

胆汁酸代謝マップにおける赤血球局在
ケト胆汁酸還元酵素の役割とその特性

(01570373)

平成2年度科学研究補助金（一般研究C）

研究成果報告書



平成3年3月

研究代表者 牧 野 勲

(旭川医科大学 医学部 教授)

は し が き

胆汁酸の重要な代謝過程（合成，酸化還元，抱合など）は原則として腸肝循環経路内で営まれると考えられているが，最近我々はケト胆汁酸の還元が腸肝循環経路外の大循環血中，とりわけ赤血球により行なわれるという事実を見出した（日消誌 84(4)：948, 1987）。赤血球によるケト胆汁酸の還元機構はその基礎的検討から，①従来既知の肝内還元酵素とは特性が異なること，②反応様式は特異性を有すること，③還元能は予想以上に大きいことが判明し，明らかに生体内意義を有すると推察された。本研究は胆汁酸代謝マップにおける赤血球還元機構の正確な位置づけを行うとともに，その生理的，臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

研究組織

研究代表者：牧野

勲（旭川医科大学医学部教授）

研究経費

平成元年度	1800千円
平成2年度	200千円
計	2000千円

●研究発表

(1) 学会誌等

- Yoneda M, Makino I, Tamasawa N, Takebe K, Sakuraba K, Goto J & Nambara T. The biotransformed metabolite profiles in blood after intravenous administration of dehydrocholic acid.
Am. J. Gastroenterol., 84 巻 3 号, 1989年 3 月。

- Goto J, Miura H, Ando M, Nambara T & Makino I.
Reductive biotransformation of 3-oxo bile acids in human blood.
Chem. Pharm. Bull. 37 巻 7 号, 1989年 7 月

- 牧野 勲
赤血球局圧ケト胆汁酸還元酵素による Dehydrocholic acid の代謝出現機序
日本消化器病学会雑誌 投稿予定

- 牧野 勲, 中村 公英
胆汁酸代謝とその異常
クリニカ 17巻 8 号 平成 2 年 8 月

- 中村 公英, 牧野 勲
胆汁うっ滞と胆汁酸代謝
臨床医 16巻 4 号 平成 2 年 4 月

(2) 口頭発表等

- 西村 英夫, 秋山 建児, 牧野 勲

赤血球によるケト型胆汁酸の還元代謝機構とその意義 (ワークショップ)

第31回日本消化器病学会大会, 平成元年10月5日

- 三浦 裕也, 安藤 昌幸, 後藤 順一, 南原 利夫, 牧野 勲

赤血球による3オキシ胆汁酸の還元代謝

第12回東北胆汁酸研究会, 平成元年11月25日

● 研究 成 果

1. 赤血球内ケト胆汁酸還元酵素の部分的精製とその特質の検討

赤血球内ケト胆汁酸還元酵素は肝細胞内の細胞質分画に存在する 3α -hydroxysteroid dehydrogenase 酵素と特性が類似するところから Berseu らの方法 (European J. Biochem 2 : 493, 1967) に従って部分的精製を試み、現在継続中である。しかし赤血球内ケト胆汁酸還元酵素系の特性は全血ないし赤血球を用いた dehydrocholic acid の還元代謝反応からも十分知ることが出来、それにより次の点を明らかにした。

①赤血球局在のケト胆汁酸還元酵素による還元反応は基質濃度、反応時間に依存し、至適温度は $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、至適 pH 7.0 であり、 70°C 2 分間処理で完全に抑制される。

② dehydrocholic acid の還元代謝産物の分析からその還元能は C-3 位ケト基のみに限定される。

③肝の 3α -hydroxysteroid dehydrogenase を特異的に抑制する p-chloromercuribenzoate により、活性は抑制されず、両酵素は同一でない。

2. 赤血球還元機構を加えた胆汁酸代謝マップの作製

dehydrocholic acid はケト胆汁酸の代表であるが、経静脈投与後肝に摂取され、70%は 3α , 7α -dihydroxy-12-keto-cholanoic acid, 20%は 3α -hydroxy-7, 12-diketo-cholanoic acid, 10%は cholic acid に還元されて、胆汁中に排泄されることが定説となっていた (図1)。この場合、肝における C-3 位の還元は肝細胞質分画に存在する 3α -hydroxysteroid dehydrogenase により、C-7 位、C-12位の還元は肝細胞のミクロソーム分画局在の酵素によることが知られている。

今回我々は dehydrocholic acid が大循環血中において赤血球により C-3 位ケト基が還元され、 3α -hydroxy-7, 12-diketo-cholanoic に変化することを見出し、dehydrocholic acid には altered pathway が存在することを明らかにした (図2)。本研究は、その生理的意義と重要性をさらに検討するため、正常人並びに外胆道瘻造設患者に dehydrocholic acid を経静脈投与し、血中、胆汁中、尿中の各還元代謝産物を定量した。併せて試験管内実験から赤血球の dehydrocholic acid 還元能を分析した。

正常人 6 名に dehydrocholic acid 1g を経静脈負荷すると血中では 3α -hydroxy-7, 12-diketo-cholanoic acid 濃度が速やかに上昇し、10分後に $92.6\ \mu\text{M}$ の最高値に達して、その後60分までに $29.3\ \mu\text{M}$ に減少した。一方、胆道癌で完全外胆道瘻造設患者 2 名に減黄後、同様な dehydrocholic acid 負荷試験を行ったところ、 3α -hydroxy-7, 12-diketo-cholanoic acid 濃度の最高値は各々 $111.8\ \mu\text{M}$ (30分後) と $135.3\ \mu\text{M}$ (60分後) であった。ヒト血漿量を体重の 5% とし、 3α -hydroxy-7, 12-diketo-cholanoic acid の最高濃度から、その時点における還元代謝量を算出した。その結果、正常人では $102\ \text{mg}$ 、外胆道瘻患者で $124\ \text{mg}$ と $150\ \text{mg}$ であった。したがって負荷量の 10数% が赤血球で還元され

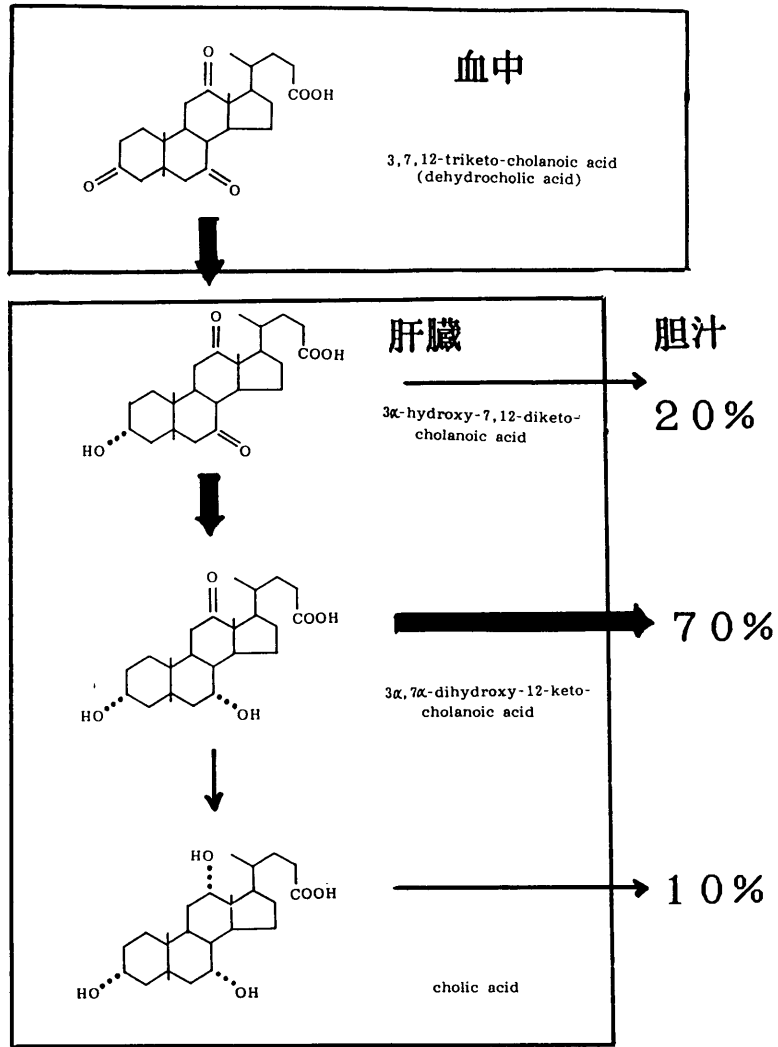


図1 Dehydrocholic acidの代謝経路の従来説

ており、本 altered pathwayは生理的に意義を有すると判断された(図2)。この場合 deoxycholic acid および 3α-hydroxy-7, 12-diketo-cholanoic acidは共に血中から肝に摂取され、代謝をうけるが、上記計算は本因子を無視したものであり、さらに多くの dehydrocholic acidが altered pathwayを経由すると考えられるので、現在詳細な検討を継続中である。

なお、赤血球と dehydrocholic acid のインキュベーション実験からも上記結果を裏づける成績が得られている。

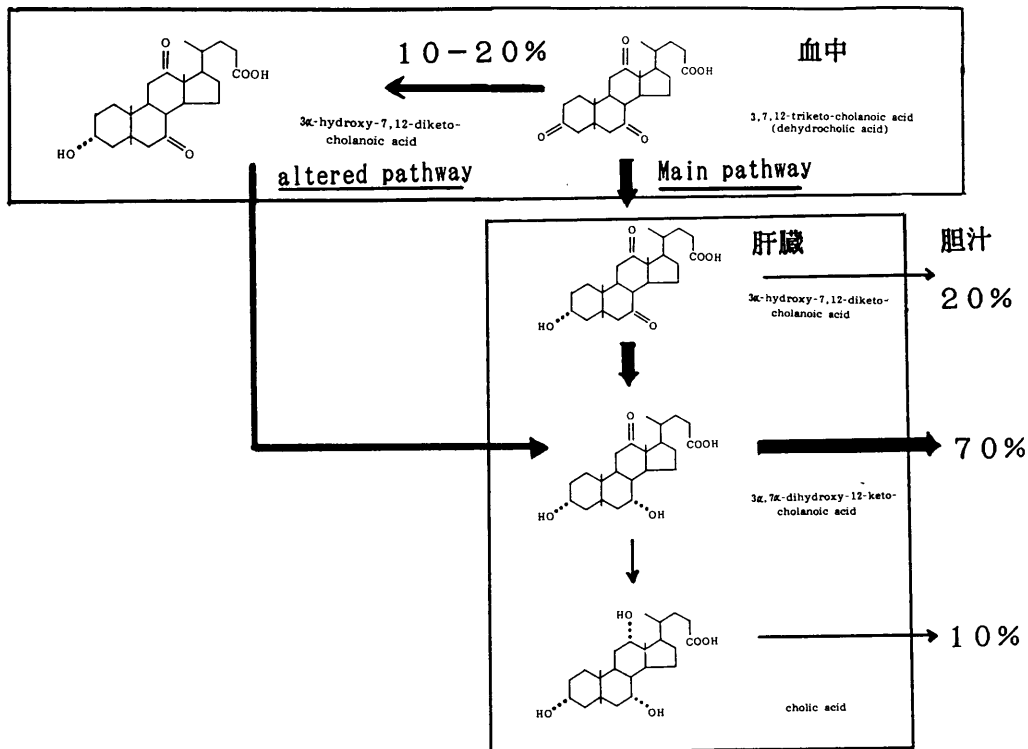


図2 Dehydrocholic acidの代謝マップ

—Main pathwayとaltered pathway—

3. 赤血球還元機構由来の血中胆汁酸の検討

従来の血中胆汁酸の分析報告では、血中に3ケト胆汁酸は原則として存在しないことが明らかにされており、我々が行った血中胆汁酸分析でも同様な成績が得られている。そのメカニズムは、腸管内で二次胆汁酸の3ケト胆汁酸が生成され、それが末梢血中へ流入しても赤血球局在ケト胆汁酸還元酵素が存在するため速やかに3αヒドロキシ体へ還元されることが推察された。

ま と め

赤血球局在ケト胆汁酸還元酵素の役割と特性を dehydrocholic acid を用いて検討し、下記の成果を得た。

- 1) 赤血球局在ケト胆汁酸還元酵素は dehydrocholic acid を 3α-hydroxy-7, 12-diketo-cholanoic acid に変化させる。その作用は肝の 3α-hydroxysteroid dehydrogenase と類似するが、同一酵素ではない。
- 2) 経静脈投与された dehydrocholic acid はその10数%が赤血球により 3α-hydroxy-7, 12-diketo

-cholanoic acid に還元される。本代謝経路は従来報告のない新しい altered pathway であり、生理的意義を有する。

3) 赤血球局在ケト胆汁酸還元酵素が存在するため、血中胆汁酸には原則として3ケト胆汁酸は認められない。

以 上