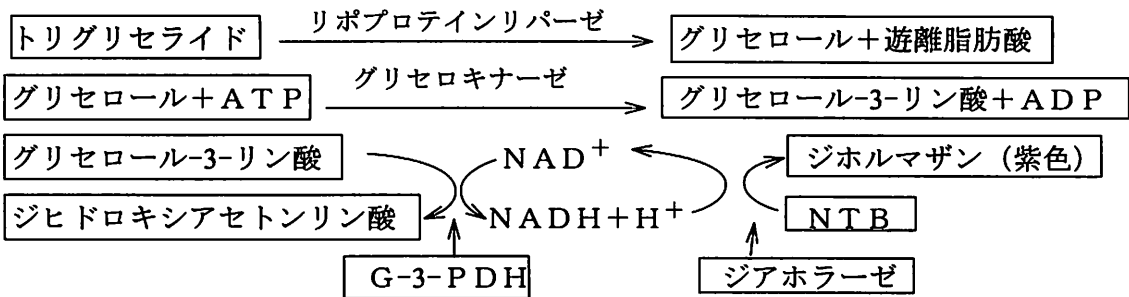
コレステロールエステラーゼ



コレステロール染色原理

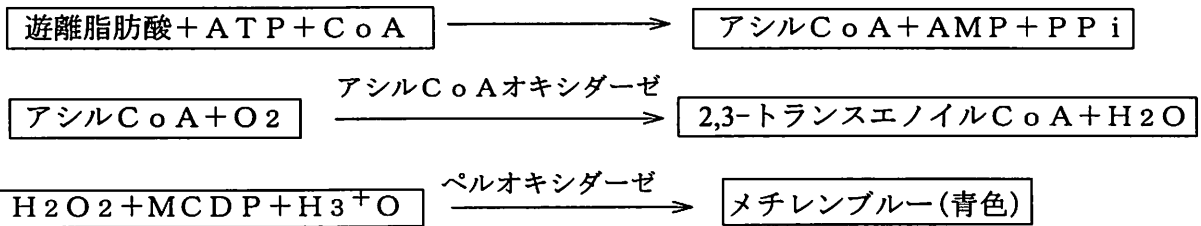


リン脂質染色原理

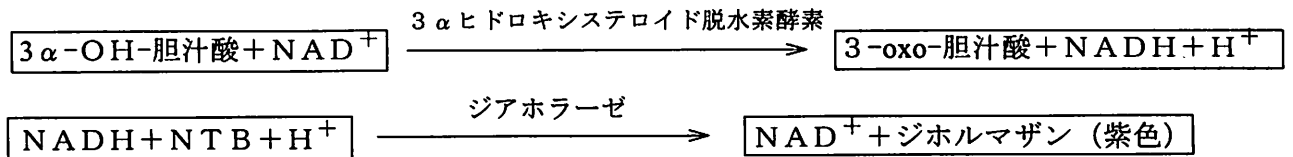


中性脂質染色原理

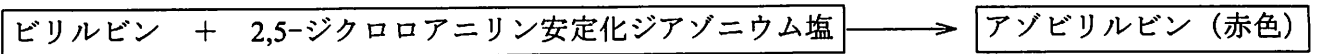
アシルCoAシンセターゼ



遊離脂肪酸染色原理



胆汁酸染色原理



ビリルビン染色原理

図1 電気泳動の染色原理

通電条件は一般的には90V、20分で行った。支持体はアガロースゲル膜（ヘレナ）を使用、電気泳動用緩衝液はペロナール緩衝液（pH8.6）を使用した。

脂質成分の染色は血清電気泳動用試薬のコーコレストA（酵素法）、コーピーエルA（酵素法）、コートリグリA（酵素法）（日本ケミファ）を使用し、それ以外は現在血清測定用試薬がないので、独自で考案した方法で染色した。遊離脂肪酸と胆汁酸の染色¹⁾は胆汁濃度測定時に使用した試薬を利用し染色した。総ビリルビンの染色²⁾は血清ビリルビン測定用試薬（安定化ジアゾ法：シスメックス）を利用し染色した。各染色原理を図1に示す。

結 果

1. 胆汁の各成分濃度

胆汁の各成分の濃度は比較しやすいようにmmol/lを使用した。mg/dl表示をmmol/lに変換するための分子量は、中性脂肪（875）、コレステロール（386.7）、リン脂質（774）とした。ただし総蛋白濃度はあまりにも低濃度になるので、g/dl単位で取り扱った。

胆汁の採取部位あるいは採取時間によって異なるが、脂質成分については中性脂肪は0～1.11mmol/lと血清濃度³⁾（0.34～1.70mmol/l）と比べ低濃度であった。

総コレステロールは0.03～9.85mmol/lで5mmol/lを超える胆汁は4例で血清（3.11～5.70mmol/l）に比べ低濃度であった。また大部分の検体で遊離コレステロールが分析値の大半を占めた。リン脂質は0.50～12.98mmol/lで血清（1.94～3.23mmol/l）と比べ高値を示した。遊離脂肪酸は0.05～3.89mmol/lで血清（0.2～0.6mmol/l）に比べ非常に高値を示したが一方ではかなり低値の胆汁もあり濃度にかかなりの幅があった。今回の測定法ではコリン含有のリン脂質、即ちレシチン、リゾレシチン、スフィンゴミエリンを測定していることになる。文献⁴⁾によると胆汁のリン脂質の95%はレシチン次いでリゾレシチン3%、ホスホエタノールアミン1%であるので、今回得られた胆汁のリン脂質値で、全リン脂質を示すものと考えてよいと思う。

胆汁酸については1.97～30.75mmol/lと非常に幅広い値が得られた。当然のことながら血清（1

～9μmol/l）に比べると非常に高値であった。今回用いた胆汁酸測定法は3βヒドロオキシステロイドを測定するもので3αヒドロオキシステロイドであるコレステロールは除外されている。文献⁴⁾によると胆汁中の胆汁酸分画はグリシン抱合の胆汁酸塩が3/4近くを占め（ケノデオキシコール酸30.4%、コール酸27.6%、デオキシコール酸14.5%）1/4がタウリン抱合体となっている。しかし文献によってその量比はかなり異なる。

総蛋白質は測定数が21検体に満たなかったが、0.03～1.7g/dlと血清（6.3～8.1g/dl）に比べ非常に低濃度であった。

各成分のヒストグラムを図2に示す。各成分のヒストグラムより、総コレステロール、中性脂肪、リン脂質、遊離脂肪酸は対数正規分布に近い分布を示す。胆汁酸については脂質成分と異なり、測定数を増やせば正規分布に近い型をとることも予想できる。

2. 各成分の相関性

今回測定した各成分の相関を調べた結果、相関係数の高かった組合せはコレステロールとリン脂質（r=0.844）と中性脂肪と遊離脂肪酸（r=0.702）であった。コレステロールとリン脂質については血清においては相関が非常に高くその濃度比も1である。胆汁に

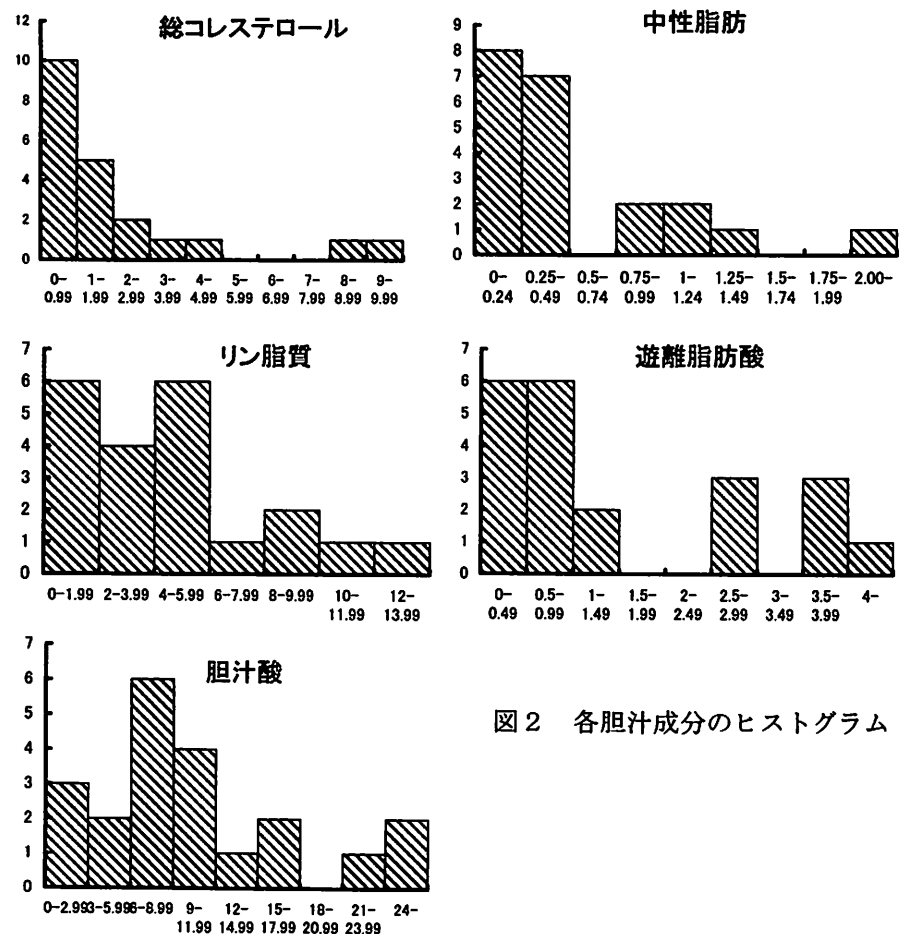


図2 各胆汁成分のヒストグラム

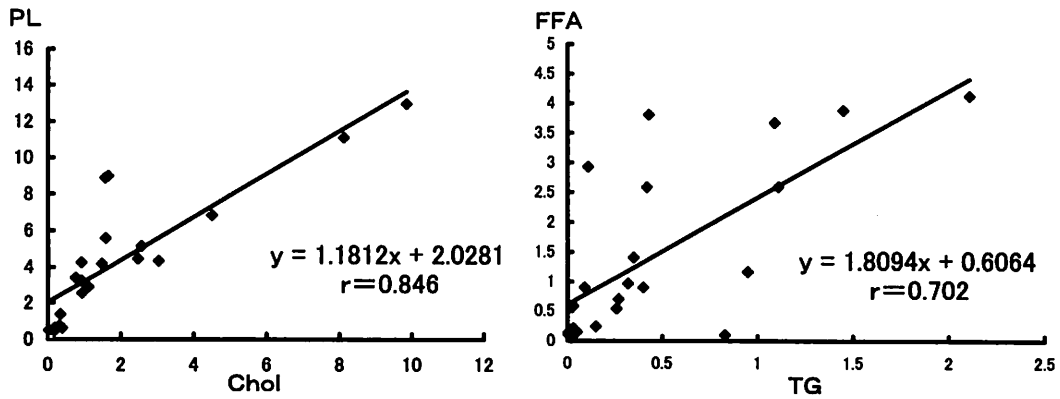


図3 コレステロールとリン脂質および中性脂質と遊離脂肪酸の相関図

については相関はあるものの、その濃度比は1.3~16.6と幅広い値を示した。図3に相関図を示す。

3. 電気泳動パターン

1) コレステロールとリン脂質

図4の1に示すように血清の分画とは全く異なり、血清アルブミンよりかなり陽極側に検出された。リン脂質は胆汁Aと胆汁Bは同位置に検出されたが、コレステロールについては胆汁Bでは一番陽極側のバンドは胆汁Aと一致して染まっているが、陽極側のバンドの他に帯状に染まったバンドが検出された。胆汁Cは胆汁A、Bよりさらに陽極側に検出された。

2) 胆汁色素 (ビリルビン)

測定に使用した胆汁は黄緑色を呈しており、それは胆汁色素 (ビリルビン) と思われる。その分画は塗布位置 (陰極側) よりほんの少し陽極側に移動した位置に緑色のバンドとして検出されている。図4の1の下段に赤く染まっているバンドは胆汁A~Cのビリルビン染色をしたものである。(緑色のバンドと一致している。)

通常、血清中のビリルビンはアルブミンと結合しているため、アルブミンと同様の位置に泳動されるが、胆汁の場合アルブミンはごく微量であるため、荷電を持たないビリルビンの大部分はほんの僅かしか動かなかったものと思われる。

3) 遊離脂肪酸

図4の2に示すように遊離脂肪酸はコントロールの血清アルブミンよりも陽極側に1本のバンドとして検出された。胆汁により多少移動度は異なる。血清中の遊離脂肪酸はアルブミンと結合している。胆汁中では少量のアルブミンに過量の遊離脂肪酸が結合し、その少量のアルブミンにさらに陰性荷電を与えているのかもしれない。

4) 胆汁酸

図4の2に示すように胆汁酸は血清アルブミン位と α 1位の2本に検出された。胆汁酸の位置はコレステ

ロール、リン脂質、遊離脂肪酸のどれとも一致していない。

5) アルブミン含有膜を使用した結果

図4の3にアルブミン含有アガロース膜を使用した胆汁の脂質成分を示す。

この膜は血清リポ蛋白の分析に使用されるもので、分離をよくする為にアガロースゲルに少量のアルブミンを添加してある。

アルブミン含有膜では通常のアガロース膜での泳動に比べ胆汁の各脂質成分の移動度に大差はないが、胆汁色素 (緑色) は塗布位置付近に止まらず脂質成分と同位置またはそれより陽極側に泳動されている。このことはアルブミン濃度が高い場合では胆汁色素はアルブミンに結合して移動すると考えられる。

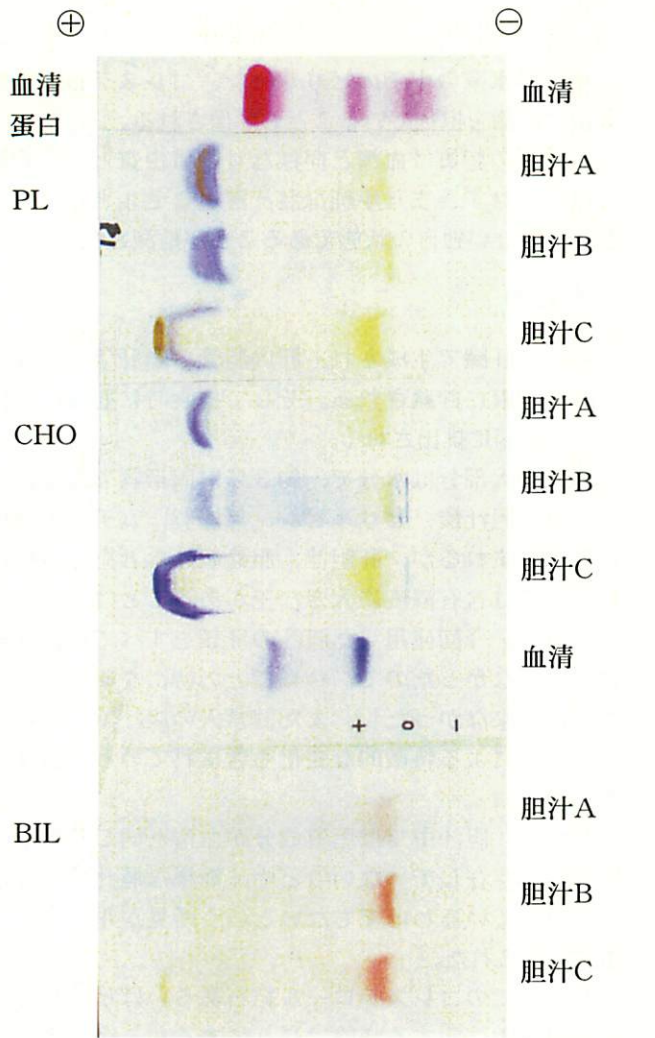
しかし、脂質成分についてはアルブミン濃度に影響されるとは考えられない。

考 察

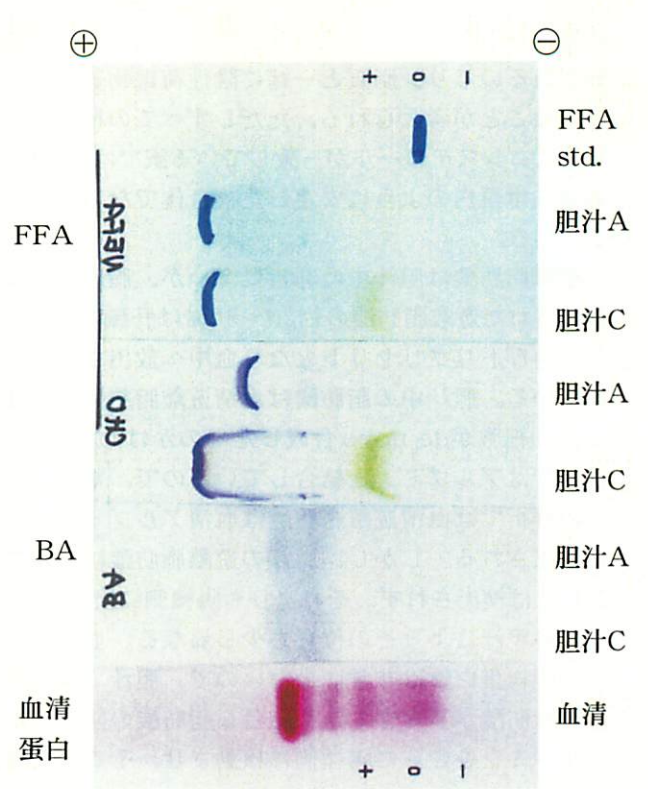
胆汁の成分は血液と比較するとかなり異なる。脂質成分でもリン脂質や遊離脂肪酸が多い結果となった。脂質は血中ではリポ蛋白として存在している。それゆえ、電気泳動法で分析すると、血清の α 1、pre β 、 β 位にそれぞれHDL、VLDL、LDLの分画として検出され、コレステロールやリン脂質の染色をすると、その分画の濃度に応じて α 1、pre β 、 β 位に検出される。

しかし、今回の胆汁の電気泳動の結果を見ると、胆汁の脂質は血清リポ蛋白とは全く異なった状態で存在している。コントロールの血清アルブミンよりさらに陽極側に泳動され、コレステロール、リン脂質、中性脂肪は同位置に泳動されている検体が多いが、なかにはコレステロールとリン脂質のバンドが一致しない検体もあった。

リン脂質はリン酸基の陰性荷電により陽極側へ泳動されることは考えられるが、コレステロールはそれ自



1. リン脂質・コレステロール・胆汁色素
(PL) (CHO) (BIL)



2. 遊離脂肪酸・胆汁酸
(FFA) (BA)



3. アルブミン添加膜による胆汁脂質成分と胆汁色素 (緑色)

図4 胆汁の電気泳動分析結果

体電荷をもたない。それがリン脂質と同様な位置に泳動されるのはリン脂質と一緒に陰性荷電物質と会合していることが考えられる。ただしすべての検体でリン脂質とコレステロールが一致している訳ではないので、血清リポ蛋白のように安定した複合体でないことを示している。

遊離脂肪酸は胆汁中に非常に多いが、脂肪組織より放出された遊離脂肪酸の約20~30%は肝臓に取り込まれ、再びトリグリセリドとなり血中へ放出されるとされている。胆汁中の脂肪酸は血清遊離脂肪酸由来なのか、肝細胞がde novo合成したものかはわからない。血中ではアルブミンと結合しているため、電気泳動法での分析では血清遊離脂肪酸は血清アルブミンの位置に検出される。しかし、胆汁の遊離脂肪酸はアルブミン位には検出されず、それよりも陽極側に検出される。また各胆汁によりその位置も少し異なる。血清に比べ胆汁の総蛋白質は非常に少ないので、胆汁では大量の遊離脂肪酸がアルブミンに結合し脂肪酸の陰性荷電がアルブミンをさらに陽極側に移動させ、そこに遊離脂肪酸も検出されていると推定される。

胆汁色素（ビリルビン）は塗布位置よりほとんど移動していないが、これもアルブミンが微量であるためほとんどキャリアーとしての役割を果たすことが出来ず、胆汁色素単独では荷電を持たないためと考えられる。そのことはアルブミン含有膜での胆汁色素が、陽極側へ移動していることから推定できる。アルブミン含有膜上ではあたかも脂質成分と胆汁色素と一緒に移動しているように見える。

胆汁酸についてはアルブミン位から α 1位にブロードなバンドとして、またはアルブミン位と α 1位の2本として検出される。各胆汁での検出位置はほとんど同様である。

胆汁中の胆汁酸は抱合型と考えられるが、抱合型胆汁酸の立体構造を考えると骨格部分は疎水性であるが、親水性の水酸基は同一方向（同一面）を向き、それが強力な界面活性作用の原因と考えられる。その界面活性作用が消化管の中で脂溶性の食品を水系に分散し、消化酵素と接触させる役割を果たしていることは十分に納得できる。

その胆汁中での役割は水に溶けない老廃物即ちビリルビンとコレステロールを十二指腸まで運び出す役割を担っていると考えられる。しかし、電気泳動の結果では脂質成分と胆汁酸の移動度は一致をみない。このことは胆汁酸とコレステロール、ビリルビンは単純なミセルを形成しているのではないことを推定させる。

胆汁は一般に血清より粘性が高い。胆汁の粘性はムチン（糖蛋白質）に由来するが、ムチンはアルブミン位より陽極側に検出されることはなく、またムチンに

脂質成分が結合しているとも考えにくい。しかし、その粘性が水系の中でのビリルビン、コレステロールの分散に役割を担っていることも想像される。

胆汁中の脂質は血清と同様なりポ蛋白質という形態では存在せず、また単純な胆汁酸塩ミセルとしても存在していない独自の状態であることが推測される。

まとめ

胆汁は肝臓で生成され、肝内胆管、総肝管、胆嚢管を経て胆嚢に貯蔵される。そして摂食時に胆嚢は収縮し十二指腸に排出される。

胆汁の大部分は水分で、約3%が固形物である。脂質成分、胆汁酸、ビリルビン、無機質、ムチン、蛋白質等が含まれるが、肝胆汁、胆嚢胆汁など胆汁の種類によっては含有濃度に大きな差があることは周知のことである。今回使用した胆汁の種類をすべて把握するには至らなかったため、種類ごとの特徴を明確にすることは出来なかったし、また健康人の胆汁ではないので、疾患による特徴的な変化も含まれている可能性もある。

しかし、胆汁中では脂質成分が血清と同じリポ蛋白質として存在していないことや、簡単な胆汁酸ミセルを形成しているわけでもないという所見が電気泳動分析より得られた。

胆道系でのコレステロール結石あるいはビリルビン結石の成因に関する議論は様々にあるが、今回の電気泳動分析の結果からはコレステロール、リン脂質やビリルビンは、胆汁という水系に安定なミセルとしては存在しているのではなく、ムチンという粘性物質の中に胆道系あるいは消化管系の蠕動運動が波及して混ぜ合わされて存在し、不安定な混合物として十二指腸に排泄されている可能性もあると考えられる結果であった。

文献欄

- 1) 三橋百合子他 生物物理化学別冊Vol.37, No.5 : 325~328, 日本電気泳動学会 (1993年)
- 2) 三橋百合子他 生物物理化学Vol.37, No.5 : 305, 日本電気泳動学会 (1993年)
- 3) 菅野剛史他 臨床検査技術学10 臨床化学第3版 医学書院
- 4) 高加国夫 MediacI Technology Vol.33, No.13 : 1472~1478, 医歯薬出版 (2005年)