高脂血症治療薬Pravastatin Sodiumの高感度定量法の開発
および代謝経路の研究

村　松　重　基

高脂血症治療薬Pravastatin Sodiumの高感度定量法の開発および代謝経路の研究

村松　重基

目次

緒論 …… 1

第Ⅰ編　血漿中pravastatin sodiumの高感度定量法の開発

第１章　エンザイムイムノアッセイによるpravastatin sodiumの測定

第１節　序 …… 5

第２節　Pravastatin sodiumに対する抗血清の調製 …… 6

第３節　ELISAによるpravastatin sodiumの定量法 …… 8

第４節　Pravastatin sodium投与後のヒト血漿中濃度の測定 …… 12

第５節　考察 …… 14

第２章　蛍光HPLCによるpravastatin sodiumの測定

第１節　序 …… 15

第２節　固定化抗体カラムによる前処理 …… 15

第３節　Pravastatin sodiumの蛍光誘導体化 …… 17

第４節　HPLCによるpravastatin sodiumの定量法 …… 19

第５節　Pravastatin sodium投与後の実験動物血漿中濃度の測定 …… 21

第６節　考察 …… 22

第Ⅱ編　ラット遊離肝細胞を用いる代謝経路の研究

第１章　Glutathione抱合体の生成経路

第１節　序 …… 24

第２節　ラット遊離肝細胞によるpravastatin sodiumの代謝 …… 25

第３節　代謝物CM-1およびCM-2の構造解析 …… 26

第４節　推定代謝中間体の合成 …… 29

第５節　CM-1およびCM-2の生成経路 …… 31

第６節　P-450を誘導または阻害したラット遊離肝細胞による pravastatin sodiumの代謝 …… 33

第７節　考察 …… 34

第２章　Pravastatin sodiumの代謝に関与する脂水素酵素
第１節　序 …… 37
第２節　代謝物CM-3の生成経路 …… 37
第３節　CM-3の生成に関与するPS 6′β-hydroxydehydrogenaseの
　　諸性質 …… 40
第４節　PS 6′β-hydroxydehydrogenaseの精製 …… 44
第５節　PS 6′β-hydroxydehydrogenaseの基質特異性 …… 46
第６節　考察 …… 47
結語 …… 50
謝辞 …… 52
実験の部
第１編第１章に関する実験 …… 53
第１編第２章に関する実験 …… 58
第２編第１章に関する実験 …… 60
第２編第２章に関する実験 …… 65
引用文献 …… 69

本学位論文は、以下の原著論文に基づいたものである。

第１編

第１章

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Pravastatin, A HMG-CoA Reductase Inhibitor, in Human Plasma
Shigeki Muramatsu, Wataru Takasaki, Minoru Uchiyama, Yuko Komokata, Yorihisa Tanaka, and Hidekuni Takahagi.
Journal of Immunoassay, **17**(1), 13-27 (1996)

第２章

Highly Sensitive and Specific Determination of Pravastatin Sodium in Plasma by High-performance Liquid Chromatography with Laser-Induced Fluorescence Detection after Immobilized Antibody Extraction
Christophe Dumousseaux, Shigeki Muramatsu, Wataru Takasaki, and Hidekuni Takahagi.
Journal of Pharmaceutical Science, **83**(11), 1630-1636 (1994)

第２編

第１章

Metabolism of Pravastatin Sodium in Isolated Rat Hepatocytes. Ⅰ. Glutathione Conjugate Formation Reaction
Shigeki Muramatsu, Kimitoshi Miyaguchi, Haruo Iwabuchi, Yoko Matsushita, Takemichi Nakamura, Takeshi Kinoshita, Minoru Tanaka, and Hidekuni Takahagi
Xenobiotica, **22**(5), 487-498 (1992)

第２章

Metabolism of Pravastatin Sodium by 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase
Shigeki Muramatsu, Yuko Komokata, Yorihisa Tanaka, and Hidekuni Takahagi
Biological & Pharmaceutical Bulletin, **20** (11). (掲載予定)

略号一覧表

[略号]

AUC: 濃度曲線下面積(Area Under the Concentration-time Curve)

BSA: ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin)

B_0: 吸光度

CM: Cell Metabolite

CV: 変動係数(Coefficient of Variation)

DHP-1: Dehydropeptidase-1

DNS-ED: Dansylethylenediamine

DEPC: Diethyl Phosphorocyanidate

DMF: N,N-Dimethylformamide

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

GCMS: Gas Chromatography/Mass Spectrometry

GS: Glutathione

γ -GT: Glutamyltranspeptidase

HEPES: Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethylsulfonic acid

トリス: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A

HPLC: High-performance Liquid Chromatography

HRP: Horseradish Peroxidase

HSA: ヒト血清アルブミン(Human Serum Albumin)

IC_{50}: 50% Inhibitory Concentration

IgG: Immunoglobulin G

LDL: 低密度リポタンパク質(Low-density Lipoprotein)

MC: 3-Methylcholanthrene

NAD: β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NADH: 還元型NAD(β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form)

NADP: β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NADPH:還元型NADP(β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form)

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

P-450: Cytochrome P-450

PB: Phenobarbital

PCC: Pyridinium Chlorochromate

PS: Pravastatin Sodium

SDS-PAGE: Sodium Dodecylsulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis

S/N: Signal/Noise

TEA:Triethylamine

TLC: Thin Layer Chromatography

[緩衝液]

PBS: 等張リン酸緩衝液(Phosphate-buffered Saline, pH7.4)

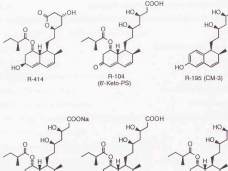
緩衝液 A: 50mMリン酸緩衝液(pH7.2)

緩衝液 B: 0.05%NaN_3を含むPBS(pH7.4)

緩衝液 C: 0.1%HSAを含むPBS(pH7.4)

[Pravastatin sodiumおよび関連化合物]





緒論

血清中のコレステロール、トリグリセリドおよび中性脂肪などの脂質成分が正常値以上に増加した状態が一般に高脂血症と言われている。心筋に血液を送る冠状動脈の硬化によって引き起こされる虚血性心疾患は冠動脈にコレステロールが沈着しておこる粥状動脈硬化が主な原因[1]であり、Framingham研究所をはじめとする多くの疫学調査結果から、血清コレステロールが高い程、冠動脈疾患の発病率が増加することが示されている。生体内コレステロールの約70%は主に肝臓および小腸内でacetyl CoAを出発原料として多くの段階を経て生合成され(図1)、この経路における律速酵素は3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)を還元してmevalonic acidの生成に関与するHMG-CoA reductaseである[2]。遠藤らは1976年、*Penicillium citrinum*からHMG-CoA reductaseの特異的かつ強力な阻害剤ML-236B(Compactin)を発見し[3]、それがイヌ、サルなどの動物実験で強力に血中コレステロールを低下させることを確認した後、コレステロール高値症例での治験に適用された[4-6]。ML-236Bはβ-hydroxy-δ-lactoneの部分構造を有し、その開環体がHMG-CoAのHMG部分と似ており、HMG-CoA reductaseに対し本来の基質であるHMG-CoAよりり1000倍強い親和性を有することによりり生体内コレステロ

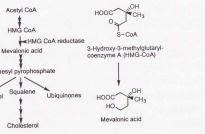


FIGURE 1 The Cholesterol Biosynthesis Pathway

ール合成に対し拮抗阻害作用を発揮する(図2)。このようなHMG-CoA reductase阻害剤の作用機序については Brown らをはじめとして多くの研究が行われており[9-12]、それらの研究から、HMG-CoA reductase阻害剤の薬効はコレステロールの合成阻害により細胞内コレステロールが減少し、それに伴い、細胞LDL受容体が増加して血中コレステロールを細胞内へ取り込み、その結果、血中コレステロールが低下すると考えられている。

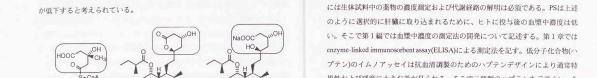


FIGURE 2 Structures of HMG-CoA Inhibitors

Pravastatin sodium(PS)はML-236Bを投与したイヌの糞中から活性代謝物として発見されたHMG-CoA reductase阻害剤であり(図-2)、コレステロール合成阻害活性が強く、かつコレステロール生合成の主要臓器である肝臓や小腸に選択的に移行しこの生合成を阻害する[13,14]。HMG-CoA reductase阻害剤はコレステロール合成の初期段階である mevalonic acidの生成を阻害するため、mevalonic acidを原料とする多くの副脂肪分(ユビキノン、ドリコール、イソプレニル蛋白など)やコレステロールを原料とするステロイドホルモンの生成にも影響する可能性がある。PSは他のHMG-CoA reductase阻害剤と異なり、dealin環に一つの水酸基を有し、かつ開環体として投与するため、親水性の高い薬物であり[15]、本質的には細胞膜を通過することはできない。しかしながら、PSは肝細胞に存在する有機アニオン輸送担体を介して特異的かつ効率よく作用臓器である肝臓に取り込まれ、他の臓器への移行は少なく[16,17]、肝臓以外でコレステロールの合成を阻害せず安全性の高い薬物と考えられる。事実、PSは6595人の患者を対象にしたWest of Scotland Coronary Prevention Study[18]などにより薬効および安全性が認められている。

薬物動態の研究は薬物の吸収、分布、代謝および排泄とその機構を解明し、それらを通して薬物の効果および安全性の正確な評価を行うことであり、そのためには生体試料中の薬物の濃度測定および代謝経路の解明は必須である。PSは上述のように選択的に肝臓に取り込まれるために、ヒトに投与後の血漿中濃度は低い。そこで第1報では血漿中濃度の測定法の開発について記述する。第1章ではenzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)による測定法を記す。低分子化合物(ハプテン)のイムノアッセイは抗血清調製のためのハプテンデザインにより選択特異性および感度に大きな差が見られる。そこで二種類のハプテンをデザイン、合成して抗血清を調製し、ELISAによる定量法を確立した。第2章では抗体をカラム保持体に不溶化し、その生物学的親和性を利用するイムノアフィニティークロマトグラフィーによる生体試料中からのPSの抽出法を検討した。ついで蛍光標識し、より高感度なHe-Cdレーザー蛍光検出を用いたHPLCにより高選択的かつ高感度な定量法を確立した。

薬物の代謝反応は一般に官能基が導入される第1相反応と抱合反応による第II相反応に大きく分けられ、生体内に投与された薬物は排泄されるまでにこれらの代謝反応を受け、排泄されやすい形に変換される。特に第II相反応は薬物を不活化し、排泄されやすい代謝産物に変換する解毒化反応(毒性化反応の場合もある)と考えられている。第2報では第1相および第II相反応を同時に観察できるラット遊離肝細胞[19]を用いて、PSの代謝を検討し、生成した代謝物(CM-1、CM-2および CM-3(CM: cell metabolite))についてその構造と代謝経路について記述する。第1章ではまず生成したCM-1およびCM-2がepoxide中間体を経由し、glutathione抱合体(CM-1)と dihydrodiol体(CM-2)に代謝されることを解明した。第2章ではまず生成したCM-3の構造とその代謝経路およびその代謝に関与する酵素について検討し、CM-3が脱水素酵素による代謝中間体を経て生成することを明らかにした。

薬物代謝に関与する酵素は元来、生体内物質の合成反応を触媒するとともに、体内に投与されたさまざまな薬物を代謝し体外に排泄する。CM-3を生成する酵素がどの内因性物質の代謝に関与する酵素であるかを解明するため、この酵素を精製し検討した結果、3 α -hydroxysteroid dehydrogenase であることを明らかにした。

以上、本論文では高脂血症治療薬PSの体内動態、特に高選択的かつ高感度測定法の確立および代謝経路の解明に焦点をあて得られた研究結果についてまとめた。

第1章　エンザイムイムノアッセイによるpravastatin sodiumの測定[78]

第1節　序

PSは上述のように標的臓器である肝臓に選択的に移行する特徴を持ち、薬物態の指標となる血漿中濃度は極めて低く、臨床検体の測定は電子イオン化法または負イオン化学イオン化法によるガスクロマトグラフィー／マススペクトロメトリー(GC/MS)で行われている[21,22]。一般的に用いられている紫外吸収(UV)検出器を用いたHPLCでは、この low dose の PS を測定するには感度が不十分である。一方、高感度定量法であるGC/MSは生体試料中PSの測定に有用であるが、その測定方法は繁雑で分析前に固相抽出および二種類の誘導体化などの前処理が必要である。こうした観点から、簡便な操作で多数の検体を高感度に測定できる免疫測定法、特にエンザイムイムノアッセイに着目し、特異抗血清の開発を検討した。PSの測定にイムノアッセイを応用する場合、PSを動物またはヒトに投与して生成する図1-Iのような代謝物との交差反応性を避けなければならない。一般に低分子化合物(ハプテン)は免疫原性が低いため、抗体の調製にはウシ血清アルブミン(BSA)のようなキャリア蛋白質にハプテンを結合し、抗原を調製する。この キャリア蛋白質との結合にPSの1位カルボキシル基の利用は最も好ましいと考えられたが、この反応にはN-succinimidyl esterなどの活性エステルへの誘導体化が必要であり、1位カルボン酸はこの活性エステルの合成において5位水酸基と分子内ラクトン化を生じるためにそのままでは利用することができない。そこでこの問題を解決するために二種類のPS誘導体を合成し、キャリア蛋白と結合させ得られた抗原を調製し、これらをウサギに感作することにより抗血清を調製した。各々の抗血清を用いてELISAによる測定法を確立した後、PS投与後のヒト血漿中PS濃度を測定し、GC/MSで得られた結果と比較検討した。

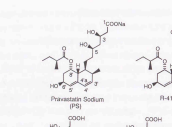


FIGURE 1-1　Structures of Pravastatin Sodium and its Metabolites

第２節　Pravastatin sodiumに対する抗血清の調製

2-1. 感作抗原の合成

抗原の合成は分子内クトン化を防ぐために、1) 1位カルボン酸をキャリア蛋白と結合可能な置換基で修飾する、2) 3位水酸基を除去する、この二種類の方法を検討した。1)の方法はPSの水酸基と反応せず、また1位カルボン酸を活性エステルとして単離することなく置換基で修飾するために、縮合剤としては1工程でアミド化の可能なdiethyl phosphorocyanidate(DEPC)を選択し、側鎖としてはアミノ基とキャリヤ蛋白との結合に利用できるカルボキシル基を有するβ-alanine ethyl esterを選択した。反応は室温で速やかに進行し収率良く、N-PS-β-alanine ethyl ester[1]を得ることができた。このエステル[1]を加水分解し、得られたN-PS-

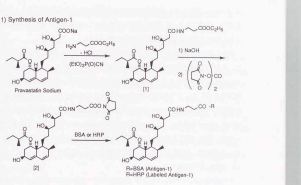


FIGURE 1-2　Syntheses of Antigens and Labeled Antigens

β-alanine(ハプテン-1)にN,N'-disuccinimidyl carbonate を反応して活性エステル[2]を得た。[2]はラクトン化することなく単離することが可能で、細田らの方法[20]により、BSAと反応させ感作抗原-1を得た(図1-2-1)。

2)の方法はPSのラクトン体(R-414)を出発原料として5位水酸基の除去を検討した。R-414の水酸基をt-butyldimethylsilyl基で保護し、ラクトン環を加水分解後diazomethaneでメチルエステル化し、反応性のある置換基が5位水酸基のみの化合物[3]を合成した。この水酸基をmethanesulfonic acid esterとし、LiCl/T.chloride[4]に置換した後、tributyltin hydride[2]より還元的に脱離し、5位の置換基を除去したmethyl ester[5]を得た。このester[5]をtetrabutylammonium fluoride で保護基を脱離した後、加水分解し5-dioxy-PS(ハプテン-2)を合成し、感作抗原-1と同様に活性エステル化後、BSAと反応させ、感作抗原-2に導いた(図1-2-2)。

2-2. 標識抗原の調製

2-1で使用したハプテン-1およびその活性エステルをそれぞれ細田らの方法[20]に準じてdioxane中で西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と反応させ、各々の標識抗原を作製した(図1-2)。

2-3. 抗血清の調製

2-1で得られた二種類の感作抗原をFreund's complete adjuvantとのエマルジョンとして各々3羽のウサギに2週間隔で4ヵ月感作し抗血清を得た。感作抗原-1から得られた抗血清と標識抗原-1を組み合わせELISA-1として、感作抗原-2から得られた抗血清と標識抗原-2を組み合わせELISA-2として使用した。

第3節　ELISAによるpravastatin sodiumの定量法

ウサギのIgGに対するヤギのIgGを第二抗体に使用し、HRP活性はtetramethylbenzidineを用いる細田らの方法[20]に準じて測定し、抗血清との免疫反応性をELISAにおける吸光度(B)で評価した。ELISAに使用するBSPS抗血清の希釈倍率は標識抗原（20ng/ml）を用いたときの希釈曲線から決定した(図1-3)。

この希釈曲線から求めた50%置換点はELISA-1で60万倍、ELISA-2で100万倍であり、図1-3に示したようにこれらのPS抗抗血清はPSと高い親和性を有していた。このアッセイ系を用いて得られた感度は200ngのPS添加時の酵素活性の阻害率によって検討した結果、表 1-1に示したように感度（阻害%）および精度(back-ground%)においてもPSの測定に十分であった。各々3羽のウサギから得られた抗血清の標識抗原に対する50%阻害率(IC$_{50}$)は36-130ng/wellであり、PSに薬物との交差反応性は表1-2に示したようにR-414を除き、高い選択性を有していた。各々3羽のウサギから得られた抗血清のうち、阻害率および選択性の高いELISA-1では抗血清No.1を使用し、およびELISA-2では抗血清No.2を使用して検量線を作成した。これら検量線から求めたPSの測定範囲は5-500ng/well(B$_0$の約90-10%結合に相当)であり、IC$_{50}$についても50-100ng/wellと血漿中PSの測定に十分応用できることが判明した。

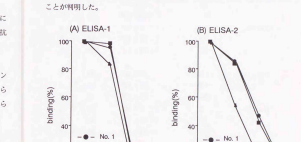


FIGURE 1-3　Antisera Dilution Curves with HRP-labeled Antigens

TABLE 1-1

Inhibition of Bound Enzymic Activity of HRP-labeled Antigens by 200 pg of Pravastatin Sodium

ELISA system (Antiserum No.)		Amount of label (ng)	Antiserum dilution	Inhibition (%)	NSB* (%)
1	(No.1)	10	1 : 5×10^4	60	5
		20	1 : 10×10^4	46	8
		50	1 : 20×10^4	44	17
	(No.2)	10	1 : 5×10^4	56	7
		20	1 : 10×10^4	57	10
		50	1 : 20×10^4	33	21
	(No.3)	10	1 : 5×10^4	59	3
		20	1 : 10×10^4	46	8
		50	1 : 20×10^4	39	15
2	(No.1)	5	1 : 5×10^5	59	4
		10	1 : 10×10^5	48	4
		20	1 : 20×10^4	38	7
	(No.2)	5	1 : 5×10^5	68	8
		10	1 : 10×10^5	52	8
		20	1 : 20×10^4	38	16
	(No.3)	5	1 : 2×10^5	62	5
		10	1 : 5×10^5	51	8
		20	1 : 10×10^4	33	14

* Non-specific binding (background).

TABLE 1-2

Sensitivity and Selectivity of two ELISA Systems for Pravastatin Sodium

ELISA system (Antiserum No.)		IC_{50} (pg/well)	Cross-reactivity (%)			
			R-414	R-416	R-418	R-195
1	(No.1)	74	308	6.2	0.4	0.1
	(No.2)	130	650	6.2	0.4	0.2
	(No.3)	96	367	6.4	0.6	0.1
2	(No.1)	50	2632	7.1	1.0	1.3
	(No.2)	36	1059	6.7	1.1	0.7
	(No.3)	74	1850	4.1	0.4	0.6

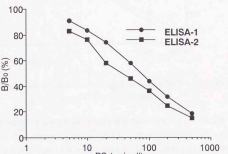


FIGURE 1-4 Dose-response Curves of Two ELISA Systems

第4節　Pravastatin sodium投与後のヒト血漿中濃度の測定

ヒトコントロール血漿に既知量のPSを添加(4ng/ml)し、この血漿2.5-50 μlを用いてELISAによる定量法を検討した(図1-5)。ELISA-1では添加した血漿の容量と吸光度に良い直線性が見られたがそれに比べELISA-2ではわずかではあるが直線性が劣っていた。このことは抗血清の抗原抗体反応に血漿成分がなんらかの影響を及ぼしていることを示した。ELISA-1で血漿中PS濃度を測定したときの日内変動は5ng/mlで4.5%、検出限界は500pg/mlであった。

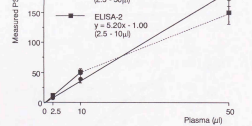


FIGURE 1-5　Influence of the Plasma Volume on the Determination of Pravastatin Sodium by ELISA

健常人ボランティアに10mgの錠剤1錠を経口投与したときの血漿中濃度をELISA-1およびELISA-2で測定し、得られた値とGC/MSで測定した値[9,27]とを比較検討した。この結果、図1-6A,Cに見られるようにELISA-1ではGC/MCと良い相関が見られた(y=1.03x+0.30, r=0.906)。しかしながら、ELISA-2を用いた場合にはGC/MSの2倍の値が測定された(図1-6B)。

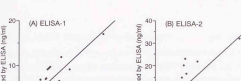


FIGURE 1-6　Correlation Analysis between Two ELISA Systems and GC/MS for Pravastatin Sodium Levels in Human Plasma

またこのときの血漿中濃度推移をELISA-1で測定し、その結果を図1-7に示した。この測定値から求めた濃度曲線下面積(AUC)および半減期($T_{1/2}$)はそれぞれ29.96±5.25ng・hr/mlおよび2.12±0.17hrであり、GC/MSで得られた値とほぼ同じであった。



FIGURE1-7　Plasma Concentrations of Pravastatin Sodium after Oral Administration of Pravastatin Sodium at a Dose of 10mg/body to Humans

第５節　考察

イムノアッセイに用いる抗体はハプテンとキャリヤ蛋白の結合位置、結合様式[26-31]、および結合鎖長[32-34]の産生される抗体の特異性および感度に大きな影響を及ぼす。本章ではPSの高感度定量法としてELISAによる定量法を目的とし、特に代謝物との識別性を考慮してデカリン環を認識するハプテンのデザインを試み、特異性に優れた高力価な抗PS抗血清を得ることができた。TsuyoらはPSの9位水酸基をケトンに酸化した後、carboxymethyloximeとしてキャリヤ蛋白と結合して抗PS抗血清を調製し、ラジオイムノアッセイによる測定において、得られた抗体はR-414およびR-416を認識するもののR-4182の交差反応性が23%あることを報告している[20]。本実験で調製した二種類の抗血清はdecalin環部分の違いに高い認識能を有し、PS26位エピマーである R-418に対しても交差反応性は1%以下と高い選択性を有していた。しかしながら、両アッセイ系ともPSのラクトン体であるR-414に対しては高い親和性を示し、特にELISAではPSよりも100倍以上高い値であった。この原因は感作抗原として使用した抗原が1位カルボン酸部分のアミドを結合による誘導体であり、フリーのカルボン酸よりもその誘導体であるラクトンをより高く認識したと考えられる。また、ELISA-とELISA-2の選択性の違いは5位水酸基の有無およびカルボン酸とキャリヤー蛋白質との結合鎖長が影響し、ELISA-1に用いた抗血清がよりPSに対し認識能を持っているものと考えられた。緩衝液で希釈した血清を用いた測定結果はELISA-1においてGC/MSと良い相関を示したことから血漿中のR-414は少ないものと考えられるが、今後、1位カルボン酸を誘導する感作抗原の合成もしくはモノクローナル抗体の調製などの検討によりR-414との識別も可能になると考える。

第２章　蛍光HPLCによるpravastatin sodiumの測定[36]

第１節　序

第１章ではELISA法によるPSの定量法について述べてきたが、生体内物質による影響およびR-414との交差反応性などの問題点が生じた。そこでHPLCによる高感度かつ高選択的なPS測定法の開発を目指し、血漿中からの抽出、誘導体化および検出法について検討した。

PSのような有機カルボン酸を生体試料中から酸性下、有機溶媒で抽出すると、血漿中に存在する約10μg/mlの生体内カルボン酸も同時に抽出され、蛍光誘導体化後のHPLCによる分析において妨害ピークとなることが予想される。Glencross ら[35]は17-estradiolの測定において生体由来の妨害成分の除去には抗原抗体反応を利用した固定化抗体カラムによる前処理を行っている。このような固定化抗体カラムは最近、薬物[36]、内因性プロスタノイド[38,41]およびplatelet activating factor[42]などの生理活性成分子化合物の抽出に応用されている。本章では第１章で得られた高選択的な抗PS抗体をSepharose 4Bに固定化したイムノアフィニティーゲルを利用して血漿成分からPSの分離、N-dansylethylenediamine(DNS-ED)による蛍光誘導体化[43]、He-Cdレーザー蛍光検出[44,45]を用いたHPLCによる血漿中PSの定量法の開発について記述する。

第２節　固定化抗体カラムによる前処理

2-1. 固定化抗体カラムの作製

第１章で得られた抗血清(ELISA, No.2)をProtein A-SepharoseカラムによりigGに精製後、Cnatrecasus ら[46]の変法によりBrCNで活性化したSepharose 4Bに固定化した。得られたゲルをポリプロピレン製セパコールミニカラムに約1ml充填し、固定化抗体カラムを作製した。

2-2. 固定化カラムからpravastatin sodiumの溶出

500mgのPS水溶液を固定化抗体カラムに負荷し、水洗後、MeOHによる抽出率を検討したが現在までに報告されている低分子を認識する抗体カラムの回収率に比較するとあによる洗浄で約50%が溶出するため63%と低く、そこで血漿試料を想定して、PS-S/BSA水溶液に溶解し、カラムに負荷後、水－MeOHの段階溶出による抽出率を測定した。その結果、図2-1に示したように水の洗浄で約12%が除去されるが80%以上のMeOHで溶出すると約80%が回収され安定した抽出率が得られた。

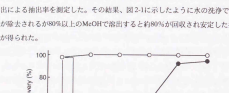


FIGURE 2-1 Elution Profiles of PS and R-416

Shaded columns and open columns represent the recovery of PS and R-416 in each fraction, respectively. The cumulative recoveries of PS (●) and R-416 (○) were plotted.

このカラムの保持容量はPSの負荷量に比例して増加し、1mlのゲルを用いたときの負荷量は830ngで飽和し、500ngまで直線性をもって回収されたことから、負荷量の上限は300ngとした。また、このカラムは生体高分子である抗体を固定化したにもかかわらず、等張リン酸緩衝液、水およびMeOHで洗浄することにより変性することなく再利用可能であった。

第３節　Pravastatin sodiumの蛍光誘導体化

PSの蛍光誘導体化はDNS-EDを用いて、TEA存在下DEPCを縮合剤として行い、反応式を図2-2に示した。

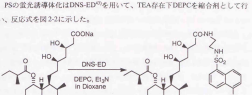


FIGURE 2-2　Derivatization with DNS-ED

誘導体化に対する条件設定はレーザー蛍光検出器を用いたHPLCで生成するPS誘導体のピーク面積を各条件で比較することにより決定した。反応溶媒をdioxane, tetrahydrofuran(THF), AcOEtおよびdimethylformamide(DMF)を用いて検討した結果、dioxaneが最適な溶媒であったが、PSはdioxaneに難溶性なため、誘導体化はPSを少量のDMFに溶解し、試薬のdioxane溶液を加えることにより行った。図２-３に誘導体化に及ぼすDNS-ED量の影響を示した。100mgのPSを100μlのDMFに溶解し、DEPCとTEAの量を一定(0.34M dioxane溶液, 100μl)にして、DNS-ED (dioxane溶液,100μlの濃度を増加する

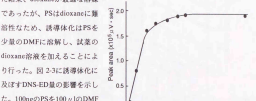


FIGURE 2-3　Effect of DNS-ED Concentration on the Derivalization

と、100 μg/mlの濃度までPS誘導体の増加が認められたが それ以上の濃度ではほぼ一定となり、PSの濃度が低くても、このDNS-EDの濃度は必要であり、DNS-EDの濃度を100 μg/mlに固定した。誘導体化に及ぼすTEAおよびDEPCの濃度変化を図2-4に示した。DNS-EDの濃度を一定の100 μg/ml(0.34 mM)としたとき、DEPCとTEAはともに0.34M(DEPC:51.8 μl/ml in dioxane、TEA:47.6 μl/ml in dioxane)の濃度で最も反応率が高く、試薬類はこの濃度の前後を用いて誘導体化を行った。この結果、誘導体化は固定化抗体カラムから抽出したPS(100 μl)をDMFに溶解し、試薬(dioxane溶液)を100 μl加えると反応は非常に速やかに進行し、5分間室温放置で安定したピークが観察された。PSの定量は固定化抗体カラムで採取されるR-416を内部標準物質として前処理後に加え、PSと同時に蛍光ラベル化を行った。



FIGURE 2-4 Influence of DEPC and TEA Concentrations on the Derivatization

第4 節 HPLCによるpravastatin sodiumの定量法

4-1. 蛍光誘導体の分離

反応混合物を直接分析カラムに注入すると極めて多くのピークが現われ、低濃度のPSの定量は困難であったので、本研究ではカラムスイッチング法[91]を検討した。蛍光誘導体の物性を考慮して、二種類の逆相カラムを選択し、高極性のC4カラム(カラム-1)で大部分の試薬類や副生成物を除去し、PSとR-416の誘導体を二

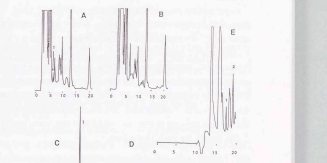


FIGURE 2-5 Typical Chromatograms of Reagents, Plasma Blank, and Samples Spiked with PS Obtained from the C18 Column Alone (A, B) and by the Column-Switching Technique (C-E)

A: standard PS derivatized with DNS-ED(1 μ g), B: reagent blank for A, C: extracted and derivatized plasm sample spiked with PS (PS: 50ng, IS: 10ng), D: blank for C, except the concentration (PS: 0.5ng, IS: 1ng). 1: PS, 2: R-416(IS: Internal standard).

本日のODSカラム(カラム-2)に導入し分離定量を行った。種々の前提条件を検討し、カラム-1には30%、カラム-2には50%のCH_3CNを用いることによりピークのブロード化を抑いた。図2-5にODSカラムのみによる分離とカラムスイッチング法によるクロマトグラムを示した。PSおよびR-416の蛍光誘導体はカラム-1から7.5-10分の間に溶出されるが実験目毎に分離の確認とカラム-2への導入時間の設定を行った。

4-2. 検量線

ラットの血漿に0.5-100ng/mlの範囲でPSを添加後、本法で測定し、そのピーク面積および高さを内部標準物質のそれらと比較し、検量線を作成し、その結果を表2-1に示した。ピーク面積および高さから求めた検量線はどちらも原点を通る良い直線性を示し、相関係数はどちらも0.998であった。検量線作成時のn=3のデータについて、本法の測定精度を評価した結果、ピーク面積法による全濃度についてのCVの値の平均は6.6%であり、最も濃度の薄い0.5ng/mlの試料のみで15.8%とやや高いバラツキが見られた。これはクロマトインテグレータによる面積の測定がベースラインイオンの最低値を結んだ線を基準に行われているために思われる。用手法によるピーク高さ法ではこの点が補正され、CV値は3.19%と他の濃度と同様に精度良く測定できることが示された。

TABLE 2-1 Linearity and Precision of Calibration Curves

Amount added (ng)	Peak area (n=3)		Peak height (n=3)	
	PS/R-416	CV (%)	PS/R-416	CV (%)
0.5	0.045	15.8	0.047	3.19
1	0.103	5.80	0.108	7.07
5	0.47	6.51	0.55	6.56
10	0.87	7.83	1.05	4.50
15	1.27	7.44	1.45	6.41
20	1.68	5.48	1.94	4.44
50	3.80	1.32	4.59	3.36
100	8.40	2.73	9.95	1.81
	r=0.998	Ave=6.58	r=0.998	Ave=4.67

4-3. 検出限界と定量限界

本法で利用したレーザー光励起による蛍光検出法[**,**]を、通常の蛍光検出およびUV検出法と比較しながら、検出限界を検討し、結果を図2-6に示した。

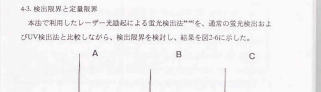


FIGURE 2-6 Comparison of the Detection Limit of PS-DNS-ED Adduct by Three Different Detection Methods in HPLC with a C18 Column
The detection limit (DL) was determined at a signal-to-noise level of 2. A: UV(259nm) detection with 10ng/injection, and DL was 1ng; B: conventional fluorescence detection (excitation at 350 and emission at 530nm) with 50ng/injection, and DL was 40pg; C: laser induced fluorescence detection with 15pg/injection, and DL was 2pg.

標準溶液10 μlを注入したときのHe-Cdレーザー蛍光検出器で測定したS/N(シグナル/ノイズ)=2の検出限界は2pgであり、その感度は通常の蛍光検出器の約20倍高く、UV検出器の約500倍であった。PSを添加したlmlの血漿を用いて抽出、誘導体化後、その10 μlをHPLCによって測定し、求めた定量限界は約100pg/mlであったが、用いる血漿の量およびHPLCへの注入量を増加することによって改善されると考えられる。

第5図 Pravastatin sodium投与後の実験動物血漿中濃度の測定

PSをラット (20mg/kg) およびイヌ (5mg/kg) に経口投与し、その時の血漿中濃度推移を本法で測定し、得られた結果を図2-7に示した。どちらの動物種においても吸収は速いが血漿中濃度は低く、^{14}C標識したPS投与後の結果[16]と良く一致した。

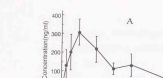


FIGURE 2-7　Profile of PS Concentrations in Plasma after Oral Administration
A: Rats (20mg/kg) and B: Dogs (5mg/kg)

第6節　考察

本法で利用した固定化抗体カラムは固定化に用いた抗PS抗体の特異性により、選択的かつ簡便な前処理を可能とした。このカラムからPSの回収率は食前溶液としても本を用いた場合63%であるのに対し、5%BSAまたは血漿を用いた場合には80%以上であった。この回収率の違いの原因は明らかではないがBSAもしくは血漿中の蛋白質がカラム壁または固定化抗体ゲルの吸着障害に何らかの作用を及ぼすものと考えられる。この回収率は他の固定化抗体カラムを利用した前処理法とほぼ同等であった[9,39,42]。内部標準物質R-416はこの固定化抗体カラムに対し親和性を持たず、本による洗浄で除くことができることおよび蛍光誘導体のカラム-1における保持時間がPSのそれとほぼ近く、分析カラムによって分離可能であることから選択した。

HPLCにおける高感度検出法の一つに蛍光法があり、現在までにHPLCを用いたカルボン酸の定量法として多くの蛍光誘導体化試薬、例えば、4-(bromomethyl)-7-methoxycoumarine[38]、9-anthryldiazomethane[20]、p-(9-anthryloxy)phenacyl-bromide[31]、1-(bromoacetyl)pyrene[32]、3-(bromomethyl)-6,7-(methylenedioxy)-1-methyl-2(1H)-quinoxaline[23]、monodansylcadaverine[33]などの試薬が開発されている。しかしながら、これらの多くは試薬自身または生成する蛍光誘導体の感度が低い、長い反応時間や加熱を要する、あるいは安定性が悪い等の問題がある。この研究においてはisoprofenの定量法に用いられているDNS-ED誘導体による化学発光または蛍光検出法[43]を利用した。誘導体化は簡単で前にPSのカルボキシル基とDNS-EDをDEPCでアミド結合で縮合する方法で、monodansylcadaverineを用いた誘導体化[33]と異なり、TEAがアミド結合生成に必須であった。この縮合反応は室温下、非常に速く進行し、生成物は4℃で数日間は安定でPSの誘導体化に非常に有用であった。

ODSカラムに誘導体化後の試料を直接注入するとPS誘導体の他に多くのピークが現われ、100ng/ml以下の低濃度の分離定量は困難であった(図2-5)。そこで誘導体化により生じる副生成物および過剰な試薬を除去する目的でカラムスイッチング法[40]を利用した。この方法は一本のODSカラムからの溶離液が2-3ml二本目のカラムに導入するため、有機溶媒組成比に20%の差を持たせ、カラム-2での拡散を抑制し、分離のブロードピーク化を防がなければならない。極ゆえに、結果、カラムは無性の異なる二本の逆相カラムのC4とODSを組み合わせ、溶媒にCH3CNを用いることにより、多くの諸害ピークが除去され、微量な試料の測定が可能になった(図2-5)。

イムノアフィニティーカラムによる選択的抽出、さらに蛍光誘導体化からなるPSの測定法は感度をさらに高めるためにレーザー光の利用を検討した。蛍光検出法にエネルギーの高いレーザー光を利用すれば高感度が期待できることは容易に考えられる。しかしながら、光源にレーザー光を利用しただけでは考えられるほど感度は上昇しない。これはセルへの入射光量が増加すると、蛍光強度の他にレーリー散乱、ラマン散乱、研所や反射等によるバックグラウンド蛍光も上昇するためである。本実験ではこれらのバックグラウンド蛍光の少ない光ファイバーによりレーザー光を直接検出部に導入する市販の蛍光検出器を用い、DNS誘導体の最高励起波長が350nmであることからUV325nmのHe-Cdレーザー光を選択し、HPLCによる高選択的かつ高感度定量法を開発した。

第１章　Glutathione抱合体の生成経路[93]

第１節　序

投与された薬物は吸収、分布、代謝の過程を経て、体外に排泄される。薬物の体内での代謝を検討する場合、その薬物を実験動物に投与し、排泄された尿、糞、胆汁および各臓器中から、代謝物を単離精製するin vivo実験法と各臓器のスライス、遊離肝細胞およびホモジネート、可溶性画分もしくはミクロゾームなどの細胞画分を用いるin vitro実験法がある。In vitro実験法は多くの場合、生成する代謝物が量的に少ないものの精製の段階で生体成分が少なく単離が容易であり、その中でも細胞を用いる実験は第Ⅰ相反応および第Ⅱ相反応を同時に観察できる利点がある。そこで、PSの主要抗臓器である肝臓中での代謝をラット遊離肝細胞[19]を用いて検討した。

14Cで標識したPSをラット遊離肝細胞と反応させると極性および非極性代謝物の他にCM-1およびCM-2の二種類の主代謝物と微量代謝物CM-3が生成した。代謝経路を検討するには、代謝中間体を生体試料から単離精製するか、またはその代謝物から代謝中間体を予想して化学的に合成し、その中間体の代謝を検討する方法がある。しかしながら、これら代謝中間体は一般的に不安定で生体試料中から取り出すことは難しい。本章では、PSの代謝物CM-1およびCM-2の単離、構造解析とその予想代謝中間体を合成し、生成経路を解明した。

第２節　ラット遊離肝細胞によるpravastatin sodiumの代謝

Moldeusらの方法[19]に準じて調製した2x10[6]個/ml/dラット遊離肝細胞浮遊液に14Cで標識したPSを終濃度0.1mMの濃度で加え、37℃でインキュベートすると、図3-1に示したように非極性および極性代謝物の他に主代謝物としてR-416、CM-1、CM-2およびCM-3の生成が認められた。

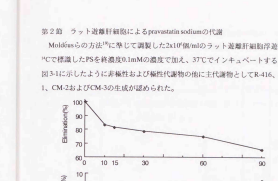


FIGURE 3-1　Elimination of Pravastatin Sodium (upper) and Formation of Its Metabolites (lower) in Isolated Rat Hepatocytes

◆, Pravastatin sodium; ●, CM-1; □, R-416; △, Non-polar metabolites; ■, CM-2; ○, Polar metabolites; ▲, CM-3.

反応液中のPSは30分で79%、60分で75%そして90分後には60%に減少し、PSの減少にともなって代謝物が増加した。これらの代謝物の中でPSの構造異性体であるR-416および6'位のエステルが鏡像違方香環化したCM-3(R-195)は標準試料のTLCのRf値、HPLCの保持時間およびMSスペクトルを標準試料のそれらと比較しR-195と同定した。CM-1およびCM-2はODSを充填したカートリッジカラムで粗精製した後、分取用ついで分析用ODSカラムを用いたHPLCを用いて分取精製した。

第３節　代謝物 CM-1およびCM-2の構造解析

単離精製したPSの遊離肝細胞による代謝物CM-1は２次イオン化マススペクトルにより構造解析を行い、そのマススペクトルを図3-2に示した。

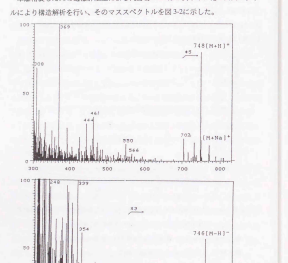


FIGURE 3-2　Mass Spectra of CM-1, the Glutathione Conjugate of Pravastatin Sodium

The positive (upper) and the negative (lower) secondary ion mass spectrum.

陽イオン検出では分子イオンがm/z 748 [M+H]+、とm/z 770 [M+Na]+のピークとして、また陰イオン検出では分子イオンがm/z 746 [M-H]-とm/z 768 [M-2H+Na]-のピークとして観察されたことから、CM-1の分子量は親化合物（MW 424）より323増加した747であることが明らかとなった。この323マスユニットの増加はglutathioneの分子量に相当し、CM-1はglutathione抱合体である可能性が強く示唆された。そこで、酵素を用いた分解反応をTLCおよびマススペクトルを用いて検討し、その時のTLCパターンを図3-3に示した。

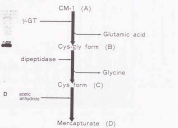


FIGURE 3-3　Enzyme Hydrolysis and Acylation of CM-1

CM-1はγ-glutamyltranspeptidase(γ-GT)およびdipeptidase(dehydropeptidase-1,DHP-1[9])による処理、ついで無水酢酸によるアセチル化を順次行うとTLC上のスポットは反応毎に上方に移動し、生成した分解物のマススペクトルではそれぞれ129（glutamic acid）、58（glycine）マスユニットの減少およびアセチル化による42マスユニットの増加が見られた。このことはγ-GTの作用によるglutathione基からglutamic acidの脱離、ついでDHP-1による glycineの脱離、そして無水酢酸によるアセチル化の反応が順次進行したことを示唆し、CM-1はglutathione抱合体であることを確認した。

基礎精製したCM-2はdiazomethaneでmethyl化後、bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamideにより trimethylsilyl化しGC/MSで測定した結果、一つのカルボン酸と五つの水酸基が認められ、5つに二つの水酸基が導入された代謝物であることが示唆された(図3-4)。

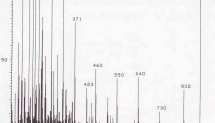


FIGURE 3-4 Mass Spectrum of CM-2, the Dihydrodiol Isomer of Pravastatin Sodium

CM-1およびCM-2の構造は中村ら[7]による一次元^{1}H-NMRスペクトル、^{1}H-^{1}Hおよび^{13}C-^{1}H二次元シフト相関NMRスペクトルを用いた解析により、glutathioneおよび水酸基の結合位置およびその立体構造が明らかにされた。この結果CM-1はglutathioneが4-α位に、水酸基がβ位に導入され、CM-2は二つの水酸基が5-αおよび5-β位に導入された代謝物であると決定された。CM-1およびCM-2の^{1}H NMRとそれらの構造を図3-5に示した。

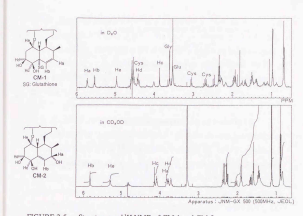


FIGURE 3-5 Structures and ^{1}H NMR of CM-1 and CM-2

第4節 推定代謝中間体の合成

浜野ら[20]はPSのラクトンにm-chloroperbenzoic acidを作用させ4-α,5-β,5-β-epoxy-PS-lactoneを合成し、このものを加水分解後、酸性条件下でCM-2が得られることを報告している。CM-1およびCM-2の構造からこれらの代謝物も同様にepoxide中間体を経由して生成することが想定されたので、PSのepoxide体の合成を検討し、合成法を図3-6に示した。浜野らの合成法に準じてエポキシ化、次いでアルカリ条件下加水分解し、4-α,5-β,5-epoxy-PSを合成した(図3-6-1)。このepoxy-PSはアルカリ条件下では比較的安定であるがその精製は困難なため、精製せずに第5節の実験に使用した。また、図 3-6-2に示すようにR-414の水酸基をt-butyldimethylsilyl基で保護し、m-chloroperbenzoic acidを作用させると二種類のepoxide体の生成が認められ、各々をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離した。

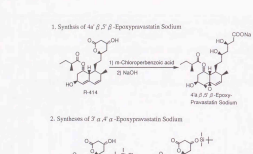


FIGURE 3-6 Syntheses of 4α,β,5′β- and 3′α,4′α-Epoxy-Pravastatin Sodium

これら二種類のepoxide体は中村ら[7]によるNMRスペクトルの解析から、一つは4α,β,5′β-epoxide体[2]であり、もう一方は3′α,4′α-epoxide体[3]であった。[2]と[3]の生成比は約1:4で[3]が主生成物であり4α,β,5′β-epoxide体が選択的に生成する反応と異なっていた。[3]の保護基を脱離し、ラクトン環を加水分解して3′α,4′α-epoxy-PSを得た。このepoxide体は4α,β,5′β-epoxy-PSに比較して緩衝液中でも安定であった。

第5節 CM-1およびCM-2の生成経路

CM-1およびCM-2の生成経路は得られた二種類のepoxide体とglutathione-S-transferaseの存在するラット肝可溶性画分とを反応させ、HPLCによりCM-1とCM-2の生成を観察して確かめた。図3-7から明らかなように4α,β,5′β-epoxide体からはCM-1とCM-2の生成が見られたが3′α,4′α-epoxide体からはこれらのピークは認められなかった。これらの結果、PSからCM-1およびCM-2への代謝は同一の代謝中間体4α,β-5′β-epoxide体を経由して生成することが強く示唆された。この4α,β,5′β-epoxide体の濃度を変化させて肝可溶性画分とインキュベートし、CM-1およびCM-2の生成を検討するとCM-1の生成は基質である4α,β,5′β-epoxide体の濃度が高くなるに連れて飽和現象が見られたが、CM-2の生成は基質の濃度に比例して直線的に上昇した(図3-8)。また、透析によりglutathioneを除去した肝可溶性画分に基質を添加しインキュベートするとCM-1の生成は認められなかったが、CM-2の生成は直線的に増加し、glutathioneを添加することによりglutathione抱合体は再生され、CM-1の生成が確認された。またこのepoxide体は緩衝液中でも透析した肝可溶性画分とほぼ同じ速度で分解し、CM-2を生成した。これらの結果からCM-1の生成は酵素関与の反応であり、CM-2の生成はdecalin環の二重結合の分子内転位をともなって水酸基が3′位に入る非酵素的な分解であることが示唆された。この4α,β,5′β-epoxy-PSと肝可溶性画分の反応から得られたglutathione抱合体はラット遊離肝細胞とインキュベートし生成するCM-1と同一の構造であることをNMRスペクトル、マススペクトルおよびHPLCの保持時間より確認した。

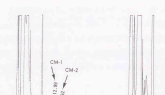


FIGURE 3-7 HPLC Profiles of the Products Obtained from Incubation of Pravastatin Epoxides with Rat Hepatic Cytosol

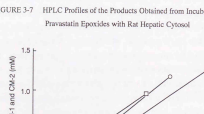


FIGURE 3-8 Formation of CM-1 and CM-2 from the 4'α,5',β-Epoxide in Rat Hepatic Cytosol

▲ and △, CM-1 formation in cytosol and in dialysed cytosol, respectively. ●, ○ and □, CM-2 formation in cytosol, in dialysed cytosol and in medium buffer (without cytosol), respectively.

第6節 P-450を誘導または阻害したラット遊離肝細胞によるpravastatin sodiumの代謝

Phenobarbital(PB)および3-methylchoranthrene(MC)を前投与し、P-450を誘導したラット遊離肝細胞による代謝、およびその阻害剤であるSKF-525Aを添加した阻害実験を行い、結果を図3-9に示した。PBで誘導したラット遊離肝細胞によって、CM-1およびCM-2の生成は正常ラットに比較して約2倍および1.5倍に増加し(60分インキュベート後)、MCで誘導したラット遊離肝細胞ではそれぞれ1.5倍および2倍の増加が認められた。それらとは対照的にSKF-525Aを添加した系ではPSが減少せず、CM-1およびCM-2の生成は観察されなかった。これらの結果、PSの遊離肝細胞による代謝にはP-450が関与することが強く示唆された。

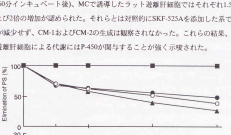


FIGURE 3-9 Effect of Phenobarbital and 3-Methylchoranthrene Pre-treatment to Rats and SKF-525A Inhibition on Elimination of Pravastatin Sodium(upper), Formation of CM-1(middle), and CM-2(lower) in Isolated Rat Hepatocytes

●, Normal hepatocytes; ▲, Induced with PB; ○, Induced with MC;
■, Inhibited with SKF-525A

ラット遊離肝細胞を用いたPS2のin vitro代謝実験により、二種類の主代謝物の構造とその生成経路に関する検討を行った結果、生成する主代謝物CM-1およびCM-2は同一のepoxide中間体を経由することが示唆された。Glutathione抱合体を生成する一つの経路にepoxide中間体経由の代謝が知られている[9]。ラット遊離肝細胞によって得られた主代謝物CM-1およびCM-2の構造、そしてP-450を誘導したラット遊離肝細胞による代謝およびその阻害実験から、このPSの代謝はepoxide中間体を経由することが示唆された。PSはその構造に共役する二つの二重結合を有するdecalin骨格を持っている。図3-10にdecalin環の二つの二重結合が酸化された生成すると考えられる四種類のepoxideの構造およびCM-1とCM-2の生成する可能性を示した。

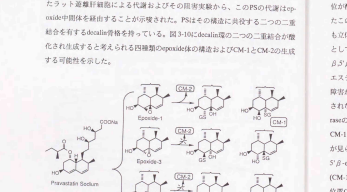


FIGURE 3-10 Structures of Glutathione Conjugates and Dihydrodiol Metabolites from Corresponding Pravastatin Epoxides

この四種類のepoxide体の中で、epoxide-1とepoxide-2はCM-2の生成が可能な構造であり、他の二種類のepoxide体は水酸基の導入されるα位置およびβ位構造を考慮するとCM-2の生成が不可能と考えられる。そこでPS2のepoxide体の合成を検討した結果、epoxide-1およびepoxide-2は化学合成によって得ることができたが他の二種類のepoxide体は得られなかった。このことは4位に水酸基が存在するときには水酸基の存在する面から酸化試薬が攻撃し、水酸基に近いα-二重結合のβ配位が酸化され、4'aおよびβ epoxide体(epoxide-1)が生成するものと考えられる。またこの水酸基をかさ高いt-butyldimethylsilyl基で保護するとこの効果は消失し、結果立体障害の少ないサブ二重結合のα側に試薬が攻撃し、3'α,4'α epoxide体が主として生成し、次いで立体障害の少ないα-サブ二重結合のβ側から酸化された4'aβ,5'β-epoxide体が得られるものと考えられる。4'a位二重結合のα側は8'α位のエステル基による立体障害、3'位二重結合のβ側は2'β位のmethyl基による立体障害があるために試薬の攻撃を受けにくく、これらの二種類のepoxide体が生成されないものと考えられた。得られた二種類のepoxide体をglutathione S-transferaseの存在するラット肝可溶性画分とインキュベートすると、epoxide-1からはCM-1とCM-2の生成が見られたが、epoxide-2は安定で反応を受けずそれらの生成が見られなかった。このことからCM-1とCM-2の生成は同一の代謝中間体(4'a,5'β-epoxy-PS)を経由する代謝反応であることを示唆した。Glutathione抱合体(CM-1)のglutathione結合位置(4'a-α)とdihydrodiol体(CM-2)の水酸基の導入された位置(3'α-O)の違いはCM-1の生成が酵素反応与えるものにおけて、CM-2の生成は非酵素的な加水分解によるものと考えられる。CM-2の生成はエポキシ基にまずH^+イオンの攻撃しエポキシ環が開環し、5'位が水酸基となり生成した4'a位のカチオン→立体障害のためOH^-イオンが攻撃できず、二重結合の転位をともなって3'位に水酸基が導入したためと考えられる。これらのことから解明したPSからglutathione抱合体(CM-1)およびdihydrodiol体(CM-2)への代謝経路を図3-11に示した。

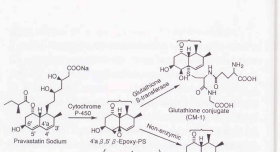


FIGURE 3-11 Plausible Metabolic Pathways of Formation of CM-1 and CM-2

一般的にglutathione抱合体は胃腸においてさらにglutamic acidの脱離(cysteinyl-glycine conjugate)、glycineの脱離(cysteine conjugate)およびアセチル化(N-acetyl-cysteine conjugate, mercapturic acid derivative)の代謝を受け、尿中へ排泄されることが知られている。その後の研究で胸井ら[9]はラットおよびサルにPSを投与し、このglutathione抱合体およびその代謝物が血漿および胆汁中に存在していることを報告している。本章ではPSの*in vitro*における代謝研究から予想代謝中間体を合成し、投与した薬物の代謝経路を解明した。

第2章　Pravastatin sodiumの代謝に関与する脱水素酵素[8]

第1節　序

薬物代謝の研究においてその薬物の代謝経路およびその代謝に関わる酵素がどの内因性物質に関与しているかを知ることは安全性および薬効を考える上で重要である。薬物の代謝に関与する多くの酵素はin内因性物質の代謝に関わり、組織分布、動物種および基質特異性などに差があることが知られている。

本章ではCM-3の生成経路およびその代謝酵素について記述する。ラット遊離肝細胞によりPSから生成した代謝物CM-3の代謝経路を予想中間体として合成した6'-keto-PSを指標にして解明した。また、この代謝経路に関わる酵素は肝可溶性画分に存在し、補酵素としてNADPまたはNADを必要とし、動物種ではラットに高い活性を持ち、また肝臓に多く存在した。肝可溶性画分を用いてCM-3の生成阻害を調べると3 α -hydroxysteroid脱水素/Δ3-ketosteroid異性高い阻害活性がみられ、精製した酵素の基質特異性を調べた結果、3 α -hydroxysteroid dehydrogenaseであることが強く示唆された。

第2節　代謝物CM-3の生成経路

2-1. ラット肝遊離画分によるpravastatin sodiumの代謝

ラット遊離肝細胞によりPSから微量代謝物として CM-3が生成することから、この代謝に関わる酵素がどの細胞画分に存在するか検討した。ラット肝臓の9000xg上清に補酵素としてNADおよびNADPを添加してインキュベートするとPSからCM-3のみがHPLCによって観察された。この9000xg上清をさらにミクロゾームと可溶性画分に分画して調べると、PSは可溶性画分で代謝され、ミクロゾームではほとんど代謝を受けなかった。このことから、PSからCM-3の生成に関与する酵素は肝可溶性画分に局在していることが示され、その結果を図4-1に示した。

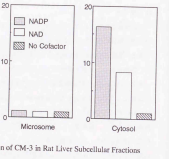


FIGURE 4-1　Formation of CM-3 in Rat Liver Subcellular Fractions

2-2. 代謝中間体R-104の合成

医野らはR-195(CM-3)を、PSの6'位水酸基の酸化によるketone体経由で合成している。この合成経路でPSの代謝が進行すると考え、代謝中間体として6'-keto-pravastatin(R-104)を合成し、PSからCM-3の生成経路の検討に利用した。

合成方法は図4-2に示すように、R-414をpyridinium chlorochromate(PCC)により6'位を酸化しketone体[2]に導びき、この6'-ketolactoneをアルカリ条件下加水分解してR-104を得た。本反応過程において、中間体のR-104はアルカリ条件下で速やかにCM-3に変換するため、0℃で反応を行い、反応終了後直ちに酸性としてCHP-20(ポーラスポリマー)カラムにより、最終生成物CM-3(R-195)と分離精製した。

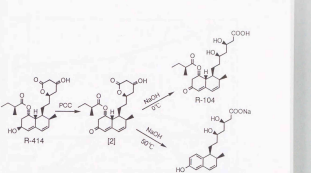


FIGURE 4-2　Syntheses of R-104 and CM-3

2-3. ラット肝可溶性画分によるpravastatin sodiumの代謝

PSからCM-3の生成経路を検討するために、まず2-2で合成したR-104の各種pH緩衝液中での安定性をHPLCによって検討した。この結果R-104は中性付近のpHでも容易に脱ラクトン化後芳香環化しCM-3に分解した。この反応はアルカリ性になるほど速く、2時間後のCM-3の生成率はpH7.4で30%、pH9では50%であり、R-104からCM-3の生成が実験室的な分解反応であることを示唆した。

ついでラット肝可溶性画分を用いてPSの代謝を検討した。PSをNADP存在下、ラット肝可溶性画分と2時間までインキュベートし、HPLCでR-104およびCM-3の生成を経時的に追跡した。この結果は図4-3に示したように、まずR-104が生成し、ついでCM-3の生成が認められた。

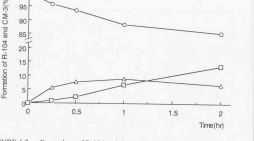


FIGURE 4-3　Formations of R-104 and CM-3 from Pravastatin Sodium in Rat Liver Cytosol (37℃, PS conc.: 0.5mM)
○, PS; △, R-104; □, CM-3.

これらの結果、PSからCM-3の生成はまず肝可溶性画分中の脱水素酵素(PS 6′β-hydroxydehydrogenase)によりR-104が生成し、ついで非酵素的な分解によってCM-3が生成するものと考えられた。

第3節　CM-3の生成に関与するPS 6′β-hydroxydehydrogenaseの諸性質

3-1. PS 6′β-hydroxydehydrogenaseのpH依存性および反応条件の決定

PS 6′β-hydroxydehydrogenaseのpH依存性を調べるため、ラット肝可溶性画分に適当量の緩衝液を加えpHを3.0から12.2に変化させ、PSからR-104および CM-3の生成量をHPLCにより定量した。pH9.0以下は0.1Mリン酸緩衝液、pH9.0以上は0.1M Glycine-NaOH緩衝液を用い、補酵素としてはNADおよびNADPを用いて検討し、結果を図4-4に示した。

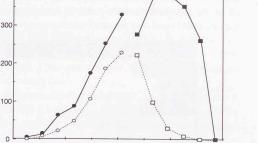


FIGURE 4-4 pH Profiles of PS 6′β-Hydroxydehydrogenase in Rat Liver Cytosol
●, Phosphate buffer, +NADP; ○, Phosphate buffer, +NAD;
■, Glycine-NaOH, +NADP; □, Glycine-NaOH, +NAD.

これらの結果からPS 6′β-hydroxydehydrogenaseの至適pHはNADPを用いたときは9.8、NADを用いたときは8.8であった。また、この酵素反応における最適条件は蛋白濃度が1mg/ml、インキュベート時間が20分であり、pH9.8の条件では生成したR-104がほとんどCM-3に分解した。従って、以下の酵素反応は補酵素としてNADP、緩衝液としてpH9.8のglycine-NaOH緩衝液を用い、インキュベート20分後に生成するCM-3をHPLCで測定した。

3-2. PS 6′β-hydroxydehydrogenaseの動物種差

各種動物の肝可溶性画分を用いてPS 6′β-hydroxydehydrogenaseの活性を比較し、種差について検討した。結果は図4-5に示したようにウサギ、モルモット、サルではその生成量が25-45nmol/mg蛋白であったのに対してラットではその約6-

8倍高い活性を示した。またイヌではこの活性はほとんど見られず、ヒトはイヌとモルモットの中間で15nmol/mg蛋白であった。この結果、このPS δ-hydroxydehydrogenaseはラットに特異的に活性の高い酵素であることが示唆された。

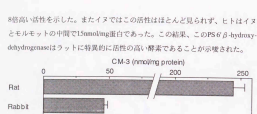


FIGURE 4-5 PS 6' β-Hydroxydehydrogenase Activity in Liver of Various Species

3-3. ラットにおけるPS 6' β-hydroxydehydrogenase活性の組織分布

ラットの肝臓、腎臓、肺、小腸、脳および心臓の可溶性画分を用いて、PS 6' β-hydroxydehydrogenase活性を検討し、結果を図 4-6に示した。この酵素活性は肝臓において最も高く、ついで肺に圧倒の約1/2の高い活性が見られ、小腸、心臓の活性は肝臓の約1/6であり、腎臓および脳には活性がほとんど見られなかった。

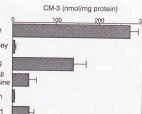


FIGURE 4-6 Tissue Distribution of PS 6' β-Hydroxydehydrogenase in Rats

3-4 各種酵素阻害剤による影響

PS 6' β-hydroxydehydrogenaseの性質を検討するために各種阻害剤を用いて酵素阻害実験を行い、結果を図 4-7に示した。PSから CM-3の生成阻害はquercetin, indomethacin, 5 α-androstan-3 α -ol-17-oneおよびtestosteroneで10%以下に強く阻害され、cholic acidおよびphenobarbitalでは弱い阻害が見られ、pyrazole, 3 α -および3 β-hydroxyhexobarbitalでは阻害されなかった。またPSの矛盾エピマーである4-AIBを阻害剤として用いても阻害は見られず、基質として用いた CM-3の生成は全く認められなかった。

各種hydroxysteroid類を阻害剤（終濃度0.1mM）として用いると検討したすべてのステロイドで阻害が見られた。しかしながら、阻害剤の終濃度を0.02mMにすると表 4-1に示すように3 α -hydroxysteroid類および3-ketosteroid類に阻害活性が見られた。

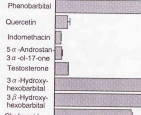


FIGURE 4-7 Effects of Various Inhibitors on PS 6' β-Hydroxydehydrogenase

TABLE 4-1 Inhibition of PS 6'β-Hydroxydehydrogenase by Steroids

(PS conc.: 0.5mM, inhibitor conc.: 0.02mM)

Inhibitor	% inhibition
5α-Androstan-3α-ol-17-one	30.4±5.9
5α-Androstan-3β-ol-17-one	4.4±5.6
5β-Androstan-3α-ol-17-one	4.9±5.5
5β-Androstan-3β-ol-17-one	0.0±8.6
4-Androsten-17β-ol-3-one	25.7±8.5
5α-Androstan-17β-ol-3-one	51.2±5.2
5β-Androstan-17β-ol-3-one	41.1±2.7

第4節 PS 6'β-hydroxydehydrogenaseの精製

酵素を含む蛋白質の分離には基質となる化合物を不活性な担体に固定化したアフィニティークロマトグラフィーによる精製が知られている。そこでR-414のラクトン環を1,6-diaminohexaneでアミン分解し、得られた1-N-PS-1,6-diaminohexane[1]をCuatrecasasらの方法[9]でBrCNで活性化したSepharose 4Bに固定化しアフィニティーゲルを調製した(図4-8)。

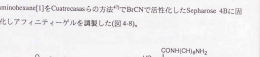


FIGURE 4-8 Preparation of Affinity Gel

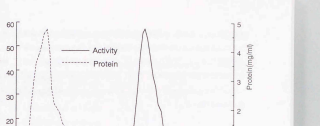


FIGURE 4-9 Elution Profile of PS 6'β-Hydroxydehydrogenase

この調製したアフィニティーゲルを用いて、ラット肝可溶性画分からPS 6'β-hydroxydehydrogenaseの精製を検討した。可溶性画分を10mMリン酸緩衝液で透析後、アフィニティーカラムにかけ、10mMから50mMのリン酸緩衝液のリニアグラジエントで溶出した。溶出パターンを図4-9に示した。ほとんどの蛋白質は8-30フラクションの間に溶出され、酵素活性のある画分は75-120フラクションに溶出された。このアフィニティーカラムは1回の使用で比活性を約17倍に高め、かつ精製収率も約90%と良好であり、PS 6'β-hydroxydehydrogenaseの精製に有効な



FIGURE 4-10 SDS-PAGE of Purified PS 6'β-Hydroxydehydrogenase

1: marker, 2: cytosol,
3: PS 6'β-hydroxydehydrogenase

手段であった。その後、0-500mMNaCl水溶液を溶出溶媒としたDEAE-Sepharoseカラムによる精製およびPb-500mMリン酸緩衝液を用いたhydroxylapatiteカラムによる精製を2回行った。これらの精製によってその酵素活性は107倍に上昇し、最精製標品は1%であった(表4-2)。精製したPS 6β-hydroxydehydrogenaseは図4-10に示したようにSDS-PAGEで単一なバンドとなり、この電気泳動から求めた分子量は36,000であった。

TABLE 4-2　Purification of PS 6β-Hydroxydehydrogenase from Rat Liver Cytosol

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Cytosol	2358	10399	4.41	100	1
PS Affinity Gel	120	9258.6	77.2	89.0	17.5
DEAE-Sephacel	44.6	3992.5	89.5	38.4	20.3
Hydroxylapatite-1	4.14	1864.2	450.3	17.9	102.1
Hydroxylapatite-2	2.41	1135.2	471.5	10.9	106.9

第5節　PS 6β-hydroxydehydrogenaseの基質特異性

精製したPS 6β-hydroxydehydrogenaseの基質特異性を検討した。反応は生成するNADPHを340nm2UV波長で定量し、その生成量により基質の親和性を表わすKm値およびVmax を求めた(表4-3)。酵素反応は3α-hydroxysteroid類を基質にしたときのみNADPHを産生し、肝可溶性画分との反応でCM-3の生成阻害の見られた3α-ketosteroid類およびその他のsteroid類はNADPHの生成が観察されなかった。これらの結果、PS 6β-hydroxydehydrogenaseは3α-hydroxysteroid dehydrogenaseと考えられた。しかし、この酵素に対するPSのVmax/Km値は内因性物質である3α-hydroxysteroid類に比べ、1/5-1/60倍と小さい値を示した。

TABLE 4-3　Substrate Specificity of Purified PS 6β-Hydroxydehydrogenase

Substrate	Km (μM)	Vmax (nmol/min/mg)	Vmax/Km (ml/min/mg)
5β-Androstan-3 α-ol-17-one	41.68	66.96	1.61
5α-Androstan-3 α-ol-17-one	20.16	22.77	1.13
5β-Androstan-3 β-ol-17-one	-	-	-
5α-Androstan-3 β-ol-17-one	-	-	-
5-Pregnen-3 β-ol-20-one	-	-	-
4-Androsten-17 α-ol-3-one	-	-	-
5β-Androstan-17 β-ol-3-one	-	-	-
Testosterone	-	-	-
Pravastatin Sodium	277.03	4.54	0.02

- : not detected

第6節　考察

本章では、PS が胎水素類によりR-104に代謝され、その後非酵素的な分解によりCM-3(R-195)が生成することを解明するとともに、代謝中間体R-104の生成に関わるPS代謝酵素(PS 6β-hydroxydehydrogenase)が3α-hydroxysteroid dehydrogenaseであることを示した。Everettらは PS をヒトに投与後の尿中にCM-3が投与量の約1%排泄され、血漿中にもこの代謝物の存在することを確認している[9]。この胎水素酵素は胎盤に見られなかったことから投与されたPSは肝臓でR-104に代謝され非酵素的にCM-3に変換して体循環中に出現し、尿中に排泄されるものと考えられる。

3α-Hydroxysteroid dehydrogenaseは肝臓[10]、前立腺[11]、脳[12]などおよび多くの動物組織に存在していることが知られている。しかしながら、PS 6β-hydroxy-

PSの構造から PS 6β-hydroxydehydrogenase は3α-および3β-hydroxyhexobarbital dehydrogenase および steroid dehydrogenase に属すると考え、阻害剤としてpyrazole (アルコール脱水素酵素阻害剤)、quercetin(carbonyl reductase阻害剤)[66]、phenobarbital(aldehyde reductase阻害剤)[67]、indomethacin(3α-hydroxysteroid dehydrogenase阻害剤[67]、3α-および3β-hydroxyhexobarbital[68] およびある種ステロイド類を用いてPSからCM-3の生成阻害実験を行った。この結果3α-および3β-hydroxyhexobarbitalでは全く阻害が見られず、quercetin、indomethacin およびsteroid類に強い阻害が観察された。このsteroid類の中では3Hにケトンもしくはα配位の水酸基を有するものに阻害が観察された。3-Keto steroid の阻害は肝可溶性画分中に存在するNADPHおよびNADHによりケトンから水酸基への還元反応にPS 6β-hydroxydehydrogenase が関与するものと推察された。事実、3位にケトンを持つsteroid類は精製したPS 6β-hydroxydehydrogenaseとの反応によってNADPHの生成が見られなかった。従ってPS 6β-hydroxydehydrogenase は3α-hydroxysteroid dehydrogenaseに分類されることが示唆された。

ステロイドに対する脱水素酵素はステロイド骨格上の水酸基の位置によって、分類される。このPS 6β-hydroxydehydrogenaseがどのステロイド脱水素酵素に分類されるかを検証するために精製を行った。PS 誘導体をSepharose 4Bに固定化したアフィニティーカラクロマトグラフィー、DEAEおよびhydroxylapatiteカラムクロトグラフィーを順次行い、SDS-PAGEで単一なバンドになるまで精製し、これから求めた分子量は36,000であった。これまでにラット肝臓の3α-hydroxysteroid dehydrogenaseの分子量は34,000と報告されており[69]、今回の結果とほぼ同じであった。精製した酵素を用いてステロイド類に対する基質特異性を検討すると、3α-hydroxysteroid類のみに活性を示した。細胞内局在性、補酵素要求性、阻害剤による実験、分子量および基質特異性から考察するとPS 6β-hydroxydehydrogenase は3α-hydroxysteroid dehydrogenaseに分類されると考えられる。

PSはsteroid類と同様な位置に水酸基を有するdecalin骨格を有するために3α-hydroxysteroid dehydrogenaseにより反応すると考えられるがステロイドでは3α位の水酸基がこの酵素によって脱水素されるのに対して同じ位置に水酸基を有する6α配位のR-418は反応せず、逆に配位の異なる6β配位を持つPSが脱水素され興味深く思われた。この理由については現在はっきりした確証が得られていないが、steroid類では10β位にメチル基がありこの立体障害のために3β位の水酸基は脱水素せず、3α位の水酸基が反応すると考えられる。PSは6α位にエステル基を有しているため、この立体障害により6α位の水酸基は脱水素されず到いながらも6β位の水酸基が反応すると推定される。

PSのこの酵素に対する反応性の指標と考えられるVmax/Kmは3α-hydroxysteroid類に比べ1/55-1/80の小さな値であり、生体内基質の3α-hydroxysteroid類に比較して反応性は低いものと考えられる。

以上の結果から解明したPSからCM-3への代謝経路を図4-11に示した。

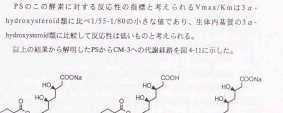


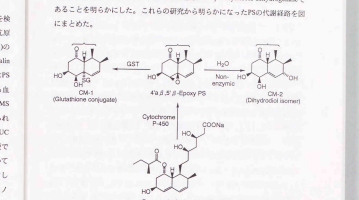
FIGURE 4-11 Plausible Metabolic Pathway of CM-1

結語

本論文は高脂血症治療薬pravastatin sodium(PS)の体内動態を解明する目的で、血漿中PSの定量法の開発およびPS薬効臓器である肝臓内での代謝経路を検討した。以下、本研究により得られた結果についてその要約を記述した。

第1編ではヒトにPS投与後の血漿中濃度の測定法として、二種類の定量法を検討した。第1章ではキャリヤ蛋白質とPSをβ-alanineを介して結合した抗原(ELISA-1に使用)と3位水酸基を除去し蛋白質と結合した抗原(ELISA-2に使用)の二種類を調製しウサギに感作し抗血清を得た。得られた二種類の抗血清はdecalin環部分が異なる代謝物に対しては高い認識能を有していたが(M-4)に対してはPSよりも3-26倍高い親和性を持っていた。これらの抗血清を用いてELISAによる血漿中PSの測定法を確立し、ヒトにPS投与後の血漿中PSの濃度を測定してGC/MSで測定して得られた値と比較検討した結果、ELISA-1において良い相関が見られた。この測定法を用いてヒトにPS投与後の血漿中濃度推移を測定しそめたAUCおよび血漿中半減期はGC/MSで得られた値とほぼ同様であり、本測定法は簡便でかつ少量な試料中PSの定量が可能な高感度測定法と考えられる。第2章においてはより選択性の高い定量法を確立する目的でHPLCによるPSの測定法を検討した。まず、第1章で得られた抗血清をIgGに精製後Sepharose 4Bに固定化しイムノアフィニティーゲルを調製し血漿からPSの選択的な抽出を行い、次いでdansylethylenediamineによる蛍光誘導体化を行った。HPLCによる分離分析はカラムスイッチング法を用い反応夾雑物と分離後、He-Cdレーザー光を利用した高感度検出器により高選択的な定量法を確立した後、本定量法を用いて実験動物にPS投与後の血漿中濃度推移を測定した。

第2編はラット遊離肝細胞を用いてPSの代謝を行い生成したCM-1、CM-2およびCM-3の代謝物についてその代謝経路を検討した。第1章ではCM-1とCM-2を単離精製し、CM-1はglutathione conjugate、CM-2はdihydroiol体であることを決定した。それらの構造からepoxide経由の代謝であると考え予想代謝中間体としてa,b,g-epoxy-PSを合成し、ラット肝可溶性画分と反応することにより代謝経路を解明した。第2章でCM-3を単離精製後そのUV、HPLCおよびそのマススペクトルからR-195と同定し、この代謝経路が6'-keto-PS経由の反応であることを解明後、どの内因性物質の代謝に関与する酵素であるかを検討した。肝密集細胞および この酵素を精製し基質特異性を検討した結果3 α-hydroxysteroid dehydrogenaseであることを明らかにした。これらの研究から明らかにしたPSのCM代謝経路を図にまとめた。



SG: Glutathione, GST: Glutathione S-Transferase,
PS 6'-β-Hydroxydehydrogenase: 3 α-Hydroxysteroid Dehydrogenase

FIGURE Postulated Metabolic Pathways of Pravastatin Sodium

謝辞

本論文提出の機会をお与え戴き、有益なご助言と温かいご指導ご鞭撻賜わりました城西大学 薬学部 毓昌 啓二郎 教授に心から厚くお礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、ご校閲とご教示を賜わりました城西大学 薬学部 菊川 靖雄 准教授 並びに城西大学 薬学部 各 隻 教授に深謝致します。

本研究は、三共株式会社分析代謝研究所において行われたものであり、この間 温かいご指導とご助言を賜わりました前分析代謝研究所 所長 田中 実 博士（現 三共ヨーロッパ GmbH 支配人）および分析代謝研究所 所長 川原 孝則 博士に深謝致します。

本研究の遂行に当たって終始直接のご指導、ご助言を戴きました前分析代謝研究所 代謝研究第二室 室長 高萩 美月 博士（現 学術開発第一部 部次長）並びに分析代謝研究所 薬物動態研究第４グループ グループリーダー 田中 精久 博士に厚くお礼申し上げます。また、本研究に際しご支援とご教示戴きました前活性物質研究所 主任研究員 倉林 正明 氏（現株式会社 ケムテック ラボ 主任研究員）および バイオメデカル研究所 主任研究員 浜野 豊 氏にお礼申し上げます。さらに、実験の遂行にあたって ご協力して戴きました分析代謝研究所 所次長 木下 武 博士、同研究所 岩渕 晴男 博士、中村 健造 博士、宮口 公寿氏、高崎 淳 博士、内山 稔 氏、Christophe Dumousseau 氏、松下 淳子 氏、萩方 裕子 氏、鈴木 佳奈恵 氏並びに分析代謝研究所の皆様に深謝致します。

第１編第１章に関する実験

１．試薬

ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン(HSA)およびFreund's complete adjuvant (Sigma社から、抗ウサギIgG（山羊由来）はCappel社から購入した。96穴マイクロタイタープレート(ELISA用)は住友ベークライト社製を用いた。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)は薬剤結社より、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)、β-alanine ethyl ester、t-butyldimethylsilyl chloride、methanesulfonyl chloride、α,α-azobisisobutyronitrile、tributyltinhydride および*N*,*N*'-disuccinimidyl carbonate は和光純薬より、diethyl phosphorocyanidate (DEPC)およびtriethylamine (TEA)は東京化成より購入した。Pravastatin sodium(PS)およびその関連標品(R-416、R-418および R-195）は三共（株）バイオメディカル研究所もしくは分析代謝研究所で合成したものを用いた。その他の試薬および溶媒は市販の特級品およびHPLC用を購入し、精製することなく用いた。

２．抗原の合成

2-1. N-PS-β-alanineの合成

PS(4.47g)とβ-alanine塩酸塩(1.54g)のDMF(20ml)溶液に室温下、DEPC(1.82ml)とTEA(1.67ml)を加え、30分間撹拌した。反応液にethyl acetate(AcOEt)を加え、水、希塩酸および水で順次洗浄後、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：CH_2Cl_2/MeOH = 99/1 → 90/10、段階溶出)により精製し、PS-β-alanine ethyl ester[1], 3.27g)を得た。得られたester[1](3.27g)をMeOH(20ml)に溶解し、この溶液に1M NaOH水溶液(7.5ml)を加え室温下1.5時間 撹拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を1M塩酸で酸性にし、AcOEiで抽出した。抽出液を水洗後、Na_2SO_4で乾燥、ろ過し、減圧濃縮した。残渣

をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：CH_2Cl_2/MeOH/AcOH=85/15/5)で精製し、*PS*-β-alanine(1.59g)を得た。^{1}H NMR (DMSO-d6) δ ppm：0.82 (3H, t, J=7.3Hz, 4'-CH_3), 0.83 (3H, d, J=5.9Hz, 2'-CH_3), 1.03 (3H, d, J=6.8Hz, 2'-CH_3), 1.20-1.60 (9H,m), 2.05-2.40 (8H, m), 3.10-3.55 (4H, m), 3.84-3.97 (1H, m), 4.15 (1H, br) 4.42 (1H, br), 4.75 (1H, br), 5.19 (1H, br, 8'-CH), 5.48 (1H, br, 5'-CH=), 5.83 (1H, dd, J=5.9, 8.3Hz, 3'-CH=), 5.90 (1H, d, J=9.8Hz, 4'-CH=), 7.84 (1H, t, J=5.4Hz, -CONH-).

2-2. 5-Deoxy-PS-α-CD

PS(12.5g)のCH_3CI_2(300ml)懸濁液に-20℃でpyridine(3.4ml)を加えた後methyl chloroformate(2.16ml)のCH_2Cl_2(25ml)溶液を加え、20分間同温室温で30分間攪拌した。反応液を希塩酸、水、5% NaHCO$_3$水溶液、水で順次洗浄後、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過、減圧濃縮後残渣をAcOEtより再結晶し、R414 (7.5g)を得た。^{1}H NMR (CDCl$_3$) δ ppm: 0.893H, t, J=7.3Hz, 4'-CH_3), 0.91 (3H, d, J=7.3Hz, 2'-CH_3), 1.12 (3H, d, J=7.0Hz, 2'-CH_3), 1.22-1.77 (9H, m), 1.8-2.01 (2H, m), 2.15 (1H, d, J=2.9Hz, OH), 2.53-2.67 (2Hm), 2.73 (1H, dd, J=5.1,17.6Hz, 2-CH), 4.33-4.48 (2H, m, 3-CH, 6-CH), 4.55-4.67 (1H, m, 5-CH), 5.41 (1H, br, 8'-CH), 5.57 (1H, s, 5'-CH=), 5.72 (1H, dd, J=5.9,9.7Hz, 3'-CH=), 6.01 (1H, d, J=9.7Hz, 4'-CH=).

R-414 (10g)のCH_2Cl_2(150ml)溶液に氷下、imidazol(4.0g)とt-butyldimethylsilyl chloride(9.27g)を加えた後、室温で5時間撹拌した。反応液をAcOEtで希釈し、水洗後、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：hexane/AcOEt= 90/10-70/30、段階溶出)で精製し、3,6'-bissilyl-R-414(1.56g)を得た。得られたsilyl ether 体(1.56g)をCH_2Cl_2(100ml)に溶解し、1M NaOH水溶液(25.8ml)を加え、室温下、1時間撹拌した。反応液を減圧濃縮し、1M 塩酸で酸性とした後、AcOEtで抽出した。抽出液を水洗後、Na_2SO_4で乾燥、ろ過後、diazomethaneのether溶液を加えた、methyl ester化した。この溶液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：benzene/AcOEt=97/3-80/20、段階溶出)により精製し、3,6'-bissilyl PS methyl ester{3},14.7g)を得た。

得られたmethyl ester{3}(18.0g)をpyridine(70ml)に溶解し、この溶液に氷冷下、methanesulfonyl chloride(4.18ml)を加えた。反応液を室温で1時間撹拌後、減圧下pyridine を蒸去した。残渣をAcOEtで希釈し、水洗後Na_2SO_4で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：benzene/AcOEt=95/5-80/20、段階溶出)により精製し、methanesulfonate体(18.1g)をDMF(80.8ml)およびhexamethylphosphoramide(20.2ml)に溶解し、LiCl(10.1g)を加えた。この溶液を室温で50時間撹拌後、AcOEtで希釈し、水洗、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane/AcOEt=95/5-85/15、段階溶出)により精製し、5-chloro-PS{4},6.48g)を得た。得られた{4}(2.0g)をbenzene(15ml)に溶解し、α,α'-azobis(isobutyronitrile)(95.9mg)とtributyltin hydride(1.57ml)を加え、18時間加熱還流した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：benzene/AcOEt=98/2-90/10、段階溶出)で精製し、3,6'-bissilyl-5-deoxy-PS{5}1.77g)を得た。得られた{5}(2.0g)をTHF(71.4ml)に溶解し、tetrabutylammonium fluoride(2.1MTHF溶液(30.7ml)とAcOH (3.6ml)の混合溶液を加えた。50℃で30分間撹拌後、反応液をAcOEtで希釈し、水、5% NaHCO$_3$水溶液および水で順次洗浄後、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：CH_2Cl_2/MeOH=99/1-94/6、段階溶出)で精製し、deoxy-PS methyl ester{6}(610mg)を得た。得られたmethyl ester体(100mg)をCH_3CN (5ml)に溶解し、1M NaOH水溶液(0.36ml)を加え、室温で1時間撹拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をCHP-20P(三菱化成)カラムクロマトグラフィー(溶離液：H$_2$O/acetone=100/0-80/20、段階溶出)により精製し、5-deoxy-PS(95mg)を得た。^{1}H NMR (D_2O) δ ppm: 0.68 (3H, t, J=7.7Hz, 4'-CH_3), 0.70 (3H, d, J=7.0Hz, 2'-CH_3), 0.93 (3H, d, J=7.0Hz, 2'-CH_3), 1.00-1.53 (12H, m), 2.10 (1H, dd, J=7.7, 16.2Hz, 2-CH), 2.17 (1H, dd, J=6.2, 16.2Hz, 2-CH), 2.23-2.40 (4H, m), 3.72-3.83 (1H, m, 3-CH), 4.18-4.28 (1H, m, 6'-CH), 5.24 (1H, br, 8'-CH), 5.39 (1H, br, 5'-CH=), 5.84 (1H, dd, J=5.9, 9.9Hz, 3'-CH=), 5.90 (1H, d, J=5.9Hz, 4'-CH=).

2-3. N-Succinimidyl ester体の合成

PS-β-alanine(248mg)をCH$_2$Cl$_2$(5ml)に溶解し、この溶液にN,N'-disuccinimidyl carbonate(128mg)を氷冷下加え、室温で1.5時間撹拌した。反応液をAcOEtで希釈し、水、5%NaHCO$_3$水溶液および水で順次洗浄後、Na$_2$SO$_4$で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液：CH$_2$Cl$_2$/MeOH=90/10)で精製し、PS-β-alanine N-succinimidyl ester(150mg)を得た。5-deoxy-PS(99mg)も同様に反応、精製し、5-deoxy-PS N-succinimidyl ester (92.7mg)を得た。

2-4. 感作原液の合成

2-3で得られたN-succinimidyl ester体は細胞からの方法[29]に準じてBSAに結合し、感作抗原を合成した(図1-2)。PS-β-alanine N-succinimidyl ester(17.8mg)をpyridine (3.0ml)に溶解し、水冷下、この溶液に50mMリン酸緩衝液(pH7.3, 3.0ml、以下緩衝液A)に溶解したBSA(67mg)を加えた。反応液を室温で7時間撹拌後、緩衝液A(6ml)を加え、DMF:水(4.6, 1.2)、水(1.2)および生理的食塩水(1.1)にて透析した。この透析した溶液に生理的食塩水を加え、全量を33.5mlとして感作抗原-1の溶液を調製した。同様に、5-deoxy-PS(15.2mg)をBSA(67mg)と反応、処理し、感作抗原-2の溶液を調製した。

3．抗PS抗体活性の測定

2-4で得られた抗原-1および抗原-2を希釈(2mg protein/ml)し、Freund's complete adjuvantとの等量混合エマルジョンにした。このエマルジョンを雄性日本白色家兎の足ないし首および背部皮下に1回の感作量1mg protein/羽を用いて、施注で4カ月間感作した。最終感作10日後に脂動脈採血を行った。これらの血液を4℃で16時間放置後、3000rpmで20分間遠心し、各々の抗血清を得た。

4．酵素標識抗原の調製

酵素標識抗原は細胞からの方法[29]に準じて調製した。PS-β-alanine-N-succinimidyl ester(890μg)をdioxane(0.2ml)に溶解し、この溶液にHRP(2mg)の緩衝液A(0.4ml)を加え、4℃で4時間撹拌した。この反応液を等量リン酸緩衝液(pH7.4、以下PBS)/DMF(50/50, 500ml×1)、PBS/DMF(70/30, 500ml×2)およびPBS(500ml×2)

で透析した。この溶液を希釈(500μg protein/ml)し、酵素標識抗原としてELISA-1に使用した。また5-deoxy-PS(700μg)も同様に反応処理し、ELISA-2の酵素標識抗原として用いた。

5．ELISA

ウサギIgG（以下第二抗体）を固相化緩衝液(Na$_2$CO$_3$: 1.5g, NaHCO$_3$: 2.95g, (NH$_4$)$_2$SO$_4$ 20gを水1lに溶解したpH9.6溶液)で、蛋白量を10μg/mlとなるように希釈し、マイクロタイタープレートに250μl/well分注した。室温下、一昼夜放置して第二抗体を固相化後、上清を除去し、1%ヒト血清アルブミン(HSA)および0.1%NaN$_3$を含むPBS(300μl/well)を分注し4℃で保存した。このプレートは使用前に0.05%(W/V)Tween20を含むPBS(以下緩衝液B)で洗浄(350μl×3)後ELISAに用いた。

HRP標識抗原を0.1%HSAを含むPBS(以下緩衝液C)で希釈(ELISA-1は200-1000ng/ml、ELISA-2は100-500ng/ml)し、マイクロタイタープレートに50μl加えた。ついで、既知量のPS各濃化検量線用血漿もしくはPS測定用試料を緩衝液Cにて希釈(1/5)し、この溶液を50μl加えた。さらに、抗血清を緩衝液Cで希釈(ELISA-1では1/500,000、ELISA-2では1/600,000)し、このプレートに50μl加え、4℃で20-24時間インキュベートした後、緩衝液Cで洗浄(350μl×3)した。

酵素活性は細胞からの方法[29]をわずかに変えて測定した。0.01%tetramethylbenzidine(0.50mM酢酸ナトリウムークエン酸緩衝液(pH3.5、3%dimethylsulfoxide)および0.002%H$_2$O$_2$を含む)を200μl加え、室温で30分インキュベートした。その後、0.5M H$_2$SO$_4$(50μl)を加え、反応を停止し、マイクロプレートリーダーにて450nmの吸光度を測定した。

6．Pravastatin sodiumを投与後のヒト血漿中濃度推移

一晩絶食した6人の健常な男子被験者にPS(100mg)錠を1錠投与した。投与後、0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8時間に採血し、速心分離後、血漿中濃度をELISA-1により測定した。

第1編第2章に関する実験の部

1．試薬

N-(2-Aminoethyl)-5-(dimethylamino)naphtalene-1-sulfonamide (N-dansyl ethylene diamine, DNS-ED)はMolecular Probes社より購入した。Sepharose 4B(ファルマシア社より、Affigel Protein A MAPS-II kit(Bio-Rad社から購入した。その他の試薬および溶媒は第1章に準じたものを用いた。

2．HPLC関連装置および分析条件

DNS-ED誘導体化後のPS○分離はカラムスイッチング法[*]を用いて分析した。第1カラムにはC4カラム(Ultron 300-C4, 4.6mm I.D.x150mm :信和化工)を用い、移動相は10mM 2-モルホリノエタンスルホン酸(pH2.4)/CH3CN(70/30)をCCPDポンプ(東ソー)により流速1ml/minで送液した。第2カラムにはC18カラム(Cosmosil 5C18-AR, 6mmI.D.x 150mm:ナカライテスク)を用い、移動相は10mMクエン酸(pH2.4)/CH3CN (50/50)をLC9Aポンプ(島津)により流速1ml/minで送液した。カラムスイッチング装置はPTS000(東ソー)を、レーザー蛍光検出器はLFB010(東ソー)を、He-Cdレーザー光源はSeries74(Omnichrome, 波長325nm, 出力40mW)を用いた。ピークシグナルの測定はSic Chromatrecorder 11(システムインスツルメント)による面積と用手法による高さを利用して定量した。

3．固定化抗体カラムの調製

第1章でELISA-1に用いた抗PS抗血清(No.2)10mlをProtein A MAPS-II kitにより抗PS IgG に精製し、このフラクションを0.1M炭酸緩衝液(pH9.0)中、4℃で一晩透析した。得られたIgG溶液はCuatrecasasらの方法[**]に準じて固定化した。Sepharose 4B(25ml)を水(50ml)に懸濁させ、水冷下、4N NaOHでpH11-11.5に調節しながらBrCN3.5gを加え活性化した。この活性化したSepharose 4B(25mlベッドボリューム)を0.1M炭酸緩衝液(pH9.0, 40ml)に懸濁し、抗PS IgG溶液(IgG 100mg/10ml)をすばやく加え、ロータリーエバポレーターを用いてゆるやかに4℃、16時間攪拌した。ヌッチェにてろ過後、同炭酸緩衝液で洗浄し、未反応の活性基を0.1M トリス塩酸緩衝液(pH8.0)で処理し不活化した後、PBSに置換して4℃で保存した。得られた固定化抗体ゲルをポリプロピレン製カラム(セパコールミニPP, 生化学工業)にベッドボリューム約1ml充填してカラムを調製した。

4．固定化抗体カラムによるpravastatin sodiumの精製

調製した固定化抗体カラムは使用する前に水(4ml)、80% MeOH(4ml)およびPBS(4ml)で洗浄した。血漿試料(1ml)を含有しpH 5.5に緩衝液、水(4mlx2)、PBS (4ml)およびH2O(4mlx2)で洗浄したPS○の溶出はMeOH(4ml)を用いて行った。溶出液に内部標準溶液(100 μl, R-416+100mg/ml)を加え、RC11遠心型凍結乾燥器(ヤマト)を用いて濃縮した。回収率の検討はPS○を5%BSA溶液に添加し、抽出後、蛍光標識せずにそのままHPLCカラムスイッチング法のカラム1の条件, UV:235nm)で測定した。

5．Pravastatin sodiumの誘導体化

濃縮乾固後の試料をDMF(100 μl)に溶解し、この溶液にTEA 47.6 μl/ml dioxane溶液、DEPC 51.8 μl/ml dioxane溶液および2DNS-ED 100 μg/ml dioxane溶液各々100 μlを加えた。試薬を加えた後、10秒間よく振盪し室温で5分間放置した。蛍光誘導体化後の反応液10 μlをHPLCで分析した。

6．標準溶液の調製

PS○水溶液(100 μg/ml)を保存溶液とし、これを希釈して5-1000ng/ml の標準溶液を調製した。同様に内部標準物質(R-416)溶液(10, 100, 500ng/ml)の水溶液を調製した。血漿およびBSA溶液の標準溶液は上記の標準水溶液(100 μl)をラットコントロール血漿または5%BSA(900 μl)に添加して調製した。

7．PS投与後のダミ血漿中濃度推移

一般経皮した雄性ビーグル犬、3匹にPS水溶液(PS: 5mg/kg)を経口投与し、投与後0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4および6時間にこれぞれ2ml採血し、血漿を分離した。得られた血漿は凍結するまで-70℃で保存した。血漿中濃度の測定は各々1mlを用いて行った。

8．PS投与後のラット血漿中濃度推移

16h絶食した体重230-250gの雄性ウィスター系今道ラットにPSを経口投与(20mg/ml)し、投与後0.25, 1, 2, 3, 4hおよび24h時に採血し、遠心分離後血漿を得た。血漿中濃度の測定は各々100 μlを用いて行った。

第２編第１章に関する実験

1．試薬

^{14}C標識PS(radium ^{14}C-acetate)を出発原料として*P. citriosum*を用いた醗酵法で合成した^{14}C-ML-236Bをさらに*S. cerevisiae*により微化[16]して^{14}C-R-414を得た(第一化学)。この^{14}C-R-414を等モルのNaOHで加水分解して^{14}C-PSを得た。Collagenase は(Boehringer-Mannheim社から購入した物)。N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES)は同仁化学より、m-chloroperbenzoic acid、tris (hydroxymethyl)aminomethane(Tris) およびtetra-butylammonium fluorideはナカライテスクより購入した。

2．実験動物

体重200-250gのSprague-Dawley(SD)系雄性ラットを日本チャールス・リバー社より購入した。醗素誘導はラットにS-methylcholantrene(MC, 80mg/kg/day, ヤネ洪治液)またはphenobarbital(PB, 80mg/kg/day, 水治液)を実験前１日間腹的内投与によりP-450を誘導し、実験に用いた。

3．ラット遊離肝細胞および肝溶性画分の調製

ラット遊離肝細胞はMeldrumらの方法[20]により調製した。肝可溶性画分はラットを麻酔致死後に肝臓を取り出し、3倍量の1.15% KCl/10mMリン酸カリウム緩衝液(pH-7.4)を加え、ポリトロン(Kinematica社製)でホモジナイズ後、105000xgで60分間遠心分離した上清を用いた。

4．ラット遊離肝細胞によるPSの代謝

上記で調製したラット遊離肝細胞浮遊液を2x10^{6}個/ml)になるようにKrebes-HEPES緩衝液(HEPES:3g, KCl:0.334g, $MgSO_4$・$7H_2O$: 0.294g, $NaHCO_3$: 2.1g, KH_2PO_4: 0.166g, $CaCl_2$・$2H_2O$: 0.373gおよびNaCl: 6.92gを水1Lに溶解)で希釈した。この浮遊液を十ス型フラスコに入れ、5分間プレインキュベートし、^{14}C-PS(終濃度：0.1mM)を加え、混合ガス(95% O_2-5% CO_2)気流下、37℃で回転(約30rpm)させながらインキュベートした。終了後ただちにサンプリング遠心分離後、上清をHPLCにより分析し、代謝物を定量した。HPLC条件はcolumn: YMC-ODS, A-312(6mmI.D.x150mm, YMC), 溶離液：CH_3CN/MeOH/H_2O(0.2% Pic A(waters)), 検出UV: 210nmおよびラジオアイソトープ(LB03型RI検出器(Berthold))で行った。細胞浮遊液は実験するまで4℃に冷却し保存し、トリパンブルー色素法による細胞のviability は88-90%であった。またMCおよびPB で酵素誘導したラット遊離肝細胞も同様に調製し、PSと反応した。阻害実験は細胞浮遊液にSKF525A(Smith Kline and Franch Labs. Ltd.、終濃度：0.2mM)を加えた後、PSを添加し同様に反応した。

5．ラット遊離肝細胞により生成した主代謝物の単離精製

ラット遊離肝細胞において生成した2種類の主代謝物(CM-1およびCM-2)はBond-Elut C18(Waters)で精製した。インキュベートした反応液は遠心分離後、上清を半酢によりpH2に調整し、3ml水のBond-Elutに負荷した。水洗後、CM-1はH_2O/MeOH(80/20)で、CM-2は50/50で溶出した。CM-1はさらに下記の2種類の条件を用いたHPLCにより再精製した。

1. Colum: YMC-ODS, S-343-15(20mmI.D.x 250mm, YMC), 溶離液：0.05%Trifluoroacetic acid/MeOH(80/20), 流速:2ml/min, 検出: UV(210nm).

2. Colum: YMC-ODS, A-312(6mmI.D.x 58)150mm, YMC), 溶離液および検出: 1と同条件, 流速：1ml/min.

2のHPLC条件でCM-1は5分に、CM-2は12.5分に検出された。60mgのPSを反応し、CM-1を0.9mg、CM-2を1.4mg得た。

6．Epoxide 類のラット肝可溶性画分による反応

ラット肝可溶性画分(400 μl, 2.95%w/v)に還元型glutathione(50mM, Sigma)および合成したepoxide類(1–15mM)の1.15% KClを含むリン酸緩衝液(pH7.4)(最終(50 μl)を加え、15分インキュベートし、HPLC(6)の2と同条件)によりCM-1およびCM-2の生成を測定した。また、セルロース膜(UC 20-30-100, Viscase Corp)により透析したラット肝可溶性画分を用い、同様な実験を行った。

7．Epoxide 類の合成

7-1．4′a,β,5′,β-Epoxy-PS の合成

4′a,β,5′,β-Epoxy-PS は浜野らの合成法[9]に準じて行った。R-414(678mg)のAcOEt(10ml)溶液に2ml の5% Na_2CO_3水溶液およびm-chloroperbenzoic acid(421mg)を加え、氷冷下、1時間撹拌した。反応液に10ml のAcOEtを加え、水、2% Na_2CO_3を含む2% Na_2SO_3水溶液および水で順次洗浄し、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過、減圧濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(Alumina B, activity grade IV, ICN Biomedicals,溶媒system: CH_2Cl_2/MeOH=95/5)により精製し4′a,β,5′,β-epoxy-PS lactone(260mg)を得た。得られた4′a,β,5′,β-epoxy-R-414(260mg)のCHCl$_3$(2ml)溶液に氷冷下、0.1M NaOH水溶液(6.2ml)を加え、30分撹拌した。反応液にCH$_2$Cl$_2$(50ml)を加え、減圧濃縮し、4′a,β,5′,β-epoxy-PS の白色粉末(285mg)を得た。HPLCにおける retention time: 13.15分(条件; column: Cosmosil 5C18, 6mmI.D.x150mm, 溶媒system: 50mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.4)/CH$_3$CN(90/20), 流速: 1.0ml/min, 検出: UV(210nm)). ^{1}H NMR (D_2O) δ ppm: 0.88 (3H, t, J=7.0Hz, 4′-CH$_3$), 0.95 (3H, d, J=7.0Hz, 2′-CH$_3$), 1.12 (3H, d, J=6.8Hz, 2′-CH$_3$), 1.27-1.63 (9H, m), 1.86 (1H, m, 1′-CH), 2.14 (1H, m, 7′-CH), 2.20 (1H, dd, J=4.0, 12.2Hz, 8′a-CH), 2.31 (1H, dd, J=8.0, 14.8Hz, 2′-CH), 2.37 (1H, dd, J=5.4, 14.8Hz, 2′-CH), 2.45 (2H, m, 2′, 5′-CH), 3.50 (1H, br, 5′-CH), 3.70 (1H, ddt, J=3.3, 5.0, 7.7Hz, 5-CH), 4.08 (1H,t, J=5.5, 8.0Hz, 3-CH), 4.25 (1H, ddd, J=2.0, 5.5, 11.5Hz, 6′-CH), 5.11 (1H, d, J=9.7Hz, 4′-CH=), 5.23 (1H, tbr, J=3.9Hz, 8′-CH), 6.45 (1H, dd, J=6.4, 7.8Hz, 3′-CH=).

7-2. 3′,α,4′-α-Epoxy-PS の合成

1) 3,6′-Bis-t-butyldimethylsilyl-3′,α,4′-α-epoxy-R-414の合成

第 1 章で合成した3,6′-bis-t-butyldimethylsilyl R-414(2.13g)のAcOEt(25ml)溶液に5% NaHCO$_3$水溶液(10ml)および m-chloroperbenzoic acid(1.16g)を加え、20分間撹拌した。反応液にAcOEt(30ml)を加え希釈した後、2% Na_2CO_3を含む2% Na_2SO_3水溶液および水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥した。減圧濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: hexane/AcOEt=75/25)により精製し、3,6′-bis-t-butyldimethylsilyl 3′,α,4′-α-epoxide体(1.0g)および3,6′-bissilyl-4′a,β,5′,β-epoxide体(0.59g)を得た。得られたbissilyl-3′,α,4′-α-epoxide体(326mg)のTHF(5ml)溶液に氷冷下、1M tetrabutyl ammonium fluoride(5ml)とAcOH(0.63ml)の混合液を加え、室温で1時間撹拌した。反応液にAcOEt(10ml)を加え、水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: CH$_2$Cl$_2$/MeOH=95/5)で精製し3′,α,4′-α-epoxy-R-414 (139mg)を得た。

^{1}H NMR (CDCl$_3$) δ ppm; 0.88 (3H, t, J=7.7Hz, 4′-CH$_3$), 0.94 (3H, d, J=7.3Hz, 2′-CH$_3$), 1.11 (3H, d, J=7.0Hz, 2′-CH$_3$), 1.20-1.54 (4H, m), 1.55-1.87 (5H, m), 1.90-1.99 (1H, m), 2.07-2.17 (1H, m), 2.30-2.57 (3H, m), 2.62 (1H, ddd, J=1.1, 4.0, 17.6Hz, 2-CH), 2.73 (1H, dd, J=5.1, 17.6Hz, 2-CH), 3.39 (1H, m, 3′-CH), 3.46 (1H, d, J=3.7Hz, 4′-CH), 4.35 (1H, m, 5-CH), 4.41 (1H, m, 6′-CH), 4.58 (1H, m, 5-CH), 5.31 (1H, br, 8′-CH), 6.04 (1H, br, 5′-CH=).

2) 3′,α,4′-α-Epoxy-PS の合成

3′,α,4′-α-Epoxy-R-414(42.2mg)のCH$_2$Cl$_2$(0.5ml)溶液に氷冷下、0.1M NaOH水溶液を加え、室温で1時間撹拌した。反応液をそのままCHP-20P のカラムクロマトグラフィー(溶離液: H$_2$O/acetone= 100/0-80/20, 段階溶出)で精製し、目的とする3′,α,4′-α-epoxy-PS(32mg)を得た。HPLC: Retention time; 6.23min (Column: Cosmosil 5C18, 6mmI.D.x150mm, 溶媒system: 50mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.4)/CH$_3$CN=80/20, 流速: 1ml/min, 検出: UV(210nm). ^{1}HNMR (D2O) δ ppm: 0.86 (3H, t, J=7.5Hz, 4′-CH$_3$), 0.94 (3H, d, J=6.6Hz, 2′-CH$_3$), 1.10 (3H, d, J=7.0Hz, 2′-CH$_3$), 1.27-1.69 (10H, m),

2.30-2.50 (6H, m), 3.50 (1H, thr, J=3-4Hz, 3'-CH), 3.65 (1H, d, J=4.0Hz, 4'-CH), 3.71 (1H, m, 5-CH), 4.08 (1H, ht, J=6.0, 7.3Hz, 3-CH), 4.40 (1H, ddt, J=3.3, 6.6, 10.5Hz), 5.31 (1H, m, 8'-CH), 6.08 (1H, bt, 5'-CH).

8．ラット肝可溶性画分と4'a,β,β'-epoxy-PSの反応

ラット肝可溶性画分(45ml)に4'a,β,β'-epoxy-PS(20mg)を加え、37℃で30分インキュベートした。反応液にMeOH(22ml)を加え、反応を停止した後、セライト(Hyflo Super-Cell, Johns-Manville)ろ過した。得液を約20mlになるまで減圧濃縮し、残留液をCHP-20Pカラムクロマトグラフィー(溶離液:H_2O/acetone=100/0-80/20, 段階溶出, 目的物は5-10%acetoneで溶出)で精製し、CM-1 (7.7mg)を得た。得られたglutathione conjugateは中村らによりNMRを用いた構造解析[7]から、遊離肝細胞のGT活性CM-1と同定された。

9．膵素反応によるglutathione conjugateの同定

ラット膵細胞より単離した CM-1をα-glutamyl transpeptidase(γ-GT, 20unit, Sigma)の50mM glycylglycine および10mM $MgCl_2$を含む50mM Tris緩衝液(pH7.4)溶液(2ml)に添解し、37℃で1時間インキュベートした。反応溶液の半量を取り、dehydropeptidase-I[8](10unit)を加え、さらに同温度、30分インキュベートした。各々の反応液をBond-Elut C18カートリッジカラムで精製(溶出液：γ-GT分解物:H_2O/MeOH =90/10, DHP-1分解物:H_2O/MeOH=85/15)した。DHP-1分解物はさらに水冷下、xcric anhydride-acetone(30/70,v/v)によりアセチル化した。各々の生成物はTLC(TLC条件-2の方法)により展開後、X線フィルムにコンタクトし、現像後、解析した。

10．マススペクトロメトリーによるglutathione conjugateの解析

CM-1の構造はglycerolをマトリックスとして用いた二次イオン化マススペクトロメトリー(M-80A, 日立)により解析した。

11．代謝物のTLC分離条件

遊離肝細胞による代謝物は反応液を遠心分離後、凍結乾燥し、H_2O/MeOH(20/80)に溶解し、その10 μlをTLC板(Silica gel 60 F254, Merck)にスポットした。展開

溶媒は(1) $CHCl_3$/MeOH/AcOH=8/1/1、2)n-butanol/AcOH/H_2O=4/1/1で行った。展開後、風乾し、Bio-Image Analyzer BA-100(富士写真フィルム)またはX線フィルムにコンタクトし、解析した。

第2編　第2章に関する実験の部

1．動物および試薬

ラット[2]SD系雄性(体重: 約250g)を用い、Hartley系モルモット、ビーグル犬およびカニクイザルの肝臓はすべて雄性のものを用いた。これらの肝臓は実験に供するまで-80℃で保存した。また、ヒト肝9000xg上清はKeystone Skin Bankより購入した。1,6-diaminohexane, quercitin およびpyrazole は東京化成より、β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), β-nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), indomethacin, cholic acid およびsteroid類はSigmaから購入した。3-α-および3β-dihydroxybenzbatilal は福岡大学薬学部上敷教授から供与された。その他の試薬および溶媒は前の章に準じたものを用いた。

2．細胞分画法

各種動物から摘出した肝臓およびその他の臓器に1倍量の1.15% KClを含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)を加え、ホモジナイズした。このホモジネートを4℃、9000xgで20分間遠心分離し、その上清をさらに同温度、105000xgで60分間遠心分離後、上清を可溶性画分とした。下層をミクロソームとした。実験に供するまで可溶性画分はそのまま、ミクロソームは30% グリセリンを含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)に懸濁して-80℃で保存した。

3．酵素活性測定法

細胞画分またはカラム溶出画分に適当量の緩衝液(0.1M リン酸カリウム緩衝液もしくは0.1M Glycine-NaOH緩衝液)および補酵素(終濃度: 1mM)を加え、PSを1mMになるように添加して37℃で反応を開始した。限実実験は限管剤およびPSの終濃度を0.5mMに、補酵素は1mMになるように添加した。20分間インキュベ

ートした後、等量のCH_2Cl_2を加え反応を停止させ、遠心分離後、上清に生成する R-104および5-HMS-3-ケトPHLCで分析した。

HPLC条件：Column: YMC-ODS, A-312 (6mmx15mm), 溶離液：50mM KH_2PO_4/CH_3CN=70/30, 流速：1ml/min, 検出：UV 220nm(CM-3), UV 290nm(R-104).

4. 6'-Keto-PSの合成

R-414(2g)のCH_2Cl_2(150ml)の溶液に氷冷下、pyridinium chlorochromate(2g)を加え30分間撹拌し、減圧蒸発した。残渣にAcOEtを加え30分間撹拌した後セライトでろ過し母液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：hexane/AcOEt=30/70-93/7, 段階溶出）で精製し目的部分を減圧濃縮乾燥後をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：CH_2Cl_2/MeOH=100/0-93/7, 段階溶出）で再精製し、6'-keto-R-414(515mg)を得た。6'-keto-R-414(202mg)をCH_2Cl_2(5ml)に溶解し0.1M NaOH水溶液(5ml)を氷冷下加え30分間撹拌した。反応液を10% HCl水溶液でpH2とし、CHP-20ウラムクロマトグラフィー（H$_2$O/acetone=100/0-60/40, 段階溶出）により精製し目的部分を減圧濃縮した。残渣をローパーバッカム（Merck, RP-18, size B, 溶離液：H_2O/MeOH=70/30-40-60, 段階溶出）により再精製し目的とするR-keto-PS（40mg)を得た。1H NMR ($CDCl_3$) δ ppm: 0.85 (3H, t, J=7.5Hz, 4"-CH_3), 0.98 (3H, d, J=7.3Hz, 2'-CH_3), 1.07 (3H, d, J=6.8Hz, 2"-CH_3), 1.20-1.73 (7H, m), 1.80-2.05 (2H, m), 2.25-2.40 (1H,m), 2.47-2.88 (4H, m), 3.95-4.06 (1H, m, 5-CH), 4.40-4.53 (1H, m, 3-CH), 5.67 (1H,br, 8'-CH), 5.89 (1H, d, J=2.0Hz, 5'-CH=), 6.22 (1H, d, J=9.8Hz, 4'-CH=), 6.39 (1H, dd, J=5.9, 9.8Hz, 3'-CH=).

5. PS 6'-hydroxydehydrogenaseの精製

5-1. L-N-PS-1,6-diaminohexaneの合成

R-414(1g)のCH_2Cl_2(5ml)およびhexamethylphosphoramide(2ml)の溶液に室温下、1,6-diaminohexane(1ml)を加え、同温度で17時間撹拌した。反応液にAcOEtを加え、水およびBrine和食塩水で洗浄し、Na_2SO_4で乾燥した。ろ過後、減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：CH_2Cl_2/MeOH/ TEA=90/10/5-80/20/5, 段階溶出）により精製し、1-N-PS-1,6-diaminohexane (490mg)を得た。1H NMR ($CDCl_3$) δ ppm: 0.88 (3H, t, J=7.3Hz, 4"-CH_3), 0.90 (3H, d, J=6.8Hz, 2'-CH_3), 1.11(3H, d, J=6.8Hz, 2"-CH_3), 1.15-1.75 (19H,m), 2.26-2.45 (5H, m), 2.43-2.75 (3H, m), 2.71 (2H, t, J=6.8Hz, NH_2CH_2), 3.20-3.30 (2H, m, -NHCH$_2$), 3.73-3.85 (1H, m, 5-CH), 4.14-4.26 (1H, m, 3-CH), 4.35-4.46 (1H, m, 6-CH), 5.42 (1H, br, 8'-CH), 5.89 (1H, dd, J=5.8, 9.8Hz, 5'-CH=), 6.00 (1H, d, J=9.8Hz, 4'-CH=), 6.19 (1H, t, J=5.8Hz, <CONH).

5-2. アフィニティゲルの調製

第1編、第2章の実験3で述べた$CaCl_2$ゲルの方法[4]により、BrCN で活性化したSepharose 4B(30ml)に1-N-PS-1,6-diaminohexane(150mg)を固定化した。

5-3. アフィニティーゲルによる精製

ラット5歳の肝可溶性画分(2,358mg蛋白)を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)で一晩透析し、1mMになるようにNADPを加え、アフィニティーゲルカラム(255ml)に負荷した。溶出は1mMNADP-10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4, 300ml)、10mM-500mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4, 各300ml)のリニアグラジエント次いで500mMリン酸ナトリウム緩衝液(450ml)で溶出した。流速は1ml/minとし、各フラクション約8mlを集め、各フラクションの酵素活性と蛋白量を測定した。

5-4. DEAE-Sepharoseによる精製

アフィニティゲルカラムによるPS 6'-hydroxydehydrogenase溶出画分をpolyethyleneglycol(ペグ)で濃縮し、200mlとしてリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中で透析後、DEAE-Sepharose(Pharmacia, 275ml, 溶離液：0Mおよび500mMのNaCl を含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)各300ml)のリニアグラジエント)により精製した。

5-5. Hydroxylapatiteカラムによる精製

DEAE-Sepharoseカラムから溶出した活性画分を集め、10mMリン酸カリウム緩衝液中で透析後、hydroxylapatite(Bio-Rad)カラム(容量:10mM-300mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4), 各300mlのリニアグラジェント)で精製し、活性フラクションを集め、同様な操作を二度繰り返した。

6．蛋白定量

Protein Assey Kit(Bio-Rad)を用い、BSAを標準蛋白として検量線を作成し、595nmの吸光度で定量した。

7．SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

Laemmliの方法[9]に準じて行い、ゲルはプリキャストゲル(ゲル濃度10%, TEFCO)を用いた。標準分子量マーカーはElectrophorisis Calbration Kit(low M.W. 用, Pharmacia)を用い染色はクーマシーブリリアントブルーで行った。

引用文献

1) Page I.H., Berrettoni J.N., Butkus A., Sones F.M.Jr., *Circulation*, **42**, 625 (1970).

2) Endo A., Kuroda M., Tanzawa K., *FEBS Lett.*, **72**, 323 (1976).

3) Endo A., Kuroda M., Tsujita Y., *J. Antibiot.*, **29**, 1346 (1976).

4) Kuroda M., Tsujita Y., Tanzawa K., Endo A., *Lipids*, **14**, 585 (1979).

5) Tsujita Y., Kuroda M., Tanzawa K., Endo A., *Atherosclerosis*, **32**, 307 (1979).

6) Endo A., Tsujita Y., Kuroda M., Tanzawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **575**, 266 (1979).

7) Mabuchi H., Tatami K., Ueda K., Ueda R., Haba H., Kametani T., Watanabe A., Wakasugi T., Ito S., Koizumi J., Ohta M., Miyamoto S., Takeda R., *Atherosclerosis*, **32**, 435 (1979).

8) Yamamoto A., Sudo H., Endo A., *Atherosclerosis*, **35**, 259 (1980).

9) Bilheimer D.W., Goldstein J.L., Grundy S.M., Starzl T.E., Brown M.S., *N. Engl. J. Med.*, **311**, 1658 (1984).

10) Kovanen P.T., Bilheimer D.W., Goldstein J.L., Jaramillo J.J., Brown M.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 1194 (1981).

11) Brown M.S., Kovanen P.T., Goldstein J.L., *Science*, **212**, 628 (1981).

12) Brown M.S., Goldstein J.L., *Science*, **232**, 34 (1986).

13) Haruyama H., Kawano H., Kinoshita T., Terahara A., Nishigaki T., Tamura C., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1459 (1986).

14) Arai M., Serizawa N., Terahara A., Tsujita Y., Tanaka M., Masuda H., Ishikawa S., *Annu. Rep. Sankyo Res. Lab.*, **40**, 1 (1988).

15) Serajuddin A.T.M., Ranadive S.A., Mahoney E.M., *J. Pharm. Sci.*, **80**, 830 (1991).

16) Tsujita Y., Kuroda M., Shimada Y., Tanzawa K., Arai M., Kaneko I., Tanaka M., Masuda H., Tarumi C., Watanabe Y., Fujii S., *Biochim. Biophys. Acta*, **877**, 50 (1986).

17) Yamazaki M., Suzuki H., Hanano M., Tokui T., Komai T., Sugiyama Y., *Am. J. Physiol.*, **264**, (Gastrointest. Liver Physiol., 27), G36-44 (1993).
18) Shepherd J., Cobbe S.M., Ford I., Isles C.G., Lorimer A.R., Macfarlane P. W., McKillop J.H., Packard C.J., *N. Engl. J. Med.*, **333**, 1301 (1995).
19) Moldéus P., Hoogberg L., Orrenius S., *Methods Enzymol.*, **52**, 60 (1978).
20) Muramutsu S., Takasaki W., Uchiyama M., Komokata Y., Tanaka Y., Takahagi H., *J. Immunoassay*, **17**, 13 (1996).
21) Funke P.T., Ivashkiv E., Arnold M.E., Cohen A.I., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **18**, 904 (1989).
22) Morris M.J., Gilbert J.D., Hsieh J.Y.K., Matuszewski B.K., Ramjit H.G., Bayne W.F., *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 1 (1993).
23) Hosoda H., Yoshida H., Sakai Y., Miyairi S., Ishii K., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 742 (1979).
24) Hosoda H., Karube T., Kobayashi N., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 249 (1985).
25) Hosoda H., Takasaki W., Oe T., Tsukamoto R., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4177 (1986).
26) Sasahara K., Kawabata K., Nakaya N., Goto Y., *Rinsho Iyaku*, **4**, 45(1989).
27) Kawabata K., Hoshiyama K., Suzuki S., Niitsu T., Sasahara K., *Proc. Jpn. Soc. Biomed. Mass Spectrom.*, **16**, 149 (1991).
28) Pratt J.J., *Clin. Chem.*, **24**, 1869 (1978).
29) Franek M., Hruska K.J., *J. Steroid Biochem.*, **13**, 675 (1980).
30) Hosoda H., Kobayashi N., Miyairi S., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3606 (1981).
31) Hosoda H., Miyairi S., Kobayashi N., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2127 (1982).
32) Hosoda H., Kobayashi N., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 953 (1983).

33) Hosoda H., Kobayashi N., Kawamoto H., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3595 (1983).
34) Hosoda H., Kobayashi N., Miyairi S., Kato A., Kawamoto H., Nambara T., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3594 (1984).
35) Tsay H., Reiss A., Stouffer B., Mantha S., Turabi, N., Jagoda, E., Tu J. A., *Clin. Chem.*, **35**, 1189 (1989).
36) Damoussoux C., Muramatsu S., Takasaki W., Takahagi H., *J. Pharm. Sci.*, **83**, 1630 (1994).
37) Glencross R.G., Abeywardene S.A., Corney S.J., Morris H.S., *J. Chromatogr.*, **223**, 193 (1981).
38) Takasaki W., Tanaka Y., *Chikaku*, **4**, 308 (1992).
39) Kikawa Y., Sudo M., Hirata Y., Hayashi H., Ito S., Ishibashi M., Miyazaki H., Fukushima M., Narumiya S., Hayashi O., *Pro. Jap. Soc. Biomed. Mass Spectrom.*, **13**, 117 (1988).
40) Takasaki W., Nakagawa Y., Tnaka Y., Nakamura K., Shindo H., Hayashi Y., Yamamoto S., *Thromb. Res.*, **63**, 331 (1991).
41) Hayashi Y., Shono F., Yamamoto S., Takasaki W., Nakagawa A., Watanabe K., Yamashita K., Miyazaki H., *Anal. Biochem.*, **187**, 151 (1990).
42) Watanabe M., Watanabe T., Hirasawa N., Mae S., Muramatsu S., Matsushita Y., Takahagi H., Braquet P., Braquet C., Levine L., Ohuchi K., *J. Chromatogr.*, **597**, 309 (1992).
43) Miyaguchi K., Muramatsu S., Takahagi H., Proceedings of the 9th Conference on Liquid Chromatography, Tokyo, Japan, p31 (1988).
44) Michael J.S., Yeung E.S., *J. Chromatogr.*, **190**, 377 (1980).
45) Sakae S., Harata A., Kitamori T., Okubo A., Shimizu T., Watanabe H., Toda S., Sawada T., *Anal. Sci.*, **7**, 957 (1991).
46) Toyo'oka T., Ishibashi M., Terao T., *J. Chromatogr.*, **625**, 357 (1992).

47) Caatrecasas P., Wilcheck M., Anfinsen C.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 636 (1968).
48) Takahagi H., Kurosaki K., Horiguchi M., *J. Chromatogr.*, **352**, 367 (1986).
49) Dunges W., *Anal. Chem.*, **49**, 442 (1977).
50) Nimura N., Kinoshita T., *Anal. Lett.*, **13**, 191 (1980).
51) Watkins W.D., Peterson M.B., *Anal. Biochem.*, **125**, 30 (1982).
52) Yamaguchi M., Hara S., Matsunaga R., Nakamura M., Ohkura Y., *Anal. Sci.*, **1**, 295 (1985).
53) Yamaguchi M., Takehiro O., Hara S., Nakamura M., Ohkura Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2263 (1988).
54) Lee Y.M., Nakamura H., Nakajima T., *Anal. Sci.*, **5**, 209 (1989).
55) Muramatsu S., Miyaguchi K., Iwabuchi Y., Matsushita Y., Nakamura T., Kinoshita T., Tanaka M., Takahagi H., *Xenobiotica*, **22**, 487 (1992).
56) Hirota T., Nishikawa Y., Takahagi H., Igarashi T., Kitagawa H., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **49**, 435 (1985).
57) Nakamura T., Yoda K., Kuwano H., Miyaguchi K., Muramatsu S., Takahagi H., Kinoshita T., *Xenobiotica*, **21**, 277 (1991).
58) Hamano K., Serizawa N., Tsujita Y., Terahara A., Kawano H., In Abstracts, Annual Meeting of the Agricultural Chemical Society of Japan, Kyoto, p. 152 (1986).
59) Hammarstrom S., Murphy R.C., Samuelsson B., Clark D.A. Mioskowski C., Corey E.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1266 (1979).
60) Komai T., Kawai K., Tokui T., Tokai Y., Kuroiwa C., Shigehara E., Tanaka M., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 103 (1992).
61) Muramatsu S., Komokata Y., Tanaka Y., Takahagi H., *Biol. Pharm. Bull.*, **20** (11), (1997), 投載予定.
62) Evertt D.W., Chando T.J., Didonato G.C., Singhvi S.M., Pan H.Y., Weinstein S.H., *Drug Metab. Dispos.*, **19**, 740 (1991).
63) 鈴木 裕, 伊藤 喜章, 今野 昌八, 薬学雑誌, **111**, 765 (1991).
64) Ghosh M.N., Shield H.O., *Eur. J. Pharmacol.*, **90**, 11 (1983).
65) Shay H., Komarov S.A., Fels F.F., Meranze D., Gruenstein M., Siplet H., *Gastroenterology*, **5**, 43 (1945).
66) Klein J., Thomas H., Post K., Woener W., Oesch F., *Eur. J. Biochem.*, **205**, 1155 (1992).
67) Jean-Pierre Marthurg and Wermuth B. Aldehyde Reductase, in "Enzymatic Basis of Detoxication, Vol. 1, ed. by Jacogy W.B., Academic Press, New York, 1980, pp.249
68) Penning T.M., Mukharji I., Barrows S., Talalay P., *Biochem. J.*, **222**, 601 (1984).
69) Smithgall T.E., Penning T.M., *Biochem. J.*, **254**, 715 (1988).
70) Laemmli U.K., *Nature(London)*, **227**, 680 (1970).