

タツミ アキトシ

氏名(本籍)	辰見 明俊(大阪府)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	論博第43号
学位授与年月日	平成30年3月29日
学位授与の条件	学位規程第4条第2項該当者
学位論文の題名	ヒト血清アルブミンのワルファリンエナンチオマー結合性と エステラーゼ活性に及ぼすエタノールの影響に関する研究
論文審査委員	主査 教授 岩川 精吾 副査 教授 向 高弘 副査 教授 力武 良行 副査 教授 坂根 稔康

論文内容の要旨

緒言

ヒト血清アルブミン(Human serum albumin; HSA)は、585個のアミノ酸からなる分子量約66,500のタンパク質で、血漿タンパク質の約60%を占める血漿中で最も量の多いタンパク質である。ヒト血清アルブミンは血液の膠質浸透圧の維持に中心的な役割を担っているとともに、脂肪酸やホルモン、薬物など様々な物質と結合して必要な部位に運搬する機能も有した重要なタンパク質である。Sudlowの分類によるとヒト血清アルブミンの主な薬物結合部位は2か所あり、サイトIへはワルファリン、インドメタシンが結合しやすく、サイトIIはジアゼパム、ナプロキセンが結合するとされている¹⁾。また、サイトI及びサイトIIは種々のエステル型薬物などに対して加水分解を示す酵素的作用(エステラーゼ活性)を有している。

ヒト血清アルブミン製剤は、臨床においてアルブミンの喪失、アルブミン合成低下による低アルブミン血症、血漿膠質浸透圧の維持や循環血漿量の是正に繁用されている。市販のアルブミン製剤には製剤添加物に相違がある。また、ヒト血清アルブミンは製剤添加物としても用いられ、従来の安定化剤としてのみならず、近年ではアルブミン懸濁型抗がん剤にも使用されている²⁾。

製剤添加物が注射剤混合時の配合変化に及ぼす影響については検討がなされているが、注射剤が投与された後の製剤添加物に起因する生体内での薬物相互作用についての検討は少ない。製剤添加物として注射剤等で水に難溶性の薬物の溶解性向上のためにエタノールが繁用されている。そこで、市販ヒト血清アルブミン製剤及びヒト血清アルブミン製品の各種製造ロット試料を用いて、ヒト血清アルブミンへのワルファリンエナンチオマーの結合性およびエステル型薬物に対するエステラーゼ活性へのエタノールの影響を明らかにする目的で本研究を実施した。

第1章 ワルファリンエナンチオマーのヒト血清アルブミンへの結合性とCYP2C9.1による薬物代謝に及ぼすエタノールの影響

クマリン系の抗凝固薬であるワルファリンは出血等による重篤な副作用リスクが高い薬物である。臨

床において *S*-エナンチオマーおよび *R*-エナンチオマーからなるラセミ体で用いられているが、*S*-ワルファリンの抗凝固活性は *R*-ワルファリンの 3~5 倍高い³⁾。ワルファリンはヒト血清アルブミンのサイト I に高い割合で (97~99%) 結合するため、腎機能または肝機能の障害に伴う低アルブミン血症や併用薬剤等による結合部位の置換により、非結合型の割合が上昇する^{4,5)}。しかしながら、製剤添加物との相互作用に関する検討はなされていない。そこで、ワルファリンのヒト血清アルブミンへの立体選択的結合に及ぼすエタノールの影響について検討するとともに、主要な肝代謝酵素の 1 つで、*S*-ワルファリンの主な代謝酵素である CYP2C9.1 による薬物代謝へのエタノールの影響についてもあわせて検討した。

方 法

1. ヒト血清アルブミン ヒト血清アルブミンは遊離脂肪酸除去製品を Sigma-Aldrich 社から購入した。アルブミン(5%)・カッター、献血アルブミン(5%)・Wf、アルブミンナー 5%、ブミネート 5%を市販アルブミン製剤として使用した。

2. タンパク結合実験 Borga ら⁶⁾の方法を一部改変して行った。リン酸緩衝食塩水にヒト血清アルブミンまたは市販アルブミン製剤、ラセミ体のワルファリンナトリウムまたは *S*-ワルファリン、*R*-ワルファリンおよびエタノールを溶解させた後、Centrifree Micropartition System (メルク社)に移し 37°Cでインキュベート後、遠心分離した濾液を HPLC 法にて定量した。

3. 遊離脂肪酸の定量 市販アルブミン製剤中に含まれる遊離脂肪酸濃度は、NEFA C-テストワコーを用いて定量した。

4. CYP2C9.1 による薬物代謝実験 Iwakawa ら⁷⁾の方法を一部改変して行った。トリス-HCl (pH 7.4) に *S*-ワルファリンあるいはジクロフェナク、エタノールおよび NADPH 再生系 (NADP⁺、glucose-6-phosphate、MgCl₂、glucose-6-phosphate dehydrogenase) を溶解したものに、CYP2C9.1 を加えて 37°Cで 30 分間インキュベーションした。氷冷したアセトニトリル添加にて反応停止後、遠心し、回収した上清中に含まれる 7-ヒドロキシワルファリンあるいは 4'-ヒドロキシジクロフェナクを HPLC 法により測定した。

5. 解析方法 ワルファリンエナンチオマーのヒト血清アルブミンへの結合パラメータは Scatchard 式により算出した。CYP2C9.1 による薬物代謝パラメータは Lineweaver-Burk 式により算出した。

結果および考察

1-1. ヒト血清アルブミンへのワルファリンエナンチオマー結合性に及ぼすエタノールの影響

エタノール(2.9 vol%)添加により *S*-エナンチオマーの解離定数は低下した。一方、*R*-エナンチオマーの解離定数は上昇した (Table 1)。次に市販のアルブミン製剤を用いてワルファリンのタンパク結合へのエタノールの影響について検討したところ、市販アルブミン製剤ではエタノール(2.9 vol%)の添加により *S*-エナンチオマー、*R*-エナンチオマー共に非結合型濃度の上昇を認め、特に *R*-エナンチオマー非結合型濃度の上昇率が大きかった (Fig. 1)。また、市販アルブミン製剤間においてエタノール添加によるワルファリンエナンチオマーの非結合型濃度に相違が認められた。ワルフ

Table 1. Effect of Ethanol on the Binding of Warfarin Enantiomers to HSA

		Control	With ethanol
<i>S</i> -warfarin	n	0.72±0.07	0.73±0.04
	K _d (μM)	12.4±1.0	10.4±0.6*
<i>R</i> -warfarin	n	1.11±0.10	1.15±0.09
	K _d (μM)	19.7±2.0	26.2±1.9*

Each value represents the mean±S.D. (N=4). n: the number of binding sites in the HSA molecule. K_d: the dissociation constant. HSA: 615 μM. Ethanol: 2.9 vol%. * p<0.05 versus control (paired t-test).

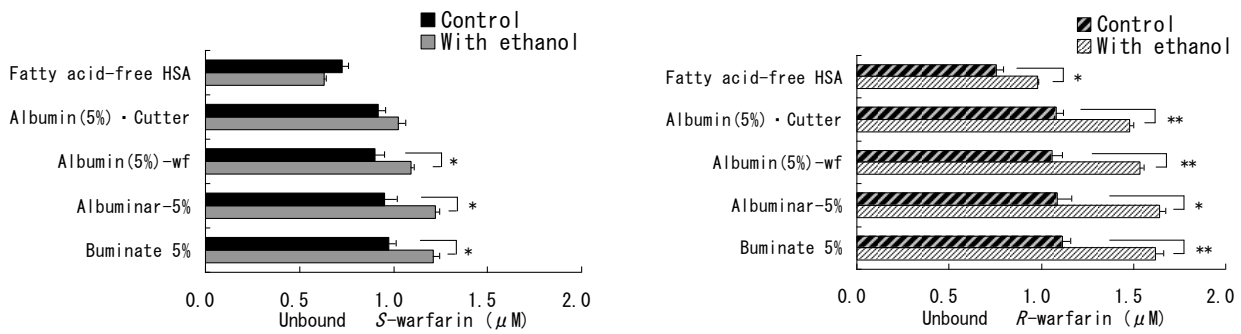


Fig. 1. Effect of Ethanol on the Binding of *S*- and *R*-warfarin to Commercial Albumin Preparations

Data are expressed as mean values \pm S.D. (N=3). HSA: 615 μ M. Warfarin racemate: 50 μ M. Ethanol: 2.9 vol%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control (paired *t*-test).

アリンの血清アルブミンへの結合に遊離脂肪酸が影響すること^{8,12)}や市販アルブミン製剤中のアルブミンのサイト I への結合に脂肪酸が影響すること¹³⁾が報告されていることから、次に市販アルブミン製剤中に含有される遊離脂肪酸濃度を定量した。Table 2 に示すようにエタノール添加による非結合型ワルファリンエナンチオマー濃度の上昇率が大きい傾向を示したアルブミン 5%およびブミネート 5%は、アルブミン(5%)・カッターおよび献血アルブミン(5%)-Wf に比べ遊離脂肪酸濃度が高値を示した。したがって、エタノールによる非結合型ワルファリンエナンチオマー濃度の変動に遊離脂肪酸の影響が考えられた。そこで、エタノールによる影響の大きかったアルブミン 5%を選択し、その結合性に及ぼすエタノールの影響について検討した。エタノール(2.9 vol%)添加により *S*および *R*-エナンチオマーの解離定数は有意に上昇した (Table 3)。

エタノールは高濃度では薬物の結合置換を、低濃度では結合サイト周囲の立体構造変化を示すことが報告されている¹⁴⁾。そのため、このエタノールによる薬物のアルブミン結合性への立体選択的な影響は、エタノールがヒト血清アルブミン内のワルファリン結合サイト周囲の立体構造変化を生じさせたことによると推察された。また、ヒト血清アルブミンと比較し市販アルブミン製剤中タンパク質へのワルファリンエナンチオマーの結合性低下は、含有する遊離脂肪酸による影響であることが示唆された。

1-2. ワルファリンエナンチオマーの CYP2C9.1 による代謝に及ぼすエタノールの影響

CYP2C9.1 を用いてシトクロム P450(CYP)による薬物代謝へのエタノールの影響を CYP2C9 で代謝される *S*-ワルファリンおよびジクロフェナクを用いて検討したところ、*S*-ワルファリンの CYP2C9.1 による代謝の K_m はエタノールにより影響を受けず、 V_{max} および V_{max}/K_m はエタノール濃度の増加により低下した (Table 4)。したがって、エタノールは *S*-ワルファリンの CYP2C9.1 による代謝に対し非競合的に阻害することが示唆された。一方、ジクロフェナクの V_{max} はエタノールにより有意な影響を受けなかったが、 K_m および V_{max}/K_m はエタノール濃度の増加により減少した (Table

Table 2. NEFA Concentration in Commercial Albumin Preparations

Albumin preparation	NEFA concentration (mEq/L)
Fatty acid-free albumin	0.02
Albumin(5%)·Cutter	3.64
Albumin(5%)-wf	4.00
Albuminar-5%	4.11
Buminate 5%	4.39

Each values represents the mean. (N=2).

Table 3. Effect of Ethanol on the Binding of Warfarin Enantiomers to Proteins from Albuminar

		Control	With ethanol
<i>S</i> -warfarin	n	0.84 \pm 0.06	0.92 \pm 0.05
	K_d (μ M)	19.2 \pm 1.6	24.0 \pm 1.5*
<i>R</i> -warfarin	n	0.94 \pm 0.10	0.96 \pm 0.03
	K_d (μ M)	26.9 \pm 2.8	36.8 \pm 2.4*

Each value represents the mean \pm S.D. (N=4). n: the number of binding sites in the HSA molecule. K_d : the dissociation constant. Protein: 615 μ M. Ethanol: 2.9 vol%. * $p < 0.05$ versus control (paired *t*-test).

Table 4. Kinetic Parameters for 7-Hydroxylation of *S*-Warfarin by Recombinant Human CYP2C9.1

Ethanol	V_{max} (pmol/min/nmol P450)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m (μ l/min/nmol P450)
Control	64.1 ± 13.5	2.5 ± 1.1	28.2 ± 7.1
0.05 vol%	48.5 ± 14.4	2.5 ± 1.0	20.4 ± 5.0
0.10 vol%	50.9 ± 6.2	3.9 ± 0.5	13.0 ± 0.7
0.30 vol%	33.0 ± 6.1	4.5 ± 1.1	7.5 ± 0.7
1.00 vol%	16.1 ± 3.8	4.6 ± 1.9	4.1 ± 2.3

Each value represents the mean ± S.D. (N=3). * p <0.05, ** p <0.01 (Tukey's t -test).

Table 5. Kinetic Parameters for 4'-Hydroxylation of Diclofenac by Recombinant Human CYP2C9.1

Ethanol	V_{max} (nmol/min/nmol P450)	K_m (μ M)	V_{max}/K_m (ml/min/nmol P450)
Control	6.5 ± 1.0	3.3 ± 0.6	2.0 ± 0.1
1.0 vol%	5.8 ± 0.5	3.6 ± 0.1	1.6 ± 0.2
3.0 vol%	6.3 ± 0.6	5.5 ± 0.7	1.2 ± 0.1

Each value represents the mean ± S.D. (N=3). * p <0.05, ** p <0.01 (Tukey's t -test).

5)。そのため、エタノールはジクロフェナクの代謝において競合的に阻害することが示唆された。CYP2C9.1による*S*-ワルファリンの代謝を阻害するエタノール濃度は、ジクロフェナクの代謝を阻害する濃度よりも低濃度であった。CYP2C9.1による*S*-ワルファリンとジクロフェナクの代謝におけるエタノールによる阻害濃度および阻害様式の相違から、代謝される基質により影響が異なることが明らかになった。また、エタノールは球状タンパク質を変性させる作用を有する¹⁵⁾。エタノールの*S*-ワルファリン代謝への阻害は、CYP2C9.1の構造変化によるものと考えられる。これらの結果から、ヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性に注目し、異なる基質間でのエステラーゼ活性へのエタノールの影響についても検討が必要であると考えられた。

第 2 章 ヒト血清アルブミンによるエステル型薬物の加水分解に及ぼすエタノールと薬物の影響におけるヒト血清アルブミン製品製造ロット間での相違

第 1 章では、ヒト血清アルブミンおよび市販アルブミン製剤間においてワルファリンエナンチオマーのタンパク結合性に及ぼすエタノールの影響に相違が認められた。また、CYP2C9.1による*S*-ワルファリンの代謝とジクロフェナクの代謝においてエタノールの作用が異なることを確認した。そこで、本章ではヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性について、3種類のエステル型薬物（アスピリン、*p*-ニトロフェニルアセテート、オルメサルタンメドキシミル）を基質として用いてヒト血清アルブミンによる加水分解に及ぼすエタノールの影響を検討した。さらにヒト血清アルブミンへの結合率の高い薬物でサイト I に結合するワルファリン、インドメタシン及びサイト II に結合するナプロキセンによるエステル型薬物の加水分解への影響についても、ヒト血清アルブミン製品の製造ロットの異なる 4 製品を使用して比較検討した。

方 法

1. ヒト血清アルブミン ヒト血清アルブミンは製造ロットの異なる遊離脂肪酸除去 4 製品を Sigma-Aldrich 社から購入した。

2. アスピリンあるいはオルメサルタンメドキシミルの代謝実験 Ma ら¹⁶⁾の方法を一部改変して行った。リン酸緩衝液 (pH 7.4) にヒト血清アルブミンとエタノール、ワルファリン、インドメタシンまたはナプロキセンを溶解したものに、アスピリンまたはオルメサルタンメドキシミルを加えて 37°C でインキュベーションした。一定時間後に氷冷したアセトニトリル添加にて反応停止後、遠心して上清を回

収し、HPLCによりサリチル酸あるいはオルメサルタンを測定した。その際、ヒト血清アルブミンを含まないリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中でのアスピリンあるいはオルメサルタンメドキシミルの加水分解も測定し、ヒト血清アルブミンによる加水分解の擬 1 次速度定数 (k_{obs}) を補正して算出した。

3. *p*-ニトロフェニルアセテートの代謝実験 Ikeda ら¹⁷⁾の方法を改変して行った。リン酸緩衝液 (pH 7.4) にヒト血清アルブミンとエタノール、ワルファリン、インドメタシンまたはナプロキセンまたはエゼリンを溶解したものに、*p*-ニトロフェニルアセテートを加えて 25°C でインキュベーションした。生成する *p*-ニトロフェノールを吸光光度法により経時的に測定した。

4. 解析方法 擬 1 次速度定数 (k_{obs}) をヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性による加水分解作用の指標とした。

5. 遊離脂肪酸の定量 各製造ロットのヒト血清アルブミン製品中に含まれる遊離脂肪酸濃度は、第 1 章と同様に NEFA C-テストワコーを用いて定量した。

6. グリコアルブミンの測定 各種製造ロットの製品におけるヒト血清アルブミン中のグリコアルブミンの割合は、株式会社エスアールエルに依頼し、酵素法により測定した。

7. インドキシル硫酸および 3-インドール酢酸の定量 各種ロットのヒト血清アルブミン製品中に含まれるインドキシル硫酸および 3-インドール酢酸は、ヒト血清アルブミンを除去した上清について HPLC 法により定量した。

結果および考察

2-1. アスピリンの加水分解に及ぼすエタノールの影響におけるヒト血清アルブミン製品製造ロット間での相違

エタノール非存在下においてアスピリンの加水分解に製造ロット間の違いが認められた。エタノール (2 vol%) の添加は、製造ロット 090M7001V および SLBD7204V のヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解を阻害した。一方、113K7601 および 085K7541 によるアスピリンの加水分解には影響しなかった (Table 6)。

Table 6. Effect of Ethanol on the Hydrolysis of Aspirin by HSA from 4 Different Lot Preparations

Manufacturing Lots of HSA	k_{obs} for aspirin ($10^{-6} s^{-1}$)		Student's <i>t</i> -test results
	Control	With ethanol	
113K7601 ^a	7.4±0.1	6.4±1.0	NS
085K7541 ^a	10.3±2.4	10.6±1.3	NS
090M7001V ^b	12.1±1.3	9.4±0.7	<i>p</i> <0.05
SLBD7204V ^b	12.6±1.7	8.2±0.3	<i>p</i> <0.05

Each value represents the mean±S.D. (N=3). HSA: 200 μM, Aspirin: 100 μM, Ethanol: 2 vol%. NS: not significant. ^a: not detected fatty acids, ^b: detected low levels of fatty acids by NEFA C-Test Wako (data not shown).

2-2. アスピリンの加水分解に及ぼす薬物の影響におけるヒト血清アルブミン製品製造ロット間での相違

ヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解に及ぼすワルファリン、インドメタシンおよびナプロキセンの影響を検討した結果、エタノール添加の結果と同様に、ワルファリンやインドメタシンの添加によって 090M7001V と SLBD7204V による加水分解は大きく阻害された (Fig. 2)。サイト II に結合するナプロキセンよりもサイト I に結合するワルファリンやインドメタシン添加によりアスピリンの加水分解が強く阻害されることを認めたため、アスピリンの加水分解にはサイト I が関与していることが示唆された。

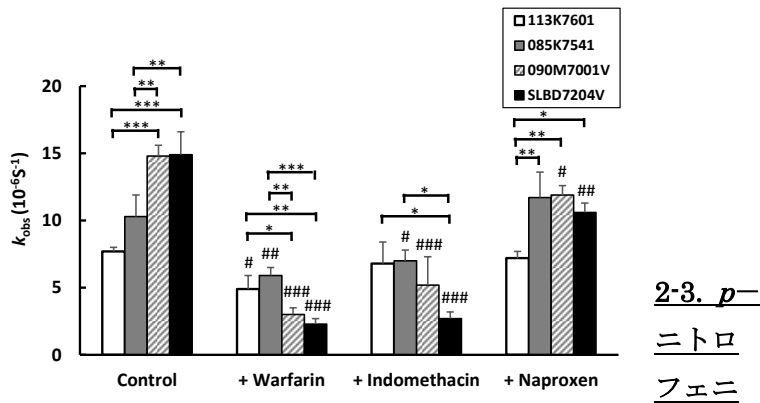


Fig. 2. Effects of Warfarin, Indomethacin, and Naproxen on the Hydrolysis of Aspirin by HSA from 4 Different Lot Preparations

Data are expressed as mean values±S.D. (N=3). HSA: 200 μM. Aspirin: 100 μM. Inhibitor: 200 μM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significant difference among manufacturing lots in each group (Tukey's t -test). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ significantly different from the control (Dunnett's pairwise multiple comparison t -test).

2-3. p -ニトロフェニルアセテートの加水分解に及ぼすエタノールの影響におけるヒト血清アルブミン製品製造ロット間での相違

エタノール非存在下において顕著な製造ロット間の違いが認められ、特に 113K7601 による加水分解が低かった。全ての製造ロットで p -ニトロフェニルアセテートの加水分解をエタノール(2 vol%)は有意に阻害し、113K7601 以外の製造ロットによる加水分解を大きく阻害した (Table 7)。

Table 7. Effect of Ethanol on the Hydrolysis of p -Nitrophenyl Acetate by HSA from 4 Different Lot Preparations

Manufacturing Lots of HSA	k_{obs} for p -Nitrophenyl Acetate (10^{-3} s^{-1})		Student's t -test results
	Control	With ethanol	
113K7601	4.1±0.2	3.5±0.2	$p < 0.05$
085K7541	22.1±0.6	11.9±0.1	$p < 0.001$
090M7001V	17.1±0.3	9.2±0.3	$p < 0.001$
SLBD7204V	20.6±0.4	10.6±0.4	$p < 0.001$

Each value represents the mean±S.D. (N=3). HSA: 50 μM. p -Nitrophenyl acetate: 10 μM. Ethanol: 2 vol%.

2-4. p -ニトロフェニルアセテートの加水分解に及ぼす薬物の影響におけるヒト血清アルブミン製品製造ロット間での相違

ワルファリンやインドメタシンと比べ、サイト II に結合するナプロキセンは p -ニトロフェニルアセテートの加水分解を強く阻害し、 p -ニトロフェニルアセテートの加水分解はサイト II が関与していることを示唆した。ワルファリン、インドメタシンあるいはナプロキセンによる p -ニトロフェニルアセテートの加水分解の阻害の強さは、何れの製造ロットにおいても同程度であった (Fig. 3)。

ヒト血清アルブミンによる加水分解において製造ロット間で相違が認められた。ヒト血清アルブミン製品へのコリンエステラーゼ混入の報告¹⁸⁾もあるため、コリンエステラーゼ

阻害剤であるエゼリン添加の有無による p -ニトロフェニルアセテートの加水分解の変化を検討した。しかし、エゼリンによる有意な影響は認められなかった。さらに、検討に用いたヒト血清アルブミン製

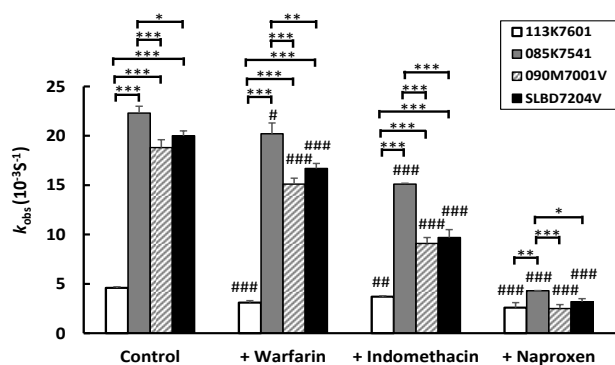


Fig. 3. Effects of Warfarin, Indomethacin, and Naproxen on the Hydrolysis of p -Nitrophenyl Acetate by HSA from 4 Different Lot Preparations

Data are expressed as mean values±S.D. (N=3). HSA: 50 μM. p -Nitrophenyl acetate: 10 μM. Inhibitor: 50 μM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significant difference among manufacturing lots in each group (Tukey's t -test). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ significantly different from the control (Dunnett's pairwise multiple comparison t -test).

品 4 製品において、内因性のサイト II 高親和性物質インドキシル硫酸および 3-インドール酢酸はアルブミン 1 分子当たり 0.001 分子以下であった。また、ヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性への遊離脂肪酸による影響や、ヒト血清アルブミンの糖化による影響が報告されていることから、各製造ロットにおける NEFA 含量およびグリコアルブミン値を測定した。NEFA 含量の多いロット製品でアスピリンの加水分解速度は高値を示した。一方、グリコアルブミン値とアスピリンの加水分解速度との関連性はみられなかった。少量の遊離脂肪酸はサイト I が存在するサブドメイン II A へのワルファリンやアスピリンの結合を増大させる^{19, 20)}。そのため、アスピリンの加水分解はサイト I への結合増大により促進されたと考えられる。また、NEFA 濃度の高いロット製品において、ワルファリンとインドメタシンはアスピリンの加水分解を強く阻害した。これは、ワルファリンとインドメタシンはアスピリンよりもヒト血清アルブミンへの結合親和性が高い²¹⁻²⁴⁾ ため、NEFA の存在によりアスピリンのヒト血清アルブミンへの結合をワルファリンとインドメタシンは、より強く阻害したためと考えられる。

2-5. オルメサルタンメドキシミルの加水分解に及ぼすエタノールと薬物の影響におけるヒト血清アルブミン製造ロット間での相違

エタノール非存在下におけるヒト血清アルブミンによるオルメサルタンメドキシミルの加水分解に、これまでのアスピリンや *p*-ニトロフェニルアセテートの結果と異なり、製造ロット間による相違は認められなかった (Table 8)。ヒト血清アルブミンによるオルメサルタンメドキシミルの加水分解に及ぼすエタノール(2 vol%)による阻害の影響は、全てのロットにおいて認められなかった。しかしながら、ワルファリン、インドメタシンおよびナプロキセンの添加により阻害された。そのため、オルメサルタンメドキシミルはサイト I 並びにサイト II の両部位で加水分解されることが示唆された。これらの結果より、ヒト血清アルブミンによるエステル型薬物の加水分解へのエタノールの影響が基質により異なること確認された。また、ヒト血清アルブミン製品の製造ロット間でエステル型薬物の加水分解特性は異なることが観察された。

Table 8. Effects of Ethanol, Warfarin, Indomethacin, and Naproxen on the Hydrolysis of Olmesartan Medoxomil by HSA from 4 Different Lot Preparations

Manufacturing lots of HSA	k_{obs} for olmesartan medoxomil ($10^{-3} s^{-1}$)				
	Control	With ethanol	With warfarin	With indomethacin	With naproxen
113K7601	1.28±0.11	1.09±0.10	0.47±0.04***	0.43±0.12***	0.46±0.16***
085K7541	1.01±0.02	1.06±0.09	0.44±0.08***	0.50±0.16***	0.74±0.15*
090M7001V	1.16±0.07	1.32±0.30	0.45±0.03**	0.51±0.09**	0.65±0.17*
SLBD7204V	1.32±0.22	1.38±0.17	0.43±0.01***	0.61±0.06***	0.60±0.12***

Each value represents the mean ± S.D. (N=3). HSA: 200 μM. Olmesartan medoxomil: 40 μM. Ethanol: 2 vol%. Inhibitor: 200 μM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from the control (Dunnett's pairwise multiple comparison *t*-test).

結 論

ヒト血清アルブミンへのワルファリンエナンチオマー結合性に及ぼすエタノールの影響とともに、ヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性に及ぼすエタノールの影響を検討し、以下の結論を得た。

1. エタノールはワルファリンエナンチオマーの遊離脂肪酸除去ヒト血清アルブミンへの結合性にエナンチオマー間で異なる影響を及ぼした。市販アルブミン製剤中タンパク質へのワルファリン両エナンチオマーの結合性はエタノールにより低下した。そして、市販アルブミン製剤中に含有される遊離脂肪酸はワルファリンエナンチオマーのタンパク結合性へのエタノールの作用に影響を及ぼした。

2. ヒト血清アルブミン製品のエステラーゼ活性に製造ロット間での相違を示した。そして、エタノールはヒト血清アルブミンのサイトIとサイトIIが関与するエステラーゼ活性に基質により異なる影響を及ぼした。また、エタノールによるサイトIにおけるエステラーゼ活性阻害作用にヒト血清アルブミン製品に含まれる遊離脂肪酸が影響した。

主薬相互だけでなく製剤添加物も含めて注射剤混合時の配合変化と共に投与時には体内での製剤添加物とのタンパク結合における相互作用に注意する必要性が示唆された。ヒト血清アルブミン製品のほとんどは、ヒト血清から精製されており、製造ロット間でのエステラーゼ活性の相違により、エタノールによる影響が変動することを示唆する結果を得た。また、エタノールはエステル型のプロドラッグにおいてヒト血清アルブミンによる活性代謝物の生成に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究の成果は製剤添加物と薬物との相互作用を考慮する上での有益な基礎的知見を与えるものと考えられた。

文 献

- 1) Sudlow G, *et al. Mol. Pharmacol.*, **11**, 824-832 (1975).
- 2) Kratz F. *J. Control Release*, **190**, 331-336 (2014).
- 3) O'Reilly RA. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**, 348-354 (1974).
- 4) O'Reilly RA, *et al. Thromb. Diath. Haemorrh.*, **1**, 1-22 (1964).
- 5) Yacobi A, Levy G. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **5**, 123-131 (1977).
- 6) Borga O, Borga B. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **25**, 63-77 (1997).
- 7) Iwakawa S, *et al. Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1983-1985 (2006).
- 8) Vorum H, Honore B. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 870-875 (1996).
- 9) Birkett DJ, *et al. Mol. Pharmacol.*, **13**, 987-992 (1977).
- 10) Nilsen OG, *et al. Biochem. Pharmacol.*, **26**, 229-235 (1977).
- 11) Wilding G, *et al. Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1143-1146 (1977).
- 12) Noctor TAG, *et al. J. Chromatogr.*, **577**, 305-315 (1992).
- 13) Birkett DJ, *et al. Clin. Chim. Acta.*, **85**, 253-258 (1978).
- 14) Ha CE, *et al. J. Biomed. Sci.*, **7**, 114-121 (2000).
- 15) Herskovits TT, *et al. J. Biol. Chem.*, **245**, 2588-2598 (1970).
- 16) Ma SF, *et al. Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1911-1919 (2005).
- 17) Ikeda K, *et al. Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 80-87 (1979).
- 18) Chapuis N, *et al. Pharm. Res.*, **18**, 1435-1439 (2001).
- 19) Petitpas I, *et al. J. Biol. Chem.*, **276**, 22804-22809 (2001).
- 20) Bojko B, *et al. Int. J. Biol. Macromol.*, **42**, 314-323 (2008).
- 21) Aarons L, *et al. J. Pharm. Pharmacol.*, **32**, 537-543 (1980).
- 22) Lee S, *et al. Vet. Hum. Toxicol.*, **37**, 224-225 (1995).
- 23) Kragh-Hansen U. *Pharmacol. Rev.*, **33**, 17-53 (1981).
- 24) Honoré B, Brodersen R. *Mol. Pharmacol.*, **25**, 137-150 (1984).

論文審査の結果の要旨

分子量約 66,500 の血清タンパク質であるヒト血清アルブミンは血液の膠質浸透圧の維持に重要な役割を担っていると同時に、薬物、脂肪酸やホルモンなどの物質と結合して輸送する機能も有している。ヒト血清アルブミンには主な薬物結合部位が 2 か所あり、サイト I はワルファリン、インドメタシンが結合するサイトで、サイト II はジアゼパム、ナプロキセンが結合するサイトとされている。また、サイト I 及びサイト II は種々のエステル型薬物などに対して酵素的作用(エステラーゼ活性)を有している。

製剤添加物が注射剤混合時の配合変化に及ぼす影響については検討がなされているが、注射剤が投与された後の製剤添加物に起因する生体内での薬物相互作用についての検討は少ない。水に難溶性の薬物の溶解性向上のためにエタノールが製剤添加物として注射製剤で繁用されている。そこで、申請者は市販ヒト血清アルブミン製剤及びヒト血清アルブミン製品の各種製造ロット試料を用いて、ヒト血清アルブミンへのワルファリンエナンチオマーの結合性およびエステル型薬物に対するエステラーゼ活性へのエタノールの影響を明らかにする目的で検討を行った。

ヒト血清アルブミンへのワルファリンエナンチオマー結合性へのエタノールの影響についての検討により、ワルファリンエナンチオマーのヒト血清アルブミンへの結合性にエタノールはエナンチオマー間で異なる影響を及ぼすことを明らかにした。また市販アルブミン製剤中タンパク質へのワルファリン両エナンチオマーの結合性はエタノールにより低下することを認めた。そして、市販アルブミン製剤を用いたワルファリンエナンチオマーのアルブミン結合性へのエタノールの作用に市販アルブミン製剤中に含有される遊離脂肪酸が影響を及ぼすことを認めた。また、3 種類のエステル型薬物(アスピリン、*p*-ニトロフェニルアセテート、オルメサルタンメドキシミル)を基質として用いてヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性を検討したところ、ヒト血清アルブミン製品のエステラーゼ活性は製造ロット間で相違することを認めた。そして、エタノールはヒト血清アルブミンのサイト I とサイト II が関与するエステラーゼ活性に基質によって異なる影響を及ぼすことを明らかにした。また、エタノールによるサイト I におけるエステラーゼ活性阻害作用にヒト血清アルブミン製品に含まれる遊離脂肪酸が影響することを認めた。

本研究により、主薬相互だけでなく製剤添加物も含めて注射剤混合時の配合変化と共に投与時には体内での製剤添加物と薬物とのタンパク結合における相互作用に注意する必要性が示唆された。また、エタノールは、エステル型のプロドラッグにおいてヒト血清アルブミンによる活性代謝物の生成に影響を及ぼす可能性が示唆された。本研究の成果は、製剤添加物と薬物との相互作用を考慮する上での有用な基礎的知見を与えるものと考えられる。

上記の論文は博士(薬学)論文として、適当と判定する。