

財団法人伊藤記念財団 保存版

動物の特効成分の有効利用に関する研究報告

(伊藤記念財団平成9年度研究委託事業)

伊藤ハム株式会社中央研究所

動物の特効成分の高度利用に関する研究報告

目次

1. はじめに	1
2. 熊胆および他の動物胆汁等の成分分析	2
(1)材料と方法		
(2)結果		
(3)考察		
3. 胆汁からのコール酸(コラン酸)誘導体合成原料の精製	14
4. ウルソデオキシコール酸の合成	15
(1)材料と方法		
(2)結果		
(3)考察		
5. 熊胆および関連物質の薬理活性の測定	17
(1)材料と方法		
(2)結果		
(3)考察		
6. まとめ	22

1. はじめに

中国の故事に「臥薪嘗胆」というのがある。その意味は、薪の上に寝、苦い肝を舐めるほど苦勞することであるが、転じて、将来の希望を叶えんがために苦勞を重ねることを言う。この「嘗胆」というのは熊の胆、即ち「熊胆(ゆうたん)」を舐めることであるとされている。

このように、「熊胆」は歴史上極めて古く、中国では唐の時代から利用されてきた代表的な動物臓器薬であり、主として健胃、鎮痙、鎮痛、胆汁分泌促進の目的で日本でも江戸時代から現代に至るまで重用されてきた。今でも家庭薬あるいは漢方薬に配合されている例がある。さらには近年、コレステロール性の胆石を溶解する作用についても検討されている。

しかしながら、熊胆を得るためには原料となる野生の熊を捕獲しなければならず、最近では自然動物の保護の観点から原料の入手は困難になってきている。現実に国際保護条約により、「熊」の捕獲が制限されるようになり、将来的には熊胆の製造は不可能になると考えられている。

漢方薬では動物由来の「三大高貴薬」として「麝香」・「牛黄」・「熊胆」が挙げられるが、前2者は既に合成または代用物が市場に出回っており、これも原料の入手が困難になってきたためである。

牛黄・熊胆などの動物の胆汁を原料とした漢方薬は様々な薬効を有する貴重な薬として珍重されてきた。特に、熊胆の薬効成分はウルソデオキシコール酸及びそのタウリンもしくはグリシン抱合体であるとする見解が主流である。これらについての本格的な研究が始まったのは1920年代からであり、成分分析に関しては分析技術がめざましく発展した1970年代から盛んになり、臨床面における詳細な効能研究も同時に開始されたが、単一の胆汁酸に関する検討であり、漢方薬としての観点からの総合的な結論は未だに得られていない。

本研究では、薬効の高い熊胆をはじめとする動物胆汁由来の試料の組成成分を最新のHPLC技術で分析するとともに、熊胆の薬効の主成分であるウルソデオキシコール酸の合成を試みた。また、それらの薬理活性としての胆汁分泌促進作用をラットで検討した。

2. 熊胆および他の動物胆汁等の成分分析

(1) 材料と方法

①分析に供した材料

熊胆・・・中国産：茶褐色結晶

ウシ胆汁・・・国内産食肉用より胆嚢を採取

ブタ胆汁・・・国内産食肉用より胆嚢を採取

ウシ胆汁末・・・国産品

熊胆・動物胆汁成分含有一般市販薬

市販品A, B, C および ウルソサン散錠（東京田辺製薬）

②分析方法

1. 胆汁酸の分析

【分析試料の調製】

(標準胆汁酸の調製)

日本分光（株）より【胆汁酸スタンダードキット15分画用】を購入し、標準品として用いた。

各成分を50ml容量のメスフラスコ（JIS Grade A）に秤取し、約5nmole / 10 μ lのメタノール溶液を調製し、メタノールで10倍希釈（約500pmole）したものを定量標準液とした。正確な濃度は秤取重量から算出して定量計算に用いた。

(ウシ胆汁末の調製)

41.0mgを秤取し、メタノールにてメスフラスコで50mlとした。

(熊胆の調製)

12.1mgを秤取し、同様にメタノールで10mlとした。

(ウルソサン散錠の調製)

1錠（ウルソデオキシコール酸50mg含有）を同様にメタノールで50mlとした。

(市販品Aの調製)

3包（10丸/包）を2.0mlの純水に懸濁し、同様にメタノールで100mlとした。

(市販品Bの調製)

1錠を2.0mlの純水に懸濁し、同様にメタノールで100mlとした。

(市販品Cの調製)

1/6包（1丸）を0.5mlの純水で懸濁し、同様にメタノールで25mlとした。

(ウシおよびブタ胆汁の調製)

それぞれ自己消化の少ない胆嚢を3頭分ずつ選択し、各胆嚢より切開により取り出した胆汁100 μ lに対し5mlのメタノールを加え、試料溶液とした。

調製試料溶液は、HPLC分析に際し、マイレクスGV（ミリポア社）にて除粒子処理を行なった。

<分析システム>

HPLCポンプ：LC Module 1 (Waters社)

：PU-980 (日本分光(株))

インテグレーター：825-Workstation (Waters社)

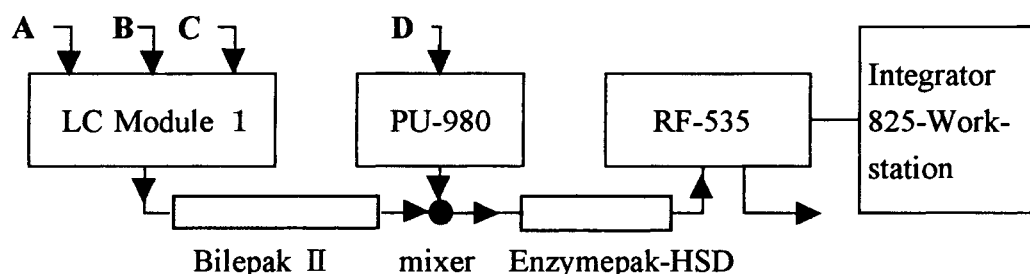
検出器・・・：RF-535 (ケイ光検出器；(株)島津製作所)

カラム・・・：Bilepak II (分離用；日本分光(株))

：Enzymepak-HSD (反作用固定化酵素*カラム；日本分光(株))

*酵素名：3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase

3 α -Hydroxysteroid：NAD⁺ oxidoreductase [EC1.1.1]



<分析条件>

(分離用移動相) A：30 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.98)

B：メタノール

C：アセトニトリル

(酵素反作用緩衝液) D：10 mM リン酸一カリウム，1 mM EDTA-2 Na
0.3 mM β -NAD，0.05% 2-メルカプトエタノール，pH 7.80 (KOHで調製)

(胆汁酸分離用 HPLC ポンプ移動相組成コントロール条件)

LC Module 1

時間 (min)	流速 (ml/min)	移動相組成			カーブタイプ
		% A	% B	% C	
0.00	1.00	60	20	20	
32.00	1.00	40	30	30	直線
60.00	1.00	40	30	30	直線
60.01	1.00	60	20	20	直線
75.00	1.00	60	20	20	直線

(酵素反作用緩衝液)

PU-980ポンプ：1.00 ml/min に固定

(RF-535ケイ光検出器の設定)

3 α -Hydroxysteroid 骨格をもつ物質とHSDが反応する際にカップリング反応として、NAD⁺ → NADH に変換するため、NADHのケイ

光を測定する事により検出する方法である。

励起波長：345 nm

検出波長：470 nm

Response：FAST

Sensitivity：HIGH

(試料溶液注入量)：前記調製各種試料溶液10 μlを自動注入

2. タンパク質・ペプチドの分析

【分析試料の調製】

熊胆20.0 mgをメタノール1 mlに懸濁し、×30,000 gにて10 minの遠心分離を行ない、回収した上清画分をエバポレーターにて乾固し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)200 μlを加え可溶画分50 μlを分析に供した。沈殿は、更に1 mlのメタノールで同様に洗淨し、エバポレーターにて乾固したものに0.1%TFA200 μlを加え、可溶画分を分析に供した。

<分析システム>

HPLCポンプ：LC Module 1 (Waters社)

：880-PU (日本分光(株))

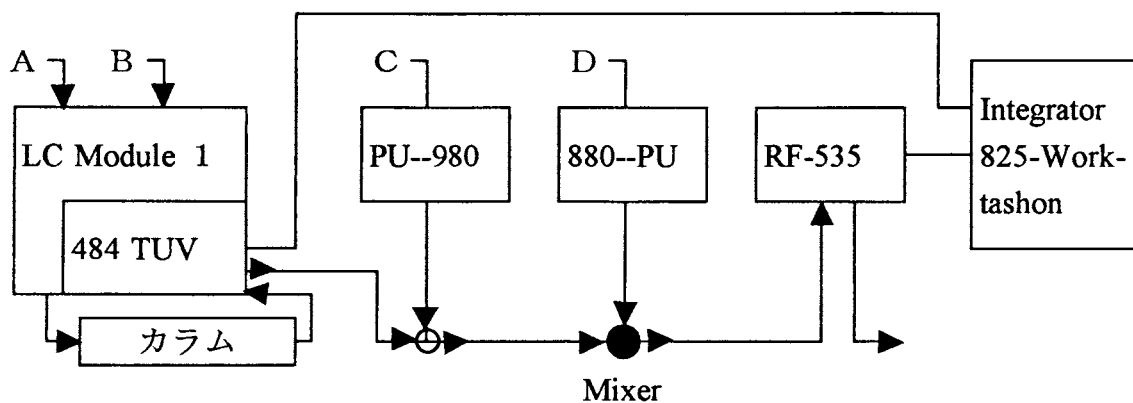
：PU-980 (日本分光(株))

インテグレーター：825-Workstation (Waters社)

検出器・・・：RF-535 (ケイ光検出器；(株)島津製作所)

：484 TUV (吸光検出器；Waters社)

カラム・・・：Symmetry™ C18 (4.6 mm×250 mm；Waters社)



<分析条件>

(分離用移動相)

A：0.1% TFA

B：0.1% TFA in アセトニトリル

(反应用緩衝液)

C：0.15 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0；NaOHにて調製)

(反応液)

D：100 mg/L Fluram (Fluorescamine)

in アセトン

1級アミンと反応すると強い蛍光物質を生成する。
また、1級アミンと反応しなかったものは水溶液中
ですみやかに分解される。(Böhlen,P., etc.,(1973);Arch.
Biochem.Biophys.155,213.)

励起波長：395 nm, ケイ光波長：495 nm。

(分離用HPLCポンプ移動相組成コントロール条件)

LC Module 1

時間 (min)	流速 (ml/min)	移動相組成		カーブタイプ
		% A	% B	
0.00	0.50	100	0	
10.00	0.50	100	0	直線
100.00	0.50	5	95	直線
101.00	0.50	0	100	直線
110.00	0.50	0	100	直線
111.00	0.50	100	0	直線
136.00	0.50	100	0	直線

(反応用緩衝液用HPLCポンプ)

PU-980 : 1.5 ml/minに固定

(反応液用ポンプ)

880-PU : 1.0 ml/minに固定

(吸光検出器)

484 TUV : 220 nm

(ケイ光検出器)

RF-535 : 励起波長 : 395 nm

検出波長 : 495 nm

Response : FAST

Sensitivity : HIGH

(試料溶液注入量) : 前記試料溶液 50 μ l を自動注入

(2) 結果

① 標準胆汁酸 15 分画のクロマトグラムを図 1 に、熊胆のクロマトグラムを図 2 に示す。

図中、A ～ O で示したピークは下記の標準胆汁酸に相当する。

(略記号)

A : Glycoursodeoxycholic acid (Na salt)	: GUDCA
B : Tauroursodeoxycholic acid (Na salt)	: TUDCA
C : Ursodeoxycholic acid	: UDCA
D : Glycocholic acid	: GCA
E : Taurocholic acid (Na salt)	: TCA
F : Cholic acid	: CA
G : Glycochenodeoxycholic acid (Na salt)	: GCDCA
H : Taurochenodeoxycholic acid (Na salt)	: TCDCA
I : Glycodeoxycholic acid	: GDCA
J : Taurodeoxycholic acid (Na salt)	: TDCA
K : Chenodeoxycholic acid	: CDCA
L : Deoxycholic acid	: DCA
M : Glycolithocholic acid (Na salt)	: GLCA
N : Taurolithocholic acid (Na salt)	: TLCA
O : Lithocholic acid	: LCA

図 2 より、今回入手した熊胆の含有胆汁酸は、殆どがウルソデオキシコール酸とケノデオキシコール酸のタウリン包合体であることが示された。

また、ウシ胆汁 (図 3) とブタ胆汁 (図 4) 中の胆汁酸組成を比較してみると、ウシ胆汁中にはケノデオキシコール酸の存在が認められたが、ウルソデオキシコール酸の存在がまったく観察されず、一方、ブタ胆汁中には両者の存在が認められた。

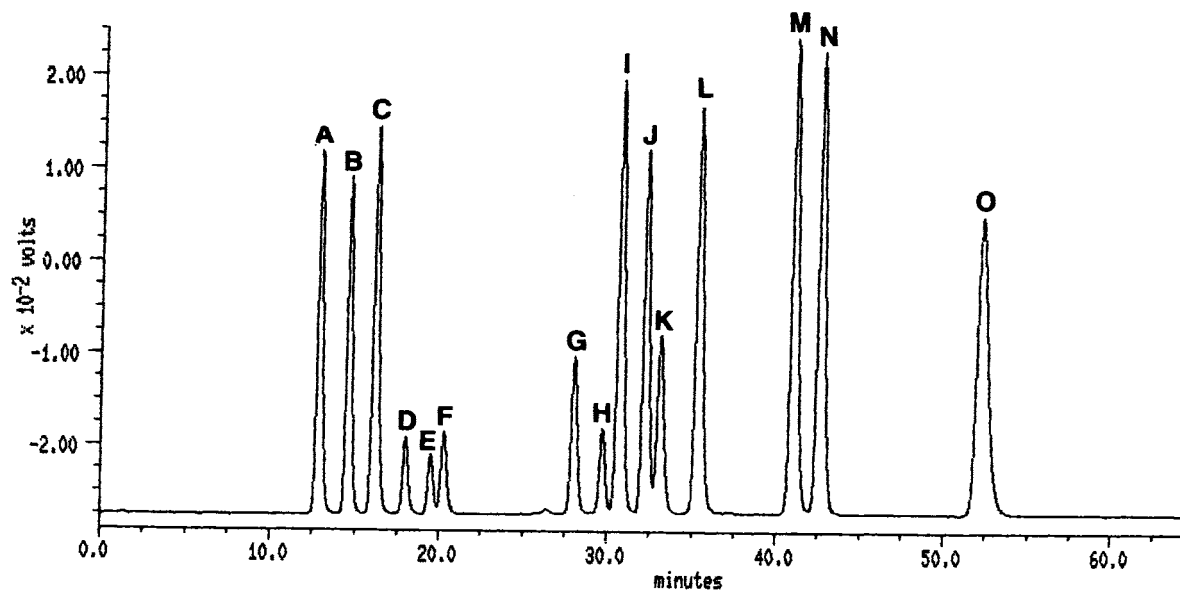
ウシ胆汁とブタ胆汁中の総胆汁酸濃度を比較すると、ウシ胆汁の方が薄い様である。

さらには、図 4 に示されるブタ胆汁酸分析クロマトグラムには、今回用いた 15 種類の胆汁酸以外の、HSD の基質となり得る成分、特に、疎水性の低い成分の存在が認められた。

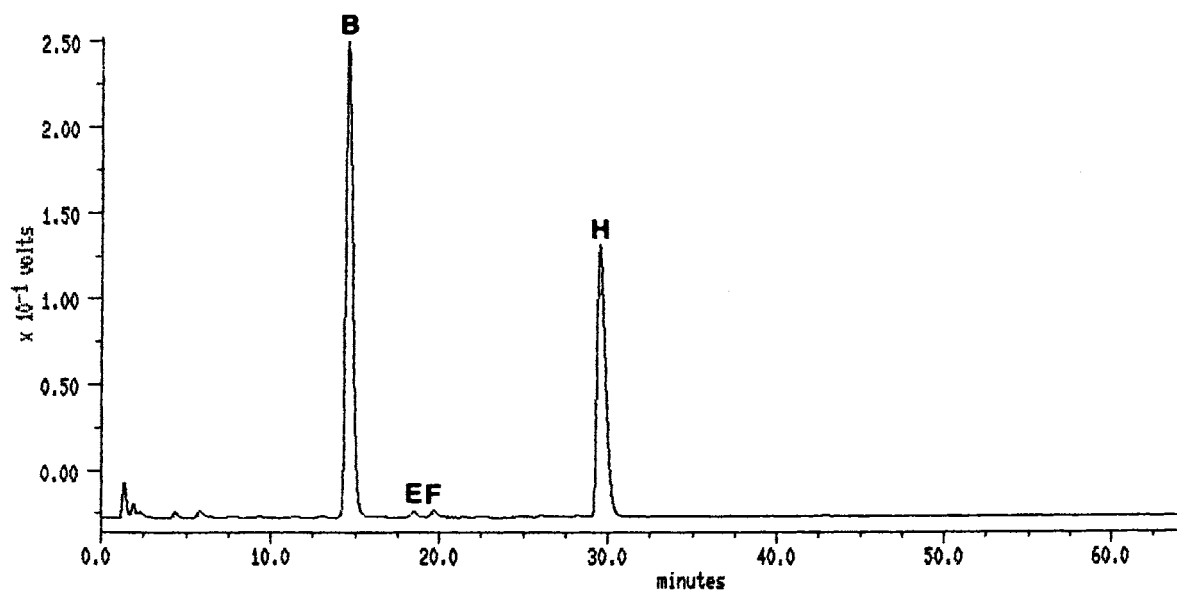
これらの成分に関しては、ブタの胆嚢が自己消化を起こしやすいのか、黄白色を呈した脂肪成分と思われる胆嚢内壁成分等の混入を考慮した上での検討が課題である。

また、胆汁を採取するに当たっても、と殺直後に胆嚢を切開して採取し、出来る限り新鮮な状態の試料を用いて再検討する必要がある。

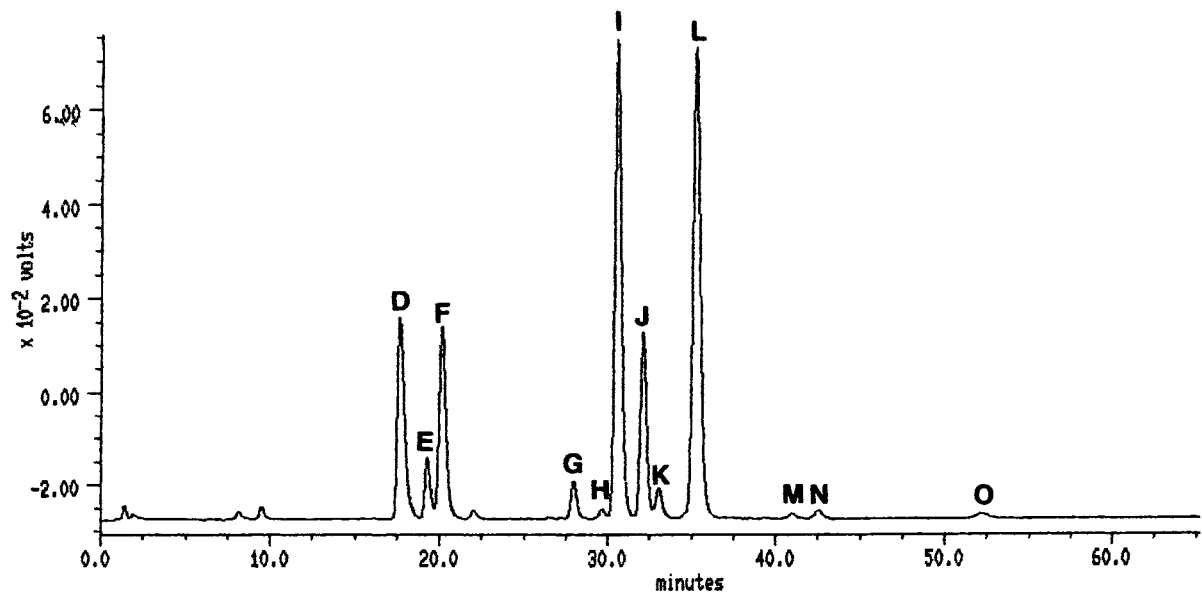
(図1) 標準胆汁酸のクロマトグラム



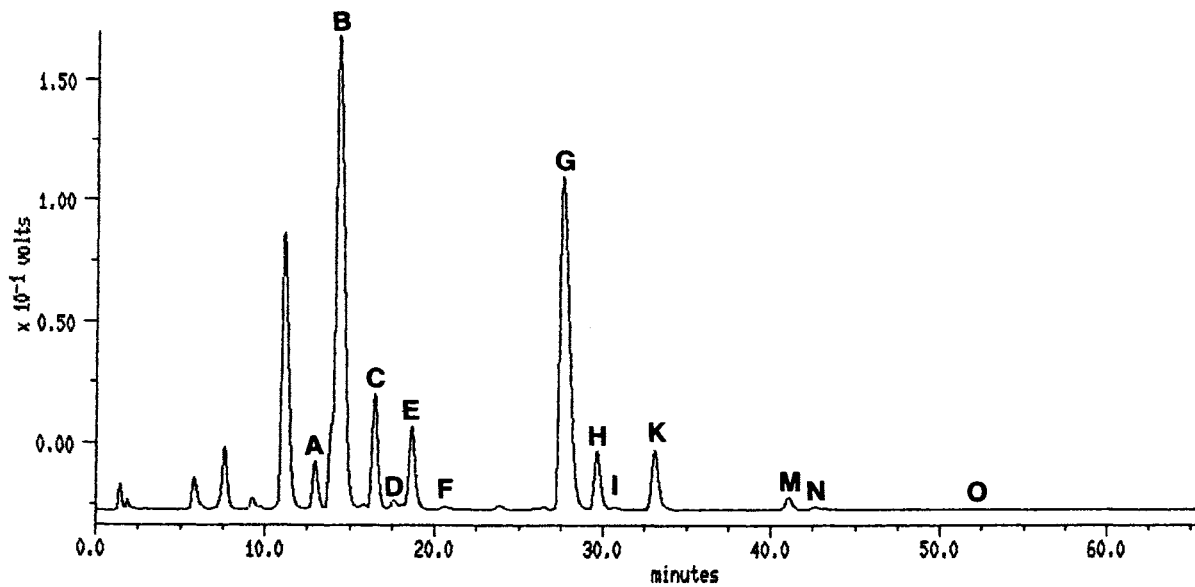
(図2) 熊胆の胆汁酸分析クロマトグラム



(図3) ウシ胆汁中の胆汁酸分析クロマトグラム



(図4) ブタ胆汁中の胆汁酸分析クロマトグラム



②表 1 に市販品の胆汁酸組成分析結果を、表 2 にウシおよびブタ胆汁中とウシ胆汁末の胆汁酸組成を示した。

(表 1) 市販品部門 胆汁酸含量 (単位: mg)

胆汁酸名	市販品名				
	ウルソサン散錠	市販品 A	市販品 B	市販品 C	熊胆
GUDCA・Na	ND	ND	ND	ND	ND
TUDCA・Na	ND	4.30	ND	ND	2.76
UDCA	42.94	0.13	ND	2.67	ND
GCA	ND	11.89	6.93	1.21	ND
TCA・Na	ND	26.27	12.94	2.36	0.14
CA	ND	12.62	3.03	ND	0.10
GCDCA・Na	ND	1.07	0.59	ND	ND
TCDCa・Na	ND	11.13	1.36	0.38	6.71
GDCA	ND	3.37	1.81	0.57	ND
TDCA・Na	ND	6.98	3.37	0.86	ND
CDCA	ND	0.97	ND	ND	ND
DCA	ND	1.99	0.54	ND	ND
GLCA・Na	ND	0.04	0.02	0.02	ND
TLCA・Na	ND	0.12	0.06	0.02	ND
LCA	ND	0.01	ND	ND	ND
合計	42.94	80.89	30.65	8.09	9.71
処方量に対する wt/wt%	85.9	68.6	76.6	28.6	80.2

ND: Not Detected

表 1 の中で、ウルソサン散錠の処方では 1 錠中 UDCA が 50 mg 含まれる事となっているが、分析結果から胆汁酸組成は単一で UDCA のみが検出され処方と一致したものの、含量が 14% 程低い値となった。この原因は、検出方法がケイ光を測定しているために、クエンチング (消光) 等の量子収率論的な問題が関与する事が一因として考えられる。その代わりに、直接 NADH の 345 nm の吸光度を測定した方が安定した結果が得られると思われるが、感度のレベルではケイ光測定法に劣ってしまい、分析に必要な基質濃度と HSD の反応条件を至適化する必要が生じ、また、分析に供するサンプル量が多くなるために、分離カラムと HSD カラムのサイズ等を変更する必要が生じると考えられる。この分析値をもとに分析値補正を行なっても、市販品 C の UDCA 処方量と補正分析値では約 1/2 量しか検出されなかった。

一般的に、糖衣錠のような製品は完全に懸濁するのに長時間を要するため、分析用に調整するのに困難を極めたが、ほぼ処方成分の確認は可能であった。

(表2) ウシおよびブタ胆汁中とウシ胆汁末の胆汁酸組成分析結果 (単位: mg)

胆汁酸名	ウシ胆汁末	ウシ A	ウシ B	ウシ C	ブタ A	ブタ B	ブタ C
GUDCA・Na	ND	ND	ND	ND	0.58	0.82	0.55
TUDCA・Na	ND	ND	ND	ND	9.67	12.49	11.12
UDCA	ND	ND	ND	ND	0.78	1.32	1.44
GCA'	6.87	10.77	8.41	12.51	1.23	0.66	0.97
TCA・Na	13.00	10.23	2.99	9.59	3.90	8.99	8.08
CA	0.58	1.14	6.23	3.28	0.32	0.27	0.89
GCDCA・Na	0.89	0.49	0.63	0.47	18.99	16.24	14.06
TCDCa・Na	2.17	0.71	0.32	0.57	2.27	3.98	3.11
GDCA	3.06	2.54	3.05	2.57	0.04	0.03	0.11
TDCA・Na	4.82	3.61	1.44	2.80	ND	ND	ND
CDCA	ND	ND	0.42	0.02	1.85	1.57	1.38
DCA	0.03	0.26	2.95	0.75	ND	ND	ND
GLCA・Na	0.06	0.02	2.50	2.63	0.12	0.14	0.11
TLCA・Na	0.10	0.05	0.05	0.04	0.02	0.05	0.04
LCA	ND	ND	0.03	ND	0.01	0.01	0.01
合計	31.58	29.82	29.02	35.23	39.78	46.57	41.87
サンプル量	41.0	1ml	←	←	←	←	←
wt/wt %	77.0	—	—	—	—	—	—

表2から、コール酸原料原料としては、ブタよりもウシの胆汁の方が GCA・TCACA の合計含量・含有率 (約50%) が高いことから適していると考えられる。

また、UDCA と CDCA については、UDCA はブタ胆汁中にはそんざいするが、ウシでは全く検出されなかった。更に、UDCA は Glyco 型よりも Tauro 型として存在している事が示された。

CDCA についてみると、ブタ・ウシ共に検出されるが、特にブタの場合は Glyco 型として高濃度で存在している事は非常に興味深い。

全体的に考えると、疎水性の低い胆汁酸は Tauro 型として存在し、疎水性の高い胆汁酸は Glyco 型として存在する傾向があるように考えられる。

このことは、摂取食物に依存しているようにも考えられる。即ち、ウシの場合は、含有率から判断して、CA と DCA が主体的に作用していると考えられ、一方ブタの場合は、CDCA, UDCA が主体であり、次いで、CA が補助しているものと推定される。

構造上、胆汁酸の疎水性はステロイド骨格に配位するメチル基と水酸基、そして、アルキル基の末端にあり、自由度の高い親水性のカルボキシル基による両親媒性の複雑な相互作用 (水素結合・イオン結合・疎水結合等) が微妙に異なるのみと考えられるが、胆嚢自体の内壁細胞膜層に支障をもたらさない割合・抱合体形式を取るものと推定される。事実、UDCA の Free acid はクロロホルムに易溶だが、Tauro 型になると難溶性を示すようになる。従って、CDCA や DCA のような疎水性の

高い成分に分類されるものは Glyco 型をとる事により細胞壁への浸潤を少なくしていると考えられる。

ここまでは胆汁酸のみについて考察したが、胆汁酸以外の成分を考慮に入れないでこれ以上考察する事は片手落ちである。

今回入手した熊胆は、UDCA・CDCA 共に Tauro 型だったが、この件についてはより多くの試料を入手・分析してからでないと総合的な判断は出来ない。

同種の熊でも生息地域や季節、生存環境により UDCA が検出されなかったという報告もあり、この事は、自然環境による摂取食物や生体ホルモンバランスが変動する要因が考えられる。特に、脳下垂体、視床下部、(副)甲状腺ホルモン等は生体のバランスに大きく作用するからである。

③熊胆の胆汁酸以外の成分を検索する目的で、逆相系 HPLC により、まず一級アミン (アミノ酸でいえば、 α -アミノ基、 ϵ -アミノ基) を有する成分について分析を行なった。

熊胆のメタノール不溶画分について分析した結果が図5と図6であり、図5は220 nmの吸光度で検出したクロマトグラムである。

分析に供した試料量が多すぎたのか非常にブロードなピークとして検出されたが、一部にシャープなピークが検出されている。この結果と図6 (一級アミンを検出したクロマトグラム) を比較してみると、同様なクロマトパターンを示しており、図5のシャープなピークは見られない事から、全般的にタンパク質が主体である事を反映しているものと考えられる。

一方、メタノール可溶画分については図7のシャープなピークを描くクロマトグラムに対し、図8では一級アミノ基を有する成分が、選択的に検出された。

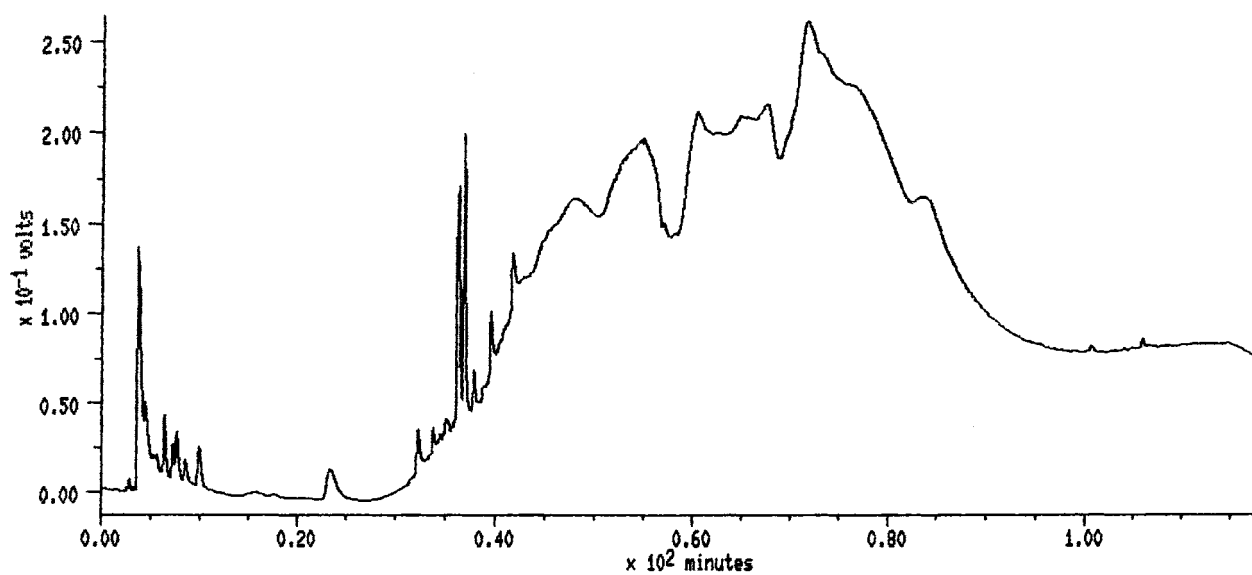
図5、図6で Void volume の位置に一級アミンを有する成分が観察されるが、極性の高いアミノ酸かアンモニウム塩と考えられる。

遊離アミノ酸については、熊胆の薬効には関与しない事が既に報告されており、本件では、まだ研究されていない生理活性を有するペプチドを検索する事が今回の研究目的の一つである。

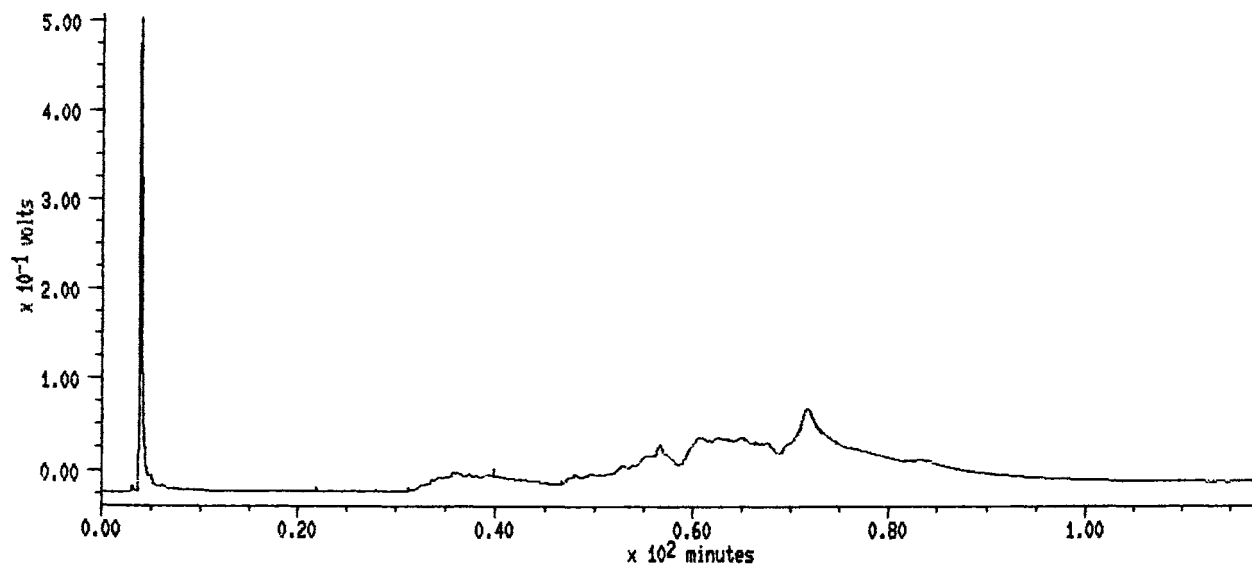
残念ながら、今回は、一級アミノ基を有する成分を反映する画分について詳細な分析を行なうに至らなかった。

現在では、LC-Mass が高度な発展を遂げ、容易に分子量や組成分析が可能となった。このような分析結果が待たれるところである。

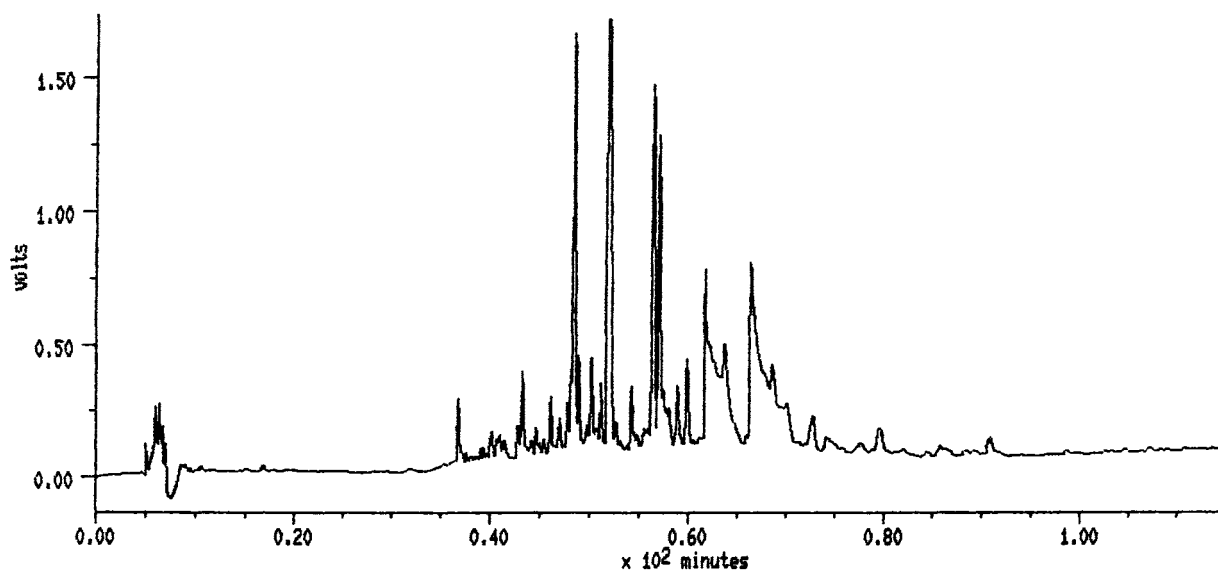
(図5) 熊胆のメタノール不溶画分の分析クロマトグラム (A 220nm)



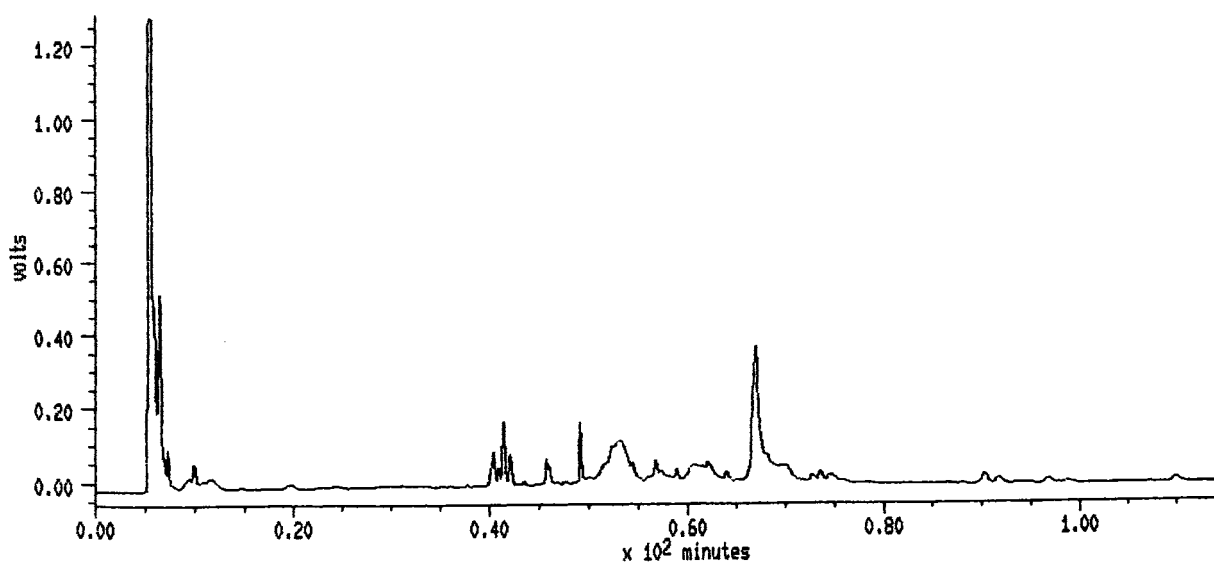
(図6) 熊胆のメタノール不溶画分の分析クロマトグラム (ケイ光@ 495nm)



(図7) 熊胆のメタノール可溶画分の分析クロマトグラム (A 220nm)



(図8) 熊胆のメタノール可溶画分の分析クロマトグラム (ケイ光@ 495nm)



3. 胆汁からのコール酸（コラン酸）誘導体合成原料の精製

(1) 材料と方法

①胆汁

胆汁酸分析結果より，ウシ胆汁を使用した。

②精製方法

生化学実験講座 3 脂質の化学（p 485）を参考にして行なった。

胆汁を40倍量のメタノールで処理し，大まかな除タンパク質を行なうのが第一段階であるが，あまりにも大量のメタノールを使用する事になるため，まず100mlの胆汁をエバポレーターで4倍程度に濃縮し，これにメタノールを加えて除タンパク質を行なった。

次に，エバポレーターでメタノールを除去し，これに10%NaOH-50%エタノール溶液50mlを加えて溶解し，耐圧ビンに移し替えてオートクレーブ中にて120℃，2時間の加水分解を行なった。

温度が低下してから取り出し，3N塩酸でpHを2とし，分液ロートに移し替えて，酢酸エチル50mlで抽出操作を行なった。

上層に純水を加えてpHが6になるまで洗浄を繰り返し，無水硫酸ナトリウムを結晶が凝固しなくなるまで加えて脱水し，エバポレーターを用いて酢酸エチルを除去乾固した。

乾固したものを最小限量のクロロホルムに溶解して，クロロホルム-メタノール系でシリカゲルクロマトグラフィーを試みたが目的とするコール酸を単離するには至らなかった。

4. ウルソデオキシコール酸の合成

(1) 材料と方法

①材料

コール酸 (ICN社) を購入し、ウルソデオキシコール酸合成の原料とした。 純度 > 99% 以上

②合成方法

金沢定一らの報告した方法 (日化, 76, 297-301, 1955) に従い、原法の通り行なった。

その合成ルートを Scheme 1 に示した。

③NMR分析

GX-270型 (270MHz; 日本電子) を用いて行なった。

(2) 結果

20g のコール酸を原料として最終的に 15.8g の目的物質を得た。収率は理論量の 82% であった。

合成物を重クロロホルム中でNMR測定を行ない、半同定を行なった。

図9に合成物のNMRスペクトルを、図10に標準胆汁酸として使用したウルソデオキシコール酸 (日本分光 (株)) のNMRスペクトルを示した。また、参考比較のために7位の水酸基がα位の構造異性体であるケノデオキシコール酸のNMRスペクトルを図11に示した。

この結果、図9と図10に示したNMRスペクトルは完全に一致しており、合成された物質はウルソデオキシコール酸と判定された。

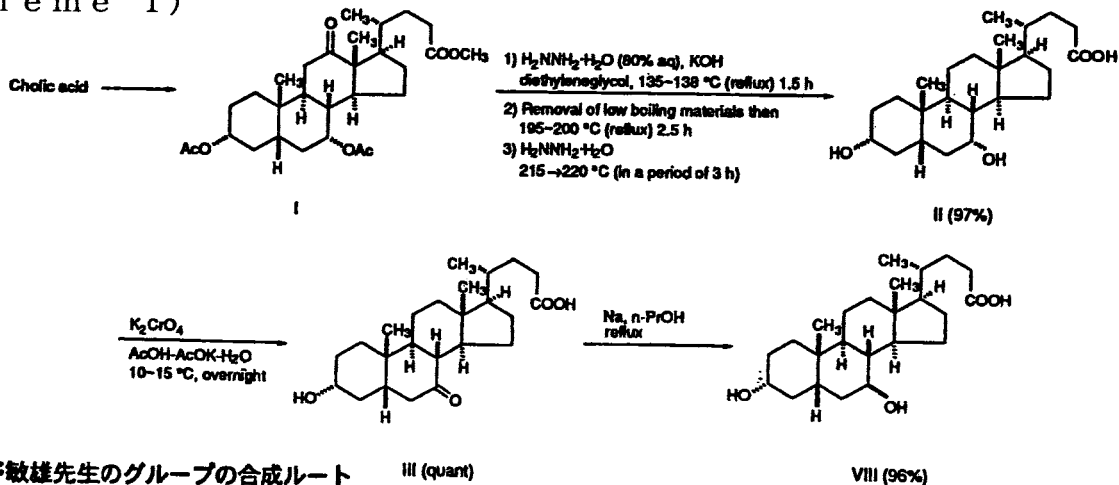
純度については、測定を行っていない。

(3) 考察

今回はコール酸からウルソデオキシコール酸が合成出来る事を確認するに止まったが、さらに新しい反応方法を取り入れる事により、簡便な合成経路を開発する事が可能と考えられる。

金沢らの方法でも十分な収率が報告されているので、小規模であれば本法でも良いかと考えられるが、大規模になると問題が生じる恐れがある。

(Scheme 1)

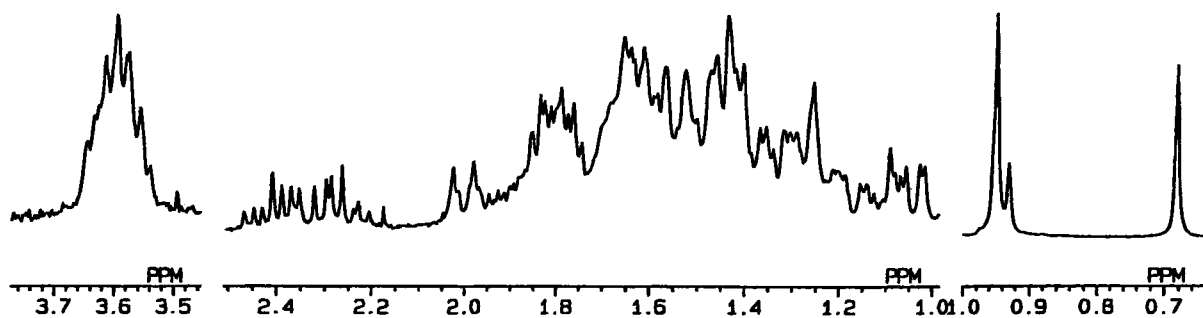


星野敏雄先生のグループの合成ルート III (quant)

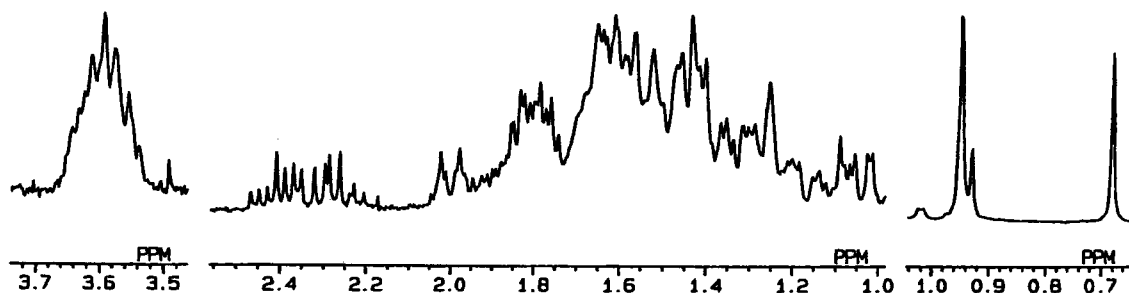
金沢定一、島崎昭夫、佐藤徹雄、星野敏雄、日化、1955, 76, 297-301.

(図中、化合物番号は原報どおり)

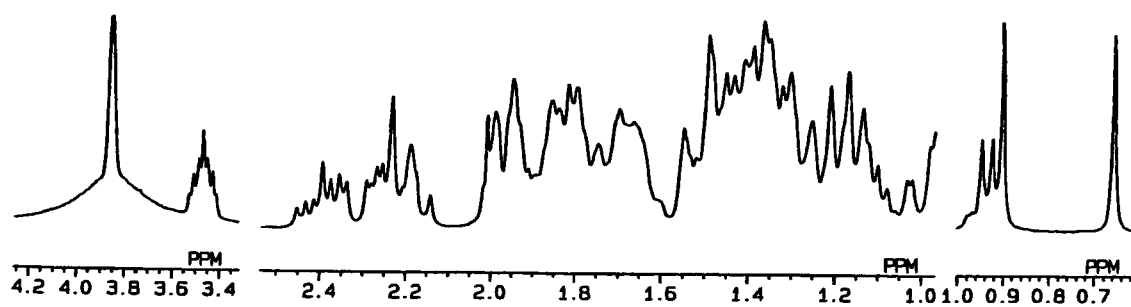
(図9) 合成した物質のNMRスペクトル



(図10) ウルソデオキシコール酸 (標準品) のNMRスペクトル



(図11) ケノデオキシコール酸 (標準品) のNMRスペクトル



5. 熊胆および関連物質の薬理活性の測定

-胆汁排泄量および胆汁酸濃度に及ぼす影響-

熊胆は古くから胆汁分泌を促進する効果を有することが知られているが、最近では入手が困難となり、合成品（ウルソデオキシコール酸や他のコール酸誘導体）や他の動物の胆汁が用いられるようになってきている。そこで今回は、熊胆、ウルソデオキシコール酸、ウシ胆汁末、熊胆を含有する市販品について胆汁分泌に対する薬理作用を比較検討した。

(1) 材料と方法

1. 測定に供した試料

- ①ウルソデオキシコール酸（ウルソ^R、東京田辺）
- ②熊胆（中国製）
- ③ウシ胆汁末（国内産）
- ④市販品 A（熊胆を含有したもの）
- ⑤市販品 B（牛胆汁末を主成分としたもの）

2. 動物

Crlj:SD 系雄性ラット（体重 130-185g）を試験に供した。

3. 胆汁の採取方法

ラットをネンブタール（50 mg/kg.i.p.）麻酔下で開腹後、総胆管にカニューレ（ポリエチレン製、内径 0.4mm、外径 0.8mm）を逆行性に挿入した。胆汁の流出を確認した後、5～15 分放出した。薬物を投与し、投与後 0-1 時間、1-2 時間及び 2-3 時間に得られる胆汁をエッペンドルフチューブに採取した。

4. 薬物投与方法

試料を 0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液に懸濁し、経口ゾンデを用いて強制的に胃内投与した。投与液量は 5ml/kg とし、投与量はヒトの 1 回量を参考にして、濃度はウルソデオキシコール酸 1mg/kg, 熊胆 2mg/kg, ウシ胆汁末 2mg/kg, 市販品 A 2.8mg/kg 及び市販品 B 28mg/kg とし、対照群には 0.5 % CMC 溶液のみを投与した。なお、実験は一群 3 匹にて行った。

5. 測定項目

各時間に得られた胆汁量は天秤を用いて重量を測定し、単位時間当たりの胆汁排泄量 (μ l/hr) とした。胆汁中の総胆汁酸量は、胆汁酸試薬（極東製薬）を用いて生化学自動分析装置（EXPRESS PLUS, CIBA-CORNING）にて単位時間当たりの総胆汁酸濃度 (mmol/L/hr) を測定した。

(2) 結果

単位時間当たりの胆汁排泄量の測定値を表 3 に、またその変化を、図 1 2 に示した。正常麻酔下ラットに 0.5% CMC を付加した対照群の胆汁排泄量は、胆管カニューレ挿入後、経時的な低下傾向を示した。このような条件下にて熊胆および関連物質を投与した群について対照群と比較した結果、熊胆にのみ排

泄量の増加が認められた。一方、他のウルソデオキシコール酸、ウシ胆汁末及び市販品Bは対照群に比較し排泄量の低下傾向を示し、特に市販品Aは著しい抑制を示した。

次に、総胆汁酸濃度について検討した結果、0.5% CMC を付加した対照群では総胆汁酸濃度は約 10mmol/L であるのに比し熊胆および関連物質を投与した直後（0-1 時間）の総胆汁酸濃度は全ての被験物質投与群で高値を示し、市販品 A 及び市販品 B は対照群に比し有意な高値を示した（図 1 4）。この総胆汁酸濃度上昇作用は経時的に減弱した。

（3）考 察

正常ラットを用いて、熊胆および関連物質の胆汁排泄量と総胆汁酸濃度を測定した。その結果、熊胆の 2mg/kg 投与により胆汁排泄量の増加作用が認められた。しかし熊胆の主成分であるウルソデオキシコール酸投与群（1mg/kg）および熊胆を含有している市販品 A 2.8mg/kg については排泄量の増加作用が認められなかった。このことはまた、ウルソデオキシコール酸および市販品 A の投与量が少なかったために胆汁排泄量に差がでなかったのか、あるいは熊胆の他の成分による効果である可能性も考えられる。またウシ由来の各物質についても排泄量の増加は示さなかった。しかしながら、総胆汁酸量については、熊胆及び関連物質のいずれもが胆汁酸濃度の増加作用を示し、ウシ由来胆汁成分（ウシ胆汁末および市販品 B）でも作用が確認できた。このことより、ウシ由来胆汁成分においても熊胆同様に、ラットの胆汁酸分泌促進作用があることが確認された。また、熊胆（2mg/kg）群とウシ胆汁末（2mg/kg）群を比較するとその作用は同等であることより、熊胆には胆汁排泄量の増加作用を有する成分と胆汁酸分泌促進作用を示す成分の両者があることが認められるが、ウシ胆汁末には胆汁排泄量増加作用が認められないことより、胆汁排泄量増加作用を有する成分が無いか極めて少ないものと考えられる。しかし今回の試験においては、投与濃度が 1 用量であるため濃度依存性や熊胆の作用との効力比を算出することはできないが、少なくともウシ由来の胆汁末においては熊胆の持つ胆汁酸分泌促進作用がありその作用は熊胆と同様であると思われた。

さらに、熊胆含有である市販品 A の 2.8mg/kg とウシ胆汁末含有の市販品 B の 28mg/kg 投与群において、同様な胆汁酸分泌促進作用が認められたことより、ウシ胆汁末が催胆剤としての候補となりうることを示唆している。

表3 熊胆および関連物質の薬理作用
— 胆汁排泄量および胆汁酸濃度に及ぼす影響 —

Sample	A. No.	胆汁酸量(μL)				胆汁酸濃度(mmol/L)				総胆汁酸量(μmol)†			
		1 h	2 h	3 h	$\Sigma(1-3h)$	1 h	2 h	3 h	$\Sigma(1-3h)$	1 h	2 h	3 h	$\Sigma(1-3h)$
① 0.5% CMC	1	576	564	523	1663	8.85	8.46	8.04	25.35	5.10	4.77	4.20	14.07
	2	414	380	294	1089	10.19	9.48	10.38	30.05	4.22	3.60	3.05	10.88
	3	356	329	320	1006	12.36	10.83	9.01	32.20	4.40	3.57	2.89	10.86
	mean	449	425	379	1252	10.47	9.59	9.14	29.20	4.57	3.98	3.38	11.94
	$\pm\text{SE}$	86	71	72	207	1.02	0.69	0.68	2.02	0.27	0.40	0.41	1.07
② ウルソデオキシ コール酸	1	269	241	232	742	13.98	12.28	10.73	36.99	3.76	2.96	2.49	9.21
	2	421	368	380	1169	13.20	10.85	8.35	32.40	5.55	3.99	3.17	12.72
	3	515	472	442	1430	12.13	10.95	9.95	33.03	6.25	5.17	4.40	15.82
	mean	402	360	352	1114	13.10	11.36	9.68	34.14	5.19	4.04	3.36	12.58
	$\pm\text{SE}$	72	67	62	200	0.54	0.46	0.70	1.44	0.74	0.64	0.56	1.91
③ 熊胆	1	499	407	344	1249	10.91	9.11	9.43	29.44	5.44	3.71	3.24	12.38
	2	525	512	419	1457	16.39	11.51	11.04	38.94	8.61	5.89	4.63	19.14
	3	558	506	491	1555	9.49	8.33	7.46	25.29	5.29	4.22	3.66	13.17
	mean	527	475	418	1420	12.26	9.65	9.31	31.22	6.45	4.60	3.85	14.90
	$\pm\text{SE}$	17	34	42	90	2.10	0.96	1.03	4.04	1.08	0.66	0.41	2.13
④ 牛胆汁末	1	294	255	259	809	13.09	11.50	10.52	35.11	3.85	2.94	2.73	9.51
	3	479	495	382	1355	11.92	9.94	10.58	32.44	5.70	4.92	4.04	14.67
	4	379	379	396	1155	11.94	9.05	8.95	29.94	4.53	3.43	3.55	11.51
		mean	384	376	346	1106	12.32	10.16	10.02	32.50	4.69	3.76	3.44
	$\pm\text{SE}$	53	69	44	160	0.39	0.72	0.53	1.49	0.54	0.60	0.38	1.50
⑤ 市販品A	1	351	289	254	894	16.05	13.47	12.59	42.12	5.63	3.89	3.20	12.73
	2	228	173	150	552	15.35	13.17	12.13	40.65	3.50	2.28	1.82	7.60
	3	281	291	340	912	16.55	12.86	11.75	41.16	4.64	3.74	4.00	12.38
	mean	286	251	248	786	15.98	13.17	12.16	41.31	4.59	3.30	3.01	10.90
	$\pm\text{SE}$	36	39	55	117	0.35	0.18	0.24	0.43	0.62	0.51	0.64	1.65
⑥ 市販品B	1	356	349	277	982	15.25	13.81	12.30	41.36	5.43	4.82	3.40	13.65
	2	287	320	263	870	16.80	14.64	13.35	44.80	4.82	4.69	3.51	13.02
	3	521	368	304	1193	13.83	11.07	9.01	33.91	7.21	4.08	2.74	14.02
	mean	388	346	281	1015	15.29	13.18	11.55	40.02	5.82	4.53	3.22	13.56
	$\pm\text{SE}$	70	14	12	95	0.86	1.08	1.31	3.21	0.72	0.23	0.24	0.29

*, p<0.05, **, p<0.01 Student's t-test

† 総胆汁酸量 = 胆汁酸量 × 胆汁酸濃度

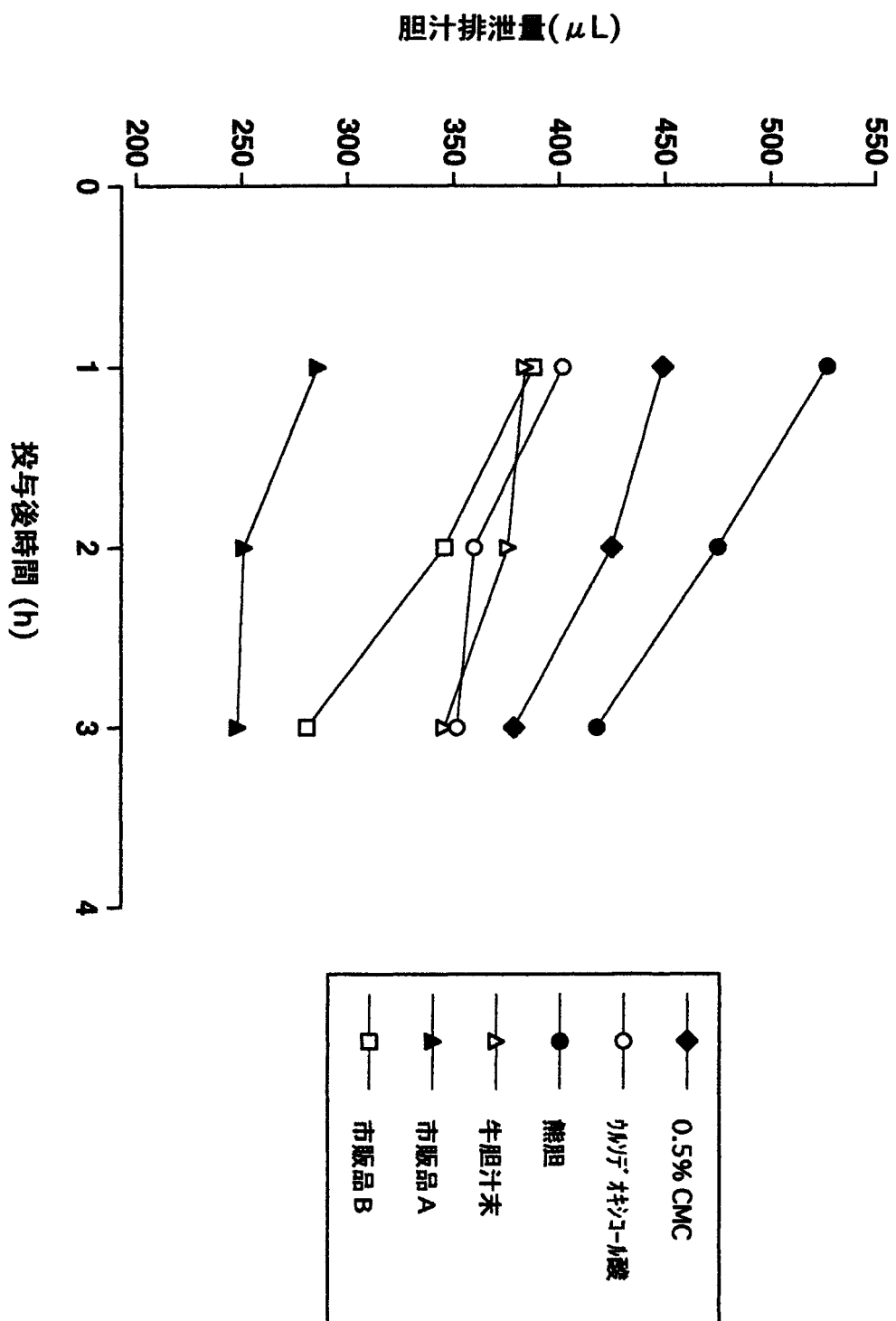


図12 胆汁排泄量変化

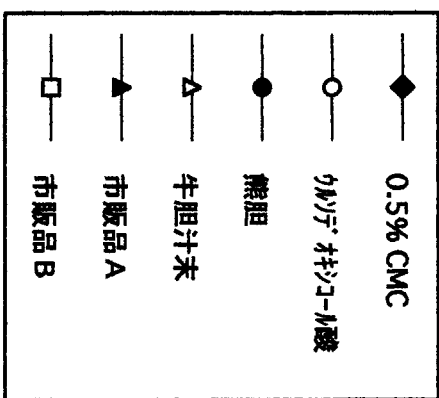
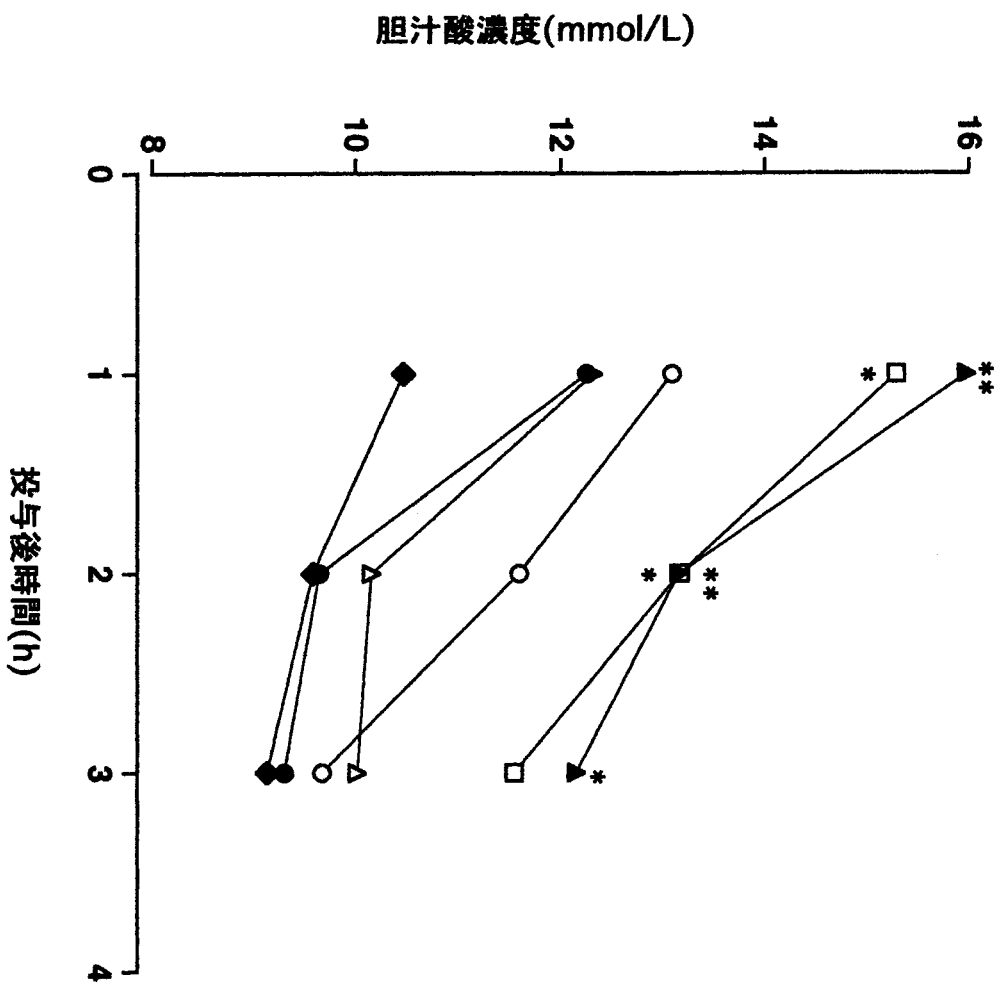


図13 胆汁酸濃度変化

(*: p<0.05, **: p<0.01, Student's t-test)

6. まとめ

熊胆は熊の胆嚢の乾燥物であり、古くから漢方薬に配合されてきたが、近年は原料である熊が、野生動物の保護のため、容易に捕獲できなくなってきた。そこで本研究では熊胆や他の動物の胆汁の成分を分析し、薬効成分とされるウルソデオキシコール酸を合成し、またそれらの薬理作用を検討した。

熊胆、牛と豚の胆汁、熊胆あるいは合成ウルソデオキシコール酸を含有する市販の医薬品製剤を入手し、メタノールで抽出される胆汁酸成分について、酵素(3α -hydroxysteroid dehydrogenase)を固定化したカラムを用いた HPLC で分析した。

その結果、熊胆に検出される胆汁酸は全体で約 80%であり、ウルソデオキシコール酸とケノデオキシコール酸が主体であり、他に少量の2種類の胆汁酸が検出された。これに対し、牛胆汁では、検出される胆汁酸の種類は10種類にのぼり、コール酸とデオキシコール酸の抱合体が主成分であった。

熊胆に含まれる胆汁酸以外の生理活性成分について探索する目的でタンパク質とペプチド性の物質の分析を逆相系 HPLC で実施した。熊胆は水にほとんど溶解しないため、TFA 可溶性画分を分析した。その結果、胆汁酸以外の成分はタンパク質が主であると考えられた。

牛の胆汁を原料として胆汁酸を分離精製し、コール酸を得るための製法を検討した。胆汁をアルコール分画して除タンパクした後、アルコール可溶画分をアルカリ加水分解し、抱合型胆汁酸からグリシン・タウリンを除去し、さらにシリカゲル充填カラムクロマトグラフィーで各種の胆汁酸の分離精製が可能であることが確認できた。しかし、純度的には不十分で、目的とするコール酸を単離するには、さらに何らかの精製手段を講じる必要があると考えられた。

ウルソデオキシコール酸の合成はコール酸を原料として、金沢定一らの方法を参考にして行った。20g のコール酸を原料として、15.8g の製品を得ることができた。

また、熊胆の薬理効果の1つである利胆作用を調べるため、SD系のラットを用いて、麻酔下にて熊胆、牛と豚の胆汁乾燥物などの種々の試料の懸濁液を、経口ゾンデを用いて投与し、胆管カニューレーションにより投与後の胆汁の分泌量の増加を測定した。また、分泌された胆汁中の成分の変化についても診断用胆汁酸測定キットを用いて測定した。熊胆だけに胆汁分泌の増加が見られたが、主成分であるウルソデオキシコール酸には利胆作用は観察されなかった。しかし、総胆汁酸量については熊胆と関連物質の両方に増加が見られた。