

回腸バイパス術後の胆石発生に関する実験的研究

第1編：イヌの胆汁脂質におよぼす回腸 バイパス術の影響

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

小林 展 章

〔原稿受付：昭和54年9月10日〕

Experimental Studies on Gallstone Formation after Partial Ileal Bypass Operation

(I) Effects of Partial Ileal Bypass on Biliary Lipids in Dogs

NOBUAKI KOBAYASHI

Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director : Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

In the view point of gallstone formation, effects of partial ileal bypass operation on biliary cholesterol, phospholipids and bile acids concentration in gallbladder bile and hepatic bile were examined in dogs, and the following results were obtained.

1) No gallstone was found all in 13 dogs followed up for 8 months after the partial ileal bypass operation.

2) Total bile acids concentration in the bile decreased markedly but cholesterol and phospholipids showed no significant change.

3) Molar ratio of bile acids decreased after the partial ileal bypass operation but those of cholesterol and phospholipids increased.

4) Although the ratio of bile acids plus phospholipids to cholesterol decreased, the bile composition still remained in the micellar zone according to Holzbach in the triangular coordinates by Admirand and Small.

5) Among bile acids, the concentration of cholic acid and deoxycholic acid decreased, but chenodeoxycholic acid showed no significant change.

6) The percentage of chenodeoxycholic acid in total bile acids increased but those of

Key words : Partial ileal bypass, Enterohepatic circulation, Biliary lipids, Bile acid, Gallstone formation.

索引語：回腸バイパス，腸肝循環，胆汁脂質，胆汁酸，胆石発生。

Present address : Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

cholic acid and deoxycholic acid remained unchanged.

7) Linear correlation was found not only between bile acids and cholesterol concentration, but also between bile acids and phospholipids concentration in hepatic bile, in both control and partial ileal bypassed dogs. And the secretion of cholesterol and phospholipids per one mole of bile acids after the partial ileal bypass operation increased than before the operation.

8) It was concluded that the partial ileal bypass operation increased lithogenic index of bile, but actually no gallstone was formed in dogs.

結 言

回腸切除後や回腸炎の合併症として、胆石の発生頻度の高いことが注目されている⁴⁾¹¹⁾²⁵⁾²⁹⁾³⁴⁾。その原因の一つとして胆汁酸の吸収障害にもとづく胆汁脂質組成の変化があげられている⁴⁾¹¹⁾²⁵⁾²⁹⁾³⁴⁾。また、高コレステロール血症患者に対して、その外科治療の目的で施行される、小腸の遠位3分の1を迂回させる Partial ileal bypass 術⁶⁾後にも、同様に胆汁酸の腸肝循環の障害から、コレステロール胆石発生の可能性が推測されている⁹⁾。しかし、一方では、Partial ileal bypass 術を受けた101例の高コレステロール血症患者の中、術後10年間の経過観察中、胆石発生をみたのはわずかに1例に過ぎないとの報告もある⁹⁾。この頻度は胆石の自然発生頻度⁴⁾²⁵⁾²⁹⁾³⁴⁾よりはるかに少い。しかるに、これを解明するための、Partial ileal bypass 術後の胆汁脂質の変化については臨床的、実験的検索はなされていない⁹⁾¹⁰⁾⁴³⁾。

そこで著者は、実験的にイヌに Partial ileal bypass 術を施行し、それが胆石の発生および胆汁脂質の組成におよぼす影響について検討した。

実験材料並びに方法

試獣として、体重9~14kgの雑種成犬を用いた。搬入時、薬液槽(バコマ[®]1000倍液、エーザイ株式会社、東京)で15分間水浴消毒し、ステンレス製箕子底の個別犬舎に収容した。飼料はドッグフード(ラブリ[®]、オリエンタル酵母工業株式会社、東京)を用い、1日300gを投与し、飲料水はノズルよりの自然給水とした。搬入後1週間以上経過をみて、下痢、体重の変化および呼吸器障害のないもの、食餌摂取良好のもの、など異常のないイヌを実験に供した。

合計13頭のイヌに Partial ileal bypass 術を行い、術後の体重変化、便の性状を観察した。その中7頭を、開腹術そのものの影響が消失して胆汁分泌が安定しだす時期⁵³⁾と思われる術後3週目に、4頭を術後3ヶ月目に、2頭を術後8ヶ月目に夫々再開腹し、胆石発生の有無、腹腔内臓器の肉眼的観察を行い、同時に胆汁を採取してその脂質を分析した(なお術後8ヶ月間観察したイヌについては胆石発生の有無だけを調べた)。

(1) Partial ileal bypass 術の手術手技

16~18時間絶食後、ネンブタール[®](Pentobarbital sodium, アボットラボラトリーズ, USA) 25mg/kg体重の静脈麻酔下に正中切開で開腹し、胆嚢、腸管に異常のないことを確かめた上、小腸の全長(Treitz 靱帯から回盲弁まで)を腸間膜附着部で計測し、その遠位3分の1の部位で小腸を切断し、近位断端を回盲弁のやや肛門側の大腸に端側吻合した。遠位断端は閉鎖の上、盲腸に固定した⁹⁾(Fig. 1)。

(2) 胆汁採取

(i) 胆嚢胆汁の第1回目の採取は、バイパス術のために開腹した際、手術操作に先立ち、滅菌注射筒による胆嚢穿刺で採取し、これを術前の試料とした。穿刺孔は細い絹糸(4号)で結紮閉鎖した。第2回目の採取は、術後3週目あるいは術後3ヶ月目に、16~18時間絶食後、ネンブタール[®] 25mg/kg体重の静脈麻酔下に開腹し、滅菌注射筒で、前回同様胆嚢穿刺にて採取した。再三の開腹術および胆嚢穿刺による胆嚢への影響を最少限にするため、同一犬に対する開腹術および胆嚢穿刺は、バイパス術時と、術後3週目かあるいは術後3ヶ月目かの2回にとどめた。胆嚢胆汁の脂質成分について測定し、同一犬の術前値と術後値を比較、検討した。術後3週目に再開腹した7頭を第1群

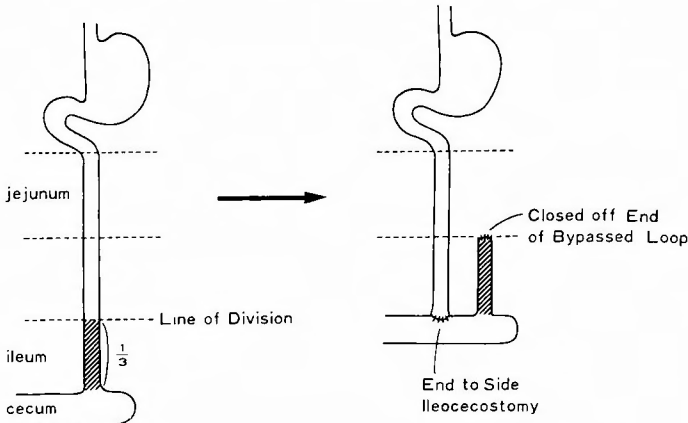


Fig. 1. Diagram of partial ileal bypass operation.

(G-I), 術後3ヶ月目に再開腹した4頭を第2群 (G-II) とした。

(ii) 肝胆汁の採取は、総胆管にカニューレションし外胆汁瘻造設の上施行した。即ちバイパス術後3週目あるいは3ヶ月目に開腹し、胆嚢胆汁を採取した後胆嚢管を結紮し、十二指腸上部で総胆管を切開し、外径1.9mm 内径1.4mm のポリエチレンチューブ (Intra-medical[®] PE200, Clay Adams, USA) を肝臓側へ約1.5cm 挿入し結紮固定した。チューブの遠位端を腹腔外に出し、閉腹して完全外胆汁瘻とした。体外チューブの先端を、仰臥位としたイヌの脊椎の高さにおき、自然滴下で、最初の1滴が滴下し始めるのを俟って肝胆汁を経時的に分割採取した。一方、非手術対照犬に対しても、同様の操作を行い肝胆汁を採取し、対照とした。得られた肝胆汁の脂質を測定し、非手術犬と手術犬とのそれを比較、検討した。

分析まで各胆汁試料は、密栓して、 -20°C に冷凍保存した。

(3) 胆汁中脂質の分析

(i) 胆汁中脂質成分の胆汁からの抽出

胆汁中脂質の分析は、胆汁酸、コレステロール、リン脂質について行った。冷凍庫に保存した胆汁試料を室温で融解し、十分攪拌した後正確にその1ml をとり、約20倍量のエタノール (肝胆汁では10倍量) を加えて約5分間煮沸した。室温冷却後エタノールを加えて正確に20ml (肝胆汁では10ml) とし、濾紙 (Toyo 濾紙, No. 2) にて濾過した。この操作で除蛋白と脂質の抽出が行われ得る³²⁾。このエタノール抽出液を

正確に1ml とり、温浴上で窒素ガスの気流下に乾固した後、5% (1.25N) 苛性ソーダ溶液2ml を加え、オートクレーブ (Automatic high speed autoclave, Model S-90V, Tomy Seiko Co. Ltd. Tokyo) を使って、 120°C (15 psi) 下に6時間、加水分解した。

アルカリ性水溶液を30ml のエチルエーテルで2回抽出して中性画分としコレステロールの測定に供した。

水層は、2N塩酸 約1.7ml を加えてpH 1~2とし、30ml のエチルエーテルで2回抽出した。2回の抽出液を合わせ、少量の蒸留水 (約5ml) で2回洗滌し、少量の無水硫酸ソーダ (約1g) で脱水して、胆汁酸の測定に供した。

なお抽出は100ml 容の分液ロートをを用い、振盪にはアジテーター (Agitation Shaker, Mitamura Riken, Osaka, Tokyo) を用いて毎回15分間振盪した。

(ii) 胆汁酸のガスクロマトグラフィーによる定量

酸性画分は蒸発乾固した後、少量のメタノールに溶解し、新たに調製したジアゾメタンを加えて、胆汁酸のメチル化を行った。ジアゾメタンの作製は、エチルエーテル50ml 中にニトロソメチルウレアの粉末1.5g を入れ、50% 苛性カリを滴下して発生するジアゾメタンガスを氷水につけたエチルエーテルを少量入れたコルベンに捕集し、液化させた。メチル化は、添加したジアゾメタンの黄色が少くとも15分間は持続するまでジアゾメタンを追加し、反応の完了を期した。メチル化完了後、窒素ガスの気流下に乾固し、無水トリフルオロ酢酸 約0.4ml を加えて60分以上放置し、窒素ガス

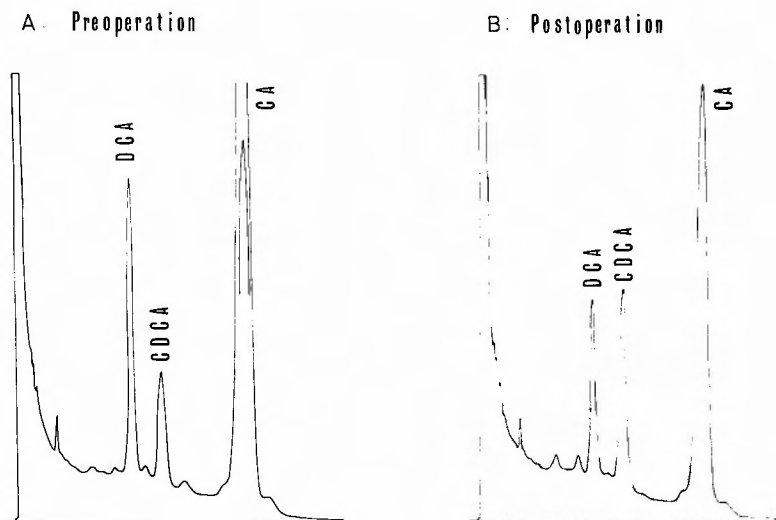


Fig. 2. Comparisons of gas-liquid chromatograms of biliary bile acids in dogs before (A) and after (B) partial ileal bypass operation. DCA : deoxycholic acid, CDCA : chenodeoxycholic acid, CA : cholic acid.

の気流下に乾固した。

試料はアセトンに溶解し、ガスクロマトグラフ（島津製作所、Model 4BMPF）によって分析した。なおカラムには3% QF-1 充填カラム（100-200 mesh, Chromosorb W, 1.5m×4mm）を用いた。カラム温度は235°C、検出器温度は300°C、キャリアガスには窒素（流速 55~60ml/min）を用いた。

標準胆汁酸（Sigma Chemical Company, St. Louis, USA）を使った基礎実験で、各胆汁酸のピーク高と用量とは直線的関係にある⁵⁹⁾ことから各胆汁酸量を定量した。

正常イヌ胆嚢胆汁中胆汁酸のガスクロマトグラムはFig. 2の如くで、主な胆汁酸はデオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、コール酸であり、術後も同様であったので、この3者の合計から総胆汁酸量を求めた。

(iii) コレステロールの定量

コレステロールの定量は塩化第二鉄法²⁷⁾⁽⁵⁸⁾⁽⁶³⁾で行った。先の(i)の操作で得られたアルカリ水解液のエチルエーテル抽出液を窒素ガスの気流下に乾固した後、塩化第二鉄酢酸溶液（10.8gの塩化第二鉄結晶を1ℓの血清コレステロール測定用水酢酸（関東化学）に溶解したものを保存液とし、これをさらに同水酢酸で10倍に希釈して使用）4ml、超特級硫酸（Ultrapure sulfuric acid, 関東化学）2mlを重層させ、瞬時に振

盪して充分攪拌し、正確に30分後に、分光光度計（日立製作所、Model 200）を用いて、波長560nmで比色定量した。標準としてコレステロール（標準用コレステロール、半井化学）の50μg, 100μg, 150μgをとり、測定の度毎に検量線を作成した。検量線は50~150μgの範囲では常にほぼ原点を通る直線関係を示した。なお空試験としては、塩化第二鉄酢酸溶液4mlと超特級硫酸2mlを混和したものを用いた。

(iv) リン脂質の定量

リン脂質の測定には(i)の操作で得られたエタノール抽出液を用い、湿性灰化法²²⁾⁽⁶²⁾にて定量した。胆汁のエタノール抽出液を0.2mlとり、窒素ガスの気流下に乾固した後、60%過塩素酸2mlを加えて砂浴（約300°C）上にて、試料が黒変、次いで透明になるまで約30分間加熱した。室温下に放置して冷却させた後、30%過酸化水素2滴を加え、再び砂浴上で黄変、次いで透明となるまで約20分間加熱した。室温まで冷却後、蒸留水を加えて9mlとし、2.5%モリブデン酸アンモニウム5ml、さらにメトール試薬1mlを加えて発色させ、60分間放置後、分光光度計により波長750nmで比色定量した。標準としては、第一磷酸カリ溶液（第一磷酸カリ結晶0.432gを蒸留水100mlに溶解した保存液を、蒸留水で100倍に希釈して使用した。無機リンとして10μg/ml含まれることになる）の1~5ml

(各10~50 μ g)をとり、60%過塩素酸2mlを加えた後さらに蒸留水を加えて9mlとし、試料と同様の発色操作を行った。なお検量線は測定の度毎に作成したが、10~50 μ gの範囲では原点を通る直線関係が常に得られた。空試験には60%過塩素酸4ml、蒸留水5ml、モリブデン酸アンモニウム5ml、メトール試薬1mlの混合液を用いた。試料中の無機リン量を25倍し、それをもって試料中のリン脂質量とした。

実験成績

(1) 肉眼的変化

Partial ileal bypass 術を施行した全てのイヌに、術直後から水様ないし泥状の下痢便がみられたが、3週目ごろからはほぼ固型便となった。術後全てのイヌの体重は減少し、2~3週目には平均、術前体重の81%まで低下したが、それ以後は次第に回復し、3ヶ月目には平均、術前体重の90%となった。

手術を施行した13頭全てにおいて、即ち術後3週目

の7頭、3ヶ月目の4頭、8ヶ月目の2頭において何れもその再開腹時には、胆石はみられなかった。また再開腹時、ごく軽度の腸管癒着以外には胆嚢壁、胆嚢の大きさ、腸管壁、採取胆汁には肉眼的な異常所見は認められなかった。また曠置した回腸は術前よりも細く、萎縮していたので、回盲弁より腸内容の口側への逆流はなかったものと思われる。

(2) 胆汁中脂質の成分変化

(i) 胆嚢胆汁

Partial ileal bypass 術後の胆嚢胆汁中の脂質の成分変化は Table 1 に示す通りである。総胆汁酸濃度は術後3週目に、術前に比べ、31%減少し、3ヶ月後でもなお引続き減少していた。コレステロール濃度は術後に有意な変化を示さず、リン脂質濃度は術後3ヶ月目に18%の増加を示した。

これら3つ脂質の相対比(Molar ratio)では、総胆汁酸が術後3週目に81.5%から75.5%と著明に減少し、3ヶ月目もなお76.1%に減少したままであった。これ

Table 1. Changes of lipids concentration and molar ratio in gallbladder bile after partial ileal bypass operation in dogs.

		Before operation		Three weeks after operation		Three months after operation	
		Concentration (μ mol/ml)	Molar ratio (%)	Concentration (μ mol/ml)	Molar ratio (%)	Concentration (μ mol/ml)	Molar ratio (%)
Cholesterol	G-I	3.27 \pm 0.50 ^{a)}	0.91 \pm 0.13	3.93 \pm 0.84	1.53 \pm 0.41 ^{b)}		
	G-II	2.86 \pm 0.47	0.82 \pm 0.14			3.88 \pm 1.13	1.30 \pm 0.42
Total bile acids	G-I	293.3 \pm 49.4	81.5 \pm 2.9	202.4 \pm 43.6 ^{b)}	75.5 \pm 3.1		
	G-II	289.7 \pm 34.8	82.6 \pm 2.1			229.7 \pm 18.4	76.1 \pm 2.1 ^{b)}
Phospholipids	G-I	62.8 \pm 12.7	17.6 \pm 2.9	62.3 \pm 21.8	22.8 \pm 3.5		
	G-II	57.7 \pm 3.0	16.6 \pm 2.0			67.9 \pm 3.8 ^{b)}	22.6 \pm 1.8 ^{b)}
BA + PL Ch	G-I	109.8 \pm 15.4		69.5 \pm 19.4 ^{b)}			
	G-II	123.6 \pm 22.8				83.1 \pm 27.9	
BA Ch	G-I	90.3 \pm 12.7		53.0 \pm 13.0 ^{b)}			
	G-II	103.2 \pm 20.6				64.5 \pm 22.5	
PL Ch	G-I	19.5 \pm 4.3		16.5 \pm 6.6			
	G-II	20.5 \pm 2.8				18.6 \pm 5.5	

G-I : sampled before and 3 weeks after operation (n=7).

G-II : sampled before and 3 months after operation (n=4).

BA : total bile acids, PL : phospholipids, Ch : cholesterol.

a) : Mean \pm SD

b) : Statistically significant (p < 0.05) against before operation.

に対してコレステロールは術後3週目に1.68倍に、3ヶ月目に1.59倍と増加し、リン脂質も術後3週目1.30倍、3ヶ月目に1.36倍に増加していた。

一方、胆汁の脂質組成の変化をコレステロール胆石の易形成性(Lithogenicity)という点からみると、(胆汁酸+リン脂質)/コレステロール比³³⁾は術後3週目に、術前の109.8から69.5と約3分の2に減少し、この減少は3ヶ月後でもなお持続していた。しかし、

Issakson³³⁾のいう臨界値11よりはなおはるかに高い値であった。脂質の Binary ratio¹²⁾ すなわち、胆汁酸/コレステロール比では術後3週目に40%の減少を示し、3ヶ月目でも同様に40%減少したままであった。リン脂質/コレステロール比では術後変化はみられなかった。さらに Admirand and Small²⁾の三角座標にプロットして表わしてみると Fig. 3 に示す如く、術後は右方ないしやや上方に移動しているが、Holzbach³¹⁾

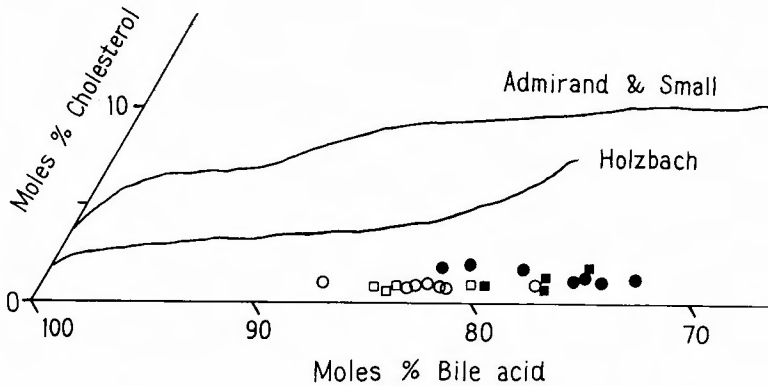


Fig. 3. The lipids composition of gallbladder bile, expressed by triangular coordinates, from pre- and postoperative dogs. Boundaries of micellar zone are followed from Admirand and Small²⁾, and Holzbach³¹⁾.

- : Before operation (G-I) □ : Before operation (G-II),
- : 3 weeks after operation (G-I),
- : 3 months after operation (G-II).

Table 2. Changes of bile acids concentration and percentage in total bile acids in gallbladder bile after partial ileal bypass operation in dogs.

		Before operation		Three weeks after operation		Three months after operation	
		Concentration (μmol/ml)	%	Concentration (μmol/ml)	%	Concentration (μmol/ml)	%
Deoxycholic acid	G-I	57.9 ± 26.0 ^{a)}	20.0 ± 6.9	34.7 ± 21.1 ^{b)}	19.0 ± 10.3		
	G-II	64.0 ± 16.5	22.6 ± 7.2			50.7 ± 18.4 ^{b)}	21.8 ± 6.9
Chenodeoxycholic acid	G-I	12.1 ± 4.5	4.4 ± 2.0	17.7 ± 9.0	9.7 ± 4.5 ^{b)}		
	G-II	18.6 ± 8.8	6.4 ± 2.6			29.1 ± 16.5	12.8 ± 7.8
Cholic acid	G-I	213.1 ± 31.4	75.6 ± 6.2	133.3 ± 38.6 ^{b)}	71.3 ± 6.7		
	G-II	207.1 ± 38.3	71.1 ± 5.9			149.9 ± 8.8	65.4 ± 3.3

G-I : sampled before and 3 weeks after operation (n=7).

G-II : sampled before and 3 months after operation (n=4).

a) : Mean ± SD

b) : Statistically significant (p<0.05) against before operation.

の Saturation line を用いても、常にミセル域にとどまっていた。

次に胆汁酸組成の変化は Table 2 および Fig. 2 に示す通りで、術後3週目にコール酸 (以下 CA) 濃度は37%、デオキシコール酸 (以下 DCA) 濃度が40%減少し、DCA 濃度は3ヶ月後でも21%減少を示して

いた。ケノデオキシコール酸 (以下 CDCA) 濃度は術後有意な変化を示さなかった。各胆汁酸の総胆汁酸中に占める割合は、CDCA のみが術後3週目および3ヶ月目に各々2.2倍、2.0倍に増加したが、CA, DCA の割合は術後変化をみなかった。術後の総胆汁酸量の減少は主に CA 量の減少によるものである。

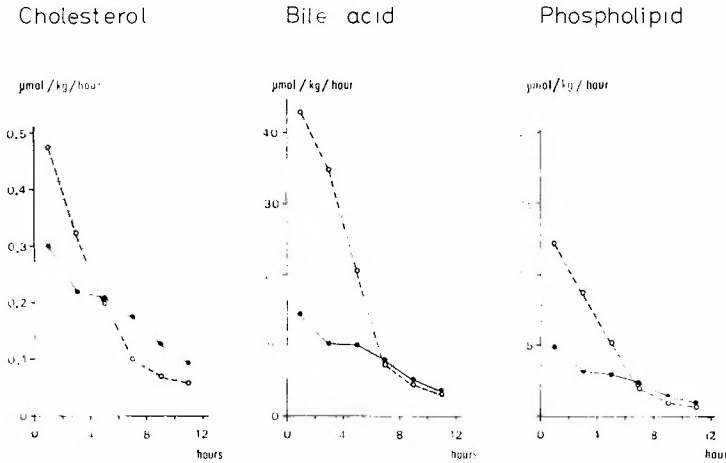


Fig. 4. Changes in biliary lipid secretion after biliary diversion in control and partial ileal bypassed dogs. Each point represents mean of 2 cases. ○-----○ control, ●-----● partial ileal bypassed.

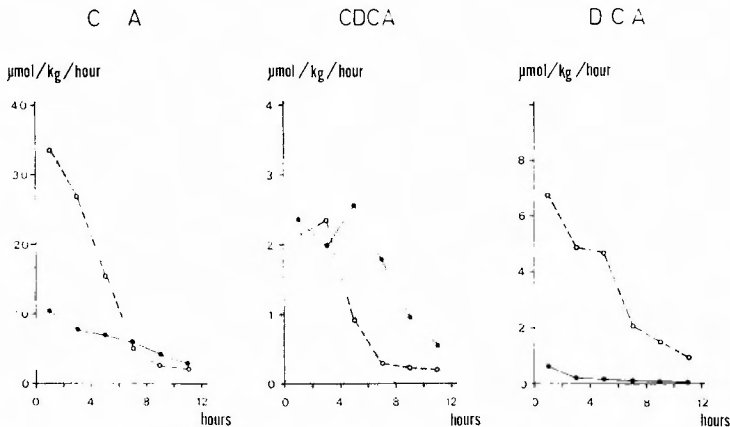


Fig. 5. Changes in biliary bile acid secretion after biliary diversion in control and partial ileal bypassed dogs. Each point represents mean of 2 cases. ○-----○ control, ●-----● partial ileal bypassed.

(ii) 肝胆汁

総胆管にカニューレションして肝胆汁をドレナージし、肝胆汁中へ分泌されるコレステロール、胆汁酸、リン脂質の夫々の分泌速度を2時間毎に経時的に12時間にわたり手術犬、対照犬について観察した。各2頭の平均の値を示すと、Fig. 4, Fig. 5 の如くなる。各脂質の分泌は、ドレナージ後の初期には何れも手術犬では対照犬よりも少ないが、時間経過とともにその差はなくなり、6時間を過ぎると最早手術犬と対照犬と

の間に差がみられなくなる。とくにコレステロール分泌の様相は、手術犬の方が対照犬を上まわるようにさえなった (Fig. 4)。

胆汁酸の分泌についてみると、CA はドレナージ開始直後、手術犬の方が対照犬より少なかったが、6時間を過ぎるところから差がなくなり、むしろ手術犬の方がその後上まわるようになった。CDCA は初期から手術犬においても、対照犬と何ら変らぬ分泌状態を示し、4時間を過ぎるところから明らかに対照犬よりも高

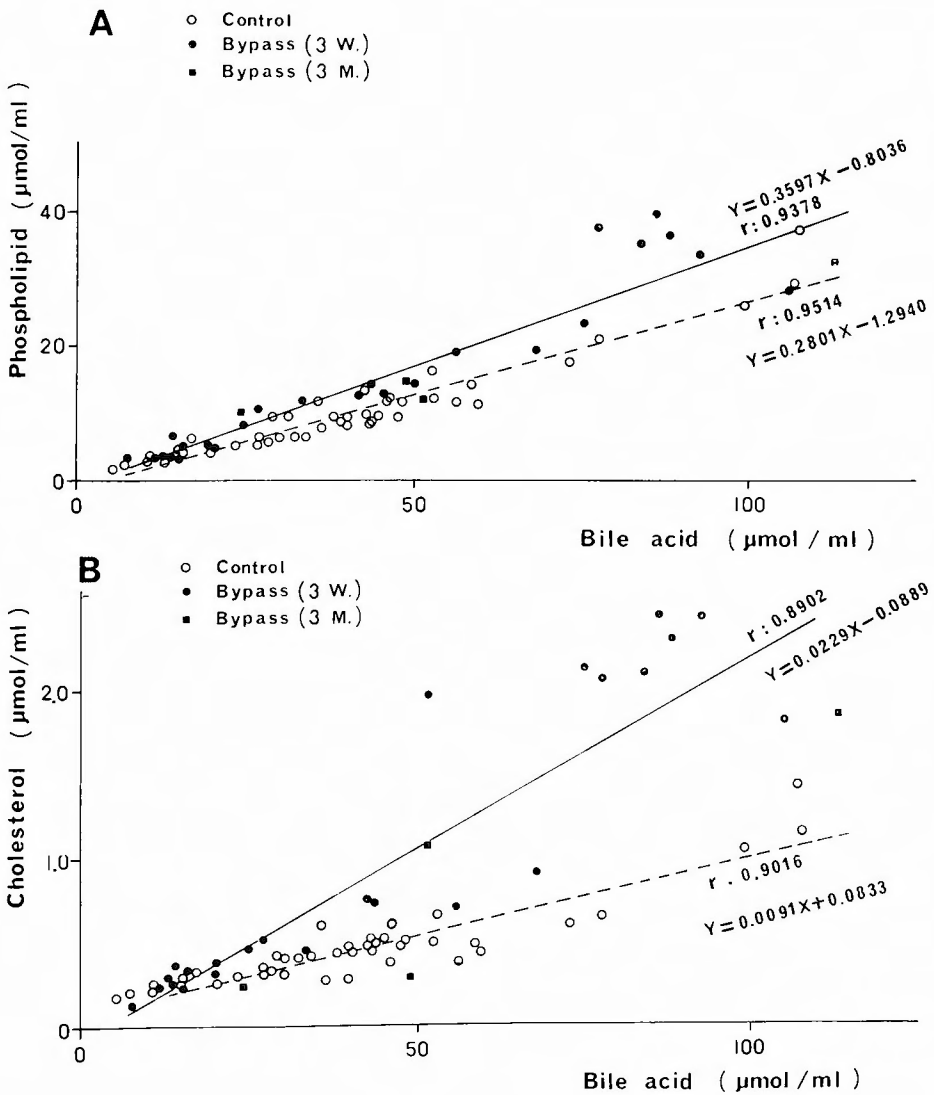


Fig. 6. Correlations between bile acid and phospholipid (A) and bile acid and cholesterol (B) in hepatic bile from control and partial ileal bypassed dogs.

い分泌を示した。DCA 分泌は、ドレナージ開始後から、手術犬の方が低値を示し、時間の経過とともにその分泌を殆んどみなくなった (Fig. 5)。

iii) コレステロール分泌、リン脂質分泌と胆汁酸分泌との相互関係

ドレナージにて得られた各肝胆汁試料中の脂質各成分の相互間の関係をみた (Fig. 6)。

まず、横軸 (X 座標) に胆汁酸のモル濃度を、縦軸 (Y 座標) に同一試料中のリン脂質のモル濃度をとり、各試料についてプロットしたものが Fig. 6-A である。対照犬でリン脂質と胆汁酸との相関をみると、相関係数 $r=0.95$ で有意 ($p<0.01$) の直線的関係 ($Y=0.2801X-1.2940$) を示した。一方手術犬でも $r=0.94$ で有意 ($p<0.01$) の直線的関係 ($Y=0.3597X-0.8036$) を示した。すなわち、リン脂質分泌と胆汁酸分泌の間には、何れもほぼ原点を通る直線的関係が成立し、リン脂質の分泌は胆汁酸分泌に dependent であるといえる。その勾配が対照犬では 0.2801 であるのに対し、手術犬では 0.3597 であることから、単位胆汁酸量とともに分泌されるリン脂質量は術後増加するものと考えるのが妥当であろう。

次に、コレステロール分泌と胆汁酸分泌との関係を見るために、同一試料中の胆汁酸およびコレステロールのモル濃度値を夫々横軸、縦軸にとり、各試料についてプロットしてみたが、その結果は Fig. 6-B の如くなる。両者の関係は、対照犬では相関係数 $r=0.90$ で有意 ($p<0.01$) の直線的関係 ($Y=0.0091X+0.0833$) を示し、手術犬でも $r=0.89$ で有意 ($p<0.01$) の直線的関係 ($Y=0.0229X-0.0889$) を示した。イヌにおけるコレステロール分泌はリン脂質同様胆汁酸分泌に dependent であると考えられ、手術犬では対照犬に比べて 1 モル当りの胆汁酸とともに分泌されるコレステロールの量が増加していることが推察される。

考 按

従来、回腸切除術を施行した患者や、回腸炎の患者では、胆石の合併が自然発生率 (8~12%) にくらべて数倍も高く、24.5~34% のものにみられるとされ、注目されてきた⁴⁾¹¹⁾²⁵⁾²⁹⁾³⁴⁾。回腸切除や回腸炎などの回腸機能障害時の病態の主たる特徴の 1 つは、胆汁酸の吸収障害である。この胆汁酸の腸肝循環の破綻は胆汁脂質組成の変化をもたらす、その変化が胆石発生の原因になるものと一応考えられてきた。

回腸切除後や回腸炎の際の胆汁脂質組成の変化は、

ヒトや動物でかなり検討されており¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁹⁾²⁵⁾³⁴⁾³⁸⁾⁴⁰⁾⁴⁷⁾、それらの成績からみると、胆汁酸プールの減少²⁴⁾、胆汁中胆汁酸の欠乏ないし胆汁酸組成の変化、胆汁脂質組成の変化などが特徴的所見¹⁾¹⁹⁾²⁵⁾³⁸⁾⁴⁰⁾⁴⁷⁾で、回腸切除後の胆石発生の成因を、感染や炎症よりもこのような胆汁の Lithogenicity に求める説が多い¹⁹⁾²³⁾²⁵⁾。その 1 つには、胆汁酸欠乏¹¹⁾³⁴⁾により胆汁中コレステロールが過飽和になること⁴⁾¹⁵⁾、2 つには、胆汁酸組成の変化の中、とくにグリシンおよびタウリン抱合胆汁酸比 (G:T 比) が増加すること¹⁾¹⁹⁾²⁵⁾³⁴⁾、そしてそのために $-SO_3$ 基にもとづく Zeta-potential が低下し、結石を生じやすくなること²⁰⁾⁴⁵⁾⁶¹⁾、3 つには、腸内細菌が影響をつよくうけ、二次胆汁酸が増加すること²⁵⁾³⁴⁾³⁷⁾、によるとすると考え方である。またこの際、罹患期間の長いものほど、胆石の合併率が高いという報告もある⁴⁾²⁵⁾³⁴⁾。

回腸切除後に発生する胆石の種類あるいはその成分についての検索は、胆石発生の原因や機序を解明する上からも大変興味深くかつ大切なことであるが、殆んどなされていない。コレステロール胆石発生の機序については、一般に精製糖分や動物性脂質の大量摂取や線維の不足²⁸⁾⁵⁷⁾などが原因となっており、肝におけるコレステロールの合成の亢進⁴⁴⁾がもたらされ、胆汁中のコレステロール分泌が増加すると共に、胆汁酸分泌は減少し、ひいては胆汁中コレステロールの過飽和状態を来たして、コレステロール胆石の形成されるに至る²⁸⁾⁵⁷⁾ことがあげられている。

他方、回腸機能不全時に発生する胆石は、Silent stone が多い²⁵⁾²⁹⁾とされ、これは胆嚢炎や胆嚢の機能異常によるよりも胆汁組成の変化によるものであることを示唆しているように思われる。Cohen¹¹⁾は 41 例の回腸疾患患者中 14 例に胆石症の合併をみたとし、その中 2 例でその胆石組成を分析し、典型的なコレステロール胆石であったとしている。これは胆汁中のコレステロールの過飽和状態が原因となっていることを示すものである。Pellerin⁴⁶⁾によると、自験の 18 例の小児胆石症の中 4 例までが回腸を含む広範囲小腸切除後に発生したもので、その胆石の種類は、4 例の中 2 例までがコレステロール胆石、あとの 2 例はコレステロール胆石と炭酸カルシウム石であったという。彼はその成因を腸切除による胆汁酸の腸肝循環の障害による胆汁酸欠乏に求めている。さらに Hill²⁹⁾も回腸瘻造設術を行った際、回腸を 10cm 以上切除したものに胆石合併頻度がより高いことを示し、その原因を胆汁酸欠

乏に求めている。

一方、Heaton²⁵⁾らは、回腸切除術をうけた患者を含めて回腸機能不全患者72例中に23例の胆石症の合併例をみたと報告しているが、有石患者の胆嚢造影所見で radio-opaque な結石が57.1%に認められ、自然発生石の場合の約20%⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵²⁾よりも大で、必ずしも radio-lucent なコレステロール石とは限らず、胆汁酸欠乏が胆石発生の必須条件ではないとし、回腸機能不全時に合併する胆石の成因は、自然発生石の成因とは異なるものであろうと述べている。むしろ G/T 比の上昇が必須であり、カルシウム含量の多い胆石ができるとしているのである。さらに彼は結石の分析から、二次胆汁酸であるリトコール酸が胆石形成に関与しているという報告に対し、自験例ではグリシン抱合体が石の中心部に多く、デオキシコール酸は殆んどなかったとしている。

肥満症に対する外科治療の目的で行われる Intestinal bypass 術後も胆汁酸の腸肝循環の障害による影響が大いに起り得てよい。Wise⁶¹⁾によれば、101例の“35cm-10cm-intestinal bypass 術”施行患者の平均29.6ヶ月の追跡調査ではその中の9例に術後胆石症の合併をみたと報告しているが、その際の胆汁組成の変化としては、コレステロールと胆汁酸が減少し、胆汁酸の G/T 比が上昇し、デオキシコール酸が増加していたとし、彼もまたその際の胆石の成因を、G/T 比の上昇による Zeta-potential 低下に負うものとしている。

高コレステロール血症患者に対しては、外科治療として、小腸の遠位3分の1をバイパスさせる Partial ileal bypass 術が行われるが⁶⁾、この手術の意義⁹⁾は食物内容が回腸を通らないように迂回させることで、(1)胆汁酸の再吸収を減少させて肝へ帰る胆汁酸を減少させ、コレステロールから胆汁酸への異化を促進させることでコレステロールの減少を計ること、(2)コレステロールの吸収面積を減少させて直接コレステロールプールの減少を計ることにある。この結果、血清コレステロール値を約40%下げる継続的な効果もたらされるわけであるが、その効果は回腸切除術よりは回腸バイパス術の方が勝っているという。しかしその理由は不明とされている⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾。この場合にも回腸切除術後や回腸炎の場合と同様に、胆汁酸の腸肝循環の障害⁸⁾から、コレステロール胆石発生の可能性が大いに推測される⁹⁾。Buchwald⁹⁾によれば、本術式を101例の高コレステロール血症患者に施行し、最高10年間の経過観

察期間中、わずか1例に胆石(種類不明)を生じたに過ぎない。この頻度は胆石の自然発生率(8~12%)⁴⁾²⁵⁾²⁹⁾³⁴⁾よりもはるかに低い。しかも Partial ileal bypass 術施行後の胆汁脂質に関する臨床的、実験的検査は未だ今日まで充分にはなされていない⁹⁾¹⁰⁾⁴³⁾。そこで著者は果して Partial ileal bypass が胆石発生の素地を生むか否かを検討する目的で、イヌに Partial ileal bypass 術を施行し、胆汁脂質組成におよぼす影響を検討した。

胆嚢胆汁中の脂質組成の術後の変化は Table 1 に示す如くで胆汁酸濃度の減少が特徴的であり、Fig. 4 の washout 時の胆汁酸分泌曲線から胆汁酸プールの減少していることが考えられる¹³⁾¹⁸⁾。その中でも Table 2 に示す如く、CA の減少が著明であった。これは胆汁酸の Active transport site を有し、CA の主たる吸収部位である回腸²¹⁾³⁶⁾⁴⁷⁾を迂回することに負うところが大きく、上部小腸³⁾⁴⁰⁾⁵⁵⁾や大腸⁴¹⁾⁴²⁾⁴⁹⁾での CA の吸収は効果的でなく、肝での合成亢進¹³⁾¹⁸⁾⁵³⁾でも代償しきれなくなるためと思われる。大腸に入った CA は腸内細菌の影響を受け、二次胆汁酸の DCA となってその1部が吸収されるが、術後初期には下痢による腸内滞在時間の短縮、後には胆汁中へ分泌される CA の減少から、腸内で二次胆汁酸となって再び胆汁中へ分泌される DCA も減少するものと思われる。しかし、イヌの場合には CA、DCA の総胆汁酸中に占める割合が大きいこともあって、両者の総胆汁酸中での比率は術後も変らない。一方、CDCA についてみると、術後も胆汁中のそれは減少することなく、むしろ総胆汁酸中に占めるその割合は有意に増加していた。CDCA が CA に比べ、上部小腸からもよく吸収されること³⁾⁴⁰⁾⁵⁵⁾ことや、肝における合成亢進¹³⁾¹⁸⁾⁵³⁾による結果と思われる。

胆汁中へのコレステロール分泌やリン脂質の分泌は、胆汁酸分泌と直線的な相関関係を有することを観察したが(Fig. 6)、これは麻酔犬⁴⁸⁾、無麻酔犬⁵⁴⁾、およびイヌの灌流肝³⁰⁾を用いた実験でも同様に認められている。イヌのコレステロール分泌は胆汁酸分泌に非依存性の部分を有するとの成績⁴⁸⁾⁵⁴⁾もあるが、今回の実験では、両者の関係はほぼ原点を通る直線で表わされ(Fig. 6-B)、コレステロール分泌は胆汁酸に依存的であった。リン脂質の分泌は胆汁酸分泌に依存的で(Fig. 6-A)、諸家の成績³⁰⁾⁴⁸⁾⁵⁴⁾と同じである。Partial ileal bypass 術施行犬では非手術犬に比べて、1モルあたりの胆汁酸とともに分泌されるコレステロールお

よびリン脂質の量が増加していることが観察されたが、この変化は灌流肝を用いた Hoffman らの実験³⁰⁾や、麻酔犬における Poupon らの実験⁴⁸⁾において、CA を投与した時に比べ、CDCA を投与した際に、1モルの胆汁酸とともに分泌されるコレステロールおよびリン脂質の量が多いという成績とよく似ている。今回の手術犬におけるコレステロールおよびリン脂質の分泌増加の理由は明らかではないが、1つには総胆汁酸中の CDCA の占める比率が増加したことによるかもしれない。

以上の結果、Partial ileal bypass 術後の胆汁組成は、胆汁酸が減少し、その結果コレステロール、リン脂質の相対的増加となった。この変化は、回腸切除を受けたヒトの胆汁組成の変化¹⁵⁾と極めてよく似ている。胆汁の易胆石形成性を示す指標としての(胆汁酸+リン脂質)/コレステロール比³³⁾の値は術後減少し、胆石が生じやすい傾向になるものとはいえるが、物理化学的にコレステロールを沈澱させるにたる臨界値11という値³³⁾よりはるかに大きく、また胆汁脂質組成は三角座標²⁾で表わしたミセル域²⁾³¹⁾にとどまっており、実際にも胆石発生は全く認められなかった。胆汁酸の G/T 比の変化については、イヌの抱合胆汁酸にはタウリン抱合体しかなく²⁶⁾、今回の胆汁酸測定では、遊離型にしてしか測定できないガスクロマトグラフィーを用いたこともあり、この点については検索できなかった。

以上のイヌにおける成績から Partial ileal bypass は、胆汁脂質組成に対し回腸切除の場合とほぼ同様の変化をもたらす、コレステロール胆石を生じやすい素地を生むようになるものと思われるが、実際には Partial ileal bypass 術後のイヌに胆石発生は認められなかった。イヌは、その胆嚢中に入れたヒトのコレステロール胆石を溶解するほど³⁴⁾、胆汁中のコレステロール濃度が低く、コレステロール胆石の自然発生は極めて稀とされている³⁹⁾。胆汁酸組成はヒトのそれと比較的似てはいるが⁶⁰⁾、グリシン抱合体をもたない²⁶⁾、さらにイヌでは胆石形成食負荷にても肉眼的コレステロール胆石の形成をみるに至らないこと¹⁶⁾¹⁷⁾、迷走神経切断で胆汁組成は易胆石形成性に傾くが、この際にもコレステロール胆石発生はみられないこと³⁵⁾、などからも実験的胆石の形成は困難である。Partial ileal bypass はイヌの胆汁をコレステロール胆石の形成にいたるまで十分に lithogenic ならしめ得ないようである。従って、さらにヒトに近い胆汁脂質

組成をもち⁵⁾⁶⁰⁾、食餌性にも容易に胆石を形成する⁵⁶⁾ような試獣、例えばゴールデンハムスターのような動物を用いての検討をさらに要するようになる。

結 語

Partial ileal bypass 術は胆石を発生させるか否か、コレステロール胆石易形成性を高めるか否かを明らかにする目的で、イヌを用いて Partial ileal bypass 術を施行し、胆石発生と胆汁中脂質組成の変化について検討し、以下の結論を得た。

(1) 術後8ヶ月まで追跡した2頭を含めて13頭の Partial ileal bypass 術を施行したイヌに、術後胆石の発生は全く認められなかった。

(2) 胆汁中の胆汁酸濃度の減少が著明で、その結果として、相対的(Molar ratio)にコレステロールとリン脂質が増加し、胆汁酸が減少した。

(3) 胆石形成の指標の1つである(胆汁酸+リン脂質)/コレステロール比は減少したが、Admirand and Small の三角座標にプロットすると、Holzbach らにより修正を加えられた境界線を用いても、ミセル域にとどまっていた。

(4) 胆汁酸組成の変化として、コール酸、デオキシコール酸の濃度が減少し、ケノデオキシコール酸の比率が増加した。

(5) 胆汁中へのコレステロールおよびリン脂質の分泌は、胆汁酸の分泌と直線的な相関関係を有し、単位モルあたりの胆汁酸とともに分泌するコレステロールおよびリン脂質の量は、術後、術前のそれを上まわっていたが、このことは術後に胆汁酸組成中のケノデオキシコール酸の比率が増加したと関係があると思われる。

(6) 以上のイヌにおける実験で、イヌの胆汁中のコレステロールの濃度がヒトのそれよりも低く、イヌでは胆石の自然発生は極めて稀であることなどから、Partial ileal bypass 術は、イヌの胆汁中の Lithogenic index を高めたが、胆石形成にたるに十分なまでに lithogenic になしえないものと思われる。従って、さらにヒトのそれに近い胆汁脂質組成をもった試獣、例えばゴールデンハムスター、を用いての検討をさらに要するようになる。

本論文の要旨は、第18回(伊勢, 1976)および第19回(奈良, 1977)日本消化器病学会秋季大会、および VI World Congress of Gastroenterology (Madrid, 1978)において発表した。

稿を終るにあたり、終始御指導頂き、且つ御校閲を頂いた恩師日笠頼則教授、並びに御指導頂いた室家大久博士、谷村弘博士に深く感謝の意を表す。

文 献

- 1) Abaurre R, Stuart GG, et al : Fasting bile salt pool size and composition after ileal resection. *Gastroent* **57** : 679-688, 1969.
- 2) Admirand WH, Small DM : The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* **47** : 1043-1052, 1968.
- 3) Angelin B, Einarsson K, et al : Evidence for the absorption of bile acids in the proximal small intestine of normo- and hyperlipidemic subjects. *Gut* **17** : 420-425, 1976.
- 4) Baker AL, Kaplan MM : Gallstones in inflammatory bowel disease. *Digestive Disease* **19** : 109-112, 1974.
- 5) Behr WT, Casazza KK, et al : Effects of accumulated tissue cholesterol on bile acid metabolism in hypophysectomized rats and hamsters. *Atherosclerosis* **12** : 383-392, 1970.
- 6) Buchwald H : A surgical operation to lower circulating cholesterol. *Circulation* **28** : 649, 1963.
- 7) Buchwald H : Lowering of cholesterol absorption and blood levels by ileal exclusion : Experimental basis and preliminary clinical report. *Circulation* **29** : 713-720, 1964.
- 8) Buchwald H, Gebhard RL : Localization of bile salt absorption in vivo in the rabbit. *Ann Surg* **167** : 191-198, 1968.
- 9) Buchwald H, Moore RB, et al : Surgical treatment of hypercholesterolemia. *Circulation* **45** : Suppl. 1-37, 1974.
- 10) Buchwald H, Varco RL : Partial ileal bypass for hyperlipidemia management : past, present and future. *In* *Metabolic surgery*, edited by Buchwald H, Varco RL, New York, San Francisco, London, Crune and Stratton Press, 1978, p. 85.
- 11) Cohen S, Kaplan M : Liver disease and gallstone in regional enteritis. *Gastroent* **60** : 237-245, 1971.
- 12) Dam H, Kruse I, et al : Studies on human bile ; I. Composition of bladder bile from cholelithiasis patients and surgical patients with normal bile compared with data for bladder bile of hamsters on different diets. *Scand J Clin Lab Invest* **18** : 385-404, 1966.
- 13) Dowling RH, Mack E, et al : Effects of controlled interruption of the enterohepatic circulation of bile salts by biliary diversion and by ileal resection on bile salt secretion, synthesis, and pool size in rhesus monkey. *J Clin Invest* **49** : 232-242, 1970.
- 14) Dowling RH, Mack E, et al : Biliary lipid secretion and bile composition after acute and chronic interruption of the enterohepatic circulation in the rhesus monkey. IV. Primate biliary physiology. *J Clin Invest* **50** : 1917-1926, 1971.
- 15) Dowling RH, Bell GD, et al : Lithogenic bile in patients with ileal dysfunction. *Gut* **13** : 415-420, 1972.
- 16) Englert E Jr, Harmen CG, et al : Gallstones induced by normal foodstuffs in dogs. *Nature* **224** : 280-281, 1969.
- 17) Englert E Jr, Harmen CG, et al : Studies on the pathogenesis of diet induced dog gallstones. *Digestive Disease* **22** : 305-314, 1977.
- 18) Eriksson S : Biliary excretion of bile acids and cholesterol in bile fistula rats. *Proc Sci Exp Biol Med* **94** : 578-582, 1957.
- 19) Garbutt JT, Heaton KW, et al : Increased ratio of glycine- to taurine-conjugated bile salts in patients with ileal disorders. *Gastroent* **56** : 711-720, 1969.
- 20) Gardner B : Studies of the zeta potential of cells and a silica particle in varying concentration of albumin, calcium, sodium, plasma, and bile. *J Lab Clin Med* **73** : 202-209, 1969.
- 21) Glasser JE, Weiner IM, et al : Comparative physiology of intestinal taurocholate transport. *Amer J Physiol* **208** : 359-362, 1965.
- 22) Gomori G : A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J Lab Clin Med* **27** : 955-960, 1942.
- 23) Hardison WGM, Rosenberg IH : Bile salt deficiency in the steatorrhea following resection of ileum and proximal colon. *N Eng J Med* **277** : 337-342, 1967.
- 24) Heaton KW, Austed WI, et al : Enterohepatic circulation of C¹⁴-labelled bile salts in disorders of the distal small bowel. *Gastroent* **55** : 5-16, 1968.
- 25) Heaton KW, Read AE : Gallstones in patients with disorders of the terminal ileum and disturbed bile salts metabolism. *Bri Med J* **3** : 494-496, 1969.
- 26) Heaton KW : Bile salts in health and disease. Edinburgh and London, Longman Group Ltd, 1972.
- 27) Henly AA : The determination of serum cholesterol. *Analyst* **82** : 826-827, 1957.
- 28) Hikasa Y, Matsuda S, et al : Initiating factors of gallstones, especially cholesterol stones. *Arch*

- Jap Chir **33** : 601-616, 1965.
- 29) Hill GL, Main WS J, et al : Gallstones after ileostomy and ileal resection. *Gut* **16** : 932-936, 1975.
- 30) Hoffman AF, Donald DE, et al : Effects of primary bile acids on bile lipid secretion from perfused dog liver. *Amer. J. Physiol.* **229** : 714-720, 1975.
- 31) Holzbach RT, Marsh M, et al : Cholesterol solubility in man, evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest* **52** : 1476-1479, 1973.
- 32) 堀 太郎, 杉田陸海 : 脂質の抽出法, 生化学実験講座 3, 脂質の化学, 日本生化学会編, 東京, 東京化学同人, 1974.
- 33) Issakson B : On the dissolving power of lecithin and bile salts for cholesterol in human bladder bile. *Acta Soc Med Upsalien* **59** : 296-306, 1954.
- 34) Kelly TR, Klein RL : Alteration in gallstone solubility following distal ileal resection. *Arch Surg.* **105** : 352-355, 1972.
- 35) Komaki K : Comparative study on vagotomy procedures in relation to biliary composition. *Arch Jap Chir* **45** : 339-355, 1976.
- 36) Lack L, Weiner IM : In vitro absorption of bile salts by small intestine of rats and guinea pigs. *Amer J Physiol* **200** : 313-317, 1961.
- 37) Low-Beer TS, Pomare EW : Can colonic bacterial metabolites predispose to cholesterol gallstone? *Bri Med J* **1** : 483-440, 1975.
- 38) Marks JW, Conley DR, et al : Gallstone prevalence and biliary lipid composition in inflammatory bowel disease. *Digestive Disease* **22** : 1097-1100, 1977.
- 39) Martensson K : Studies on the etiology of gallstones ; A subtilislike bacilli group as an etiologic factor. *Acta Chir Scand* **84** : Suppl. 1-227, 1941.
- 40) McLeod MB, Wiggins HS : Bile-salts in small intestinal contents after ileal resection and in other malabsorption syndromes. *Lancet* **1** : 873-876, 1968.
- 41) Mekhjian HS, Phillips SF : Perfusion of the canine colon with unconjugated bile acids ; Effect on water electrolyte transport, morphology, and bile acid absorption. *Gastroent.* **59** : 120-129, 1970.
- 42) Mekhjian HS, Phillips SF, et al : Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids : Perfusion studies in man. *J Clin Invest* **50** : 1569-1577, 1971.
- 43) Miettinen TA : Clinical implications of bile acids metabolism in man. *In* The bile acids, chemistry, physiology and metabolism. vol. 2, edited by Nair PP, Kritchevsky D, New-York London, Plenum Press, 1973, p. 191.
- 44) Muroya H : Stimulative effect of dietary glucose on hepatic cholesterol biosynthesis and formation of cholesterol gallstones in hamsters. *Arch Jap Chir* **37** : 76-93, 1968.
- 45) Ostrowitz A, Gardner B : Studies of bile as suspending medium and its relationship to gallstone formation. *Surgery* **68** : 329-333, 1970.
- 46) Pellerin D, Bertin P, et al : Cholelithiasis and ileal pathology in childhood. *J Pediat Surg* **10** : 35-41, 1975.
- 47) Playoust MR, Lack L, et al : Effect of intestinal resection on bile salt absorption in dogs. *Amer. J. Physiol.* **208** : 363-369, 1965.
- 48) Poupon R, Poupon R, et al : Influence of bile acids upon biliary cholesterol and phospholipid secretion in the dog. *Europ J Clin Invest* **6** : 279-286, 1976.
- 49) Samuel P, Saypol GM, et al : Absorption of bile acids from the large bowel in man. *J Clin Invest* **47** : 2070-2078, 1968.
- 50) Shehadi WH : Radiologic examination of the bile tract : Plain film of the abdomen ; Oral cholecystography. *Radiologic Clinics of North America* **4** : 463-482, 1966.
- 51) Sherlock S : Disease of the liver and biliary system. 4th edn. Blackwell Oxford, 1968.
- 52) Sleisenger MH : *In* Cecil and Loeb, Textbook of Medicine, 12th edn. edited by Beeson and McDermott W, Saunders, Philadelphia 1967.
- 53) Small DM, Dowling RD, et al : The enterohepatic circulation of bile salts. *Arch Intern Med* **130** : 552-573, 1972.
- 54) Soloway RD, Powell KM, et al : Interrelationship of bile salts, phospholipids, and cholesterol in bile during manipulation of the enterohepatic circulation in the conscious dog. *Gastroent.* **64** : 1156-1162, 1973.
- 55) Schalm SW, LaRusso NF, et al : Diurnal serum levels of primary conjugated bile acids, assessment by specific radioimmunoassays for conjugates of cholic and chenodeoxycholic acid. *Gut* **19** : 1006-1014, 1978.
- 56) Tanimura H : Experimental studies on the etiology of cholelithiasis. *Arch Jap Chir* **34** : 1160-1180, 1965.
- 57) Tanimura H, Shioda R, et al : Initiating factors in formation of cholesterol gallstones. *Arch Jap Chir* **47** : 427-445, 1978.
- 58) 内田清久, 三宅有 : 去勢ラットの血中脂質に及ぼす諸種ステロイド化合物の影響. 塩野義研究所年報, 第11号, 119-132, 1961.

- 59) Uchida K, Nomura Y, et al : Effects of estradiol, dietary cholesterol and 1-thyroxine on biliary bile acid composition and secretory rate, and on plasma liver and bile cholesterol level in rats. *Endocrinol Jap* **17** : 107-121, 1970.
- 60) 内田清久, 門脇真澄 : 胆汁と胆汁酸の比較生化学, 代謝 **14** 増刊号, 199-210, 1977.
- 61) Wise L, Stein T : The effect of jejunoileal bypass on bile composition and formation of biliary calculi. *Ann Surg* **187** : 57-62, 1978.
- 62) 吉川春寿 : 臨床生化学 (I) 実験編, 東京 : 協同医書出版社, 1955
- 63) Zak B : Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. *Amer J Clin Path* **27** : 583-588, 1957.