

胆汁中ビリルビン排泄に及ぼすウルソデオキシコール酸の影響

—胆汁酸抱合の意義—

奈良県立医科大学第3内科学教室

松村吉庸

EFFECT OF URSODEOXYCHOLATE ON THE BILIARY EXCRETION OF BILIRUBIN

— SIGNIFICANCE OF BILE ACID CONJUGATION —

YOSHINOBU MATSUMURA

The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received September 29, 1994

Abstract: The biliary excretion of bilirubin was studied in normal Sprague-Dawley rats and mutant jaundiced rats (Eizai hyperbilirubinuria rat, EHBR) under the continuous intravenous infusion of free ursodeoxycholate, tauroursodeoxycholate, glyoursodeoxycholate and ursodeoxycholate-glucuronide. Continuous infusion of free ursodeoxycholate at a rate of $0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g B. W.}$ promoted the biliary excretion of bilirubin in normal rats. However, it suppressed the biliary excretion of bilirubin in EHBR and β -alanine-fed rats, which were associated with defective conjugation of ursodeoxycholate with taurine. When the infusion rate was increased to $1.2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g B. W.}$, free ursodeoxycholate turned out to suppress the biliary excretion of bilirubin in normal rats. However, when taurine or glycine was infused simultaneously, the biliary excretion of bilirubin was not suppressed, but was augmented remarkably. In addition, taurine was more effective than glycine in the promotion of the biliary excretion of bilirubin. Continuous infusion of tauroursodeoxycholate and glyoursodeoxycholate always increased the biliary excretion of bilirubin in normal rats, EHBR and β -alanine-fed rats. On the other hand, ursodeoxycholate-glucuronide extremely suppressed the biliary excretion of bilirubin even in normal rats at lower infusion rate, $0.3 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g B. W.}$. These results indicate that bile acid conjugation, especially conjugation with taurine, plays a very important role in the biliary excretion of bilirubin.

Index Terms

ursodeoxycholate, bilirubin, bile acid conjugation, taurine, ursodeoxycholate-glucuronide

緒 言

近年、肝内胆汁うっ滞に対するウルソデオキシコール酸の有用性が臨床的^{1)~4)}にも実験的^{5)~7)}にも確立されてきている。しかしながら、ウルソデオキシコール酸の利胆作用は主として、胆汁流量、胆汁中への胆汁酸排出お

よび重炭酸イオン排出の面から検討されており^{8)~10)}、胆汁中へのビリルビン排出に及ぼすウルソデオキシコール酸の影響は不明である。現在、肝内胆汁うっ滞の治療には遊離型ウルソデオキシコール酸(FUDCA)がもちいられているが、投与されたFUDCAの大部分は通常、肝細胞においてタウリンあるいはグリシン抱合を受け、タウ

リン抱合型ウルソデオキシコール酸(TUDCA)あるいはグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸(GUDCA)として胆汁中へ排泄される。TUDCA および GUDCA は FUDCA に比して、毛細管膜を介しての胆汁移行が良い、細胞毒性が弱いなどの特徴があることが知られており、肝内胆汁うっ滞に対しても TUDCA および GUDCA は FUDCA より高い有効性を発揮する可能性がある。また、タウリンおよびグリシン抱合以外の抱合形式としてグルクロン酸抱合の存在が知られているが、健常者では、グルクロン酸抱合型胆汁酸は血清および尿中にごく微量存在するに過ぎず、臨床的意義に乏しいと考えられている。一方、胆汁うっ滞患者ではグルクロン酸抱合の亢進により健常者の約 10~30 倍のグルクロン酸抱合型胆汁酸¹¹⁾が血清および尿中に存在している。この際、本抱合型胆汁酸は遊離型胆汁酸に比して著しく水溶性が高いため、肝内胆汁うっ滞時における胆汁酸の尿中排泄を促進し、胆汁うっ滞を緩和する方向に動く^{12),13)}と考えられ、その意味で合目的意義を有するものとされてきた。しかしながら最近、グルクロン酸抱合型リトコール酸は遊離型リトコール酸よりもむしろ胆汁うっ滞作用の強いことが報告¹⁴⁾されており、肝内胆汁うっ滞におけるグルクロン酸抱合の意義は見直されるべき時期にきている。

ところで現在まで、ウルソデオキシコール酸の胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす影響を直接的に検討した報告はみられず、さらに胆汁酸の抱合形式の差が胆汁中ビリルビン排泄にいかなる影響を及ぼすかという点も全く不明である。そこで筆者は、種々の実験系において非抱合型および各種抱合型ウルソデオキシコール酸を投与し、胆汁中ビリルビン排泄に対する影響を検討した。

材 料 と 方 法

1. 実験動物

実験動物として、体重 250~300 g の Sprague-Dawley 系雄性ラット(静岡実験動物)および体重 250~300 g の Eizai hyperbilirubinuria rat (EHBR, エーザイ株式会社)を用い 12 時間の絶食後実験に供した。なお実験前 1 週間は室温 23℃, 湿度 40% の定環境下で飼育した。

2. 実験方法

A) 胆汁流量および胆汁中ビリルビンの測定

ラットをエーテル麻酔下に開腹し、総胆管にポリエチレン-10 チューブ (IGARASHI IKAKOGYO CO., LTD) を留置して外胆汁瘻を作製し、大腿静脈から FUDCA, TUDCA, GUDCA, グルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸 (UDCA-gl) を持続注入した。外胆汁瘻から流出する胆汁を遮光条件下で、胆汁酸投与開始 30

分前から 150 分間 30 分毎に採取し、胆汁流量を測定した。次に、胆汁中ビリルビンはビリルビン-HR II (和光純薬) を用い、アルカリアゾビリルビン法¹⁵⁾で測定した。胆汁流量と胆汁中ビリルビン濃度から胆汁中ビリルビン排泄率を算定し、ラット体重 100 g 毎分当たりのビリルビン量を ng で表示した。

B) 胆汁酸抱合能

EHBR および正常ラットの肝ホモジェネートを試料として、胆汁酸抱合能を Gottfreis らの方法¹⁶⁾を用いて検討した。すなわち、摘出したラット肝を直ちに冷 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で細切後、1500 回転/分にて 5 分間ホモジェネートした。このホモジェネート (肝湿重量 40 mg) に、¹⁴C-コール酸 (50 mCi/mmol, 第一化学薬品) 2.32 nmol, ATP 0.6 μmol, ニコチン酸アミド 4 μmol, 塩化マグネシウム 1 μmol および各種濃度の非放射性コール酸を加え、さらに非放射性コール酸の 10 倍量のタウリンとグリシンを添加後、水酸化カリウムで反応液を pH 7.4 に調整し、37℃ で 120 分間インキュベーションした。反応液を沸騰水に浸して反応を停止させ、コール酸、タウロコール酸およびグリココール酸をブタノールで抽出した後、薄層クロマトグラフィーにて分離した。この際、展開液にはブタノール:氷酢酸:蒸留水 (10:1:1) を、薄層クロマトグラフィープレートにはシリカゲル 60 F 254 (関東化学) を用いた。展開終了後、クロマトグラフィープレートにリンモリブデン酸アルコールを噴霧し、120℃ で乾燥させて、コール酸、タウロコール酸およびグリココール酸の存在部位を確認した。同部位を掻き取り、PPO:POPOP: Cab-O-Sil: トルエン (0.5:0.03:4.0:100) の混合液に移し、液体シンチレーションカウンターで放射性活性を測定し、タウロコール酸とグリココール酸の生成量を算定した。

C) 肝タウリン量およびグリシン量の測定

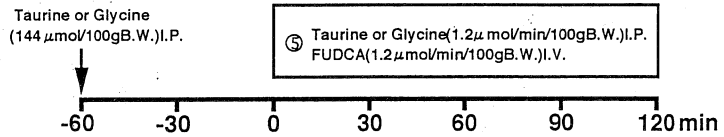
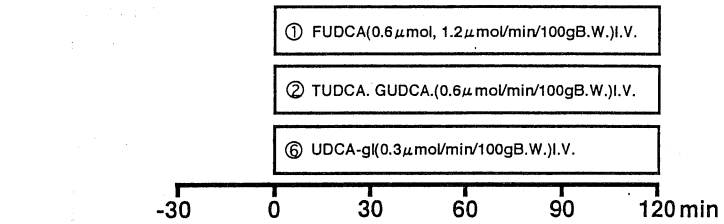
3% βアラニン¹⁷⁾水を 1 週間自由飲水させた正常ラットの肝タウリンおよびグリシン量を Deyl らの方法¹⁸⁾に準じて測定した。具体的には、トリクロロ酢酸溶液で総量 10 ml としたラット肝 0.5 g を 1500 回転/分, 5 分間ホモジェネートし、同試料を 3000 回転/分, 10 分間遠沈した。その際得られた上清のアミノ酸分析を HPLC によりおこない、肝タウリン量と肝グリシン量を測定した。なお、常用水を飲水させたラットをコントロールとした。

D) 実験デザイン

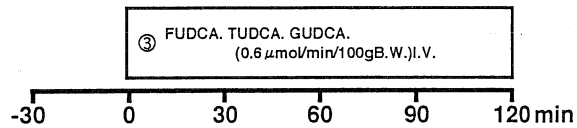
以下に示す実験プロトコールに基づいて、ウルソデオキシコール酸の抱合形式の差が胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす影響を検討した (Fig. 1)。

① 正常ラットに FUDCA (0.6 μmol/min/100 g B.W.

Normal rat



EHBR



β-Alanine fed rat

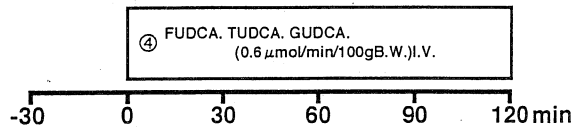


Fig. 1. Experimental protocol.

および $1.2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$) を持続静注

② 正常ラットに TUDCA および GUDCA ($0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$) を持続静注

③ EHBR に FUDCA, TUDCA および GUDCA ($0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$) を持続静注

④ 3% βアラニン水を 1 週間自由飲水させた正常ラットに FUDCA, TUDCA および GUDCA ($0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$) を持続静注

⑤ 正常ラットに FUDCA ($1.2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$) を持続静注すると同時にタウリンあるいはグリシンを腹腔内持続注入

⑥ 正常ラットに UDCA-gl ($0.3 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$) を持続静注

なお各プロトコルにおいて生理食塩水 ($2 \text{ ml}/\text{hr}$) 持続静注をコントロールとし、胆汁酸溶液は $2 \text{ ml}/\text{hr}$ の速度で静注した。

結 果

1) 正常ラットの胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす FUDCA 持続静注の影響 (Fig. 1. プロトコル①)

正常ラットに生理食塩水を持続静注した際の胆汁中ビリルビン排泄率は緩徐に低下した。一方、FUDCA を 0.6

$\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ の速度で持続静注した際の胆汁中ビリルビン排泄率は静注開始 30 分後までは一旦軽度増加し、その後緩徐に低下した。FUDCA ($0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$) 持続静注時と生理食塩水静注時における胆汁中ビリルビン排泄率とを比較すると、静注開始 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後のいずれの時点においても、前者は後者より有意に高値を示した (Fig. 2)。

また、FUDCA の静注量を 2 倍、すなわち $1.2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ に増やして、FUDCA 持続静注時における正常ラットの胆汁中ビリルビン排泄率を検討すると、胆汁中ビリルビン排泄率は静注開始 30 分までは $0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ 投与時と同様に一旦軽度増加したがその後は急激に低下し、静注開始 60 分後、90 分後、120 分後のいずれの時点においても生理食塩水静注時を下回っていた (Fig. 2)。

この 120 分間の胆汁中ビリルビン総排泄量を生理食塩水、FUDCA $0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ 、FUDCA $1.2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ の各群について検討すると、 $19.2 \pm 1.5 \mu\text{g}/100 \text{ gB.W.}/2 \text{ hr}$ 、 $24.8 \pm 3.6 \mu\text{g}/100 \text{ gB.W.}/2 \text{ hr}$ 、 $15.8 \pm 3.7 \mu\text{g}/100 \text{ gB.W.}/2 \text{ hr}$ となり、FUDCA $0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ 静注時には生理食塩水静注時に比して胆汁中ビリルビン総排泄量は有意に ($P < 0.05$)

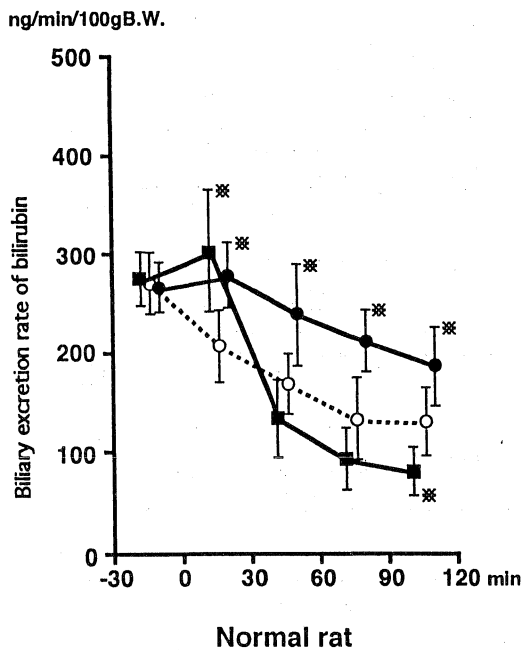


Fig. 2. Biliary excretion rate of bilirubin under the continuous intravenous infusion of FUDCA (0.6 or 1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ gB. W.}$) in normal rats.
 ...○... Saline —●— FUDCA (0.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ gB. W.}$)
 —■— FUDCA (1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ gB. W.}$)
 * $P < 0.05$ V. S. Saline

高値であった。一方、FUDCA 1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ gB.W.}$ を負荷時の胆汁中ビリルビン総排泄量は生理食塩水静注時より有意($P < 0.01$)に低値であった。

2) 正常ラットの胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす TUDCA および GUDCA 持続静注の影響(Fig. 1. プロトコール②)

正常ラットに TUDCA および GUDCA 持続静注時の胆汁中ビリルビン排泄率は FUDCA 0.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ g B. W.}$ 持続静注時と同様に推移し、静注開始 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後のいずれの時点においても生理食塩水静注時における胆汁中ビリルビン排泄率に比して有意に高値であった(Fig. 3)。

さらに、この 120 分間の胆汁中ビリルビン総排泄量は、生理食塩水静注群 $19.2 \pm 1.5\ \mu\text{g}/100\text{ gB.W.}/2\text{ hr}$ 、TUDCA 静注群 $24.1 \pm 2.7\ \mu\text{g}/100\text{ gB.W.}/2\text{ hr}$ 、GUDCA 静注群 $23.3 \pm 2.9\ \mu\text{g}/100\text{ gB.W.}/2\text{ hr}$ となり TUDCA および GUDCA のいずれの胆汁酸を静注した際にも、胆汁中ビリルビン総排泄量は生理食塩水静注時と比較して有意に($P < 0.01$, $P < 0.01$)高値を示した。

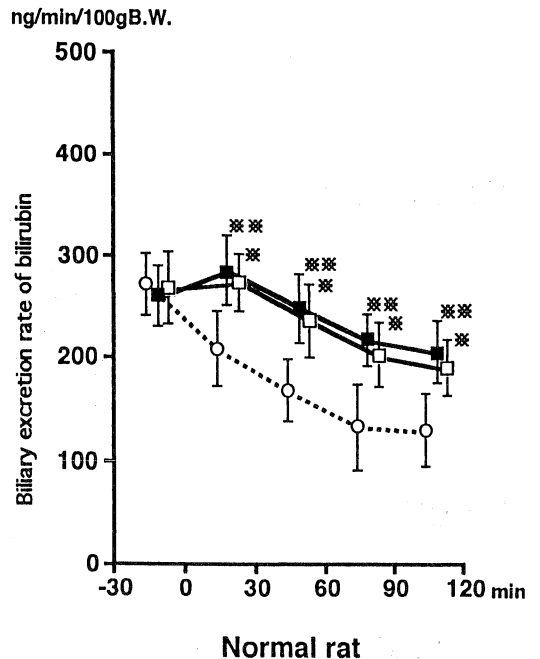


Fig. 3. Biliary excretion rate of bilirubin under the continuous intravenous infusion of TUDCA and GUDCA (0.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ gB. W.}$) in normal rats.
 ...○... Saline —■— TUDCA —□— GUDCA
 * $P < 0.05$ V. S. Saline ** $P < 0.01$ V. S. Saline

3) EHBR の胆汁酸抱合能

EHBR と正常ラットにおけるタウロコール酸およびグリココール酸生成量を検討したところ、EHBR のタウロコール酸生成量は正常ラットの約 1/2 に低下していたが、グリココール酸生成量は両者の間で差を認めなかった(Fig. 4)。

4) EHBR の胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす FUDCA, TUDCA および GUDCA 持続静注の影響(Fig. 1. プロトコール③)

EHBR に生理食塩水を持続静注した際にも、胆汁中ビリルビン排泄率は正常ラットと同様に緩徐に低下した。一方、EHBR に FUDCA を持続静注すると、胆汁中ビリルビン排泄率は静注開始 30 分後までは一旦軽度増加し生理食塩水静注時を有意に上回っていたが、静注開始 60 分以降は急激に低下し、いずれの時点においても、生理食塩水静注時の値を下回っていた(Fig. 5 左)。

また、EHBR に TUDCA を静注した際の胆汁中ビリルビン排泄率は、静注開始 30 分まで一旦軽度増加した後緩徐に低下したが、生理食塩水静注時における胆汁中

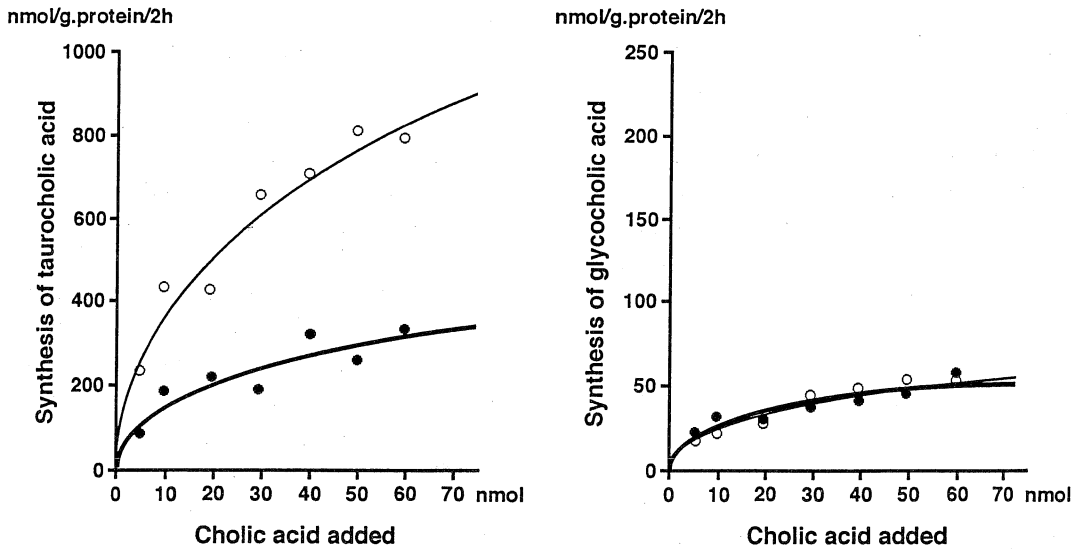


Fig. 4. Conjugation of cholic acid in EHBR and normal rats.

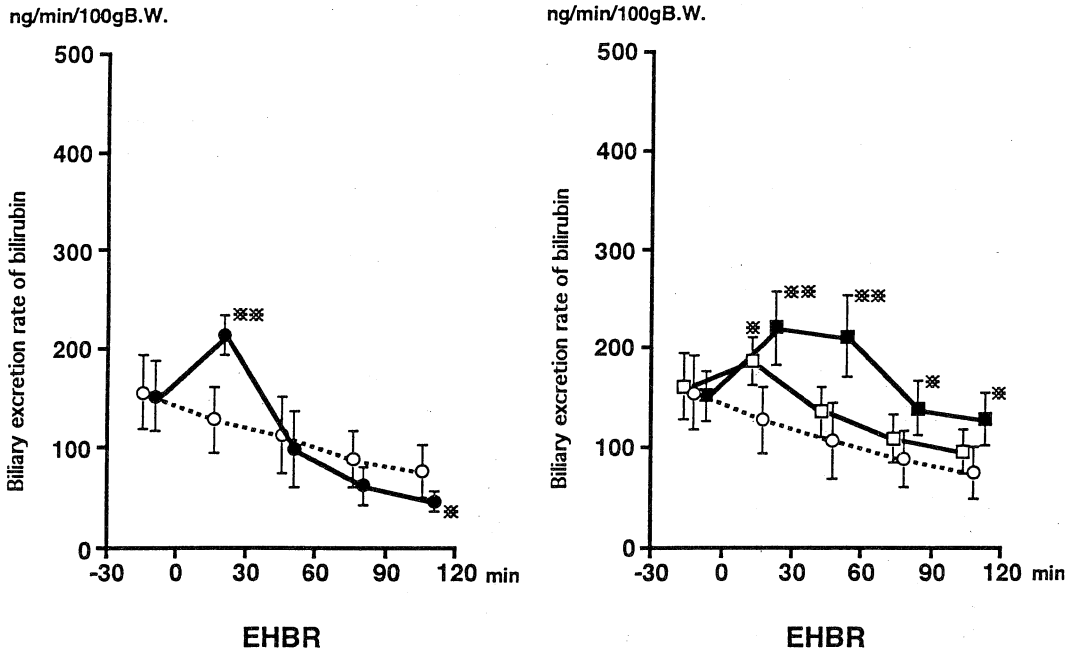


Fig. 5. Biliary excretion rate of bilirubin under the continuous intravenous infusion of FUDCA, TUDCA and GUDCA ($0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{gB. W.}$) in EHBR.

...○...Saline —●—FUDCA —■—TUDCA —□—GUDCA
 * $P < 0.05$ V. S. Saline ** $P < 0.01$ V. S. Saline

ビリルビン排泄率と比較すると、静注開始 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後のいずれにおいても有意に高値であった。一方、EHBR に GUDCA を静注した際も、静注開始 30 分後で一旦胆汁中ビリルビン排泄率は生理食塩

水静注時より有意に増加したが、その後は漸減し、生理食塩水静注時との間に有意差を認めなかった(Fig. 5 右)。また静注開始 60 分後において TUDCA 群の値は GUDCA 群の値より有意に ($P < 0.05$) 高値を示した。

この120分間の胆汁中ビリルビン総排泄量は、生理食塩水群 $10.6 \pm 1.8 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, FUDCA 群 $8.9 \pm 1.4 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, TUDCA 群 $18.2 \pm 3.2 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, GUDCA 群 $14.4 \pm 2.6 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$ となり、FUDCA 静注時には生理食塩水静注時に比して胆汁中ビリルビン総排泄量が低値である傾向にあった。一方、TUDCA および GUDCA 静注時には生理食塩水静注時と比較して、胆汁中ビリルビン総排泄量が有意に ($P < 0.01$, $P < 0.01$) 高値であった。

5) β アラニン投与ラットの肝タウリンおよびグリシン量

β アラニン投与ラットの肝タウリン量 ($0.73 \pm 0.42 \mu\text{mol}/\text{mg liver}$) はコントロール ($1.99 \pm 0.41 \mu\text{mol}/\text{mg liver}$) の約 40% にまで低下していた。一方、肝グリシン量については β アラニン投与ラット ($0.62 \pm 0.27 \mu\text{mol}/\text{mg liver}$) とコントロール ($0.67 \pm 0.24 \mu\text{mol}/\text{mg liver}$) の間に差を認めなかった (Fig. 6)。

6) β アラニン投与ラットの胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす FUDCA, TUDCA および GUDCA 持続静注の影響 (Fig. 1. プロトコル④)

β アラニン投与ラットに生理食塩水を持続静注した際の胆汁中ビリルビン排泄率は緩徐に低下した。一方、 β アラニン投与ラットに FUDCA を持続静注すると、胆汁中ビリルビン排泄率は静注開始 30 分までは一旦軽度増加し、生理食塩水静注時のビリルビン排泄率に比して有意に高値であったが、静注開始 60 分以後は急激に低下し、いずれの時点においても、生理食塩水静注時の値を下回

っていた (Fig. 7 左)。

TUDCA および GUDCA 静注時の胆汁中ビリルビン排泄率は静注開始 30 分までは一旦軽度増加し、その後緩徐に低下したが、生理食塩水静注時の値と比較すると、高値の傾向にあった (Fig. 7 右)。

この120分間の胆汁中ビリルビン総排泄量を比較すると、生理食塩水群 $16.9 \pm 3.0 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, FUDCA 群 $14.9 \pm 3.1 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, TUDCA 群 $23.9 \pm 2.6 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, GUDCA 群 $22.9 \pm 3.5 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$ となり、FUDCA 静注時には胆汁中ビリルビン総排泄量が生理食塩水静注時より低値の傾向にあるが、TUDCA および GUDCA 静注時には有意に ($P < 0.01$, $P < 0.01$) 高値であった。

7) 正常ラットの胆汁中ビリルビン排泄に及ぼすタウリンと FUDCA およびグリシンと FUDCA 同時投与の影響 (Fig. 1. プロトコル⑤)

FUDCA $1.2 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{gB.W.}$ とともにタウリンを同時投与すると、正常ラットにおける胆汁中ビリルビン排泄率は低下することなく、経時的に増加しつづけた。

一方、グリシンを同時投与した際には、胆汁中ビリルビン排泄率は投与 30 分まで一旦軽度増加した後、緩徐に低下したが、静注開始 90 分の時点でも生理食塩水投与時よりも高値を示した (Fig. 8)。

さらに、この際の120分間の胆汁中ビリルビン総排泄量をみると、生理食塩水投与時、タウリンと FUDCA 同時投与、グリシンと FUDCA 同時投与時においてそれぞ

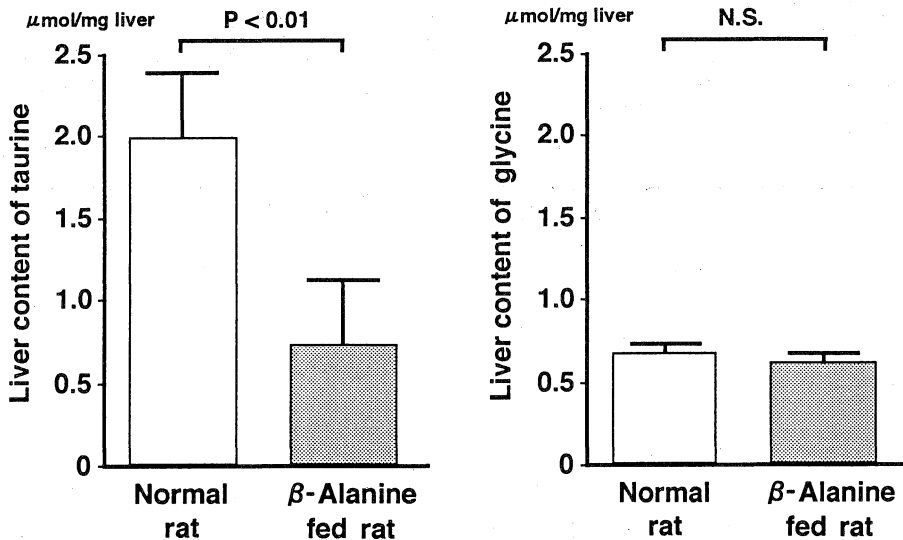


Fig. 6. Liver content of taurine and glycine in β -Alanine fed rats.

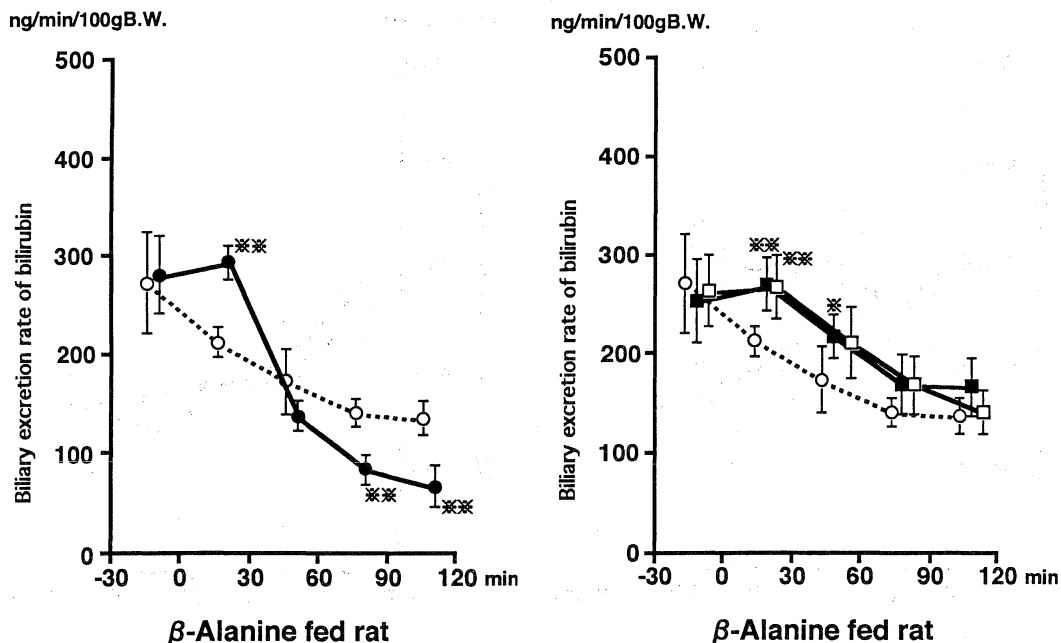


Fig. 7. Biliary excretion rate of bilirubin under the continuous intravenous infusion of FUDCA, TUDCA and GUDCA ($0.6 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{gB.W.}$) in β -Alanine fed rats.

···○···Saline —●— FUDCA —■— TUDCA —□— GUDCA
 * $P < 0.05$ V. S. Saline ** $P < 0.01$ V. S. Saline

れ $19.2 \pm 1.5 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, $31.4 \pm 4.4 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$, $23.9 \pm 4.2 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$ となり、タウリンあるいはグリシン同時投与時には生理食塩水投与時と比較して胆汁中ビリルビン総排泄量が有意に ($P < 0.01$, $P < 0.01$) 高値であった。

8) 正常ラットの胆汁中ビリルビン排泄に及ぼすタウリンあるいはグリシン持続投与の影響 (Fig. 1. プロトコール⑤)

生理食塩水の持続静注時にタウリンあるいはグリシンを腹腔内投与した際における胆汁中ビリルビン排泄率は生理食塩水単独投与時と同様の推移をたどり、各々の間に有意な差はなかった (Fig. 9)。

9) 正常ラットの胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす UDCA-gI 持続静注の影響 (Fig. 1. プロトコール⑥)

正常ラットに UDCA-gI ($0.3 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{gB.W.}$) を持続静注すると胆汁中ビリルビン排泄率は静注直後から急激に低下し、常に生理食塩水静注時を下回った (Fig. 10)。

その際の胆汁中ビリルビン総排泄量を比較すると、UDCA-gI 静注時 ($8.5 \pm 1.7 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$) は、生理食塩水静注時 ($19.2 \pm 1.5 \mu\text{g}/100 \text{gB.W.}/2 \text{hr}$) と比較して有意 ($P < 0.01$) に低値であった。

考 察

ある種の胆汁酸に強力な利胆作用のあることは古くから知られていたが、細胞障害作用を有するため、従来肝疾患患者に対する胆汁酸製剤の投与は禁忌とされてきた。しかしながら最近、胆汁酸製剤のひとつであるウルソデオキシコール酸は細胞障害性をほとんど示さず、むしろ肝細胞保護作用を持つことが明らかとなったため、急性肝内胆汁うっ滞の治療薬^{1),2)}として用いられるようになった。さらに今日では、ウルソデオキシコール酸は薬剤性およびウイルス性肝内胆汁うっ滞のみならず、慢性進行性の肝内胆汁うっ滞症である原発性胆汁性肝硬変に対しても有効かつ安全な薬剤であるとの成績^{3),4),19)-21)}があいついで報告されてきている。この様にウルソデオキシコール酸が肝内胆汁うっ滞に有効である機序としては、胆汁中重炭酸イオン濃度の上昇を伴う特異な利胆作用、肝細胞保護作用、細胞障害性をもつ内因性胆汁酸との置換などがあげられてきた。なかでも、その強力な利胆作用が注目を集めており、胆汁流量、胆汁中胆汁酸排泄および胆汁中重炭酸イオン排泄などに関する多数の報告⁹⁾⁻¹⁰⁾が見られる。しかしながら、胆汁中ビリルビン排泄に及ぼすウルソデオキシコール酸の影響を直接的に検討

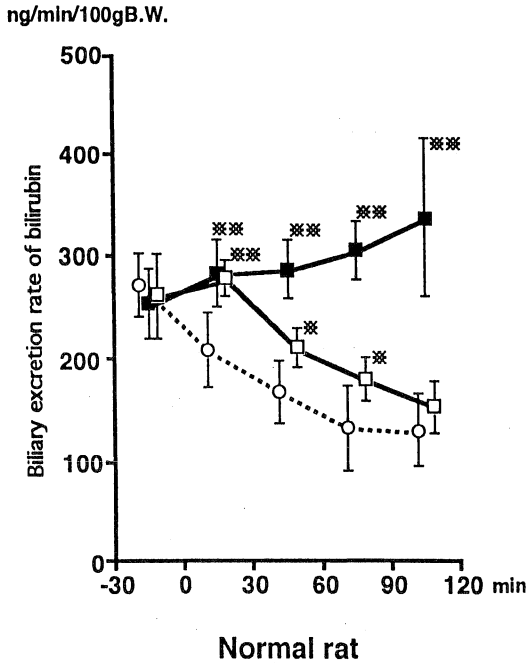


Fig. 8. Effect of taurine and glycine on biliary excretion rate of bilirubin under the continuous intravenous infusion of FUDCA (1.2 μ mol/min/100 gB. W.) in normal rats.
 ...○...Saline —■—Taurine+FUDCA
 —□—Glycine+FUDCA
 ※P<0.05 V. S. Saline
 ※※P<0.01 V. S. Saline

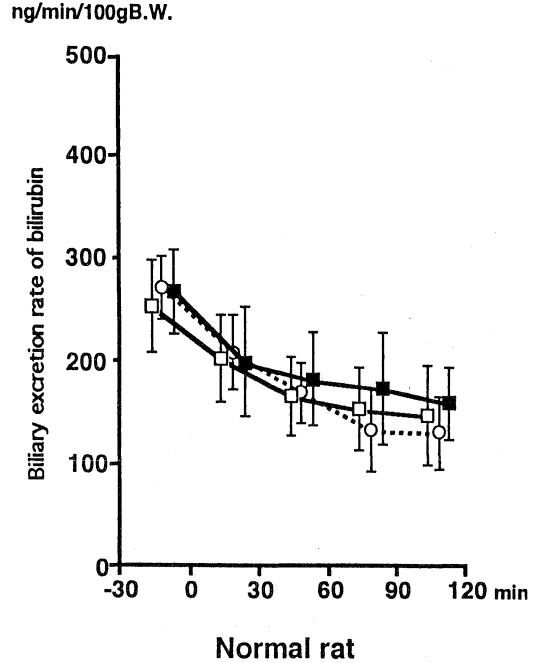


Fig. 9. Effect of taurine and glycine on biliary excretion rate of bilirubin under the continuous intravenous infusion of Saline in normal rats.
 ...○...Saline —■—Taurine+Saline
 —□—Glycine+Saline

した報告は見あたらず、その様な視点からの検討が必要であると考えられた。

また現在、肝内胆汁うっ滞の治療薬としては遊離型ウルソデオキシコール酸が用いられているが、遊離型胆汁酸の大部分は肝細胞内においてタウリンあるいはグリシン抱合をうけて胆汁中へ排泄されることが知られている。タウリンおよびグリシン抱合の生理的意義については、1) 胆汁酸の水溶性を増して胆汁排泄を促進する。2) 胆汁酸の細胞障害性を軽減する。3) ミセル形成能を高めることにより、胆汁酸の胆汁中におけるコレステロール溶存作用および腸管における脂質吸収促進作用を強化するなどの点が指摘されており、肝内胆汁うっ滞に対してもタウリンおよびグリシン抱合型胆汁酸は遊離型胆汁酸よりも高い有効性を示す可能性がある。しかしながら、ウルソデオキシコール酸の抱合形式の差が胆汁中ビリルビン排泄に及ぼす影響を検討した報告はみられない。そこで、筆者は種々の実験系において、遊離型、タウリン抱合型ならびにグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸を

投与して、胆汁中ビリルビン排泄を検討した。

まず、正常ラットに遊離型、タウリン抱合型ならびにグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸(0.6 μ mol/min/100 gB. W.)を持続静注したところ、いずれの胆汁酸の場合にも、胆汁中ビリルビン排泄は促進された。次に、肝内胆汁うっ滞のモデルとして最近注目されているEHBR²²⁾⁻²⁴⁾についても同様の検討をおこなった。本研究にこのラットを用いた理由は、予備実験でおこなった胆汁酸分析において、本ラットでは血清および胆汁中の遊離型胆汁酸が増加していた²⁵⁾からで、EHBRにおける胆汁酸抱合能を今回検討したところ、本ラットでは胆汁酸のグリシン抱合能に異常はないが、タウリン抱合能が正常ラットの約1/2に低下していることが明らかとなった。かかるタウリン抱合能の低下したEHBRに遊離型、タウリン抱合型ならびにグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸を持続静注すると、タウリンおよびグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸は正常ラットの場合と同様に胆汁中ビリルビン排泄を促進した。しかしながら、EHBRにおいては遊離型ウルソデオキシコール酸は正常ラットとは異なり、むしろ胆汁中ビリルビン排泄に抑制的に働くことが明らかとなった。すなわち、遊離型ウ

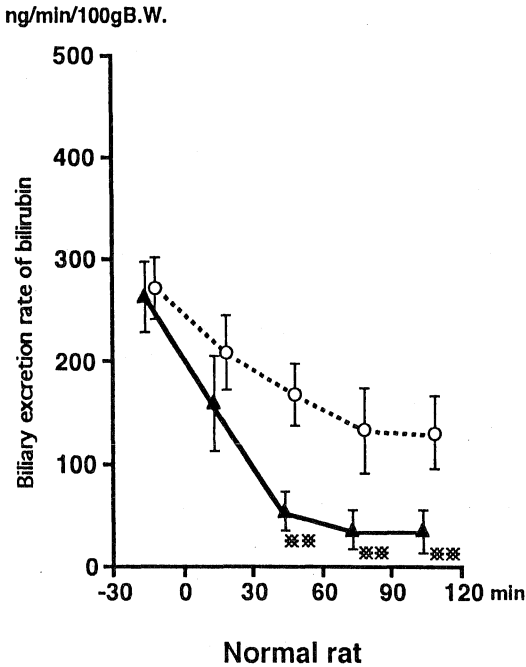


Fig. 10. Biliary excretion rate of bilirubin under the continuous intravenous infusion of UDCA-gl (0.3 μ mol/min/100 g B. W.) in normal rats.

...○...Saline —▲—UDCA-gl
 ※※P<0.01 V. S. Saline

ルソデオキシコール酸はタウリンあるいはグリシンと抱合されることにより、胆汁中ビリルビン排泄を促進するようになると考えられた。

次に、タウリンの尿中排泄を促進することにより、肝タウリン量を低下させる β アラニン¹⁷⁾をラットに投与して、タウリン減少ラットを作製し、同様の検討をおこなった。その結果、タウリン減少ラットでもEHBRの場合と同様に、タウリンおよびグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸は胆汁中ビリルビン排泄を促進したが、遊離型ウルソデオキシコール酸はむしろ胆汁中ビリルビン排泄を抑制した。すなわち、遊離型ウルソデオキシコール酸は肝タウリン量が正常である場合には、胆汁中ビリルビン排泄を促進させたが、肝タウリン量が低下している場合には、胆汁中ビリルビン排泄を抑制することが明らかとなり、胆汁中ビリルビン排泄における胆汁酸抱合の重要性が再確認できた。

さらに、正常ラットにおいても、遊離型ウルソデオキシコール酸の静注量を体重100gあたり1.2 μ mol/minに増加させると、ビリルビン排泄はむしろ抑制されたが、この現象は、遊離型ウルソデオキシコール酸静注量の増

加により、 β アラニンを投与した場合と同様に、肝内タウリンの枯渇状態が生じたためと考えられる。

木谷・金井²⁰⁾はラットに体重100gあたり1.2 μ mol/minの遊離型ウルソデオキシコール酸を持続静注すると、当初は胆汁流量と胆汁中胆汁酸排泄率はともに平行して増加するが、静注開始60分以後では胆汁流量は増加し続けるにもかかわらず、胆汁酸排泄率は低下すると報告している。筆者も、同じモデルにおいて胆汁流量と胆汁中胆汁酸排泄率の乖離現象を観察している。木谷・金井はその乖離現象の原因として肝内タウリンの枯渇²⁷⁾を挙げている。すなわち、比較的大量の遊離型ウルソデオキシコール酸の持続静注により、肝において遊離型ウルソデオキシコール酸のタウリン抱合が急激におこなわれ、肝内タウリンの枯渇と胆汁中へのタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸の排泄の低下を招くことから説明できるとしている。一方、滝川²⁸⁾らは、遊離型ウルソデオキシコール酸持続静注時に胆汁流量と胆汁中胆汁酸排泄率が乖離するように見えるのは、グルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸を測定していないために起こる見掛けの現象であり、胆汁中グルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸排泄率を勘案して算出した胆汁中胆汁酸排泄率と胆汁流量の間には乖離はなく、両者は常にパラレルな関係を保っていると報告している。このグルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸は、遊離型ウルソデオキシコール酸が大量に持続静注された場合に、しかも肝内のタウリンが枯渇し、タウリン抱合型ウルソデオキシコール酸の胆汁中排泄が低下する時期に一致して胆汁中に排泄されるようになる²⁹⁾と考えられており、木谷・金井と滝川らの説は遊離型ウルソデオキシコール酸大量持続静注により肝内タウリンが枯渇するという点に関しては一致していると思われる。

以上のように、遊離型ウルソデオキシコール酸大量投与による肝内タウリンの低下が胆汁中ビリルビン排泄に影響を及ぼすことが判明したため、次に、遊離型ウルソデオキシコール酸(1.2 μ mol/min/100 g B. W.)と抱合基質であるタウリンならびにグリシンの同時投与をおこない、胆汁中ビリルビン排泄を観察した。抱合基質を同時投与した際には遊離型ウルソデオキシコール酸静注量を増加させても、胆汁中ビリルビン排泄の抑制は起こらず、むしろ著明な促進が認められた。

したがって、肝に十分な抱合基質が存在し、遊離型ウルソデオキシコール酸が抱合を受けることができれば、遊離型ウルソデオキシコール酸は胆汁中ビリルビン排泄を増加させると考えられる。この際に、タウリンの効果がグリシンの効果を凌駕した点の解釈は難しいが、外因

性にタウリンおよびグリシンを与えるとタウリンの方が抱合基質として優先的に消費されること^{29),30)}が判明しており、タウリンとグリシンの抱合基質としての bioavailability の差が影響した可能性が考えられる。

さらに、胆汁うっ滞時に増加することが知られているグルクロン酸抱合型胆汁酸^{31),32)}のひとつであるグルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸を正常ラットに持続静注したところ、胆汁中ビリルビン排泄は投与直後から著明に抑制された。したがって、グルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸は、タウリンあるいはグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸とは異なり、むしろ胆汁中ビリルビン排泄を抑制すると考えられた。

従来、グルクロン酸抱合は胆汁酸の水溶性を著しく増加させ、その尿中排泄を促進することにより、胆汁酸代謝の homeostasis を維持する方向に作用して、胆汁うっ滞時に合目的役割を果たすとされてきた^{12),13)}。しかしながら最近、グルクロン酸抱合型リトコール酸は遊離型リトコール酸よりもむしろ胆汁うっ滞作用の強いことが報告¹⁴⁾されており、今回の結果を考え併せると、肝内胆汁うっ滞におけるグルクロン酸抱合の意義は問い直されるべきであると考えられる。グルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸が胆汁中ビリルビン排泄を抑制する機序については、遊離型、タウリン抱合型ならびにグリシン抱合型などの胆汁酸とは異なり、グルクロン酸抱合型胆汁酸は肝から胆汁への移送経路がビリルビンと共通であること³³⁾が関係している可能性がある。

最後に、タウリン抱合が低下するような条件下で遊離型ウルソデオキシコール酸を投与すると胆汁中ビリルビン排泄が何故抑制されるかという点であるが、まず、胆汁中胆汁酸排泄の低下が関与している可能性がある。なぜならば、ビリルビンは胆汁中では複合ミセルとして存在しており、胆汁酸の非存在下では存在しえず、両者の胆汁排泄は coupling しているものと考えられている。したがって、大量の遊離型ウルソデオキシコール酸投与により肝内タウリンが枯渇して、胆汁中胆汁酸排泄が低下すると、ビリルビンの排泄が低下する可能性がある。また、遊離型に比してタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸はミセル形成能が高いため、胆汁酸、なかんずくタウリン抱合型胆汁酸の低下は、胆汁中ビリルビン排泄の低下に拍車をかけることとなりうる。

つぎに、肝内タウリンの枯渇とグルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸の出現との関連も想定される。すなわち、グルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸は肝内タウリンの枯渇が想定されるような大量の遊離型ウルソデオキシコール酸をラットに投与した際に出現²⁸⁾す

るとされており、ともあれ、グルクロン酸抱合型ウルソデオキシコール酸をラットに投与すると胆汁中ビリルビン排泄が著明に抑制された事実を考え併せると、本抱合体は遊離型ウルソデオキシコール酸投与時にみるビリルビン排泄の抑制に関与して可能性がある。

結 論

胆汁中へのビリルビン排泄に及ぼす各種抱合型ウルソデオキシコール酸の影響を検討し、以下の成績を得た。

1. 正常ラットでは、遊離型、タウリン抱合型およびグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸(0.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$)のいずれもが胆汁中ビリルビン排泄を促進した。

2. 胆汁酸タウリン抱合能の低下している EHBR では遊離型ウルソデオキシコール酸は胆汁中ビリルビン排泄を抑制したが、タウリン抱合型およびグリシン抱合型ウルソデオキシコール酸は胆汁中ビリルビン排泄を促進した。

3. β アラニン投与により肝タウリン量を低下させたラットでは、EHBR と同様の結果が得られた。

4. 正常ラットにおいても遊離型ウルソデオキシコール酸静注量を 1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ にまで増加させるとビリルビンの排泄は抑制された。

5. 抱合基質であるタウリンまたはグリシンを遊離型ウルソデオキシコール酸と同時に投与すると、遊離型ウルソデオキシコール酸の投与量を 1.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$ に増加させても、胆汁中ビリルビン排泄は抑制されず、むしろ著明な促進をみた。その際、特にタウリン同時投与でその効果は著明であった。

6. UDCA-gl(0.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ gB.W.}$)は正常ラットにおいて胆汁中ビリルビン排泄を著明に抑制した。

7. 以上の成績から遊離型ウルソデオキシコール酸が利胆効果を発揮するには、十分な抱合基質の存在下で抱合を受ける必要があり、ビリルビン排泄における胆汁酸抱合、特にタウリン抱合の重要性が明らかとなった。

謝 辞

本稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師辻井 正教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御助言、御校閲を賜りました生化学教室神谷 知彌教授ならびに病態検査学教室中野 博教授に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり常に御指導、御助言をいただいた福井 博助教授、山尾純一助手ならびに御助力

いただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 大西弘生, 森脇久隆, 高村敦子, 友田 隆, 名倉一夫, 加藤正孝, 山田昌夫, 武藤泰敏, 清島 満, 清水 勝, 小島正夫, 林 真功, 大橋三興治: 日消誌. 85: 2420-2429, 1988.
- 2) 辻井 正, 久保良一, 高谷 章: 肝胆膵 11: 911-919, 1986.
- 3) Poupon, R., Chretien, Y., Poupon, R. E., Ballet, F., Calmus, Y. and Darnis, F.: Lancet 1: 834-836, 1987.
- 4) Calmus, Y., Gane, P., Rouger, P. and Poupon, R.: Hepatology 11: 12-15, 1990.
- 5) Kitani, K. and Kanai, S.: Life Sci. 30: 515-523, 1982.
- 6) 森田倫史, 久保良一, 坂口嘉一: Tokyo Tanabe Quarterly 臨時増刊: 32-41, 1988.
- 7) 森田倫史, 辻井 正: 日消誌. 84: 2020, 1987.
- 8) Kitani, K. and Kanai, S.: Life Sci. 29: 269-275, 1981.
- 9) Dumont, M., Erlinger, S. and Uchman, S.: Gastroenterology 79: 82-89, 1980.
- 10) Renner, E. L., Lake, J. R. and Cragoe, E. J.: Am. J. Physiol. 254: G232-241, 1988.
- 11) Palmer, R. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. 58: 1047-1050, 1967.
- 12) Makino, I., Hashimoto, H. and Shinozaki, K.: Gastroenterology 68: 545-553, 1975.
- 13) Summerfield, J. A., Cullen, J., Barnes, S. and Billing, B. H.: Clin. Sci. Mol. Med. 52: 51-65, 1977.
- 14) Oelberg, D. G., Chari, M. V., Little, J. M., Adcock, E. W. and Lester, R.: J. Clin. Invest. 73: 1507-1514, 1984.
- 15) Jendrassik, L.: Biochemistry 289: 1-14, 1966.
- 16) Gottfries, A., Schersten, T. and Ekdahl, P. H.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18: 643-653, 1966.
- 17) Shaffer, J. E. and Kocsis, J. J.: Life Sci. 28: 2727-2736, 1981.
- 18) Deyl, Z.: J. Chromatography 379: 177-250, 1986.
- 19) 星野 潮, 村脇義和, 周防武昭, 川崎寛中: 臨床成人病 22: 315-319, 1992.
- 20) 水野恭嗣, 鶴浦雅志, 木谷 恒, 稲垣 豊, 金子周一, 小林健一, 服部 信, 中沼安二: 肝臓 31: 86-92, 1990.
- 21) 田中直見, 松崎靖司, 土井幹雄: 肝臓 32: 1204-1206, 1991.
- 22) 井上正康, 杉 和洋, 川元俊二: 肝胆膵 17: 193-200, 1988.
- 23) Mikami, T., Nozaki, M. and Tagaya, T.: Congen. Anom. 26: 250-251, 1986.
- 24) 杉 和洋, 川元俊二, 井上正康: 薬理と治療 18: 301-306, 1990.
- 25) 松村吉庸, 坂口嘉一, 山尾純一, 久保良一, 森田倫史, 辻井 正: 日消誌. 86: 521, 1989.
- 26) Kitani, K. and Kanai, S.: Life Sci. 31: 1973-1985, 1982.
- 27) Kitani, K. and Kanai, S.: Jap. J. Physiol. 35: 443-462, 1985.
- 28) Takikawa, H., Sano, N., Narita, T. and Yamanaka, M.: Hepatology 11: 743-749, 1990.
- 29) Garbutt, J. T., Heaton, K. W., Lack, L. and Tyor, M. P.: Gastroenterology 56: 711-720, 1969.
- 30) Sjovall, J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100: 676-678, 1959.
- 31) Back, P.: Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 749-752, 1974.
- 32) Takikawa, H., Otsuka, H., Beppu, T., Seyama, Y. and Yamakawa, T.: Digestion 27: 189-195, 1983.
- 33) Takikawa, H., Sano, N., Uchida, Y., Yamanaka, M., Horie, T., Mikami, T. and Tagaya, O.: Hepatology 14: 352-360, 1991.