

# Ursodeoxycholic acid の薬効薬理試験

—ハムスターに対する ursodeoxycholic acid の胆汁分泌に対する作用—

## 【要 約】

ハムスターにおいて ursodeoxycholic acid (UDCA) 及び chenodeoxycholic acid (CDCA) を持続的に静脈内及び連続的に経口投与した時の胆汁分泌量、胆汁中への脂質及び電解質分泌量について検討した。

UDCA 及び CDCA の持続的な静脈内投与により胆汁分泌量の増加が認められ、その作用は UDCA の方が強かった。胆汁脂質（総胆汁酸、総コレステロール、リン脂質）も同様に増加傾向が認められた。胆汁中  $\text{HCO}_3^-$  分泌量は UDCA により増加したが、CDCA によっては変化しなかった。UDCA 及び CDCA の連続経口投与においては UDCA の高用量適用により胆汁分泌量は低下した。胆汁脂質及び電解質 ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$ ) 分泌量も同様に UDCA の高用量により低下傾向を示した。

以上のことから、UDCA は CDCA とは胆汁分泌機構に対する作用が異なり、また、投与方法により胆汁分泌に対する作用が異なることが示唆された。

## 【緒 言】

コレステロール系胆石の発症メカニズムについてはこれまでに多数報告され、1) 肝におけるコレステロール過飽和胆汁の生成、2) 結晶形成、3) 胆石への発育の3段階が存在することが報告されている。この1)におけるコレステロール混合ミセルの形成時に胆汁中胆汁酸及びリン脂質が密接に関与していると考えられているが、外因性胆汁酸投与における胆汁中の脂質及び電解質分泌に対する報告は少ない。今回、胆石治療薬及び利胆薬として臨床使用されている UDCA 及び CDCA の静脈内持続投与時と連続経口投与時の胆汁分泌量と胆汁中への脂質及び電解質分泌量について検討した。

## 【実験材料及び方法】

### 1. 使用薬物

Ursodeoxycholic acid (以下 UDCA と略す) は、当社にて製剤化予定の原末を大東工場より入手して使用した。chenodeoxycholic acid (以下 CDCA と略す) は Sigma 社製を使用した。静脈内投与の場合は使用薬物を 0.1N-NaOH 溶液で溶解後、希塩酸で pH7.2 ~7.5 に調整して用いた。経口投与の場合は 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム (キシダ化学) 溶液に懸濁して用いた。

### 2. 使用動物

体重 85 g 前後の雄性 Syrian ハムスター (日本エスエルシー) を1週間の予備飼育ののち実験に供した。

### 3. 実験方法

#### 1) 胆汁酸静脈内投与による胆汁分泌に及ぼす作用

動物を pentobarbital (大日本製薬) 40mg/kg、i.p.麻酔下で背位に固定し、正中切開したのち polyethylene tube (SP-10、夏目) を総胆管に挿入固定して胆汁を体外に導い

た。

薬物は大腿静脈にカニューレーションした polyethylene tube (SP-10) を介して、約 3 mL/hr で 2 時間持続投与した。薬物投与前 20 分間の胆汁を採取したのち、生理食塩液を対照として、UDCA (4、20mg/kg/hr) 及び CDCA (20mg/kg/hr) を投与した。流出胆汁は薬物投与 2 時間後まで 20 分毎に採取し、分泌量を重量法で測定したのち、分析用の試料とした。

## 2) 胆汁酸連続経口投与による胆汁分泌に及ぼす作用

UDCA を 0.4、4 及び 20ng/kg/day、CDCA を 0.4mg/kg/day を毎日 1 回、14 日間、午後 5 時に経口投与した。薬物最終投与後 16 時間絶食したのち、1) と同様の手術を行い、流出する胆汁を 3 時間まで 1 時間毎に採取し、分泌量を重量法で測定したのち、分析用の試料とした。

## 3) 胆汁中成分測定法

### (1) 総胆汁酸 (BA)、総コレステロール (TC)、リン脂質 (PL)

BA は胆汁を蒸留水で約 400 倍希釈して、市販キット総胆汁酸-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。TC 及び PL は胆汁を直接、それぞれ市販キット、イアトリポ TC (ヤトロン) 及びイアトロセット PL-E (ヤトロン) を用いて測定した。

### (2) $\text{HCO}_3^-$

$\text{HCO}_3^-$  は電気伝導度検出器 (ICA-3030、東亜電波) を装着した高速液体クロマトグラフ装置 (ICA-3000、東亜電波) で分析した。分離用カラムには PCI-305S (8  $\phi$ ×300mm、東亜電波) を、カラム温度 45°C で使用した。移動相には、6 mM p-トルエンスルホン酸 (キシダ化学) 及び 20mM トリス緩衝液 (pH7.0) を用い、流速は 0.8ml/min で分析した。データ処理には COS86 (日本クロマト工業) を用いた。

### (3) $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$

胆汁中の  $\text{Na}^+$  及び  $\text{K}^+$  は蛍光光度計 MF-303 (日本分光) を、 $\text{Cl}^-$  はクロライドメーター CL-12 (日本分光) を用いて測定した。

## 4. 統計学的処理

測定値は各群の平均値と標準偏差で表示し、有意差検定には Student の t 検定を用いた。

## 【実験結果】

### 1. 胆汁酸静脈内投与による胆汁分泌に対する作用

薬物投与後 2 時間までの 20 分毎における胆汁分泌量を表 1 に示した。

対照群の胆汁分泌量は 80 分後まで 0.16~0.18mL/20 分とほぼ定量であったが、以後低下した。UDCA 群では投与 80 分後から用量依存性の、胆汁分泌量の有意な増加が認められた。また、CDCA 群も同様に投与 100 分後から胆汁分泌量の有意な増加が認められた。

### 2. 胆汁酸静脈内投与による胆汁脂質分泌に対する作用

薬物投与後 2 時間までの 40 分毎における胆汁脂質分泌量を表 2 に示した。

対照群の BA、TC 及び PL 分泌は各々 80 分後まではほぼ一定量を示したが、以後それぞれ約 50% まで低下した。UDCA 低用量群においては投与 0~40 分後において BA 及び PL の有意な分泌量の増加が認められたが、以後は対照群との間に差を認めなかった。UDCA 高用量群においては投与 0~120 分後まで BA、TC 及び PL の分泌量の増加傾向が認められ、80~120 分間の BA 及び TC の分泌量は対照群に比べて有意に増加した。CDCA 群においても UDCA 高用量群と同様に BA、TC 及び PL の分泌増加が認められた。

### 3. 胆汁酸静脈内投与による胆汁中 $\text{HCO}_3^-$ 及び $\text{Cl}^-$ 分泌量に対する作用

薬物投与後 60~120 分後の胆汁  $\text{HCO}_3^-$  及び  $\text{Cl}^-$  分泌量を表 3 に示した。

対照群の胆汁中  $\text{HCO}_3^-$  及び  $\text{Cl}^-$  分泌量は薬物投与前値と変化が認められなかった。UDCA 低用量群においては対照群との間に差が認められなかったが、高用量群では  $\text{HCO}_3^-$  分泌量が有意に増加した。

CDCA 群の  $\text{HCO}_3^-$  及び  $\text{Cl}^-$  排泄量については増加傾向を認めたものの有意ではなかった。

### 4. 胆汁酸連続経口投与による胆汁分泌に対する作用

薬物を 14 日間経口投与したのちの胆汁分泌量を図 1 に示した。

対照群の胆汁分泌量は 3 時間当たり  $1.172 \pm 0.248$  ( $n = 3$ ) mL であった。UDCA 低用量、中用量及び CDCA 群においては対照群とほぼ同量の分泌量が認められ、対照群との間に差は認められなかった。UDCA 高用量群では胆汁分泌量が  $0.650 \pm 0.116$  ( $n = 4$ ) mL と対照群に比べ有意に低下した。

### 5. 胆汁酸連続経口投与による胆汁脂質分泌に対する作用

薬物を 14 日間経口投与したのちの胆汁脂質分泌量を表 4 に示した。

3 時間当たりの胆汁中 BA、TC 及び PL 分泌量については対照群と UDCA 低用量及び中用量群においてはほとんど差を認めなかった。CDCA 群及び UDCA 高用量群のリン脂質を除く、脂質分泌量は各々対照群に比べて低下傾向を示したものの有意な低下ではなかった。UDCA 高用量群のリン脂質分泌量は対照群と比べ有意に低下した。

### 6. 胆汁酸連続経口投与による胆汁電解質分泌に対する作用

薬物を 14 日間経口投与したのちの胆汁電解質分泌量を表 5 に示した。

1 時間当たりの胆汁中  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  及び  $\text{HCO}_3^-$  分泌量については対照群と UDCA 低用量、中用量及び CDCA 群においてはほとんど差を認めなかった。UDCA 高用量群の電解質分泌量はそれぞれ対照群に比べて有意に低下した。

## 【考 察】

ハムスターにおける UDCA の胆汁分泌量、胆汁中への脂質及び電解質分泌に対する作用について CDCA と比較検討した。

UDCA 及び CDCA の持続的な静脈内投与により、胆汁分泌量に著名な増加が認められた。即ち、UDCA、CDCA 20mg/kg/hr の適用で UDCA では対照に比べ約 2 倍、CDCA では約 1.8 倍の増加を示した。胆汁脂質の BA、TC 及び PL 分泌量は UDCA 及び CDCA の持続的な静脈内投与により有意な増加ないし増加傾向が認められた。これらの事実から、胆汁中脂質分泌と胆汁分泌量とは相互に関連しあっていることが示唆されるが、その機構については不明である。胆汁分泌機構は胆汁酸依存性、非依存性や浸透圧利胆、分泌型利胆など色々にわけて考えられている<sup>24)</sup>が、これらの分類も胆汁中  $\text{HCO}_3^-$  濃度の上昇に伴う利胆現象の発見等<sup>4)</sup>により明確な分類が困難となってきた。UDCA 及び CDCA による胆汁分泌は胆汁分泌量の増加に伴って BA 及び TC 分泌量が増加し、さらに UDCA では  $\text{HCO}_3^-$  分泌量も増加した。これらの事実から UDCA と CDCA の胆汁分泌機構は若干異なることが示唆され、CDCA は BA 依存性の、UDCA は BA 及び  $\text{HCO}_3^-$  依存性の胆汁分泌であることが推察される。木谷ら<sup>5)</sup>はラットに UDCA を持続的に静脈内投与し、注入 1 時間後までは胆汁中 BA 排泄量に依存して胆汁分泌量が増加し、その後は BA と  $\text{HCO}_3^-$  排泄量の合計が胆汁分泌量とよく相関することを報告しており、著者らの実験結果とほぼ一致した。胆汁中電解質のうち  $\text{HCO}_3^-$  分泌は UDCA の高用量投与により増加したが、CACD では変化が認められなかった。また、 $\text{Cl}^-$  分泌は両者により変化しなかった。Yoon ら<sup>6)</sup>は UDCA による胆汁中  $\text{HCO}_3^-$  の上昇について chole-hepatic recycling なる仮説を提唱している。すなわち、胆管上皮中で炭酸ガスと水からカルボニックアンヒドラーゼにより  $\text{H}^+$  と  $\text{HCO}_3^-$  ができ、胆管中に排泄された UDCA は  $\text{H}^+$  と結合し再吸収され、残りの  $\text{HCO}_3^-$  は胆汁中に分泌されると推論している。これらの事実から UDCA の高用量投与による胆汁分泌量の増加機序の一つとして  $\text{HCO}_3^-$  排泄増加に伴う胆汁浸透圧の上昇が関与している可能性がある。

つぎに、UDCA と CDCA を経口的に連続投与したときの影響について検討した。ハムスターは夜行性の動物であり、コレステロール代謝の日内リズム<sup>7)</sup>を考慮して、薬物の投与を午後 5 時頃に実施した。UDCA の 0.4 及び 4 mg/kg/day と CDCA 0.4mg/kg/day の投与では胆汁分泌量に変化は認められなかったが、UDCA の 20mg/kg/day では胆汁分泌量は低下した。これらの事実は、一定量以上の UDCA を連続的に経口投与すると、持続的な静脈内投与の場合と異なり、胆汁分泌機構に対して抑制的に作用することが考えられる。胆汁脂質の BA、TC 及び PL 分泌量においても UDCA の高用量適用により低下傾向が認められた。この事実は、外因性 UDCA の高負荷によって、内因性 BA の産生、分泌が抑制された結果、TC 及び PL の分泌も低下したのと考えられる。また、TC 分泌量が低下することから胆石形成時における胆汁中コレステロール飽和状態が軽減されるため、UDCA 経口投与による胆石形成の抑制効果が期待される。

胆汁中電解質の  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  及び  $\text{HCO}_3^-$  分泌量は UDCA の高用量適用により有意に低下した。UDCA の静脈内投与では  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  分泌量は変化せず(データは示さず)、 $\text{HCO}_3^-$  分泌量が増加したことから、UDCA の連続的な経口投与による電解質分泌低下作用

の詳細は不明であるが、少なくとも、肝臓における胆汁中へのこれら電解質の排泄過程に直接、影響を及ぼしたのではなく胆汁分泌量そのものの減少に由来したものであると推測される。

【文 献】

- 1) Carey MC : Clinical Hepatology, Csom's G and Thaler Hed, Springer-Verlag, Berlin, p52-69, 1983
- 2) Erlinger S : Hepatology 1 : 352, 1981
- 3) Blitzer J : Boyer JL. : Gastroenterology 8 : 346, 1982
- 4) 木谷健一, 金井節子 : 治療学 6 : 769, 1981
- 5) Kitanlk, Kanais. : Life Sci 31 : 1973, 1982
- 6) Yoon YB : Gastroenterology 90 : 837, 1986
- 7) Mitropoulos, KA : Biochem. Biophys. Acta 326, 428, 1973

表 1 . 胆汁酸静脈内投与による胆汁分泌量に対する作用

Group	Time interval									
	-20 ~ 0 min	0 ~ 20 min	20 ~ 40 min	40 ~ 60 min	60 ~ 80 min	80 ~ 100 min	100 ~ 120 min			
対 照 (Saline) n = 3	0.148 ± 0.031	0.157 ± 0.029	0.181 ± 0.039	0.180 ± 0.039	0.168 ± 0.040	0.148 ± 0.033	0.116 ± 0.010			
UDCA-L (4 mg/kg/hr) n = 4	0.165 ± 0.039	0.182 ± 0.030	0.194 ± 0.023	0.189 ± 0.019	0.170 ± 0.007	0.163 ± 0.020	0.155 ± 0.021 *			
UDCA-H (20mg/kg/hr) n = 4	0.139 ± 0.025	0.184 ± 0.025	0.170 ± 0.024	0.190 ± 0.032	0.194 ± 0.016	0.216 ± 0.015 *	0.238 ± 0.028 **			
CDCA (20mg/kg/hr) n = 3	0.169 ± 0.037	0.177 ± 0.038	0.211 ± 0.052	0.219 ± 0.065	0.212 ± 0.075	0.208 ± 0.044	0.207 ± 0.032 **			

\* : p < 0.05,    \*\* : p < 0.01,    Significantly different from the control.

(mL)    mean ± S. D.

表 2. 胆汁酸静脈内投与による胆汁脂質分泌に対する作用

Group	Time interval			-40 ~ 0 min			0 ~ 40 min			40 ~ 80 min			80 ~ 120 min		
	BA <sup>1)</sup>	TC <sup>2)</sup>	PL <sup>3)</sup>	BA	TC	PL	BA	TC	PL	BA	TC	PL	BA	TC	PL
対 照 (Saline) n = 3	2.65 ± 0.45	39.6 ± 8.3	0.35 ± 0.03	2.55 ± 0.65	38.9 ± 4.9	0.35 ± 0.05	3.00 ± 1.19	38.3 ± 7.0	0.34 ± 0.09	1.04 ± 0.47	20.4 ± 6.0	0.17 ± 0.04			
UDCA-L (4 mg/kg/hr) n = 4	2.38 ± 0.53	45.6 ± 9.7	0.41 ± 0.05	4.80 ± 0.31 **	47.0 ± 7.4	0.46 ± 0.05 *	2.00 ± 0.81	29.3 ± 2.8	0.24 ± 0.04	1.04 ± 0.42	24.9 ± 2.5	0.17 ± 0.03			
UDCA-H (20mg/kg/hr) n = 4	2.11 ± 0.68	38.1 ± 8.4	0.36 ± 0.08	4.16 ± 1.51	43.8 ± 10.5	0.48 ± 0.12	3.89 ± 1.57	50.2 ± 4.2	0.50 ± 0.12	3.82 ± 0.88	54.0 ± 11.8	0.49 ± 0.23			
CDCA (20mg/kg/hr) n = 3	2.45 ± 0.46	41.7 ± 7.9	0.37 ± 0.09	4.27 ± 1.84	59.7 ± 12.2	0.55 ± 0.02 **	2.26 ± 1.24	55.5 ± 12.6	0.54 ± 0.09	3.23 ± 0.60 **	47.6 ± 2.3 **	0.49 ± 0.09 **			

mean ± S.D.

\* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01,

Significantly different from the control.

- 1) Bile acid (mg)
- 2) Total cholesterol ( $\mu$ g)
- 3) Phospholipid (mg)



表 4. 胆汁酸連続経口投与による胆汁脂質分泌に対する作用

胆汁中脂質排泄 Group	総胆汁酸 (mg/3hr)	総コレステロール ( $\mu$ g/3hr)	リン脂質 (mg/3hr)
対照 (0.5%CMC) n = 4	6.05 $\pm$ 1.66	236.7 $\pm$ 119.1	1.29 $\pm$ 0.30
UDCA-L (0.4mg/kg) n = 4	5.97 $\pm$ 2.17	229.2 $\pm$ 98.3	1.05 $\pm$ 0.35
UDCA-M (4 mg/kg) n = 4	7.10 $\pm$ 1.54	353.2 $\pm$ 132.1	1.48 $\pm$ 0.38
UDCA-H (20mg/kg) n = 4	4.26 $\pm$ 1.01	149.3 $\pm$ 32.0	0.74 $\pm$ 0.08 *
CDCA (0.4mg/kg) n = 3	4.55 $\pm$ 1.47	197.5 $\pm$ 2.9	0.82 $\pm$ 0.12

\* p < 0.05, Significantly different from the control.

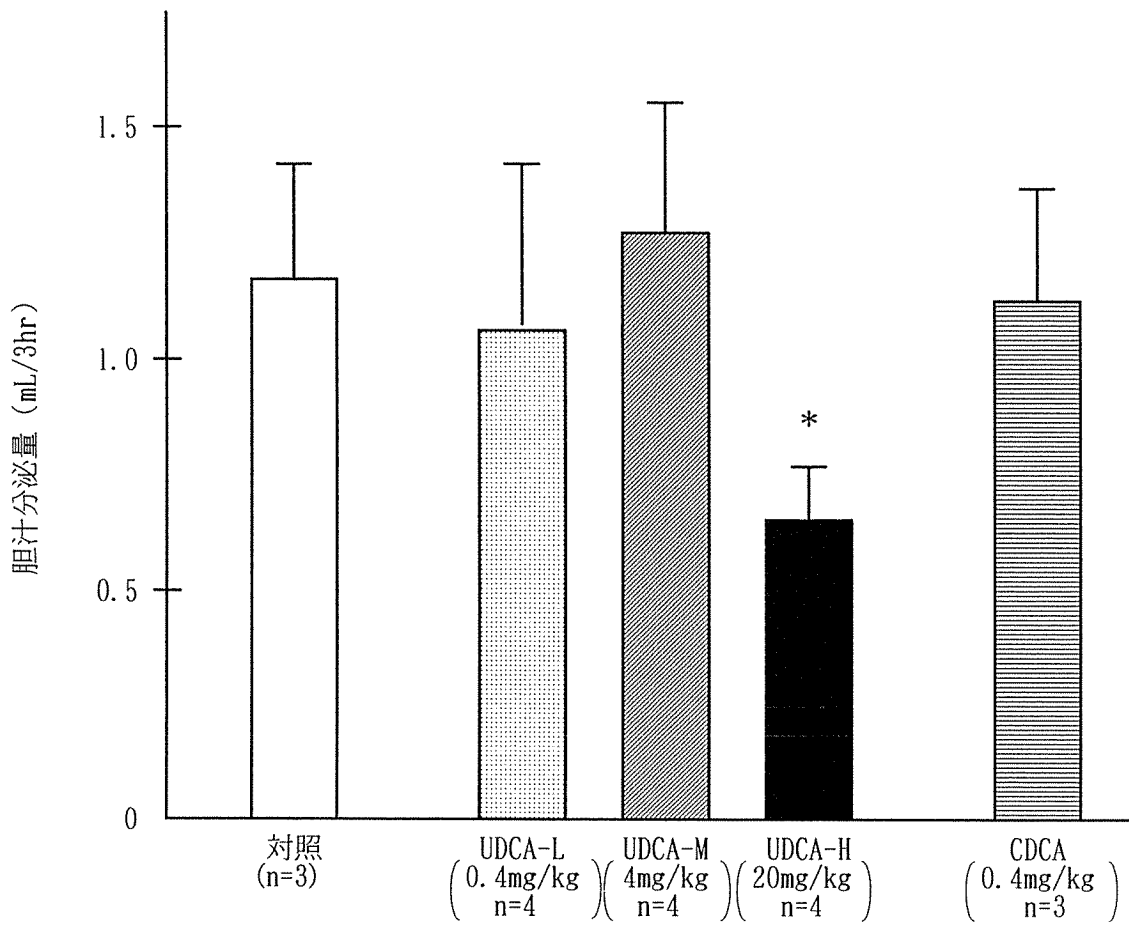
mean  $\pm$  S.D.

表 5. 胆汁酸連続経口投与による胆汁電解質分泌に対する作用

胆汁中電解質排泄 Group	Na <sup>+</sup> ( $\mu$ Eq/hr)	K <sup>+</sup> ( $\mu$ Eq/hr)	Cl <sup>-</sup> ( $\mu$ Eq/hr)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu$ Eq/hr)
対照 (0.5%CMC) n = 4	65.3 $\pm$ 16.7	2.09 $\pm$ 0.52	31.1 $\pm$ 6.1	14.3 $\pm$ 4.2
UDCA-L (0.4mg/kg) n = 4	63.7 $\pm$ 20.7	2.00 $\pm$ 0.65	27.8 $\pm$ 8.7	14.1 $\pm$ 5.1
UDCA-M (4 mg/kg) n = 4	75.1 $\pm$ 15.7	2.46 $\pm$ 0.59	32.2 $\pm$ 7.0	16.2 $\pm$ 3.9
UDCA-H (20mg/kg) n = 4	39.0 $\pm$ 7.3 *	1.29 $\pm$ 0.28 *	17.2 $\pm$ 2.8 **	8.0 $\pm$ 2.0 *
CDCA (0.4mg/kg) n = 3	65.8 $\pm$ 12.7	2.15 $\pm$ 0.44	30.4 $\pm$ 6.2	13.9 $\pm$ 3.8

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, Significantly different from the control.

mean  $\pm$  S.D.



\*  $p < 0.05$ , Significantly different from the control.

図1. 胆汁酸連続経口投与による胆汁分泌に対する作用