(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3836148号
(P3836148)
(45)発行日　平成18年10月18日(2006.10.18)　(24)登録日　平成18年8月4日(2006.8.4)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 31/575	(2006.01)	A61K	31/575
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00
A61P 1/00	(2006.01)	A61P	1/00

請求項の数 10　(全 29 頁)

(21)出願番号	特願平9-519828
(86)(22)出願日	平成8年11月19日(1996.11.19)
(65)公表番号	特表2000-500764(P2000-500764A)
(43)公表日	平成12年1月25日(2000.1.25)
(86)国際出願番号	PCT/US1996/018487
(87)国際公開番号	WO1997/018816
(87)国際公開日	平成9年5月29日(1997.5.29)
審査請求日	平成12年3月16日(2000.3.16)
(31)優先権主張番号	08/560,992
(32)優先日	平成7年11月21日(1995.11.21)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　500469235
チルドレンズ　ホスピタル　メディカル　センター
アメリカ合衆国４５２２９－３０３９　オハイオ州，シンシナティ，バーネット　アベニュー　３３３３
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100097870
弁理士　梶原　斎子
(74)代理人　100102897
弁理士　池田　幸弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ウルソデオキシコール酸の硫酸コンジュゲートと、炎症性障害及び他の用途におけるそれらの有利な使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

３α，７β－ジヒドロキシ－５β－コラン－２４－酸（ＵＤＣＡ）のスルフェートまたはそれらの塩と、薬理学的に受容されるキャリヤーとを含む、哺乳動物の胃腸管の炎症性状態を抑制または治療するための組成物であって、前記炎症性状態が結腸癌、直腸癌、結腸の腫瘍、直腸の腫瘍、結腸の発癌、直腸の発癌、潰瘍性大腸炎、腺腫様ポリープ、家族性ポリポーシス及びこれらの組合せから成る群から選択され、前記スルフェートが哺乳動物の前記胃腸管の炎症性状態を抑制または治療するための有効量で存在する薬理学的に受容される組成物。

【請求項２】

前記スルフェートがＵＤＣＡ－３－スルフェート、ＵＤＣＡ－７－スルフェート、ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート、グリコ－ＵＤＣＡ－３－スルフェート、グリコ－ＵＤＣＡ－７－スルフェート、グリコ－ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート、タウロ－ＵＤＣＡ－３－スルフェート、タウロ－ＵＤＣＡ－７－スルフェート、タウロ－ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート、及びこれらの組合せから成る群から選択される、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。

【請求項３】

前記スルフェートがＵＤＣＡ－３－スルフェート、ＵＤＣＡ－７－スルフェート、ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート及びこれらの組合せから成る群から選択される、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。

【請求項４】
前記スルフェートがＵＤＣＡ－７－スルフェート、ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート及びこれらの組合せから成る群から選択される、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。
【請求項５】
前記胃腸管が小腸、大腸、及びこれらの組合せから成る群から選択される、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。
【請求項６】
哺乳動物の大腸にＵＤＣＡを送達するための、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。
【請求項７】
前記スルフェートがＣ－７炭素上にスルフェート部分を含み、ＵＤＣＡによる又はＣ－７炭素上にスルフェート部分を有さないＵＤＣＡスルフェートによる大腸へのＵＤＣＡ送達に比べて、哺乳動物の大腸へのＵＤＣＡ送達を改良する、請求項６記載の薬理学的に受容される組成物。
【請求項８】
前記スルフェートがＣ－７炭素上にスルフェート部分を含み、結腸中のリトコール酸又はその塩、及びデオキシコール酸又はその塩の量を減ずる、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。
【請求項９】
前記スルフェートがＣ－７炭素上にスルフェート部分を含み、結腸におけるリトコール酸又はその塩の、デオキシコール酸又はその塩に対する比率を実質的に高めることなく、結腸にＵＤＣＡを送達する、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。
【請求項１０】
経口投与、局所投与又は静脈内投与用に製剤化されている、請求項１記載の薬理学的に受容される組成物。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
３α，７β－ジヒドロキシ－５β－コラン－２４－酸（“ウルソデオキシコール酸”又は“ＵＤＣＡ”）は２０年間以上にわたって臨床的に用いられており、最初は胆石症患者の治療に有効であると実証され、さらに最近では胆汁うつ滞性（cholestatic）肝疾患の患者の治療に有望であると判明している。ＵＤＣＡの経口投与が血清肝酵素(serum liver enzyme)の有意な改良をもたらすことが充分確立しており、長期間の臨床試験の結果に基づいて、多数意見は、ＵＤＣＡが初期の原発性胆汁性肝硬変の治療に有利であるということである。さらに、臨床試験は、ＵＤＣＡが硬化性胆管炎、嚢胞性線維症及び慢性肝炎を有する患者における肝機能の臨床的及び生化学的インデックス（index）の改良に有益であることを示している。
肝疾患においてＵＤＣＡによって示される有望な効果にも拘わらず、その作用機序はまだ不明である。初期の考察は、胆汁の胆汁酸プール(biliary bile acid pool)の疎水性／親水性バランスのシフトがその効力の重要な決定要素であることを示唆しているが、最近のデータはこの主張を完全には支持していない；肝機能の改良はほぼ確実に、より大きく有害と考えられる胆汁酸又は他の内因性作用剤(endogenous agent)の胆汁排泄を促進する、ＵＤＣＡによって誘導される顕著な胆汁分泌亢進の結果である。
多様な肝疾患を有する患者におけるＵＤＣＡの代謝に重点をおいた研究では、尿中のＵＤＣＡのＣ－３スルフェートエステルの実質的な量（substantial amount）が一貫して観察されており、この特異的代謝産物はＵＤＣＡコンプライアンス(compliance)の有用なマーカーであることが実証されている。さらに、動物試験は、胆汁酸の硫酸化が胆汁うつ滞を防止し、肝細胞損傷を制限するための重要な代謝経路を表しうることを示唆している。
胆汁酸の細胞傷害性又は膜損傷性効果はその物理化学的性質に関係する。疎水性胆汁酸は親水性胆汁酸よりも明らかに膜損傷性であり、細胞傷害性の相対的なインデックスが逆相

高圧液体クロマトグラフィー系における胆汁酸の保持容量に基づいて又はオクタノール／水中の分配係数から確立されている。ヒトの肝臓が、本質的に肝傷害性である疎水性分子のケノデオキシコール酸を、その原発性胆汁酸の１種として合成することは逆説的であり；胆汁うつ滞では、この胆汁酸の肝臓蓄積が肝臓損傷を開始する、又は肝臓損傷に寄与し、又は肝臓損傷を悪化させる可能性がある。これに反して、ＵＤＣＡ、ケノデオキシコール酸の７β－エピマーは高度に親水性であり、疎水性胆汁酸の膜損傷性効果に反作用することが判明している。これは多様な肝疾患の治療にＵＤＣＡを治療的に用いることの１つの根拠である。ＵＤＣＡの経口又は静脈内投与後に、この胆汁酸は肝臓内で主としてコンジュゲーションによって効率的にバイオトランスフォームされる。その結果、比較的高い用量を投与した後にも、ヒトの胆汁中には無視できるような濃度及び割合の非コンジュゲート化ＵＤＣＡが検出されるに過ぎない。

ＵＤＣＡはまた種々な肝疾患の治療へのその使用以外にも治療的役割を有することができる。これに関して、ＵＤＣＡの保護的役割を示唆するデータが結腸発癌の動物モデルから得られている。

しかし、経口投与される通常の治療用量（１０～１５ｍｇ／ｋｇ体重／日）において、ＵＤＣＡが腸から比較的良好に吸収されて、肝臓において主としてコンジュゲーションによって効率的にバイオトランスフォームされることで、結腸へのＵＤＣＡの実際の送達（delivery）は問題である。この結果、ＵＤＣＡの有効量を結腸に特異的に送達することは極めて困難である。

それ故、結腸への送達のこの限定を想定するならば、ＵＤＣＡを結腸に効果的に送達することができる化合物、組成物又は方法を有することが非常に有益であると考えられる。胃腸管の他の部分にＵＤＣＡを効果的に送達するために用いることができる化合物、組成物又は方法を有することも非常に有益であると考えられる。さらに、胃腸管又は肝臓の炎症性障害を効果的に抑制又は治療することに用いるための化合物、組成物又は方法を有することは有利であると考えられる。

発明の概要

本発明の１つの態様は、３α，７β－ジヒドロキシ－５β－コラン－２４－酸（ウルソデオキシコール酸又は“ＵＤＣＡ”）のスルフェート（sulfate）と、薬理学的に受容されるキャリヤーとを包含する薬理学的に受容される組成物に関する。好ましい組成物では、このスルフェートはＵＤＣＡ－３－スルフェート、ＵＤＣＡ－７－スルフェート、ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート、グリコ－ＵＤＣＡ－３－スルフェート、グリコ－ＵＤＣＡ－７－スルフェート、グリコ－ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート、タウロ－ＵＤＣＡ－３－スルフェート、タウロ－ＵＤＣＡ－７－スルフェート、タウロ－ＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェート、又はこれらの組合せである。

本発明の他の態様は、障害を抑制又は治療するために哺乳動物にＵＤＣＡを投与する方法があって、この障害を抑制又は治療するために充分な量でＵＤＣＡのスルフェートを哺乳動物に投与することを含む方法に関する。例えば、結腸癌、直腸癌、結腸の腫瘍(neoplasm)、直腸の腫瘍、結腸の発癌、直腸の発癌、潰瘍性大腸炎、腺腫様ポリープ、家族性ポリポーシス等のような、胃腸管の炎症性状態を抑制又は治療することに、ＵＤＣＡスルフェートを有利に用いることができる。ＵＤＣＡのスルフェートはまた、肝臓の炎症性障害を抑制又は治療するために投与することもできる。ＵＤＣＡのスルフェートは、管疾患若しくは肝機能の血清生化学を改良するため、又は胆汁の流動を高めるため、又はリン脂質若しくはコレステロールの胆汁分泌（biliary secretion）を減ずるために用いることができる。

さらに他の態様では、本発明は、単離された器官を、この器官をＵＤＣＡスルフェートで灌流することによって維持する方法に関する。

本発明は先行技術を凌駕する幾つかの利益及び利点を提供する。例えば、結腸癌等のような炎症性障害の抑制又は治療のために、結腸及び胃腸管の他の部分に治療有効量のＵＤＣＡを投与することができる。さらに、肝疾患を抑制若しくは治療するため又は肝機能を改良するためにＵＤＣＡスルフェートを効果的に用いることができる。本発明の下記詳細な

説明を検討するならば、上記及び他の利益と利点が当業者に容易に明らかになると考えられる。

【図面の簡単な説明】

図１Ａと１Ｂは、ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ－３Ｓ、ＵＤＣＡ－７Ｓ及びＵＤＣＡ－ＤＳの経口投与後の全空腸中のＵＤＣＡの総質量（図１Ａ）と肝組織中の濃度（図１Ｂ）の、対照ラットとの比較を示す。アニオン交換クロマトグラフィー後のＧＣ－ＭＳを用いた個々の画分の分析によって、それらのコンジュゲーション形式に応じて胆汁酸を分離した。結果は全ての動物の平均値として表す；

図２は対照ラットと、ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ３－Ｓ、ＵＤＣＡ７－Ｓ及びＵＤＣＡ－ＤＳを経口投与したラットとにおける糞便胆汁酸排泄を示す。アニオン交換クロマトグラフィー後のＧＣ－ＭＳを用いた個々の画分の分析によって、それらのコンジュゲーション形式に応じて胆汁酸を分離した。結果は全ての動物の平均値として表す；

図３は対照ラットと、ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ３－Ｓ、ＵＤＣＡ７－Ｓ及びＵＤＣＡ－ＤＳを経口投与したラットとの糞便中のリトコール酸／デオキシコール酸の比率を示す。結果は全ての動物の平均値として表す；

図４Ａ～４ＤはＵＤＣＡ（図４Ａ）、ＵＤＣＡ３－Ｓ（図４Ｂ）、ＵＤＣＡ７－Ｓ（図４Ｃ）及びＵＤＣＡ－ＤＳ（図４Ｄ）を経口投与したラットの肝組織中のＵＤＣＡ濃度を示す。アニオン交換クロマトグラフィー後のＧＣ－ＭＳを用いた個々の画分の分析によって、それらのコンジュゲーション形式に応じて胆汁酸を分離した。結果は全ての動物の平均値として表す；

図５Ａと５ＢはＵＤＣＡとスルフェートコンジュゲートとのＩＶ注入中のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットによる平均胆嚢胆汁流動（biliary bile-flow）と胆汁酸アウトプット(bile acid output)とを示す；

図６Ａ～６ＤはＵＤＣＡとそのスルフェートコンジュゲートとの注入後の胆汁酸分泌速度と胆汁－流動との関係を示す；

図７Ａと７ＢはＵＤＣＡとスルフェートコンジュゲートとのＩＶ注入中のＳｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラットによる平均胆汁コレステロールとリン脂質アウトプットとを示す；及び

図８Ａ～８Ｅはラット胆汁注入前（preinfusion）（図８Ａ）、ＵＤＣＡ注入中（図８Ｂ）、ＵＤＣＡ３－Ｓ注入中（図８Ｃ）及びＵＤＣＡ７－Ｓ注入中（図８Ｄ）及びＵＤＣＡ－ＤＳ注入中（図８Ｅ）の負イオンＦＡＢ－ＭＳスペクトルを示す。

発明の詳細な説明

以下に出現する他の略号は下記を包含する：ＧＣ（気液クロマトグラフィー）、ＧＣ－ＭＳ（気液クロマトグラフィー－質量分析法）、ＦＡＢ－ＭＳ（高速原子衝撃－質量分析法）、ＴＬＣ（薄層クロマトグラフィー）、ＨＰＬＣ（高速液体クロマトグラフィー）、ＵＤＣＡ－３Ｓ（ウルソデオキシコール酸－３－スルフェート）、ＵＤＣＡ－７Ｓ（ウルソデオキシコール酸－７－スルフェート）、ＵＤＣＡ－ＤＳ（ウルソデオキシコール酸３，７－ジスルフェート）、ｔＢＤＭＳエーテル（ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルエーテル）及びｔＢＤＭＣ（ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルクロリド）。

以下に示すデータはＵＤＣＡの個々の胆汁酸スルフェートの腸代謝及び挙動と、非コンジュゲート化胆汁酸とを比較し、特に、Ｃ－７スルフェート部分の存在がＵＤＣＡの細菌分解を防止し、ＵＤＣＡの腸吸収を抑制することを示す。

材料と方法

ＵＤＣＡのスルフェートエステル(sulfated ester)の合成

ＵＤＣＡ（９９％純度）はＳｉｇｍａ　ＣｈｅｍｉｃａｌＣｏ．（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。ＵＤＣＡのモノスルフェート及びジスルフェートエステルは、この詳細な説明における以下で段階的に詳細に説明する方法によって製造した。要約すると、モノスルフェートエステルの合成はＵＤＣＡ分子中の環ヒドロキシル基の各々の選択的保護と、その後の非保護ヒドロキシル基の硫酸化と、モノスルフェートエステルを放出するための保護基の加水分解とを含む。ＵＤＣＡのジスルフェートコンジュゲートはＵＤＣＡと

クロロスルホン酸との反応によって製造した。ガスクロマトグラフィー－質量分析法（ＧＣ－ＭＳ）を用いて、酸化、加溶媒分解及び、メチル／エステル－トリメチルシリルエーテル誘導体への転化後の生成物の分析によってスルフェート基の位置を確認した。合成胆汁塩のクロマトグラフィー純度は、高圧液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー及び毛管カラムクロマトグラフィーによって測定して、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートに関しては＞９７％であり、ＵＤＣＡ３－スルフェートに関しては＞９５％であることが発見された。

動物試験

雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（Ｈａｒｌａｎ　Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙ社，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）（体重２１０～２９０ｇ）を3日間、１２時間明暗サイクルで維持し、標準実験食餌(standard laboratory chow)を任意に与えた。次に、これらの動物を代謝ケージ(metabolic cage)に移し、その中にこれらの動物を個別に収容し、同じ食餌を与えた。ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ３－スルフェート、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートを２５０ｍｇ／日の用量で胃管栄養によって連続４日間投与した。各群は３～６匹のラットを含んだ。動物の体重を毎日測定した。５日目に、動物をエーテル麻酔下で放血によって殺した。血漿を回収し、－２０℃において冷凍した。肝臓を取り出し、通常の生理的食塩水中ですすぎ洗いし、液体窒素中でフラッシュ冷凍した(flash-frozen)。尿と糞便を２４時間毎に回収し、－２０℃において冷凍した。全ての動物はＮａｔｉｏｎａｌ　Ａｃａｄｅｍｙ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓによって作成された“Ｇｕｉｄｅ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　ｏｆ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａｎｉｍａｌｓ”（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ出版Ｎｏ．８６－２３、１９８５年改訂）に従ってヒューマンケア（humane care）を受けた。

胆汁酸分析

腸内容物と糞便中の非コンジュゲート化胆汁酸とスルフェート胆汁酸

腸内容物を秤量して、小ピース(small pieces)に分解した。各群において、試験の４日目に全ての動物からの糞便（１００ｍｇ）をプールし、次に磨砕して、微細ペーストにした。全てのサンプルを超音波処理し、続いて、８０％メタノール中で2時間還流させ、クロロホルム／メタノール（１：１）中で1時間還流させた。サンプルを乾燥させ、乾燥した抽出物を８０％メタノール（２０ｍｌ）中に再懸濁させた。メタノール抽出物（腸内容物の１／４０と、糞便サンプルの１／２０）の画分を取り出し、内部標準のノルデオキシコール酸（１０μｇ）を加えた。この抽出物を０．０１ｍｏｌ／リットルの酢酸（２０ｍｌ）によって希釈して、最初にＬｉｐｉｄｅｘ１０００カラム（床サイズ，４ｘ１ｃｍ；Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｃｏ．，オランダ，Ｇｒｏｎｉｎｇｅｎ）に通し、次にＢｏｎｄ－Ｅｌｕｔ　C_{18}カートリッジ（Ａｎａｌｙｔｉｃｈｅｍ，Ｈａｒｂｏｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）に通した。Ｌｉｐｉｄｅｘ１０００カラムとＢｏｎｄ－Ｅｌｕｔカートリッジとをメタノール（それぞれ、２０ｍｌと５ｍｌ）によって溶出させることによって、胆汁酸を回収し、一緒にした抽出物を乾燥させた。ジエチルアミノヒドロキシプロピルＳｅｐｈａｄｅｘ　ＬＨ－２０（Ｌｉｐｉｄｅｘ－ＤＥＡＰ；Ｐａｃｋａｇｅ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｃｏ．）上での親油性アニオン交換クロマトグラフィーによって、非コンジュゲート化胆汁酸を中性ステロール及びコンジュゲート化胆汁酸から単離させ、分離した。非コンジュゲート化胆汁酸の回収は７２％エタノール中の０．１ｍｏｌ／リットル酢酸（７ｍｌ）中による溶離と、その後の溶媒の蒸発とによって達成した。９ｍｌの７２％エタノール中の０．３ｍｏｌ／リットル酢酸（ｐＨ９．６）によって、総コンジュゲート化胆汁酸を回収した。ノルデオキシコール酸（１０μｇ）の添加後にＢｏｎｄ－Ｅｌｕｔ　C_{18}カートリッジに通すことによって塩を取り出し、５ｍｌのメタノールによる溶出によって、コンジュゲート化胆汁酸を回収した。メタノール（１ｍｌ）と、蒸留したテトラヒドロフラン（９ｍｌ）と、ジオキサン中の１ｍｏｌ／リットル　トリフルオロ酢酸（０．１ｍｌ）との混合物中で加溶媒分析をおこない、４５℃に2時間加熱した。加溶媒分析後に、非コンジュゲート化胆汁酸をＬｉｐｉｄｅｘ－ＤＥＡＰ上でのクロマトグラフィ

ーによって単離した。サンプルをメタノール（０．３ｍｌ）中に溶解し、２．７ｍｌの新たに蒸留したエーテル性(ethereal)ジアゾメタンと反応させることによって、メチルエステル誘導体を製造した。試薬の蒸発後に、メチルエステル誘導体を５０ｍｌのＴｒｉ－Ｓｉｌ試薬（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）の添加によってトリメチルシリルエーテルに転化させた。Ｌｉｐｉｄｅｘ５０００のカラム（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　Ｃｏ．）を用いて、誘導体化試薬(derivatizing reagent)を取り出し、サンプルを精製した。

血漿と尿中の非コンジュゲート化胆汁酸とスルフェート胆汁酸

各群において、全ての動物からの尿を回収した個々の日にプールした。１日目(day1)は基底サンプルを表し、２日目、３日目及び４日目からのサンプルは胆汁酸投与中に得た。ノルデオキシコール酸（１μｇ）の添加後に、Ｂｏｎｄ－Ｅｌｕｔ　C_{18}カートリッジを用いて、一部の尿（３ｍｌ）と血漿（１ｍｌ）とから胆汁酸を定量的に抽出した。液体－固体抽出後に、非コンジュゲート化胆汁酸とコンジュゲート化胆汁酸との単離及び分離をＬｉｐｉｄｅｘ－ＤＥＡＰ上での親油性アニオン交換クロマトグラフィーによって達成した。胆汁酸コンジュゲートの加溶媒分解と、加水分解生成物(hydrolyzed product)の単離を上述したようにおこない、胆汁酸を揮発性メチルエステル－トリメチルシリルエーテル誘導体に転化させた。

肝臓と空腸内容物とにおける胆汁酸コンジュゲーション度

肝臓サンプル（１００ｍｇ）を磨砕して、微細ペーストにし、腸内容物と糞便とに関して上述したように、還流と、Ｌｉｐｉｄｅｘ１０００カラムに通すことによって胆汁酸を抽出した。親油性アニオン交換クロマトグラフィーによって、胆汁酸のコンジュゲーション形式に応じた胆汁酸のグループ分け（group separation）を達成した。各動物からの抽出物をプールし、Ｌｉｐｉｄｅｘ－ＤＥＡＰと、下記緩衝剤：７２％エタノール中の０．１ｍｏｌ／リットル酢酸（非コンジュゲート化胆汁酸）；７２％エタノール中の０．３ｍｏｌ／リットル酢酸、ｐＨ５．０（グリシンコンジュゲート）；７２％エタノール中の０．１５ｍｏｌ／リットル酢酸、ｐＨ６．５（グリシンコンジュゲート）；及び７２％エタノール中の０．３ｍｏｌ／リットル酢酸、ｐＨ９．６（スルフェートコンジュゲート）とによるゲル床の階段的溶出とを用いて、胆汁酸とそれらのコンジュゲートとを分離した。緩衝剤の蒸発後に、硫酸化胆汁酸は加溶媒分解したが、アミド化コンジュゲート(amidated conjugate)は２．５ｍｌの０．２ｍｏｌ／リットルリン酸塩緩衝剤、ｐＨ５．６中の５０単位のコリルグリシンヒドロラーゼ（Ｓｉｍｇａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．）によって３７℃において一晩加水分解した。得られた非コンジュゲート化胆汁酸をＬｉｐｉｄｅｘ－ＤＥＡＰ上で単離し、メチルエステル－トリメチルシリルエーテル誘導体を上述したように製造した。

加溶媒分解後に、ラット腸の空腸部分からのアミド化胆汁酸をＬｉｐｉｄｅｘ－ＤＥＡＰ上で、７２％エタノール中の０．１５ｍｏｌ／リットル酢酸、ｐＨ６．５（６ｍｌ）によって溶出させることによって単離した。酵素加水分解を上述したようにおこない、得られた非コンジュゲート化胆汁酸を単離し、上述したように誘導体化した。

ＧＣ－ＭＳ

メチルエステル－トリメチルシリルエーテル誘導体を３０ｍｘ０．２５ｍｍＤＢ－１融合シリカ毛管カラム（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｆｏｌｓｏｎ，ＣＡ）上で、２℃／分の増分による２２５℃から２９５℃までの温度プログラムを用いて、３０分間の最終等温期間によって分離した。同じ条件下で操作される同じガスクロマトグラフィーカラムを収容したＦｉｎｎｉｇａｎ４６３５質量分析計（Ｆｉｎｎｉｇａｎ　Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いて、ＧＣ－ＭＳ分析をおこなった。溶出する成分の反復走査によって５０～８００ダルトンの質量範囲にわたって、電子イオン化（７０ｅＶ）質量スペクトルを記録した。メチレンユニット値と呼ばれる、ｎ－アルカンの同族列を基準にしたガスクロマトグラフィー保持インデックスと、信頼できる標準と比較した質量スペクトルとに基づいて胆汁酸の同定をおこなった。胆汁酸の定量はガスクロマトグラフィーを用いて、個々の胆汁酸のピーク高さ反応を内標準から得られたピーク高さ反応と比較することに

よっておこなった。

液体二次イオン化質量分析法

ステンレス鋼プローブ上にスポットしたグリセロール／メタノールマトリックスの小滴上に約１μｌのメタノール抽出物を供給した後に、尿サンプルの液体二次イオン化質量分析法負イオンスペクトルを得た。このプローブをＶＧ　Ａｕｔｏｓｐｅｃ　Ｑ質量分析計のイオンソース(ion source)中に導入し、セシウムヨウ素(cesium iodine)(３５ＫｅＶ)から発生した、高速セシウム原子のビームをサンプルを含むターゲットに発射した。５０～１０００ダルトンの質量範囲にわたって負イオンスペクトルが得られた。

統計分析

データは、分析前に抽出物をプールしたときの全ての動物の平均値±ＳＥＭとして又は平均値として表現する。種々な群からの結果はペアード(paired)又はアンペアード(unpaired)両側Ｓｔｕｄｅｎｔ　ｔ検定を用いて比較した。＜０．０５のＰ値を統計的に有意と見なされた。

結果

腸に沿った管腔内の胆汁酸組成

対照群の動物と、個々の胆汁酸を投与された動物とに関する腸の棄却された区分の平均重量は同じであった。対照動物では、空腸中のＵＤＣＡの総量（０．０３±０．０１ｍｇ）はごく僅かであり、総胆汁酸の僅か０．３％を占めるものであった。しかし、ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ３－スルフェート、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートの最終用量を投与された後２４時間の全ての動物では、空腸中のＵＤＣＡの総質量（及び総胆汁酸のその割合）はより大きく、それぞれ、９．９５±０．４９ｍｇ（３５．９％）、３．６７±０．４５ｍｇ（１６．４％）、１．０９±０．３４ｍｇ（４．７％）及び０．２１±０．０７ｍｇ（２．０％）であった。この結果は、スルフェート基がＣ－７位置においてコンジュゲートされるときにＵＤＣＡが殆ど保存されないことを示す（表１）。

ＵＤＣＡ及びＵＤＣＡ３－スルフェートを投与された動物の空腸には、$\triangle^{22}$ＵＤＣＡ、外因的に投与されたＵＤＣＡの特定の代謝産物が大きな割合で、多量に検出された。しかし、この代謝産物は対照群では検出されず、ＵＤＣＡのＣ－７スルフェートコンジュゲートを投与された動物の総空腸胆汁酸の＜３％を占めた（表１）。

空腸中のＵＤＣＡのコンジュゲーションパターンを親油性アニオン－交換クロマトグラフィーによって胆汁酸の分離後に調べた場合に（図１）、ＵＤＣＡを投与された動物は主としてグリコ－及びタウロ－ＵＤＣＡを有し、少量の非コンジュゲート化ＵＤＣＡ及び無視できる量の硫酸化ＵＤＣＡを有することが判明した。ＵＤＣＡのアミド化及び非コンジュゲート化形がＣ－７スルフェートの投与後に空腸中で検出されたが、空腸中のＵＤＣＡの総質量は非常に少なかった。ＵＤＣＡ－３－スルフェートを投与されたラットでは、空腸は実質的な割合のアミド化ＵＤＣＡを含有し、このことは脱コンジュゲーション(deconjugation)及び／又はアミド化による有意なバイオトランスフォーメーションを実証する。

内因的胆汁酸に関しては、コール酸が対照動物の空腸中の主要胆汁酸であり、総胆汁酸の４８．５％±２．９％（６．８２±１０１０ｍｇ）を占め、ＵＤＣＡ投与後は、１６．８％±１．３％（４．６８±０．６５ｍｇ）に有意に低下した（Ｐ＝０．０１）。ＵＤＣＡ３－スルフェートも、ＵＤＣＡよりも低い程度にではあるが、コール酸の割合を低下させたが（Ｐ＝０．０５）、ＵＤＣＡのＣ－７スルフェートの投与は空腸中のコール酸の割合を増加させた（Ｐ＝０．０１）（表１）。

対照動物の結腸では、胆汁酸の大部分は二次的（secondary）であり、主としてデオキシコール酸素及びω－ムリコール酸として同定されたが、ごく少量のリトコール酸が検出された（表２）。ＵＤＣＡ投与はデオキシコール酸の割合を低下させたが（Ｐ＝０．００３）、リトコール酸は存在する主要な胆汁酸になり、総結腸胆汁酸の３２．０％±０．８％を占めた（Ｐ＝０．０００４）。これとは対照的に、ＵＤＣＡ７－スルフェートとＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートの投与は、結腸中のデオキシコール酸とリトコール酸の両方の質量と割合とを実質的に減少させた。

糞便胆汁酸排泄
動物群の間で各日排泄される糞便重量の有意差は認められなかった。ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ３－スルフェート、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡジスルフェートを投与された動物における総糞便胆汁酸の排泄は、それぞれ、１４．８５、１０．７０、１２．６５及び１０．８８ｍｇ／ｇ糞便であった。全ての動物の糞便はＵＤＣＡを多く含有したが；非コンジュゲート化胆汁酸を投与された動物では、ＵＤＣＡが殆んど排他的に非コンジュゲート化形で検出された。これとは対照的に、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートを投与されたラットの糞便中には無視できる濃度の非コンジュゲート化ＵＤＣＡが存在し；これらの２種類のコンジュゲートは実際に無変化で糞便中に排泄された（図２）。糞便中に排泄される主要な二次的胆汁酸（secondary bile acid）の濃度は動物群の間で変化した。ＵＤＣＡ群では、リトコール酸が対照値から顕著に増加するが、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートの投与後のリトコール酸の糞便排泄は減少した。デオキシコール酸排泄でも同様な傾向が見られた。標準のラット糞便とを比較すると、リトコール酸／デオキシコール酸のレイション(ration)は、ＵＤＣＡを投与したときは２０倍より大きく増加し、ＵＤＣＡ３－スルフェートを投与したときには１１倍に増加したが、ＵＤＣＡ７－スルフェートを投与したときには増加しなかった（図３）。

肝組織の胆汁酸組成
肝組織中の個々の胆汁酸の濃度と割合とを表３に要約する。対照動物では、ＵＤＣＡ濃度は１２．０ｎｍｏｌ／ｇであり、総肝臓胆汁酸の２．８％を占めた。ＵＤＣＡとＣ－３スルフェートの投与は肝組織ＵＤＣＡの濃度と割合とを増加させた（図１）。さらに、$\triangle^{22}$ＵＤＣＡが肝臓中に比較的高い割合で検出された。これに反して、動物にＣ－７スルフェート胆汁酸を投与したときには、総ＵＤＣＡ濃度と組成％との顕著な低下が生じた。ＵＤＣＡ投与は肝臓リトコール酸濃度を増加させたが、スルフェートコンジュゲートの投与後は、リトコール酸の減少が生じた。全ての群において、胆汁酸の投与によってデオキシコール酸濃度は減少し、この減少はＣ－７スルフェートに関して大きかった。肝組織コール酸濃度はＵＤＣＡを投与したときにほぼ１／４に減少したが、Ｃ－７スルフェートコンジュゲートの投与後にはやや増加した。
個々の胆汁酸の投与後に、肝組織中のＵＤＣＡのコンジュゲーションは、非コンジュゲート化ＵＤＣＡとそのＣ－３スルフェートが主としてタウリンとのコンジュゲーションによって両方ともバイオトランスフォームされることを確立した。投与した胆汁酸に関係なく、無視できる濃度と割合の非コンジュゲート化ＵＤＣＡと硫酸化ＵＤＣＡとが全ての動物の肝組織中に存在した（図４）。

血漿及び尿の胆汁酸組成
ＵＤＣＡを投与させた動物中の非コンジュゲート化血漿ＵＤＣＡ濃度は４．８±２．２μｍｏｌ／リットルであり、この値はＵＤＣＡ３－スルフェート（０．９±０．４μｍｏｌ／リットル）、ＵＤＣＡ７－スルフェート（０．７±０．５μｍｏｌ／リットル）及びＵＤＣＡジスルフェート（１．０±０．２μｍｏｌ／リットル）を投与された動物に関して検出された値よりも有意に大きかった。硫酸化ＵＤＣＡ濃度は全ての動物群において同じであり、＜０．３μｍｏｌ／リットルであった。
ＵＤＣＡの尿排泄は、全ての動物に関して胆汁酸投与前は無視できる程度（＜０．４ｎｍｏｌ／リットル）であった。ＵＤＣＡ後に、尿の非コンジュゲート化ＵＤＣＡ排泄は６４２．７ｎｍｏｌ／日であった。これはスルフェートコンジュゲート（ＵＤＣＡ３－スルフェート，５．２ｎｍｏｌ／日；ＵＤＣＡ７－スルフェート，１．８ｎｍｏｌ／日；及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェート，１．３ｎｍｏｌ／日）を投与された動物の尿中に排泄されるＵＤＣＡ濃度よりも有意に大きかった。ＵＤＣＡのスルフェートコンジュゲートは非コンジュゲート化ＵＤＣＡ（４．６ｎｍｏｌ／日）、ＵＤＣＡ３－スルフェート（２．７ｎｍｏｌ／日）、ＵＤＣＡ７－スルフェート（３１７．８ｎｍｏｌ／日）及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェート（２１７．１ｎｍｏｌ／日）の投与後の尿中にも検出された。これは一日投与量の＜０．０５％に相当するが、これらの胆汁酸コンジュゲートを液体二次イ

オン化質量分析法によって検出することが可能であった。
考察
肝組織ＵＤＣＡ濃度はＵＤＣＡの経口投与によって顕著に増加したが、この胆汁酸は主としてアミド化によってコンジュゲート化された。無視できる量の非コンジュゲート化ＵＤＣＡが検出され（図４）、これに関して、その代謝はヒトの代謝に類似する。これとは対照的に、Ｃ－７スルフェート及びジスルフェートコンジュゲートを投与した場合には、ＵＤＣＡの肝臓濃度は対照動物に比べて低く、このことはこれらのコンジュゲートが腸から吸収されないために、ＵＤＣＡの保存が無視できる程度であることを実証した。肝臓ＵＤＣＡ濃度はＣ－３スルフェートの投与後に増加したが、これが主としてアミド化されるという事実は、ＵＤＣＡ３－スルフェートの有意な脱硫酸化（desulfation）とアミド化とがおこなわれたことを実証した。空腸におけるＵＤＣＡのコンジュゲーションのパターンは肝組織の同パターンに匹敵するが、ＵＤＣＡ投与群とＵＤＣＡ３－スルフェート投与群では高い割合の非コンジュゲート化ＵＤＣＡが存在した（図１）。胆汁酸供給（feeding）の以前の研究は、胆汁酸プールの最大の富化が４日間までに得られ、供給を持続しても胆汁酸組成の他の変化がもはや生じないことを確立している。
ＵＤＣＡのＣ－７スルフェートの腸吸収が無いことは糞便の胆汁酸組織にさらに表れる。ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートを投与された動物におけるＵＤＣＡの総量の糞便濃度は、ＵＤＣＡ又はＵＤＣＡ３－スルフェートを投与された動物の糞便中に検出されるＵＤＣＡ濃度よりも顕著に大きかった。さらに、ＵＤＣＡのＣ－７スルフェートは主として無変化で糞便中に排泄された。これらの研究結果は、Ｃ－３胆汁酸スルフェートに対してのみ活性であることが既に判明している細菌スルフェート（bacterial sulfate）の基質特異性によって説明することができる。ＵＤＣＡ投与は主要な二次的胆汁酸とリトコール酸及びデオキシコール酸との糞便排泄に対して顕著な影響を及ぼした。非コンジュゲート化ＵＤＣＡ及びＵＤＣＡ３－スルフェートを投与した場合には糞便リトコール酸濃度の大きな増加が生じたが、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートの投与はこれらの二次的胆汁酸の糞便アウトプットに有意な影響を与えなかった。
糞便及び肝臓のリトコール酸濃度の増加はＵＤＣＡとこれより軽度ではあるがそのＣ－３スルフェートとの腸細菌バイオトランスフォーメーションによって説明することができる。ＵＤＣＡからリトコール酸へのバイオトランスフォーメーションはラットとヒトの両方において同じような程度に生ずる。ＵＤＣＡを投与された動物の糞便中のデオキシコール酸の増加は末端回腸におけるコール酸吸収の既知の競合阻害と一致し、このコール酸吸収の競合阻害は結腸への溢流(spill-over)の増加と、その結果の７α－デヒドロキシレーション(dehydroxylation)とをもたらし、デオキシコール酸を形成する。興味深いことには、ＵＤＣＡ　Ｃ－７スルフェートは逆の効果を有するように思われる；肝組織中のコール酸濃度は対照動物に比べてやや増加し、糞便コール酸とデオキシコール酸濃度は減少した。
ＵＤＣＡが有意なバイオトランスフォーメーションを受けてリトコール酸になり、糞便デオキシコール酸濃度を高め、これらの両方が高度に疎水性の胆汁酸であるという事実を考慮すると、化学的に誘導された結腸癌の動物モデルにおいてＵＤＣＡの有益な効果が示されていることは恐らく意外であろう。これらのモデルでは、疎水性胆汁酸が腫瘍の成長を促進することが決定的に確立されている。胆汁酸の直腸投与と経口投与、盲腸への胆汁転換（diversion）、コレスチラミン供給、食餌の脂肪及びある種の繊維（全てが結腸を通しての胆汁酸の流動を高める条件）は、促進効果と一致して、腫瘍形成を増強する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ研究は、デオキシコール酸とリトコール酸がコマイトジェン性（comitogenic）であり、結腸上皮細胞増殖速度を高めることを実証する。オルニチンデカルボキシラーゼ活性とＨＬＡクラスＩ及びクラスＩＩ抗原とに対する他の効果も判明している。
ＵＤＣＡの化学予防効果(chemopreventive effect)に関しては幾つかの可能な説明が存在する。膜傷害性である疎水性胆汁酸と共にｉｎ　ｖｉｔｒｏで同時インキュベートする又はｉｎ　ｖｉｖｏで同時注入するときのＵＤＣＡの細胞保護効果と同様な形式で、結腸に

おけるリトコール酸形成の増加の如何なる有害な効果も比較的高濃度のＵＤＣＡの存在によって緩衝されることができる。或いは、保護効果は結腸デオキシコール酸濃度の低下の結果である可能性があり、このことはデオキシコール酸が結腸癌の促進において非常に重要であることを意味すると考えられる。硫酸化胆汁酸の投与によって結腸デオキシコール酸が同様に減少するにも拘わらず、ＵＤＣＡのＣ－７スルフェート類は、これらのコンジュゲートがより大きく疎水性の胆汁酸にバイオトランスフォームされないので、原則としてＵＤＣＡよりも優れている。さらに、小腸においてＣ－７スルフェートの吸収が無いことは小量の使用によって同様な化学的予防効果を得ることを可能にすると考えられる。

ヒトの結腸発癌における胆汁酸の役割はあまり明らかにされていない。初期の研究は、糞便胆汁酸排泄、特にリトコール酸とデオキシコール酸の排泄が結腸癌患者、腺腫ポリープ患者及び家族性ポリポーシス患者において増加することを示唆しているが、これらの研究結果は数人の他の研究者によっては実証されていない。対照と比較して、結腸癌患者又は腺腫ポリープ患者は糞便中の増大した水相リトコール酸及びデオキシコール酸濃度を有すると報告されており、これらの濃度は結腸細胞の増殖度と相関した。結腸癌の動物モデルとｉｎ　ｖｉｔｏ細胞系とにおいてＵＤＣＡの化学保護（chemoprotective）／細胞保護効果を支持する先行データにも拘わらず、ＵＤＣＡ投与後のリトコール酸形成の増加は結腸におけるＵＤＣＡの総合的効力を限定すると考えられる。糞便中のリトコーレート／デオキシコーレートのレイションはＵＤＣＡ投与後及びＵＤＣＡ３－スルフェート投与後は対照に比べて顕著に増加する（図３）。このことは、結腸癌患者及び結腸癌の高い危険性状態にある患者では糞便リトコーレート／デオキシコーレートの比率が増加し、この比率は診断価値があると提案されているので、あまり望ましくない。他方では、ＵＤＣＡ７－スルフェート及びＵＤＣＡ３，７－ジスルフェートの投与はリトコーレート／デオキシコーレートのレイションを変化させなかった。統計的に有意ではないが、このレイションの減少傾向が観察されたが、これらの二次的胆汁酸の量的な糞便排泄は対照動物と同じであった。

さらに、上記で考察したように、ＵＤＣＡのＣ－７位置におけるスルフェート基の導入はこの分子の親水性を高め、腸吸収を防止することによって、結腸へのＵＤＣＡの部位特異的送達を容易にする。リトコール酸に転化することによって、糞便のリトコール酸／デオキシコール酸比率を高め、結腸疾患の危険因子と見なされる非コンジュゲート化ＵＤＣＡとは対照的に、Ｃ－７スルフェートは代謝的に不活性である。それ故、これらのコンジュゲート化胆汁酸は結腸においてＵＤＣＡよりも有効な化学保護剤であると考えられる。

ラットにおける胆汁流動（bile-flow）と胆汁脂質分泌に対するデオキシコール酸のスルフェートエステルの代謝と効果

ＵＤＣＡのＣ－３及びＣ－７スルフェートエステルとジスルフェートコンジュゲートをすぐ下記で段階的に詳述するように製造した。続いて、胆道フィステル（bile fistula）中のこれらの胆汁酸の肝臓代謝を試験し、これらの胆汁酸をＵＤＣＡと比較して、胆汁流動と胆汁脂質分泌に対するこれらの効果を確認した。

材料と方法

ウルソデオキシコール酸３－スルフェート（ＵＤＣＡ－３Ｓ）の合成

イミダゾール（３．５ｇ）とｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルクロリド（１．６ｇ）とを、無水ジメチルホルムアミド（１．５ｍｌ）－ピリジル（０．７５ｍｌ）中のＵＤＣＡ（２ｇ）の氷冷(ice-cold)溶液に加え、この混合物を３０分間撹拌した。次に、この反応混合物を氷水（２０ｍｌ）中に注入して、酢酸エチル（１００ｍｌ）によって抽出した。有機層を水で洗浄し、無水Na_2SO_4上で乾燥させ、蒸発させた。得られた油性残査をヘキサン－酢酸エチル（３：１容量％、２５０ｍｌ）中に溶解し、４０ｇのシリカゲルカラム（２８－２００　Ｍｅｓｈ、Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．社、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ）。溶液を蒸発させた後に、残渣をエタノール中に溶解し、生成物のＵＤＣＡ－３－ｔＢＤＭＳエーテル（２．１５ｇ、収率８３％）を結晶化した。室温における無水酢酸（２０ｍｌ）とピリジン（２０ｍｌ）とによるＵＤＣＡ－３－ｔＢＤＭＳエーテル（２．０ｇ）の５の処理は、油性生成物としてＵＤＣＡ７－アセテート３－ｔｂＤＭＳエーテ

ルを生じた。アセトン（２４ｍｌ）中のＵＤＣＡ７－アセテート３－ｔｂＤＭＳエーテルの溶液に、１８％ＨＣｌ（２．４ｍｌ）を加え、混合物を室温において３０分間撹拌した。得られた生成物を酢酸エチル中に抽出し、水によって洗浄し、無水Na_2SO_4上で乾燥させ、溶媒を蒸発させて、ウルソデオキシコール酸７－アセテートを油性生成物として得た。無水ピリジン（１２ｍｌ）中のクロロスルホン酸（１．２ｍｌ）をＵＤＣＡ７－アセテート（１．２ｇ）の氷冷溶液に加え、この溶液を５０℃に加熱した。３０分間後に、水（４００ｍｌ）を加えて反応混合物の反応を停止させ、生成物をオクタデシルシラン結合シリカの大型カートリッジ、ＭＥＧＡ－ＢＯＮＤ－ＥＬＵＴ（Ｖａｒｉａｎ、Ｈａｒｂｏｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）上に吸収させ、メタノールによる溶出によって回収した。次に、メタノール抽出物を蒸発乾固させ、次に、ＵＤＣＡ７－アセテート３－スルフェートのピリジニウム塩を０．２Ｍ　ＮａＯＨメタノール溶液（４０ｍｌ）中に溶解することによって二ナトリウム塩に転化させ、濾過した。濾液を冷エーテル（４００ｍｌ）によって希釈して、沈殿を回収し、冷エーテルによって洗浄し、乾燥させた。固体（１．０ｇ）をＭｅＯＨ（１０ｍｌ）中に溶解し、３．５Ｍ　ＮａＯＨ（１０ｍｌ）を加え、溶液を室温において１８時間撹拌した。水（５００ｍｌ）によって希釈した後に、生成物をＭＥＧＡ－ＢＯＮＤ－ＥＬＵＴによって抽出した。カートリッジからのメタノール抽出物を蒸発乾固させ、０．２Ｍ　ＮａＯＨメタノール溶液（３０ｍｌ）中に溶解して、濾過した。濾液を冷エーテル（３００ｍｌ）によって希釈し、得られた沈殿を回収し、エーテルによって洗浄した。この操作をメタノール（２０ｍｌ）とエーテル（２００ｍｌ）とによって3回繰り返して、ＵＤＣＡ－３－スルフェートの二ナトリウム塩（０．６２ｇ、収率５０％）を得た。

ウルソデオキシコール酸７－スルフェート（ＵＤＣＡ－７Ｓ）の合成

無水ピリジン（９ｍｌ）中のクロロスルホン酸（０．９ｍｌ）をＵＤＣＡ３－ｔｂＤＭＳエーテル（９００ｍｇ）の氷冷溶液に加え、混合物を５０℃に加熱した。３０分間後に、水（４００ｍｌ）を加えて、反応を停止させた。沈殿の、ＵＤＣＡ３－ｔｂＤＭＳ７－スルフェートのピリジウム塩を水によって洗浄し、真空下で乾燥させ、ＨＣｌによって上述したように加水分解した。生成物をＭＥＧＡ－ＢＯＮＤ－ＥＬＵＴのカートリッジによって抽出し、メタノール抽出物を蒸発乾固させ、０．２Ｍ　ＮａＯＨメタノール溶液（３０ｍｌ）中に溶解した。メタノール溶液を冷エーテル（３００ｍｌ）によって希釈して、沈殿した二ナトリウム塩を上述したように単離して、ＵＤＣＡ７－スルフェートの純粋な二ナトリウム塩（６４０ｍｇ、収率７６％）を得た。

ウルソデオキシコール酸３，７－ジスルフェート（ＵＤＣＡ－ＤＳ）の合成

ピリジン（１０ｍｌ）中のクロロスルホン酸（１ｍｌ）を無水ピリジン（１０ｍｌ）中のＵＤＣＡ（１ｇ）の氷冷溶液に加え、混合物を５０℃に加熱した。６０分間後に、水（５００ｍｌ）を加えて、反応を停止させた。生成物をＭＥＧＡ－ＢＯＮＤ－ＥＬＵＴによって抽出し、上述したように単離して、ＵＤＣＡ－ジスルフェートの二ナトリウム塩（１．１ｇ、収率９１％）を得た。

酸化、加溶媒分解及び、メチル－トリメチルシリル（Ｍｅ－ＴＭＳ）エーテル誘導体への転化後の全ての合成した化合物中のスルフェート基の位置を、ガス－クロマトグラフィー－質量分析法（ＧＣ－ＭＳ）を用いて確認した。合成化合物のクロマトグラフィー純度は高圧液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）及び毛管カラムガスクロマトグラフィー（ＧＣ）によって測定して、＞９７％であることが判明した。

動物試験

成体雄Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット（体重２００～２３０ｇ）をペントバルビタール（Ｎｅｍｂｕｔａｌ、７．５ｍｇ／１００ｇ体重）の腹腔内注入によって麻酔させ、追加の投与量によって鎮静状態に維持した。右頚静脈と総胆管とに、ＰＥ－５０ポリエチレンチューブ（Ｃｌａｙ－Ａｄａｍｓ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）を用いてカニューレを挿入した。実験を通して、直腸プローブとサーモスタット制御加熱パッド（Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓ　Ｃｏ．社，Ｍｉｌｌｉｓ，Ｍａｓ．）とを用いて、体

温を３７℃に維持した。Ｈａｒｖａｒｄポンプ（Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓ Ｃｏ．社）を用いて、生理的食塩水を１．０ｍｌ／時の速度で、頚静脈中に２時間の対照期間(control period)にわたって注入した。基底分析(base-line analysis)のために２つの１０分間胆汁サンプルを回収した後に、胆汁酸を個々に、段階的に投与量を増加させて（０．５、１．０及び２．０μｍｏｌ／分／１００ｇ体重）３０分間にわたって静脈内（ｉ．ｖ．）注入した。胆汁酸溶液は０．４５％生理的食塩水中３％ヒトアルブミン中に調製した。各実験に６匹の動物を用いて、胆汁を予め秤量した管中に１０分間毎に回収した。実験の終了時に、心臓穿刺によって血液を採取し、膀胱の吸引によって尿を採取した。全ての生物学的標本は－２０℃において保存した。この動物試験プロトコール（＃１Ｂ１００４４）はＣｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｈｏｓｐｉｔａｌ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ（Ｃｉｎｃｉｎｎａｔｉ，Ｏｈｉｏ）のＢｉｏｅｔｈｉｃｓ委員会によって認可された。

分析方法

プレコートした（precoated）シリカゲルＧプレート（Ｍｅｒｃｋ，０．２ｍｍ厚さ）上でｎ－ブタノール－酢酸－水（１０：１：１、容量比）の溶媒系を用いて、ＴＬＣをおこなった。ホスホモリブデン酸の１０％エタノール溶液を吹き付けた後に１２０℃において５分間加熱することによって、スポットを可視化した。

可変波長ＵＶ検出器を装備し、２５ｘ０．４６ｃｍのＨｙｐｅｒｓｉｌ ＯＤＳカラム（５μｍ粒度；Ｋｅｙｓｔｏｎｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｂｅｌｌｅｆｏｎｔｅ，ＰＡ）を収容するＶａｒｉａｎ ５０００ＨＰＬＣ機器（Ｖａｒｉａｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ社，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）を用いて、ＨＰＬＣをおこなった。このカラムは周囲温度において操作し、溶離用溶媒は、ｐＨ６．８に調節し、Ｒｏｓｓｉ等の方法［「ヒト胆汁中のコンジュゲート化胆汁酸の高圧液体クロマトグラフィー分析：硫酸化及び非硫酸化リトコリルアミデートの同時分解（simultaneous resolution）と、総コンジュゲート化胆管（common conjugated bile duct）」，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ Ｒｅｓ．２８：５８９～５９５（１９８７）］から改良した、メタノール－０．０１Ｍリン酸塩緩衝剤（６５：３５、容量比）であった。流速度は１．０ｍｌ／分であり、胆汁酸は２０５ｎｍにおける吸収によって検出された。

ＧＣは３０メートルＤＢ－１（４ｍｍ内径；０．２５μｍフィルム）融合シリカ毛管カラム（Ｊ＆Ｗ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社，Ｒａｎｃｈｏ Ｃｏｒｄｏｖａ，ＣＡ）を収容するＨｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ５８９０ガス クロマトグラフ上で、２℃／分の増分による２２５℃から２９５℃までの温度プログラムと、それぞれ、２分間と３０分間の初期と最終の等温期間とを用いて、実施した。ヘリウムをキャリヤーガスとして１．８ｍｌ／分の流速度で用いた。

ＧＣ－ＭＳは、同じＧＣカラムを収容して、同じクロマトグラフィー条件下で操作されるＶＧ Ａｕｔｏｓｐｅｃ Ｑ磁気セクター機器（magnetic sector instrument）又はＦｉｎｎｉｇａｎ４６３５ファドルプルＧＣ－ＭＳ－ＤＳ機器上で実施した。電子イオン化（７０ｅＶ）質量スペクトルを５０～１０００Ｄａ／ｅの質量範囲にわたって溶出成分の反復走査によって記録した。

胆汁サンプル、尿及び合成化合物の負イオン高速原子衝突－質量分析法（ＦＡＢ－ＭＳ）スペクトルを、ＦＡＢプローブの銅ターゲット上にスポットしたグリセロールマトリックスの小滴上に、等量の約１μｌのオリジナル胆汁抽出物と、１０μｌ～５０μｌの尿抽出物と、メタノール中に溶解したμｇ量の合成胆汁酸とを供給した後に得た。このプローブを質量分析計のイオンソース中に直接導入し、８ｋＶ及び２０μＡで操作されるサドルフィールド 原子ガン（saddle field atom gun）（Ｉｏｎ Ｔｅｃｈ，Ｔｅｄｄｉｎｇｔｏｎ，Ｍｉｄｄｌｅｓｅｘ，ＵＫ）によって発生したキセノン、又はセシウム ヨウ素（３５ｋＶ）から発生したセシウムのいずれかの高速原子ビームを、サンプルを含むターゲットに発射した。５０～１０００Ｄａ／ｅの質量範囲にわたって負イオンスペクトルが得られた。

胆汁分析

胆汁量を１ｇ／ｍｌの密度を想定して、重量分析によって測定した。加溶媒分解前（非硫

酸化胆汁酸）と加溶媒分解後（総胆汁酸）とに、胆汁中の総３α－ヒドロキシ胆汁酸濃度を酵素的に測定した（Ｍａｓｈｉｇｅ，Ｆ．等，「血清中の総胆汁酸の直接分光測定法」，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．２７：１３５２～１３５６（１９８１））。胆汁流動速度に胆汁酸濃度を乗ずることによって、胆汁酸アウトプットを算出した。胆汁リン脂質(biliary phospholipid)をコリンオキシダーゼ方法（Ｎｉｐｐｏｎ　Ｓｈｏｊｉ社，日本、大阪）に基づく酵素的方法によって測定した（Ｇｒａｎｔｚ，Ｄ．等，「胆汁中のコリン含有リン脂質の酵素による測定」，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ　Ｒｅｓ．２２：２７３～２７６（１９８１））。コレステロールも酵素的に測定した（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｅｈｉｍ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）（Ｆｒｏｍｍ，Ｈ．等，「ヒト胆汁中のコレステロール分析のための単純酵素アッセイの使用」，Ｊ．Ｌｉｐｉｄ　Ｒｅｓ．２１：２５９～２６１（１９８０））。

胆汁及び尿の胆汁酸分析

注入した胆汁酸の肝臓バイオトランスフォーメーションを測定するために、６匹の動物からの胆汁回収物(bile collections)をプールし、抽出、加溶媒分解、加水分解及び誘導体化後に、胆汁の胆汁酸をＧＣ－ＭＳによって測定した。胆汁酸の定量はＧＣを用いて、個々の胆汁酸のピーク高さ反応を、最初の胆汁サンプルに加えた内標準のノルデオキシコール酸から得られたピーク高さ反応に比較することによって、達成した。胆汁酸の同定はメチレンユニット値（ＭＵ）と呼ばれる、ｎ－アルカンの同族系列に比較して、保持インデックスに基づいておこなった、質量スペクトルの分画パターン（fragmentation pattern）を信頼できる標準と比較した。信頼できる胆汁酸標準の１００を越える質量スペクトルと保持インデックスとのリストが最近、基準ソース(reference source)として編集された（Ｌａｗｓｏｎ，Ａ．Ｍ．等，「胆汁酸の質量分析法」，Ｔｈｅ　Ｂｉｌｅ　Ａｃｉｄｓ，４巻、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，１６７～２６７頁（１９８８））。６匹の動物からの尿回収物をプールし、胆汁酸をＢｏｎｄＥｌｕｔ－C_{18}カートリッジを用いた液体－固体抽出によて抽出し、胆汁酸を加溶媒分解、加水分解及び誘導体化後に、ＧＣ－ＭＳによって胆汁酸を分析した。

親油性アニオン交換クロマトグラフィーを用いた胆汁酸のグループ分け

ＵＤＣＡ－３Ｓを注入した動物の割合に、胆汁酸注入（１．０μｍｏｌ／分／１００ｇ体重）の最終期間中に胆汁を回収した。胆汁酸を加溶媒分解し、親油性アニオン交換ゲル、ジエチルアミノヒドロキシプロピルＳｅｐｈａｄｅｘ　ＬＨ－２０（Ｐａｃｋａｒｄ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｇｒｏｎｉｎｇｅｎ，オランダ）を用いて、それらのコンジュゲーション形式に基づいてグループに分離した。加水分解と、Ｍｅ－ＴＭＳエーテルの調製後に、各画分中の胆汁酸組成をＧＣ－ＭＳによって測定した。

統計的方法

結果は平均値±平均値の標準誤差（ＳＥＭ）として表現した。胆汁流動と胆汁脂質アウトプットとは、それぞれ、μｌ／分／ｇ肝臓とｎｏｍｏｌ／分／ｇ肝臓として表す。統計分析はＩＮＳＴＡＴプログラム（Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ社，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いておこなった。グループ間のパラメトリックデータ（parametric data）をＳｔｕｄｅｎｔ　ｔ－検定を用いて分析した。異なるグループ間の統計的比較は一方向分散分析(one way analysis of variance)（ＡＮＯＶＡ）によっておこなった。これらの数値が異なる胆汁塩の注入に関して有意であることが判明し、任意の２グループの比較をＢｏｎｆｅｒｒｏｎｉ　ｔ－検定によっておこなった。線形回帰分析をおこなった。各胆汁酸の胆汁分泌促進活性を胆汁酸分泌速度と胆汁流動との間の相互関係の回帰線の勾配から判定し、μｌ／μｍｏｌとして表現した。勾配間の比較は一方向ＡＮＯＶＡによっておこなった。

結果

胆汁流動と胆汁酸分泌

胆汁流動と胆汁酸分泌速度とに対するＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ－３Ｓ、ＵＤＣＡ－７Ｓ及びＵＤＣＡ－ＤＳのｉ．ｖ．注入の効果を図５Ａと５Ｂに示し、表４に要約する。全ての胆汁酸は顕著に胆汁分泌促進性であり、最大胆汁流動の順序はＵＤＣＡ－３Ｓ＜ＵＤＣＡ＜Ｕ

ＤＣＡ－７Ｓ＝ＵＤＣＡ－ＤＳであった。胆汁の胆汁酸分泌速度は全ての動物において、ＵＤＣＡ－３Ｓ、ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ－ＤＳ及びＵＤＣＡ－７Ｓの注入中に、それぞれ、１３８．９±１１．８、１４５．１±１７．３、２２２．４±２４．３及び２５５．４±１８．２ｎｍｏｌ／分／ｇ肝臓の最大値まで増加した。比較のために、基底胆汁酸分泌は平均して４０．４±４．２ｎｍｏｌ／分／ｇ肝臓であった。各胆汁酸の注入後の胆汁酸分泌速度と胆汁流動との関係を図６に示す。回帰線の勾配から算出された、ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ－７Ｓ、ＵＤＣＡ－３Ｓ及びＵＤＣＡ－ＤＳの見かけの胆汁分泌促進活性は、それぞれ、１６±２、１５±１、１３±１及び１６±１μｌ／μｍｏｌであった。胆汁酸に依存しない胆汁流動を実証する回帰線のインターセプト（intercept）は全ての動物群に関して同じ大きさ（１．７μｌ／分／ｇ肝臓）であった。

胆汁脂質分泌

コレステロールとリン脂質との胆汁アウトプットに対するＵＤＣＡとそのスルフェートコンジュゲート注入の効果を図７Ａと７Ｂに示す。ＵＤＣＡとＵＤＣＡ－７Ｓ注入の最初の４０分間にわたって、胆汁コレステロールは増加し、それぞれ、１．８８±０．１９と１．７６±０．２１ｎｍｏｌ／分／ｇ肝臓の最大分泌速度に達し、コレステロール分泌はＵＤＣＡ－７Ｓによって維持されたが、ＵＤＣＡをさらに投与量を段階的に高めながら注入した場合には顕著な低下を示した。注入前の期間（pre-infusion period）では、コレステロールの対応する分泌速度は平均して、それぞれ、１．４６±０．１と１．４２±０．１６ｎｍｏｌ／分／ｇ肝臓であった。これに反して、ＵＤＣＡ－３ＳとＵＤＣＡ－ＤＳの注入は胆汁コレステロールアウトプットを基底値に比べて有意に低下させて、それぞれ、０．４０±０．０５と０．３７±０．１２ｎｍｏｌ／分／ｇ肝臓にした。胆汁リン脂質分泌はＵＤＣＡとＵＤＣＡ－７Ｓの注入によって有意に増加したが、これに反して、ＵＤＣＡ－３ＳとＵＤＣＡ－ＤＳは胆汁リン脂質を有意に減少させた（表４）。

胆汁及び尿の胆汁酸の負イオンＦＡＢ－ＭＳ分析

非コンジュゲート化ＵＤＣＡの注入前（基底期間）と注入中に回収したプールされたラット胆汁の負イオンＦＡＢ－ＭＳスペクトルを図８Ａと８Ｂに示す。基底胆汁サンプル中のｍ／ｚ５１４とｍ／ｚ４９８とのイオンは、それぞれ、トリヒドロキシ－及びジヒドロキシ－コラノエートのタウリンコンジュゲートを表し、ラット胆汁中の主要な種である原発性胆汁酸を表す。ＵＤＣＡの注入中に、スペクトル中の主要なイオンはｍ／ｚ４９８とｍ／ｚ４４８になり、このことは注入されたＵＤＣＡが殆ど排他的にタウリン及びグリシンとコンジュゲートしたことを示す。ｍ／ｚ４７１のイオンはジヒドロキシコラノエート（ＵＤＣＡ）スルフェートを表し、ｍ／ｚ５６７とｍ／ｚ５８９（ナトリウムアダクツ）のイオンはＵＤＣＡのフルクロニドコンジュゲートを表す。

ＵＤＣＡ－７Ｓの注入中に、スペクトル（図８Ｄ）中の主要なイオンはｍ／ｚ４７１であり、そのナトリウムアダクツはｍ／ｚ４９３であり、これらのイオンは無変化ＵＤＣＡ－７Ｓを表す。ＵＤＣＡ－７Ｓのさらなる代謝転換を示す、他の有意なイオンは存在しなかった。

ＵＤＣＡ－３Ｓの注入中に、ｍ／ｚ４７１とｍ／ｚ４９３（ナトリウムアダクツ）におけるイオンは無変化胆汁酸の胆汁分泌を確証し、ｍ／ｚ５５０とｍ／ｚ６００におけるイオンはグリシン及びタウリンによるアミド化を表す（図８Ｃ）。

ＵＤＣＡ－ＤＳの注入中に、主要なイオンはｍ／ｚ４７１とｍ／ｚ４９３（ナトリウムアダクツ）とｍ／ｚ５７３とであった。ｍ／ｚ５７３のイオンはＵＤＣＡ－ＤＳを表し、ｍ／ｚ４７１とｍ／ｚ４９３はフラグメントイオンである。ＵＤＣＡ－ＤＳのさらなる代謝転換を示す、他のイオンは存在しなかった（図８Ｅ）。

胆汁の胆汁酸のＧＣ－ＭＳ分析

表５は、ＵＤＣＡの注入後の胆汁中の個々の胆汁酸と、種々なスルフェートコンジュゲートとの相対的％組成を要約する。基底状態において、コール酸、α－ムリコール酸及びβ－ムリコール酸がラット胆汁の主要な胆汁酸であった。全ての化合物の注入中に、ＵＤＣＡが主要な胆汁中胆汁酸になり、％組成は全ての群で同じであり、このことは硫酸化胆汁酸の全てが肝臓によって吸収されて、胆汁中に効率的に分泌されたことを示した。

ＵＤＣＡのＣ－７スルフェートとジスルフェートエステルとのアミド化を含めたバイオトランスフォーメーションを支持する証拠は存在しなかったが、非コンジュゲート化ＵＤＣＡとＵＤＣＡ－３Ｓの両方は、恐らく側鎖において、さらなるヒドロキシル化によって代謝された、しかし、ヒドロキシル化代謝産物の正確な構造はまだ明確に確立されていない。

ＵＤＣＡ－３Ｓの注入中に胆汁中に分泌された胆汁酸コンジュゲートの分離は、等しい割合（２５％）の注入された胆汁酸がタウリンコンジュゲート及びグリシンコンジュゲートとして回収され、ＵＤＣＡが殆ど排他的にタウリン及びグリシンによってコンジュゲートされたことを実証した。ＵＤＣＡ－７ＳとＵＤＣＡ－ＤＳのバイオトランスフォーメーションが無いことがＦＡＢ－ＭＳによって確認されたので、さらなるコンジュゲート分離試験は不必要であると思われた。

尿の胆汁酸分析

全ての尿サンプルの負イオンＦＡＢ－ＭＳ分析は、ＵＤＣＡのスルフェートエステルが全て尿中に排泄されたことを示し、これはＧＣ－ＭＳ分析によて確証された。しかし、量的には、尿中に排泄されたＵＤＣＡスルフェートの相対的割合は、排除の主要な経路であった胆汁排泄に比べて小さかった。ＵＤＣＡを注入した場合には、総投与量の無視できる割合（０．０１％）が尿中に出現した。ＵＤＣＡ－３スルフェート、ＵＤＣＡ－７スルフェート及びＵＤＣＡ－ジスルフェートに関しは、尿中に出現した、投与量の対応する割合は、それぞれ、２．８％、０．９％及び２．２％であった。

考察

上述した結果は、ＵＤＣＡと同様に、スルフェートコンジュゲートの全てが明らかに胆汁分泌促進性であり、胆汁酸分泌を高めることを実証する。個々の胆汁酸に関する最大胆汁流動の順序はＵＤＣＡ－ＤＳ＝ＵＤＣＡ－７Ｓ＞ＵＤＣＡ＞ＵＤＣＡ－３Ｓであり、ＨＰＬＣ保持インデックスから評価された、それらの相対的な疎水性／親水性特性に直接関係しなかった。

胆汁酸核のＣ－７位置におけるスルフェート部分の存在は、ＵＤＣＡによって誘導されるよりも有意に高い胆汁流動を生じ、Ｃ－３スルフェートは、胆汁分泌促進性であるが、胆汁流動の刺激に関しては、非コンジュゲート化ＵＤＣＡよりも効果的ではなかった。これらの差異は、Ｃ－３スルフェートの有意なアミド化が初回通過肝臓クリアランス中におこなわれるが、Ｃ－７位置のスルフェート部分がバイオトランスフォーメーションを妨害するという事実によって説明されることができる。アミド化スルフェートが低い胆汁分泌促進性を有することも考えられる。興味深いことには、胆汁中に出現するＵＤＣＡの相対的割合は、これらの化合物の間に胆汁流動の有意差が存在したとしても、試験した全ての胆汁酸に関して同じであった。

コレステロールとリン脂質の分泌に関しては、明確な傾向が認められた。最大に極性である胆汁酸（それらのＨＰＬＣ保持インデックスによって証明）が胆汁コレステロールとリン脂質のアウトプットを有意に低下させることが判明した。胆汁酸の疎水性／親水性と、コレステロール及びリン脂質の分泌との間のこの関係は、恐らく分子の洗浄力（detergenicity）に関連すると思われる。即ち、低洗浄性で高度に極性の胆汁酸スルフェートはより大きく疎水性の胆汁酸よりも低い膜傷害性である。

非コンジュゲート化ＵＤＣＡに比べて、ＵＤＣＡの高親水性３－スルフェートと３，７－ジスルフェートコンジュゲートによって誘導される、低いコレステロール及びリン脂質の分泌と大きい胆汁分泌亢進（hypercholeresis）との複合効果は、これらの特定の胆汁酸スルフェートが胆汁分泌停止性肝疾患の治療のためのより高い効力の薬剤でありうることを示唆する。

個々のＵＤＣＡスルフェートの肝臓バイオトランスフォーメーションの明白な差異が観察された。例えば、核中のＣ－７位置におけるスルフェート部分の置換は肝臓バイオトランスフォーメーションを妨害するので、ＵＤＣＡ－７スルフェートとＵＤＣＡ－ジスルフェートとは両方とも無変化で胆汁中に分泌された。このことはＵＤＣＡのＣ－３スルフェートには該当せず、このＣ－３スルフェートは胆汁中に限定された程度で無変化分泌される

のみでなく、タウリン及びグリシンによる知覚されうるアミド化と、恐らく側鎖におけるさらなるヒドロキシル化とをも受けた。他方では、非コンジュゲート化ＵＤＣＡは主としてタウリンによってコンジュゲート化され、これより軽度に、グリシンコンジュゲート、スルフェートコンジュゲート及びフルクロニドコンジュゲートに転化されてから、胆汁分泌される。

比較的高濃度を注入した後にも、無視できる量のＵＤＣＡスルフェートが尿中に排泄された。このことは、尿中の胆汁酸の大部分がスルフェートコンジュゲートであることを考えるときに、特に意外であった。それ故、胆汁分泌停止性肝疾患を有する患者に胆汁の胆汁酸スルフェートが存在しないことと、硫酸化した尿中胆汁酸の高い割合と高濃度という研究結果とは腎臓硫酸化によってのみ説明されることができ，胆汁酸の肝臓硫酸化によって説明されない。これらの観察は、硫酸化胆汁酸が肝臓によって容易に吸収され、胆汁中に運ばれることを明確に実証するが、肝臓硫酸化が胆汁うつ滞における重要な代謝経路であるという一般に受容された考えを支持するとは思われない。これに関して、腎臓は胆汁うつ滞中に肝臓を胆汁酸の有害性から保護するために重要な代謝器官である。

ラットは、胆汁酸を有意に６β－ヒドロキシル化する種であり、ＣＤＣＡ及びＵＤＣＡの６β－ヒドロキシル化が生ずることが判明している。この試験では、例えばムリコール酸異性体のような、ＵＤＣＡのヒドロキシル化生成物の有意な量を検出することができなかった。胆道フィステルラットにおいてタウロケノデオキシコール酸ジスルフェートとグリコケノデオキシコール酸ジスルフェートとが９０％まで代謝されて、３α，７α－ジスルフェート、６β－ヒドロキシ５β－コラン酸（α－ムリコール酸の３α，７α－ジスルフェート）になることが報告されている。本発明に関して実施された実験では、ＵＤＣＡ－７ＳもＵＤＣＡ－ジスルフェートもヒドロキシル化されなかった。これらの実験は、スルフェート基の存在が核の肝臓バイオトランスフォーメーションを防止することを強度に示唆する。しかし、ヒドロキシル化を担当する酵素が基質としてのアミド化胆汁酸に選択的に作用することが可能であると考えられる。

胆汁酸とタウリンとのコンジュゲーションは酵素（胆汁酸ＣｏＡ：グリシン／タウリン－Ｎ－アシル－トランスフェラーゼ）の基質アフィニティと、肝臓中のタウリンの供給とに依存することが考えられる。ＵＤＣＡ－３Ｓの一部がタウリン及びグリシンによってアミド化されることを示したＦＡＢ－ＭＳとＧＣ－ＭＳの出願人の結果は、スルフェートエステルが非スルフェート胆汁酸に比べて酵素に対して低いアフィニティを有することを実証する。ＵＤＣＡ－７ＳとＵＤＣＡ－ＤＳがタウリン又はグリシンによってアミド化されなかったという観察は、７β－スルフェート部分の存在が酵素活性を妨害することを実証する。

表 1

対照ラットと、UDCA、UDCA－3－スルフェート、UDCA－7－スルフェート又はUDCA－3，7－ジスルフェートを経口投与した後のラットとからの空腸における主要胆汁酸の質量と％組成、GC－MSによって測定

	対照		UDCA		UDCA 3－スルフェート		UDCA 7－スルフェート		UDCA 3,7－スルフェート	
	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)
リトコール酸	0.02 ± 0.01	0.2 ± 0.1	0.26 ± 0.01	1.0 ± 0.1	0.07 ± 0.01	0.3 ± 0.1	0.01 ± 0.01	0.1 ± 0.1	ND	0
デオキシコール酸	0.50 ± 0.03	4.8 ± 1.1	1.56 ± 0.18	5.6 ± 0.3	1.96 ± 0.68	8.4 ± 1.5	0.76 ± 0.08	3.3 ± 0.1	0.5 ± 0.05	5.2 ± 0.3
ケノデオキシコール酸	0.25 ± 0.05		0.98 ± 0.06		0.43 ± 0.10		0.26 ± 0.06		0.12 ± 0.04	
α－ムリコール酸	1.48 ± 0.24		0.75 ± 0.02		0.18 ± 0.02		0.04 ± 0.01		ND	
コール酸	6.82 ± 1.10	48.5 ± 2.9	4.68 ± 0.65	16.8 ± 1.3	8.49 ± 1.22	37.7 ± 0.9	15.78 ± 1.30	69.0 ± 0.8	6.78 ± 1.03	66.0 ± 1.3
UDCA	0.03 ± 0.01	0.3 ± 0.2	9.95 ± 0.49	35.9 ± 0.4	3.67 ± 0.45	16.4 ± 0.6	1.09 ± 0.34	4.7 ± 1.3	0.21 ± 0.07	2.0 ± 0.4

	対照		UDCA		UDCA 3-スルフェート		UDCA 7-スルフェート		UDCA 3, 7-ジスルフェート	
	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)
Δ^{22}-UDCA	ND	0	4.00 ± 0.05	14.5 ± 0.7	2.04 ± 0.08	9.2 ± 1.0	0.70 ± 0.05	3.1 ± 0.1	0.21 ± 0.03	2.1 ± 0.1
β-ムリコール酸	0.64 ± 0.18		4.12 ± 0.25		3.02 ± 0.80		2.21 ± 0.17		1.70 ± 0.14	
Δ^{22}-β-ムリコール酸	3.44 ± 0.57		0.85 ± 0.01		2.09 ± 0.16		1.49 ± 0.22		0.34 ± 0.09	
ω-ムリコール酸	0.10 ± 0.01		0.31 ± 0.01		0.37 ± 0.03		0.31 ± 0.04		0.24 ± 0.02	
Δ^{22}-ω-ムリコール酸	0.56 ± 0.08		0.30 ± 0.01		0.24 ± 0.01		0.26 ± 0.01		0.12 ± 0.01	
合　計	4.04 ± 2.40		27.77 ± 1.69		22.57 ± 3.53		22.91 ± 2.11		10.24 ± 1.37	

注釈：　結果は平均値±ＳＥＭとして表わす

ＮＤ：　検出されず

JP 3836148 B2 2006.10.18

表 2

対照ラットと、UDCA、UDCA－3－スルフェート、UDCA－7－スルフェート又はUDCA－3，7－ジスルフェートを経口投与した後のラットとからの結腸における主要胆汁酸の質量と％組成、GC－MSによって測定

	対照		UDCA		UDCA 3-スルフェート		UDCA 7-スルフェート		UDCA 3,7-ジスルフェート	
	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)
リトコール酸	0.08 ± 0.02	3.4 ± 0.2.	0.97 ± 0.43	32.0 ± 0.8	0.61 ± 0.19	18.4 ± 7.2	0.04 ± 0.02	1.3 ± 0.3	0.02 ± 0.10	1.8 ± 0.6
デオキシコール酸	0.94 ± 0.34	32.3 ± 0.8	0.31 ± 0.13	10.4 ± 0.9	.58 ± 0.07	17.4 ± 3.3	0.36 ± 0.16	11.4 ± 2.1	0.31 ± 0.04	27.2 ± 6.0
ケノデオキシコール酸	0.03 ± 0.01		0.05 ± 0.03		0.06 ± 0.01		0.08 ± 0.03		0.07 ± 0.05	
α-ムリコール酸	0.15 ± 0.05		0.01 ± 0.01		0.02 ± 0.01		0.03 ± 0.02		0.03 ± 0.01	
コール酸	0.47 ± 0.12	15.6 ± 1.7	0.24 ± 0.07	8.9 ± 2.8	0.44 ± .012	13.8 ± 5.3	0.09 ± 0.09	2.5 ± 2.0	0.23 ± 0.15	26.3 ± 9.8
UDCA	0.02 ± 0.01	0.6 ± 0.2	0.31 ± 0.26	8.3 ± 3.4	0.05 ± 0.02	1.5 ± 0.2	1.28 ± 0.38	44.0 ± 9.5	0.20 ± 0.17	14.7 ± 11.0

	対照		UDCA		UDCA 3-スルフェート		UDCA 7-スルフェート		UDCA 3, 7-ジスルフェート	
	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)	質量 (mg)	パーセント (%)
Δ^{22}-UDCA	ND	0	0.02 ± 0.01	0.4 ± 0.1	0.01 ± 0.01	0.2 ± 0.1	ND	0	ND	0
β-ムリコール酸	0.31 ± 0.06		0.13 ± 0.06		0.20 ± 0.03		0.06 ± 0.04		0.06 ± 0.20	
Δ^{22}-β-ムリコール酸	0.04 ± 0.01		ND		0.01 ± 0.01		0.03 ± 0.01		0.01 ± 0.01	
ω-ムリコール酸	0.82 ± 0.30		0.83 ± 0.35		1.67 ± 0.34		0.88 ± 0.30		0.24 ± 0.10	
Δ^{22}-ω-ムリコール酸	0.24 ± 0.10		0.19 ± 0.08		0.44 ± 0.08		0.15 ± 0.02		0.06 ± 0.30	
合　計	3.17 ± 0.51		3.04 ± 1.37		4.07 ± 0.71		2.98 ± 0.85		1.22 ± 0.25	

注釈：　結果は平均値±ＳＥＭとして表す

ＮＤ：　検出されず

表　3

対照ラットと、ＵＤＣＡ、ＵＤＣＡ－３－スルフェート、ＵＤＣＡ－７－スルフェート又はＵＤＣＡ－３，７－ジスルフェートを経口投与した後のラットとからの肝臓における主要胆汁酸の質量と％組成、ＧＣ－ＭＳによって測定

	対照		UDCA		UDCA 3-スルフェート		UDCA 7-スルフェート		UDCA 3,7-ジスルフェート	
	濃度 (nmol/g)	パーセント (%)	濃度 (nmol/g)	パーセント (%)	濃度 (nmol/g)	パーセント (%)	濃度 (nmol/g)	パーセント (%)	濃度 (nmol/g)	パーセント (%)
リトコール酸	4.6	1.1	8.0	2.4	3.2	0.9	3.2	1.0	2.2	0.8
デオキシコール酸	29.0	6.7	22.5	6.8	52.6	14.5	14.9	4.5	17.3	6.1
ケノデオキシコール酸	17.2	4.0	12.4	3.7	9.2	2.5	6.4	1.9	0.7	0.2
α-ムリコール酸	39.7	9.1	16.1	4.8	6.0	1.6	0.4	0.1	6.5	2.3
コール酸	157.5	36.2	42.3	12.7	86.6	23.9	186.1	56.0	163.2	57.7
UDCA	12.0	2.8	99.6	30.0	56.6	15.6	6.1	1.8	4.9	1.7
Δ^{22}-UDCA	ND	0.0	37.4	11.3	31.3	8.6	8.7	2.6	5.8	2.0
β-ムリコール酸	45.8	10.5	60.6	18.3	65.4	18.1	36.1	10.8	50.1	17.7
Δ^{22}-β-ムリコール酸	129.1	29.7	20.9	6.3	36.3	10.0	59.8	18.0	23.0	8.1
ω-ムリコール酸	ND	0.0	6.3	1.9	8.1	2.2	4.0	1.2	5.0	1.8
Δ^{22}-ω-ムリコール酸	ND	0.0	4.8	1.4	6.3	1.7	6.6	2.0	4.0	1.4
合　計	434.9		331.8		361.7		332.3		282.7	

注釈：　結果は平均値±ＳＥＭとして表わす

ＮＤ：　検出されず

表　4：　ＵＤＣＡとそのスルフェートコンジュゲートの注入の生理的効果

	UDCA	UDCA-7S	UDCA-3S	UDCA-DS
胆汁流動： （μ１／分／ｇ　肝臓）				
基底	1.97 ± 0.05	1.95 ± 0.08	1.85 ± 0.06	2.06 ± 0.08
最大	4.88 ± 0.16	5.03 ± 0.31	3.34 ± 0.13	5.92 ± 0.21
胆汁塩アウトプット： （nmol／分／ｇ　肝臓）				
基底	47.30 ± 4.30	34.60 ± 4.40	39.60 ± 3.80	40.20 ± 5.50
最大	145.10 ± 17.30	255.40 ± 18.20	138.90 ± 11.80	222.40 ± 24.30
コレステロールアウトプット： （nmol／分／ｇ　肝臓）				
基底	1.46 ± 0.10	1.42 ± 0.16	1.28 ± 0.05	1.52 ± 0.12
最大変化	1.88 ± 0.19	1.76 ± 0.23	0.40 ± 0.02	0.37 ± 0.07
リン脂質アウトプット： （nmol／分／ｇ　肝臓）				
基底	10.30 ± 0.70	9.00 ± 1.00	9.60 ± 0.80	9.80 ± 0.70
最大変化	17.20 ± 1.90	15.00 ± 1.70	4.00 ± 0.60	2.50 ± 0.30

値は各群の６匹の動物の平均値±ＳＥＭとして表す

JP 3836148 B2 2006.10.18

表　５：　ＵＤＣＡとＵＤＣＡのスルフェートコンジュゲートとのｉ．ｖ．注入中に胆汁中に分泌された個々の胆汁酸の相対的％組成

時間（分）	DCA	CDCA	α-MCA	CA	UDCA	β-MCA	MCA	その他
UDCA 注入								
基底	2.0	5.4	0.9	76.5	3.2	26.9	1.5	nd
20-30分	1.0	3.0	4.3	49.0	51.9	17.2	1.0	14.6
50-60分	0.5	2.5	3.9	21.4	65.9	12.6	0.5	13.7
80-90分	0.7	1.5	6.4	9.0	79.5	9.9	nd	11.9
UDCA-7B 注入								
基底	5.7	5.3	7.2	58.3	1.4	18.5	3.6	nd
20-30分	2.3	1.7	2.5	20.2	61.3	10.7	1.3	nd
50-60分	0.7	0.6	0.9	7.7	83.6	5.9	0.6	nd
80-90分	1.2	0.7	1.3	9.9	78.8	7.4	0.8	nd
UDCA-3B 注入								
基底	2.2	4.0	10.8	57.4	2.0	20.6	3.0	nd
20-30分	2.5	4.6	6.2	36.0	33.3	12.4	4.9	5.2
50-60分	1.0	1.9	2.7	14.9	70.6	7.4	1.5	11.5
80-90分	1.3	2.5	3.0	18.2	67.7	5.2	2.0	11.2
UDCA-DB 注入								
基底	4.2	6.3	9.1	56.7	1.4	18.0	4.3	nd
20-30分	2.1	2.5	3.4	24.5	54.6	9.7	3.2	nd
50-60分	1.2	0.7	2.2	15.3	70.7	6.7	2.2	nd.
80-90分	nd	0.9	1.6	10.6	79.1	6.5	1.4	nd

本発明の幾つかの特定の態様を上記で詳述したが、本発明の範囲はこれらの態様に限定されず、その代わりに、下記請求の範囲によって決定されるべきである。

【図１Ａ】

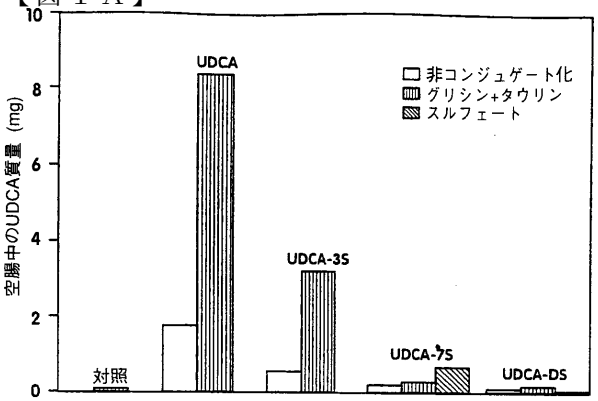


FIG. IA

【図２】

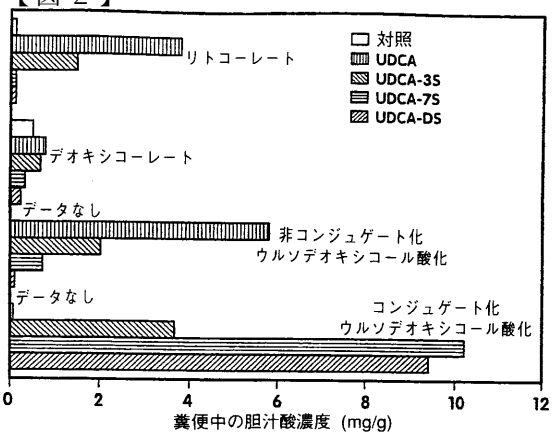


FIG. 2

【図１Ｂ】

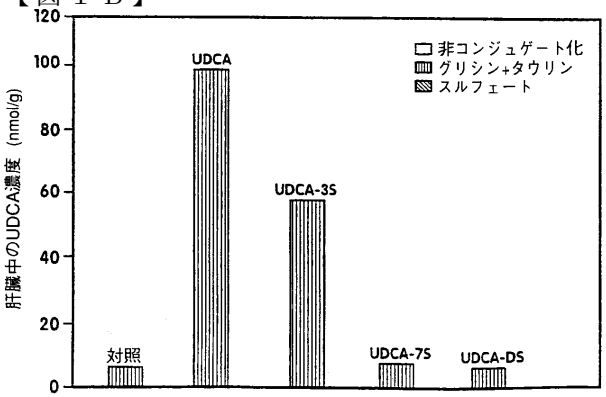


FIG. IB

【図３】

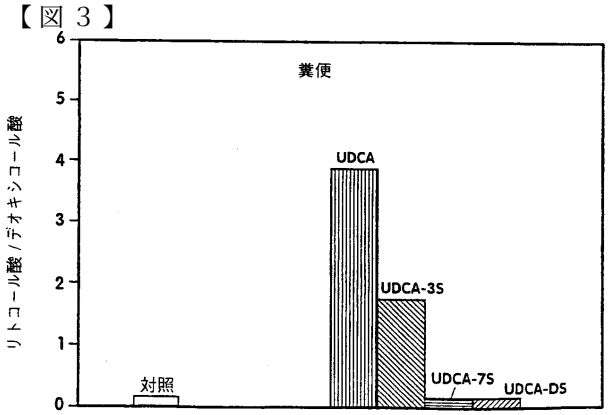


FIG. 3

【図４Ａ】

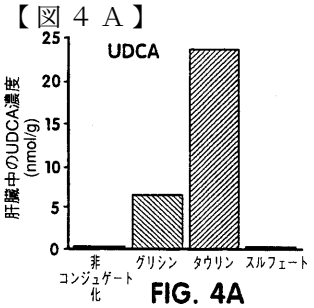


FIG. 4A

【図４Ｂ】

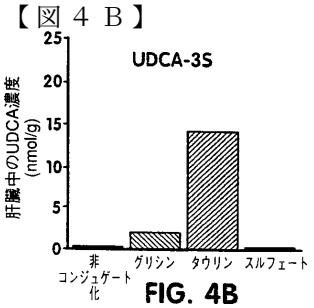


FIG. 4B

【図４Ｃ】

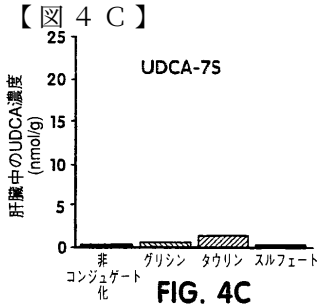


FIG. 4C

【図４Ｄ】

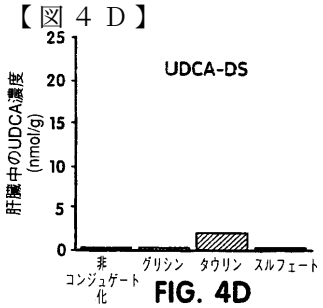


FIG. 4D

【図５Ａ】

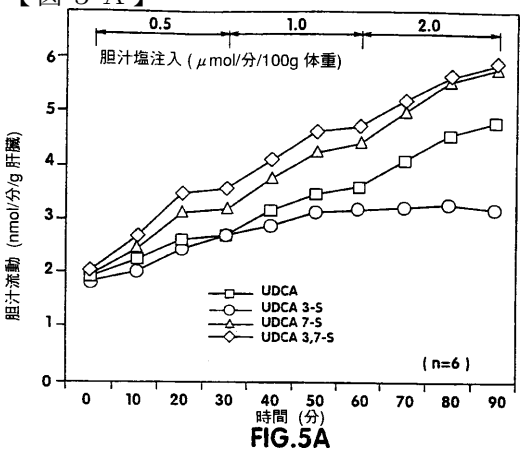


FIG.5A

【図５Ｂ】

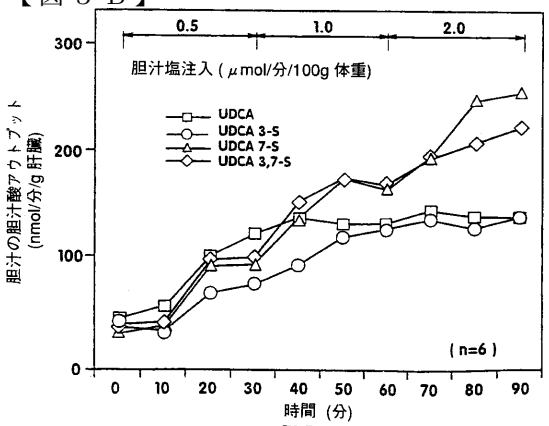


FIG.5B

【図６Ａ】

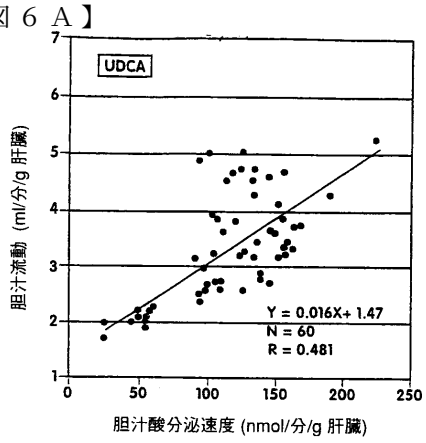


FIG. 6A

【図６Ｂ】

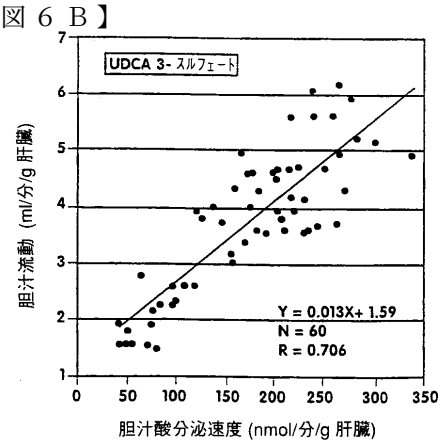


FIG. 6B

【図６Ｃ】

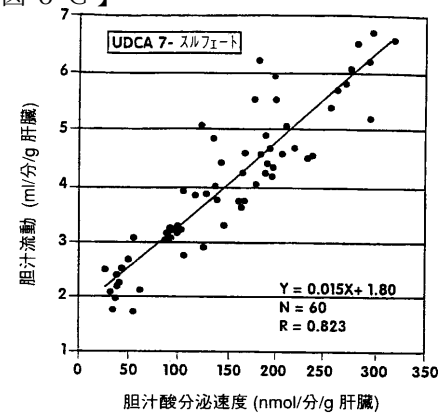


FIG. 6C

【図６Ｄ】

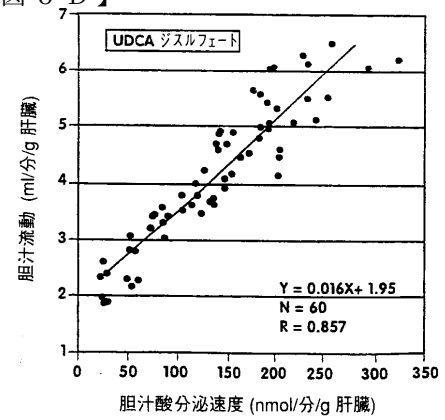


FIG. 6D

【図７Ａ】

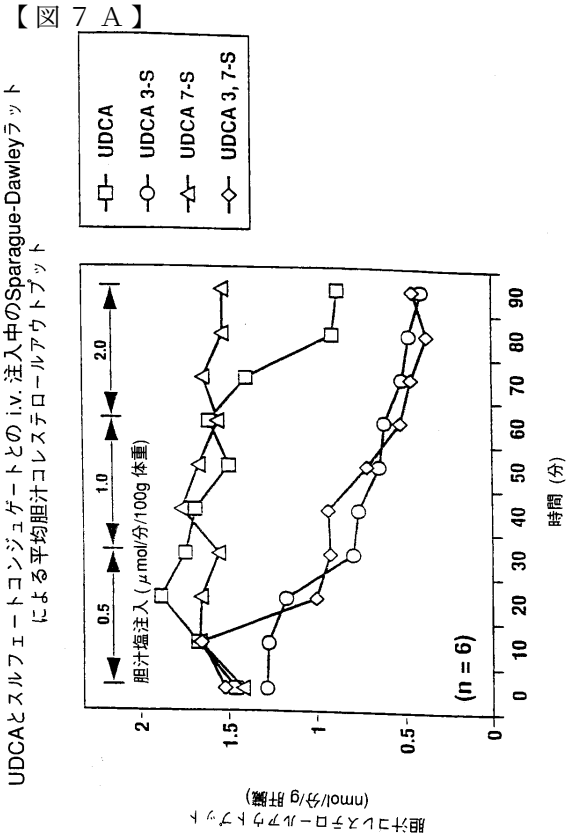


FIG. 7A

【図７Ｂ】

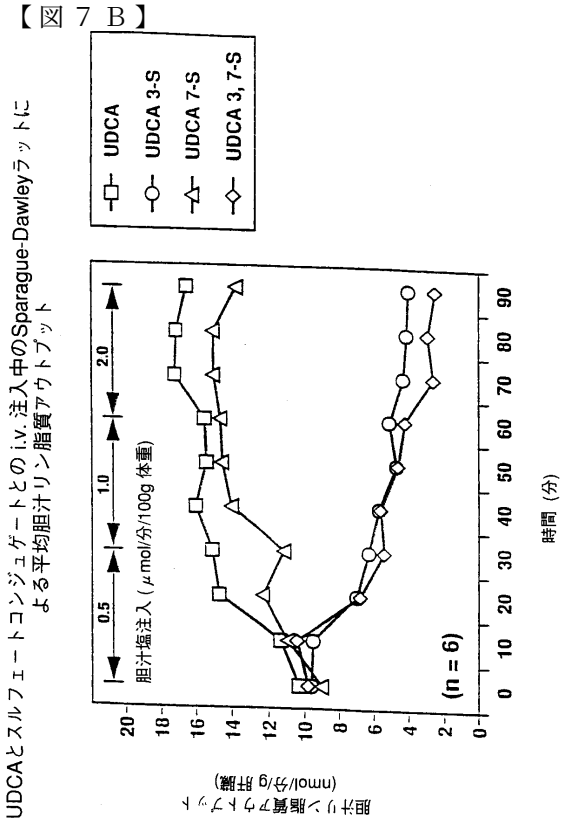


FIG. 7B

【図８Ａ】

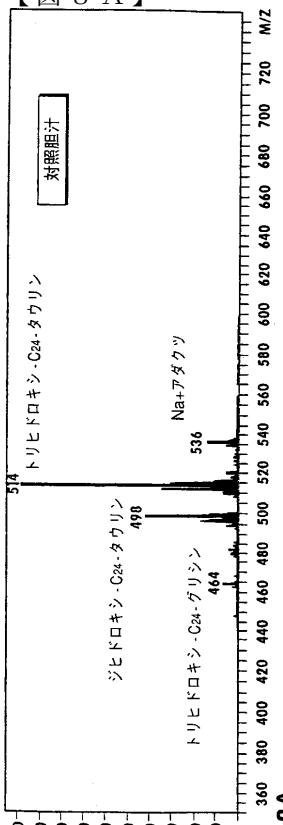


FIG. 8A

【図８Ｂ】

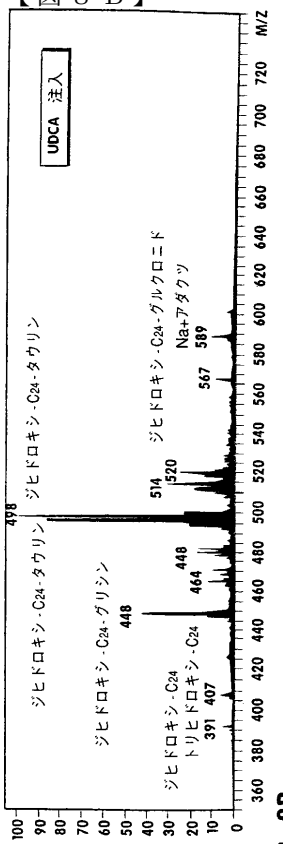


FIG. 8B

【図８Ｃ】

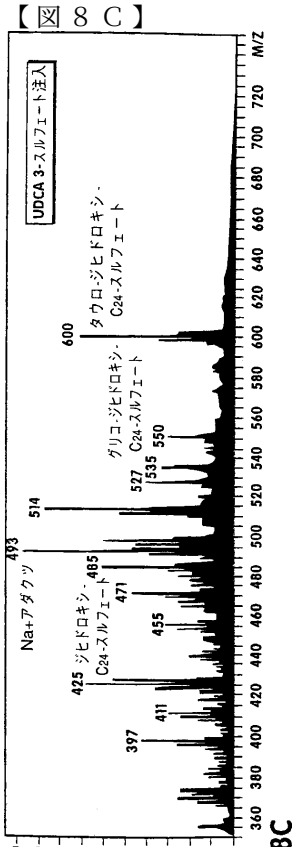


FIG. 8C

【図８Ｄ】

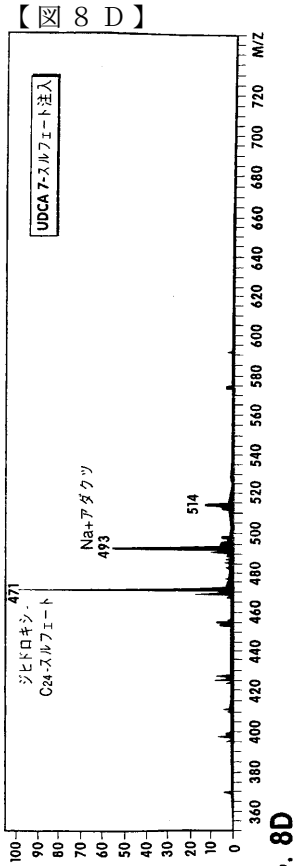


FIG. 8D

【図８Ｅ】

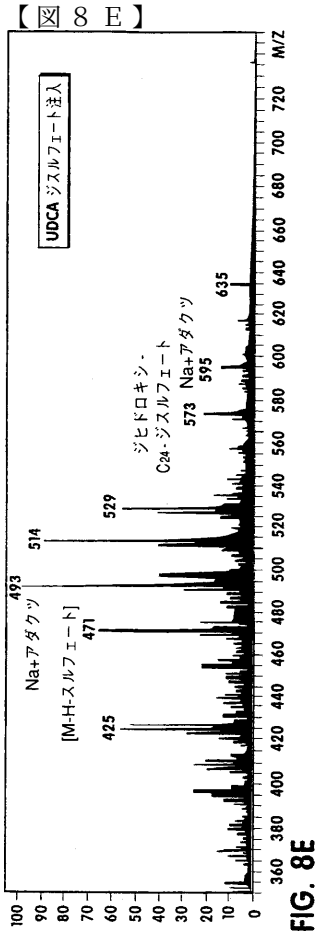

UDCA ジスルフェート注入
Na+アダクツ
493
[M-H-スルフェート]
471
425
514
529
ジヒドロキシ-
C24-ジスルフェート
Na+アダクツ
573
595
635
M/Z

FIG. 8E

フロントページの続き

(72)発明者　セッチェル，ケネス，デイ．，アール，
アメリカ合衆国４５２２７　オハイオ州シンシナティ，インディアンビューアベニュー　３８４９

審査官　榎本　佳予子

(56)参考文献　特開昭５９－１６３４００（ＪＰ，Ａ）
H.TAKIKAWA ET AL，J.HEPATOL.，１９９２年　5月，vol.15,no.1-2，77-84
H.TAKIKAWA ET AL.，J.HEPATOL.，１９９３年，vol.17,no.2，247-252

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 31/575
CAplus(STN)
EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)
BIOSIS(STN)