<短 報>

肝細胞内胆汁酸分析よりみた細胞保護作用を有する
胆汁酸の作用機序について

大岩 孝幸 星野 信 早川 富博 神谷 泰隆
 田中 明隆 平野 朝光 隈井 知之 片桐 健二
 宮治 眞 武内 俊彦*

コレステロール系胆石の溶解剤として広く臨床応用されているウルソデオキシコール酸 (UDCA) は、肝内胆汁うっ滞や原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) の肝機能障害を改善することが報告されている¹⁾。また、そのタウリン抱合体 (TUDCA) は非抱合型よりも強い胆汁うっ滞改善作用を有し、タウロケノデオキシコール酸 (TCDCA) の肝細胞障害に対し保護的に作用することが報告されている²⁾。しかしながら、その作用機序は明らかではない。われわれは、ラット初代培養肝細胞を用いて、TCDCA による肝細胞障害に対する TUDCA および TUDCA と同じく 7β 位に水酸基を有するタウロ β ムリコール酸 ($T\beta$ MCA) の細胞保護作用を比較検討した。とくに、肝細胞内へ取り込まれた胆汁酸を分析することにより、これら胆汁酸の細胞保護作用の機序について検討を行った。

方法：体重200~240gのSD系雄性ラットを用い、collagenase perfusion 法にて肝細胞を分離、 7×10^4 cells/cm²の密度で直径35mm dishに単層培養した。overnight 培養された肝細胞に対し、1) TCDCA 1mM 単独投与群、2) TCDCA 1mM+TUDCA (500 μ M~2mM)同時投与群、3) TCDCA 1mM+ $T\beta$ MCA (500 μ M~2mM)同時投与群を作成し、経時的に培養液中のLDH活性を測定した。LDH活性は、実験終了時に0.1%Triton X-100にて細胞を溶解し、その上清中のLDH活性に対する%で表示した。肝細胞内の胆汁酸は、氷冷したPBSで洗浄後採取した肝細胞を遠沈、凍結乾燥し、熱エタノールにより除蛋白を行い抽出した。さらに蒸発乾燥後、メタノールに溶解しサンプルとした。分析はHPLCと 3α -HSD固定化酵素を組み合わせた方法で行った。

成績：TCDCA 1mM 投与にて培養中LDH活性は

経時的に増加し、その3時間値は $10.7 \pm 0.3\%$ であった。TCDCA 1mM+TUDCA 2mMではその3時間値は $5.7 \pm 0.2\%$ 、TCDCA 1mM+ $T\beta$ MCA 2mMでは $5.1 \pm 0.5\%$ であり、いずれも有意に細胞障害が軽減された。また、その効果は容量依存性であった (Fig. 1)。細胞内 TCDCA 量は、培養3時間後の値が TCDCA 単

Fig. 1 Changes in LDH activity in the culture medium after administration of 1mM TCDCA, or 1mM TCDCA and 0.5~2mM TUDCA ($T\beta$ MCA) simultaneously. The control experiment was performed without administration of any bile acid. Results are expressed as mean $\pm$ S.E. (n=5). *Significantly different at $p < 0.01$ from the TCDCA alone value.

* 名古屋市立大学第1内科

<受付日1992年2月27日>

Fig. 2 Intracellular bile acid content 3hr after administration of 1mM TCDCA alone or after simultaneous administration of 1mM TCDCA and 2mM TUDCA, or 2mM TβMCA. Results are expressed as mean ± S.E. (n=5). *p<0.01 VS 1 mM TCDCA alone.

独群では 20.8 ± 1.0 nmol/mg proteinであるのに対し、TUDCA 同時投与群、TβMCA 同時投与群での値はそれぞれ 10.1 ± 1.5 , 8.7 ± 1.3 nmol/mg proteinであり、同時投与群において有意に細胞内 TCDCA 量の低下が認められた (Fig. 2)。

考察: βMCA はラットにおいては主要な胆汁酸の1つであり、CDCA、コール酸 (CA) などにくらべより親水性で、detergent action は弱い。また、βMCA は UDCA と同様に胆汁中の重炭酸イオン濃度上昇を伴う高利胆作用があったり、コルヒチン処理による、タウロコール酸 (TCA) 惹起胆汁うっ滞に対し胆汁うっ滞抑制作用があり、両胆汁酸の生理活性作用は類似している。今回の肝細胞培養を用いた実験にても、TβMCA は TUDCA と同程度に TCDCA による肝細胞障害を軽減し、細胞保護作用があると考えられた。近年、PBC の患者に対する UDCA の治療効果が報告されている³⁾。PBC では血中に抱合型の CDCA や CA

が著しく増加し、これら細胞障害性の強い胆汁酸による肝細胞障害が考えられている。この PBC 患者に UDCA を投与すると、血中総胆汁酸の約60%が UDCA に置きかわり、CA や CDCA が相対的に減少している。従って、生体内胆汁酸プールにおいて毒性の高い CA や CDCA から毒性の低い UDCA への replacement が治療効果に結びつくと推測されている。しかし、胆汁うっ滞肝では依然として肝細胞周囲は高濃度の CDCA, CA にさらされている状態であり、UDCA の相対的増加がどのようなメカニズムで CDCA や CA の細胞障害を防御するかは明らかではない。今回の肝細胞内胆汁酸分析では、TUDCA 同時投与群において細胞内 TCDCA が有意に減少し、細胞障害が軽減した。このことは細胞内における TCDCA の低下により細胞内 organelle の障害が軽減されたことが示唆され、TCDCA が細胞内で直接障害をきたしている可能性が推測された。すでにわれわれは、摘出肝灌流実験でコルヒチン処理肝に対する TCA や TCDCA による胆汁うっ滞を TUDCA が改善することを報告した。その改善作用はリン脂質や TCA, TCDCA などの胆汁中への分泌増加を伴っており、TUDCA が cytotoxicity の高い胆汁酸の排泄を促進させることが作用機序の一つと推定している。今回の培養肝細胞を用いた実験から、TUDCA や TβMCA は、細胞内よりの TCDCA の排泄を促進させ、結果として細胞内 TCDCA 量を低下させることが、TCDCA 惹起肝細胞障害に対する細胞保護作用機序として重要であると結論した。

索引用語: 胆汁酸, 細胞保護作用, 肝細胞培養

文献: 1) 友田 隆, 他: 日消誌 81: 2821-2825, 1984 2) 古賀 郁利子: 肝臓 28: 1597-1604, 1987 3) Poupon R, et al: Lancet 1: 834-836, 1987 4) 中井富夫, 他: 肝臓 31: 592, 1990

A study of the mechanism of cytoprotective bile acid with reference to intracellular bile acid analysis

Takayuki OHIWA, Makoto HOSHINO, Tomihiro HAYAKAWA, Yasutaka KAMIYA,
Akitaka TANAKA, Asamitsu HIRANO, Tomoyuki KUMAI,
Kenji KATAGIRI, Makoto MIYAJI
and Toshihiko TAKEUCHI*

* First Department of Internal Medicine, Nagoya City University, School of Medicine (Nagoya)