

Wistar Kyoto ラットにおけるビリルビン 大量負荷時の胆汁中ビリルビン排泄機構

川崎 紀彦

近畿大学医学部第2内科学教室

Biliary bilirubin excretion in Wistar Kyoto rat under
loading of bilirubin

Norihiko Kawasaki

Second Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine,
Osaka, Japan

ABSTRACT

The mechanism of biliary bilirubin excretion in Wistar Kyoto rats was studied. Bilirubin diglucuronide is a main fraction of biliary bilirubin in Wistar Kyoto rats, and is similar to that of humans but differs from that of control (SD and Wistar) rats. Large amounts of bilirubin were loaded intravenously to Wistar Kyoto rats and Wistar rats with or without intraperitoneal salicylamide administration. Hepatic uridine diphosphate (UDP)-glucuronic acid concentration, bile flow, bile acid excretion, bilirubin fraction and biliary bilirubin excretion were determined. Bile flow and bile acid concentration and output did not differ between the bilirubin loaded group and the bilirubin load + salicylamide group. Administration of salicylamide caused hepatic UDP-glucuronic acid concentration to decrease to about one twentieth of the pretreatment level of salicylamide. Since salicylamide is metabolized through glucuronidation, it consumes hepatic UDP-glucuronic acid. Biliary bilirubin diglucuronide fraction was slightly decreased and bilirubin monoglucuronide fraction was slightly increased after bilirubin loading in both strains of rats. These changes were remarkable in rats receiving the co-administration of salicylamide. In Wistar Kyoto rats, total biliary bilirubin excretion decreased with the delayed and decreased excretion of bilirubin diglucuronide fraction. Biliary bilirubin monoglucuronide excretion decreased after bilirubin loading in Wistar Kyoto rats, but the administration of salicylamide did not delay its excretion. There may be a decreased excretion of bilirubin monoglucuronide in Wistar Kyoto rats. From these results, it was concluded that there is a difference in biliary bilirubin excretion between the two strains of rats. In addition, it was concluded that the canalicular excretory pathway of bile acid is different from that of bilirubin.

Key words : bilirubin, bile acid, biliary excretion, UDP-glucuronic acid, Wistar Kyoto rat

緒 言

ビリルビンは、ヘムの代謝産物であり、主に肝細胞にて血液から胆汁へ排泄される。この排泄過程は、少なくとも以下の3つの過程からなる。(1)ジヌソイド膜における血漿から肝細胞へのとり込み(2)ミクロソームの uridine diphosphate-glucuronyltransferase (UDPGT) による抱合(3)細胆管膜を通しての胆汁中への排泄。しかし、これらのどの段階が、律速段階の主要な要因であるかについては、今だに不明な点が多い。Sieg と Fevery ら¹ は、UDPGT による抱合が、その主要な段階であるとしているが、抱合反応の基質である uridine diphosphate-glucuronic acid (UDPGA) のビリルビン排泄に及ぼす影響について検討したものは少ない。

本研究においては、Wistar Kyoto (WKY) ラットが、Wistar ラットに比較して胆汁中の bilirubin diglucuronide (BDG) の割合が多く、bilirubin monoglucuronide (BMG) の割合が少ない点に着目し、両ラットの salicylamide (SAM) 投与下の肝内 UDPGA 低下状態においてビリルビンを負荷して、胆汁中へのビリルビン排泄のラット系統による差異を検討し、胆汁中へのビリルビン排泄機構についての考察を加えた。

方 法

1. 実験材料および試薬

Methanol, distilled water, acetonitrile は high performance liquid chromatography (HPLC) grade であり、和光純薬(大阪市)より得た。Acetic acid, sodium acetate, 1-ascorbic acid, acetone, ammonium formate, sodium bicarbonate, sodium chloride, sodium nitrite, sodium hydroxide, hydrochloric acid, sucrose, glycine, magnesium chloride, digitonin, triethanolamine, EDTA, ethylanthranilate, ammonium sulphamate, n-propyl ketone, n-butyl acetate, potassium acetate, n-octylamine は、特級試薬(和光純薬)を使

用した。SAM, bilirubin IX α , human serum albumin, UDP-glucuronic acid は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より得た。ラット血管、胆管へ挿入するカニューレ(各々、PE50[®], PE10[®])は Clay Adams (Parsippany, NJ, USA) 製を用いた。

2. 実験動物および手術操作

実験に用いた動物は、雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット, Wistar ラット, WKY ラットで、いずれも生後9~11週齢、体重250~300gのものを日本 SLC 株式会社(浜松)より購入した。飼育条件は、近畿大学医学部共同研究施設(実験動物研究室)内小動物飼育室にて室温23 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度50 \pm 5%の空調下、1日12時間の自動点滅(7:00am~7:00pmに点灯)の照明サイクル下で行った。また、ラット標準飼料(CE-2, 日本クレア株式会社, 大阪)と飲水は自由摂取とした。ラットの麻酔には、pentobarbital (30 mg/kg body weight)を腹腔内に投与し、さらに2および4時間後に、10 mg/kg body weight を追加投与し、麻酔を持続した。外頸静脈より PE50[®] カニューレを挿入し、実験経過中の体液喪失を補うため、0.025 ml/min/100 g body weight の速度で生理的食塩水を注入した。腹部を正中切開し、開腹後、胆管に PE10[®] カニューレを挿入し、胆汁を氷上、暗赤色光下で採取した。実験経過中のラット体温は、Homeothermal Blanket[®] を用いて37 $^{\circ}$ Cを維持した²。胆汁採取は、以下の4グループに分けて行った。

1) Wistar ラットに、sodium bicarbonate (0.5 g/dl) + sodium chloride (0.53 g/dl) 溶液に非抱合ビリルビンを 200 mg/dl 濃度となるように溶解し、実験開始30分後より 0.025 ml/min/100 g body weight の速度で頸静脈より注入した群 (n=5)

2) Wistar ラットで 1) に加え、ビリルビン注入と同時に腹腔内に、生理的食塩水に溶解した SAM (0.2 mmol/ml) を 2 mmol/kg 投与した群 (n=6)

3) WKY ラットで 1) と同様の処置を行っ

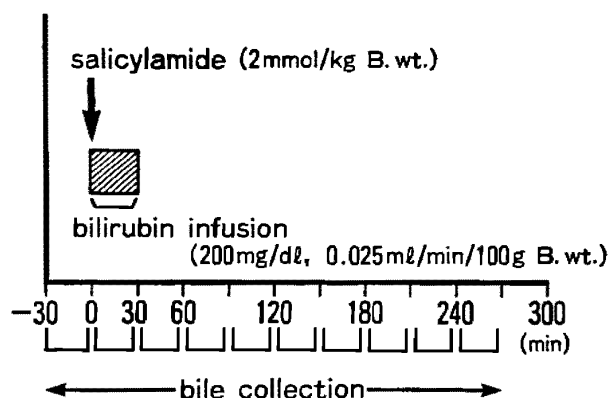


Fig. 1 Experiment design

た群 (n=5)

4) WKY ラットで 2) と同様の処置を行った群 (n=6)

胆汁は、実験開始以後30分間隔で計10回採取した (Fig. 1).

3.1. 肝 UDPGA 濃度の測定

上記グループと異なる Wistar ラット, WKY ラットを用いて肝 UDPGA 濃度を測定した. 各ラットで, 無処置ラット, および SAM 投与30分後のラット (各々 n=5) を pentobarbital 麻酔後開腹し, 取り出した肝をただちに 4 ml, 100°C 蒸留水中で 3 分間煮沸し, 氷上で冷やした後, さらに水を加えて 10% homogenate を作成した. さらに 20,000 g × 20 分間遠心後, 上清を 0.45 μm の Miller SR filter (Millipore, Bedford, MA, USA) で濾過し, Aw と Jones³ らによる HPLC 法にて測定した. HPLC 法に用いたカラムは, C₁₈ μBondapak (30 cm × 3.9 mm I.D., Waters, Milford, MA, USA), HPLC 分析装置は, Waters 社製 (Milford, MA, USA) で, 送液ポンプは 510 型, 検出器は Lambda Max Model 481 LC Spectrophotometer, 記録は Data Module 730 型 recorder を用いた. 市販 UDPGA を蒸留水に溶解し, 10 nm/ml, 50 nm/ml, 100 nm/ml 濃度の UDPGA を作成し, これより得た検量線より肝 UDPGA 濃度を求めた.

3.2. Bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity (BGTA) の測定

無処置 SD ラット, Wistar ラット, WKY

ラットを用い, Black⁴ の方法によって BGTA を測定した. その要旨は, 20 mg の肝組織の 10% homogenate を作成し, 同量の 10% digitonin 懸濁液, 200 μl bilirubin-albumin solution, 40 μl triethanolamine buffer (pH 7.4) を加えた. さらに, 40 μl, 125 mM magnesium chloride (コントロールには 125 mM EDTA), 20 μl UDPGA (コントロールには蒸留水) を加え, 37°C, 30 分間 incubation 後, diazo 試薬を加えた. 析出したアゾ色素に抽出液として n-propyl ketone/n-butyl acetate (85:15) 5 ml を加え 30 分間振とうした. さらに 1,000 g × 5 min 遠心し, 上清を波長 530 nm において吸光度を測定した. 分光光度計は UV-140-02 (島津製作所, 京都) を用いた.

3.3. 胆汁流量測定

胆汁流量は, 得られた胆汁の重量を測定し, 胆汁の比重を 1.01 として求めた⁵.

3.4. 胆汁中総胆汁酸濃度測定

胆管より得た胆汁を -30°C にて凍結保存し, 3 日以内に酵素法⁶ にて測定した. また胆汁酸排泄量は, 胆汁流量に胆汁酸濃度を乗じて求めた.

3.5. 胆汁中ビリルビン分画

胆汁中ビリルビン分画は, 山下ら^{7,8} の HPLC 法を用いて測定した. すなわち, カラムは C₁₈ μBondapak を用い, gradient 溶出は逆相で行った. 緩衝液は, 0.1 M sodium acetate (pH 4.0) を, 有機溶媒は, acetonitrile とし, 流速は, 1 ml/min, 検出機のピークは, 450 nm とした. 胆汁サンプルは, 採取後最終濃度 4% になるように 1-ascorbic acid を加え, ただちに測定するか, 測定するまで最大 3 日間 -30°C で凍結保存した. 測定時にはサンプル 1 に対して, アセトン 2 の割合で加え, 1,800 g × 5 分間遠心後, 上清を 0.45 μm の Miller SR filter で濾過し, HPLC 分析装置に注入した. 用いた HPLC 分析装置は, 肝 UDPGA 濃度測定時のものと同様である.

3.6. 胆汁中ビリルビン排泄量

同じく得られた胆汁について, 直ちにジアゾ

法⁹にてビリルビン濃度を測定し、総ビリルビン排泄量は、胆汁流量にビリルビン濃度を乗じて求めた。さらに BDG, BMG の各排泄量は、総ビリルビン排泄量に各分画の割合を乗じて求めた。

3.7. 統計処理

データは、mean±SD で示し、Student's t-test により解析し、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. ビリルビン非負荷群の結果

1.1. 肝 UDPGA 濃度

肝 UDPGA 濃度は、無処置 Wistar ラット、WKY ラットとも、それぞれ SAM 投与30分後には、約 1/20 に有意 ($p < 0.001$) に低下した。無処置 Wistar ラットと WKY ラット、SAM 投与後 Wistar ラットと WKY ラット間では、それぞれ肝 UDPGA 濃度に差はなかった (Ta-

Table 1 Changes in UDPGA after SAM administration in Wistar and WKY rat

	SAM treatment	
	before (nmol/g liver)	after (nmol/g liver)
Wistar rat	480.5±25.5	25.8±13.8***
WKY rat	489.5±86.8	25.7±9.3***

Each datum is presented as mean±SD (n=5).
***: significantly different from the pretreatment level in each rat ($P < 0.001$).

UDPGA: uridine diphosphate-glucuronic acid
SAM: salicylamide

Table 2 Biliary bilirubin fractions and hepatic microsomal BGTA in various rat strains

	BDG (%)	BMG (%)	UCB (%)	BGTA (nmol/mg protein/min)
SD rat	52.2±4.8	44.1±4.1	2.1±1.1	1.08±0.08
Wistar rat	55.6±4.1	42.7±3.8	1.9±0.9	1.17±0.16
WKY rat	83.5±5.2**	8.8±2.3***	7.3±1.8**	1.21±0.20

Each datum is presented as mean±SD (n=5).

** , ***: significantly different from SD and Wistar rat ($P < 0.01$, $P < 0.001$ respectively)

BDG : bilirubin diglucuronide

BMG : bilirubin monoglucuronide

UCB : unconjugated bilirubin

BGTA: the activity of bilirubin UDP-glucuronyltransferase

ble 1).

1.2. 無処置 SD ラット, Wistar ラットと WKY ラットの胆汁中ビリルビン分画と BGTA の比較

無処置 SD ラット, Wistar ラットと WKY ラットの胆汁中ビリルビン分画および BGTA は、Table 2 に示すごとく、WKY ラットにおいては SD ラット, Wistar ラットに比して胆汁中の BDG 分画が平均で1.5倍と高く、BMG 分画は約 1/5 と低値であった。一方、BGTA は、WKY ラットと SD ラット, Wistar ラット間で有意な差は認めなかった。

2. ビリルビン負荷群の結果

2.1. 胆汁流量の経時的变化

Wistar ラットと WKY ラットの基礎胆汁流量に差は認めず、ビリルビン単独注入後、両ラットとも時間経過とともに胆汁流量は減少し、観察終了時には前値の約20%の流量減少を示した。一方、両ラットともビリルビン+SAM 群においては、SAM 投与後胆汁流量は前値の約15%の増加を示し30~60分後をピークに漸減し、120~180分後に前値に復した。これらの流量変化は、Wistar ラットと WKY ラット間で有意な差はなかった (Fig. 2)。

2.2. 胆汁中胆汁酸濃度および胆汁酸排泄量の経時的变化

各群とも、胆汁酸濃度、胆汁酸排泄量は、実験開始後、まもなく減少しはじめた。これらの変化は、各群で有意な差はなかった (Fig.3,4)。

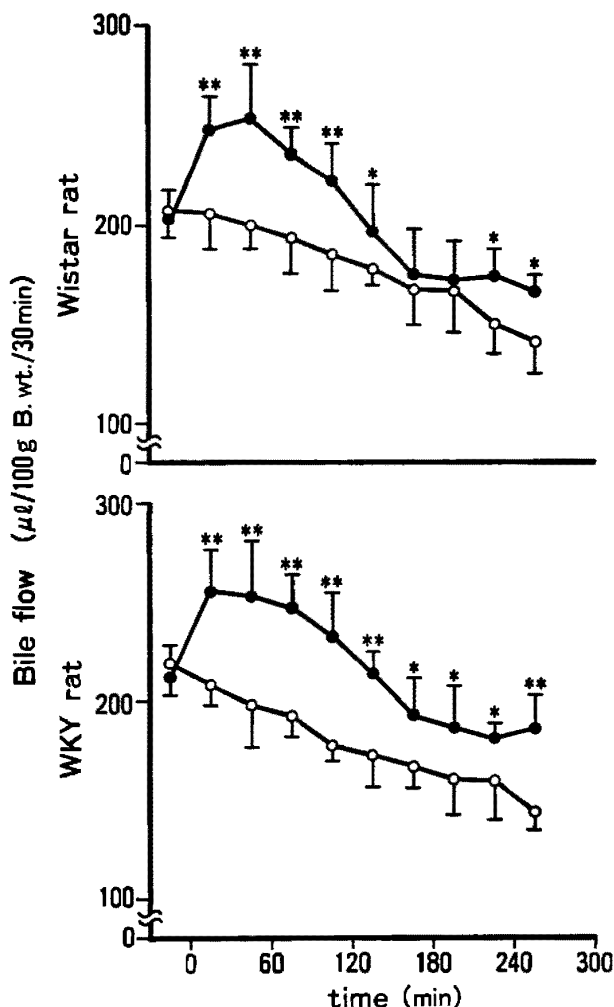


Fig. 2 Changes in the bile flow
 Open circles: the bilirubin loaded group
 Close circles: the bilirubin loaded
 +salicylamide group
 *,**: significantly different from the
 bilirubin loaded group in each strain of
 rats ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively)

2.3. 胆汁中ビリルビン分画の経時的変化

BDG 分画はビリルビン単独負荷群において、実験開始0~30分後に Wistar ラット, WKY ラットとも軽度減少した。ビリルビン+SAM 投与群では, Wistar ラットは, 平均51.8%から28.6%へと減少し, WKY ラットは, 平均88.1%から41.2%と著明に減少し, 実験開始180~240分後には, 前値付近まで復した (Fig. 5)。また BMG 分画は, ビリルビン単独負荷群において, 実験開始0~30分後に Wistar ラット, WKY ラットとも軽度増加した。さらに, ビリルビン+SAM 群では, Wistar ラットは

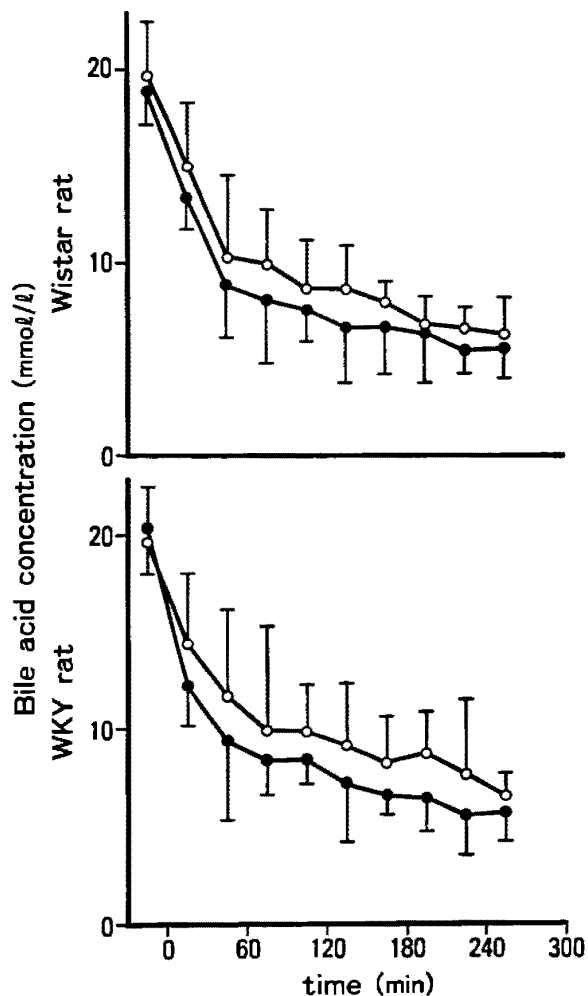


Fig. 3 Bile acid concentration
 See the legend for Fig.2.

平均46.2%から74.5%と増加し, WKY ラットは平均13.8%から57.5%と著明に増加した。いずれの場合にも実験開始150~180分後には, 前値付近まで復した (Fig. 6)。

2.4. 総ビリルビン排泄量

両ラットの両群とも総ビリルビン排泄量のピークは, 30~60分後であり, WKY ラットにおいては, ビリルビン+SAM 群の排泄ピーク量は, ビリルビン負荷のみの群のピーク量の約50%であったが, Wistar ラットにおいては, このようなピーク量の減少は, 認められなかった。WKY ラットでは SAM により総ビリルビン排泄の遅延がみられた (Fig. 7)。

2.5. BDG の胆汁中排泄量

Wistar ラットにおいては, WKY ラットに比し, BDG 排泄は, よりすみやかに行われて

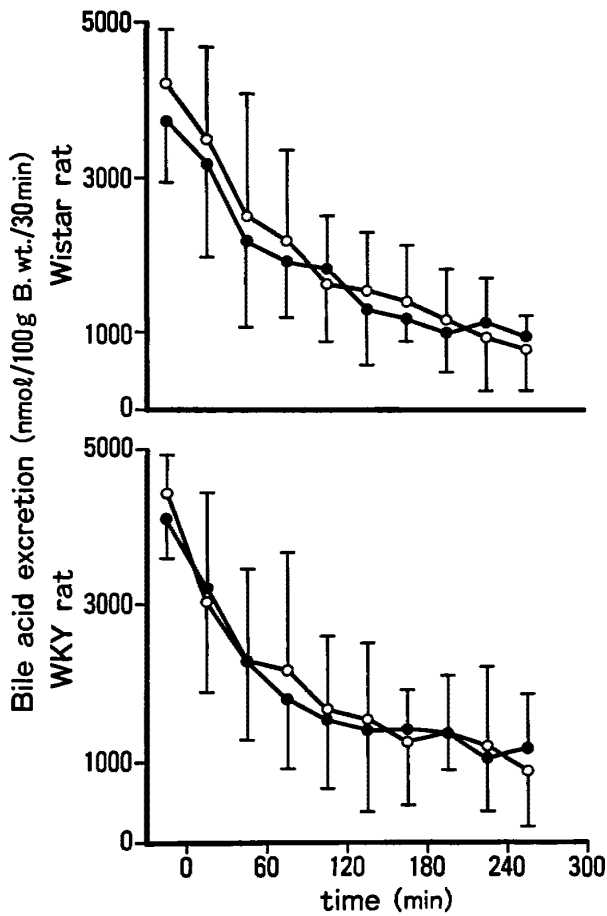


Fig. 4 Bile acid excretion
See the legend for Fig. 2.

いた。WKY ラットのビリルビン+SAM 投与群では、ビリルビン負荷のみの群に比してBDG 排泄量は減少し、さらに排泄ピーク時間の遅延と以後の排泄遅延が著明であった。一方、Wistar ラット群では、このような現象を認めなかった (Fig. 8)。

2.6. BMG の胆汁中排泄量

Wistar ラットと WKY ラットともビリルビン投与群、ビリルビン+SAM 投与群間の排泄量および排泄ピーク時間に差はみられなかったが、Wistar ラットと WKY ラット間の排泄量は WKY ラットの方が少なかった (Fig. 9)。

考 察

ビリルビンの胆汁への排泄の律速段階は、細胆管レベルにあるといわれている^{10,11} が、肝細胞内での抱合においてであるとの報告¹ もあり、いまだ一致した意見は得られていない。抱合レ

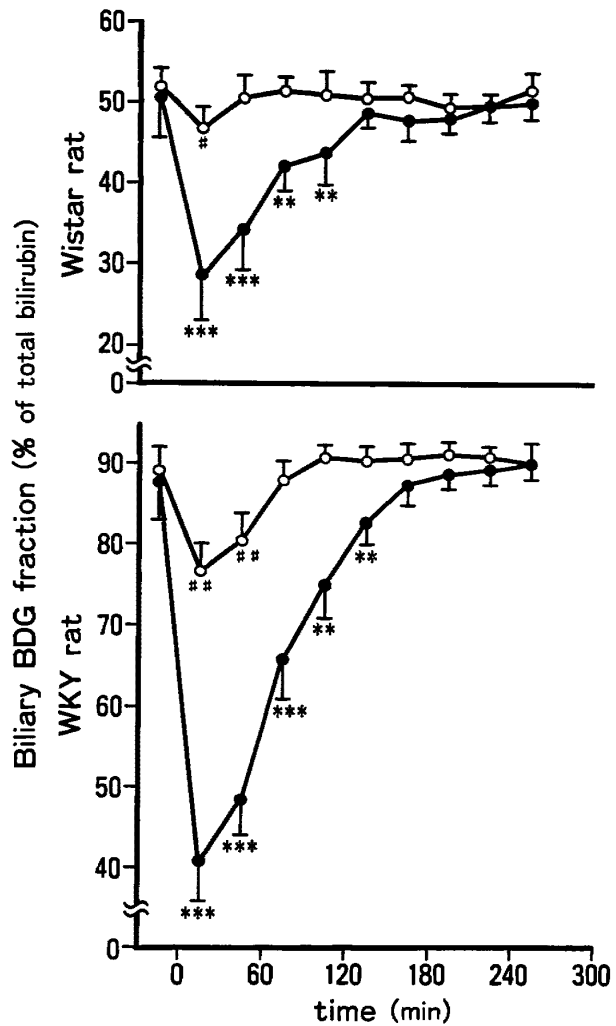


Fig. 5 Biliary BDG fraction
See the legend for Fig. 2.
*, #; p<0.05, **, ***, p<0.01, ***, ***, p<0.001: significantly different from the pretreatment level

ベルにおける研究では薬剤等を用い BGTA を変化させビリルビンの排泄をみたものや、ビリルビン負荷後のビリルビン代謝の変化をみたものが多く¹²⁻¹⁶、ラットの系統による差異や、抱合の基質である肝 UDPGA 濃度の変化が胆汁中へのビリルビン排泄に及ぼす影響をみた報告は少ない。

SAM を SD ラットの腹腔内に投与すると胆汁流量は一時的に増し¹⁷⁻¹⁹、投与15~30分後には、肝細胞内の UDPGA が正常時の 1/10 以下に減少し、その後回復することが知られている^{20,21}。本研究における Wistar ラットと Wistar Kyoto ラットでも SAM 投与によって

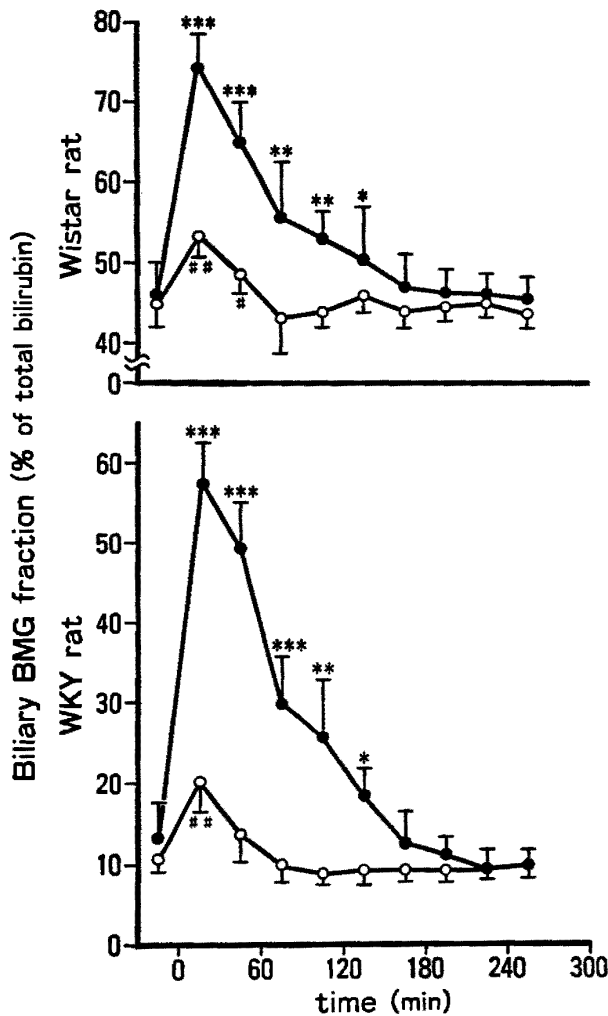


Fig. 6 Biliary BMG fraction
See the legend for Fig. 5.

UDPGA 濃度は、約 1/20 に低下した。上籾は、以前 SD ラットにおいて、SAM の投与により胆汁中 BDG 分画が減少し、BMG 分画が増加する事を示した^{20,21}。SAM は、肝細胞においてグルクロン酸抱合をうけ肝内の UDPGA を消費し、このように胆汁中ビリルビン分画に変化をおよぼす²⁰⁻²⁴。SAM は、ヒトとラットにおいて、それぞれ約70%と35%が glucuronidation をうけるとされている²⁵。つまり SAM は、ビリルビンと同様 UDPGA を基質とする外因性物質と考えることができる。しかし肝 UDPGA 濃度の低下は、ビリルビンの排泄量には影響を及ぼさなかった²¹。そこで筆者は、Wistar ラットと胆汁中ビリルビン組成中、BDG 分画割合がその大半を占めるという点で、ヒトと類似している WKY ラットとを比較し、大量のビリ

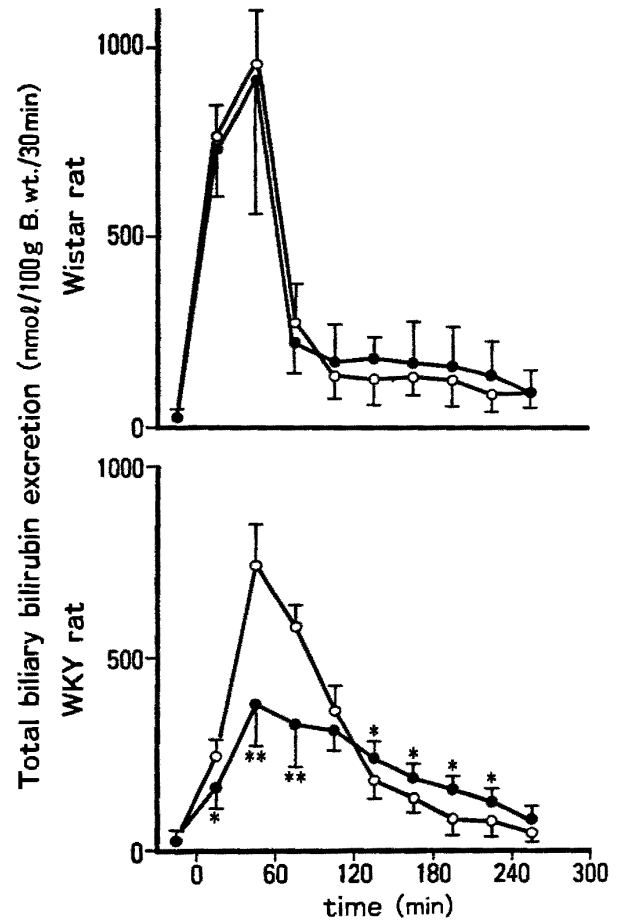


Fig. 7 Biliary bilirubin excretion
See the legend for Fig. 2.

ルビンを負荷した状況（すなわちビリルビンの最大排泄状態）にて肝 UDPGA 濃度の低下が胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす影響を観察し、両ラット間のビリルビン排泄機構の差について検討した。

Wistar ラットと WKY ラットの間には、胆汁流量、および胆汁中胆汁酸排泄量の変化に差はなかった (Fig. 2, 4)。ビリルビンの過負荷で胆汁流量が減少することが知られているが、これは高濃度ビリルビンにより非抱合ビリルビンが膜リン脂質と結合し、cytotoxic な影響を及ぼすため、胆汁分泌量は減少し、さらに胆汁鬱滞が引き起こされるためと考えられている^{26,27}。また、ラットにおいて高濃度ビリルビン負荷により肝細胞質空胞、bile canicular の拡張がみられるとの報告もある²⁸。

本研究において、Wistar ラットでは、SAM 投与により総ビリルビンの排泄遅延は認められ

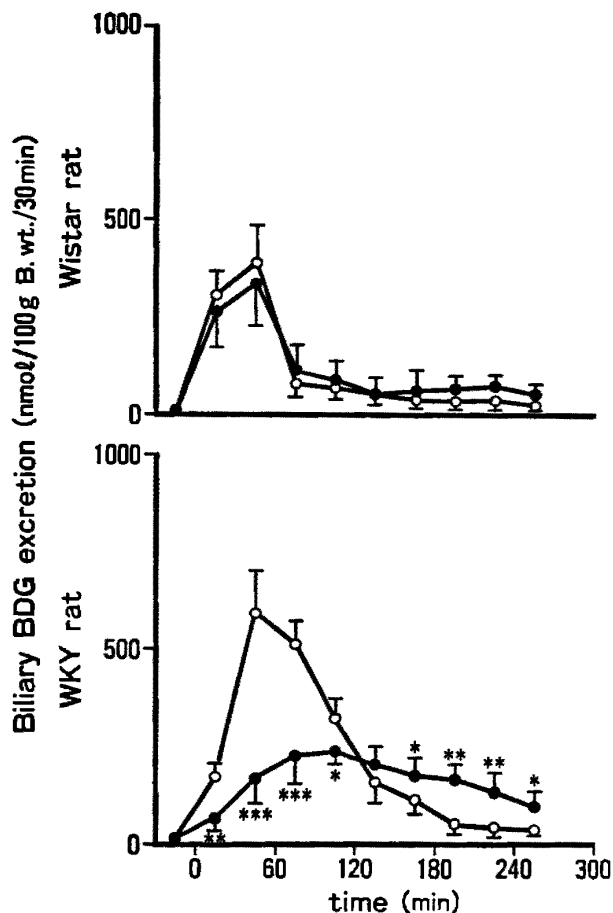


Fig. 8 Biliary BDG excretion
See the legend for Fig. 2.
In Wistar rats, no significant difference was observed between the bilirubin loaded group and the bilirubin loaded + salicylamide group.
*, **, ***: Significant differences were observed.
($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively)
The peak excretion time was delayed in Wistar Kyoto rats.

なかったが、WKY ラットにおいては、SAM 投与にて総ビリルビン排泄の遅延を認めた (Fig. 7)。

WKY ラットと同様に胆汁流量の減少した Wistar ラットではビリルビン排泄遅延がみられないことより、胆汁流量の減少が、ビリルビン排泄遅延の原因となったとは考えにくい。

本実験において Wistar ラットと WKY ラットにおいてビリルビン代謝に相違がある事が示唆された。Wistar ラットと WKY ラットを比較した場合、肝 UDPGA 濃度は、SAM 投

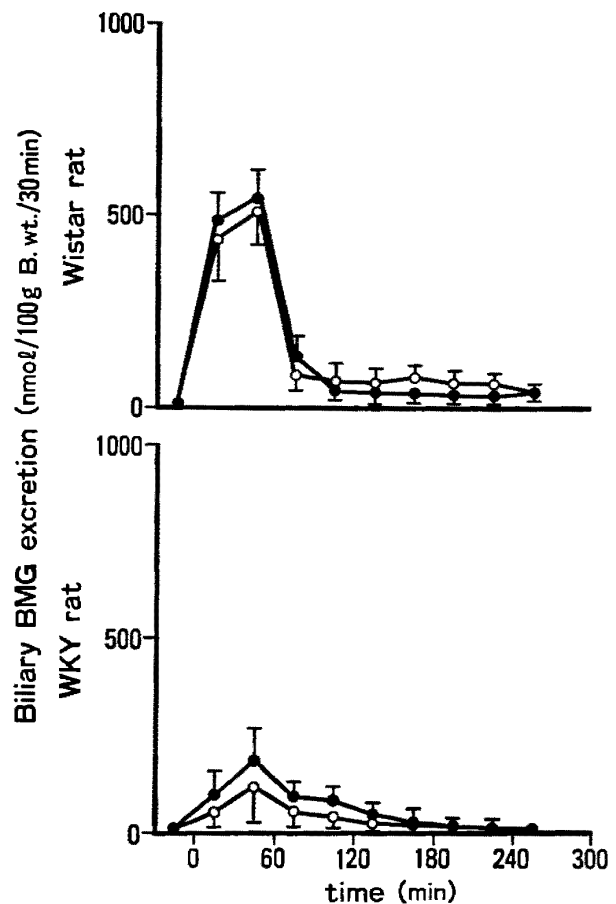


Fig. 9 Biliary BMG excretion
See the legend for Fig. 2.
No significant difference was observed between the bilirubin loaded group and the bilirubin loaded + salicylamide group in each strain of rats. Biliary BMG excretion in Wistar Kyoto rats was less than that in Wistar rats.

与前の濃度、および SAM 投与後の濃度変化にそれぞれ差はなかった (Table 1)。また胆汁中 BDG、BMG 組成の経時的变化から、肝 UDPGA 濃度の回復状況は、両ラット間で同様であると考えられる。ヒトにおいては、胆汁中 BDG/BMG 比率は肝細胞内の BGTA により規定されると考えられている²⁹。両ラットとも BGTA には差が認められなかったが、前者の胆汁中ビリルビンは BDG と BMG の比率が約 1:1 であるのに対し後者は約 9:1 であった (Table 2)。さらに、ビリルビン単独負荷状況下において、WKY ラットでは、Wistar ラットに比してビリルビン排泄のピーク時間の遅延はないが、0~30分の胆汁への総ビリルビン、

BDG の排泄の遅延が認められる (Fig. 7, 8). SAM 投与により Wistar ラットに比してWKY ラットのビリルビン排泄量が減少し, BDG 排泄に関しては, ピーク時間の遅延もみられた. ビリルビンと SAM の同時負荷にて肝内 UDPGA 不足のため肝細胞内にて BMG ができやすい環境にあるにもかかわらず WKY ラットにては BMG の排泄は増加せず (Fig. 9), BDG はピーク時間の遅延を伴う排泄遅延が認められた. これらの事は以下の可能性を示唆する. ① 外因性物質 (SAM) による肝 UDPGA 濃度の低下によって BDG/BMG 比の低下を来す. ② WKY ラットにおいて, BDG の排泄障害は軽度であるが, BMG のさらに高度な排泄障害がある為, 胆汁中ビリルビン排泄量の低下が引き起こされた. ③肝細胞において UDPGA 濃度の改善 (増加) による BDG 濃度の増加後, ビリルビンが胆汁中へ排泄された.

以上より胆汁中の BDG/BMG 比が肝細胞内での抱合反応過程後におけるビリルビンの排泄過程の変化によっても規定されている事が明らかとなった. また, 胆汁酸の胆汁中への排泄過程は, ビリルビンの排泄過程と異なるものと認められた. WKY ラットの胆汁中ビリルビン分画はヒトのそれと類似しており, ヒトにおいても薬物代謝上, UDPGA の低下を引き起こす薬剤で, 胆汁へのビリルビン排泄遅延がおこる可能性がある.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました第2内科山本俊夫教授に深甚なる謝意を捧げます. また, 終始御指導, 御助言を賜りました第2内科足立幸彦助教授に心から感謝申し上げるとともに御協力をいただきました上谷俊法博士をはじめ第2内科学教室員各位に感謝致します. 本論文の要旨は International Association for the Study of the Liver, Brighton, UK, 1992., にて発表した.

文 献

1. Sieg A, Stiehl A, Fevery J, Heirwegh KPM, Raedsch R, Kommerell B. Similarities in maximal biliary bilirubin output in the normal rat after administration of unconjugated bilirubin or bilirubin diglucuronide. *Hepatology* 1989; 10: 14-20.
2. Yamashita M, Adachi Y, Kambe A, Nanno T, Nagase S, Yamamoto T. Serum binding and biliary excretion of bilirubin after bilirubin loading in Nagase analbuminemic rats and heterozygous (Jj) Gunn rats. *J Lab Clin Med* 1988; 112: 443-449.
3. Aw TY, Jones DP. Direct determination of UDP-glucuronic acid in cell extracts by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1982; 127: 32-36.
4. Black M, Billing BH, Heirwegh KPM. Determination of bilirubin UDP-glucuronyl transferase activity in needle-biopsy specimens of human liver. *Clin Chim Acta* 1970; 29: 27-35.
5. Dittler DS. Biological handbook: Blood and other body fluids. Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington D. C. 1961.
6. Turley SD, and Dietschy JM. Reevaluation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J Lipid Research* 1978; 19: 924-928.
7. Yamashita M, Adachi Y, Yamamoto T. Analysis of bilirubin conjugates in human bile acid by column chromatography. *J Chromat* 1986; 375: 386-391.
8. 山下正己. 肝胆道疾患における胆汁中ビリルビン分画の検討. *近畿大医誌* 1987; 12: 141-154.
9. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 1937; 119: 481-490.
10. Scharschmidt BF. Biliary secretion of bile pigments. In: Ostrow JD, eds. *Bile pigments and jaundice*: New York: Marcel Dekker Inc 1986; 243-269.
11. Meier PJ, Ruetz S, Fricker G, Landmann L. Isolation and characterization of a canalicular bile salt binding polypeptide of rat liver. In: Baumgartner G, Stiehl A, Gerok W, eds *Bile acids and the liver*: Lancaster: MTP press limited 1986; 137-142.
12. Arias IM, Johnson L, Wolfson S. Biliary excretion of injected conjugated and unconjugated bilirubin by normal and Gunn rats. *Am J Physiol* 1961; 200: 1091-1094.
13. Connor EB. Cholelithiasis in sickle cell

- anemia. *Am J Med* 1968 ; 45 : 889-898.
14. Fevery J, Damme BV, Michels R, De Groot J, Heirwegh KPM. Bilirubin conjugates in bile of man and rat in normal state and liver disease. *J Clin Invest* 1972 ; 51 : 2482-2492.
 15. Gartner LM, Lane DL, Cornelius CE. Bilirubin transport by liver in adult *Macaca mulatta*. *Am J Physiol* 1971 ; 220 : 1528-1535.
 16. Gregory DH, Strickland RD. Solubilization and characterization of hepatic bilirubin UDP-glucuronyl transferase. *Biochem Biophys Acta* 1973 ; 327 : 36-45.
 17. Cooper MJ, Williamson RCM. The action of salicylates on bile flow in man. *Br J Clin Pharmacol* 1983 ; 16 : 570-572.
 18. Beck WS, Dietzel K, Geisslinger G, Engler H, Vergin H, Brune K. Effect of sodium salicylate elimination kinetics of indomethacin and bile production in dogs. *Drug Metabolism and Disposition* 1990 ; 18 : 962-967.
 19. Levy G, Ashley JA. Effect of inhibition of glucuronide formation on elimination kinetics of diphenyl-hydantoin in rats. *J Pharm Sci* 1973 ; 62 : 161-162.
 20. 上裕俊法. 胆汁中ビリルビン分画に影響を及ぼす因子について: 特に UDPGA 供給状態からみた胆汁中ビリルビン分画の変化. *近畿大医誌* 1991 ; 16 : 179-189.
 21. Kamisako T, Adachi Y, and Yamamoto T. Effect of UDP-glucuronic acid depletion by salicylamide on biliary bilirubin excretion in the rat. *J Pharm Exp Ther* 1990 ; 254 : 380-382.
 22. Howell SR, Hazelton GA, Klassen CD. Depletion of hepatic UDP-glucuronic acid by drugs that are glucuronidated. *J Pharm Exp Ther* 1986 ; 236 : 61-64.
 23. Sigrid CB. The effect of sodium salicylate on bile secretion in the dog. *J Physiol* 1975 ; 245 : 549-565.
 24. Levy G, Prockmal JA. Drug biotransformation interactions in Man I. Mutual inhibition in glucuronide formation of salicylic acid and salicylamide in man. *J Pharm Sci* 1968 ; 57 : 1330-1350.
 25. Shibasaki J, Konishi R, Takemura M. Comparison of the first-pass metabolism of ethenzamide and salicylamide in rats. *J Pharm Dyn* 1984 ; 7 : 804-810.
 26. Usui R, Ise H, Kitayama O, Moriyasu A, Abe Y, Matsuno S. Bilirubin conjugation and biliary bilirubin excretion after intravenous bilirubin injection in dogs. *Tohoku J Exp Med* 1991 ; 165 : 67-77.
 27. Witzleben CL. Bilirubin as a cholestatic agent. *Am J Pathol* 1971 ; 62 : 181-187.
 28. Veel T, Villanger O, Holthe MR. Intravenous bilirubin infusion causes vacuolization of the cytoplasm of hepatocytes and canalicular cholestasis. *Acta Physiol Scand* 1991 ; 143 : 421-429.
 29. Adachi Y, Yamashita M, Nanno T, Yamamoto T. Proportion of conjugated bilirubin in bile in relation to hepatic bilirubin UDP-glucuronyl-transferase activity. *Clin Biochem* 1990 ; 23 : 131-134.