

[原 著]

ウルソデスオキシコール酸の肝 3-hydroxy-3-methylglutaryl  
coenzyme A reductaseと肝コレステロール 7 $\alpha$ -hydroxylase  
活性におよぼす作用

中村 治雄, 倉橋 昌司, 吉田 昌江, 猪股孝四郎

東日本学園大学歯学部口腔生理学講座

(主任: 中村 治雄 教授)

Effects of Ursodesoxycholic Acid on 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase Activity in Mice Liver Microsomes.

Haruo NAKAMURA, Masashi KURAHASHI,  
Masae YOSHIDA, and Koshiro INOMATA

Department of Oral Physiology, School of Dentistry,  
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Prof. Haruo NAKAMURA)

Abstract

The activity of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase and 7 $\alpha$ -hydroxylase, which are the enzymes controlling the rate of hepatic synthesis respectively, in the cholesterol and bile acids were studied in mice receiving ursodesoxycholic acid (0.5% of the diet) for 10 days and in the microsomal fraction containing 10<sup>-4</sup>M ursodesoxycholic acid in vitro.

Both the activities of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase were reduced in vivo and in vitro.

On the basis these findings, it is suggested that the decreased rate of cholesterol synthesis and cholesterol degradation to bile acid may play a significant role in the elimination of cholesterol in the serum and liver after ursodesoxycholic acid feeding.

**Key words:** Ursodesoxycholic acid, HMG-CoA reductase, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase

緒 論

最近胆石溶解作用がウルソデスオキシコール酸 (UDCA) およびヘノデオキシコール酸にあり, その機序について, 胆汁中のコレステロ-

ル飽和状態を不飽和にするためであるとされている。それに関連して, 肝コレステロール合成を律速する 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase および胆汁酸合成を律速する 7 $\alpha$ -hydroxylase が関与

受付: 昭和57年10月12日

していると報告されている。

1965年著者<sup>4)</sup>はマウスに0.5%ウルソデスオキシコール酸加飼料にて10日間飼育すると血清および肝コレステロールの減少, 肝コレステロール生合成の低下, およびメバロン酸-2-<sup>14</sup>Cに由来するステロール-<sup>14</sup>Cの糞への増加, 更にステロール-<sup>14</sup>Cの異化による胆汁酸-<sup>14</sup>Cの排泄の減少を報告した。

そこでコレステロール生合成のHMG-CoAをメバロン酸にするマイクロゾームにあるHMG-CoA reductase およびコレステロールを胆汁酸にかえるコレステロール7 $\alpha$ -hydroxylase 活性を測定して前報の結果をより明らかにしようとして実験を行った。

### 実験方法

動物はICR-JCL オスマウスを用い, in vivo 実験では0.5%UDCA 加オリエンタル飼料で10日間飼育した。in vitro 実験でのUDCA添加実験では, 正常マウス肝を用いた。動物はすべて10時-11時の間に処理した。

前報<sup>5)</sup>のごとく摘出肝を蔗糖300mM, ニコチン酸アミド75mM, EDTA2.5mM, グルタチオン25mMを含むホモジネート液で10% (w/v)の肝ホモジネートを作り, 800×gで10分遠心し, その上清を9500×g, 10分遠心後, その上清を100,000×g, 60分遠心し, マイクロゾーム分画を分離し, これに再びホモジネート液を加えホモジナイズし, 更に100,000×g, 30分遠心しマイクロゾーム分画を分離した。マイクロゾーム分画はpH7.4, 0.1Mリン酸緩衝液に懸濁し, 蛋白濃度はLowryらの方法<sup>6)</sup>で測定した。このマイクロゾーム分画をHMG-CoA reductase および7 $\alpha$ -hydroxylase 活性の測定に用いた。

#### 1. HMG-CoA reductase 活性の測定<sup>7)</sup>

測定系0.8ml中に100mMリン酸緩衝液pH7.4, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM NADP, 10mM glucose-6-

phosphate, 2単位 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 50mM還元グルタチオン, 0.2mM R, S- (3-<sup>14</sup>C)-HMG-CoA, マイクロゾーム蛋白0.1-0.3mgを含む。測定系は37℃, 30分培養後10NHCl0.1mlを加え反応を止め, 担体として3mgのメバロン酸ラク톤を加えた。これに0.5mlの無水エタノール, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>1gを加え, 2mlのdiethyl etherで4回抽出し抽出液はN<sub>2</sub>下で乾固し, アセトンに溶かし, その一定量をシリカゲルG薄層プレートにスポットし, アセトン-ベンゼン(1:1)で展開後, 2,7-dichlorofluorescein をスプレーし紫外線(366nm)による蛍光によりメバロン酸ラク톤を検出し, この部分を削り取り液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

また in vitro 実験でのUDCA添加の場合には10<sup>-4</sup>Mで行った。

HMG-CoA reductase 活性は, pmol/蛋白mg/分で表わした。対照は煮沸したマイクロゾーム蛋白を用いて同様に行った。

#### 2. 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性の測定

Van Cantfortら<sup>8)</sup>の方法に準じて行い, すべて光を遮って行った。測定系1.0ml中に4mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM NADP, 20mM glucose-6-phosphate, 3単位 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 20mM cysteamine chloride, マイクロゾーム蛋白0.1-0.4mg, 100mMリン酸緩衝液pH7.4, 0.1 $\mu$ Ci コレステロール-4-<sup>14</sup>C (56mCi/mmol)を含む。尚, コレステロールはTween-80 (1mg/ml)で溶解して用いた。

マイクロゾーム蛋白を除いた測定系を37℃, 10分間前培養後マイクロゾーム蛋白を加え, 30分間培養後 dichloromethane-ethanol (5:1) 8mlを加え反応を止め, 更に水3mlを加え60分間振盪後, 遠心し有機溶媒層を分離し, 40℃, N<sub>2</sub>下で乾固し, クロロホルム:メタノール(2:1)に溶かし, その一定量をシリカゲルG薄層プレー

トにスポットした。同時に7 $\alpha$ -hydroxycholesterol および7 $\beta$ -hydroxycholesterol, cholesterol を夫々30  $\mu$ g 同一場所にスポットした。プレートは5℃でエーテルで展開, 風乾後3.5% phosphomolybdic acid-メタノール液でスプレーし80℃の乾燥器に入れ, 発色させた。Rf値は夫々7 $\alpha$ -hydroxycholesterolは0.35, 7 $\beta$ -hydroxycholesterolは0.47, cholesterolは0.88であった。スポット部分を削り取り液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。対照は煮沸したマイクロゾーム蛋白を用い同様にを行い, 補正を行った。抽出による計測効率の損失も補正した。

またin vitro実験でのUDCA添加の場合には10<sup>-4</sup>Mで行った。

7 $\alpha$ -hydroxylase 活性は pmol/蛋白mg/分 で表わした。

### 成績と考按

HMG-CoA reductase 活性についてはTable 1に示すようにin vitro およびin vivoにおいても活性は低下していた。またコレステロール7 $\alpha$ -hydroxylaseについてもTable 2に示すようにin vitro およびin vivoにおいても活性は低下していた。

**Table 1.** Effect of 10<sup>-4</sup>M ursodesoxycholic acid on HMG-CoA reductase and 7 $\alpha$ -hydroxylase activity in mice liver microsome in vitro.

Group	HMG-CoA reductase	7 $\alpha$ -hydroxylase
Control	93.5 $\pm$ 5.4*	13.2 $\pm$ 0.41
Treated	72.3 $\pm$ 4.1 (-23%)	11.6 $\pm$ 0.40 (-12%)
P	< 0.02	< 0.05

\*N=5, M $\pm$ SE, pmol/mg protein/min

UDCAのHMG-CoA reductaseに対する作用についてはCarulliら<sup>2)</sup>はラットで5% UDCA加飼料で1週間飼育すると活性は増加し, 胆石

**Table 2.** Effect of 0.5% ursodesoxycholic acid of the diet on HMG-CoA reductase and 7 $\alpha$ -hydroxylase activity in mice liver microsome in vivo.

Group	HMG-CoA reductase	7 $\alpha$ -hydroxylase
Control	127.0 $\pm$ 7.62*	11.2 $\pm$ 0.43
Treated	78.7 $\pm$ 4.87 (-38%)	9.5 $\pm$ 0.41 (-15%)
P	< 0.001	< 0.05

\*N=5, M $\pm$ SE, pmol/mg protein/min

患者に投与すると同様に増加すると報告している。これに対してMatonら<sup>9)</sup>は胆石患者に投与すると活性が低下, 同様のことをSalenら<sup>10)</sup>も認めている。平林ら<sup>11)</sup>はラット肝のin vitroで活性が低下すると報告している。この様に研究者によりまちまちの成績であるが, 前報<sup>4)</sup>のUDCA加飼育マウスにおいてコレステロールの生合成が低下している結果よりみると, HMG-CoA reductase 活性の低下は当然のことと考えられる。

7 $\alpha$ -hydroxylaseに関してはCarulliら<sup>2)</sup>は胆石患者では活性は低下していたが, これにUDCAを投与しても変化なかった。平林ら<sup>11)</sup>はラット肝のin vitroでは低濃度では活性は増加するが濃度を増加すると低下する。前報<sup>4)</sup>のUDCA加飼育マウスにおいてメバロン酸-<sup>14</sup>C投与に由来する胆汁酸-<sup>14</sup>Cの糞への排泄の低下よりコレステロールの胆汁酸の異化の低下を推定していたが, 本実験ではin vivoにおいても低下していたことはコレステロールの胆汁酸への異化の低下を意味する。山崎ら<sup>12)</sup>もラットで胆汁酸の投与は胆汁酸の生成を減少させると報告している。

コレステロール吸収に関してRaynierら<sup>13)</sup>はマウス, Raichtら<sup>14)</sup>はラット, Ponz De Leonら<sup>15)</sup>はヒトでUDCAの投与はコレステロールの腸よりの吸収を抑制すると報告している。この事実は前報<sup>4)</sup>のUDCA加飼育マウスにおいてメバロン酸-2-<sup>14</sup>C投与に由来するステロール-<sup>14</sup>Cの

糞への排泄の増加はUDCAの腸でのコレステロール吸収の抑制に起因するのではないかと考えられる。

前報<sup>4)</sup>においてUDCAの血清および肝コレステロール低下作用として生合成の低下、糞へのステロールの増加、胆汁酸生成の抑制によるのではないかと推論したが、本実験によりコレステロール生合成についてのHMG-CoA reductaseおよびコレステロールの胆汁酸への異化の7 $\alpha$ -hydroxylaseの抑制を来すことよりコレステロール低下作用の機序が一段と明らかになった。

## 結 論

ウルソデスオキシコール酸0.5%加飼料10日間飼育マウス肝マイクロゾーム(in vivo)および正常マウス肝マイクロゾームにウルソデスオキシコール酸 $10^{-4}$ M添加(in vitro)についてHMG-CoA reductaseおよび7 $\alpha$ -hydroxylase活性を測定し、次の結果を得た。

1. 肝HMG-CoA reductase活性はin vivo, in vitroにおいて低下した。
2. 肝コレステロール7 $\alpha$ -hydroxylase活性もin vivo, in vitroにおいて低下した。

以上のことよりウルソデスオキシコール酸は、肝コレステロールの生合成ならびにコレステロールの胆汁酸への異化を抑制すると思われる。

## 謝 辞

稿を終るにのぞみ、ウルソデスオキシコール酸を提供された東京田辺製薬株式会社に深謝する。

## 文 献

1. Ahlberg, J., Angelin, B. and Einarsson, K.: Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and biliary lipid composition in man: Relation to cholesterol gallstone disease and effects of cholic acid and chenodeoxycholic acid treatment, *J. Lipid Res.*, 22; 410-422, 1981.
2. Carulli, N., Ponz De Leon, M., Zironi, F., Pinetti, A., Smerieri, A., Iori, R. and Loria, P.: Hepatic cholesterol and bile acid metabolism in subjects with gallstones: Comparative effects of short term feeding of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid, *J. Lipid Res.*, 21; 35-43, 1980.
3. Einarsson, K. and Grundy, S. M.: Effect of feeding cholic acid and chenodeoxycholic acid on cholesterol absorption and hepatic secretion of biliary lipids in man, *J. Lipid Res.*, 21; 23-34, 1980.
4. 中村治雄: ウルソデスオキシコール酸の血清コレステロール低下作用の機序に関する研究, *日消誌*, 62(9); 1105-1114, 1965.
5. 中村治雄, 本多佐保, 倉橋昌司, 猪股孝四郎: 顎下腺のコレステロール生合成とHMG-CoA reductaseの調節, *歯基礎誌*, 23(1); 197-202, 1981.
6. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193; 265-275, 1951.
7. Shefer, S., Hauser, S., Lapar, V. and Mosbach, E. H.: HMG-CoA reductase of intestinal mucosa and liver of the rat, *J. Lipid Res.*, 13; 402-412, 1972.
8. Van Cantfort, J., Renson, J. and Gielen, J.: Rat liver cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase: Development of a new assay based on the enzymic exchange of the tritium located on the 7 $\alpha$ -position of the substrate, *Eur. J. Biochem.*, 55; 23-31, 1975.
9. Maton, P. N., Murphy, G. M. and Dowling, R. H.: Ursodeoxycholic acid treatment of gallstones. Dose response study and possible mechanism of action, *Lancet*, 2; 1297-1301, 1977.
10. Salen, G., Colalillo, A., Tint, G. S. and Shefer, S.: Comparative effects of high and low dose ursodeoxycholic acid on gallstone dissolution and biliary lipid composition, *Gastroenterology*, 75; 986, 1978.
11. 平林紀雄, 大管俊明: Ursodeoxycholic acidのラット肝3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A ReductaseおよびCholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylaseにおよぼす影響, *応用薬理*, 15(1); 125-132, 1978.
12. 山崎三省, 安永誠, 小倉道雄, 杉原徹彦: 胆汁酸のCholesterol代謝に及ぼす影響 II-Desoxycholic acid

- ラッテ血中及び肝 Cholesterol 値低下作用について,  
米子医誌, 11(1);172—178, 1960.
13. Reynier, M. O., Montet, J. C., Gerolami, A., Marteau, C., Crotte, C., Montet, A. M. and Mathieu, S. : Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic, and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol, *J. Lipid Res.*, 22;467—473, 1981.
  14. Raicht, R. F., Cohen, B. I., Sarwal, A. and Takahashi, M. : Ursodeoxycholic acid. Effects on sterol metabolism in rats, *Biochim. Biophys. Acta.*, 531; 1—8, 1978.
  15. Ponz De Leon, M., Garulli, N., Loria, P., Iori, R. and Zironi, F. : Cholesterol absorption during bile acid feeding. Effect of ursodeoxycholic acid (UDCA) administration, *Gastroenterology*, 78;214—219, 1980.