

①

6位に水酸基を有する胆汁塩の
比較生化学的研究

1991

吉 井 美智子

6位に水酸基を有する胆汁塩の
比較生化学的研究

1991

吉 井 美智子

目 次

序 章	6-水酸化胆汁塩	1
第1章	6位に水酸基を有する胆汁アルコール	12
第2章	6位に水酸基を有するC ₂₇ 胆汁酸	21
第3章	6位に水酸基を有するC ₂₄ 胆汁酸	27
終 章	要約	33
実験の部		35
参考文献		50
謝 辞		58

本文中に慣用名、略号を二回以上用いた胆汁酸、胆汁アルコールの systematic name、及び略号、化学式で示した用語、物質名は下記の通りである。

慣用名	略号	本文中番号	systematic name
ケノデオキシコール酸	CDC	(1)	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
コール酸		(2)	3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
ヒオコール酸	HC	(3)	3 α ,6 α ,7 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
ヒオデオキシコール酸	HDC	(4)	3 α ,6 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
α -ムリコール酸	α -MC	(5)	3 α ,6 β ,7 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
β -ムリコール酸	β -MC	(6)	3 α ,6 β ,7 β -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
ω -ムリコール酸	ω -MC	(7)	3 α ,6 α ,7 β -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
リトコール酸	LC	(11)	3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
7-ケトリトコール酸	7-KLC	(14)	3 α -hydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid
ムリデオキシコール酸	MDC	(10)	3 α ,6 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
α -trichechol		(31)	5 β -cholestane-3 α ,6 β ,7 α ,25,26-pentol
β -trichechol		(36)	5 β -cholestane-3 α ,6 β ,7 β ,25,26-pentol
ω -trichechol		(37)	5 β -cholestane-3 α ,6 α ,7 β ,25,26-pentol
ウルソデオキシコール酸	UDC		3 α ,7 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
5 β -bufol		(35)	5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α ,25,26-pentol
7-ケトデオキシコール酸		(45)	3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid
	THCA	(38)	3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholestan-26-oic acid
	DHCA	(33)	3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholestan-26-oic acid
	TeHCA	(44)	3 α ,6 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholestan-26-oic acid
デオキシコール酸			3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
12 α -ヒドロキシヒオコール酸	12 α -OH-HC	(51)	3 α ,6 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
12 α -ヒドロキシ- α -ムリコール酸	12 α -OH- α -MC	(63)	3 α ,6 β ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
12 α -ヒドロキシ- β -ムリコール酸	12 α -OH- β -MC	(65)	3 α ,6 β ,7 β ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid

GLC : gas-liquid chromatography

TLC : thin-layer chromatography

GC-MS : gas-liquid chromatography-mass spectrometry

¹H-NMR : ¹H-nuclear magnetic resonance

¹³C-NMR : ¹³C-nuclear magnetic resonance

TMS : trimethylsilyl

RRT : relative retention time

M⁺ : molecular ion

NBS : N-bromosuccinimide

NaBH₄ : sodium borohydride

CH₃MgI : methylmagnesium iodide

序章 6-水酸化胆汁塩

胆汁塩の比較生化学的研究は、各種脊椎動物の種属間で胆汁塩の化学構造にかなりの相違があることを明らかにしてきた。天然胆汁中に見出される胆汁塩は胆汁酸のグリシンまたはタウリンとの抱合体と、胆汁アルコールの硫酸との抱合体に二大別される。殆どの胆汁アルコールは炭素数八個の側鎖をもつコレスタン骨格に幾つかの水酸基が導入されたポリヒドロキシステロイドである。胆汁酸には炭素数24個の C_{24} 胆汁酸と、それより炭素数の多い高級胆汁酸とがある。殆ど的高级胆汁酸は胆汁アルコールと同じくコレスタン骨格をもつ C_{27} 胆汁酸であり、その側鎖末端にカルボキシル基が存在する点が胆汁アルコールとは異なっている。 C_{24} 胆汁酸はコレスタン骨格より炭素数が3個少ないコラン骨格をもち、その側鎖末端には C_{27} 胆汁酸と同じくカルボキシル基が存在する。

胆汁アルコールは一部の魚類と両生類の胆汁主成分であり、 C_{27} 胆汁酸は爬虫類のワニ目、カメ目において胆汁主成分であり、 C_{24} 胆汁酸は多くの魚類、爬虫類の有鱗目、鳥類、哺乳類の胆汁主成分である。このように動物種によってその主胆汁塩を異にするのは胆汁塩生合成の鎖が脊椎動物の進化に伴って進化してきた結果であると考えられており、ヒトにおける胆汁酸の生合成経路もその生合成鎖進化の一つの結果であると思なすことができる。脊椎動物の系統図とその主胆汁塩を Fig. 2. に示す。

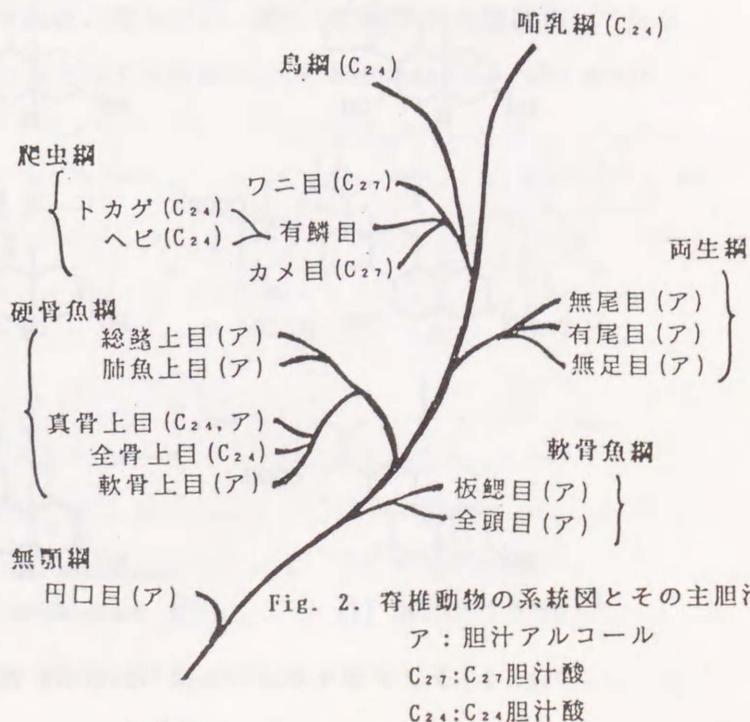
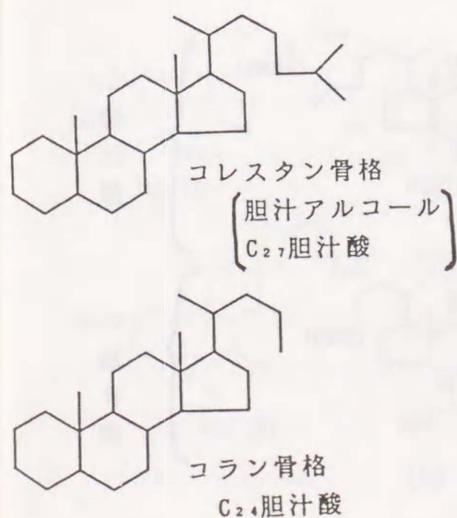


Fig. 1. 胆汁塩の基本骨格

ヒトにおける一次胆汁酸、ケノデオキシコール酸 (CDC) (1) とコール酸 (2) の生成主経路を Fig. 3. に示す。Fig. 2. と Fig. 3. の対照より明らかなように、ヒトをはじめ高等な脊椎動物での C_{24} 胆汁酸生成経路は、胆汁アルコールや C_{27} 胆汁酸を中間体として経過するものであり、一方胆汁アルコールや C_{27} 胆汁酸を主胆汁塩とする下等な脊椎動物は、 C_{24} 胆汁酸生成経路の中途までしか生合成酵素を獲得していないものである。

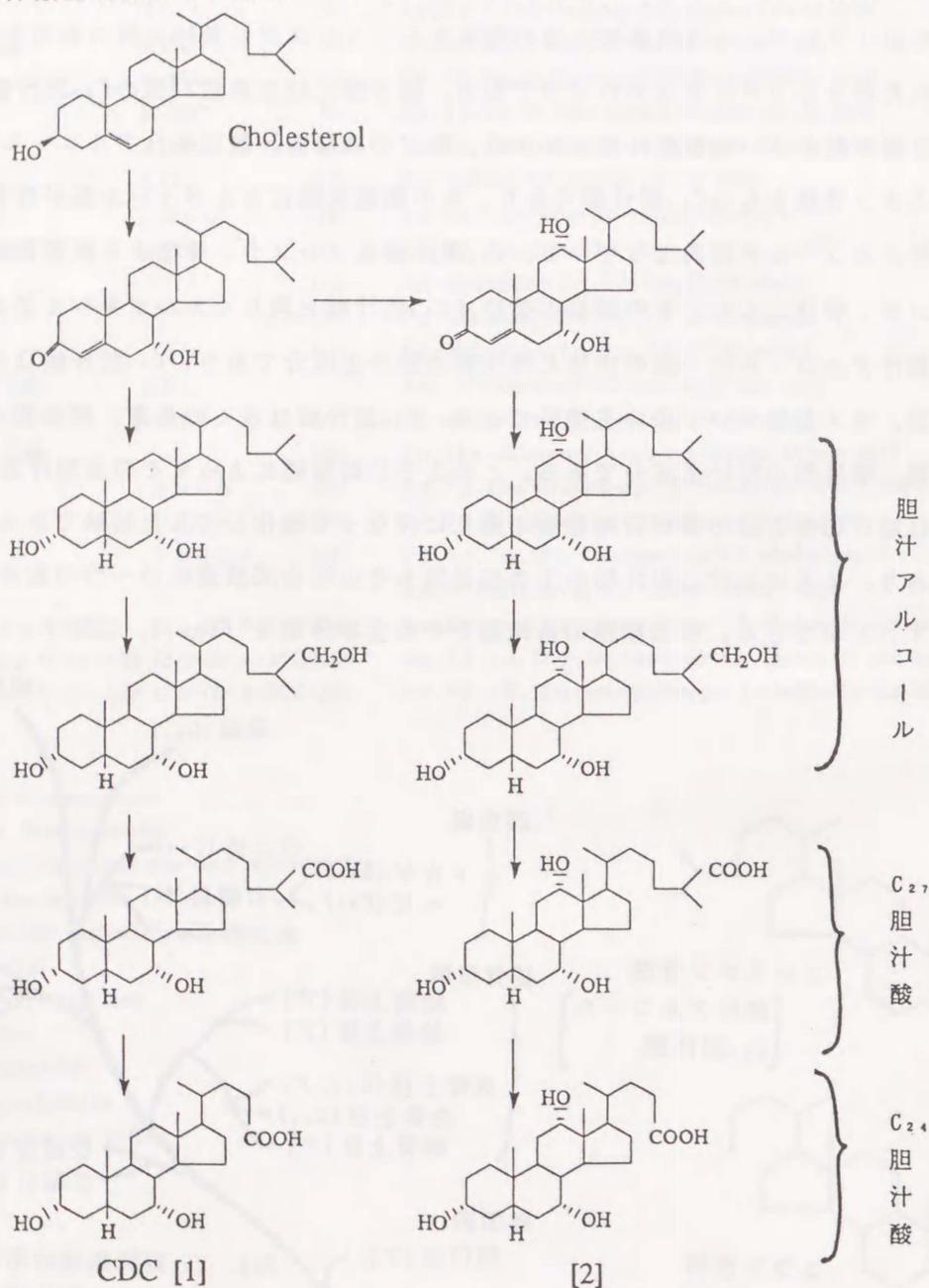


Fig. 3. ケノデオキシコール酸 (CDC) (1) 及びコール酸 (2) 生合成経路

ところで天然胆汁酸、胆汁アルコールの殆どは母核の 3,7,12位に1~3個の水酸基を持っているが、それらに加え母核のそれ以外の位置に水酸基を持つ胆汁酸、胆汁アルコールも幾種か知られている。円口類のヌタウナギやメクラウナギに見出された myxinol (5 α -cholestane-3 β ,7 α ,16 α ,26-tetrol) と 3-epimyxinol (5 α -cholestane-3 α ,7 α ,16 α ,26-tetrol)、それにある種のヘビに見出された pythocholic acid (3 α ,12 α ,16 α -trihydroxy-5 β -cholanoic acid) は 16 α -水酸基を有している。また淡水魚ピラルクからは arapaimol A (5 β -cholestane-2 β ,3 α ,7 α ,12 α ,26-pentol)、arapaimol B (5 β -cholestane-2 β ,3 α ,7 α ,12 α ,26,27-hexol)、arapaimic acid (2 β ,3 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholanoic acid) と、2 β -水酸基を有する胆汁アルコールとC₂₇胆汁酸が見出されている。そして、ブタに見出されたヒオコール酸 (HC) (3)、ヒオデオキシコール酸 (HDC) (4)、ラット、マウスに見出された α -、 β -、 ω -ムリコール酸 (α -、 β -、 ω -MC) (5,6,7) には 6位に水酸基が存在する。以上のような母核の3,7,12位以外の位置に水酸基を有する胆汁酸のなかで最も古くから知られているのは、6位に水酸基を持つ胆汁酸である。今まで見つかった 6位に水酸化をうけた胆汁酸を Fig. 4. に示す。1847年、Gundelach と Strecker はブタの胆汁より HDC (4) のグリシン抱合体を得ているが¹⁾、1923年に到り、Windaus と Bohne はグリコヒオデオキシコール酸をアルカリ加水分解し、遊離の HDC (4) を結晶として単離した²⁾。HDC (4) の化学構造は1940年、Tukamoto によって研究された。即ち彼は、HDC (4) をクロム酸酸化して得た 3,6-dioxo-5 β -cholanoic acid を還元して4種類の 3,6-dihydroxy-5 β -cholanoic

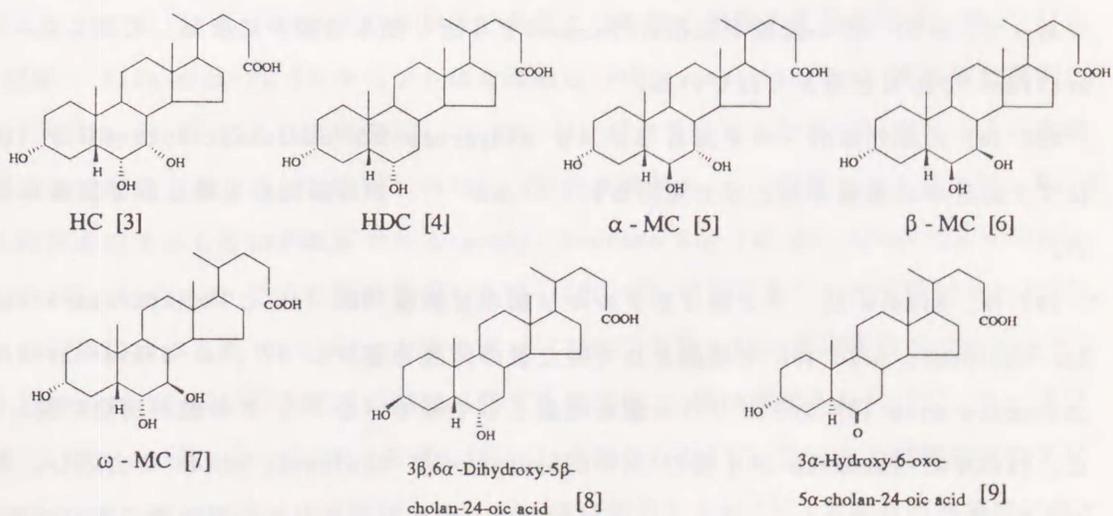


Fig.4. C-6 hydroxylated C₂₄ bile acids.

acids を調製し³⁾、その中の 3β -水酸基を有する二種の化合物のうちの一つは構造が既に決定していた化合物、 $3\beta,6\beta$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid と一致し、もう一つの $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid (8) は、Kimura によりブタより単離された酸と一致することを明らかにし、さらに残り二つの 3α -水酸基を有する化合物のうち、 $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid と思われる化合物の融点が、ブタからとれた HDC (4) と一致することを確認した。しかしこの研究では HDC (4) の 6-水酸基の配置はまだ推定の域を脱することができなかった。1947年、Moffett と Hoehn は、HDC (4) の 3-水酸基のみを選択的に酸化して調製した 3-ケト-6-ヒドロキシ体を白金触媒下接触還元して得られた化合物が、 $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid (8) であったことから、HDC (4) の 6-水酸基の配置が α であると決定し、ここに HDC (4) の構造は $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid (4) と確定した⁴⁾。HDC (4) は長くブタに特異的な胆汁酸と考えられていたが、後にラット肝⁵⁾、胆汁⁶⁾、糞^{7,8)}中に相当量存在していることが明らかにされた。

1935年、Fernholz は 15 L のブタ胆汁をアルカリ加水分解後、HDC (4) を結晶化により取り除いた母液中から、新胆汁酸をメチルエステル-アセタートの結晶として得、それをアルカリ加水分解して得た遊離酸の構造を 3α -hydroxy-6-oxo- 5α -cholan-24-oic acid (9) と決定している⁹⁾。この化合物は A/B 環の結合がトランス型の胆汁酸としては天然から最初に見出されたものであるが、実はこの 5α -胆汁酸は天然胆汁中には 3α -hydroxy-6-oxo- 5β -cholanoic acid のグリシン抱合体として存在していたものであって、その 5位の配置が脱抱合のためのアルカリ加水分解中に反転して生じた artifact であると考えられている。

HDC (4) の異性体の一つである $3\alpha,6\beta$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid (MDC) (10) はブタ胆汁中の微量成分として見出されているが¹⁰⁾、他の動物から得られた報告はない。

1937年、Kimura は、ブタ胆汁をアルカリ加水分解後 HDC (4) と 3α -hydroxy-6-oxo- 5α -cholanoic acid (9) を結晶として得た後の母液を塩析し $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid (8) のナトリウム塩を結晶として得ている¹¹⁾。この酸の構造に関しては、1940年に Tukamoto が4種の $3,6$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acids を合成し、その合成 $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholanoic acid (8) と天然酸との混合物の融点が変わらないことから決定された³⁾。またブタ胆石中にこの 8 が微量存在することも報告さ

れている^{12,13)}。

1954年、Haslewood と Sjoval1 は、ブタの胆汁をペーパークロマトグラフィーで分析したところ、グリココール酸と類似するが明かに相違する spot を認め、新トリヒドロキシ胆汁酸の存在を予知した¹⁴⁾。同年、Haslewood はブタ胆汁をアルカリ加水分解後、エチルエステルとして Al_2O_3 カラムクラマトグラフィーにより精製して新胆汁酸を単離し、ヒオコール酸 (HC) (3) と名付けた¹⁵⁾。しかし、このときの結晶は HDC (4) との混晶であり、単一の結晶ではなかった。1956年、Haslewood はブタ胆汁酸混合物のメチルエステルもしくはエチルエステルのアセタートを調製、その再結晶をくり返して精製後、アルカリ加水分解して HC (3) の純品を得た¹⁶⁾。同年、Ziegler によりブタ胆汁から同じ胆汁酸が単離され、奇しくも同じヒオコール酸 (3) と命名された¹⁷⁾。HC (3) を単離した Haslewood と Ziegler は独立的にその化学構造について、ブタの胆汁中には 3α 位と 7α 位に水酸基をもつ CDC (1) と 3α 位と 6α 位に水酸基をもつ HDC (4) が存在すること、また HC (3) は acetonide を形成し得ることから、この新胆汁酸、HC (3) が $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid であると推定している^{16, 17)}。Ziegler はこの化合物の $[M]_D$ は $+19^\circ$ であり、Barton と Klyne のデータから計算により求めた $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha$ -トリヒドロキシ体の $[M]_D$ は -13° 、 $3\alpha, 6\alpha, 7\beta$ -トリヒドロキシ体の $[M]_D$ は $+249^\circ$ であるから、HC (3) は $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha$ -トリヒドロキシ体であると推定している¹⁷⁾。それに加え、この HC (3) をクロム酸酸化した時の生成物は 3-oxo-6,7-secocholan-6,7,24-trioic acid である事がわかり、このことは、HC (3) が 6,7-ジヒドロキシ体であることを強く示唆するものであった^{16, 17)}。

翌年、Hsia らは HC (3) からケト体を経由し ethylenedithioketal 誘導体を調製し、これを Raney Ni により脱硫還元して HDC (4) ができたことから、3 位と 6 位の水酸基は α -配置であることを確定した¹⁸⁾。7 位の水酸基も α -配置であることは、HC (3) を化学合成するときの前駆体である methyl 6-bromo- $3\alpha, 7\alpha$ -diacetoxy- 5β -cholanoate を Raney Ni により脱臭素化した時、CDC (1) が生じることから確認された¹⁹⁾。

1957年にはじまる St. Louis 大学のグループによる胆汁酸の代謝研究のなかからラット胆汁中に HC (3) の水酸基の配置に関する異性体二種が単離され^{20, 21)}、 α -及び β -ムリコール酸 (α -MC (5), β -MC (6)) と命名された¹⁹⁾。ラットと同属のマウスにも α -及び β -MC (5, 6) が存在することは後に知られたが²²⁾、おなじケツ菌類に属する動物、ハムスター、モルモットにはその存在が確認されていない。

HC (3)、 α -、 β -MC (5,6) のもう一つの異性体、 $3\alpha,6\alpha,7\beta$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid は、1958年、Hsia らにより胆管を結さつしたラットに $[24-^{14}\text{C}]$ HDC (4) を大量に投与し、HDC (4) の代謝物として尿からクロマトグラフィーを用いて初めて単離された¹⁰⁾。のちにこの胆汁酸はラット糞中に常在することが明らかにされ、ムリコール酸はこれで最後という意味から ω -ムリコール酸 (ω -MC) (7) と名付けられた。

これら3種類の MC の構造決定に関しては、これらを CrO_3 酸化したところ HC (3) の時と同じく 6,7-secocholane-6,7,24-trioic acid が得られたことから、HC (3) の水酸基の立体配置に関する異性体であろうと考えられた¹⁸⁾。これら4種類の 3,6,7-トリヒドロキシ体を過ヨウ素酸酸化したところ、 ω -MC (7) > β -MC (6) > HC (3) > α -MC (5) の順で反応し難く、この酸化に最も強く抵抗する α -MC (5) は diaxial trans-glycol、つまり $6\beta,7\alpha$ -glycol であると推定された^{23,19)}。また α -MC (5) は $6\alpha,7\alpha$ -epoxide と $6\beta,7\beta$ -epoxide のいずれの開環によっても合成され、このことから α -MC (5) は diaxial trans-glycol であると考えられた^{23,24)}。更に $6\alpha,7\alpha$ -epoxide と $6\beta,7\beta$ -epoxide のそれぞれを HBr と処理して得たプロムヒドリンを Raney Ni で脱臭素化して得られた化合物が $3\alpha,7\alpha$ 位に水酸基を有する CDC (1) と $3\alpha,6\beta$ 位に水酸基を有する MDC (10) であったことから、 α -MC (5) の構造は $3\alpha,6\beta,7\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid であると決定された。

β -MC (6) の構造に関しては、まず Kagan が methyl 3α -acetoxy- 5β -chol-6-enoate の OsO_4 酸化によって得た合成酸を旋光度、及び立体障害の考察から $6\beta,7\beta$ -glycol であるとし、この合成胆汁酸が天然の β -MC (6) と同じであることを明らかにした²⁵⁾。Hsia らも同じ方法により β -MC (6) を合成している²⁶⁾。また、 β -MC (6) は $3\alpha,6\beta$ -diacetoxy- 7α -bromo- 5β -cholanoate から合成することができるが²⁷⁾、この合成中間体である bromohydrin acetate を Raney Ni により脱臭素化した結果、 $3\alpha,6\beta$ 位に水酸基を有する MDC (10) が得られることから、 β -MC (6) が 6β -水酸基を有することが明らかにされた²⁴⁾。これらのことから β -MC (6) の構造は、 $3\alpha,6\beta,7\beta$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid であると決定された。

もう一つのムリコール酸である ω -MC (7) の構造が、 $3\alpha,6,7$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acids の4つの異性体の中で一つ残った、 $3\alpha,6\alpha,7\beta$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid であることは当然の帰結である。この化合物 $3\alpha,6\alpha,7\beta$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid、 ω -MC (7) は Hsia らにより、methyl $3\alpha,6\alpha$ -dihydroxy-7-oxo-

5 β -cholanoate の 6 α -水酸基を tetrahydropyranyl ether として allomerization を防いだ後、金属 Na により 7-ケト基を還元して合成されている²⁸⁾。

次に、これら 6位に水酸基を有する胆汁酸のなかでその生成経路が最初に明かにされたのは、発見の経緯がそうさせたのだが、 α -及び β -MC (5,6) である。即ち St. Louis 大学のグループはラットを用いて CDC (1) の代謝を調べていたところ、その主代謝物として α -及び β -MC (5,6) を発見した。そこで大量のラット胆汁を採取し、これら CDC (1) の 6 β -水酸化成績体を結晶状に得ることに成功したのである。 α -MC (5) は CDC (1) の直接の 6 β -水酸化で生成する。 β -MC (6) については、Fig. 5. に示すような経路が Samuelsson により提唱されている²⁸⁾。即ち彼等はラットにおける CDC (1) の主代謝物が α -、 β -MC (5,6) であるのに、7-ケトリトコール酸を投与した時、その半分近くがウルソデオキシコール酸に代謝されていることを明かにし、 β -MC (6) は 7-ケトリトコール酸を経由して生成するのではなく、CDC (1) の直接 6 β -水酸化により生じた α -MC (5) の 7 α -水酸基が脱水素されて 7-ケト体になり、それが 7 β -水酸基に還元されて β -MC (6) になると考えた²⁸⁾。

ブタにおける 6 α -水酸化胆汁酸の生合成経路に関しては Fig. 6. に示すような経路が 1959年、Bergstrom らによって提唱されている²⁹⁾。Bergstrom らは胆管瘻ブタの胆汁を集めたところ一日目の主胆汁酸は CDC (1)、HC (3)、HDC (4) であったが、二日目以降は HDC (4) の存在を認めなかった。そこで、[24-¹⁴C] CDC (1)、[24-¹⁴C] HDC (4) を胆管瘻ブタに投与したところ、それぞれ HC (3)、HDC (4) の抱合体に代謝されていた。さらに [³H]HC (3) をブタに投与し、50% が HDC (4) に代謝されることを確認し、ブタでの胆汁酸生合成経路を次のように考えた。即ち、コレステロールから肝でつくられた CDC (1) は肝臓でさらに 6 α -水酸化され HC (3) になり、腸管に分泌され腸内細菌の作用により 7 α -水酸基を失わない HDC (4) になるというものである。その後彼等はさらに 7 α -水酸基の脱離機構を詳細に調べ、HC (3) から HDC (4) への変換に際し 7 β -H は失なわれないが、6 β -H が 7 α -水酸基とともに離脱していることを明らかにし、 Δ^6 -中間体を経由して HDC (4) になると考えている^{30,31)}。ブタ胆汁加水分解物中に見出された 3 α -hydroxy-6-oxo-5 α -cholan-24-oic acid (9) の母体、3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid は、HDC (4) の 6 α -水酸基が腸内細菌によってケト基に脱水素されて生じた二次胆汁酸と考えられている。

ラットにも HDC (4) が存在するが、その生合成経路は 1966年、Einarsson によって

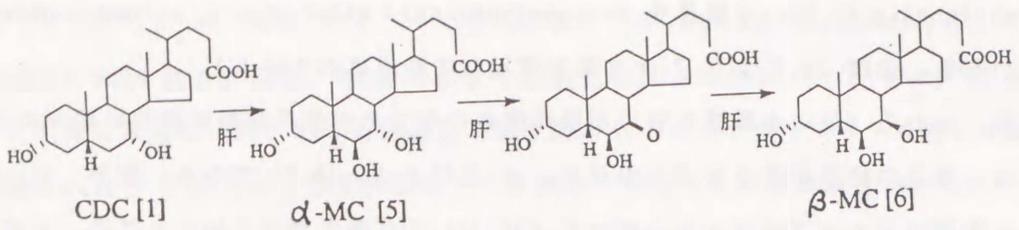


Fig. 5. α -ムリコール酸、 β -ムリコール酸の生合成経路



Fig. 6. ブタでのヒオデオキシコール酸生合成経路

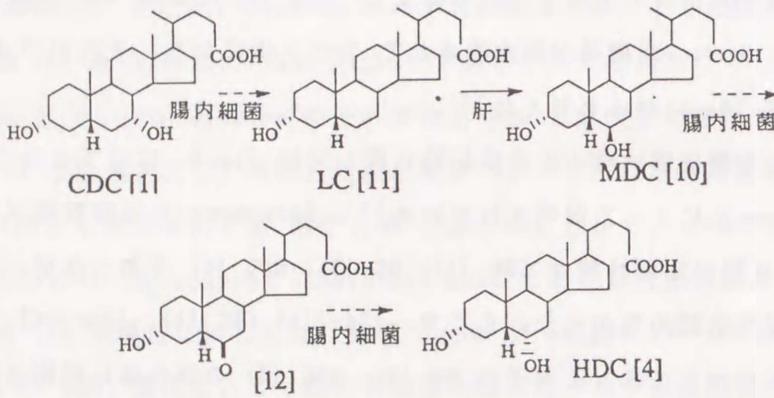


Fig. 7. ラットでのヒオデオキシコール酸生合成経路 (Einarsson 説)

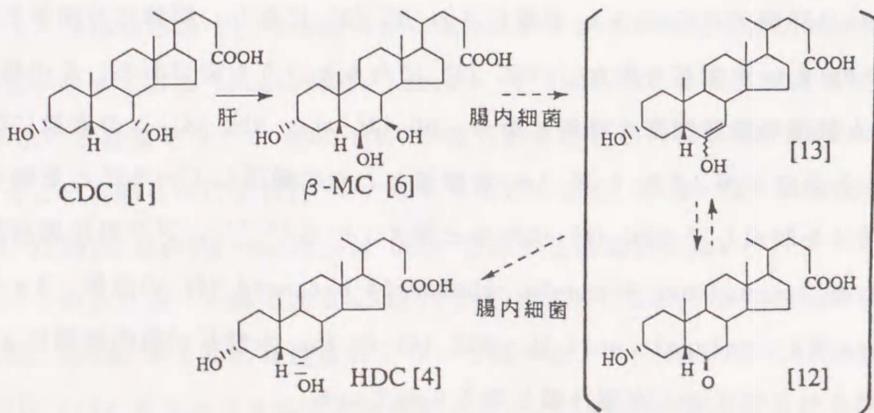


Fig. 8. ラットでのヒオデオキシコール酸生合成経路 (太田 説)

Fig. 7. に示すように提唱された³²⁾。彼は intact rat と胆管瘻ラットを用いそれぞれに [24-¹⁴C] リトコール酸、[24-¹⁴C] MDC (10)、[24-¹⁴C] 3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid を投与し、intact rat では投与標識体は全て HDC (4) に変換されるが、胆管瘻ラットでは MDC (10) は β -MC (6) に変換され、3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid は 3 α ,6 β 位に水酸基を有する MDC (10) に還元されるが、どちらからも HDC (4) は生成しないことを明らかにして Fig. 7. の経路を提唱したのである。即ち CDC (1) はまず、腸内細菌により 7 α -dehydroxylation を受けリトコール酸 (LC) (11) になり、この LC (11) が再吸収され肝臓で 6 β -水酸化を受け MDC (10) になり、腸内に再び分泌され腸内細菌の作用により 3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid (12) となり、さらに腸内細菌により還元されて HDC (4) になるという経路である³²⁾。しかし、次に示す理由から太田らはラットでの HDC (4) 生成のもう一つの経路を提唱している³³⁾。彼等は、intact rat の胆汁中、糞中に HDC (4) 生成の中間体であるという MDC (10) が認められないこと、及び彼等の実験においてラットでの CDC (1) からの β -MC と HDC (4) の生成と減衰曲線が相補的であり、 β -MC が CDC (1) から HDC (4) が生成する際の中間体であることが示唆されたことから、 β -MC が HDC (4) の直接の前駆体であると考えた。そして彼等は、 β -MC をラット糞サスペンションとインキュベートして HDC (4) が生成することを確認し、Fig. 8. に示すような HDC (4) 生成経路を考えた。即ち CDC (1) は肝臓で β -MC (6) に代謝され、これが腸内細菌による代謝をうけて 7 β -水酸基と 6 α -H の脱離によって 3 α ,6-dihydroxy-5 β -chol-6-enoic acid (13) となり、その Δ^6 二重結合が腸内細菌により飽和されて HDC (4) となるか、或いはこの Δ^6 体 (13) は 3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid (12) のエノール型であり、そのケト型、3 α -hydroxy-6-oxo-5 β -cholanoic acid (12) の 6-ケト基の還元によって HDC (4) になったものと考えた。

ラットにおける HDC (4) が Einarsson 経路、太田経路のいずれで生成するかはまだ確定していないが、先に述べたようにラットに [24-¹⁴C] HDC (4) を投与して ω -MC (7) を得ていることから、HDC (4) が ω -MC (7) の母体であると考えられている。即ち、 ω -MC (7) は HDC (4) という二次胆汁酸の代謝産物であるというわけだが、 ω -MC (7) が HDC (4) とともに germ free rat の胆汁、糞中に存在しないという事実³⁴⁾は、上記 ω -MC (7) 生成経路を支持するものであろう。

以上、ラットとブタにおける 6-水酸化胆汁酸の存在と生成についてこれまでに明らかにされたところを略述したが、1971年、穂下はこれら 6-水酸化胆汁酸の生成は、CDC (1) 生合成鎖の末端に高度に種属特異的な 6α - または 6β - 水酸化酵素が付け加わっての産物であると考えた³⁶⁾。つまり 6-水酸化胆汁酸の生成経路は、全ての動物に普遍的な胆汁酸生合成経路の先に最も特殊化した枝として付け加わった、最も遅れて発達した経路であるというのである。そしてラット肝での 6β -水酸化反応において、CDC (1) よりもタウロケノデオキシコール酸のほうがよりよい基質であるという事実、つまり、コレステロールはケノデオキシコール酸抱合体にまで変換され、すでにそのままで十分に胆汁分泌可能な形態になったものへ、更にもう一個水酸基を導入しているという事実こそ上記の考えを支持すると述べている。確かに、1971年の時点においては 6-水酸化胆汁酸はラット、マウスとブタにのみ存在する、まさにユニークな胆汁酸であったから、そう考えたのは無理もなかった。しかしその後、驚いたことにヒトにも 6-水酸化胆汁酸が存在することが明かにされたのである。

まず1976年、Summerfield らは、胆汁うっ滞を伴う肝疾患の患者の尿中に、初めて 6-水酸基を有する胆汁酸、HDC (4)、HC (3) の存在を明かにした³⁸⁾。その後胆汁酸の微量分析法の進歩に伴ない、健常人尿中にも HDC (4)、HC (3) が存在することが明らかとなった^{37, 40)}。また1980年、胎便中に HC (3) が検出された⁴¹⁾のを始め新生児の尿⁴²⁾、胎児の胆嚢胆汁^{43, 44)}に、各種の 6-水酸化胆汁酸の存在が明かにされている。1988年、ヒトの羊水、へその緒の血液、肝臓病患者の尿、血清から三種類の 3,6,7,12-tetrahydroxy- 5β -cholanoic acids と推定される胆汁酸の存在が報告された⁴⁵⁾。

先天的なペルオキシソームの欠損症である Zellweger's syndrome の患者には 3α , 7α , 12α -trihydroxy- 5β -cholestanoic acid (THCA) を始め各種の C_{27} 胆汁酸が蓄積するが、1985年に Kase らが⁴⁶⁾、1987年に Une らが⁴⁷⁾この疾患患者尿中に 3α , 6α , 7α , 12α -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid (TeHCA) と推定される C_{27} 胆汁酸が存在することを認めた。

こうしたヒトにおける 6-水酸化胆汁酸の発見に加えて、6-水酸化胆汁アルコールも発見された。1988年、Kuroki らが West Indian manatee, *Trichechus manatus latirostris* の胆汁塩を調べたところ、この動物は哺乳類であるのにかわらず胆汁酸は全く検出されず、胆汁アルコール硫酸エステルが主成分であり、その主胆汁アルコール、 α -trichechol は、GC-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR を用いた分析より 6β 位に水酸基を有

する 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pentol であると報告された^{4b)}。

このように 6 位に水酸基を有する C_{24} 胆汁酸、 C_{27} 胆汁酸が病態時、健常時のヒトに存在すること、また 6-水酸化胆汁アルコールを胆汁主成分とする哺乳類が見い出されたことにより、先に述べた穂下の見解は何らかの修正を要するようになったことに疑いはない。しかし、これらヒト及び manatee から新しく見出された 6 位に水酸基を有する化合物は、いずれも GC-MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ で構造が推定されているに過ぎず、それらの存在の生物学的な意義を論ずる前に、まず化学構造を確定することが必要である。そこで著者は推定された構造式をもつ 6-水酸化 C_{24} 胆汁酸、 C_{27} 胆汁酸、胆汁アルコールを化学合成しそれを天然物と直接に比較して同定をおこなった。

第 1 章 6 位に水酸基を有する胆汁アルコール

1988年 Kuroki らが、海棲哺乳類である West Indian manatee, *Trichechus manatus latirostris* の胆嚢胆汁を調べたところ、その主胆汁塩は胆汁アルコールの硫酸抱合体であった⁴⁸⁾。いままでに調査された全ての哺乳類の主胆汁塩は胆汁酸のグリシン、またはタウリンの抱合体であったのに反し、この manatee 胆汁中には胆汁酸の存在は認められなかった。加うるに、この manatee の胆汁アルコールは今までに報告されている魚類、両生類に見出された胆汁アルコールのどれとも異なる構造を有するものであった。即ち、従来知られている天然胆汁アルコールの殆どはコール酸(2)、アロコール酸(3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 α -cholan-24-oic acid) などと同じくその母核の 3, 7, 12 位にのみ水酸基を有しており、例外としてメクラウナギ、ヌタウナギの myxinol (5 α -cholestane-3 β , 7 α , 16 α , 26-tetrol)、3-epimyxinol (5 α -cholestane-3 α , 7 α , 16 α , 26-tetrol) は 16 位が、ピラルクの arapaimol A (5 β -cholestane-2 β , 3 α , 7 α , 12 α , 26-pentol)、arapaimol B (5 β -cholestane-2 β , 3 α , 7 α , 12 α , 26, 27-hexol) は 2 位が水酸化されているものがあるに過ぎない。ところが manatee から得られた主胆汁アルコール、 α -trichechol の構造は GC-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR を用いた分析より、5 β -cholestane-3 α , 6 β , 7 α , 25, 26-pentol と推定されている。この母核構造は α -ムリコール酸のそれと同一であり、ラット、マウスに存在する胆汁酸と同一母核構造を、manatee の胆汁アルコールが有するか否か確定することは比較生化学的見地より極めて興味深い。そこで著者は α -trichechol の化学構造を確定するため、5 β -cholestane-3 α , 6 β , 7 α , 25, 26-pentol (31) を化学合成し、天然胆汁アルコールとの比較同定をおこなった。

[結果、考察]

5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pentol (31) を Fig. 9. に示す方法で調製した。まず最初に CDC (1) を低温下にクロム酸酸化して 7-ケトリトコール酸 (7-KLC) (14) とし、この 7-KLC をメチルエステル-アセタート (15) とした後に酢酸中で臭素と処理して 6-ブロム体 (16) とし、この 16 の 7位のケト基を NaBH_4 で還元して 17 を導き、最後に酢酸中亜鉛と処理して methyl 3α -acetoxy- 5β -chol-6-enoate (18) を得た。次に (18) の側鎖炭素を Arndt-Eistert 反応によって一個延長し 3α -hydroxy-25-homo- 5β -chol-6-en-25-oic acid (23) にした。即ち 18 をアルカリ加水分解して得た 19 の 3α -水酸基をホルミル化して保護した後、塩化チオニルと処理して酸塩化物 (21) とし、この 21 をジアゾメタンと反応させジアゾケトン体 (22) とし、これを直ちに高温下コリジン中でベンジルアルコールと反応させた後、アルカリ加水分解して 23 を得た。これをメチルエステル化後、*m*-クロロ過安息香酸酸化して 6,7-epoxide (25) を得、25 を酢酸と処理後、アルカリ加水分解して α -MC の C_{25} 同族体 (26) を得た。26 の水酸基をアセチル化して保護し、得られたアセタート (27) を塩化チオニル処理で酸塩化物 (28) とした後ジアゾメタンと反応させてジアゾケトン体 (29) としこれを直ちに酢酸と処理して $3\alpha,6\beta,7\alpha,26$ -tetraacetoxy-27-nor- 5β -cholestan-25-one (30) とし、最後に 30 と CH_3MgI とを Grignard 反応により縮合させて最終目的物である 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pentol (31) を得た。

こうして調製した化学合成 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pentol と manatee の胆汁から単離した α -trichechol の thin-layer chromatography (TLC) 上の Rf 値、GLC における relative retention time (RRT) は Table 1. に示すように、完全に一致した。

両者の trimethylsilyl ether (TMS) 誘導体のマススペクトルも Fig. 10. に示すように完全に一致した。この 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pentol には 25 位と 26 位に隣接する水酸基が存在しているため、まず M^+ m/z 812 から側鎖末端部 m/z 103 ($\text{CH}_2\text{-OTMS}$) が失なわれて m/z 709 のフラグメントを生じ、それから TMSOH (90) を順次失なって生じた一連のフラグメント (m/z 619, 529, 439, 349) と、それに M^+ から直接に TMSOH を 2個または 3個失なって生じたフラグメント、 m/z 632, 542 の存在が認められ、そのうち m/z 529 のフラグメントが base peak であった。

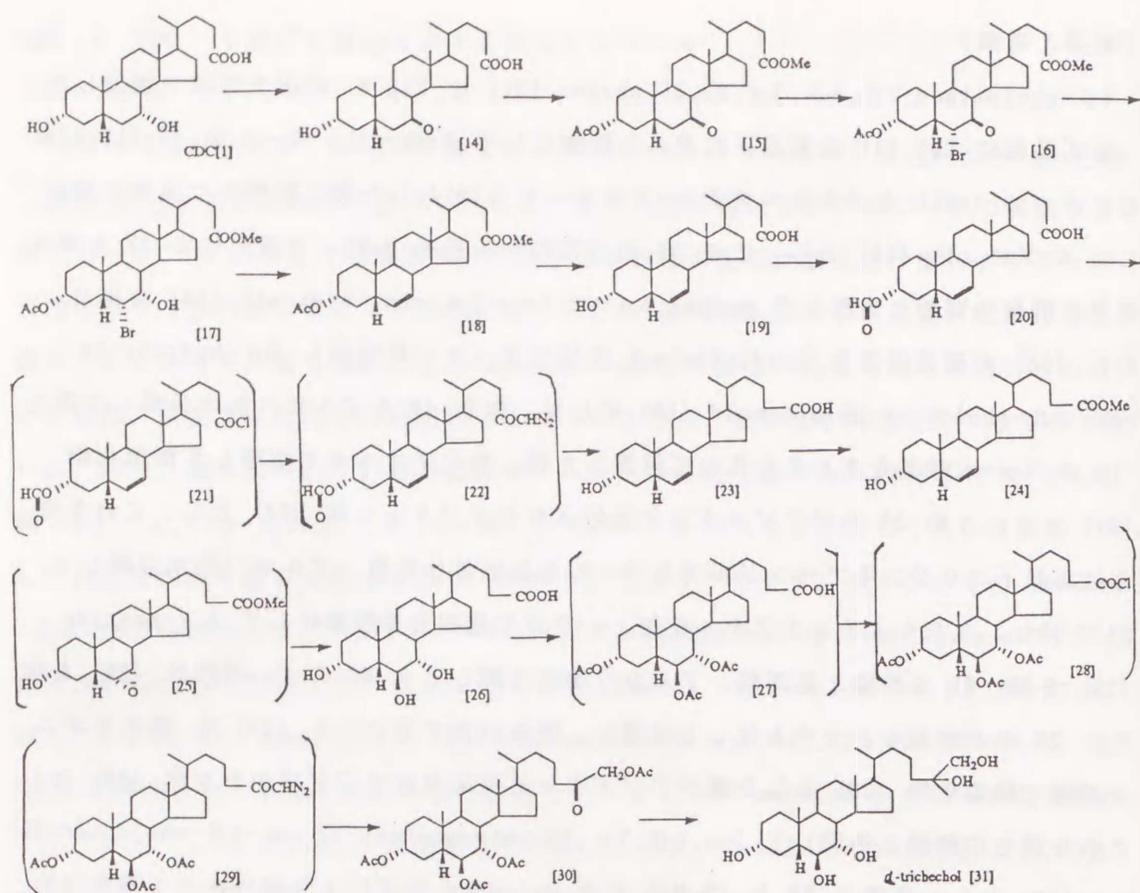


Fig.9. Synthesis of 5 β -cholestane-3 α ,6 β ,7 α ,25,26-pentol (31)

1. ケノデオキシコール酸 (CDC)
14. 3 α -Hydroxy-7-oxo-5 β -cholanoic acid
15. Methyl 3 α -acetoxy-7-oxo-5 β -cholanoate
16. Methyl 3 α -acetoxy-6 α -bromo-7-oxo-5 β -cholanoate
17. Methyl 3 α -acetoxy-6 α -bromo-7 α -hydroxy-5 β -cholanoate
18. Methyl 3 α -acetoxy-5 β -chol-6-enoate
19. 3 α -Hydroxy-5 β -chol-6-enoic acid
20. 3 α -Formoxy-5 β -chol-6-enoic acid
21. 3 α -Formoxy-5 β -cholan-24-oyl chloride
22. 25-Diazo-3 α -formoxy-25-homo-5 β -cholan-24-one
23. 3 α -Hydroxy-25-homo-5 β -chol-6-en-25-oic acid
24. Methyl 3 α -hydroxy-25-homo-5 β -chol-6-en-25-oate
25. Methyl 6 α ,7 α -epoxy-3 α -hydroxy-25-homo-5 β -cholan-25-oate
26. 3 α ,6 β ,7 α -Trihydroxy-25-homo-5 β -cholan-25-oic acid
27. 3 α ,6 β ,7 α -Triacetoxy-25-homo-5 β -cholan-25-oic acid
28. 3 α ,6 β ,7 α -Triacetoxy-25-homo-5 β -cholan-25-oyl chloride
29. 26-Diazo-3 α ,6 β ,7 α -triacetoxy-27-nor-5 β -cholestan-25-one
30. 3 α ,6 β ,7 α ,26-Tetraacetoxy-27-nor-5 β -cholestan-25-one
31. 5 β -Cholestane-3 α ,6 β ,7 α ,25,26-pentol

化学合成品と天然物両者の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルも Table 2. に示すように同一であった。両者のスペクトルにおいて H-19 に由来するシグナルは 1.53、1.55 ppm と通常の胆汁酸、胆汁アルコールのそれ（コール酸 (2) 0.93 ppm、ウルソデオキシコール酸 (UDC) 0.90 ppm、HDC (4) 0.91 ppm) に比べて低磁場にシフトしていた。これはステロイド母核の 6β 位に水酸基が存在すると H-19 が deshield されるためであり、 α -MC (5) 1.53 ppm, β -MC (6) 1.43 ppm, MDC (10) 1.41 ppm にも同じことが観察されている。また、H-6, H-7 に由来するシグナルに関しても同様、天然物 (4.32, 4.35 ppm)、合成品 (4.30 ppm) のそれは α -MC (5) (4.34, 4.30 ppm) と同じ位置に認められた。また 26, 27位のプロトンのシグナルは天然物 (3.92, 1.54 ppm)、合成品 (3.87, 1.53 ppm) 共に 5β -bufol (5β -cholestane- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha, 25, 26$ -pentol) の H-26, H-27 のシグナル (3.89, 1.50 ppm) と同じ位置にあらわれ、両者の側鎖構造が 5β -bufol と同じく 25, 26 位に水酸基をもつものであることを示している。

以上、クロマトグラフィーにおける挙動、マススペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ の一致より、 α -trichechol の構造は 5β -cholestane- $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 25, 26$ -pentol (31) であると確定した。

Table 1. Rf values on TLC and relative retention times (RRT) on GLC of the naturally occurring α -trichechol and the chemically synthesized 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pental.

	Rf values on TLC		RRT ^{c)} on GLC ^{d)}	
	EA ^{a)}	CE ^{b)}	OV-1	Poly I-110
Naturally occurring α -trichechol	0.18	0.17	2.38	1.14
Chemically synthesized 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pental	0.18	0.17	2.38	1.14

^{a)} EA=ethyl acetate:acetone, 3:2 (v/v).

^{b)} CE=chloroform:ethanol, 4:1 (v/v).

^{c)} Relative to the trimethylsilyl ether of methyl cholate (1.00).

^{d)} Bile alcohols were chromatographed as their trimethylsilyl ethers.

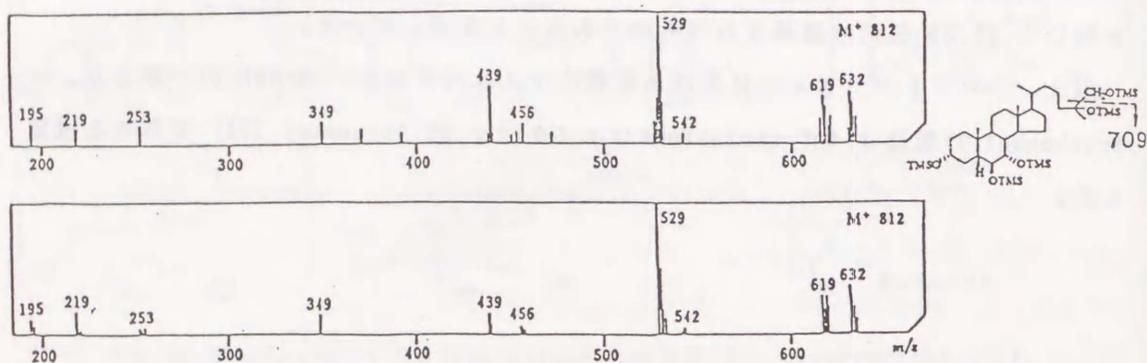


Fig.10. Mass spectra of trimethylsilyl ether derivatives of the naturally occurring α -trichechol (top) and the chemically synthesized 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pental (bottom).

Table 2. ¹H-NMR data for the naturally occurring α -trichechol and the chemically synthesized 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pental in pyridine-d₅.

	H-18	H-19	H-21	H-27	H-3	H-6	H-7	H-26
Naturally occurring α -trichechol	0.77 (s)	1.55 (s)	1.13 (d)	1.54 (s)	3.89 (m)	4.32 (m) [*]	4.35 (m) [*]	3.92 (s)
Chemically synthesized 5β -cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pental	0.77 (s)	1.53 (s)	1.12 (d)	1.53 (s)	3.86 (m)	4.30 (m)	4.30 (m)	3.87 (s)

δ are in ppm from tetramethylsilane (internal standard). Contents in parentheses are multiplicities.

^{*}Assignments may be interchanged in each line.

[生化学的考察]

Kuroki らが manatee の胆汁を分析した結果を Table 3. に示す⁴⁸⁾。この海棲哺乳類胆汁に存在している胆汁アルコールの化学構造から推測される、manatee におけるコレステロールの胆汁アルコールへの変換経路を Fig. 11. に示す。manatee 胆汁中には 12α -水酸基をもつ胆汁アルコールが存在していないことから、この動物の肝臓はブタのそれと同じく 12α -水酸化酵素活性を全くもたないものと考えられる。manatee 胆汁中 5β -cholestane- $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 26$ -tetrol (34)、 5β -cholestane- $3\alpha, 7\alpha, 25, 26$ -tetrol (35) の両者の存在は、それぞれの 6β -水酸基と 25 -水酸基の導入以前の形態、即ち 5β -cholestane- $3\alpha, 7\alpha, 26$ -triol (32) が両者に共通の生合成前駆体であることを強く示唆している。そしてこの triol (32) は通常の哺乳類においては側鎖末端水酸基、 26 -水酸基のカルボキシル基への酸化によって $3\alpha, 7\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholestanoic acid (DHCA) (33) となり、さらに β -酸化によって CDC (1) になるのであるが、manatee においてはそれら側鎖末端部の酸化切断に関与する酵素活性を欠き、その代りに側鎖 25 位と母核 6β 位への水酸基の導入により上記 2種の tetrol (34, 35) を經由して α -trichechol (31) の生成をみたものと考えられる。manatee 肝における 6β -水酸化酵素がラット、マウスのそれと同一である証拠は無いが、もし同じ酵素であるならばこの酵素の活性は側鎖の長短に関係がないということになる。Gustafsson はラットに DHCA (33) を投与し、その代謝物としてその 6β 位に水酸基をもつ $3\alpha, 6\beta, 7\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholestanoic acid を得ているので、少なくともラット肝の 6β -水酸化酵素は、 C_{24} 胆汁酸のみならず C_{27} 胆汁酸も基質とすることができるようである⁴⁹⁾。manatee 胆汁中には、 6 位に水酸基を有するペンタヒドロキシ胆汁アルコールとして α -trichechol (31) の他に β -及び ω -trichechols (36, 37) が見出されている。後二者についてはまだ化学合成品との直接比較による同定はおこなわれていないものの、本研究の結果、 α -trichechol (31) の構造が $^1\text{H-NMR}$ などでの推定どおりに確定した以上、 β -及び ω -trichechols (36, 37) も推定どおり、 β -及び ω -MC (6, 7) と同じ母核構造をもつ α -trichechol (31) の異性体であるとしてよいだろう。そして manatee における β -trichechol (36) の生合成機序もラットにおける β -MC (6) の生成機序と同様であると考えてよからう。即ち α -trichechol (31) の 7α -水酸基が 7 -ケト基を經由して 7β -水酸基に反転されて β -trichechol (36) となるものである。manatee における ω -trichechol (37) はラットにおける太田経路による ω -MC (7)

Table 3. Biliary bile alcohol composition of the manatee

本文中番号	水酸基の位置	平均 (n=7)%
(34)	3 α , 6 β , 7 α , 26	3.2
(31)	3 α , 6 β , 7 α , 25, 26 (α -Trichechol)	55.0
(35)	3 α , 7 α , 25, 26	24.7
(36)	3 α , 6 β , 7 β , 25, 26 (β -Trichechol)	13.0
(37)	3 α , 6 α , 7 β , 25, 26 (ω -Trichechol)	4.1

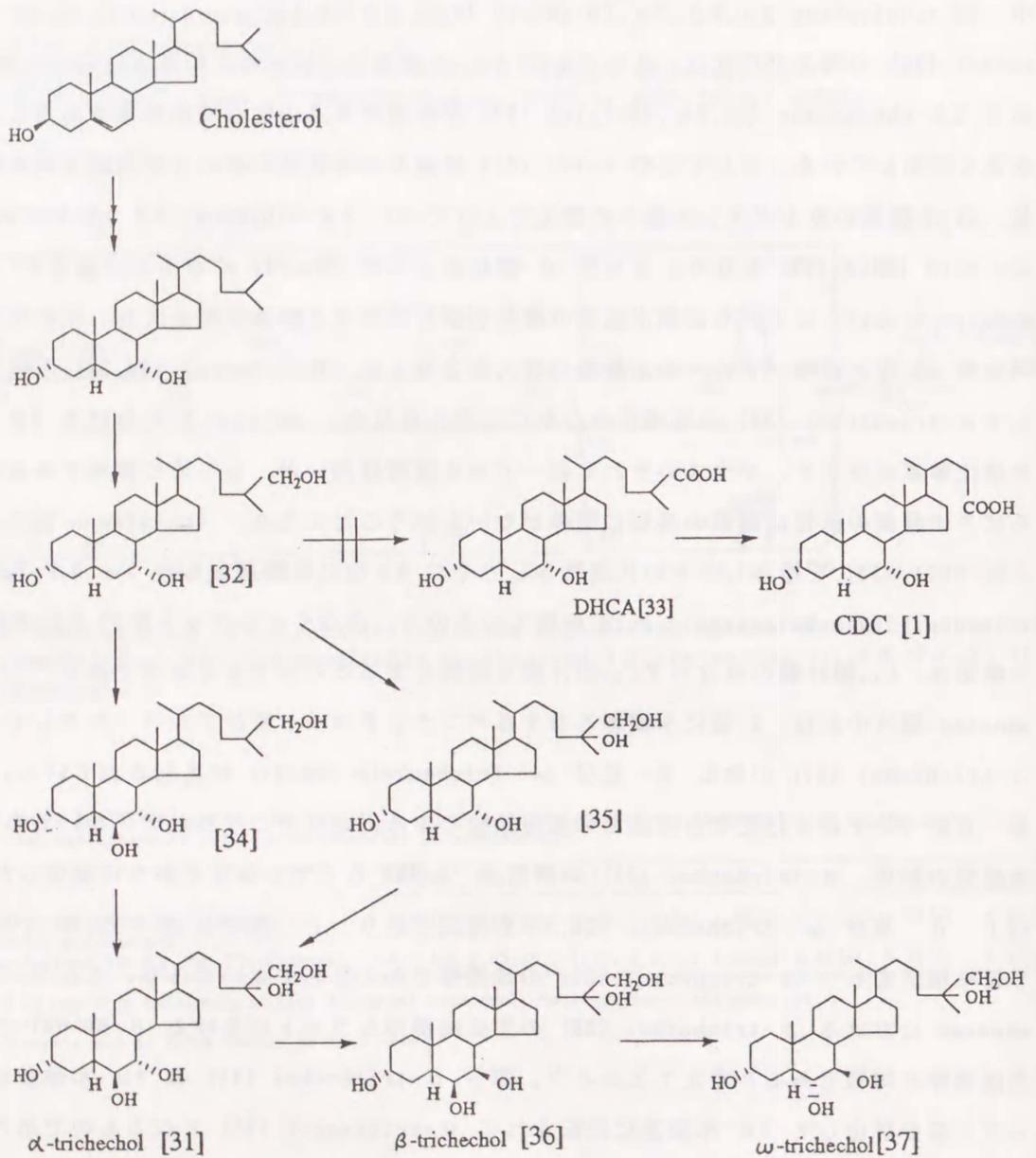


Fig. 11. West Indian manatee における胆汁アルコールの生合成経路

の生成と同様の経路、即ち腸内細菌による 7 β -水酸基の脱離反応を含む経路によって、 β -trichechol (36) から生成したものと考えることができる。しかしここで manatee の胆汁アルコール組成と、ラットの胆汁酸組成との間に大きな相違のあることに注目する必要がある。それは ラット体内では 7-水酸基をもたないデオキシコール酸、LC (11) や HDC (4) が生成存在しているのに対し、manatee 胆汁中に見出された胆汁アルコールはその全てが 7-水酸基を有しているということである。ラットにおける 7位の水酸基をもたない胆汁酸は、対応する 7-水酸化胆汁酸から腸内細菌による代謝によって生じたものであることは確定している。これに対し manatee 胆汁に、7位に水酸基をもたない胆汁アルコールが存在しないのは何故であろうか？ 一般的に海産動物の胆汁中には 7-水酸基をもたない胆汁酸は殆ど存在していない。これは海産動物の腸内細菌叢が、陸棲動物のそれと異なり 7-脱水酸基反応をおこなう細菌がいないためか、または腸内で 7-水酸基の脱離反応をうけて生じた胆汁酸が、再吸収されて肝に達したとき直ちに 7-水酸化反応をうけてしまうかのいずれかであると考えられる。例えば、ウナギは胆汁主成分がコール酸 (2) であるのにその 7 α -脱水酸基反応成績体、デオキシコール酸を欠いている。Hirofuji はウナギにおいてはデオキシコール酸の 7 α -水酸化によるコール酸 (2) への変換がおこらないことを明らかにし、従ってウナギ腸内にはコール酸 (2) の 7 α -水酸基脱離反応をおこなってデオキシコール酸に代謝する腸内細菌がいないのであろうと推定している⁵⁰⁾。7位の水酸基のない胆汁アルコールを欠いている manatee の腸内にもウナギと同様に、7-脱水酸基反応をおこなう腸内細菌が生育していないのかもしれない。そうであるとする manatee における ω -trichechol (37) の生合成経路はラットにおける ω -MC (7) のそれとは全く異なるものであるということになるが、では腸内細菌の関与なしに ω -trichechol (37) がどのような経路で生合成されるのか？ それは現時点ではまだわからない。しかし、この第1章に記述した研究の目的は、manatee における全ての胆汁アルコールの生成経路を細部にいたるまで解明してゆくことではない。ラット、ブタとは全く異なる哺乳類の一種、manatee が6位に水酸基を有する胆汁アルコールを胆汁主成分としている。そのことを化学合成品との比較により確認することがこの章に記述した研究の主目的であり、それが確認された現時点では、manatee における 6-水酸化胆汁アルコール存在の生物学的意義について以下の考察を付け加えるなら充分であろう。manatee の主胆汁塩が、哺乳類であるにもかかわらず胆汁アルコール硫酸エステルであったということ自体、胆汁塩の比較生

学にとって極めて重要な新発見である。この発見により胆汁アルコールは、従来の魚類、両生類に限定されていたその分布を一気に哺乳類にまで拡張した。両生類においてはコレステロール代謝の主経路であった胆汁アルコール生合成系は、爬虫類、鳥類、哺乳類においては新しく獲得された胆汁酸生合成系にその主役は譲ったものの、全く消失してしまっただけではなく、ときには manatee のように胆汁アルコールを胆汁主成分として産生する動物も存在しているということが判明した。これは硬骨魚類の大部分が C_{24} 胆汁酸を胆汁主成分とするのに、ときに C_{27} 胆汁アルコールを胆汁主成分とする魚類、例えばコイなどが現存しているということと全く同じことである。哺乳類において、胆汁アルコール生成系が全く失なわれたわけではないことは、ヒトにおいて極少量の胆汁アルコールが健常時にも産生され、胆汁^{51, 52)}、尿⁵³⁻⁵⁸⁾などのなかに常在しているという事実からも明らかである。一種の動物種のなかで胆汁アルコールと胆汁酸の両者が共存しているものがあることは早くから知られていたが、現時点では全ての動物種が胆汁アルコール、胆汁酸の両者を産生しており、動物種間の相違はどちらをどれほど多く産生しているかということ、即ち酵素系の存否ではなく、活性の強度の相違であるという方が正しいであろう。6位に水酸基を有する胆汁塩の存在する動物種にしても、今までのように種属特異的にブタとラット、マウスに限って 6-水酸化酵素が存在していると考えられるのではなく、第2章、第3章でのべるようにヒト肝にも 6-水酸化酵素活性が存在していることからわかるように、全ての動物の肝に 6-水酸化酵素活性は存在し、ただ特定の動物において<種属特異的>にその活性が高いことがあり、その動物ではより多くの 6-水酸化生成体が産生されていると考える方が正しいようである。

以上のことが manatee における 6-水酸化胆汁アルコールの存在確認より考察できるのである。

第 2 章 6 位に水酸基を有する C₂₇胆汁酸

ヒトの主胆汁塩はコール酸 (2)、CDC (1) といった C₂₄胆汁酸である。しかし、生合成経路に異常があると中間体的化合物が蓄積する。即ち、26-水酸化酵素の欠損した cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) の患者では胆汁アルコールが蓄積し、またコレステロール側鎖の β 酸化酵素系に障害のある Zellweger's syndrome の患者では C₂₇胆汁酸が蓄積する。Zellweger's syndrome ではペルオキシソームを先天的に欠損しており、極めて重篤な常染色体劣性遺伝疾患で、生後ほぼ1年で死亡する。症状は出生直後から神経症状、高い額、肝臓腫大、肝機能低下などを認める。脳内は肉眼、顕微鏡下ともに欠陥がみられ、腎皮質には小嚢胞がみられる。ペルオキシソームは極長鎖脂肪酸の β 酸化、胆汁酸生成時のコレステロール側鎖の酸化切断、プラスマローゲン生成などの役割をもっているため、生化学的には、極長鎖脂肪酸の蓄積、ジカルボン酸の増加、ピベコリン酸の蓄積、そして C₂₄胆汁酸の減少とその前駆体である C₂₇胆汁酸の蓄積が認められる⁵⁷⁾。

Zellweger's syndrome 患者の尿中、血清中の胆汁酸を調べた従来の研究より、最も多量に蓄積している C₂₇胆汁酸は 3α,7α,12α-trihydroxy-5β-cholestanoic acid (THCA) (38) であり^{46,58-60)}、このほかに、3α,7α-dihydroxy-5β-cholestanoic acid (DHCA) (33)、及び THCA (38) がさらに水酸化された 1β,3α,7α,12α-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid (39)⁴⁷⁾、3α,7α,12α,22-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid (40)⁶¹⁾、3α,7α,12α,23-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid (41)⁶¹⁾、3α,7α,12α,24-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid (42)⁴⁶⁾、3α,7α,12α,26-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid (43)⁴⁷⁾の存在が報告されている。これら水酸化 THCA の一つとして 3α,6α,7α,12α-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid (44) と考えられる C₂₇胆汁酸の存在が指摘されているが、まだ確実に同定されていない^{46,47)}。そこで 3α,6α,7α,12α-tetrahydroxy-5β-cholestanoic acid (TeHCA) (44) を化学合成し、それを Zellweger's syndrome 患者に見出される胆汁酸と比較同定した。

[結果]

$3\alpha,6\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid (TeHCA) (44) を Fig. 12. に示す経路により合成した。コール酸 (2) を NBS 酸化して7-ケトデオキシコール酸 (45) とし、これをエチルエステル-アセタート (46) とした後、酢酸中で臭素と処理し6-ブロム体 (47) を得、この 47 を室温下に希アルカリで処理して 48 とし、メチルエステル (49) としてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製、この 49 の7位のケト基を NaBH_4 で還元後メタノール中でアルカリ加水分解して 12α -ヒドロキシヒオコール酸 (12α -OH-HC) (51) を得た。この 51 の四個の水酸基を全てアセチル化して保護した後、クロロ炭酸エチルを反応させて酸無水物にし、これに直接 NaBH_4 を加え還元し 24-アルコール (53) とし、次にこれをピリジニウムクロクロメイトで酸化してアルデヒド (54) とし、これに (carbethoxyethylidene)triphenylphosphorane を Wittig 反応で縮合し、生成物をアルカリ加水分解して $3\alpha,6\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholest-24-enoic acid (55) を得た。この Δ^{24} 酸を白金触媒のもとに接触還元し目的物質である TeHCA (44) を得た。

こうして調製した 12α -OH-HC (51) と TeHCA (44) の6位、7位の水酸基の配置については、それらの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、GC-MS を他の 6α -もしくは 6β -水酸基を持つ化合物と比較することにより確定した。 $^1\text{H-NMR}$ の結果を Table 4. に示す。19- CH_3 のシグナルは 12α -OH-HC (51) で 0.97 ppm、TeHCA (44) で 1.04 ppm であるが、この値は 6α -水酸基をもつ胆汁酸の 19- CH_3 のシグナルに近似し (HC (3) 0.98 ppm, HDC (4) 0.91 ppm, ω -MC (7) 0.99 ppm)、 6β -水酸基をもつ胆汁酸の 19- CH_3 のシグナル (MDC (10) 1.41 ppm, α -MC (5) 1.53 ppm, β -MC (6) 1.43 ppm) とは大きく異なっている。なお 12α -水酸基の存否は 19- CH_3 のシグナルに殆ど影響しないことがわかっている。(コール酸 (2) 0.93 ppm, CDC (1) 0.96 ppm)

次に Table 5. に GC-MS の結果を示す。6,7位に水酸基をもつ化合物のうち、 7β -水酸基をもつ β -MC (6)、 ω -MC (7) のマススペクトルは 7α -水酸基をもつ α -MC (5)、HC (3) のそれと著しく異なる。ここで合成した 12α -OH-HC (51) とTeHCA (44) のマススペクトルには、いずれも 7β -水酸基をもつ胆汁酸に特徴的なフラグメントイオン (m/z 285,195) がみられないことから、7位の水酸基の配置は α であることがわかる。

Zellweger's syndrome 患者の尿を抽出、精製して得たテトラヒドロキシ胆汁酸分画のGLCのチャートを Fig. 13. に示す。ピーク 1. は GLC の RRT とマススペクトルと

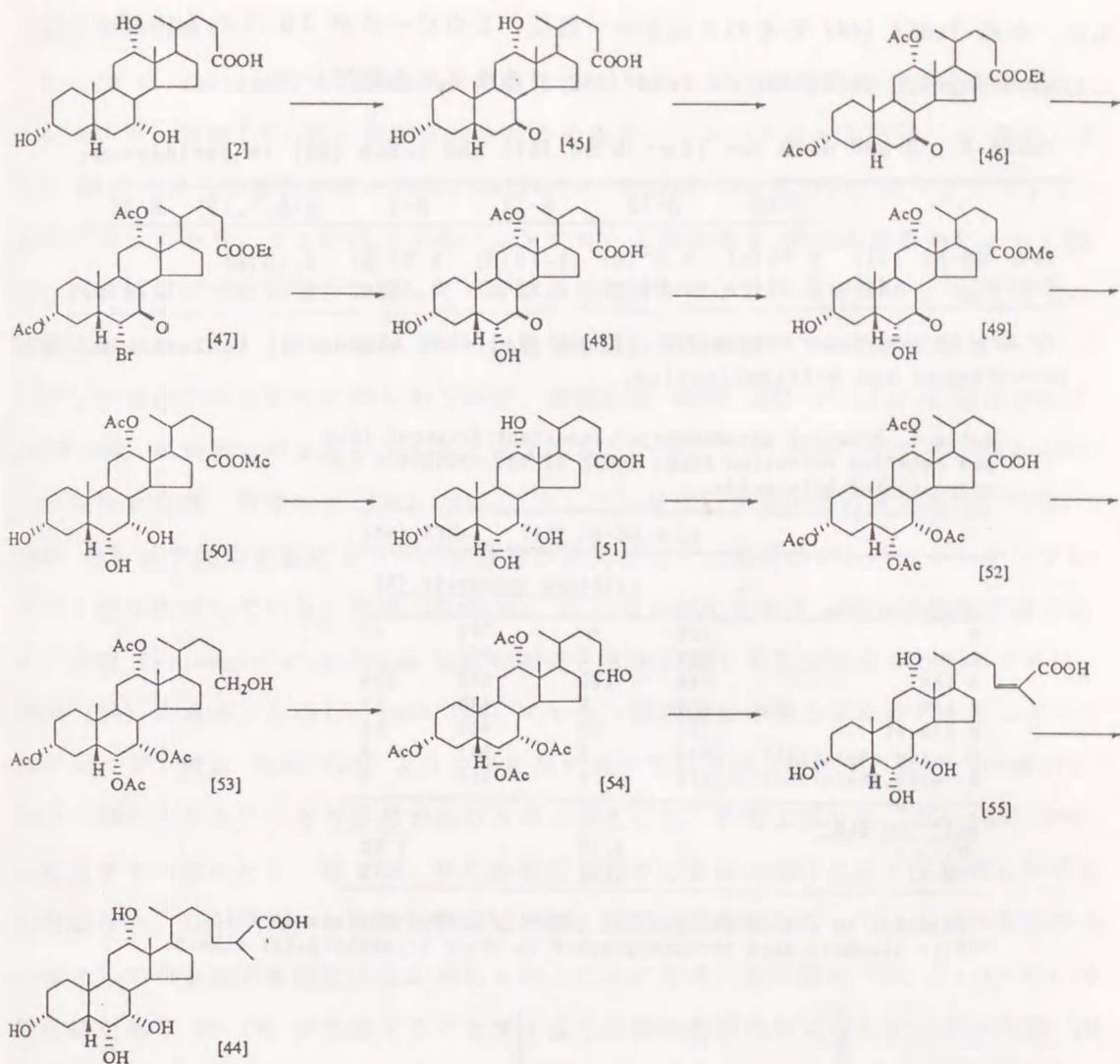


Fig.12. Synthesis of 12 α -OH-HC (51), and TeHCA (44).

2. コール酸

45. 3 α ,12 α -Dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid
46. Ethyl 3 α ,12 α -diacetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate
47. Ethyl 6 α -bromo-3 α ,12 α -diacetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate
48. 12 α -Acetoxy-3 α ,6 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid
49. Methyl 12 α -acetoxy-3 α ,6 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate
50. Methyl 12 α -acetoxy-3 α ,6 α ,7 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oate
51. 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid
52. 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetraacetoxy-5 β -cholan-24-oic acid
53. 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetraacetoxy-5 β -cholan-24-ol
54. 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetraacetoxy-5 β -cholan-24-al
55. 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholest-24-en-26-oic acid
44. 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholestan-26-oic acid

もに、合成 TeHCA (44) のそれと完全に一致し、このピークが $3\alpha,6\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid (44) であることを確定した。

Table 4. $^1\text{H-NMR}$ data for 12α -OH-HC (51) and TeHCA (44) in pyridine- d_5 .

	H-18	H-19	H-21	H-3	H-6,7,12	H-27
12α -OH-HC (51)	0.76 (s)	0.97 (s)	1.19 (d)	3.67 (m)	4.15 (m)	
TeHCA (44)	0.81 (s)	1.04 (s)	1.22 (d)	3.76 (m)	4.27 (m)	1.34 (d)

δ are in ppm from tetramethylsilane (internal standard). Contents in parentheses are multiplicities.

Table 5. Relative abundances of important fragment ions and relative retention times (RRT) of the synthetic 6α -hydroxylated bile acids.

Fragment ions	12α -OH-HC (51)		TeHCA (44)	
	m/z	relative intensity (%)	m/z	relative intensity (%)
M	726	—	768	—
M-90	636	2	678	—
M-180	546	100	588	100
M-270	456	6	498	11
M-270-89	367	19	409	12
M-(side chain+270)	341	4	341	4
M-(side chain+360)	251	4	251	3
RRT ^{a)} on GLC ^{b)}				
OV-1		1.17		1.92
OV-17		1.06		1.77

^{a)}Relative to the trimethylsilyl ether of methyl cholate (1.00).

^{b)}Bile alcohols were chromatographed as their trimethylsilyl ethers.

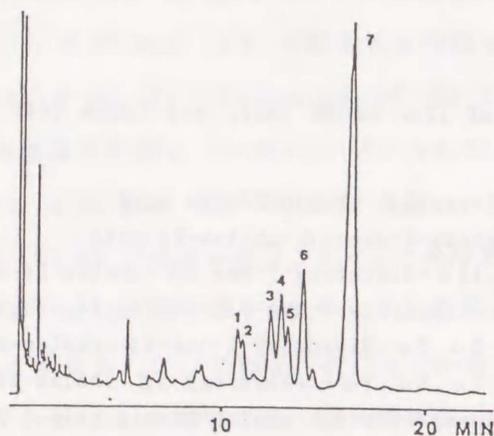


Fig. 13. Gas chromatogram of TMS ether derivatives of methyl cholestanates isolated from the urine of an infant with Zellweger's syndrome.

An OV-1 capillary column (25 m x 0.25 mm) was employed; column temperature, 280 °C.

1. $3\alpha,6\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid (44); 2. unknown tetrahydroxycholestanoic acid; 3. unknown tetrahydroxycholestanoic acid; 4. (24R and/or 24S,25S)- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid; 5. (24R and/or 24S,25R)- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid; 6. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholestano-26,23-lactone; 7. $3\alpha,7\alpha,12\alpha,26$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid.

[生化学的考察]

Fig. 14. に Zellweger's syndrome 患者に蓄積される C_{27} 胆汁酸の生合成経路を示す。コレステロールから C_{24} 胆汁酸が生成される過程で、コレステロール側鎖は ω -酸化に続く β -酸化によって酸化切断される。Zellweger's syndrome においてはペルオキシソームが欠損しており、ここに所在するコレステロール側鎖の β -酸化の酵素系によって触媒される反応がおこらない。従ってヒトにおけるコレステロール側鎖の ω -酸化までの成績体である THCA (38), DHCA (33) が蓄積する。前者に比べて後者の蓄積は少なく、しばしば蓄積のみられない例もあるのは、蓄積した DHCA (33) が 12α -水酸化されて THCA (38) に変換されるからであると考えられている。この DHCA (33) の THCA (38) への変換と同様、蓄積した THCA (38) を少しでも排泄しやすい形にするため、THCA (38) の母核や側鎖に更にもう一つ水酸基が導入されて、各種のテトラヒドロキシコレスタン酸が生成している。勿論 THCA (38) はそのままでも胆汁、尿中に排泄可能であり、実際 Zellweger's syndrome 患者の胆汁、尿中に最も多量に排泄されているのは THCA (38) である。しかし、THCA (38) にもう一個水酸基の導入されたテトラヒドロキシコレスタン酸は THCA (38) よりも更に高い親水性を有し、胆汁中、尿中への排出は THCA (38) よりもいっそう容易であるものと考えられ、肝で生成した THCA (38) がその排出までの間にその一部でも、更に水酸化されることは、生体にとって好ましいことに相違ない。THCA (38) の水酸化部位は母核、側鎖の各所にわたっているが、その中の一つとして 6α 位の水酸化反応があるということになる。ヒト肝に CDC (1) の 6α -水酸化能があり HC (3) が生成することはかなり以前から知られていたが、コール酸 (2) が 6α -水酸化して $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid (12α -OH-HC) (51) を生成するという反応もヒト肝で行なわれうるということは、第3章に記述する研究結果によってようやく判明したところである。ここではコール酸母核をもった C_{27} 胆汁酸、THCA (38) もまたヒト肝において 6α -水酸化されうるということを確認することができた。

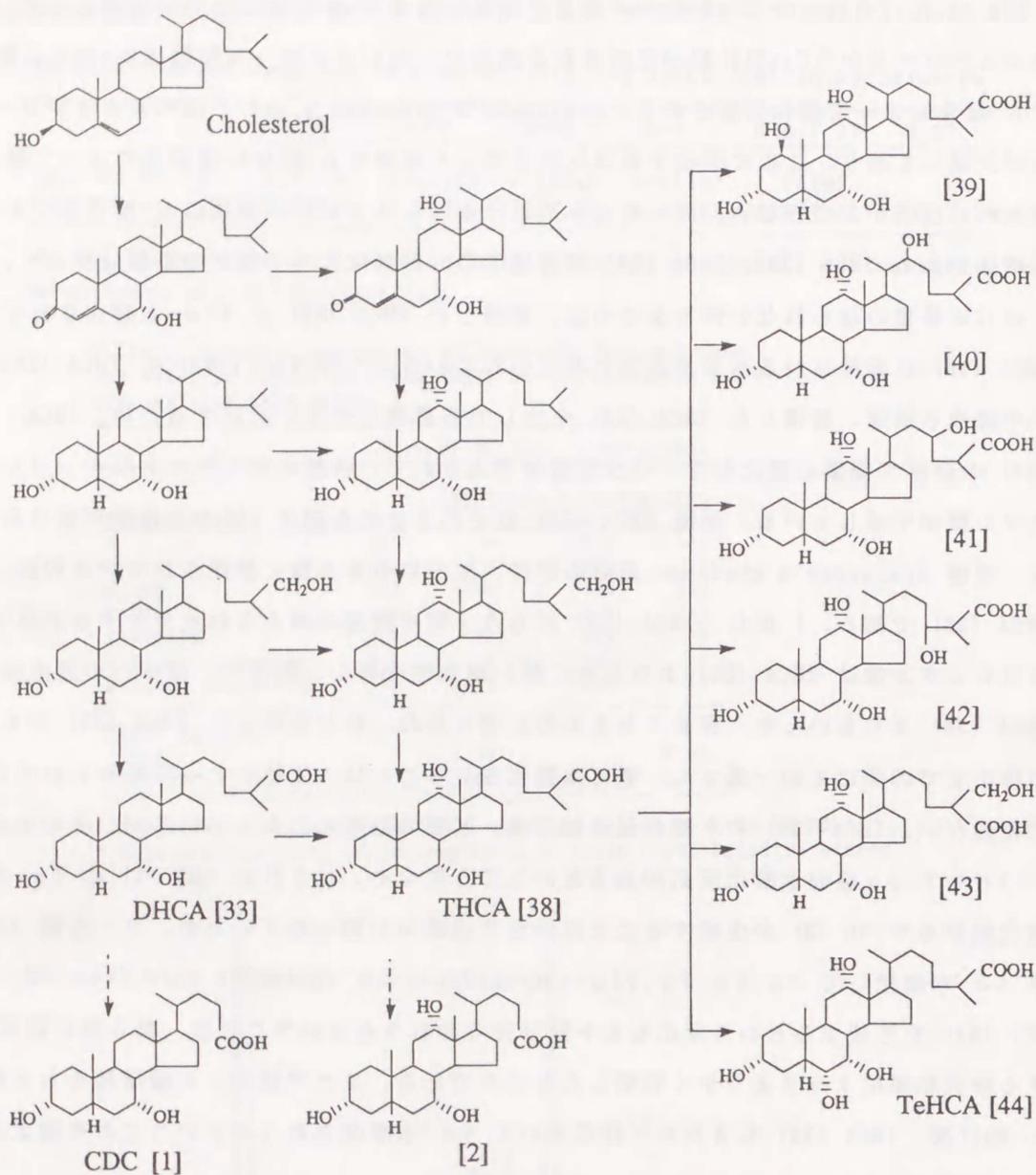


Fig. 14. Zellweger's syndrome患者におけるC₂₇胆汁酸の生合成経路

第3章 6位に水酸基を有するC₂₄胆汁酸

1976年、Summerfield が胆汁うっ滞を伴う肝疾患患者の尿中に 6-水酸基を有する胆汁酸、HDC (4)、HC (3) の存在を明らかにした³⁸⁾のを皮切りに、その後の胆汁酸微量分析法の進歩に伴ない、肝疾患患者だけでなく健常人尿中にも HDC (4)、HC (3)³⁷⁻⁴⁰⁾が存在することが明らかにされた。更に胆汁うっ滞を伴う肝疾患患者の尿中には HDC (4)、HC (3)^{37-39, 62-71)}の他に、6-水酸基を有する胆汁酸として、MDC (10)^{37, 62-64)}、 $3\alpha, 6\alpha, 12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid^{62, 63)}、 $3\alpha, 6\beta, 12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid^{37, 62-64)}、及び $3, 6, 7, 12$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid と推定されるテトラヒドロキシ酸^{37, 62-66)}等が見出された。また尿以外の体液からも 6-水酸化胆汁酸が次々と発見された。即ち胆汁うっ滞のある妊婦の血清中^{37, 67)}に HC (3) と MDC (10)、肝臓病患者血清中⁶⁷⁾に HC (3) と $3\alpha, 6\beta, 12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid がそれぞれ検出されている。また胎児、新生児に関しては、1980年に胎便中に HC (3)⁴¹⁾が、1982年には新生児の生後 24時間尿中⁴²⁾に $2, 3, 6, 7$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid、 $3, 6, 7, 12$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid が、また妊娠初期の胎児の胆嚢胆汁⁴³⁾から HC (3)、 $3, 6, 7, 12$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid の存在がそれぞれ GC-MS の結果から推定された。1988年には Setchell らが同じく胎児の胆嚢胆汁⁴⁴⁾を分析し HDC (4)、HC (3)、 $3\alpha, 6\alpha, 12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholanoic acid、及び $3, 6, 7, 12$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid と $3, 6, 7, X$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid と推定される 6-水酸化胆汁酸の存在が報告された。同じ年、Shoda らは臍帯血、羊水、それに胆汁うっ滞を伴う肝臓病患者の血清、尿を GLC, GC-MS を用いて調べたところ⁴⁵⁾、臍帯血には14種、羊水には11種、血清には15種、尿には 12種のヒトの主胆汁酸とは異なる胆汁酸が見つかった。そのうち3種類は $3, 6, 7, 12$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acids と推定された。それらの化学構造を確定することは新生児期、及び病態時における胆汁酸代謝を明らかにするためにも重要である。本研究ではそれらテトラヒドロキシ酸の構造確定のため第2章で化学合成した $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid (12α -OH-HC) (51) に加えて、 $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid (12α -OH- α -MC) (63) と、 $3\alpha, 6\beta, 7\beta, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid (12α -OH- β -MC) (65) とを化学合成し、ヒト体液中に存在する天然胆汁酸と比較同定を行なった。

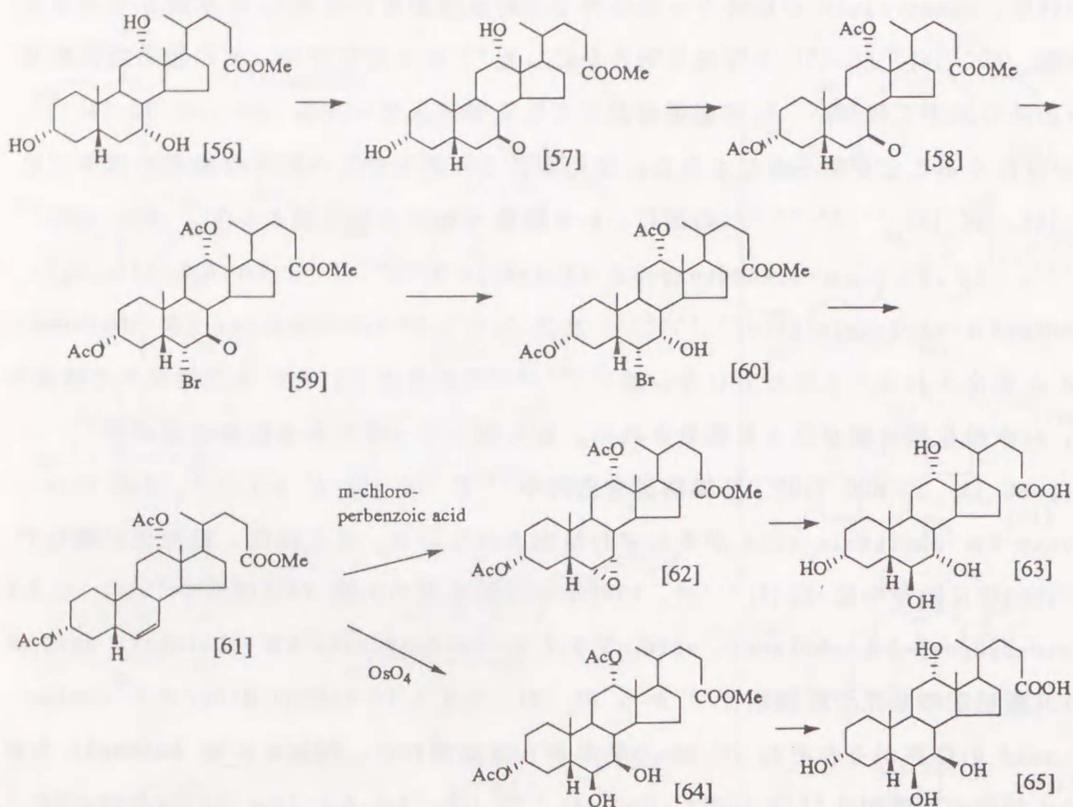


Fig.15. Syntheses of 12α -OH- α -MC (63), and 12α -OH- β -MC (65).

56. コール酸メチル

57. Methyl $3\alpha, 12\alpha$ -dihydroxy-7-oxo- 5β -cholan-24-oate

58. Methyl $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy-7-oxo- 5β -cholan-24-oate

59. Methyl 6α -bromo- $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy-7-oxo- 5β -cholan-24-oate

60. Methyl 6α -bromo- $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy-7 α -hydroxy- 5β -cholan-24-oate

61. Methyl $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy- 5β -chol-6-en-24-oate

62. Methyl $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy- $6\alpha, 7\alpha$ -epoxy- 5β -cholan-24-oate

63. $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 12\alpha$ -Tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acid

64. Methyl $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy- $6\beta, 7\beta$ -dihydroxy- 5β -cholan-24-oate

65. $3\alpha, 6\beta, 7\beta, 12\alpha$ -Tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acid

[結果]

ヒト体液中に存在する三種の 3,6,7,12-tetrahydroxy-5 β -cholanoic acids と推定されている胆汁酸の構造を決定するため前節で合成した 12 α -OH-HC (51) に加えて、12 α -ヒドロキシ- α -ムリコール酸 (12 α -OH- α -MC) (63) と、12 α -ヒドロキシ- β -ムリコール酸 (12 α -OH- β -MC) (65) を Fig.15. に示す経路で合成した。コール酸メチル (56) から NBS を用いて methyl 3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholanoate (57) を調製し、第1章に述べた 7-KLC (14) から 3 α -acetoxy-5 β -chol-6-enoic acid (18) への変換とおなじ方法により、57 から methyl 3 α ,12 α -diacetoxy-5 β -chol-6-en-olate (61) を調製、*m*-クロロ過安息香酸を用い Δ^6 二重結合を 6 α ,7 α -エポキシ化して 62 を得、これを酢酸と処理後、アルカリ加水分解して 12 α -OH- α -MC (63) を得た。12 α -OH- β -MC (65) は同じく 61 を四酸化オスミウム酸化後、アルカリ加水分解して調製した。

こうして化学合成した 12 α -OH- α -MC (63) と 12 α -OH- β -MC (65) の構造確認は ¹H-NMR、GC-MS を用いて行なった。これら二つの胆汁酸の ¹H-NMR の結果を Table 6. に示す。19-CH₃ のシグナルは 1.06, 1.08 ppm と低磁場にあり、このことは母核の 6 β 位に水酸基が存在することを示唆している。また 12 α -OH- α -MC (63) と 12 α -OH- β -MC (65) の 3 β -H のシグナルはそれぞれ 3.38 ppm と 3.48 ppm であって、7 α -水酸化体と 7 β -水酸化体との間に 0.10 ppm の差がある。この差は同じく 7-水酸基に関するエピマーである CDC (1) と UDC での 3 β -H のシグナルの差と一致する。また、12 α -OH- α -MC (63) と 12 α -OH- β -MC (65) の 7 β -H のシグナル (3.65 ppm) と 7 α -H のシグナル (3.48 ppm) もそれぞれ CDC (1) と UDC での 7 β -H (3.80 ppm)、7 α -H (3.49 ppm) のシグナルの差と一致する。また 12 α -OH- α -MC (63) のスペクトルだけに認められる 2.21 ppm のシグナルはコール酸 (2) のような 7 α 位と 12 α 位両方に水酸基を持つ化合物に特徴的であり、9 α -H と assign されている。この 9 α -H のシグナルは 7 α -水酸基と 12 α -水酸基の何れかを欠く場合には、1.39-1.89 ppm に出現する。

これら二つのテトラヒドロキシ酸のマススペクトルを Fig.16. に示す。両スペクトルには M⁺ m/z 726 から TMSOH (90) が順次脱離して生じた一連のフラグメント m/z 636, 546, 456, 366 が認められる。また 12 α -OH- β -MC (65) のスペクトルには base peak として 6位 と 7位 及び 9位 と 10位 の間が切れて生じた m/z 285、及びそれ

から TMSOH (90) の一個脱離して生じた m/z 195 のフラグメントが認められる。12 α -OH- β -MC (65) の 12 位の水酸基のない誘導体、即ち β -MC (6) においてもこの m/z 285, 195 のフラグメントは特徴的に認められる。12 α -OH- α -MC (63) のスペクトルの base peak は m/z 341 であって、これは側鎖と三個の母核の TMSO 基が脱離して生じたフラグメントである。側鎖と母核の TMSO 基の全部を失って生じたフラグメントは m/z 251 に認められ、これは母核に三個の TMSO 基しかない α -MC (5) の base peak、 m/z 253 と対応している。

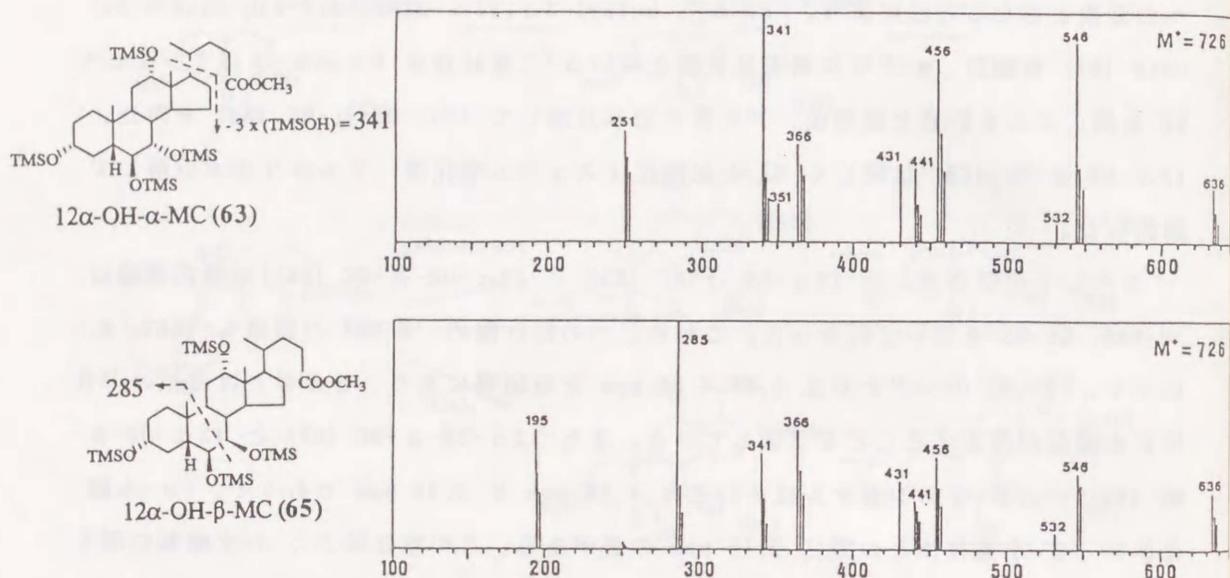


Fig.16. Mass spectra of trimethylsilyl ether derivatives of 12 α -OH- α -MC (63) (top), and 12 α -OH- β -MC (65) (bottom).

Table 6. $^1\text{H-NMR}$ data for 12 α -OH- α -MC (63) and 12 α -OH- β -MC (65) in methanol- d_4 .

	H-18	H-19	H-21	H-3	H-6,7	H-12
12 α -OH- α -MC (63)	0.74 (s)	1.06 (s)	1.02 (d)	3.38 (m)	3.65 (m)	3.96 (m)
	H-18	H-19	H-21	H-3,7	H-6	H-12
12 α -OH- β -MC (65)	0.74 (s)	1.08 (s)	1.02 (d)	3.48 (m)	3.58 (m)	3.96 (m)

δ are in ppm from tetramethylsilane (internal standard). Contents in parentheses are multiplicities.

以上の $^1\text{H-NMR}$ 及び GC-MS のデータから合成品 63 は 3 α ,6 β ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholanoic acid、合成品 65 は 3 α ,6 β ,7 β ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholanoic acid であることが確認された。

Fig. 17. にヒト羊水中の胆汁酸の典型的なガスクロマトグラムを示す。RRT と GC-MS による分析から A-K の各ピークは図中に示すような胆汁酸であると特定されたが、その中でピーク G, H, 及び J はそれぞれ合成した 12α -OH- α -MC (63)、 12α -OH- β -MC (65)、 12α -OH-HC (51) と RT もマススペクトルも完全に一致し、これらテトラヒドロキシコラン酸が胎児体内で産生されていることを確定することができた。即ちヒト肝にはコール酸 (2) の 6α 位及び 6β 位を水酸化する酵素活性があって、コール酸 (2) の一部は 12α -OH-HC (51)、 12α -OH- α -MC (63) に変換され、更にラット、マウスそして manatee の肝で行なわれている 7α -水酸基の 7β -水酸基への反転がヒトの肝でも行なわれ、 12α -OH- α -MC (63) より 12α -OH- β -MC (65) が生成したものであろう (Fig. 18.)。

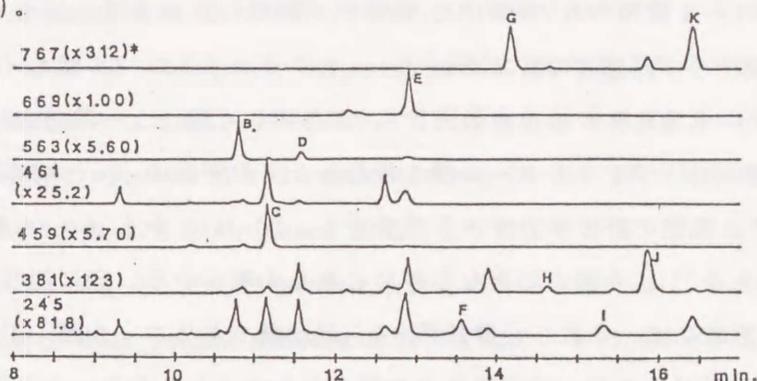


Fig. 17. Selected-ion recordings of bile acids in an amniotic fluid. Peaks A-K were identified as follows; A, lithocholic acid; B, deoxycholic acid; C, chenodeoxycholic acid; D, ursodeoxycholic acid; E, cholic acid; F, 1,3,12-trihydroxy- 5β -cholan-24-oic acid; G, 12α -OH- α -MC (63); H, 12α -OH- β -MC (65); I, 1,3,7-trihydroxy- 5β -cholan-24-oic acid; J, 12α -OH-HC (51); K, 1,3,7,12-tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acid; respectively. *:The number indicates the mass number selected and the number in parentheses indicates the magnification.

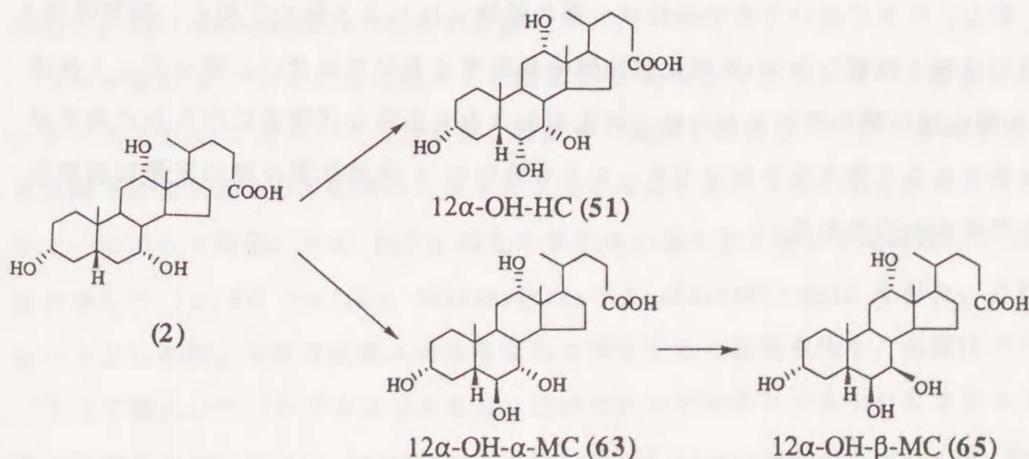


Fig. 18. ヒトにおける 3,6,7,12-テトラヒドロキシ C_{24} 胆汁酸の生合成経路

[生化学的考察]

本研究はヒト羊水中の 6-水酸化胆汁酸についてのみ合成品と直接に比較同定したが、肝疾患患者尿中などに認められるテトラヒドロキシコラン酸も、その GC-MS 上の挙動よりみて今回合成した三種の 6-水酸化 C_{24} 胆汁酸に相違なく、ヒト肝の 6 α -及び 6 β -水酸化酵素活性は胎児期、新生児期のみならず成人期にも活性は若干弱くなるのかもしれないが保存されていることに疑いはない。また胆管結さつラットでは肝ミクロソーム画分の 6 β -水酸化能が亢進するという報告があるように⁷²⁾、胆汁うっ滞のないヒトの肝ホモジネートとタウロデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、タウロリトコール酸、LC (11)、3-oxo-5 β -cholanoic acid をインキュベートしたところ、極少量のタウロデオキシコール酸が 7 α -水酸化をうけてただけで 6-水酸化は全くおきていなかったが⁷³⁾、胆汁うっ滞患者の肝ミクロソームとタウロリトコール酸をインキュベートしたところ 6 α -水酸化体が検出された⁷⁴⁾。また同じく胆汁うっ滞患者にラベルの CDC (1)、コール酸 (2)、デオキシコール酸を投与し、それぞれの 6 α -水酸化体が尿に回収されている⁷⁵⁾。胎児の肝ミクロソーム画分でも、LC (11) から 6 α -水酸化体ができたという報告がある⁷⁶⁾。今回の結果ならびにこれらの報告から、肝に胆汁酸が長く貯留するような病態時には、これらの酵素系と C_{24} 胆汁酸であるコール酸 (2)、CDC (1)、デオキシコール酸などがより長い時間接触する機会をもつこととなり、より多くの 6-水酸化胆汁酸が産生されたものと理解される。

いずれにせよ、第 1 章の考察でも述べたように、6-水酸化酵素は一部の動物にのみ局在する特殊な酵素系ではなく、ヒトを含めて全ての動物肝に所在するものであると考えられる。但し、ヒトにおいてその活性は一部の動物と比べると極めて弱く、健常時成人の体液中では極く微量しか 6-水酸化胆汁酸を見出すことはできない。従ってヒト体液中の 6-水酸化胆汁酸が増加するのは、幼生期を含めて正常な代謝系に何らかの異常があったときであると考えることができ、ヒト体液中の 6-水酸化胆汁酸の定量は病態鑑別に利用できるものである。

終章 要約

1. 5β -cholestane- $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 25, 26$ -pentolの合成

ケノデオキシコール酸を低温下にクロム酸酸化して 7-ケトリトコール酸とし、これをメチルエステル-アセタートとした後に酢酸中で臭素と処理して6-ブロム体とし、これの 7位のケト基を NaBH_4 で還元し、酢酸中亜鉛と処理後、アルカリ加水分解して 3α -hydroxy- 5β -chol-6-enoic acid を得た。これの 3α -水酸基をホルミル化して保護した後、Arndt-Eistert 反応により側鎖炭素の一個延長された 3α -hydroxy-25-homo- 5β -chol-6-en-25-oic acid を得た。これをメチルエステル化後、*m*-クロロ過安息香酸酸化して 6,7-epoxide とし、酢酸と処理後、アルカリ加水分解して $3\alpha, 6\beta, 7\alpha$ -tri-hydroxy-25-homo- 5β -cholan-25-oic acid を得た。これをアセタートにし 塩化チオニル処理で酸塩化物とした後、ジアゾメタンと反応させてジアゾケトン体を得た。次にこれを酢酸と処理し $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 26$ -tetraacetoxy-27-nor- 5β -cholestan-25-one とし、最後にこれと CH_3MgI とを Grignard 反応により縮合させて、最終目的物である 5β -cholestane- $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 25, 26$ -pentol を得た。

この合成品は West Indian manatee の胆汁主成分、 α -trichechol と TLC, GLC, GC-MS, $^1\text{H-NMR}$ の全てにおいて完全に一致し、その構造を 5β -cholestane- $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 25, 26$ -pentol と確定することができた。

2. $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid と $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid の合成

コール酸を *n*-ブromoこはく酸イミド酸化して 7-ケトデオキシコール酸とし、これをエチルエステル-アセタートとした後、酢酸中で臭素と処理し、6-ブロム体を得、これを室温下に希アルカリで処理後、メチルエステルとしてシリカゲルカラムクロマトグラフィによって精製、その 7-ケト基を水素化ホウ素ナトリウムで還元後、アルカリ加水分解して $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid を得た。これをアセタートとした後、クロロ炭酸エチルを反応させて生じた酸無水物を、水素化ホウ素ナトリウムで還元して 24-アルコールとし、次にこれをピリジニウムクロクロメイトで酸化して得たアルデヒドに (carbethoxyethylidene) triphenylphosphorane を Wittig 反応で縮合、アルカリ加水分解して $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholest-24-en-

oic acid を得た。この Δ^{24} 酸を白金触媒のもとに接触還元し目的物質である $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid を得た。

Zellweger's syndrome 患者の尿中 C_{27} 胆汁酸の一つはこの合成 C_{27} 胆汁酸とガスクロマトグラフィー上の挙動とマススペクトルが完全に一致し、その生成、存在を確定することができた。

3. $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid と $3\alpha, 6\beta, 7\beta, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid の合成

コール酸メチルを NBS 酸化により 7-ケト体にした後、1.と同じ方法により methyl $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy- 5β -chol-6-enoate を調製、その Δ^6 二重結合を *m*-クロロ過安息香酸を用いてエポキシ化し、これを酢酸と処理後、アルカリ加水分解して $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid を得た。 $3\alpha, 6\beta, 7\beta, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid は同じく methyl $3\alpha, 12\alpha$ -diacetoxy- 5β -chol-6-enoate を四酸化オスミウム酸化後、アルカリ加水分解して調製した。

羊水中胆汁酸と、これら二種の合成品と 2. で合成した $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholanoic acid とを直接に比較検討した結果、ヒト体液中にこれら三種の 6-水酸化 C_{24} 胆汁酸が存在していることを確認することができた。

4. 6-水酸化胆汁塩の生成と存在の意義

本研究において 6位に水酸基を有する胆汁アルコールと C_{27} 胆汁酸の存在を初めて確定することができ、またヒト体液中に 6位に水酸基をもつ三種のテトラヒドロキシ C_{24} 胆汁酸が常在しているという事実も明らかにすることができた。これらの結果より、6位に水酸基を有する胆汁塩は決して特定の動物に種属特異的に生成し存在するものではなく、むしろ 6-水酸化能はヒトを含めて全ての動物に広く分布存在するものであって、動物の種類、年齢、健康状態によって活性の強弱が異なるに過ぎないということを明らかにすることができた。

実験の部

Materials

コール酸 (2) 及び CDC (1) は、市販品を用いた。

Methods

融点 (mp)

柳本微量融点測定器を用い測定した。未補正である。

赤外吸収スペクトル (IR)

日本分光 model IR-408 spectrophotometer を用いて、KBr 錠剤法、ときにクロロホルム溶液で測定した。

^1H -核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$)

Hitachi model R-40 (90 MHz) または JEOL model GX-400 (400 MHz) を用い methanol- d_4 または pyridine- d_5 溶液で測定し、chemical shift は tetramethylsilane を内部標準とした δ 値 (ppm) で示した。

ガスクロマトグラフィー (GLC)

Shimadzu GC-6A gas chromatograph を用い、カラムは Gaschrom Q (80/100 mesh) に 1.5 % OV-1 または 3 % OV-17 または 3 % Poly I-110 をコーティングし、ガラスカラムに充填したものを使用した。胆汁酸のメチルエステル化はジアゾメタンを用いて行なった。この胆汁酸メチルエステルを pyridine 0.5 ml にとかし、hexamethyldisilazane 0.2 ml 及び trimethylchlorosilane 数滴を加え、室温に 1 時間放置して TMS 誘導体とし、溶媒留去後 n-hexane 0.5 ml に溶解して、GLC のサンプルとした。

ガスクロマトグラフィー マススペクトロメトリー (GC-MS)

Shimadzu QP-1000 gas chromatograph-mass spectrometer を用いて測定した。カラムは G-250 (40 m x 1.2 mm i.d., Chemicals Inspection and Testing Institute, Japan) を使用し、column temperature, 260-280 $^{\circ}\text{C}$, 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; ionizing voltage,

70 eV の条件で分析した。

元素分析

Yanaco CHNcorder MT-3 型を用いて測定した。

薄層クロマトグラフィー (TLC)

Precoated silica gel G plate (0.25 mm, Merck) を用い、発色は10 % リンモリブデン酸エタノール溶液を噴霧し加熱した。

カラムクロマトグラフィー

充填剤として silica gel 60 (70-230 mesh, Merck) をガラスカラムに充填したものと、及び市販の Lobar RP-18 (Merck) カラムを用いて行なった。

第1章に関する実験

3 α -Hydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid (14)

酢酸に溶かした CDC (1) (3.0 g) に、氷冷下で 80 % 酢酸 (5 ml) に溶解したクロム酸 (0.7 g) を滴下し、三時間攪拌後、水を加えて一晚放置した。生じた沈殿を濾取し、アセトン-水より再結晶して 3 α -hydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid (7-KLC) (14) (1.8 g) を得た。

mp: 197-198 °C (文献値 201-203 °C)⁷⁷⁾

Rf value 0.39 (ethyl acetate:iso-octane:acetic acid 10:10:2)

Methyl 3 α -acetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (15)

7-KLC (14) (13.0 g) を濃塩酸 (6 ml) を加えたメタノール (100 ml) に溶かし一晚室温で放置し、水で希釈後、エーテルで抽出し、エーテル層を水、5 % NaHCO₃、水と順次洗浄し、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。この残渣を無水酢酸 (5 ml)、ピリジン (5 ml) に溶かし、一晚室温放置した後、氷水で希釈し、析出した methyl 3 α -acetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (15) をアセトン-水で再結晶 (10 g) した。

mp: 140.5-141.0 °C (文献値 140-142 °C)⁷⁷⁾

Rf value 0.56 (ethyl acetate:acetone 7:3)

Methyl 3 α -acetoxy-6 α -bromo-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (16)

酢酸 (50 ml) に 15 (2.9 g)、HBr (0.3 ml) を溶かし、bromine (1.08 g) の酢酸 (10 ml) 溶液を滴下し、一時間放置後、氷水で希釈し、析出した結晶を濾取し、アセトン-水から再結晶して methyl 3 α -acetoxy-6 α -bromo-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (16) (2.8 g) を得た。

mp: 166.0-167.0 °C (文献値 166-168 °C)⁷⁷⁾

IR (cm⁻¹): 1730 (COOMe), 1705 (CO)

Methyl 3 α -acetoxy-6 α -bromo-7 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oate (17)

16 (2.8 g) をメタノール (200 ml) に溶かし、氷冷下に NaBH₄ (3.6 g) を少しずつ加え、室温で 45 分攪拌後、酢酸で酸性にし、減圧下に溶媒を留去して methyl 3 α -

acetoxy-6 α -bromo-7 α -hydroxy-5 β -chol-24-oate (17) の針状晶 2.5 g を得た。

mp: 150-152 °C (文献値 149-152 °C)⁷⁷⁾

Rf: 0.39 (benzene:ethyl acetate 9:1)

IR (cm⁻¹): 3500 (OH), 1730 (COOMe, OAc)

3 α -Hydroxy-5 β -chol-6-en-24-oic acid (19)

17 (3.9 g) を酢酸 (80 ml) に溶かし、亜鉛末 (4.0 g) を加え、1.5 時間還流後、濾過して亜鉛を除き、濾液を 500 ml の水に注いで、生じた沈殿をメタノールで再結晶し methyl 3 α -acetoxy-5 β -chol-6-en-24-oate (18) の結晶 3.7 g を得た。このメチルエステルアセタート (18) (3.0 g) を 5% メタノール性 KOH 100 ml で 30 分還流して加水分解し、水浴上でメタノールと水を交換後、室温まで冷却し、希塩酸で酸性にして、エーテルで抽出した。エーテル層は水洗、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。残渣をメタノールから再結晶して 3 α -hydroxy-5 β -chol-6-en-24-oic acid (19) (2.5 g) を得た。

mp: 207.5-208.0 °C (文献値 217 °C)⁷⁸⁾

Rf value: 0.23 (ethyl acetate:iso-octane:acetic acid 10:10:0.1)

IR (cm⁻¹): 3300 (OH), 1700 (COOH)

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.64 (3H, s, 18-CH₃), 0.91 (3H, s, 19-CH₃), 0.98 (3H, d, J=6.0 Hz, 21-CH₃), 3.87 (1H, m, 3-H), 5.49 (1H, d, J=9.9 Hz, 6-H), 5.65 (1H, ddd, J₁=9.9 Hz, J₂=4.7 Hz, J₃=2.6 Hz, 7-H)

3 α -Hydroxy-25-homo-5 β -cholest-6-en-25-oic acid (23)

3 α -hydroxy-5 β -chol-6-en-24-oic acid (19) (3.4 g) を蟻酸 60 ml に溶解し、55 °C、4 時間加熱後、氷水 600 ml 中に注ぎ、生じた沈殿物を濾取した。ここに得られたホルメート (20) の沈殿を乾燥後、塩化チオニル (14 ml) に溶かし、室温暗所で 2 時間放置した。過剰の塩化チオニルは室温減圧下に留去し、少量の乾燥ベンゼンを加え、再び室温減圧下で留去し、完全に塩化チオニルを除いた。ここに得られた酸塩化物 (21) の残渣は少量の乾燥ベンゼンに溶解し、新しく調製したジアゾメタンのエーテル溶液中に氷冷下に滴下し、室温に一晩放置した。過剰のジアゾメタンは減圧下にエーテルと共に留去し、油状の残渣として 25-diazo-3 α -formoxy-25-homo-5 β -cholestan-24-one

(22) を得た。これを精製することなく、ベンジルアルコール (9.6 ml)、コリジン (9.6 ml) に溶解し、予め 200 °C に熱したフラスコ中に注ぎ、180-200 °C に保ち 15 分間還流した。反応混合物は室温まで冷却し、水で希釈したのち、エーテルで抽出し、エーテル層を水洗、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣は 10 % メタノール性 KOH (100 ml) 中で一時間還流し、水浴上で加温しメタノールを蒸散させて水と置き換えたのち、希塩酸酸性下にエーテルで抽出し、エーテル層を水洗、芒硝で乾燥し、エーテルを減圧下に留去した。得られた残渣は逆相カラムクロマトグラフィー (ローバーカラム、溶媒 85 % メタノール) により精製した。目的物を含む画分より溶媒を留去して粗結晶 2.8 g を得、これをメタノール-水から再結晶して 3 α -hydroxy-25-homo-5 β -chol-6-en-25-oic acid (23) (1.6 g) を得た。

mp: 138.5-139.5 °C

Rf value: 0.31 (ethyl acetate:iso-octane:acetic acid 10:10:0.1)

IR (cm⁻¹): 3300 (OH), 1700 (COOH)

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.64 (3H, s, 18-CH₃), 0.92 (3H, s, 19-CH₃), 0.98 (3H, d, J=6.6Hz, 21-CH₃), 3.89 (1H, m, 3-H), 5.50 (1H, d, J=10.6Hz, 6-H), 5.65 (1H, ddd, J₁=10.1Hz, J₂=4.6Hz, J₃=6.6Hz, 7-H)

3 α , 6 β , 7 α -Trihydroxy-25-homo-5 β -cholan-25-oic acid (26)

23 (900 mg) を少量のメタノールに溶解し、これに新しく調製したジアゾメタンのエーテル溶液を加え、2 時間室温放置後、過剰のジアゾメタンとエーテルを減圧下に留去してメチルエステル (24) の残渣を得た。この残渣をクロロホルム 40 ml に溶かし、*m*-クロロ過安息香酸 (600 mg) を加え、室温暗所に 24 時間放置した。水を加えた後、過剰の *m*-クロロ過安息香酸を除去するため 1 N NaOH を加えエーテルで抽出、エーテル層を水、希塩酸、水、5 % NaHCO₃、水で順次洗い、芒硝で乾燥後、エーテルを減圧下に留去した。得られたエポキシ体 (25) の油状残渣を酢酸 (80 ml) に溶解し、3.5 時間還流後、室温まで冷却し、水で希釈後、エーテルで抽出し、そのエーテル層を 5 % NaHCO₃、水で順次洗い、芒硝で乾燥後、溶媒を減圧下に留去した。残渣はシリカゲルカラム (50 g) を用い、エーテル:ベンゼン (1:4) を溶出溶媒として精製した。精製物は 5 % メタノール性 KOH (100 ml) に溶かし、一時間還流し加水分解した。水浴上で水と置き換えながらメタノールを蒸散し、室温まで冷却した後、希塩酸酸性下酢酸エチル

で抽出し、その酢酸エチル層を水洗、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。残渣をメタノールから結晶化して $3\alpha,6\beta,7\alpha$ -trihydroxy-25-homo- 5β -cholan-25-oic acid (26) の結晶 376 mg を得た。

mp: 240.0-241.5 °C

Rf value: 0.35 (benzene:iso-propanol:acetic acid 30:10:1)

IR (cm^{-1}): 3400 (OH), 1700 (COOH)

$^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) (ppm): 0.76 (3H, s, 18- CH_3), 0.99 (3H, d, $J=6.6\text{Hz}$, 21- CH_3), 1.44 (3H, s, 19- CH_3), 3.80 (1H, m, 3-H), 4.21 (2H, s, 6- and 7-H)

$3\alpha,6\beta,7\alpha,26$ -Tetraacetoxy-27-nor- 5β -cholestan-25-one (30)

26 (213 mg) と酢酸ナトリウム (60 mg) を無水酢酸 (2 ml) に加え、一晚 100 °C に加熱した。反応混合物は氷水 (50 ml) に注ぎ、生じた沈殿を濾取した。この沈殿物を乾燥後、塩化チオニル (4 ml) に溶かし、室温暗所に二時間放置した。過剰の塩化チオニルを減圧下に留去し、残渣を乾燥ベンゼンに溶かし、氷冷下のジアゾメタンエーテル溶液に滴下し、室温で一晩放置した後、溶媒を留去した。得られた油状の残渣を酢酸 (14 ml) に溶解し、一日室温に放置した後、水で希釈し、エーテルで抽出、そのエーテル層を 5 % NaHCO_3 、水で順次洗い、芒硝で乾燥後、溶媒を減圧下に留去した。得られた油状残渣はシリカゲルカラム (40 g) を用い、ベンゼン:酢酸エチル (9:1) を溶出溶媒として精製し、 $3\alpha,6\beta,7\alpha,26$ -tetraacetoxy-27-nor- 5β -cholestan-25-one (30) を非晶状の粉末 (75 mg) として得た。

Rf value: 0.40 (benzene:ethyl acetate 9:1)

IR (cm^{-1}): 1730 (OAc, CO)

$^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) (ppm): 0.62 (3H, s, 18- CH_3), 0.90 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$, 21- CH_3), 1.03 (3H, s, 19- CH_3), 1.97, 2.00, 2.02, 2.06 (3H \times 4, s, $-\text{OCOCH}_3\times 4$), 4.56 (1H, m, 3-H), 4.80 (3H, s, 26- CH_2 -), 4.90 (1H, m, 6- or 7-H), 5.03 (1H, m, 6- or 7-H)

5β -Cholestane- $3\alpha,6\beta,7\alpha,25,26$ -pentol (31)

30 (56 mg) の乾燥ベンゼン溶液 (5 ml) 中に CH_3MgI のエーテル溶液 (0.95 M) (5 ml, 10 eq) を加え、2.5 時間還流後、一晚室温で放置した。反応生成物を希塩酸で処理した後、酢酸エチルで抽出、有機層を水、5 % NaHCO_3 、水で順次洗い、芒硝で乾燥

後、溶媒を減圧下に留去した。得られた残渣はメタノールから結晶化して 5.6 mg の
5 β -cholestane-3 α ,6 β ,7 α ,25,26-pentol (31) を得た。

mp: 126.0-129.0 °C

Rf value: 0.67 (ethyl acetate:acetone 3:10)

IR (cm⁻¹): 3340 (OH)

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.77 (3H, s, 18-CH₃), 1.12 (3H, d, J=6.0Hz, 21-CH₃), 1.53 (6H, s,
19- and 27-CH₃), 3.86 (1H, m, 3-H), 3.87 (2H, s, 26-CH₂-), 4.30 (2H, m, 6- and 7-H)

(元素分析は結晶が少量のため行なえなかった)

第2章に関する実験

尿の抽出

生後一月の Zellweger's syndrome 患児の尿を Sep-pak C₁₈ に通導し、水洗後メタノールで溶出し減圧下で溶媒を留去した。残渣を 2.5 N KOH 5 ml に溶かし 120 °C、3 時間 加熱して加水分解し、水で希釈後、希塩酸酸性下にエーテル抽出して得られた残渣をジアゾメタンでメチル化後、テトラヒドロキシ酸画分を得るためにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なった。主成分である 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholestanic acid (THCA) は酢酸エチル：アセトン 4:6 で溶出させた後、酢酸エチル：アセトン 2:8、及びアセトンで溶出させた分画をあわせてテトラヒドロキシ胆汁酸画分とした。溶媒を減圧下に留去し、得られた残渣をメチルエステル-TMS エーテル誘導体として GLC, GC-MS のサンプルとした。

3 α ,12 α -Dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid (45)

コール酸 (2) (10 g) を 3 % NaHCO₃ 水溶液 (200 ml) に溶かし、NBS (6 g) を加え室温で 20 時間攪拌した。反応終了後希塩酸により酸性にし生じた沈殿物を濾取し、この沈殿物をエーテルに溶かし中性になるまで水洗し、芒硝で乾燥後減圧下に溶媒を留去し 3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid (45) の飴状残渣 (13.3 g) を得た。

Ethyl 3 α ,12 α -diacetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (46)

45 (13.3 g) を 1 % H₂SO₄ エタノール溶液 (200 ml) に溶解し 75 分間還流し、大量の水で希釈した後酢酸エチルで抽出し、その有機層を水、2 % NaHCO₃、水で順次洗浄し、芒硝で乾燥し、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣は酢酸エチルより再結晶し ethyl 3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate の結晶 (4.2 g) を得た。このエチルエステル (13.7 g) を蒸留ピリジン (100 ml)、無水酢酸 (100 ml) に溶解し、水浴上で 90 °C、4.5 時間加温後、1000 mlの氷水に加え、エーテル抽出した。減圧下に溶媒を留去し ethyl 3 α ,12 α -diacetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (46) の飴状残渣 17.5 g を得た。

Ethyl 3 α ,12 α -diacetoxy-6-bromo-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (47)

46 (10 g) を酢酸 (100 ml) に溶かし、これに臭素 (1.5 ml) の酢酸溶液 (15 ml) を滴下して、室温で1時間攪拌後、1000 ml の氷水に注ぎ、沈殿物を濾取した。得られた沈殿物 (1.2 g) をシリカゲルカラム (200 g) を用い、溶出溶媒 ベンゼン：酢酸エチル 9:1 で精製して ethyl 3 α ,12 α -diacetoxy-6-bromo-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (47) の粉末 7 g を得た。

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.67 (3H, s, 18-CH₃), 0.86 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 1.16 (3H, t, J=8Hz, -COOCH₂CH₃), 1.23 (3H, s, 19-CH₃), 1.92, 2.03 (6H (3HX2), s, 3- and 7-OCOCH₃), 4.12 (2H, q, J=8Hz, -COOCH₂CH₃), 4.55-4.90 (1H, m, 3 β -H), 5.13-5.28 (1H, m, 12 β -H), 5.63 (1H, d, J=6Hz, 6 β -H)

3 α ,6 α -Dihydroxy-12 α -acetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid (48)

47 (6 g) を KOH (12 g) の水 (60 ml)、メタノール (360 ml) 溶液に溶解し、室温で一晩攪拌後、水で希釈し、希塩酸酸性下に 酢酸エチル：エーテル 1:1 で抽出した。有機層を水洗、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去し 3 α ,6 α -dihydroxy-12 α -acetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oic acid (48) の飴状残渣 (7.8 g) を得た。

Methyl 3 α ,6 α -dihydroxy-12 α -acetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (49)

48 の飴状残渣 (7.8 g) をメタノールに溶かし、ジアゾメタンエーテル溶液を加え、一晩放置してメチルエステルを得た。このメチルエステルをシリカゲルカラム (200 g) を用い、溶出溶媒 酢酸エチルで精製し、エーテルから結晶化して methyl 3 α ,6 α -dihydroxy-12 α -acetoxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (49) の結晶 (0.8 g) を得た。

mp:165-167°C

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.69 (3H, s, 18-CH₃), 0.87 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 1.20 (3H, s, 19-CH₃), 1.96 (3H, s, 12-OCOCH₃), 3.50-3.90 (1H, m, 3 β -H), 3.63 (3H, s, -COOCH₃), 4.87 (1H, d, J=6Hz, 6 β -H), 5.15-5.29 (1H, m, 12 β -H)

Methyl 3 α ,6 α ,7 α -trihydroxy-12 α -acetoxy-5 β -cholan-24-oate (50)

49 (2 g) をメタノール (100 ml) に溶かし、NaBH₄ (2 g) を加え、三時間室温で攪拌した後、希塩酸酸性下に 酢酸エチルで抽出、この有機層を水、5% NaHCO₃ で洗った

後、減圧下に溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムで精製した。溶出溶媒 酢酸エチル：アセトン 8:2 の画分から、エーテル-メタノールを用いた再結晶により methyl 3 α ,6 α ,7 α -trihydroxy-12 α -acetoxo-5 β -cholan-24-oate (50) (1.6 g) を得た。

mp: 165-167 °C

IR (CHCl₃) (cm⁻¹): 3450 (OH), 1720 (COOMe, OAc)

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.72 (3H, s, 18-CH₃), 0.91 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 0.94 (3H, s, 19-CH₃), 1.96 (3H, s, 12-OCOCH₃), 3.50-3.87 (1H, m, 3 β -H), 3.63 (3H, s, -COOCH₃), 4.03-4.25 (2H, m, 6 β - and 7 β -H), 5.17-5.23 (1H, m, 12 β -H)

Anal. Calcd. C₂₇H₄₄O₇ C 67.47, H 9.23

Found C 67.25, H 9.22

3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (51)

50 (1.4 g) を 5% KOH メタノール溶液 (100 ml) で三時間還流し加水分解後、希塩酸酸性下に酢酸エチルと n-ブタノールで抽出し、有機層を水洗し、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去して、残渣 210 mg を得た。これをローパーカラム (溶媒 80% メタノール) で精製し、非晶性の 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (51) (98 mg) を得た。

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.76 (3H, s, 18-CH₃), 0.97 (3H, s, 19-CH₃), 1.19 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 3.43-3.90 (1H, m, 3 β -H), 4.00-4.30 (3H, m, 6 β -, 7 β - and 12 β -H)

3 α ,6 α ,7 α ,12 α -Tetraacetoxy-5 β -cholan-24-oic acid (52)

51 (1 g) を無水酢酸 (30 ml)、ピリジン (30 ml) に溶かし、90 °C の水浴上で 18 時間加熱した。水で希釈後、エーテルで抽出、そのエーテル層を水洗し、芒硝で乾燥し、減圧下に溶媒を留去して 3 α ,6 α ,7 α ,12 α -tetraacetoxy-5 β -cholan-24-oic acid (52) の油状残渣 (1.1 g) を得た。

IR (CHCl₃) (cm⁻¹): 1730, 1720 (COOH, OAc)

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.90 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 0.91 (3H, s, 19-CH₃), 2.02, 2.06 (12H (3HX4), s, 3-, 6-, 7-, 12-OCOCH₃), 4.72 (1H, m, 3 β -H), 5.15-5.60 (3H, m, 6 β -, 7 β - and 12 β -H)

$3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Tetraacetoxy- 5β -cholan-24-ol (53)

52 (1.1 g) を無水テトラヒドロフラン (30 ml) に溶かし、氷冷下でトリエチルアミン (0.56 ml)、クロロ炭酸エチル (0.4 ml) を加え、二時間攪拌後、 NaBH_4 (2 g) の水溶液 (10 ml) を滴下し、室温で二時間攪拌した。反応混合物を希塩酸で酸性にし、酢酸エチルで抽出、有機層を 5% NaHCO_3 、水で順時洗浄し、芒硝で乾燥、減圧下に溶媒を留去して $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetraacetoxy- 5β -cholan-24-ol (53) の油状残渣 (1.1 g) を得た。

IR (CHCl_3) (cm^{-1}): 3450 (OH), 1730 (OAc)

$^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5) (ppm): 0.64 (3H, s, 18- CH_3), 0.90 (3H, s, 19- CH_3), 0.91 (3H, d, $J=6\text{Hz}$, 21- CH_3), 2.00, 2.04 (12H (3HX4), s, 3-, 6-, 7-, 12- OCOCH_3), 3.78 (2H, t, $J=6\text{Hz}$, 24- CH_2OH), 4.72 (1H, m, 3 β -H), 5.15-5.60 (3H, m, 6 β -, 7 β - and 12 β -H)

$3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Tetraacetoxy- 5β -cholan-24-al (54)

53 (1 g) のジクロロメタン溶液 (5 ml) にピリジニウムクロクロメイト (1 g)、酢酸ナトリウム (70 mg) のジクロロメタン溶液を氷冷下に滴下し、二時間室温で攪拌した。無水エーテル (100 ml) で希釈後、生じた沈殿をろ過して除き、濾液をフロリジルカラム (20 g) に通導し、さらにカラムを 300 ml のエーテルで洗い、得られた全ての溶出液を減圧下に溶媒留去して $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetraacetoxy- 5β -cholan-24-al (54) の無色油状残渣 (900 mg) を得た。

$3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -Tetrahydroxy- 5β -cholest-24-enoic acid (55)

54 (800 mg) と (carbethoxyethylidene)-triphenyl phosphorane (1.2 g) を無水ベンゼン (100 ml) に溶かし、10 時間還流した。水で希釈後、ベンゼンと酢酸エチルで抽出し、その有機層を水洗し、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒留去した。得られた残渣を 5% メタノール性 KOH で二時間還流して加水分解した。水で希釈、希塩酸で酸性にした後、酢酸エチルで抽出、有機層を水洗し、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。この残渣をジアゾメタンでメチル化後、シリカゲルカラム (50 g) で精製した。酢酸エチル: アセトン 8:2 で溶出した画分の溶媒を留去した後、5% メタノール性 KOH で二時間還流し加水分解した。反応混合液を水で希釈し希塩酸酸性下に酢酸エチルで抽出、有機層を水洗、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去して $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetra-

hydroxy-5 β -cholest-24-enoic acid (55) (480 mg) を得た。

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.80 (3H, s, 18-CH₃), 1.04 (3H, s, 19-CH₃), 1.24 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 1.90 (3H, s, 27-CH₃), 3.68-3.82 (1H, m, 3 β -H), 4.20-4.30 (3H, m, 6 β -, 7 β - and 12 β -H), 6.94 (1H, t, J=9Hz, 24-H)

3 α , 6 α , 7 α , 12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholestanoic acid (44)

55 (253 mg) を酢酸 50 ml に溶かし、触媒として PtO₂ (30 mg) を用い、室温で接触還元した。計算量の水素が15分間で吸収された。反応混合物から触媒をろ過して除いた後、5% NaHCO₃ で希釈し、酢酸エチルで抽出、この有機層を水洗、芒硝で乾燥、減圧下に溶媒を留去して、得られた残渣をアセトンで再結晶し 3 α , 6 α , 7 α , 12 α -tetrahydroxy-5 β -cholestanoic acid (44) の結晶 120 mg を得た。

mp: 260-262 °C

¹H-NMR (pyridine-d₅) (ppm): 0.81 (3H, s, 18-CH₃), 1.04 (3H, s, 19-CH₃), 1.22 (3H, d, J=6Hz, 21-CH₃), 1.34 (3H, d, J=7Hz, 27-CH₃), 3.68-3.84 (1H, m, 3 β -H), 4.22-4.31 (3H, m, 6 β -, 7 β - and 12 β -H)

Anal. Calcd. C₂₇H₄₈O₆ C 69.49, H 9.94

Found C 69.21, H 9.99

第3章に関する実験

Methyl 3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (57)

分液ロートに コール酸メチル (56) (10 g)、エーテル (200 ml)、メタノール (30 ml)、水 (30 ml) を入れ、NBS (5.5 g) を加えて一日放置した。反応混合液に水を 200 ml 加え、エーテルで抽出した。エーテル層を 2 % Na₂S₂O₃、5 % NaHCO₃、水で順次洗い、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去して methyl 3 α ,12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholan-24-oate (57) の残渣 (9.9 g) を得た。

Methyl 3 α ,12 α -diacetoxy-5 β -chol-6-en-24-oate (61)

57 (3.0 g) を無水酢酸 (30 ml) 氷酢酸 (30 ml) に溶かし、二時間還流後、減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣、メチルエステルアセタート (58) と HBr (0.5 ml) を酢酸 (40 ml) に溶かし、酢酸 (10 ml) に溶かした臭素 (1.0 g) を滴下し、一晩放置し、500 ml の氷水に注ぎ、生じた沈殿を濾取した。ここに得られたブロムケトン体 (59) をメタノール (300 ml) に溶かし、氷冷下に NaBH₄ (1.8 g) を少量ずつ加えた。室温で1時間攪拌後、水で希釈し、エーテルで抽出し、そのエーテル層を希塩酸、5 % NaHCO₃、水で順次洗浄して、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。得られた 60 を含む残渣 (3.3 g) を酢酸 (60 ml) に溶解し、亜鉛末 (3.3 g) を加え 1.5 時間還流した。反応後、亜鉛末をろ別し、濾液を氷水に注いで非結晶性沈殿物 (2.5 g) を得た。これをシリカゲルカラム (100 g) を用い、溶出溶媒 ベンゼン：酢酸エチル 9:1 で精製して methyl 3 α ,12 α -diacetoxy-5 β -chol-6-en-24-oate (61) の飴状残渣 (1.73 g) を得た。

3 α ,6 β ,7 α ,12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (63)

methyl 3 α ,12 α -diacetoxy-5 β -chol-6-en-24-oate (61) (0.8 g) のクロロホルム溶液 (30 ml) に m-クロロ過安息香酸 (500 mg) を加え、室温暗所で 48 時間放置した。過剰の m-クロロ過安息香酸を 1 N NaOH で分解した後、エーテルで抽出し、そのエーテル層を水、希塩酸、水、5 % NaHCO₃、水で順次洗浄し、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去してエポキシド (62) を得た。この 62 を酢酸 (80 ml) に溶解し、3 時間還流したのち、室温まで冷却後、水で希釈し、酢酸エチルで抽出、有機層を 5 % NaHCO₃、

水で順次洗浄し、芒硝で乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。残渣は酢酸エチルより再結晶して $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acid (63) の結晶 194 mg を得た。

mp: 150.0-152.0 °C

Rf value: 0.36 (ethyl acetate:acetic acid:water 85:10:5)

RRT: OV-1 (1.03), OV-17 (0.82)

Anal. Calcd. $C_{24}H_{40}O_6$ C 67.89, H 9.50

Found C 67.51, H 9.83

IR (cm^{-1}): 3400 (OH), 1720 (COOH)

1H -NMR (d_5 -methanol) (δ ppm): 0.74 (3H, s, 18- CH_3), 1.02 (3H, d, $J=6.3$ Hz, 21- CH_3), 1.06 (3H, s, 19- CH_3), 3.38 (1H, brm, 3 β -H, $W_{1/2}=23.0$ Hz), 3.65 (2H, m, 6 α - and 7 β -Hs, $W_{1/2}=3.1$ Hz), 3.96 (1H, m, 12 β -H, $W_{1/2}=2.3$ Hz)

$3\alpha, 6\beta, 7\beta, 12\alpha$ -Tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acid (65)

61 (1.1 g) を乾燥エーテル (30 ml)、蒸留ピリジン (1 ml) に溶かし、乾燥エーテル (5 ml) に溶かした四酸化オスミウム (1 g) を加え、48 時間室温暗所に放置した。反応混合物より減圧下に溶媒を留去し、残渣に 50% エタノール (140 ml) と $NaHSO_3$ (5 g) を加え 2 時間還流し、3 倍量のエタノールを加え濾過した。濾液より溶媒を留去し、残渣を 5% KOH エタノール溶液 (100 ml) 中で 2 時間還流して加水分解し、水浴上でエタノールを水と交換後、希塩酸で酸性にし、酢酸エチルで抽出、有機層を水洗し、芒硝で乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。得られた油状残渣をメタノールから結晶化し、再結晶はメタノール-酢酸エチルでおこない $3\alpha, 6\beta, 7\beta, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acid (65) の結晶 580 mg を得た。

mp: 225.0-226.0 °C

Rf value: 0.36 (ethyl acetate:acetic acid:water 85:10:5)

RRT: OV-1 (1.03), OV-17 (0.82)

Anal. Calcd. $C_{24}H_{40}O_6$ C 67.89, H 9.50

Found C 67.49, H 9.79

IR (cm^{-1}): 3400 (OH), 1720 (COOH)

1H -NMR (d_5 -methanol) (δ ppm): 0.74 (3H, s, 18- CH_3), 1.02 (3H, d, $J=6.3$ Hz, 21- CH_3), 1.08 (3H,

s, 19-CH₃), 3.48 (2H, m, 3 β - , W_{1/2}=23.1Hz and 7 α -Hs, W_{1/2}=15Hz), 3.58 (1H, m, 6 α -H, W_{1/2}=7.1Hz), 3.96 (1H, m, 12 β -H, W_{1/2}=2.1Hz)

参考文献

1. C.Gundelach, A.Strecker, 1847, Untersuchung der schweinegalle, Ann., 62, 205-232
2. A.Windaus, A.Bohne, 1923, Uber hyo-glyko-desoxy-cholsaure und uber hyo-desoxy-cholsaure, Ann., 433, 278-287
3. M.Tukamoto, 1940, Uber die synthese der stereoisomeren 3,6-dioxycholansaure aus 3,6-diketocholansaure, J.Biochem., 32, 451-460
4. R.B.Moffett, W.M.Hoehn, 1947, Configuration of the C₆ hydroxyl group in hyo-desoxycholic acid, J.Am.Chem.Soc., 69, 1995-1996
5. T.Okishio, P.P.Nair, 1966, Studies on bile acids. Some observation on the intracellular localization of major bile acids in rat liver, Biochemistry, 5, 3662-3668
6. T.H.Lin, R.Rubinstein, W.L.Holmes, 1963, A study of the effect of D- and L-triiodothyronine on bile acid excretion of rats, J.Lipid Res., 4, 63-67
7. M.Makita, W.W.Wells, 1963, Quantitative analysis of fecal bile acids by gas-liquid chromatography, Anal.Biochem., 5, 523-530
8. H.G.Roscoe, M.J.Fahrenbach, 1963, Removal of fecal pigments and its application to the determination of fecal bile acids in the rat, Anal. Biochem., 6, 520-529
9. E.Fernholz, 1935, Die isolierung der 3-oxy-6-keto-allocholansaure aus schweinegalle, Z.Physiol.Chem., 232, 202-205
10. J.T.Matschiner, R.L.Ratliff, T.A.Mahowald, E.A.Doisy Jr., W.H.Elliott, S.L.Hsia, E.A.Doisy, 1958, Bile acids. IX.metabolites of hyodeoxycholic acid-24-C¹⁴ in surgically jaundiced rats, J.Biol.Chem., 230, 589-596
11. T.Kimura, 1937, Uber die β -hyodesoxycholsaure aus schweinegalle, Z.Physiol.Chem., 248, 280-284
12. R.Schoenheimer, C.G.Johnston, 1937, Lithocholic acid gallstones from hog bile, J.Biol.Chem., 120, 499-501
13. G.A.D.Haslewood, V.Wootton, 1950, Comparative studies of 'bile salts'. 1. preliminary survey, Biochem.J., 47, 584-597

14. G.A.D.Haslewood, J.Sjovall, 1954, Comparative studies of 'bile salts'. 8. preliminary examination of bile salts by paper chromatography, *Biochem.J.*, 57, 126-130
15. G.A.D.Haslewood, 1954, 'Hyochoolic acid', a trihydroxy bile acid from pig bile, *Biochem.J.*, 56, xxxiii
16. G.A.D.Haslewood, 1956, Comparative studies of 'bile salts'. 9. the isolation and chemistry of hyochoolic acid, *Biochem.J.*, 62, 637-645
17. P.Ziegler, 1956, The elucidation of the structure of hyochoolic acid, *Can. J.Chem.*, 34, 523-529
18. S.L.Hsia, J.T.Matschiner, T.A.Mahowald, W.H.Elliott, E.A.Doisy Jr., S.A.Thayer, E.A.Doisy, 1957, Bile acids. V. chemical studies on new bile acids from the rat and the hog, *J.Biol.Chem.*, 225, 811-823
19. S.L.Hsia, W.H.Elliott, J.T.Matschiner, E.A.Doisy Jr., S.A.Thayer, E.A.Doisy, 1960, Bile acids. XIII. further contributions to the constitution of muricholic acids, *J.Biol.Chem.*, 235, 1963-1967
20. J.T.Matschiner, T.A.Mahowald, W.H.Elliott, E.A.Doisy Jr., S.L.Hsia, E.A.Doisy, 1957, Bile acids. I. two new acids from rat bile, *J.Biol.Chem.*, 225, 771-779
21. J.T.Matschiner, T.A.Mahowald, S.L.Hsia, E.A.Doisy Jr., W.H.Elliott, E.A.Doisy, 1957, Bile acids. IV. the metabolism of hyodeoxycholic acid-24-C¹⁴, *J.Biol.Chem.*, 225, 803-810
22. H.Danielsson, T.Kazuno, 1959, On the metabolism of bile acids in the mouse. bile acids and steroids 87, *Acta Chem.Scand.*, 13, 1141-1144
23. S.L.Hsia, J.T.Matschiner, T.A.Mahowald, W.H.Elliott, E.A.Doisy Jr., S.A.Thayer, E.A.Doisy, 1957, Bile acids. VI. the structure and synthesis of acid II, *J.Biol.Chem.*, 226, 667-671
24. S.L.Hsia, J.T.Matschiner, T.A.Mahowald, W.H.Elliott, E.A.Doisy Jr., S.A.Thayer, E.A.Doisy, 1958, Bile acids. VII. structure of acid I, *J.Biol.Chem.*, 230, 573-580
25. H.B.Kagan, 1957, *Chimie Organique. - Nouveaux derives d'acides biliaries:*

- acides Δ^6 -choleniques et acides 6,7-dihydroxy-cholaniques., Rend.Acad.Sci., 244, 1373-1376
26. S.L.Hsia, J.T.Matschiner, T.A.Mahowald, W.H.Elliott, E.A.Doisy Jr., S.A. Thayer, E.A.Doisy, 1958, Bile acids. X. characterization and partial synthesis of acid IV, J.Biol.Chem., 230, 597-601
27. S.L.Hsia, W.H.Elliott, J.T.Matschiner, E.A.Doisy Jr., S.A.Thayer, E.A. Doisy, 1958, Bile acids. XI. structures of the isomeric $3\alpha,6,7$ -trihydroxy-cholanic acids, J.Biol.Chem., 233, 1337-1339
28. B.Samuelsson, 1959, On the metabolism of chenodeoxycholic acid in the rat. bile acids and steroids 85, Acta Chem.Scand., 13, 976-983
29. S.Bergstrom, H.Danielsson, A.Goransson, 1959, On the bile acid metabolism in the pig. bile acids and steroids 81, Acta Chem.Scand., 13, 776-783
30. S.Bergstrom, A.Goransson, B.Samuelsson, 1959, On the mechanism of the formation of hyodeoxycholic acid in the pig. bile acids and steroids 89, Acta Chem.Scand., 13, 1761-1766
31. B.Samuelsson, 1960, Studies on the mechanism of the formation of hyodeoxycholic acid in the pig. bile acids and steroids 100, Arkiv for Kemi., 15, 425-432
32. K.Einarsson, 1966, On the formation of hyodeoxycholic acid in the rat. bile acids and steroids 154, J.Biol.Chem., 241, 534-539
33. 太田正道, 角田創, 穂下剛彦, 1978, 胆汁酸の代謝 (第3報) ケノデオキシコール酸の代謝、薬学雑誌, 98, 108-118
34. D.Madsen, M.Beaver, L.Chang, E.Bruckner-Kardoss, B.Wostmann, 1976, Analysis of bile acids in conventional and germfree rats, J.Lipid Res., 17, 107-111
35. 穂下剛彦, 1971, 胆汁酸の比較生化学的研究、生化学, 43, 323-335
36. J.A.Summerfield, B.H.Billing, C.H.L.Shackleton, 1976, Identification of bile acids in the serum and urine in cholestasis. evidence for 6α -hydroxylation of bile acids in man, Biochem.J., 154, 507-516
37. B.Alme, A.Bremmelgaard, J.Sjovall, P.Thomassen, 1977, Analysis of

- metabolic profiles of bile acids in urine using a lipophilic anion exchanger and computerized gas-liquid chromatography-mass spectrometry, *J.Lipid Res.*, 18, 339-362
38. A.Eklund, A.Norman, B.Strandvik, 1980, Excretion of bile acids in healthy children and children with cystic fibrosis, *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, 40, 595-608
 39. B.Alme, A.Norden, J.Sjovall, 1978, Glucuronides of unconjugated 6-hydroxylated bile acids in urine of a patient with malabsorption, *Clin.Chim.Acta.*, 86, 251-259
 40. T.Nakashima, A.Sano, Y.Seto, T.Nakajima, T.Okuno, T.Takino, T.Hasegawa, 1986, Unusual trihydroxy bile acids in the urine of healthy humans, *Clin.Chim.Acta.*, 160, 47-53
 41. P.Back, K.Walter, 1980, Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium, *Gastroenterology*, 78, 671-676
 42. B.Strandvik, S.A.Wikstrom, 1982, Tetrahydroxylated bile acids in healthy human newborns, *Eur.J.Clin.Invest.*, 12, 301-305
 43. C.Colombo, G.Zuliani, M.Ronchi, J.Breigenstein, K.D.R.Setchell, 1987, Biliary bile acid composition of the human fetus in early gestation, *Pediatr.Res.*, 21, 197-200
 44. K.D.R.Setchell, R.Dumasuwala, C.Colombo, M.Ronchi, 1988, Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile, *J.Biol.Chem.*, 263, 16637-16644
 45. J.Shoda, R.Mahara, T.Osuga, M.Tohma, S.Ohnishi, H.Miyazaki, N.Tanaka, Y.Matsuzaki, 1988, Similarity of unusual bile acids in human umbilical cord blood and amniotic fluid from newborns and in sera and urine from adult patients with cholestatic liver diseases, *J.Lipid Res.*, 29, 847-858
 46. B.F.Kase, I.Bjorkhem, P.Haga, Z.Pedersen, 1985, Defective peroxisomal cleavage of the C₂₇-steroid side chain in the cerebro-hepato-renal syndrome of Zellweger, *J.Clin.Invest.*, 75, 427-435
 47. M.Une, Y.Tazawa, K.Tada, T.Hoshita, 1987, Occurrence of both (25R)- and

- (25S)- $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholestanoic acids in urine from an infant with Zellweger's syndrome, J.Biochem., 102, 1525-1530
48. S.Kuroki, C.D.Schteingart, L.R.Hagey, B.I.Cohen, E.H.Mosbach, S.S.Rosso, A.F.Hofmann, N.Matoba, M.Une, T.Hoshita, D.K.Odell, 1988, Bile salts of the West Indian manatee, Trichechus manatus latirostris : novel bile alcohol sulfates and absence of bile acids, J.Lipid Res., 29, 509-522
49. J.Gustafsson, 1979, Metabolism of $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy- 5β -cholestanoic acid by rat liver in vivo and in vitro, J.Lipid Res., 20, 265-270
50. S.Hirofuji, 1966, Stero-bile acids and bile alcohols. LXXXIII. metabolism of deoxycholic acid and 5β -cholestane- $3\alpha,12\alpha$ -diol in the eel, J.Biochem., 60, 514-518
51. S.Kuroki, K.Shimazu, M.Kuwabara, M.Une, K.Kihira, T.Kuramoto, T.Hoshita, 1985, Identification of bile alcohols in human bile, J.Lipid Res., 26, 230-240
52. M.Une, Y.Shinonaga, M.Matoba, S.Kuroki, K.Kihira, T.Hoshita, 1986, Identification of new bile alcohols, 5β -cholestane- $3\alpha,7\alpha,24,26$ -tetrol, 5β -cholestane- $3\alpha,7\alpha,25,26$ -tetrol, 5β -cholestane- $3\alpha,7\alpha,26,27$ -tetrol, J.Lipid Res., 27, 1318-1323
53. M.Kuwabara, T.Ushiroguchi, K.Kihira, T.Kuramoto, T.Hoshita, 1984, Identification of bile alcohols in urine from healthy humans, J.Lipid Res., 25, 361-368
54. T.Hiraoka, K.Kihira, G.Kajiyama, T.Kuramoto, T.Hoshita, 1987, Identification of 5β -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24,25,26$ -hexol in human urine, J.Lipid Res., 28, 895-899
55. G.Karlaganis, B.Alme, V.Karlaganis, J.Sjovall, 1981, Bile alcohol glucuronides in urine. identification of 27-nor- 5β -cholestane- $3\alpha,7\alpha,12\alpha,24\zeta,25\zeta$ -pentol in man, J.Steroid Biochem., 14, 341-345
56. K.H.Ludwig, H.V.Henning, A.Sziedat, H.J.Egger, 1983, The identification of urinary bile alcohols by gas chromatography-mass spectrometry in patients with liver disease and in healthy individuals, J.Clin.Invest., 13, 91-98

57. 橋本隆、上条桂樹、鈴木康之, 1988. Peroxisome disorders, 蛋白質核酸酵素, 33, 817-820
58. R.F.Hanson, P.S.V.Leeuwen, G.C.Williams, G.Grabowski, H.L.Sharp, 1979, Defects of bile acid synthesis in Zellweger's syndrome, Science, 203, 1107-1108
59. B.F.Kase, J.I.Pedersen, B.Stranvik, I.Bjorkhem, 1985, In vivo and in vitro studies on formation of bile acids in patients with Zellweger syndrome evidence that peroxisomes are of importance in the normal biosynthesis of both cholic and chenodeoxycholic acids, J.Clin.Invest., 76, 2393-2402
60. A.M.Lawson, M.J.Madgigan, D.Shortland, P.T.Clayton, 1986, Rapid diagnosis of Zellweger syndrome and infantile Refsum's disease by fast atom bombardment-mass spectrometry of urine bile salts, Clin.Chim.Acta, 161, 221-231
61. M.Une, K.Tsujimura, K.Kihira, T.Hoshita, 1989, Identification of (22R)-3 α , 7 α , 12 α , 22- and (23R)-3 α , 7 α , 12 α , 23-tetrahydroxy-5 β -cholestanic acids, J.Lipid Res., 30, 541-547
62. B.Alme, A.Norden, J.Sjovall, 1978, Glucuronides of unconjugated 6-hydroxylated bile acids in urine of a patient with malabsorption, Clin.Chim.Acta, 86, 251-259
63. P.A.Thomassen, 1979, Urinary bile acids in late pregnancy and in recurrent cholestasis of pregnancy, Eur.J.Clin.Invest., 9, 425-432
64. A.Bremmelgaard, J.Sjovall, 1979, Bile acid profiles in urine of patients with liver diseases, Eur.J.Clin.Invest., 9, 341-348
65. P.A.Thomassen, 1981, Urinary bile acids in women treated with contraceptive steroids. A study using computerized gas chromatography-mass spectrometry, Acta Obstet.Gynecol.Scand., 60, 173-176
66. A.Stiehl, R.Raedsch, G.Rudolph, U.Gundert-Remy, M.Senn, 1985, Biliary and urinary excretion of sulfated, glucuronidated and tetrahydroxylated bile acids in cirrhotic patients, Hepatology, 5, 492-495
67. A.Bremmelgaard, B.Alme, 1980, Analysis of plasma bile acid profiles in

- patients with liver diseases associated with cholestasis, Scand.J.Gastroentrol., 15, 593-600
68. A.Norlander, A.Norman, 1982, Bile acid metabolism in non-jaundiced patients with malignant liver tumours, Scand.J.Gastroentrol., 17, 849-853
69. Y.Amuro, E.Hayashi, T.Endo, K.Higashino, S.Kishimoto, 1983, Unusual tri-hydroxylated bile acids in urine of patients with liver cirrhosis, Clin. Chim.Acta, 127, 61-67
70. A.Nemeth, B.Strandvik, 1984, Urinary excretion of tetrahydroxylated bile acids in children with α_1 -antitrypsin deficiency and neonatal cholestasis, Scand.J.Clin.Lab.Invest., 44, 387-392
71. G.Hedenborg, A.Norman, 1984, The nature of urinary bile acid conjugates in patients with extrahepatic cholestasis, Scand.J.Clin.Lab.Invest., 44, 725-733
72. H.Greim, D.Trulzsch, P.Czygan, F.Hutterer, F.Schaffner, H.Popper, D.Y. Cooper, O.Rosenthal, 1973, Bile acid formation by liver microsomal systems, Annal.New York Acad.Sci., 212, 139-147
73. I.Bjorkhem, K.Einarsson, G.Hellers, 1973, Metabolism of mono- and di-hydroxylated bile acids in preparations of human liver, Eur.J.Clin.Invest., 3, 459-465
74. D.Trulzsch, J.Roboz, H.Greim, P.Czygan, J.Rudick, F.Hutterer, F.Schaffner, H.Popper, 1974, Hydroxylation of tauroolithocholate by isolated human liver microsomes. 1. identification of metabolic product, Biochem.Med., 9, 158-166
75. A.Bremmelgaard, J.Sjovall, 1980, Hydroxylation of cholic, chenodeoxycholic, and deoxycholic acids in patients with intrahepatic cholestasis, J.Lipid Res., 21, 1072-1081
76. J.Gustafsson, S.Anderson, J.Sjovall, 1987, Bile acid metabolism during development: metabolism of lithocholic acid in human fetal liver, Pediatr.Res., 21, 99-103
77. S.L.Hsia, 1971, Hyocholic acid and muricholic acids in 'THE BILE ACIDS'.

vol. 1, Edited by P.P.Nair, and D.Kritchevsky, PRENUM PRESS, New York-
London, p.95-120

78. H.B.Kagan, J.Jacques, 1960, N° 165. -Acides biliaries comportant des
hydroxyles en position 6 et 7., Bull.Soc.Chim.Fr., 871-878

謝 辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、広島大学医学部総合薬学科教授 穂下剛彦先生に心より謹んで感謝の意を表します。

永年にわたり公私共に御指導、御鞭撻を賜りました 広島大学医学部総合薬学科 倉本戴壽先生、木平健治先生、宇根瑞穂先生、並びに研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

ヒト体液中 6-水酸化 C₂₄胆汁酸の報告にあたり共同研究者として御指導、御鞭撻を賜りました 筑波大学教授 大菅俊昭先生、筑波大学 正田純一先生に深謝致します。

また、本論文に関して有益な御助言を賜りました、広島大学医学部総合薬学科教授 木村栄一先生、同助教授 笠井良次先生に深く感謝致します。

本論文の内容は下記の雑誌に公表した

1. Michiko Yoshii, Mizuho Une, Kenji Kihira, Taiju Kuramoto, and Takahiko Hoshita,

Synthesis of 5β -cholestane- $3\alpha, 6\beta, 7\alpha, 25, 26$ -pentol and identification of a novel bile alcohol, α -trichechol, present in the West Indian manatee bile
Chem. Pharm. Bull., 37, 1852-1854 (1989) (第1章)

2. Mizuho Une, Nobuko Kisaka, Michiko Yoshii, and Takahiko Hoshita

Identification of $3\alpha, 6\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholestanoic acid in Zellweger's syndrome
J. Biochem., 106, 501-504 (1989) (第2章)

3. Michiko Yoshii, Kenji Kihira, Junichi Shoda, Toshiaki Osuga, and Takahiko Hoshita

Identification of $3, 6, 7, 12$ -tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acids in human biological fluids
Steroids, 55, 512-515 (1990) (第3章)