胆汁酸の臨床分析化学的研究と薬物代謝

後藤 順一

Bio-Analytical Studies of Bile Acids

Junichi GOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai

Summary: Bile acids are synthesized from cholesterol in the liver excreted into duodenum via the bile duct as their glycine and taurine conjugates, and converted in part into secondary bile acids by intestinal bacteria. It is well-known that further hydroxylation at C-1, -2, -4, -6 and -19, and conjugation at C-3 with glucuronic acid or sulfuric acid take place in the liver. In this paper bio-analytical studies on bile acids by hyphenated mass spectrometry related to drug metabolism will be discussed.

In the first, to clarify an extrahepatic reduction system, ^{18}O labeled 3-oxo bile acids were synthesized and after incubation with human blood, biotransformed products were separated and characterized by GC-MS. The 3-oxo group was reduced into the 3 α - and 3 β -hydroxyl function catalyzed by the enzyme(s) in human red blood cells. This result strongly implies that biologically active compounds such as drugs with the oxo group are also transformed into hydroxylated metabolites in human blood.

On the biosynthesis of bile acids, the final step involving the oxidative cleavage of a side chain of 5 β -cholestanoic acid, which has a chiral center at C-25, to form primary bile acids takes place in the peroxisomes. From a stereochemical point of view, the dehydrogenation mechanism of the biotransformation of 5 β -cholestanoic acid into (24*E*)-5 β -cholest-24-enoic acid was then studied with GC-MS. Substrates labeled with ^2H at C-24 and C-25 stereoselectively were incubated with a rat liver light mitochondrial fraction and the stereospecific elimination of a *pro-R* hydrogen at C-24 in both (25*R*)- and (25*S*)-cholestanoic acids indicating *syn*-elimination for the former, whereas *anti*-elimination for the latter was observed. When CoA thioesters of (25*R*)- and (25*S*)-5 β -cholanoic acids were incubated individually with a rat liver peroxisomal fraction, rapid epimerization to form an equal mixture of stereoisomers from either direction was occurred. Moreover only the 25*S* antipode was easily transformed into dehydrogenated 5 β -cholestanoic acid by peroxisomal acyl-CoA oxidase.

The conjugation of carboxylic acids with D-glucuronic acid to form acyl glucuronides plays a significant role in the metabolism and disposition of drugs. The formation of 24-acyl glucuronides of bile acids in the rat liver are also discussed.

Key words: Red blood cell, Reductase, Peroxisome, β -oxidation, Acyl-CoA oxidase, Acyl glucuronide, Epimerase

はじめに

我々の研究室では胆汁酸、ステロイドホルモンを例として取り上げ、クロマトグラフ法、質量分析法、免疫測定法等を組み合わせることで生体内微量生理活性物質の超高度分析を可能とするハイファネーテッド型やハイブリッド型測定法の開発と、それら方法論の生命科学研究への応用が大きな研究テーマの一つとなっている。この理由には胆汁酸、ステロイドホルモンが内因性物質であるとともに、同族体が薬物としても広く用いられており、生理活性発現や生合成機構の解明、さらには代謝研究の題

材として格好な対象である点があげられる。たとえば胆汁酸は酸化、還元といった一次反応とともに、アミノ酸、グルクロン酸、硫酸、N-アセチルグルコサミン、グルコース等との抱合反応、いわゆる二次代謝反応を受ける。また、ステロイド核を持っており、その立体構造、反応性といった物性も比較的把握しやすく、クロマトグラフ的挙動や蛋白など生体分子との間の相互作用の解析も立体化学的観点から考察を加えることも可能である。

本稿では当研究室における胆汁酸に関する近年の研究成果を、薬物代謝との関連から概説してみたい。

胆汁酸 3 位カルボニル基の還元活性

先に我々は疾病と胆汁酸の生合成、代謝との関係を明らかにする目的で、負イオン検出ガスクロマトグラフィー (GC)-マッススペクトロメトリー (MS) による検出感度 10^{-18} mol という高感度分析法を構築し¹⁾、ヒト肝組織中および血液中胆汁酸を測定し、両者を比較してみた²⁾。その結果、胆汁酸のプロファイルは母核の構造、抱合形式で全て一致したが、ウルソデオキシコール酸 ($3\alpha,7\beta$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid; UDCA) 投与患者においてのみ両者に違いが見られた。すなわち、血液中には UDCA と 3 位水酸基の配位の異なる $3\beta,7\beta$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid の存在が確認されたが、肝組織中には認められなかった。しかも、他の胆汁酸がグリシンあるいはタウリン抱合型であるのに対し、この 3-エピ UDCA は遊離型としてのみ存在した。ちょうどその頃、旭川医科大学の牧野教授より、デヒコール ($3,7,12$ -trioxo- 5β -cholanoic acid) 静注後の患者血液中に 5 分以内というきわめて早い時期から 3α -HSD (3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ; 5β -ステロイド- 3α -ヒドロキシ構造を持つ胆汁酸を 3-オキシ体に変換する酸化・還元酵素) に応答する代謝産物が血液中出现することから、その構造決定の依頼を受けた。GC-MS および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により検討したところ、代謝物は 3 位カルボニル基の還元された $7,12$ -dioxo- 3α -hydroxy- 5β -cholanoic acid とその 3β -ヒドロキシ体であり、いずれも遊離型のみであることが判った³⁾。一般に肝臓に取り込まれた胆汁酸は、グリシン、タウリンとのアミノ酸抱合体として胆汁中に排泄され (疾病によっては一部が血液中に漏れ出る)、腸より再吸収された後肝臓へと戻る。このときその一部

が血液中に移行するが、この一連の腸肝循環には通常健康人で 15~20 分、肝炎、肝硬変症等の病態では 1 時間近くもかかる。5 分以内で代謝物が出現するという事実は、デヒコールが肝臓に取り込まれる前に代謝を受けることを示しており、血液中での変換が示唆された。

これを証明すべくトレーサーとして酸素 18^{18}O 標識 3-オキシ胆汁酸を調製し、種々検討した結果、赤血球画分に 3 位カルボニル基を 3α - と 3β -水酸基に還元する酵素の存在することが判明した (Fig. 1)⁴⁾。本酵素活性はきわめて高い。従来、胆汁酸の代謝の場は主に肝臓で営まれるとされ、その他では腎臓や腸内細菌が知られているが、今回の事実は核のない赤血球をも代謝の場として考慮する必要があることを示しており、薬物においても同様のことがいえよう。

C27 胆汁酸 C-25 位の酵素的立体異性化反応

胆汁酸は肝臓でコレステロールより生合成される。すなわち、ステロイド核上 7α 位が水酸化された後、A、B 環の変換を受け 3α -ヒドロキシ- 5β -ステロイドに誘導される。ついで 26 位が酸化されて 5β -コレストアン酸 (5β -cholestanoic acid; C27 胆汁酸) に導かれ、ペルオキシソームにおいて β -酸化によりコール酸 ($3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid; CA) およびケノデオキシコール酸 ($3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid; CDCA) へと変換される。Zellweger 症候群患者ではペルオキシソームが欠損しているため、本疾病の鑑別において C27 胆汁酸の存在が重要となる (Fig. 2)。先の負イオン検出 GC-MS による高感度測定法を同様開発し、患者に適用するとともに⁵⁾、この胆汁酸が C-25 位に不斉中心を持つことから、 $25R$ 体と $25S$ 体の分離測定を目的として 3 位水酸基を介する蛍光誘導体法と

Fig. 1 胆汁酸 3 位カルボニル基の還元

Fig. 2 胆汁酸の生合成経路

HPLC を組み合わせる手法を考案し⁶⁾, Zellweger 症候群患者尿中 C27 胆汁酸を測定した. その結果, 側鎖 (26 位) カルボキシル基の遊離型では 25*R* 体のみであるのに対し, CoA チオエステルを経て生成されるグリシンおよびタウリン抱合体では 25*S* 体とのほぼ 1 : 1 混合物であることが判明した⁷⁾. C27 胆汁酸の側鎖構造は, 生体内での立体異性化反応の知られている 2-アリールプロピオン酸系抗炎症薬の部分構造とよく似ており, しかもこの異性化反応も CoA チオエステルが重要な役割を担っている.

そこでこれまでの実験事実を説明するため, まず C-24 および -25 位に立体特異的に重水素を導入した基質を調製し, ペルオキシソームにおける胆汁酸生合成の初発反応である脱水素反応における C-25 位水素の脱離の様相に検討を加えた (Fig. 3). すなわち, [24,25-²H₂]あるいは [24,25-²H₂]3α,7α,12α-trihydroxy-5β-cholestan-28-oic acid をラット肝軽ミトコンドリア画分とインキュベートし, 生成する脱水素体 3α,7α,12α-trihydroxy-5β-cholestan-28-oic acid (Δ²⁴-C27 胆汁酸) を負イオン検出 GC-MS にて分析し, 分子中の重水素の保持率を測定した. その結果, 25*S* 体では脂肪酸の場合と同様にトランス (アンチ) 脱離で反応が進行しているが, 25*R* 体ではシス (シン) 型で水素が脱離しており,

両者の脱離の様相が異なっていた. ちなみに生成する Δ²⁴-C27 胆汁酸はいずれからでも 24*E* 型である. これらの結果から, 水素脱離に先立つ 25*R* 体の立体異性化がより強く示唆された.

ついで, この異性化反応を証明するため (25*R*)-および (25*S*)-C27 胆汁酸 CoA チオエステルを新たに合成し (ペルオキシソーム画分には CoA 合成酵素が含まれていない), 光学対掌体の分離に優れる液体クロマトグラフィー (LC) と大気圧イオン化 (APCI) およびエレクトロスプレーイオン化 (ESI)-MS を用い, ラット肝ペルオキシソーム画分における異性化の様相に検討を加えた. その結果, きわめて早い速度で酵素的に異性化され, いずれの立体異性体からも 25*R* 体と 25*S* 体のほぼ 1 : 1 混合物を与えることが判明した⁸⁾. この異性化反応速度は, Δ²⁴-C27 胆汁酸を生成する脱水素反応の速度よりけた違いに大きいことから, 脱水素酵素をラセマーゼと分離精製後, Δ²⁴-C27 胆汁酸への変換の様相を調べたところ, 25*S* 体のみから Δ²⁴ 体が生成し, 25*R* 体はこの酵素の基質にならないことが判明した. したがって生体内で (25*R*)-C27 胆汁酸が生合成された後, ラセマーゼにより 25*S* 体へと異性化され, ついで β-酸化を受けて胆汁酸へと変換されるものと結論される (Fig. 4). C27 胆汁酸 C-25 位の異性化に関わるラセマーゼはミト

Fig. 3 ペルオキシソーム画分における C27 胆汁酸の β -酸化 Fig. 4 生体内における C27胆汁酸 C-25 位異性化と β -酸化

コンドリアやサイトソールにも存在し、しかもこの異性化反応は 2-アリールプロピオン酸系抗炎症薬 CoA チオエステルの添加により抑制された。このように胆汁酸の生合成に重要な役割を果たしている酵素が、薬物の異性化反応にも関与していることは興味深い。

胆汁酸のグルクロン酸抱合と蛋白付加体生成

胆汁酸は各種肝胆道疾患時において主に 3-サルフェート (3-S) に代謝され、尿中に排泄される。グルクロン酸抱合体へも変換され、1974年の Back ら⁹⁾による胆

汁酸グルクロニドの存在と構造の確認以来糖の結合位置は 3 位水酸基とされ、いわゆるエーテル型グルクロニドである。本抱合体も肝胆道疾患時に変動すると指摘されていることから、3-S¹⁰⁾と同様 ESI-MS による 3-グルクロニド (3-G) の高感度直接一斉分析法を確立し、病態時におけるそれらの動態を追跡した¹¹⁾。ところが疾病時に 3-S の尿中排泄量は大幅に増大し、健康人のその数十倍にも達するのに対し、3-G の尿中濃度はたかだか数倍程度であった。

グルクロン酸抱合は広範な有機化合物にみられる二次

Fig. 5 胆汁酸 3-および24-グルクロニドの構造

代謝反応で、これをつかさどるグルクロニルトランスフェラーゼの諸性質にもついていろいろな角度から検討が加えられている。胆汁酸に関しては Matern らがラジオアイソトープ標識リトコール酸 (3 α -hydroxy-5 β -cholanoic acid; LCA) を用いてラット肝グルクロニルトランスフェラーゼの基質特異性を吟味しており¹²⁾、酵素活性は比較的高くモノヒドロキシ体がジ-あるいはトリヒドロキシ体よりも容易にグルクロニドに変換されること、またグリシン抱合体は本酵素に対して遊離型と同様またはそれ以上の親和性を持つことを報告している。しかし、生成物の構造に関する確かな情報を得ているわけではない。

こうした尿中排泄量と肝酵素活性に関するこれまでの知見との違いを解明すべく、開発した ESI-MS による測定法を用いてラット肝胆汁酸グルクロニルトランスフェラーゼの性質について検討を加えた。遊離型胆汁酸をマイクロソームとインキュベートすると生成物を与えたが、MS による挙動は似ているものの 3-G とは LC における保持値が異なっていた。これを分取後、弱アルカリで処理したところ、基質の遊離型胆汁酸を与え、不安定なエステルグルクロニドであることが示唆された。そこで生成物をアセターメチルエステルに誘導し、LC-MS における挙動を精査した結果、C-24 位のカルボキシル基を介して生成したグルクロニド (24-G) であることが初めて明らかとなった¹³⁾ (Fig. 5)。一方、グリシンおよびタウリン抱合型胆汁酸を基質として用いたときには対応する生成物はまったく得られず、基質の回収に終わった。また、同一条件下で 3-G の生成はまったく見られず、これまでの定説とは異なり 24-G の生成の優先することが明らかとなった。

カルボキシル基を持つ薬物でもエステル型グルクロニ

ドの生成することが知られている。このエステルグルクロニドは化学的に不安定であり、2-アリールプロピオン酸系抗炎症薬ではヒト血漿アルブミンと付加体を生成することが報告されている¹⁴⁾。胆汁酸についても同様のことが考えられることから、標品を合成し¹⁵⁾これに検討を加えたところ、緩衝液中で蛋白と容易に付加体を与えることが判った。こうした事実は、LCA 投与時における胆汁うっ滞の生起との関係からも注目されよう。

おわりに

これまで薬物代謝を横に見ながら胆汁酸の臨床化学的研究を進めてきたが、最近では両者に似通った点が数多くあることに驚かされている。こうした研究が薬物代謝研究の役に立てば幸いである。最後に、1976年留学より帰国した著者に、『胆汁酸の臨床分析化学的研究』というすばらしい研究テーマをくださり、しかも今日まで温かくご指導を下さった恩師東北大学名誉教授、現星薬科大学長南原利夫先生に心より御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Goto, J., Miura, H., Inada, M., Nambara, T., Nagakura, T. and Suzuki, H.: Determination of bile acids in liver tissue by gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization detection. *J. Chromatogr.*, **452**: 119-129 (1988).
- 2) Nagakura, T., Suzuki, H., Miyazaki, Y., Otsuki, M., Goto, J., Nambara, T. and Toyota, T.: Determination of 3 β -hydroxylated bile acids in human serum and liver tissue. *Tohoku J. Exp. Med.*, **159**: 165-166 (1989).
- 3) Yoneda, M., Makino, I., Tamasawa, N., Takebe, K., Sakuraba, K., Goto, J. and Nambara, T.: The biotransformed metabolite profiles in blood after intravenous administration of dehydrocholic acid. *Am. J. Gastroenterol.*,

- 84: 290-295 (1989).
- 4) Goto, J., Miura, H., Ando, M., Yamato, Y., Ikegawa, S., Nambara, T. and Makino, I.: A novel enzyme system for the reduction of 3-oxo bile acids in human red blood cells. *Steroids*, **61**: 416-420 (1996).
 - 5) Goto, J., Miura, H. and Nambara, T.: Determination of 5 β -cholestanoic acids in human urine by gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization detection. *J. Chromatogr.*, **493**: 245-255 (1989).
 - 6) Goto, J., Gang, S., Miura, H. and Nambara, T.: Separation of C-25 epimers of 5 β -cholestanoic acids by high-performance liquid chromatography with precolumn fluorescence labeling. *Anal. Sci.*, **5**: 19-22 (1989).
 - 7) Goto, J., Shao, G., Miura, H. and Nambara, T.: Separation and characterization of C-25 epimers of unconjugated and conjugated trihydroxycholestanoic acids in urine from a patient with Zellweger syndrome by high-performance liquid chromatography. *J. Liquid Chromatogr.*, **12**: 1075-1084 (1989).
 - 8) Ikegawa, S., Goto, T., Watanabe, H. and Goto, J.: Stereoisomeric bio-inversion of (25*R*)- and (25*S*)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholestanonic acid CoA thioesters in rat liver peroxisome. *Enantiomer* (in press)
 - 9) Back, P., Spaczynski, K., Gerok, W.: Bile-salt glucuronides in urine. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**: 749-752 (1974).
 - 10) Ikegawa, S., Yanagihara, T., Murao, N., Watanabe, H. and Goto, J.: Separatory determination of bile acid 3-sulfates by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Mass Spectrometry*, **32**: 401-407 (1997).
 - 11) Ikegawa, S., Murao, N., Motoyama, T., Yanagihara, T., Niwa, T. and Goto, J.: Separation and detection of bile acid 3-glucuronides in human urine by liquid chromatography/ electrospray ionization-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **10**: 313-317 (1996).
 - 12) Matern, H., Matern, S., Schelzig, C., Gerok, W.: Bile acid UDP-glucuronyltransferase from human liver. Properties and studies on aglycone substrate specificity. *FEBS Lett.*, **118**: 251-254 (1997).
 - 13) Goto, J., Murao, N., Nakada, C., Motoyama, T., Yanagihara, T., Niwa, T. and Ikegawa, S.: Separation and characterization of carboxyl-linked glucuronides of bile acids in incubation mixture of rat liver microsomes. *Steroids*, in press.
 - 14) Ding, A., Ojingwa, J. C., McDonagh, A. F., Burlingame, A. L., Benet, L. Z.: Evidence for covalent binding of acyl glucuronides to serum albumin via an imine mechanism as revealed by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 3797-3801 (1997).
 - 15) Goto, J., Murao, N., Oohashi, J. and Ikegawa, S.: Synthesis of bile acid 24-acyl glucuronides. *Steroids*, (in press).