

Ursodeoxycholic acid の薬効薬理試験

—ラット肝 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 及び

Cholesterol-7 α -hydroxylase 活性に対する作用—

【要 旨】

ラット肝ミクロゾーム中に存在する 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (以下 HMG-CoA reductase) 及び cholesterol-7 α -hydroxylase (以下 CH-7 α -OHase) に対する ursodeoxycholic acid (以下 UDCA) の作用について in vitro において検討した。

- 1) UDCA は、HMG-CoA reductase に対して 10^{-3} 及び 5×10^{-3} M 添加において無添加時の 52.7 及び 23.2% に活性を低下させた。 10^{-3} M 添加時における UDCA の HMG-CoA reductase に対する阻害様式は非競合的であった。
- 2) UDCA は、CH-7 α -OHase に対して 10^{-3} 及び 5×10^{-3} M 添加において無添加時の 42.4 及び 7.2% に活性を低下させた。 10^{-3} M 添加時における UDCA の CH-7 α -OHase に対する阻害様式は競合的であった。

以上の結果から、UDCA は肝臓におけるステロール代謝の調節に関与することにより、血中及び肝臓中のコレステロール低下作用及び胆石生成抑制作用等を発現することが示唆された。

【緒 言】

Ursodeoxycholic acid (以下 UDCA) は、熊の胆汁中に含まれる胆汁酸の一種であり、利胆剤として胆のう、胆管及び肝臓等の疾患に使用されてきた。近年、UDCA がコレステロールの腸管からの吸収抑制作用やコレステロール代謝調節に重要な役割を果たしていることが報告¹⁻³⁾ されて以来、高脂血症の治療、コレステロール系胆石生成予防や胆石溶解剤として臨床の場で使用されている⁴⁻⁶⁾。コレステロール系胆石症のヒト及び実験的胆石モデル動物の肝では、コレステロールの生合成を律速する 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (以下 HMG-CoA reductase) の活性亢進⁷⁾ と、コレステロールから胆汁酸への異化過程を律速する cholesterol-7 α -hydroxylase (以下 CH-7 α -OHase) の活性低下⁸⁾ により、胆汁中へのコレステロールの排泄が亢進しているものと考えられる。

今回、ラット肝ミクロゾーム中に存在する両酵素に対する、UDCA の影響を in vitro において検討した。

【実験材料及び方法】

1. 使用薬物

UDCA は当社にて製剤化予定の原末 (Lot.B290315) を大東工場より入手して使用した。実験に際しては、0.1N-NaOH 水溶液に溶解したのち、希 HCl 溶液を加えて pH を 7.5 に調製して使用した。Colestyramine (クエストラン、ブリストルマイヤー) は、精製水で 100mg/mL の濃度に懸濁して使用した。その他の試薬は、市販の試薬特級を使用した。

2. 使用動物

7 週齢の Crj:Sprague-Dawley 系雄性ラット (日本チャールスリバー) を購入し、1 週

間の予備飼育ののち、異常の認められない動物を実験に供した。

3. ラット肝マイクロゾームの調製

ラットに colestyramine 懸濁液 (200mg/2mL/body) を 10 及び 15 時の 1 日 2 回、3 日間経口投与し、最終薬物投与後に絶食して、18 時間後にエーテル麻酔下に放血致死させ、ただちに肝を摘出した。摘出した肝に、氷冷したマイクロゾーム調製液 (0.3M・sucrose、0.075M・nicotinamide、0.002M・EDTA 及び 0.02M・mercaptoethanol を含む 0.05M・リン酸緩衝液、pH7.5) を 5mL/g liver 加えて、氷冷下にヒスコトロン (日音医理科) でホモジナイズし、20%肝ホモジネートを作製した。この肝ホモジネートを 4°C で 10000g、10 分間遠心分離して上清を採取し、さらにこの上清を 4°C で 100000g、60 分間遠心分離してマイクロゾーム画分を採取した。

得られたマイクロゾーム画分にマイクロゾーム調製液を加えて軽くホモジナイズし、5~10%のマイクロゾーム懸濁液を作製した。この一部をとり、Lowry 法⁹⁾ を用いてタンパク量を測定し、1mg protein/0.15mL となるように調製して、これを酵素溶液として実験に使用した。

4. HMG-CoA reductase 活性の測定

HMG-CoA reductase 活性の測定は Shefer¹⁰⁾ 及び Nicolau⁷⁾ の方法に準じて行った。すなわち、0.5mL の助因子溶液 (3mM・MgCl₂、3mM・NADP、10mM・グルコース-6-リン酸及び 3unit・グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを含む 0.1M・リン酸緩衝液、pH7.2) に、0.05mL の 20mM・mercaptoethanol、基質として 0.1mL の 0.4mM・3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (以下 HMG-CoA、3.7kBq の [3-¹⁴C]HMG-CoA (2.1 GBq/mmol、純度 99.9%、New England Nuclear) を含む)、0.01mL の純水もしくは UDCA 溶液及び 1mg protein/0.15mL のマイクロゾーム懸濁液を加え混和し、37°C で 30 分間反応させた。30 分経過後に 0.2mL の 10mg/mL メバロノラクトン溶液及び 0.4mL の 2N・H₂SO₄ を加えて酵素反応を停止させ、さらに 37°C で 60 分間インキュベートし、HMG-CoA から生成したメバロン酸のメバロノラクトン化を行った。インキュベート後、0.5mL のエタノール及び 1g の無水 Na₂SO₄ を加え、2mL のジエチルエーテルを加えて攪拌抽出し、室温で 1000rpm、5 分間遠心分離してエーテル層を採取した。同様な抽出操作を計 3 回行い、集めたエーテル層を N₂ 気流下に 25°C で乾固した。残渣に 0.1mL のアセトンを加えて溶解し、silicagel 薄層プレート (kieselgel 60 F₂₅₄、20×20cm、メルク) に 0.05mL をスポットした。プレートはアセトン：ベンゼン混液 (1:1) で展開し、風乾後 0.2%・2',7'-dichlorofluorescein メタノール溶液を噴霧し、紫外線下の蛍光によりメバロノラクトンのスポットを検出した (Rf=0.67)。検出したメバロノラクトンのスポットをスパーテルを用いてかき取ってバイアルに移し、これに液体シンチレータ (インスタゲル®、Packard) を加えて、液体シンチレーションカウンター (Tri-Card 1900CA、Packard) により放射能を計測した。計数効率の補正は外部標準線源法により行った。なお、メバロノラクトンの回収率は別に実施した実験より 70% に設定し、メバロン酸の

生成量を次式により算出した。

$$\text{Moles of mevalonate-3-}^{14}\text{C formed} = \frac{\text{Mevalonate-3-}^{14}\text{C (dpm)}}{\text{Specific activity[3-}^{14}\text{C]HMG-CoA (dpm/mole)}} \div 0.70$$

胆汁酸の本酵素活性に対する影響を検討するには、UDCA を上記反応系に対して終濃度が 10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 及び $5 \times 10^{-3}\text{M}$ となるように添加した。さらに、UDCA の阻害様式の実験においては、上述の反応系の気質濃度 (HMG-CoA) を終濃度が 11、22、44、88 及び $176 \mu\text{M}$ となるように調製し、UDCA を終濃度が 10^{-3}M となるように添加して測定した。

5. CH-7 α -OHase 活性の測定

CH-7 α -OHase 活性の測定は、Nicolau⁸⁾ 及び Hylemon¹¹⁾ らの方法を改良し、酵素誘導化 HPLC 法を用いて測定した。すなわち、10mL 容の共栓遠沈管に 1mL の 50nmol/mL コレステロール(クロロホルム : メタノール = 2 : 1 混液) 及び 1mL の 0.75mg/mL Triton X-100 (アセトン溶液) を加えて、 N_2 気流下で乾固し、残渣にマイクロゾーム調製液 0.4mL を加えて激しく攪拌して基質溶液を調製した。この基質溶液に対して、0.15mL の助因子溶液 (4.5mM MgCl₂、 1.25mM NADP、 2.5mM グルコース-6-リン酸及び 5unit グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを含む 70mM リン酸緩衝液、pH7.4)、0.1mL の純水あるいは UDCA 溶液及び 1mg protein/0.15mL のマイクロゾーム懸濁液を加えて、 37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後に、7.5mL のクロロホルム-メタノール (2 : 1) 混液及び 2.0mL の純水を加えて室温で 30 分間振とう抽出し、室温で 2000rpm、10 分間遠心分離してクロロホルム層を採取した。さらに、水層に対して 5mL のクロロホルムを加えて同様な操作を行い、クロロホルム層を合わせて、 40°C で N_2 気流下に乾固した。残渣に対して $10 \mu\text{L}$ の 10% Triton X-100 水溶液及び 1mL の 0.2M リン酸緩衝液 (pH7.6) を加えて攪拌し、5unit/20 μL の cholesterol oxidase 溶液 (1mM mercaptoethanol、20%グリセロールを含む 10mM リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解) を加え、 37°C で 10 分間インキュベートした。インキュベート後、2mL のエタノールを加えて反応を停止させ、5mL の石油エーテルを加えて 10 分間振とう抽出し、1000rpm で 5 分間遠心分離し、石油エーテル層を採取した。さらに、水層に対して 5mL の石油エーテルを加えて同様に抽出し、得られた石油エーテル層を合わせて、 40°C で N_2 気流下に乾固した。残渣に対して、1mL のアセトニトリル : メタノール (7 : 3) 混液を加えて溶解し、20 μL を HPLC に注入して分析した。分析には、ウォーターズ LC モジュール 1、カラムヒータ及びデータレコーダ 741 データモジュール (以上日本ミリポアリミテッド) を使用した。分析用カラムは Lichrospher® 100 RP-18 (粒径 5 μm 、i.d. $4 \times 250\text{mm}$ 、メルク)、溶離液にはアセトニトリル : メタノール (7 : 3)、流

速は分析開始から 22 分間は 0.8mL/min、その後 10 分間は 2.0mL/min、さらにその後 8 分間を 0.8mL/min とした。検出波長は 240nm、カラム温度は 45°C で分析した。別に 7 α -hydroxycholesterol を用いて cholesterol oxidase 処理以降の操作で行って検量線を作成し、得られた検量線より試料中の 7 α -hydroxycholesterol 含量を求め、コレステロールから生成した 7 α -hydroxycholesterol 量を算出した。

胆汁酸の本酵素活性に対する影響を検討するには、UDCA を上記反応系に対して終濃度が 10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 及び 5×10^{-3} M となるよう添加した。さらに、UDCA の阻害様式の実験においては、上述の反応系の気質濃度（コレステロール）を終濃度が 75、101 及び 153 μ M となるように調製し、UDCA を終濃度が 10^{-3} M となるよう添加して測定した。

【実験結果】

1. UDCA の HMG-CoA reductase 活性に対する作用

図 1 に UDCA の HMG-CoA reductase 活性に対する作用について示した。UDCA の 10^{-5} 、 5×10^{-5} 及び 10^{-4} M 添加では、本酵素活性に対して影響を及ぼさなかったが、 10^{-3} 及び 5×10^{-3} M 添加では無添加時の酵素活性に比べてそれぞれ 52.7 及び 23.2% に低下した。

次に、HMG-CoA reductase 活性の抑制作用が認められた 10^{-3} M における UDCA の阻害様式について検討した（図 2）。UDCA 無添加群では基質濃度が増加するにともなって酵素活性の増加が認められた。UDCA 添加群においては各基質濃度において無添加群に比べて活性の抑制が認められたが、無添加群と同様に基質濃度が増加するにともなって酵素活性の増加が認められた。この結果を Lineweaver-Burk のプロットで表示すると（図 3）、無添加時及び UDCA 添加群の K_m はそれぞれ 22.1 及び 72.5 μ M、 V_{max} はそれぞれ 21.74 及び 5.71 pmole/mg protein/min と算出された。

2. UDCA の CH-7 α -OHase 活性に対する作用

図 4 に CH-7 α -OHase 活性に対する UDCA の作用について示した。UDCA の 10^{-5} 、 5×10^{-5} 及び 10^{-4} M 添加では、本酵素活性に対して影響を及ぼさなかったが、 10^{-3} 及び 5×10^{-3} M 添加では無添加時の酵素活性に比べてそれぞれ 42.4 及び 7.2% に低下した。

次に、CH-7 α -OHase 活性の抑制作用が認められた 10^{-3} M における UDCA の阻害様式について検討した（図 5）。UDCA 無添加群では、基質濃度が増加するにともなって酵素活性の増加が認められた。UDCA 添加群においては、各基質濃度において無添加群に比べて活性の抑制が認められたが、無添加群と同様に基質濃度が増加するにともなって酵素活性の増加が認められた。この結果を Lineweaver-Burk のプロットで表示すると（図 6）、無添加群及び UDCA 添加群の K_m はそれぞれ 76.3 及び 144.9 μ M、 V_{max} は両群ともに 15.38 pmole/mg protein/min と算出された。

【考 察】

コレステロールは主に肝臓中においてアセチル CoA から合成され、さらに胆汁酸へと異化される。HMG-CoA reductase は HMG-CoA からメバロン酸を生成する酵素で、アセチル CoA からコレステロールを合成する過程を律速している酵素である。また、CH-7 α -OHase は、コレステロールの 7 位の炭素を水酸化して 7 α -hydroxycholesterol を生成する酵素で、コレステロールから胆汁酸を合成する過程を律速する酵素である。コレステロール系胆石症のヒト及び実験的胆石モデル動物の肝臓では、HMG-CoA reductase 活性の亢進と CH-7 α -OHase 活性の低下により、肝臓におけるコレステロールの生成量が増加し、胆汁中へのコレステロール排泄が増加しているものと考えられる。今回我々は、両酵素を指標にして、UDCA のコレステロール代謝調節への関与について検討を行った。

HMG-CoA reductase については、UDCA の 10^{-5} 、 5×10^{-5} 及び 10^{-4} M 添加では活性に変化が認められなかったが、 10^{-3} 及び 5×10^{-3} M 添加では無添加時に比べて 52.7 及び 23.2% に活性が低下し、平林らの報告¹²⁾と同様な結果が得られた。酵素活性の抑制が認められた UDCA の 10^{-3} M 添加時における阻害様式について検討した場合、UDCA の HMG-CoA reductase に対する阻害様式は非競合的であった。

つぎに、CH-7 α -OHase については UDCA の 10^{-5} 、 5×10^{-5} 及び 10^{-4} M 添加では活性に変化が認められず、 10^{-3} 及び 5×10^{-3} M 添加では無添加時に比べて 42.4 及び 7.2% に活性が低下した。平林らの報告では、UDCA の 10^{-5} ~ 5×10^{-5} M 添加時においては活性の亢進がみられたと報告しているが、我々の実験においてはそのような作用は認められなかった。酵素活性の抑制作用が認められた UDCA の 10^{-3} M 添加時における阻害様式について検討したとき、UDCA の CH-7 α -OHase に対する阻害様式は、平林らの報告と同様に競合的であった。以上の結果から、CH-7 α -OHase 活性はコレステロールと胆汁酸 (UDCA) の割合及び胆汁酸の種類に影響されることが示唆された。

我々は UDCA の血中及び肝臓中のコレステロール低下作用¹³⁾や胆石生成抑制作用¹⁴⁾について報告し、これらの作用は消化管腔内におけるコレステロール吸収の抑制作用によるものであるとの結論を得た。今回の実験から、UDCA は肝臓におけるステロール代謝調節に関与していることが推察され、血中及び肝臓中コレステロール低下作用や胆石生成抑制作用の一助となっていることが示唆された。

【文 献】

- 1) 松井静雄 他：基礎と臨床, 10, 73, 1976
- 2) Wilson, J.D., et al. : Arc. Int. Med., 130, 493, 1972
- 3) Howe, E.E., et al. : J. Nutr., 77, 237, 1962
- 4) 牧野勲 他：日本消化器病学会雑誌, 72, 690, 1975
- 5) 八田善夫 他：最新医学, 30, 970, 1975
- 6) 芦沢真六 他：医学のあゆみ, 101, 922, 1977

- 7) Nicolau, G., et al. : J. Lipid Res., 15, 94, 1974
- 8) Nicolau, G., et al. : J. Lipid Res., 15, 146, 1974
- 9) Lowry, O.H., et al. : J. Biol. Chem., 193, 265, 1951
- 10) Shefer, S., et al. : J. Lipid Res., 13, 402, 1972
- 11) Hylemon, P.B., et al. : Anal. Biochem., 182, 212, 1989
- 12) 平林紀雄 他 : 応用薬理, 15, 125, 1978
- 13) 清水一広 他 : 社内報告書, 1991
- 14) 清水一広 他 : 社内報告書, 1992