胆汁酸の代謝 (第 3 報¹⁾) ケノデオキシコール酸の代謝²⁾

太田正道, 角田 創, 穂下剛彦

広島大学医学部総合薬学科³⁾Metabolism of Bile Acids. III.¹⁾ Metabolism of Chenodeoxycholic Acid²⁾

MASAMICHI OTA, HAJIME TSUNODA and TAKAHIKO HOSHITA

Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine³⁾

(Received August 11, 1977)

Metabolism of chenodeoxycholic acid, a therapeutic agent for gallstone dissolution, was examined in rats, hamsters, and rabbits.

In the rat liver, chenodeoxycholic acid was found to be converted into taurochenodeoxycholate, a part of which was converted into tauromuricholate. In the rat colon, these conjugated bile acids were hydrolyzed into the corresponding free bile acids and a considerable part of the free chenodeoxycholic acid and muricholic acid were further metabolized to lithocholic acid and hyodeoxycholic acid, respectively, by the action of microorganisms. Main metabolites excreted in the rat feces were identified as muricholic acid, hyodeoxycholic acid, and lithocholic acid. Direct microbial conversion of muricholic acid into hyodeoxycholic acid was established by *in vitro* experiment in which muricholic acid was incubated with rat feces suspension. Lithocholic acid and its metabolite, 3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -cholanoic acid, were not found in the small intestine. It seems likely that lithocholic acid is poorly absorbed after its formation in the colon.

In the hamster liver, chenodeoxycholic acid was converted into tauro- and glycochenodeoxycholates. In the hamster intestinal tract, these conjugated bile acids were deconjugated to form chenodeoxycholic acid, which was further metabolized to lithocholic acid. It was found by the double labeled tracer technique using chenodeoxycholic acid [7β - 3 H, 24- 14 C] that a considerable amount of lithocholic acid was reabsorbed from the hamster colon. The absorbed lithocholic acid was completely rehydroxylated to chenodeoxycholic acid. Thus, lithocholic acid was not circulated in the enterohepatic circulation.

In the rabbit colon, chenodeoxycholic acid was metabolized to lithocholic acid, a part of which was reabsorbed and reached the liver. In contrast to the hamster, the absorbed lithocholic acid was not hydroxylated in the rabbit liver, and entered into the enterohepatic circulation.

Keywords—chenodeoxycholic acid; lithocholic acid; hyodeoxycholic acid; muricholic acid; metabolism; hydroxylation; conjugation; intestinal microorganisms; enterohepatic circulation

Chenodeoxycholic acid (3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acid, 以下 CDC と略) はヒトをはじめ多くの動物種における胆汁の正常成分であるが, 最近この胆汁酸の経口投与によってコレステロール胆石を縮小溶解させることが見出され注目を集めている。⁴⁾

CDC を投与したとき, ヒト, ラットにおいては顕著な肝障害を認めたという報告はない。しかしハムスター⁵⁾やウサギ⁶⁾では胆管増生, 肝硬変などが発生し, とくに後者は肝変化をきたしやすいことが知られた。この肝障害発現における動物の種属差は CDC 代謝が動物によって異なるためと推測されているが, 詳細はまだ明らかで

1) 第 2 報: 太田正道, 穂下剛彦, 応用薬理, 印刷中。

2) 日本薬学会第 96 年会で発表, 名古屋, 1976 年 4 月。

3) Location: Kasumi 1-2-3, Hiroshima, 734, Japan.

4) a) R.G. Danzinger, A.F. Hofmann, L.J. Shoenfield, J.L. Thistle, *New Eng. J. Med.*, **286**, 1 (1972); b) J.L. Thistle, A.F. Hofmann, *ibid.*, **289**, 655 (1973).

5) F. Bergman, W. van der Linden, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **81**, 213 (1973).

6) M.M. Fisher, N.S. Cooper, M.A. Rothschild, E.H. Mosbach, *Am. J. Dig. Dis.*, **19**, 877 (1974).

ない。そこで著者らはラット、ハムスター、ウサギにおける CDC 代謝をしらべて動物種属差出現の機序について若干の知見をうることができたので報告する。

実験の部

実験方法

標識化合物 (Chart 1) Bergström らの方法⁷⁾ によって合成した CDC-24-¹⁴C (第一化学, 比放射能 145 μ Ci/mg) と lithocholic acid-24-¹⁴C (第一化学, 比放射能 108 μ Ci/mg, 以下 LC-24-¹⁴C と略), および Samuelsson の方法⁸⁾ によって合成した CDC-7 β -³H (シンロイヒ, 137 μ Ci/mg) はいずれも非標識胆汁酸と適宜希釈して使用した。これらの標識胆汁酸の放射化学的純度はイソオクタン-イソプロパノール-酢酸 (30:10:1) またはイソオクタン-酢酸エチル-酢酸 (5:5:1) を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィー (TLC) において 99% 以上であった。

β -Muricholic acid (3 α ,6 β ,7 β -trihydroxy-5 β -cholanoic acid, 以下 MC と略) の ¹⁴C-標識体は CDC-24-¹⁴C からラット体内で生合成されたものを用いた。CDC-24-¹⁴C を投与したラットの小腸内容物を熱 EtOH で抽出, 抽出物をアルカリ処理後, 加水分解物をベンゼン-ジオキサン-酢酸 (10:5:1) を展開溶媒とする調製 TLC で精製して MC-24-¹⁴C をえた。比放射能は 0.50 μ Ci/mg, TLC により確認した放射化学的純度は 99% 以上であり, ガスクロマトグラフィーによる検定での化学的純度は 96% で, 4% の非放射性 cholic acid の混在が認められたが, 代謝実験には支障がないのでそのまま使用した。

標準物質 CDC, taurochenodeoxycholate (以下 TCD と略), および glycochenodeoxycholate (以下 GCD と略) は東京田辺製薬 K.K. からの供与品を使用した。MC は E.H. Mosbach 博士からの恵与品を使用した。Lithocholic acid (3 α -hydroxy-5 β -cholanoic acid, 以下 LC と略) および hyodeoxycholic acid (3 α ,6 α -dihydroxy-5 β -cholanoic acid, 以下 HDC と略) は市販品を再結晶して精製した。3 α ,6 β -Dihydroxy-5 β -cholanoic acid と 3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid は HDC より⁹⁾ また 3 α -hydroxy-7-oxo-5 β -cholanoic acid は CDC より¹⁰⁾ それぞれ合成した。CDC および他の遊離胆汁酸はガスクロマトグラフィーによる検定においていずれも化学的純度 99% 以上であり, また TCD と GCD は TLC において不純物によるスポットを検出しえなかった。

ラジオ TLC シリカゲル G, 厚さ 0.5 mm の薄層板の原線の上に試料溶液を線状 (2—14 cm) に塗布し, その両端に標準物質をスポットした。n-ブタノール-酢酸-水 (17:2:1), イソオクタン-酢酸エチル-酢酸 (5:5:1), またはベンゼン-ジオキサン-酢酸 (10:5:1) を展開溶媒に用いて 10—14 cm 展開した後, 放射性化合物の展開されている部分をガラス板で覆い, 標準物質をリンモリブデン酸試薬で発色検出し, ついでガラス板を除きシリカゲル層を展開方向にむかって一定幅に削りとり, 放射能測定するか, もしくは MeOH で抽出して放射性物質を回収した。

ガスクロマトグラフィー 3% QF-1 カラム (3 mm $\times$ 2 m) を用い, カラム温度 225 $^{\circ}$ で分析をおこなった。試料は diazomethane でメチルエステル化後, hexamethyldisilazane-trimethylchlorosilane 試薬と処理し, えられた trimethylsilylether 誘導体をガスクロマトグラフに注入した。

実験動物 Wistar 系雄性ラット (体重 180—220 g), 雄性ゴールデンハムスター (体重 90—110 g), および雌性ウサギ (体重 2 kg) を使用した。実験期間を通じて飼料および水は自由に与えた。

投与方法 放射性胆汁酸はナトリウム塩にして水に溶解させ, 以下の方法で投与した。1匹 1 回あたりの投与 ¹⁴C-放射能は 6 μ Ci とした。

1. ラットに CDC-24-¹⁴C, 30 mg/kg を 1 回経口投与。
2. ラットに CDC-24-¹⁴C, 30 mg/kg を 1 日 1 回, 21 日間反復経口投与。
3. ラットに CDC, 30 mg/kg を 1 日 1 回, 20 日間反復経口投与後, 21 日目に CDC-24-¹⁴C, 30 mg/kg を 1 回経口投与。
4. ハムスターに CDC-24-¹⁴C, または CDC-7 β -³H-24-¹⁴C, 30 mg/kg を 1 回経口投与。
5. エーテル麻酔下にウサギの総胆管にシリコンチューブをカニューレーションし, 縫合直前に CDC-24-¹⁴C, 10 mg または 30 mg/kg, もしくは LC-24-¹⁴C, 10 mg/kg を大腸部位に注射投与。

Chart 1. Labeled Compounds

Chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C

(R₁=H, R₂=H, R₃=OH).

Chenodeoxycholic acid-7 β -³H-24-¹⁴C

(R₁=H, R₂=³H, R₃=OH).

β -Muricholic acid-24-¹⁴C

(R₁=OH, R₂=OH, R₃=H).

7) S. Bergström, M. Rottenberg, J. Voltz, *Acta Chem. Scand.*, **7**, 481 (1953).

8) B. Samuelsson, *Acta Chem. Scand.*, **13**, 976 (1959).

9) P.T. Thomas, S.L. Hsia, J.T. Matschiner, S.A. Thayer, W.H. Elliott, E.A. Doisy, Jr., E.A. Doisy, *J. Biol. Chem.*, **240**, 1059 (1965).

10) B. Samuelsson, *Acta Chem. Scand.*, **13**, 236 (1959).

放射能測定 試料は自動燃焼装置 (Packard, 306 型) を用いて酸化燃焼せしめ測定用試料を調製し、液体シンチレーション計数装置 (Packard, 3320 型) で放射能を測定した。TLC 上の放射能を薄層板より削りとったシリカゲルに直接シンチレーターを加えて測定した。シンチレーターにはトルエン系を使用し、外部線源法により計数効率を補正した。

代謝物の抽出, 分離, 同定 放射性胆汁酸の投与を受けたラットまたはハムスターは代謝ケージに入れ糞を採取した。所定時間後に断頭出血死亡させ、肝, 小腸, 大腸, および胆のう (ハムスターの場合のみ) を摘出した。また胆管にカニューレションしたウサギを用いた実験では放射性胆汁酸を投与後 24 hr の胆汁と糞を採取した。

糞は凍結乾燥後, 熱 EtOH で 6 hr 還流抽出した。肝は水とともにホモジナイズした後, 凍結乾燥し熱 EtOH で 6 hr 還流抽出した。小腸および大腸はその内容物を取りだし凍結乾燥後熱 EtOH で 6 hr 還流抽出した。胆汁は 10 倍容の冷 EtOH で抽出した。

各抽出物中の放射性化合物は, 直接, もしくは 2.5N メタノール性 KOH にとかし 110°, 3 hr 加熱後, d-HCl 酸性下に酢酸エチル抽出してえた加水分解物のラジオ TLC により分離, 分析した。また TLC より回収した放射性化合物に非標識胆汁酸を加え, 各種溶媒からの再結晶をおこない比放射能の変らないことを確かめて同定した。

糞サスペンションによる MC 代謝実験 ラットの新鮮な糞 2.3 g を 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 10 ml とよく混和し, えられた糞サスペンションに MC-24-¹⁴C, 1.3 mg のナトリウム塩を加え, 37° でインキュベートした。24 hr 後, d-HCl を加えて pH 1 とし, エーテルで抽出した。

結 果

ラットにおける CDC 代謝

CDC-24-¹⁴C を 1 回経口投与したラットの肝および小腸内容物抽出物は *n*-ブタノール-酢酸-水を展開溶媒とする TLC で分析, タウリン抱合体画分 (*R_f* 0.15—0.48), グリシン抱合体画分 (*R_f* 0.48—0.85), 遊離酸画分 (*R_f* 0.85—1.00) の放射能を測定して Table I に示す結果をえた。

TABLE I. Labeled Bile Acids in the Liver and Small Intestine
Contents of the Rats after a Single Oral Administration
of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C, 30 mg/kg

Time after the administration (hr)	Bile acid composition (% of total)		
	Taurine conjugates	Glycine conjugates	Free bile acids
1	87.3±6.81	6.6±3.12	6.1±3.70
	87.5±1.30	4.9±0.93	7.5±1.59
4	95.4±1.28	2.5±1.21	2.2±0.46
	90.6±1.77	5.3±1.40	4.1±1.56
8	95.3±0.53	3.5±0.17	1.2±1.09
	88.0±2.58	6.0±1.98	5.9±2.03
24	93.3±2.80	5.0±1.91	1.7±0.92
	89.1±1.02	7.8±1.70	3.1±0.84
72	92.7±1.50	2.1±0.08	5.2±1.58
	88.1±2.67	6.8±0.95	5.1±1.72

In upper line in each column is shown the data of the liver and in lower line is shown the data of the small intestine contents. Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

肝抽出物は放射能濃度が低いため, それ以上の分析はできなかったが, 小腸内容物抽出物は加水分解し, えられた遊離放射性胆汁酸をイソオクタン-酢酸エチル-酢酸を展開溶媒とする TLC で分析した。ここに認められた 3 種の放射性胆汁酸は標準物質と *R_f* 値が一致することおよび実験方法で述べた再結晶法によって, おのおの CDC, MC, HDC であると同定した。LC および 3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -cholanoic acid と同じ移動度をもつ放射性化合物の存在は認められなかった。Table II に示すように CDC は投与後時間の経過とともに減少し, かわって MC, HDC が増加していた。

TABLE II. Labeled Bile Acids in the Hydrolyzate of the Small Intestine Contents of the Rats after a Single Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C, 30 mg/kg

Time after the administration (hr)	Bile acid composition (% of total)		
	β -Muricholic acid	Hyodeoxycholic acid	Chenodeoxycholic acid
1	3.8 $\pm$ 0.36	—	96.2 $\pm$ 0.36
4	16.4 $\pm$ 3.31	—	83.6 $\pm$ 3.31
8	18.5 $\pm$ 1.92	1.6 $\pm$ 0.23	79.9 $\pm$ 1.90
24	35.6 $\pm$ 3.88	39.5 $\pm$ 2.40	25.4 $\pm$ 1.63
72	30.3 $\pm$ 4.33	54.7 $\pm$ 2.34	15.1 $\pm$ 1.99

Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

大腸内容物および糞の抽出物はイソオクタン-酢酸エチル-酢酸を展開溶媒とするラジオ TLC で分析し, Table III, IV に示す結果を得た. 大腸内容物, 糞のいずれにおいても放射性化合物の 80% 以上は遊離型で存在し, その主なものとして CDC, MC, HDC, LC の 4 種を同定した. LC は投与 4 および 8 hr 後の大腸内容物および 0—1 日の糞中では 56% を占めたが, 24 hr 後の大腸内容物, 1—2 日の糞中では 20% 以下に, また 72 hr 後の大腸内容物, 2—3 日の糞中では 10% に減少した. CDC-24-¹⁴C 投与後 7 日間で投与放射能の 97% が糞中に排泄されたことを前報¹⁾で報告したが, 未変化の CDC はその 16% で, 6-水酸化体である MC と HDC の合計は 57% を占めた.

CDC-24-¹⁴C を 21 日間反復投与したラット, および CDC を 20 日間反復投与後, 21 日目に CDC-24-¹⁴C を投与したラットにおける肝, 小腸内容物, 大腸内容物, 糞中放射性化合物は, 1 回投与のときと同じ方法で分析

TABLE III. Labeled Bile Acids in the Large Intestine Contents of the Rats after a Single Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C, 30 mg/kg

Time after the administration (hr)	Bile acid composition (% of total)				
	Conjugated bile acids	β -Muricholic acid	Hyodeoxycholic acid	Chenodeoxycholic acid	Lithocholic acid
4	19.6 $\pm$ 3.4	6.4 $\pm$ 0.4	—	17.4 $\pm$ 6.5	56.6 $\pm$ 6.0
8	7.6 $\pm$ 1.7	9.9 $\pm$ 1.5	5.6 $\pm$ 2.2	21.3 $\pm$ 9.5	55.6 $\pm$ 9.2
24	7.1 $\pm$ 2.8	46.1 $\pm$ 9.6	9.9 $\pm$ 1.0	16.8 $\pm$ 5.2	19.8 $\pm$ 6.5
72	3.1 $\pm$ 0.2	25.2 $\pm$ 8.5	41.3 $\pm$ 4.8	20.0 $\pm$ 4.8	10.5 $\pm$ 2.8

Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

TABLE IV. Labeled Bile Acids in the Feces Excreted from the Rats after a Single Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C, 30 mg/kg

Time after the administration (day)	Bile acid composition (% of total)				
	Conjugated bile acids	β -Muricholic acid	Hyodeoxycholic acid	Chenodeoxycholic acid	Lithocholic acid
0—1	6.0 $\pm$ 0.8	10.2 $\pm$ 0.9	11.8 $\pm$ 4.1	15.6 $\pm$ 1.9	56.3 $\pm$ 6.1
1—2	9.7 $\pm$ 3.0	20.5 $\pm$ 5.3	23.4 $\pm$ 2.9	28.8 $\pm$ 5.2	17.7 $\pm$ 3.7
2—3	11.2 $\pm$ 2.5	26.6 $\pm$ 7.1	24.3 $\pm$ 3.5	28.9 $\pm$ 6.0	9.0 $\pm$ 0.8
0—7	7.4 $\pm$ 1.0	37.0 $\pm$ 5.0	20.1 $\pm$ 3.4	16.4 $\pm$ 5.0	20.1 $\pm$ 4.9

Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

し、Table V—VIII に示す結果をえた。肝におけるタウリン抱合体、グリシン抱合体、遊離酸への放射能分布は、1 回投与のときと本質的に同じであった。小腸内容物、大腸内容物、糞中に存在する放射性胆汁酸の種類は 1 回投与のときと同じであった。CDC 20 回反復投与後 CDC-24-¹⁴C 1 回投与群では放射性胆汁酸の組成もまた 1 回投与のときと本質的に同じであった。CDC-24-¹⁴C 21 回反復投与群では、放射性の MC および HDC が最終投与直後から認められたが、投与後時間の経過に伴ない 1 回投与のときと同じ組成になった。

TABLE V. Labeled Bile Acids in the Liver of the Rats after Repeated Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C

Time after the last administration (hr)	Bile acid composition (% of total)		
	Taurine conjugates	Glycine conjugates	Free Bile acids
1	88.2±1.62	6.3±0.67	5.5±0.96
	92.1±0.66	4.1±0.25	3.9±0.43
4	88.3±1.93	5.1±1.18	6.5±0.77
	89.1±1.55	4.8±0.93	6.0±1.01
8	86.3±0.58	8.6±0.23	5.1±0.65
	88.3±1.23	6.4±1.12	5.3±0.71
24	85.4±0.75	8.4±0.54	6.2±0.23
	89.5±0.58	6.8±0.12	3.7±0.75
72	85.9±1.37	6.6±0.72	7.4±0.69
	88.2±0.67	5.9±0.09	5.9±0.65

In upper line in each column is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) once daily for 21 days and in lower line is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid (30 mg/kg) once daily for 20 days followed by a single oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) at the 21st day.

Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

TABLE VI. Labeled Bile Acids in the Hydrolyzate of the Small Intestine Contents of the Rats after Repeated Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C

Time after the last administration (hr)	Bile acid composition (% of total)		
	β -Muricholic acid	Hyodeoxycholic acid	Chenodeoxycholic acid
1	18.5±2.40	22.1±1.04	59.5±1.43
	32.8±1.61	—	67.2±1.61
4	35.3±5.93	10.7±1.79	54.0±4.20
	35.3±2.49	2.4±0.19	62.2±2.31
8	23.0±0.75	25.9±4.20	51.1±4.67
	19.7±4.10	14.5±3.31	65.8±1.33
24	23.5±3.07	17.2±6.83	59.3±8.41
	39.1±5.12	37.6±6.27	23.4±1.17
72	37.8±5.93	26.5±14.2	35.7±8.31
	25.6±4.33	49.3±1.73	25.1±1.72

In upper line in each column is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) once daily for 21 days and in lower line is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid (30 mg/kg) once daily for 20 days followed by a single oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) at the 21st day.

Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

TABLE VII. Labeled Bile Acids in the Large Intestine Contents of the Rats after Repeated Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C

Time after the last administration (hr)	Bile acid composition (% of total)				
	Conjugated bile acids	β -Muricholic acid	Hyodeoxycholic acid	Chenodeoxycholic acid	Lithocholic acid
1	2.6 $\pm$ 1.0	33.4 $\pm$ 14.2	39.5 $\pm$ 9.2	7.9 $\pm$ 0.7	16.5 $\pm$ 4.7
4	7.1 $\pm$ 1.7	47.1 $\pm$ 5.1	22.5 $\pm$ 7.8	8.0 $\pm$ 2.1	15.3 $\pm$ 3.2
8	3.0 $\pm$ 0.1	20.4 $\pm$ 4.0	7.5 $\pm$ 1.5	23.5 $\pm$ 6.9	45.7 $\pm$ 9.5
24	2.2 $\pm$ 0.1	33.3 $\pm$ 5.4	29.0 $\pm$ 3.5	11.3 $\pm$ 1.0	24.1 $\pm$ 2.9
72	2.6 $\pm$ 0.3	20.0 $\pm$ 1.8	15.6 $\pm$ 3.1	13.8 $\pm$ 3.9	48.1 $\pm$ 2.9
	2.7 $\pm$ 0.2	33.8 $\pm$ 3.1	26.0 $\pm$ 3.1	9.7 $\pm$ 1.6	27.8 $\pm$ 4.4
	2.3 $\pm$ 0.9	27.4 $\pm$ 1.5	20.1 $\pm$ 9.8	34.9 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 6.8
	2.4 $\pm$ 0.1	47.4 $\pm$ 8.9	30.5 $\pm$ 6.0	8.5 $\pm$ 1.7	11.1 $\pm$ 1.9
	1.8 $\pm$ 0.1	36.5 $\pm$ 0.4	20.1 $\pm$ 0.5	25.3 $\pm$ 0.2	16.4 $\pm$ 0.5

In upper line in each column is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) once daily for 21 days and in lower line is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid (30 mg/kg) once daily for 20 days followed by a single oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) at the 21st day. Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

TABLE VIII. Labeled Bile Acids in the Feces Excreted from the Rats after Repeated Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid-24-¹⁴C

Time after the last administration (day)	Bile acid composition (% of total)				
	Conjugated bile acids	β -Muricholic acid	Hyodeoxycholic acid	Chenodeoxycholic acid	Lithocholic acid
0—1	4.9 $\pm$ 0.9	37.3 $\pm$ 7.5	20.2 $\pm$ 3.5	21.1 $\pm$ 4.1	16.4 $\pm$ 4.6
1—2	3.5 $\pm$ 0.1	8.1 $\pm$ 0.2	28.9 $\pm$ 3.0	19.4 $\pm$ 1.2	40.1 $\pm$ 3.5
2—3	5.1 $\pm$ 0.6	46.8 $\pm$ 1.8	21.3 $\pm$ 0.8	15.3 $\pm$ 1.3	11.5 $\pm$ 2.1
	3.6 $\pm$ 0.4	22.8 $\pm$ 8.9	39.0 $\pm$ 7.4	20.9 $\pm$ 2.6	13.7 $\pm$ 0.6
	4.3 $\pm$ 0.2	58.8 $\pm$ 5.1	17.8 $\pm$ 2.9	12.9 $\pm$ 1.8	6.4 $\pm$ 0.6
	3.1 $\pm$ 0.6	26.8 $\pm$ 12.1	41.2 $\pm$ 12.0	22.3 $\pm$ 11.0	6.5 $\pm$ 0.3

In upper line in each column is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) once daily for 21 days and in lower line is shown the data obtained from the rats after repeated oral administration of chenodeoxycholic acid (30 mg/kg) once daily for 20 days followed by a single oral administration of chenodeoxycholic acid-24-¹⁴C (30 mg/kg) at the 21st day. Each value represents the mean and standard error of 3 male rats.

ラット腸内細菌による MC 代謝

MC-24-¹⁴C をラット糞サスペンションとインキュベートした後、反応混合物をエーテルで抽出して放射能の 98% を回収した。Fig. 1 にエーテル抽出物のラジオ TLC を示す。主代謝物は HDC と同じ R_f 値を示すことおよび非標識 HDC とともに再結晶したとき比放射能が変らないこと (Table IX) より、HDC と同定した。

ハムスターにおける CDC 代謝

CDC-24-¹⁴C を 1 回経口投与したハムスターの胆汁および小腸抽出物のラジオ TLC を Fig. 2 に示す。放射性 TCD および GCD の生成、存在が認められた。胆汁、小腸のいずれにおいても両者の比は約 2:1 であった。両抽出物はそ

Fig. 1. Radiochromatogram of Extract of Incubation of β -Muricholic Acid-24-¹⁴C with the Fecal Suspension of Rats

Solvent system: benzene-dioxane-acetic acid (10:5:1, v/v).

TABLE IX. Isotope Dilution of the Metabolite from the Zone Corresponding to Hyodeoxycholic Acid on Thin-Layer Chromatography (Fig. 2) with Hyodeoxycholic Acid

Recrystallization No. and solvent	Specific activity ($\times 10^3$ dpm/mg)
1. Ethyl acetate	2.98
2. Methanol	2.96
3. Acetone	3.01

Hyodeoxycholic acid, 95 mg was added to the labeled compound (3.3×10^5 dpm) recovered from the zone.

Fig. 2. Radiochromatograms of Labeled Compounds in the Bile and Small Intestine Contents of Hamsters at 24 hr after Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid- $24\text{-}^{14}\text{C}$, 30 mg/kg

Solvent system: *n*-butanol-acetic acid-water (17: 2: 1, v/v).

Fig. 3. Radiochromatograms of Labeled Compounds in the Large Intestine Contents (at 8 hr) and Feces (0—24 hr) of Hamsters after Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid- $24\text{-}^{14}\text{C}$, 30 mg/kg

Solvent system: isooctane-ethyl acetate-acetic acid (5: 5: 1, v/v)

れぞれ加水分解後、イソオクタン-酢酸エチル-酢酸を展開溶媒とするラジオ TLC で分析、放射性 CDC を同定確認したが、他の放射性胆汁酸は認められなかった。

Fig. 3 に CDC-24- ^{14}C 投与 8 hr 後の大腸内容物、および 0—1 日糞中に含まれる放射性化合物のラジオ TLC を示す。どちらのクロマトグラムにおいても LC がほとんど唯一の放射性化合物であり、抱合胆汁酸、CDC は痕跡程度しか認めえかった。

ハムスターに CDC-7 β - ^3H -24- ^{14}C を経口投与し、4 および 24 hr 後の小腸内容物を取りだし、加水分解後 TLC をおこなって放射性 CDC を単離、その $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ を測定して Table X に示す結果をえた。投与後時間の経過とともに ^3H が次第に失われていることが認められた。

TABLE X. ^3H and ^{14}C Contents of Chenodeoxycholic Acid-7 β - ^3H -24- ^{14}C
Administered to Hamster and of Chenodeoxycholic Acid
Recovered from the Small Intestine Contents

Compound	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	^3H retained (%)
Administered chenodeoxycholic acid-7 β - ^3H -24- ^{14}C	26.0	100.0
Chenodeoxycholic acid recovered from the 4 hr intestine contents	19.5	75.0
Chenodeoxycholic acid recovered from the 24 hr intestine contents	6.4	24.6

ウサギにおける CDC 代謝

総胆管にカニューレションしたウサギの大腸部位に CDC-24- ^{14}C 、または LC-24- ^{14}C を投与し、24 hr 内に排泄される胆汁および糞を採取、胆汁抽出物はアルカリ加水分解をおこなった後、糞抽出物は直接、それぞれイソオクタン-酢酸エチル-酢酸を展開溶媒とするラジオ TLC により分析、Table XI に示す結果をえた。

TABLE XI. Excretion of Labeled Bile Acids in the Bile and Feces from the Bile
Fistula Rabbits during 24 Hours after Intraintestinal Administration
of Lithocholic Acid-24- ^{14}C or Chenodeoxycholic Acid-24- ^{14}C

Administered Bile acid	Dose (mg/kg)	Recovery (% of dose)	Bile acid composition (% of total)	
			Chenodeoxycholic acid	Lithocholic acid
Lithocholic acid	10	54.1	—	100.0
		42.2	—	100.0
Chenodeoxycholic acid	10	30.0	56.6	43.4
		65.4	0.6	99.4
Chenodeoxycholic acid	30	32.5	83.4	16.6
		62.2	1.1	98.9

In upper line in each column is shown the data of the bile and in lower line is shown the data of the feces.

24 hr 内に投与放射能の 95% 以上が胆汁と糞中に排泄された。LC-24- ^{14}C を投与したときの胆汁、糞中に存在する放射性胆汁酸は LC のみであった。CDC-24- ^{14}C を投与したときには、胆汁中には CDC に加えて LC が排泄され、また糞中の放射性胆汁酸は 90% 以上が LC で、CDC はごく僅か排泄されているだけであった。

考 察

先に著者ら¹⁾ はラット、ハムスター体内で CDC の側鎖は分解をうけないことを明らかにしているの、カルボキシル基を ^{14}C で標識した CDC を用いてその代謝をしらべた。

CDC-24-¹⁴C を経口投与したラット肝および小腸内に所在する放射性胆汁酸は 90% 以上が抱合型であった。これより CDC は消化管から速やかに吸収され肝で抱合反応をうけ小腸内に分泌されているものと考えられる。CDC を反復投与したときを含めて抱合型のほとんどはタウリン抱合体であった。動物肝のタウリンプールは比較的小さく、多量の胆汁酸が生合成もしくは投与されるとタウリンの欠乏からそれを補うグリシンとの抱合がおこることが知られているが、¹¹⁾ 本実験での投与量はラット肝タウリンの欠乏をもたらず負荷ではなかったものと認められる。

ラット小腸内に存在する CDC の主な代謝物は MC と HDC であった。CDC がラット肝において MC に代謝されることはすでに知られている。¹²⁾ CDC 投与 1 hr 後の小腸内 MC は 4% であったが、4 hr 後には 16%、24 hr 後には 36% に増加した。これは CDC が腸肝循環によって繰り返し肝に達し、その度に MC へ代謝される機会をもったからであると考えられる。

HDC の生成について Einarsson¹³⁾ は、CDC から生じた LC が再吸収され、これが肝で 6 β -水酸化されて 3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -cholanoic acid となり、このジオキシン酸がもう 1 度腸内細菌による代謝をうけ 3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid を経て HDC を生じるという経路 (Chart 2) を提唱している。しかしこの経路によって HDC が生成しているのであると、その中間体である 3 α ,6 β -ジオキシン酸が胆汁、小腸内に存在していなければならないが、今迄にこの胆汁酸をラット体内から見出したという報告はなく、本実験でもその生成、存在を認めえなかった。したがってこの経路で HDC が生成しているとは考え難い。Table II に示したように小腸内に放射性 HDC が出現するのは MC よりも遅く、8 hr 後に漸く 2% 弱生成する。しかしその後は漸増し、72 hr 後には 55% に達し、このときには MC は減少の傾向にある。この結果は MC が HDC の前駆体であることを示唆するが、さらに MC-24-¹⁴C をラット糞サスペンションとインキュベートして放射性 HDC の生成を確認、HDC が MC から腸内細菌の代謝によって直接生じたものであることを明らかにすることができた。Ursodeoxycholic acid (3 α ,7 β -dihydroxy-5 β -cholanoic acid) も腸内細菌の作用によって 7 β -水酸基を失ない LC に代謝されるが、¹⁴⁾ おそらく同じ腸内細菌により MC の 7 β -水酸基が脱離されたものと考えられる。MC の HDC への変換では、

Chart 2. Pathway for the Formation of Hyodeoxycholic Acid Proposed by Einarsson

Reactions marked $\longrightarrow$ take place in the liver and those marked $\dashrightarrow$ in the intestine.

11) W.G.M. Hardison, J.H. Proffitt, *Am. J. Physiol.*, **232**, E75 (1977).

12) T.A. Mahowald, J.T. Matschiner, S.L. Hsia, R. Richter, E.A. Doisy, Jr., W.H. Elliott, E.A. Doisy, *J. Biol. Chem.*, **225**, 781 (1957).

13) K. Einarsson, *J. Biol. Chem.*, **241**, 534 (1966).

14) 穂下剛彦, 河野真美, 松本 操, 内山美恵子, 倉本戴寿, 薬誌, **94**, 1196 (1974).

Chart 3. Pathway for the Formation of Hyodeoxycholic Acid Proposed by the Authors

Symbols as in Chart 2.

7 β -水酸基の脱離とともに 6-水酸基の配位逆転がおこっている。これは 7 β -水酸基脱離が 7 α -水酸基の腸内細菌による脱離の場合と同様に¹⁵⁾ Δ^6 -中間体を経由するものと考えたと容易に説明される。すなわち MC が 7 β -水酸基を失ない 3 α ,6-dihydroxy-5 β -chol-6-enoic acid となれば、その還元によって HDC が生成する。この推定も加えて CDC から HDC の生成経路を Chart 3 に示す。

大腸および糞中の放射性胆汁酸の大半は遊離型となっており、同定された主な代謝物は MC, HDC, LC であった。肝で生成し小腸を経て大腸に達した抱合胆汁酸はここで腸内細菌の作用により脱抱合されるのである。

CDC が腸内細菌によって LC に代謝されることはすでによく知られているが、¹⁶⁾ 本実験においても小腸内 CDC の減少につれて大腸内 LC が減少しており、LC が CDC の代謝物であることは明らかである。

ラット大腸内で生成する二次胆汁酸のうち HDC は再吸収され肝を経て小腸内に分泌されているのに対し、LC は小腸内には認められなかった。ラット肝で LC は水酸化されて、CDC, 3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -cholanoic acid, さらには MC に変換されるから¹⁷⁾ 小腸内に LC が認められないというだけでは LC の吸収がないと断定できないが、3 α ,6 β -ジオキソ酸もまた認められないのであるから LC はほとんど吸収されていないものと推測できる。

CDC を反復投与したときにも 6-水酸化胆汁酸 (MC, HDC), 7-脱水酸基胆汁酸 (HDC, LC) の生成率は CDC 1 回投与のときと差異は認められなかった。したがって CDC の反復投与は肝の MC 生成酵素系や腸内細菌叢に影響を与えないものと考えられる。

ハムスターにおける CDC 代謝は肝で相当量のグリシン抱合体が生成すること、MC に代謝されないこと、LC の生成率の高いことにおいてラットと異なっていた。最近ハムスターにおいても CDC から MC の生成が報告されたが¹⁸⁾ 本実験の結果からするとハムスター肝の MC 生成酵素系は活性のごく低いものであると考えられる。

CDC-7 β -³H-24-¹⁴C を投与したハムスターの小腸から回収した放射性 CDC では ³H の一部が失なわれていた。CDC の 7 β -位の水素が脱離するのは、CDC の 7 α -水酸基がケト基に酸化されるときか、または CDC から生じた LC が肝において 7 α -水酸化され CDC に再生されるときである。¹⁹⁾ 本実験においてハムスターの胆汁、腸内、

15) B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.*, **253**, 361 (1960).16) B.E. Gustafsson, T. Midtvedt, A. Norman, *J. Exp. Med.*, **123**, 413 (1966).17) P.J. Thomas, S.L. Hsia, J.T. Matschiner, E.A. Doisy, Jr., W.H. Elliott, S.A. Thayer, E.A. Doisy, *J. Biol. Chem.*, **239**, 102 (1964).18) T. Tateyama, K. Katayama, *Lipids*, **11**, 845 (1976).19) S. Hayakawa, *Adv. Lipid Res.*, **11**, 143 (1973).

糞中のどこにもケト胆汁酸の生成存在を認めえなかったから、7-ケト基への酸化によって $7\beta\text{-}^3\text{H}$ が失われたとは考えられない。したがって ^3H の消失は LC として再吸収された後 CDC への水酸化の際におこったものであり、4, 24 hr 後の小腸内に存在する CDC の 25, 75% はそれまでに 1 度以上大腸から LC として再吸収されたことのあるものと推測される。

ウサギの大腸部位に投与された CDC はそのまま吸収されるか、または LC に代謝され、CDC のままではほとんど糞中に排泄されなかった。CDC から生じた LC はその 8—17% が吸収され、残りが糞中に排泄されたが、この吸収率は LC を大腸部位に投与したときの吸収率 54% よりも遙かに低い。Norman と Shorb は²⁰⁾ CDC の腸内細菌による代謝実験において反応混合液を遠心分離すると生じた LC はその沈渣画分に所在することを明らかにしているが、おそらく CDC より腸内細菌の作用によって生じた LC の大部分はそのまま腸内細菌にとりこまれた状態にあって吸収に抵抗するものと推測される。

LC は強い肝毒性をもち、²¹⁾ CDC よりも少量の投与によって CDC 投与のときと同じ肝障害をおこしうる。⁶⁾ また CDC 投与による肝障害出現は抗生物質の同時投与によって抑制できる。²²⁾ これらの事実より CDC 投与による肝障害は CDC そのものによるものではなく、その代謝物である LC によっておこったものと考えられる。本実験において、ハムスター、ウサギでは投与 CDC のほとんど全てが LC に代謝されて排泄されるのに対し、ラットの場合は投与された CDC の約 60% が肝において MC に代謝され、これは LC には変換されず、また大腸に達した CDC もその全てが LC に変換されているのではないことを明らかにした。CDC による肝障害がハムスター、ウサギで出現しやすく、ラットが抵抗性を示すのは、この LC 生成の相異によるものと考えられる。

本実験においてウサギ大腸内に投与した CDC はその 5—13% が LC として吸収されるに過ぎないことを明らかにした。しかしウサギ肝は LC を水酸化する酵素系を欠き、またヒトのように²³⁾ LC を硫酸と抱合して解毒する機能ももっていない。⁶⁾ このため吸収されて肝に達した LC はその後も腸肝循環によって繰り返し肝を通過する筈である。一方ハムスターの胆汁、小腸には LC が認められない。これは吸収された LC の全てが CDC に代謝されたからである。したがってハムスターの場合は多量の LC が再吸収されてはいても、それが LC のまま腸肝循環されることはない。この LC 代謝の相異が、ハムスターよりもウサギの方が肝変化をおこしやすい理由であると考えられる。

謝辞 胆汁酸試料を提供していただいた東京田辺製薬 K.K. およびニューヨーク市公衆衛生研究所, E.H. Mosbach 博士, また実験に協力いただいた神田弘子, 福永恵美子, 磯部純子, 片山伊津子の諸嬢に深謝します。

20) A. Norman, M.S. Shorb, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **110**, 552 (1962).

21) a) R.H. Palmer, Z. Hruban, *J. Clin. Invest.*, **45**, 1255 (1966); b) N.B. Javitt, S. Emerman, *ibid.*, **47**, 1002 (1968); c) R.A. Cooper W.H. Admirand, F. Garcia, C. Trey, *ibid.*, **48**, 18a (1969).

22) G. Salen, H. Dryszka, T. Chen, *Lancet*, **1**, 1082 (1975).

23) R.H. Palmer, M.G. Bolt, *J. Lipid Res.*, **12**, 671 (1971).