

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

2018

辰見 明俊



## 目 次

略語表	iv
序 論	1
1. ヒト血清アルブミン	1
2. 製剤添加物としてのエタノールとヒト血清アルブミン	1
本 論	7
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	7
第1節 緒 言	7
第2節 実験材料及び方法	11
2-1. 実験材料及び試薬	11
2-2. ワルファリンエナンチオマーのタンパク結合測定	12
2-3. ワルファリンエナンチオマーの定量	13
2-4. 遊離脂肪酸の定量	15
2-5. ヒト血清アルブミンへの結合パラメータの解析	15
2-6. CYP2C9.1 によるワルファリン、ジクロフェナク代謝実験	15
2-7. <i>S</i> -ワルファリン代謝物およびジクロフェナク代謝物の定量	16
2-8. 代謝反応における反応速度論的パラメータの解析	18
2-9. 統計解析	18
第3節 結 果	20
3-1. 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及ぼすエタノールの影響	20
3-1-1. ワルファリンエナンチオマー間での比較	20
3-1-2. 各種アルコールの影響	22
3-1-3. 市販アルブミン製剤を用いたワルファリンのタンパク結合性に及ぼすエタノールの影響	24
3-1-4. 市販アルブミン製剤中遊離脂肪酸濃度	26
3-1-5. 市販アルブミン製剤（アルブミナー®）中タンパク質への結合性	27

3-2. 遺伝子組換え CYP2C9.1 による薬物代謝に及ぼすエタノールの影響 -----	29
3-2-1. <i>S</i> -ワルファリン、ジクロフェナクの代謝に及ぼすエタノールの影響 -----	29
3-2-2. <i>S</i> -ワルファリンの 7-水酸化代謝に及ぼすエタノールの影響 -----	30
3-2-3. ジクロフェナクの 4'-水酸化代謝に及ぼすエタノールの影響 -----	32
第 4 節 考 察 -----	35
4-1. 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 -----	35
4-2. 遺伝子組換え CYP2C9.1 による薬物代謝に及ぼすエタノールの影響 -----	41
第 5 節 小 括 -----	44

## 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----- 45

第 1 節 緒 言 -----	45
第 2 節 実験材料及び方法 -----	48
2-1. 実験材料及び試薬 -----	48
2-2. ヒト血清アルブミンによるエステル型薬物の代謝実験 -----	49
2-3. 代謝物の定量 -----	51
2-4. インドキシル硫酸および 3-インドール酢酸の定量 -----	55
2-5. 遊離脂肪酸の定量 -----	56
2-6. スルフヒドリル基の定量 -----	56
2-7. グリコアルブミンの定量 -----	56
2-8. エステラーゼ活性の解析 -----	57
2-9. 統計解析 -----	57
第 3 節 結 果 -----	59
3-1. アスピリンの加水分解に及ぼすエタノールと薬物の影響における製造ロット間での相違 -----	59
3-2. <i>p</i> -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と薬物の影響における製造ロット間での相違 -----	61
3-3. 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製造ロット間での相違 -----	66
第 4 節 考 察 -----	68

4-1. アスピリンの加水分解-----	68
4-2. <i>p</i> -ニトロフェニルアセテートの加水分解-----	73
4-3. オルメサルタンメドキシミルの加水分解-----	76
第5節 小 括 -----	79
総 括 -----	80
謝 辞 -----	81
文 献 -----	82

## 略 語 表

Cunb	Unbound concentration	(非結合型濃度)
CYP	Cytochrome P450	(シトクロム P450)
CYP2C9.1	Recombinant CYP2C9.1	(遺伝子組換え CYP2C9.1)
HPLC	High-performance liquid chromatography	(高速液体クロマトグラフィー)
HSA	Human serum albumin	(ヒト血清アルブミン)
$K_d$	Dissociation constant	(解離定数)
$K_i$	Inhibition constant	(阻害定数)
$K_m$	Michaelis constant	(ミカエリス定数)
$k_{obs}$	Pseudo-first-order reaction rate constant	(擬一次反応速度定数)
n	Number of binding sites in the HSA molecule	(HSA 1 分子上における薬物結合部位数)
N	Number of experiments	(実験回数)
NEFA	Non-esterified fatty acid	(非エステル型脂肪酸、遊離脂肪酸)
PBS	Phosphate-buffered saline	(カルシウム、マグネシウム不含リン酸緩衝食塩水)
r	Number of moles of drug bound per mole of HSA	(HSA 1 分子当たりに結合している薬物分子の数)
S.D.	Standard deviation	(標準偏差)
V	Velocity of metabolism	(代謝速度)
$V_{max}$	Maximum velocity of metabolism	(最大代謝速度)

## 序 論

### 1. ヒト血清アルブミン

ヒト血清アルブミンは585個のアミノ酸からなる分子量約66,500の単量体タンパク質である。ヒト血清アルブミンは、血漿中に約40～50 g/Lと高濃度に存在し、正常ヒト血清タンパク質のうち約60%を占める量的に最も多く存在する血清タンパク質である。内因性リガンド（遊離脂肪酸、ビリルビン、尿毒症物質、アミノ酸、ホルモン、金属イオン等）の輸送担体としての機能を有している。そして、膠質浸透圧の調節機能があり、血漿膠質浸透圧の約80%を担っている。水分を保持することにより循環血液量を調節するなどの重要な機能を有している。

また、ヒト血清アルブミンは薬物の血清タンパク質への結合性を評価するうえでも重要なタンパク質で、その分子上には主要な薬物結合サイト<sup>1)</sup>及び遊離脂肪酸結合サイト<sup>2,3)</sup>が存在している。Fig. 1に示すようにヒト血清アルブミンは3つの $\alpha$ -ヘリックスドメイン（I－III）からなり、各ドメインはAおよびBで構成され、それぞれ6つと4つの $\alpha$ -ヘリックスからなる<sup>1,4)</sup>。多くの薬物は、SudlowのサイトIとサイトIIとして知られている2つの主要な結合サイトに結合することが報告されている<sup>5)</sup>。遊離脂肪酸結合サイトは6～8箇所あり、サブドメインIII Bに高親和性結合サイトがある。その結合サイトは6つのサブドメインのすべてに含まれている。

また、ヒト血清アルブミンは抗酸化能およびエステル型薬物などに対して加水分解作用を示す酵素的作用（エステラーゼ活性）を有している<sup>6)</sup>。

### 2. 製剤添加物としてのエタノールとヒト血清アルブミン

エタノールは、汎用されている製剤添加物の一つであり、内服剤のみならず注射剤においても広く用いられている。Table 1にエタノールを製剤添加物として用いた注射薬の製剤例を示す。各種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。エタノールと同様に製剤添加剤として用いられている非イオン性界面活性剤の生体内における薬物相互作用については、ポリオキシシル 35 ヒマシ油（クレモフォール EL）やポリソルベート 80 によ

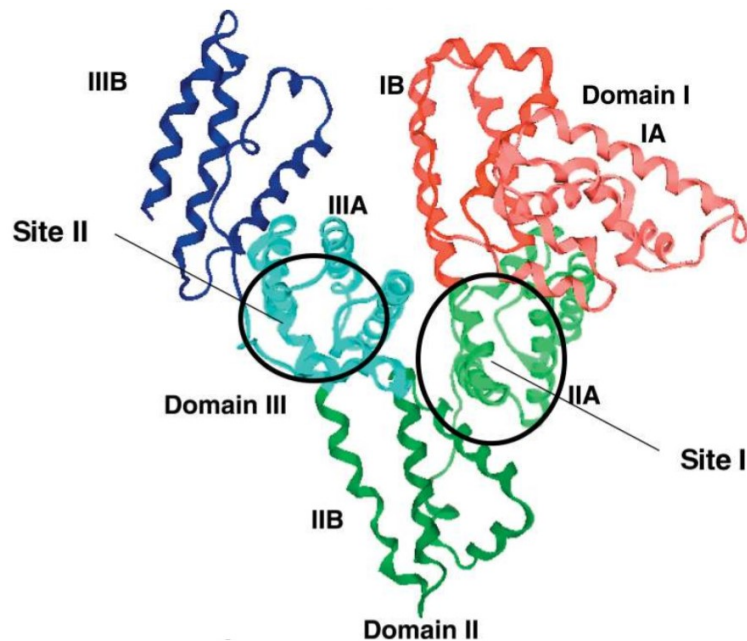


Fig. 1. Crystal structure of human serum albumin and approximate locations of Sudlow's drug binding sites. ( Chuang and Otagiri 2006<sup>7)</sup> ).

る P-糖タンパク質輸送活性阻害作用の報告<sup>8)</sup> やクレモフォール RH40 による P-糖タンパク質輸送活性阻害作用およびシトクロム P450 (CYP) 代謝活性阻害作用の報告がある<sup>9)</sup>。また、クレモフォール RH40 がジゴキシンの体内動態に影響を及ぼすことの報告<sup>10)</sup> など、吸収過程および代謝過程においての検討はされている。それに対して、製剤添加剤と薬物とのヒト血清アルブミンでの相互作用に関しては、ヒト血清タンパク質へのワルファリンやプロプラノロールなどの結合性に及ぼすポロキサマー188 の影響についての報告<sup>11)</sup> が認められる程度である。エタノールについても、ヒト肝ミクロソームや CYPs などの代謝への影響や、アルブミンの機能への影響に関する検討はそれほど多くはなく、かつ詳細な検討はなされていない。



Table 1. Examples of clinical drug preparations for intravenous injection using ethanol as excipient in Japan

Therapeutic class	Drug	Content of ethanol ( / vial or ampule )
Antiepileptic	Aleviatin <sup>®</sup>	0.525 mL
Antineoplastic	Alkeran <sup>®</sup>	0.52 mL
	Istodax <sup>®</sup>	0.468 mL <sup>a</sup>
	Docetaxel “Aska” 20 mg	0.241 mL <sup>a</sup>
	80 mg	0.963 mL <sup>a</sup>
	Docetaxel “Sawai” 20 mg	0.242 mL <sup>a</sup>
	80 mg	0.968 mL <sup>a</sup>
	Docetaxel 20 mg / 1 mL <sup>b</sup>	0.500 mL <sup>a</sup>
	80 mg / 4 mL <sup>b</sup>	2.000 mL <sup>a</sup>
	Docetaxel “Pfizer” 20 mg / 1 mL	0.487 mL <sup>a</sup>
	80 mg / 4 mL	1.950 mL <sup>a</sup>
	Docetaxel “Hospira” 20 mg / 2 mL	0.46 mL
	80 mg / 8 mL	1.84 mL
	120 mg / 12 mL	2.76 mL
	Docetaxel “Sandoz” 20 mg / 2 mL	0.698 mL <sup>a</sup>
	80 mg / 8 mL	2.79 mL <sup>a</sup>
	Etoposide “SN”	1.898 mL <sup>a</sup>
	Etoposide <sup>c</sup>	q.s.
	Faslodex <sup>®</sup>	0.127 mL <sup>a</sup>
	Halaven <sup>®</sup>	0.10 mL
	Jevtana <sup>®</sup>	0.726 mL <sup>a</sup>
	Lastet <sup>®</sup>	1.9 mL
	Onetaxotere <sup>®</sup> 20 mg / 1 mL	0.500 mL <sup>a</sup>
	80 mg / 4 mL	2.000 mL <sup>a</sup>
	Paclitaxel “Hospira” 30 mg	approx. 2.5 mL
	100 mg	approx. 8.3 mL
	Paclitaxel “NK” 30 mg	2.5 mL
	100 mg	8.4 mL
	Paclitaxel “Sawai” 30 mg	2.5 mL
	100 mg	8.35 mL
	150 mg	12.5 mL
	Paclitaxel 30 mg <sup>d</sup>	q.s.
	100 mg <sup>d</sup>	
	Taxol <sup>®</sup> 30 mg	2.50 mL
	100 mg	8.35 mL

Table 1. Examples of clinical drug preparations for intravenous injection using ethanol as excipient in Japan (continued)

Antineoplastic (continued)	Taxotere <sup>®</sup> 20 mg	0.242 mL <sup>a</sup>
	80 mg	0.968 mL <sup>a</sup>
	TORISEL <sup>®</sup>	0.953 mL <sup>a</sup>
	Vepsid <sup>®</sup>	1.5 mL
	Anhydrous Ethanol Injection “Fuso” * “Pfizer” *	5 mL 5 mL
Antiprotozoal	Bactramin <sup>®</sup>	0.633 mL <sup>a</sup>
Antithrombotic	Novastan <sup>®</sup> HI	0.380 mL <sup>a</sup>
	Slonnon <sup>®</sup> HI	0.380 mL <sup>a</sup>
Cardiotonic	Digilanogen <sup>®</sup>	0.2 mL
	Digosin <sup>®</sup>	0.109 mL <sup>a</sup>
Hematological	Normosang <sup>®</sup>	1.266 mL <sup>a</sup>
Immunosuppressive	Sandimmun <sup>®</sup>	1.645 mL
	Prograf <sup>®</sup> 2 mg	0.32 mL
	5 mg	0.8 mL
Radiopharmaceutical	Adosterol <sup>®</sup> —I 131 0.5 mL	0.008 mL
	1 mL	0.016 mL
	DaTSCAN <sup>®</sup>	0.1125 mL
Sedative	Cercine <sup>®</sup> 5mg	0.1 mL
	10mg	0.2 mL
	Diazepam “Taiyo” 5 mg	0.18 mL
	10 mg	0.36 mL
	Horizon <sup>®</sup>	0.20 mL
	Silece <sup>®</sup>	0.201 mL <sup>a</sup>
	Rohypnol <sup>®</sup>	0.201 mL <sup>a</sup>
	Vasolator <sup>®</sup> 1 mg	0.011 mL <sup>a</sup>
Vasodilator	5 mg	0.057 mL <sup>a</sup>
	25 mg	0.285 mL <sup>a</sup>
	50 mg	0.570 mL <sup>a</sup>
Vitamin	Maxacalcitol-Nipro 2.5 µg, 5 µg, 10 µg <sup>e</sup>	0.002 mL
	Oxarol <sup>®</sup> 2.5 µg, 5 µg, 10 µg	0.002 mL

a : Calculated value from the density of ethanol ( 0.79 g/mL ).

b : generic drugs of “Chemiphar”, “HK”, “NK”, “Teva”, “Towa”, or “Sawai”.

c : generic drugs of “DK”, “Sandoz”, or “Taiyo”.

d : generic drugs of “NP”, “Pfizer”, or “Sandoz”.

e : generic drugs of “Teva”, “Nichi-Iko”, or “Pfizer”

\* : active substance

q.s.: quantum sufficit (not open to the public)

また、Table 2 に示すようにヒト血清アルブミンは医薬品のほか、製剤添加物としても使用されている。市販アルブミン製剤に含まれるカプリル酸や *N*-アセチル-DL-トリプトファンなどの製剤添加物がアルブミンの薬物結合性に影響することも報告されている<sup>12)</sup>。そして、遊離脂肪酸を除去したヒト血清アルブミンと市販アルブミン製剤では同じヒト由来のアルブミンであるにもかかわらず、薬物の結合性が異なることも示されている。また、免疫グロブリン、プロテイン C および第Ⅷ因子などの血漿分画製剤や、ボツリヌス毒素などの安定化のためにヒト血清アルブミン自体が製剤添加剤としても用いられている。さらに現在では、ヒト血清アルブミンにパクリタキセルを結合させナノ粒子化したパクリタキセル製剤（アブラキサン®）も開発され臨床現場において用いられている。また、体内のアルブミンを利用することで作用の持続化を図ったドラッグデリバリー製剤も開発されている。脂肪酸側鎖を結合させてアルブミンとの親和性を高めることで作用の持続化を図ったインスリンアナログ製剤（インスリン デテムル（レベミル®）、インスリン デグルデク（トレシーバ®））や GLP-1 アナログ製剤（リラグルチド（ビクトーザ®））も開発され、臨床現場で用いられている。このようにヒト血清アルブミンは、その生体内での機能を目的とした投与のみでなく、ドラッグデリバリーの目的としても広く利用されていることから、ヒト血清アルブミンを対象とした薬物動態に関する検討は重要であると考えられる。

そこで著者は、第 1 章ではヒト血清アルブミンに高い結合性を示す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および CYP2C9 による薬物代謝に及ぼすエタノールの影響を検討した。さらに、第 2 章では、ヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性に注目し、3 種類のエステル型薬物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と薬物の影響におけるヒト血清アルブミン製品の製造ロット間での相違についても検討した。

以下、得られた結果を 2 章に分けて論述する。

**Table 2. 医薬品、製剤添加物としてのヒト血清アルブミン**

種類	使用目的	一般名	商品名
医薬品	アルブミンの喪失（熱傷、ネフローゼ症候群等） アルブミン合成低下（肝硬変症等）	人血清アルブミン（5%、25%）	アルブミナー静注 献血アルブミン静注 赤十字アルブミン静注
製剤添加物	安定化	乾燥スルホ化人免疫グロブリン 乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子 乾燥濃縮人プロトロンビン複合体	献血ベニロン-I 静注用 コンコエイト-HT ケイセントラ静注用
製剤添加物	懸濁（製剤添加物による副作用の軽減）	パクリタキセル（アルブミン懸濁型）	アブラキサ点滴静注用

## 本 論

### 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

#### 第 1 節 緒 言

##### ワルファリンエナンチオマー

ワルファリンは臨床において *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クマリン系の抗凝固薬（ Fig. 1-1 ）である。国際的にみても抗凝固療法に処方される薬物で使用頻度の高い経口投与可能な薬物である。本邦では 1962 年にワルファリンカリウムとして市販が開始され、現在に至るまで静脈血栓症の治療や予防に対して使用されている。

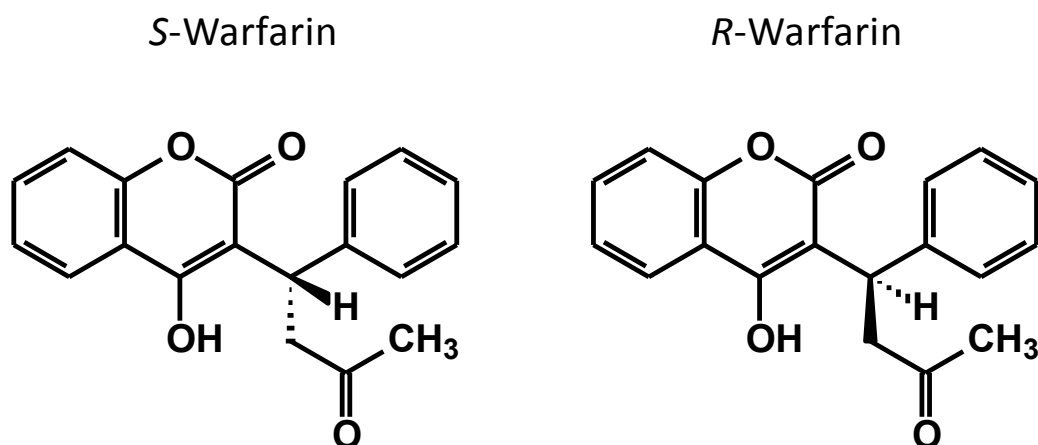


Fig. 1-1. *S*-warfarin and *R*-warfarin.

血液凝固因子のプロトロンビン（Ⅱ）、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ因子および血液凝固阻止因子であるプロテイン C、S などは、肝細胞内で合成される際、ビタミン K 依存性のカルボキシル化を受け凝固活性あるいは抗凝固活性を獲得する。この合成過程においてビタミン K は酸化され、エポキシドになるが、還元されると再びビタミン K となり補酵素活性を回復する。これをビタミン K サイクルという。ワルファリンはこの

還元酵素を阻害することにより、活性型ビタミン K を枯渇させるため、凝固因子（PIVKA）のカルボシキル化が不完全となり抗凝固効果を発揮する<sup>13)</sup>。

ワルファリンは 4% ヒト血清アルブミン濃度では 97~99% 結合し、ヒト血清アルブミンの主要な結合サイトの 1 つでサブドメイン II A に位置するサイト I が結合サイトとされている。そして、腎機能または肝機能の障害によるアルブミン濃度の低下や併用薬剤等による結合部位の置換により、非結合型ワルファリンの割合が上昇することが報告されている<sup>14, 15)</sup>。ワルファリンは治療域が狭いため、過量投与や併用薬によってワルファリンの代謝が阻害されると、脳内出血や消化管出血などの出血症状が強くなり、それが重篤である場合には死に至る場合もある。逆に投与量が少ない場合やワルファリン代謝酵素が誘導される場合は、血液が凝固し易くなるため脳梗塞や心筋梗塞などにつながる。したがって、ワルファリンの体内動態の変動には注意が必要である。

*S*-ワルファリンの抗凝固活性は *R*-ワルファリンの 3~5 倍であることが報告されている<sup>16)</sup>。また、*S*-ワルファリンと *R*-ワルファリンはヒトにおいて体内動態が異なることも報告されている<sup>17)</sup>。ワルファリンのアルブミンへの結合に関しては *S*-エナンチオマーおよび *R*-エナンチオマーはサイト I の同じ結合ポケットに結合すること<sup>18)</sup>、*S*-エナンチオマーは *R*-エナンチオマーに比べヒト血清アルブミンへの親和性が強いこと<sup>15, 19)</sup> が報告されている。したがって、ワルファリンの相互作用を検討していく上で *S*-エナンチオマーおよび *R*-エナンチオマーの評価は別々の化合物として考えていく必要がある。非ステロイド性消炎鎮痛薬においてはヒト血清アルブミンへの立体選択的な結合についての報告<sup>20-24)</sup> がいくつか見られるが、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及ぼす併用薬物との立体選択的な影響についての検討は少ない。*S*-ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合性を *S*-酢酸ロラゼパムが増強させるといった報告<sup>25)</sup> やセントジョーンズワートやニンジンが *S*-ワルファリン、*R*-ワルファリンの両エナンチオマーのヒト血清中タンパク質への結合性に影響を示さなかった報告<sup>26)</sup> がみられる程度である。ワルファリンを用いたタンパク結合に関する研究は数多く行われているが、製剤添加物の影響についての報告は少なく、またその立体選択的な結合への影響について検討した報告はほとんどみられない。

## 市販アルブミン製剤

市販アルブミン製剤は、血漿分画製剤の1つで含有タンパク質の96%以上がアルブミンである製剤である。その製剤化には、低温エタノール分画法と呼ばれる精製法が用いられている。この方法は、血漿中に低温下でエタノールと緩衝液を加え、エタノール濃度や pH 等の諸条件を調整することにより、特定の血漿タンパク質を不溶化・析出させ、遠心もしくは濾過操作により回収する方法である。分画より回収されたのち、安定化剤としてアセチルトリプトファンおよび中鎖脂肪酸であるカプリル酸ナトリウムを添加した後、60℃、10時間の液状加熱処理が行われ、最終製品となる。市販アルブミン製剤は、投与により速やかに循環血漿量が増加し体液循環が改善するため、臨床において熱傷、ネフローゼ症候群などによるアルブミンの喪失や、肝硬変症などのアルブミン合成低下による低アルブミン血症、出血性ショック等において古くから繁用されてきた。しかし、無作為化試験の系統的再評価によると、危篤状態の患者へのアルブミン製剤の投与により死亡率が上昇すると報告<sup>27)</sup>されている。これをうけ Olsen ら<sup>12)</sup>は市販アルブミン製剤およびヒト血清アルブミンを用いた薬物のタンパク結合率の違いから市販アルブミン製剤中の製剤添加物の薬物結合性への影響を報告している。また、安定化剤として添加されているアセチルトリプトファンおよびカプリル酸はヒト血清アルブミンの主にサイトⅡに結合する<sup>28, 29)</sup>。そして、カプリル酸はサイトⅡへの主要な結合薬物であるイブプロフェンエナンチオマーやナプロキセンエナンチオマーの結合に立体選択的な影響を及ぼすことが報告されている<sup>23)</sup>。そのため、市販アルブミン製剤の投与により、血漿中における薬物のアルブミンへの結合特性が変化することが考えられる。特に、血清アルブミンへの結合率の高い薬物や内因性リガンドの結合によるアルブミン結合性の変化は重要な問題である。また、臨床においては市販アルブミン製剤の大量投与は頻繁に行われており、市販アルブミン製剤中のアルブミンにより、その薬物結合性が大きく異なって現れることも考えられる。アルブミン製剤投与による死亡率の上昇にこのような背景が関係する可能性がある。このため市販アルブミン製剤と繁用される薬物や製剤添加物等による相互作用の検討は重要であると考えられる。

## ワルファリンエナンチオマーの代謝

先に述べたように *S*-および *R*-エナンチオマーのラセミ体混合物からなるワル

ワルファリンは、抗凝固薬として用いられている。この薬物は安全域が狭く、ワルファリンの代謝を変えるような薬剤との併用で、顕著な薬物間相互作用を示す<sup>30, 31)</sup>。ヒトにおけるワルファリンエナンチオマーの立体選択的な代謝は、CYP1A1/2、CYP2C9 および CYP3A4 のようなシトクロム P450 によって触媒されることが示されている<sup>32, 33)</sup>。*S*-ワルファリンの 7-ヒドロキシ化は、主として CYP2C9 によって触媒される (Fig. 1-2)。一方、*R*-ワルファリンは CYP1A2 により、6-および 8-ヒドロキシワルファリンに、CYP3A4 によって 10-ヒドロキシワルファリンに代謝される。非ステロイド性抗炎症薬のジクロフェナクもまた、CYP2C9 によって 4'-ヒドロキシジクロフェナクに代謝されることが知られている<sup>34, 35)</sup> (Fig. 1-2)。

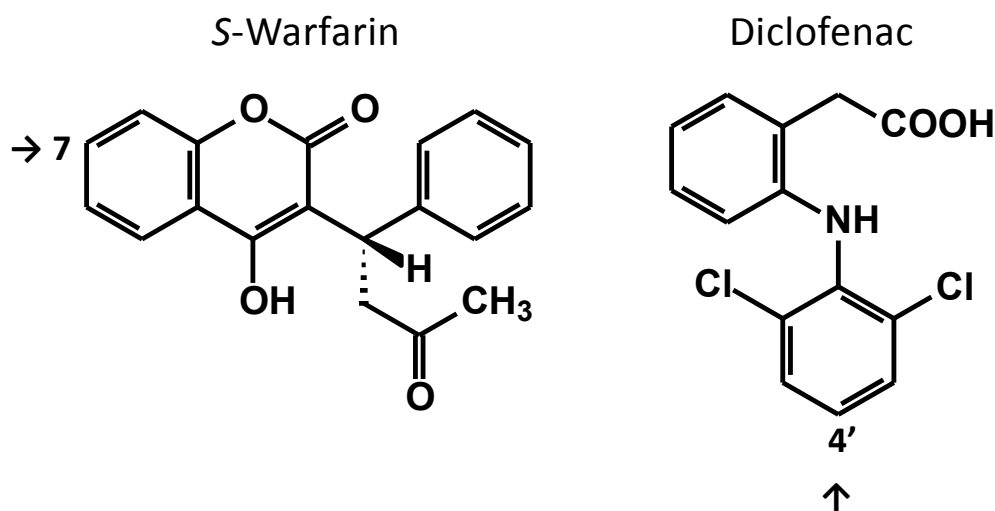


Fig. 1-2. Structure of *S*-warfarin and diclofenac.

→, primary site of hydroxylation

#### 製剤添加物としてのエタノールの薬物代謝に及ぼす影響

序論で述べたように、エタノールは多くの薬物の可溶化に用いられる製剤添加物として広く用いられている。様々な薬物は薬物動態学的に、あるいは薬力学的にアルコールと相互作用することがある<sup>36)</sup>。急性アルコール中毒は CYPs によるワルファリンの代謝を阻害し、抗凝固効果を上昇させ、出血リスクを導く<sup>37)</sup>。一方、慢性



のアルコール摂取は、代謝酵素活性を上昇させることがあり、ワルファリンの抗凝固効果を減少させることがある。Hamitouche ら<sup>38)</sup>は、CYP2E1、CYP1A2 および CYP3A4 などと同様に CYP2C9 もまたエタノールを代謝することができるが、エタノールに対する親和性は低いことを示した。様々な CYPs によるエタノールに対する酸化反応について測定された見かけ上の  $K_m$  は、約 10 mM であった<sup>38)</sup>。そのため、エタノールは CYP2C9 による他の基質の代謝にも影響する可能性がある。しかしながら、*in vitro* においてヒト CYP2C9 によるワルファリンの代謝へのエタノールの影響を検討した報告はほとんどみられない。同じく CYP2C9 により代謝されるジクロフェナクにおいては、エタノールはジクロフェナク (15  $\mu$ M) の代謝に有意な影響を及ぼさなかったことが報告されている<sup>39)</sup>。しかしながら、CYP2C9 による低濃度でのジクロフェナクの代謝におけるエタノールの影響は検討されていない。

そこで、製剤添加物として繁用されているエタノールによるワルファリンエナンチオマーの血清アルブミン結合への立体選択的な影響について検討するとともに、市販アルブミン製剤中タンパク質への結合性に及ぼすエタノールの影響を併せて検討した。次に、遺伝子組換え CYP2C9.1 ミクロソームによる *S*-ワルファリンおよびジクロフェナクの代謝に及ぼすエタノールの影響について検討することで、エタノールによる薬物の酸化反応に及ぼす影響を検討した。

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 2-1. 実験材料及び試薬

アルブミン ヒト血清由来(凍結乾燥末、遊離脂肪酸除去、グロブリンフリー、 $\geq 99\%$ 、ロット番号 113K7601)、4'-ヒドロキシジクロフェナクは Sigma-Aldrich 社から購入した。ワルファリンナトリウム、*S*-ワルファリン、*R*-ワルファリン、エタノール、ナプロキセン、NEFA C-テストワコー、ジクロフェナクナトリウム、NADPH、グルコース-6-リン酸、塩化マグネシウムおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼは和光純薬工業株式会社から購入した。7-ヒドロキシワルファリンおよび組換え

CYP2C9 である Human CYP2C9.1+P450 reductase microsomes derived from baculovirus expression systems は BD Gentest 社から購入した。メタノール、1-プロパノールはキシダ化学株式会社から購入した。2-プロパノールは関東化学株式会社より購入した。アルブミン 5%は ZLB ベーリング株式会社から、アルブミン (5%)・カッターはバイエル薬品株式会社から購入し、献血アルブミン (5%) - Wf は株式会社ベネシスから購入した。ブミネート 5%はバクスター株式会社から購入した。Centrifree Micropartition System はミリポア社から購入した。アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用 (キシダ化学株式会社) を用い、その他の試薬は特級規格品を使用した。

## 2-2. ワルファリンエナンチオマーのタンパク結合測定

### 2-2-1. 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実験

Borgå ら<sup>40)</sup>の方法を一部改変して行った。ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合に pH の変動による影響があること<sup>41, 42)</sup>から、シンプルであり短時間で非結合型の分離が行える限外濾過法<sup>40, 43)</sup>を選択した。カルシウム、マグネシウム不含リン酸緩衝食塩水 (PBS) にヒト血清アルブミン (最終濃度 615  $\mu\text{M}$ ) を溶解させた溶液に、*S*-ワルファリンまたは *R*-ワルファリン (それぞれ最終濃度 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) とエタノール (最終濃度 2.9 vol%, 500 mM) を混合した。続いて、その 1 mL を限外濾過装置 (Centrifree Micropartition System) に移し、37°C で 15 分間インキュベートした。その後、1,640 $\times g$  で 5 分間遠心 (05PR-22 形 日立小形冷却遠心機、日立工機株式会社) し、分離した濾液に内部標準としてナプロキセンを加えた 50  $\mu\text{L}$  を定量に供した。このとき、Centrifree Micropartition System の濾過膜へのワルファリンエナンチオマーの吸着や、エタノール添加による吸着への影響はほとんど認められなかった。エタノールを含まない PBS を用いて検討した試料をコントロールとした。

### 2-2-2. ヒト血清アルブミンへの結合性に及ぼす各種アルコールの影響についての結合実験

PBS にヒト血清アルブミン（最終濃度 615  $\mu\text{M}$ ）を溶解させた溶液に、ラセミ体のワルファリンナトリウム（最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ）および、メタノール、エタノール、1-プロパノール、あるいは 2-プロパノール（最終濃度 500 mM）を混合した後、2-2-1 の実験方法と同様の方法で分離し、分離した濾液の 50  $\mu\text{L}$  を定量に供した。

### 2-2-3. 種々の市販アルブミン製剤中タンパク質への結合性に及ぼすエタノールの影響についての結合実験

市販アルブミン製剤 4 製品（アルブミナー 5%、アルブミン（5%）・カッター、献血アルブミン（5%）-Wf、ブミネート 5%；アルブミン濃度として 752  $\mu\text{M}$ ）を PBS で希釈し、水酸化ナトリウムにより pH 7.3~7.4 になるように調整した溶液（アルブミン最終濃度 615  $\mu\text{M}$ ）に、ラセミ体のワルファリンナトリウム（最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ）およびエタノール（最終濃度 2.9 vol%, 500 mM）を混合した後、2-2-1 の実験方法と同様の方法で分離し、分離した濾液の 50  $\mu\text{L}$  を定量に供した。

### 2-2-4. ワルファリンエナンチオマーの市販アルブミン製剤中タンパク質への結合性に及ぼすエタノールの影響についての結合実験

アルブミナー 5% を PBS で希釈し、水酸化ナトリウムにより pH 7.3~7.4 になるように調製した溶液（アルブミン最終濃度 615  $\mu\text{M}$ ）に、*S*-ワルファリンまたは *R*-ワルファリン（それぞれ最終濃度 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ）およびエタノール（最終濃度 2.9 vol%, 500 mM）を混合し、2-2-1 の実験方法と同様の方法で分離し、分離した濾液の 50  $\mu\text{L}$  を定量に供した。

## 2-3. ワルファリンエナンチオマーの定量

Takahashi ら<sup>44)</sup>の方法を一部改変して行った。既知濃度のワルファリンナトリウムまたは *S*-、*R*-ワルファリンとナプロキセン（内部標準物質）を調製し、紫外分光光度計検出器を備えた HPLC を用いて波長 312 nm におけるワルファリンまたは *S*-、*R*-ワルファリンと内部標準物質のピーク面積比をワルファリンエナンチ

オマーの濃度に対してプロットして検量線を作成することで、ワルファリンエナンチオマーの定量を行った。Fig. 1-3 に *S*-、*R*-ワルファリンと内部標準物質の HPLC クロマトグラムを示す。使用した HPLC 分析条件は次の通りである。

システムコントローラ：島津 SCL-10Avp

オートインジェクタ：島津 SIL-10ADvp

ポンプ：島津 LC-10ADvp

紫外分光光度計検出器：島津 SPD-10Avp（波長：312 nm）

カラム：CHIRALCEL OD-RH

（4.6 mm I.D.×150 mm；5 μm、ダイセル化学工業）

カラム温度：40℃

溶出液：0.1 M リン酸二水素ナトリウム（pH 2.0） / アセトニトリル = 65 / 35（vol / vol）

流速：0.5 mL / min

注入量：50 μL

保持時間：*R*-ワルファリンエナンチオマー 41 分

*S*-ワルファリンエナンチオマー 58 分

ナプロキセン（内部標準） 26 分

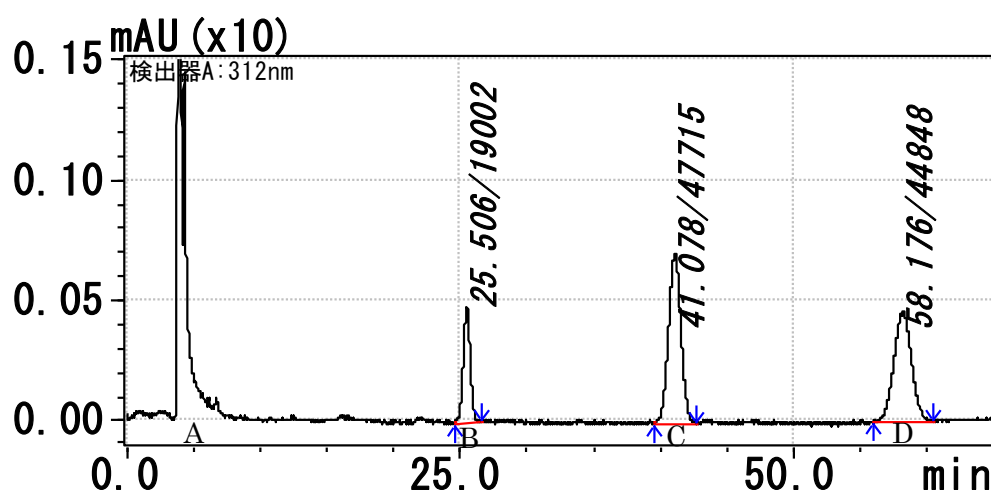


Fig. 1-3. HPLC chromatogram of warfarin enantiomers by ultraviolet analysis ( absorbance at 312 nm ).

Peaks : A = solvent peak ; B = naproxen ( 26 min ) ; C = *R*-warfarin ( 41 min ) ;  
D = *S*-warfarin ( 58 min )

## 2-4. 遊離脂肪酸の定量

ヒト血清アルブミンの 5% 溶液および各種市販アルブミン製剤中に含まれる遊離脂肪酸量は、NEFA C-テストワコーを用いて、分光光度計（220 型ダブルビーム分光光度計、株式会社 日立製作所）を用いて波長 550 nm における吸光度から定量を行った<sup>45)</sup>。既知濃度のオレイン酸溶液を調製し、分光光度計におけるオレイン酸の吸光度を濃度に対してプロットして検量線を作成することで試料中の遊離脂肪酸の定量を行った。

## 2-5. ヒト血清アルブミンへの結合パラメータの解析

ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合は高親和性サイトと低親和性サイトへの結合からなる<sup>46)</sup>。本研究では高親和性サイトを解析することとした。そこで、ワルファリンエナンチオマーのアルブミンへの結合性についてのパラメータは、下に示す Scatchard 式<sup>47)</sup>により算出した。

$$r/C_{unb} = n/K_d - r/K_d$$

ここで、 $r$  は結合型濃度を総アルブミン濃度で除した値である。 $C_{unb}$  は非結合型濃度、 $n$  はアルブミン 1 分子あたりの結合部位の数、 $K_d$  は解離定数である。

## 2-6. CYP2C9.1 によるワルファリン、ジクロフェナク代謝実験

Iwakawa ら<sup>48)</sup>の方法を一部改変して行った。7-ヒドロキシワルファリンと 4'-ヒドロキシジクロフェナクの生成が直線性を示す範囲内となる、インキュベーション時間および CYP 濃度にて行った。 $S$ -ワルファリンあるいはジクロフェナク（最終濃度 1~10  $\mu$ M）、エタノール（最終濃度 0.05~3 vol% ; 8.5~510 mM）あるいは溶媒対照、および NADPH 再生成系（最終濃度 NADPH : 0.5 mM、グルコース-6-リン酸 : 2 mM、塩化マグネシウム : 4 mM、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ : 1 U/mL）を含む 50 mM トリス-HCl (pH 7.4) を 37°C で 10 分間ブレインキュベ

ートした。その後、CYP2C9.1（最終濃度 6.5 nM）を添加することで 37℃の温度条件下、代謝反応を開始した。なお、最終反応容量は 0.25 mL とし、インキュベートは 2 検体ずつで行った。反応開始 30 分後、2.7  $\mu$ M ナプロキセン（内標準物質）を含む氷冷したアセトニトリル 0.25 mL を添加にて反応停止後、18,620 $\times g$ 、4℃で 5 分間遠心分離して上清を回収した。上清を濾過（PTFE 0.45  $\mu$ m）した後、その濾液を定量に供した。

## 2-7. *S*-ワルファリン代謝物およびジクロフェナク代謝物の定量

Iwakawa らの方法<sup>48)</sup>を一部改変して行った。既知濃度の 7-ヒドロキシワルファリンまたは 4'-ヒドロキシジクロフェナクを加え、インキュベートを行わずに前述の 2-6 の実験方法に従って操作し、蛍光検出器を備えた HPLC を用いて励起波長：320 nm、蛍光波長：415 nm における 7-ヒドロキシワルファリンまたは紫外分光光度計検出器を用いて波長 280 nm における 4'-ヒドロキシジクロフェナクと内部標準物質のピーク面積比を 7-ヒドロキシワルファリンまたは 4'-ヒドロキシジクロフェナクの濃度に対してプロットして検量線を作成することで、7-ヒドロキシワルファリンまたは 4'-ヒドロキシジクロフェナクの定量を行った。Fig. 1-4 に 7-ヒドロキシワルファリンと内部標準物質を、Fig. 1-5 に 4'-ヒドロキシジクロフェナクと内部標準物質の HPLC クロマトグラムを示す。

使用した HPLC 分析条件は次の通りである。

システムコントローラ：島津 SCL-10Avp

オートインジェクタ：島津 SIL-10ADvp

ポンプ：島津 LC-10ADvp

分光蛍光検出器：島津 RF-10A<sub>XL</sub> [励起波長：320 nm、蛍光波長：  
415 nm (*S*-7-ヒドロキシワルファリン)]

紫外分光光度計検出器：島津 SPD-10Avp [波長：280 nm<sup>49)</sup> (4'-ヒドロキシ  
ジクロフェナク)]

カラム：CHIRALCEL OD-RH

(4.6 mm I.D.  $\times$  150 mm ; 5  $\mu$ m、ダイセル化学工業)

カラム温度：40℃

溶出液：0.1 M リン酸二水素ナトリウム (pH 2.0) / アセトニトリル = 65 / 35 (vol / vol)

流速：0.5 mL / min

注入量：25  $\mu$ L (*S*-ワルファリン)  
50  $\mu$ L (ジクロフェナク)

保持時間：	<i>S</i> -7-ヒドロキシワルファリン	28 分
	<i>S</i> -ワルファリンエナンチオマー	60 分
	4'-ヒドロキシジクロフェナク	20 分
	ジクロフェナク	56 分
	ナプロキセン (内部標準)	26 分

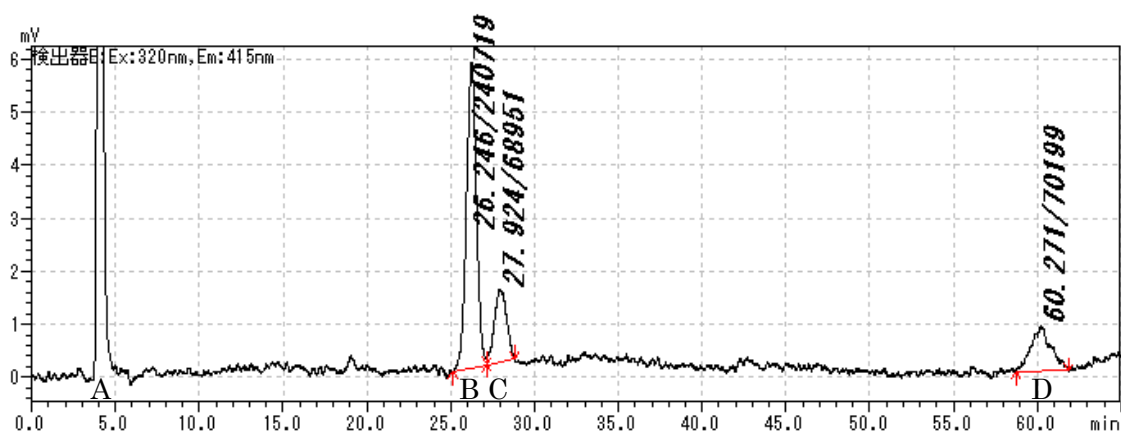


Fig. 1-4. HPLC chromatogram of *S*-warfarin metabolite by fluorescence analysis (excitation at 320 nm and emission at 415 nm).

Peaks : A = solvent peak ; B = naproxen ( 26 min ) ; C = *S*-7-hydroxywarfarin ( 28 min ) ; D = *S*-warfarin ( 60 min )

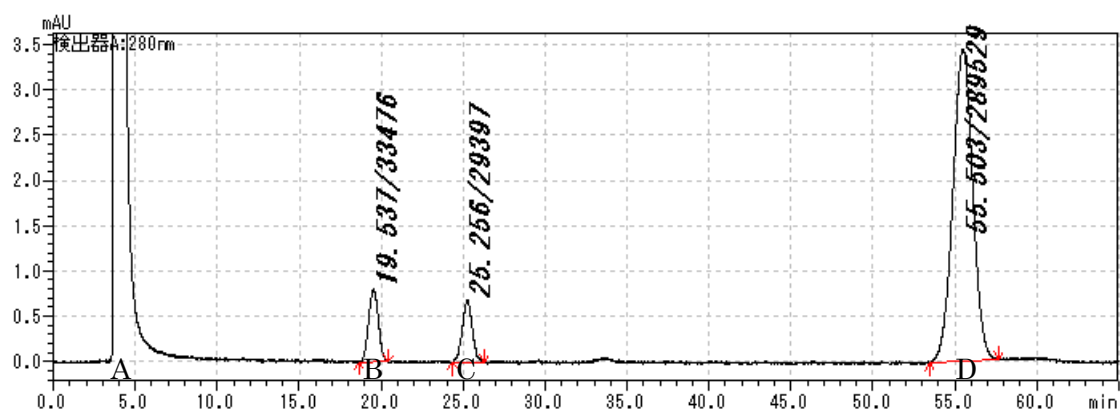


Fig. 1-5. HPLC chromatogram of diclofenac and its metabolite by ultraviolet analysis ( absorbance at 280 nm ).

Peaks : A = solvent peak ; B = 4'-hydroxydiclofenac ( 20 min ) ; C = naproxen ( 25 min ) ; D=diclofenac ( 56 min )

## 2-8. 代謝反応における反応速度論的パラメータの解析

CYP2C9.1 による *S*-ワルファリンおよびジクロフェナクの代謝反応についてのパラメータは、Michaelis-Menten 式を変形した下記の Lineweaver-Burk 式によりプロットすることで算出した。

$$1/V = (K_m/V_{\max}) \cdot 1/C + 1/V_{\max}$$

ここで、 $V$  は代謝速度、 $V_{\max}$  は最大代謝速度、 $K_m$  は Michaelis 定数で、 $V_{\max}$  の 1/2 の速度を与えるときの基質濃度、 $C$  は基質濃度である。

## 2-9. 統計解析

ヒト血清アルブミンの結合パラメータは実験結果 ( $N = 4$ ) から得られた値をプロットして算出した。市販アルブミン製剤中タンパク質の結合パラメータは実験結果 ( $N = 3$ ) から得られた値をプロットして算出した。各パラメータは平均値  $\pm$  S.D.



で示し、検定は対応のある  $t$ -test を用いた。また、ヒト血清アルブミンおよび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パラメータについての比較の検定は、対応のない  $t$ -test を用いた。

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及ぼす各種アルコールの影響についての検討は、実験結果 ( $N = 6$ ) を平均値 $\pm$ S.D.で示し、検定は Dunnett's pairwise multiple comparison  $t$ -test を用いた。

種々の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に及ぼすエタノールの影響については、実験結果 ( $N = 3$ ) を平均値 $\pm$ S.D.で示し、エタノールの有無での検定は対応のある  $t$ -test を、ヒト血清アルブミンと市販アルブミン製剤間、および市販アルブミン製剤間での比較には一元配置分散分析の後に Tukey's  $t$ -test を用いた。

CYP2C9.1 による  $S$ -ワルファリンおよびジクロフェナクの代謝反応についてのパラメータは、実験結果 ( $N = 3$ ) から得られた値をプロットして算出した。各パラメータは平均値 $\pm$ S.D.で示し、検定は Tukey's  $t$ -test を用いた。

この研究において有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 第3節 結 果

#### 3-1. 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及ぼすエタノールの影響

##### 3-1-1. ワルファリンエナンチオマー間での比較

*S*-および *R*-ワルファリンエナンチオマーを用いてヒト血清アルブミンへの結合性に及ぼすエタノールの影響を検討した。エタノール (2.9 vol%; 500 mM) の添加により、*S*-エナンチオマーのアルブミン 1 分子あたりの結合部位の数 (*n*) は、0.72 から 0.73 と変化は認められなかった (Table 1-1) が、解離定数 (*K<sub>d</sub>*) は 12.4 μM から 10.4 μM に減少した。一方、*R*-エナンチオマーのアルブミン 1 分子あたりの結合部位の数は 1.11 から 1.15 と変化は認められなかったが、解離定数は 19.7 μM から 26.2 μM に増加した。

Table 1-1. Apparent binding parameters for warfarin enantiomers binding to HSA

Binding parameter		Control	With ethanol
<i>S</i> -warfarin	<i>n</i>	0.72 ± 0.07	0.73 ± 0.04
	<i>K<sub>d</sub></i> (μM)	12.4 ± 1.0	10.4 ± 0.6 *
<i>R</i> -warfarin	<i>n</i>	1.11 ± 0.10	1.15 ± 0.09
	<i>K<sub>d</sub></i> (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<sub>d</sub>* : the dissociation constant. HSA : 615 μM. Ethanol : 2.9 vol% (500 mM).

\* ; *p* < 0.05 versus control (paired *t*-test)

今回エタノールにより、*S*-エナンチオマーのヒト血清アルブミンへの結合親和性に増大作用が認められたが、アルコールの種類によって球状タンパク質への変性の度合いが異なるという報告がある<sup>50)</sup>。ヒト血清アルブミンへの結合にアルコールの変性作用の影響が考えられることから、次に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及ぼす各種アルコールの影響について検討することとした。

### 3-1-2. 各種アルコールの影響

ワルファリン濃度を 50  $\mu\text{M}$  に固定し、上記のヒト血清アルブミンの結合性に影響を及ぼしたエタノール濃度と同様に各種アルコール濃度 500 mM で検討した結果、*S*-エナンチオマーにおいては、メタノールの添加により、非結合型 *S*-エナンチオマー濃度が上昇した (Fig. 1-6)。一方、エタノールおよび 1-プロパノールを添加した場合、非結合型 *S*-エナンチオマー濃度は低下した。2-プロパノールの添加により、非結合型 *S*-エナンチオマー濃度の大幅な低下が観察された。

*R*-エナンチオマーにおいては、メタノールの添加により、*S*-エナンチオマーの場合と同様に非結合型 *R*-エナンチオマー濃度が上昇した。また、エタノールおよび 1-プロパノールの添加の場合も同様に、非結合型 *R*-エナンチオマー濃度が上昇した。一方、2-プロパノールの添加により、*S*-エナンチオマーの場合と同じく非結合型 *R*-エナンチオマー濃度が低下した。

アルコールは、ヒト血清アルブミンへの薬物の結合性に立体選択的な影響を及ぼすこと、また、結合を阻害するアルコールもあれば、増強するアルコールもあった。

次に、医薬品として市販されているアルブミン製剤を用いてアルブミン結合性に及ぼすエタノールの影響について検討した。

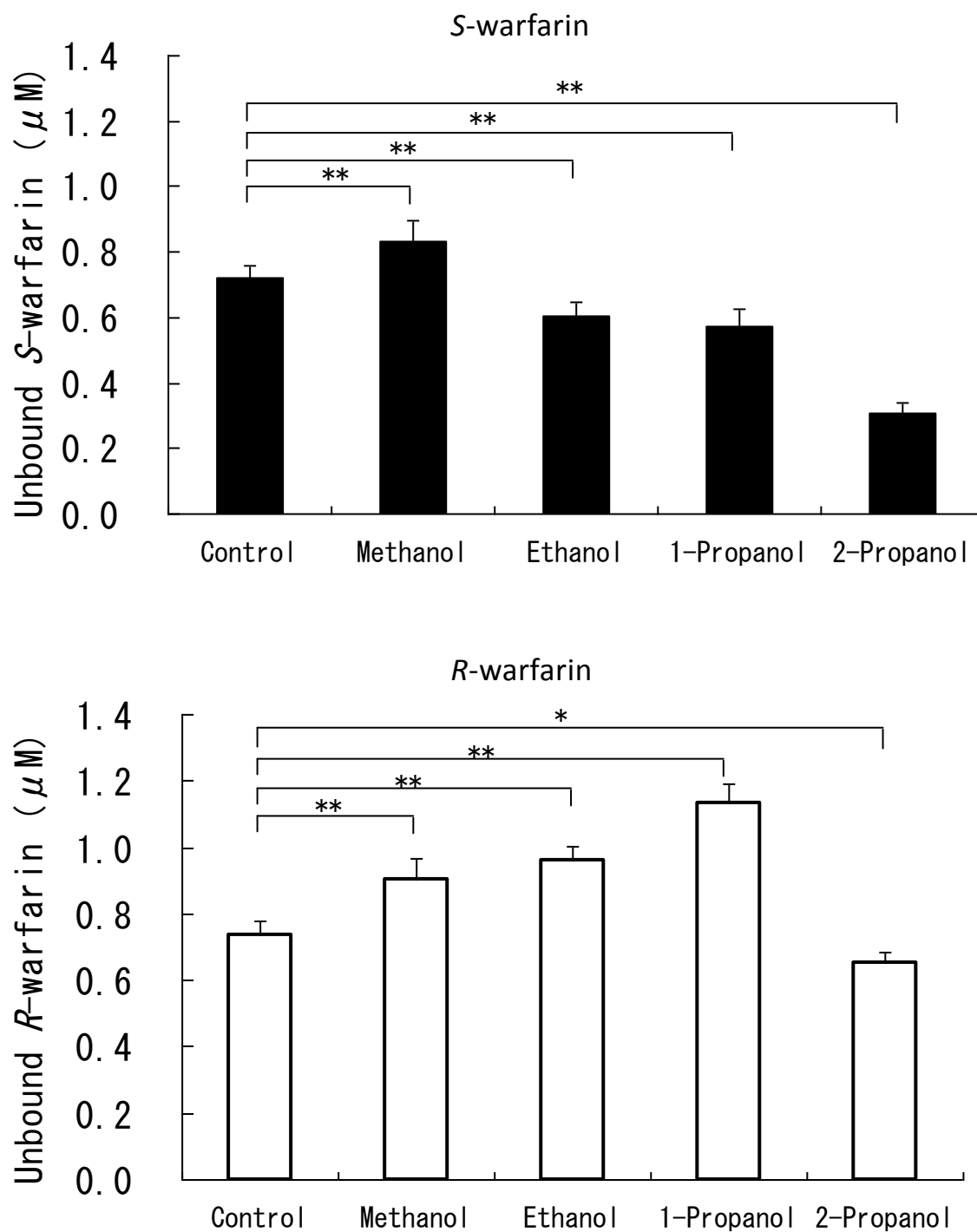


Fig. 1-6. Effect of alcohol on the binding of *S*- and *R*-warfarin to HSA. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.D. ( N = 6 ). HSA : 615  $\mu$ M. Warfarin racemate : 50  $\mu$ M. Alcohol : 500 mM. \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$  versus control ( Dunnett's pairwise multiple comparison *t*-test )

### 3-1-3. 市販アルブミン製剤を用いたワルファリンのタンパク結合性に及ぼすエタノールの影響

ワルファリン濃度を 50  $\mu\text{M}$ 、エタノール濃度を 2.9 vol%(500 mM)に固定し、各種市販アルブミン製剤で検討した結果、*S*-エナンチオマーにおいては、エタノールの添加により、ヒト血清アルブミンでは非結合型 *S*-エナンチオマー濃度の低下傾向を認めたが、市販アルブミン製剤では非結合型 *S*-エナンチオマー濃度の上昇が認められた (Fig. 1-7)。特にアルブミナー 5%、献血アルブミン (5%) -Wf、ブミネート 5%では有意な非結合型 *S*-エナンチオマー濃度の上昇が認められた。また、アルブミナー 5%およびブミネート 5%ではアルブミン (5%)・カッターに比べ非結合型 *S*-エナンチオマー濃度が大きく上昇していた。

*R*-エナンチオマーにおいては、ヒト血清アルブミンおよび各種市販アルブミン製剤共に、エタノールの添加により非結合型 *R*-エナンチオマー濃度の有意な上昇が認められた。*S*-エナンチオマーの場合と同様に、アルブミナー 5%およびブミネート 5%はアルブミン (5%)・カッターに比べ非結合型 *R*-エナンチオマー濃度の上昇がやや大きかった。

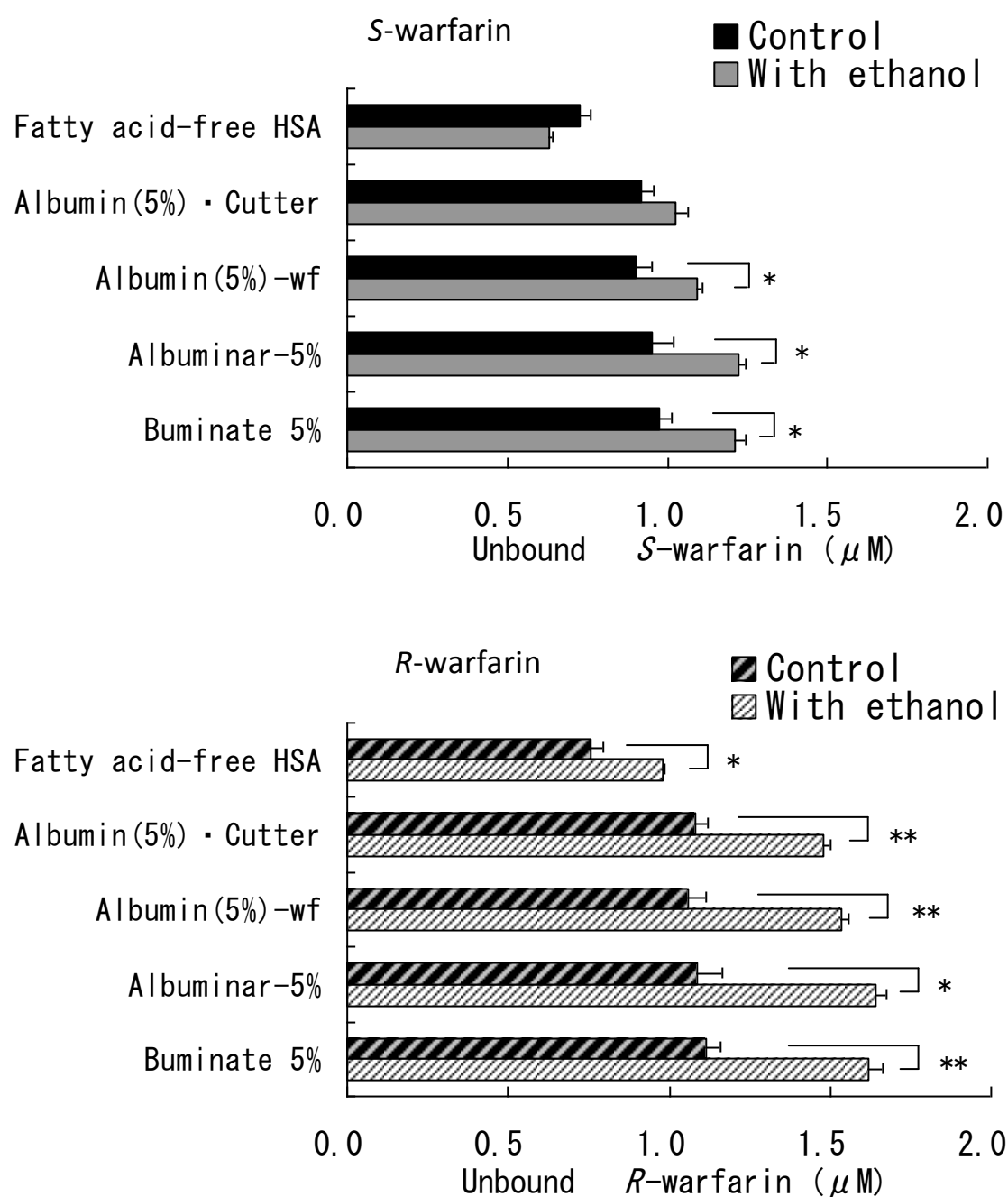


Fig. 1-7. Effect of ethanol on the binding of *S*- and *R*-warfarin to proteins from commercial albumin preparations.

Data are expressed as mean values  $\pm$  S.D. (  $N = 3$  ). HSA : 615  $\mu$ M. Warfarin racemate : 50  $\mu$ M . Ethanol : 2.9 vol%(500 mM).

\* ;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$  versus control ( paired  $t$ -test )

### 3-1-4. 市販アルブミン製剤中遊離脂肪酸濃度

ヒト血清アルブミンおよび市販アルブミン製剤中に含まれる遊離脂肪酸濃度を測定した結果、ヒト血清アルブミンでは遊離脂肪酸がほとんど検出されなかったが、アルブミナー 5%では 4.1 mM、献血アルブミン (5%) -Wf では 4.0 mM、アルブミン (5%)・カッターでは 3.6 mM、ブミネート 5%では 4.4 mM を示した (Table 1-2)。アルブミナー 5%およびブミネート 5%に含有される遊離脂肪酸濃度はアルブミン (5%)・カッターに含有される遊離脂肪酸濃度に比べ高値を示した。

Table 1-2. Non-esterified fatty acid concentration in commercial albumin preparations

Albumin preparation	NEFA concentration
	( mM )
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 value represents the mean ( N = 2 ).



### 3-1-5. 市販アルブミン製剤（アルブミナー®）中タンパク質への結合性

市販アルブミン製剤を用いたアルブミン結合性の検討には、第 3 節 3-1-3 の実験結果においてエタノール添加による非結合型エナンチオマー濃度の上昇率が高かったアルブミナーを選択した。また、結合パラメータの算出のため、*S*-および *R*-ワルファリンエナンチオマーを用いてアルブミナー中タンパク質への結合性に及ぼすエタノールの影響を検討した。

エタノールの添加では、*S*-エナンチオマーのアルブミン 1 分子あたりの結合部位の数 (*n*) は、0.84 から 0.92 となり、差は認められなかった (Table 1-3)。*S*-エナンチオマーの解離定数 (*K*<sub>d</sub>) は 19.2 μM から 24.0 μM に増加した。一方、*R*-エナンチオマーのアルブミン 1 分子あたりの結合部位の数は 0.94 から 0.96 と変化は認められなかったが、*S*-エナンチオマーと同様に *R*-エナンチオマーの解離定数は 26.9 μM から 36.8 μM に増加した。

Table 1-3. Apparent binding parameters for warfarin enantiomers binding to proteins from Albuminar

	Binding parameter	Control	With ethanol
<i>S</i> -warfarin	n	0.84 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.05
	K <sub>d</sub> ( $\mu$ 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 <sub>d</sub> ( $\mu$ M )	26.9 $\pm$ 2.8	36.8 $\pm$ 2.4 *

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. ( N = 3 ). n : the number of binding sites in the HSA molecule. K<sub>d</sub> : the dissociation constant. Albuminar : 615  $\mu$ M. Ethanol : 2.9 vol% (500 mM).

\* ;  $p < 0.05$  versus control ( paired  $t$ -test )

### 3-2. 遺伝子組換えヒト CYP2C9.1 による薬物代謝に及ぼすエタノールの影響

#### 3-2-1. *S*-ワルファリン、ジクロフェナクの代謝に及ぼすエタノールの影響

CYP2C9.1 による薬物代謝に及ぼすエタノールの影響を検討した。CYP2C9.1 による 1  $\mu$ M の *S*-ワルファリンの 7-水酸化体への代謝は 0.1 vol% (17 mM) 濃度のエタノールから強く阻害された (Fig. 1-8)。そして、エタノールは濃度依存的に 1 および 10  $\mu$ M の *S*-ワルファリンの 7-水酸化代謝を阻害した。一方、1  $\mu$ M のジクロフェナクの 4'-水酸化代謝は、より高濃度の 3 vol% (510 mM) エタノールで阻害され、さらに、10  $\mu$ M のジクロフェナクの 4'-水酸化代謝は 3 vol% (510 mM) エタノールにより阻害されなかった。ジクロフェナクに比べ *S*-ワルファリンは低濃度のエタノールで阻害されることを認めた。

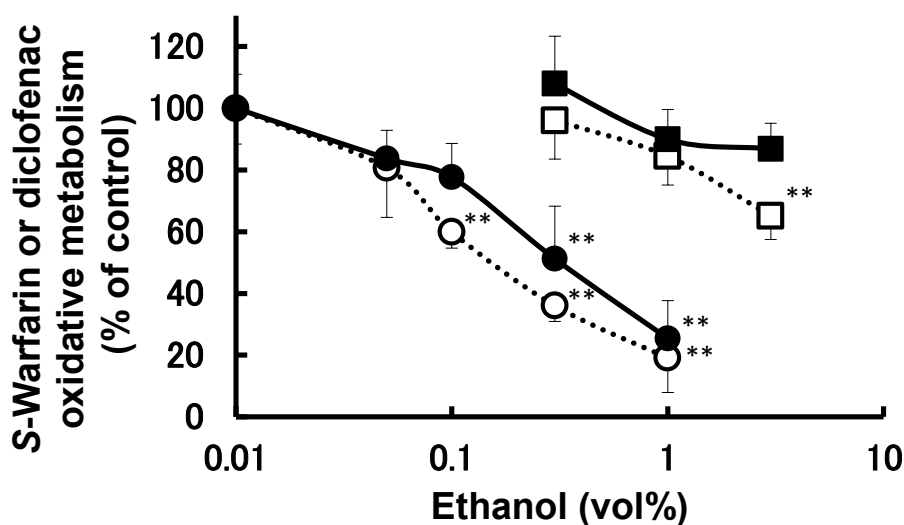


Fig. 1-8. Effect of ethanol on *S*-warfarin 7-hydroxylation and diclofenac 4'-hydroxylation by recombinant human CYP2C9.1.

○, warfarin 1  $\mu$ M; ●, warfarin 10  $\mu$ M; □, diclofenac 1  $\mu$ M; ■, diclofenac 10  $\mu$ M. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.D. ( N = 3 ). \*\* ;  $p < 0.01$  versus control ( Dunnett's pairwise multiple comparison  $t$ -test ).

### 3-2-2. *S*-ワルファリンの 7-水酸化代謝に及ぼすエタノールの影響

エタノールが CYP2C9.1 による薬物代謝に影響したことから、さらに詳細な検討を行った。エタノールは、CYP2C9.1 による *S*-ワルファリン 7-水酸化代謝の  $K_m$  に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 1-9)。一方で、 $V_{max}$  および  $V_{max}/K_m$  (見かけの固有クリアランス) はエタノール濃度の増加と共に減少した。0.3 vol% (51 mM) 濃度のエタノール添加時の  $V_{max}$  および  $V_{max}/K_m$  は、コントロールに比べ、それぞれ 49% および 73% 減少し、1 vol% (170 mM) 濃度のエタノールでは、それぞれ 75% および 85% の減少を示した。

Dixon plot<sup>51)</sup> より、エタノールは *S*-ワルファリンエナンチオマーの 7-水酸化代謝に対し、非競合的な阻害を示すことが示唆された (Fig. 1-10)。見かけの  $K_i$  は約 0.2 vol% (34 mM) であった。

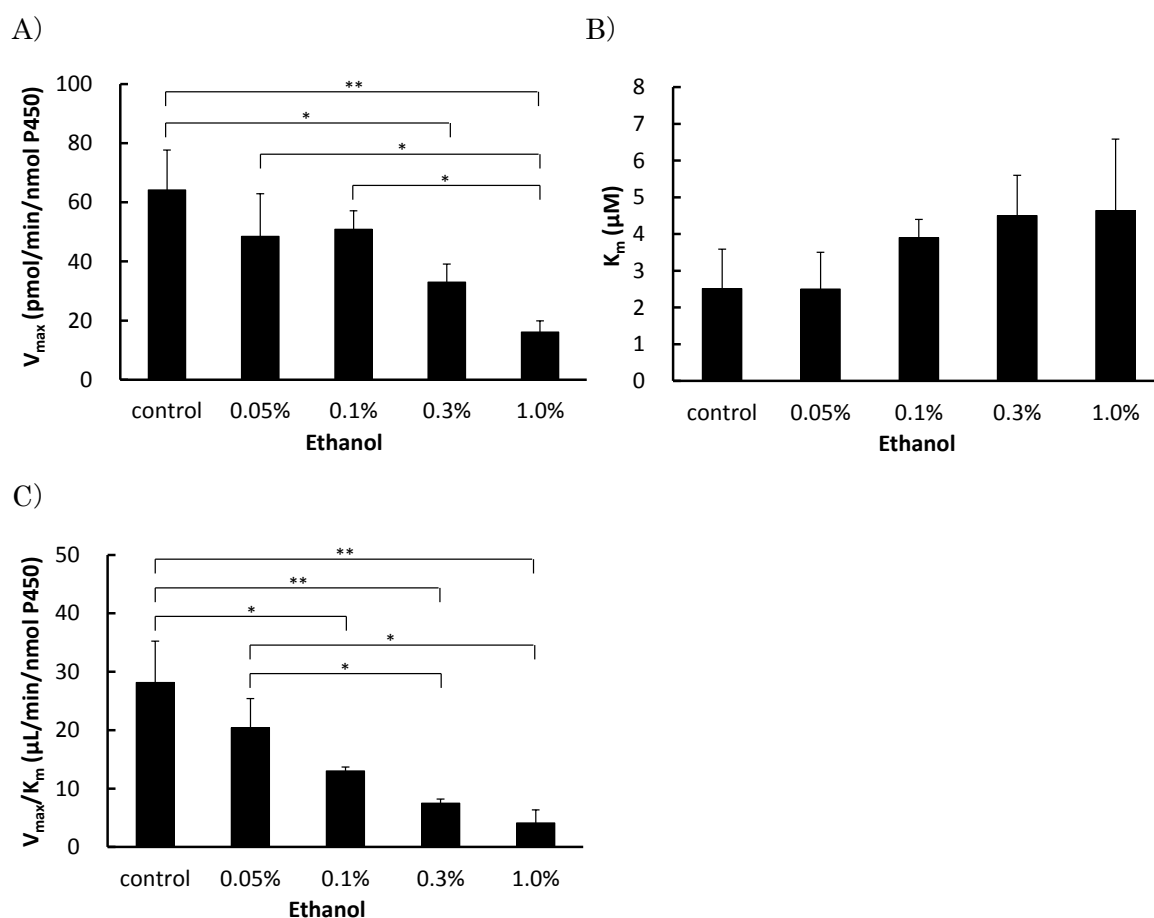


Fig. 1-9. Effect of ethanol on *S*-warfarin 7-hydroxylation by recombinant human CYP2C9.1.

A, B and C are kinetic parameters on the metabolism of *S*-warfarin 7-hydroxylation by CYP2C9.1 ( A,  $V_{\max}$  ; B,  $K_m$  ; C,  $V_{\max}/K_m$  ). Data are expressed as mean values  $\pm$  S.D. ( N = 3 ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Tukey's *t*-test).

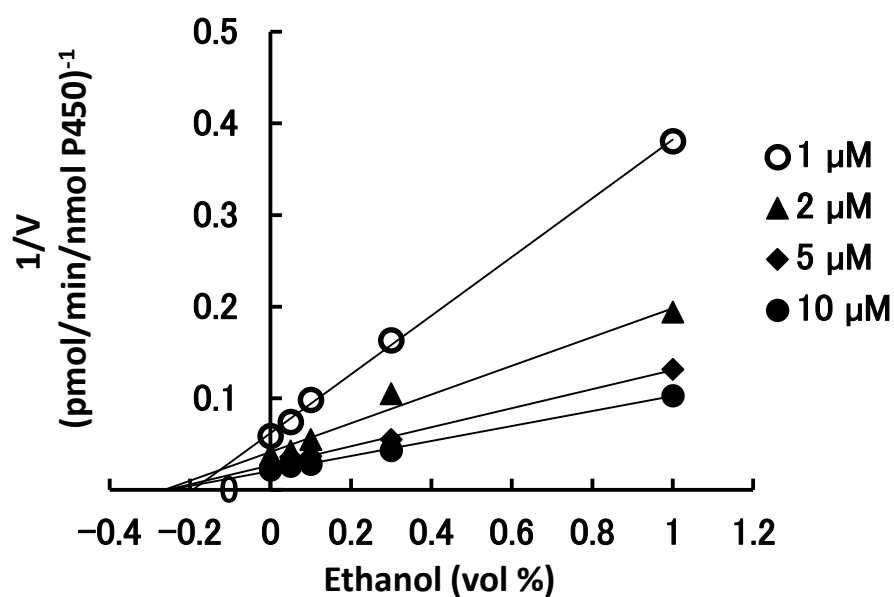


Fig. 1-10. Dixon plot for the inhibition of *S*-warfarin 7-hydroxylation by ethanol in recombinant human CYP2C9.1.

○, *S*-warfarin 1 μM ; ▲, *S*-warfarin 2 μM ; ◆, *S*-warfarin 5 μM ; ●, *S*-warfarin 10 μM. Data are expressed as mean values ( N = 3 ).

### 3-2-3. ジクロフェナクの 4'-水酸化代謝に及ぼすエタノールの影響

*S*-ワルファリンの代わりにジクロフェナクを用いて検討した結果、エタノールは、CYP2C9.1によるジクロフェナク 4'-水酸化代謝の  $V_{\max}$  に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 1-11)。一方で、エタノール濃度の増加と共に  $K_m$  は上昇し、 $V_{\max}/K_m$  は減少した。3 vol% (510 mM) エタノール添加時の  $K_m$  は、コントロールに比べ 1.7 倍上昇し、 $V_{\max}/K_m$  は 40%減少した。

Dixon plot より、エタノールはジクロフェナクの 4'-水酸化代謝に対し、競合的阻害を示すことが示唆された (Fig. 1-12)。見かけの  $K_i$  は約 4 vol% (680 mM)であった。

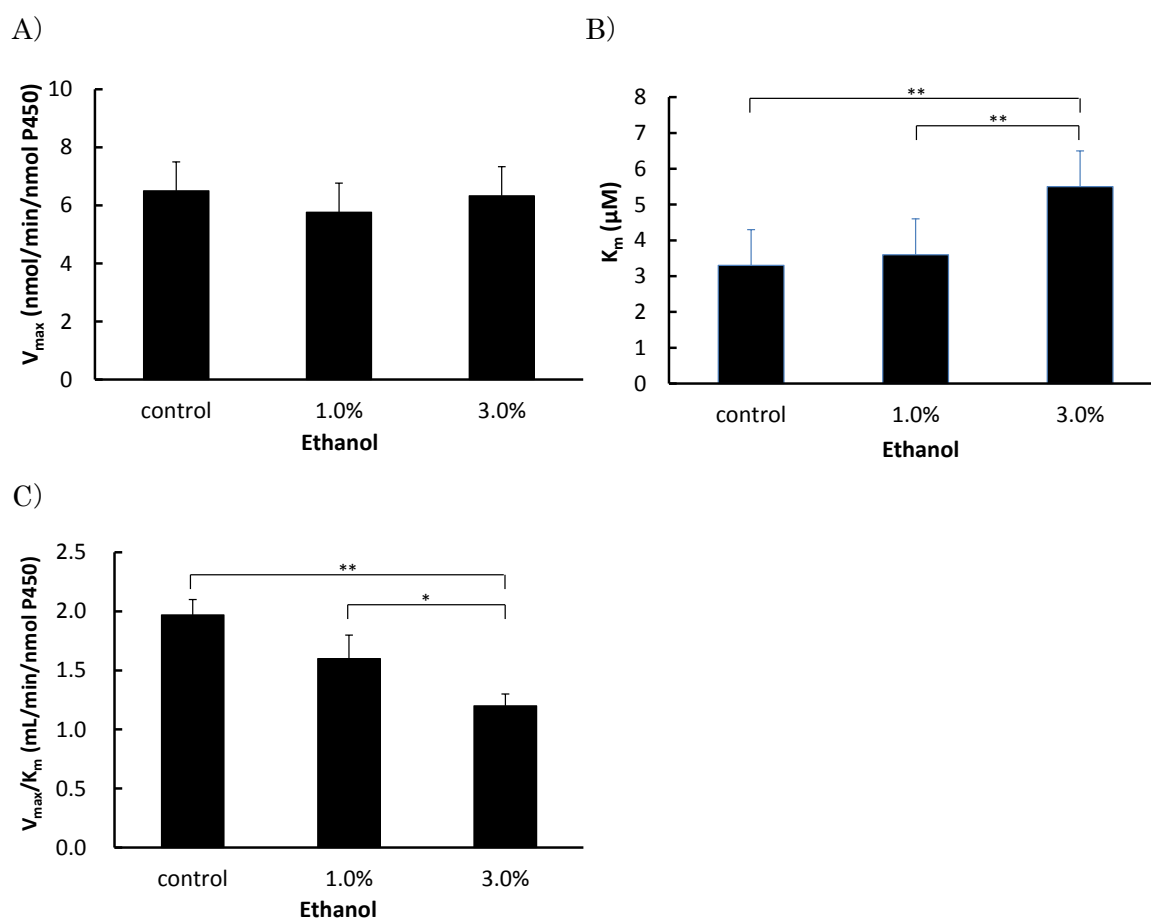


Fig. 1-11. Effect of ethanol on diclofenac 4'-hydroxylation by recombinant human CYP2C9.1.

A, B and C are kinetic parameters on the metabolism of diclofenac 4'-hydroxylation by CYP2C9.1 ( A,  $V_{max}$  ; B,  $K_m$  ; C,  $V_{max}/K_m$  ). Data are expressed as mean values  $\pm$  S.D. ( N = 3 ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Tukey's  $t$ -test).

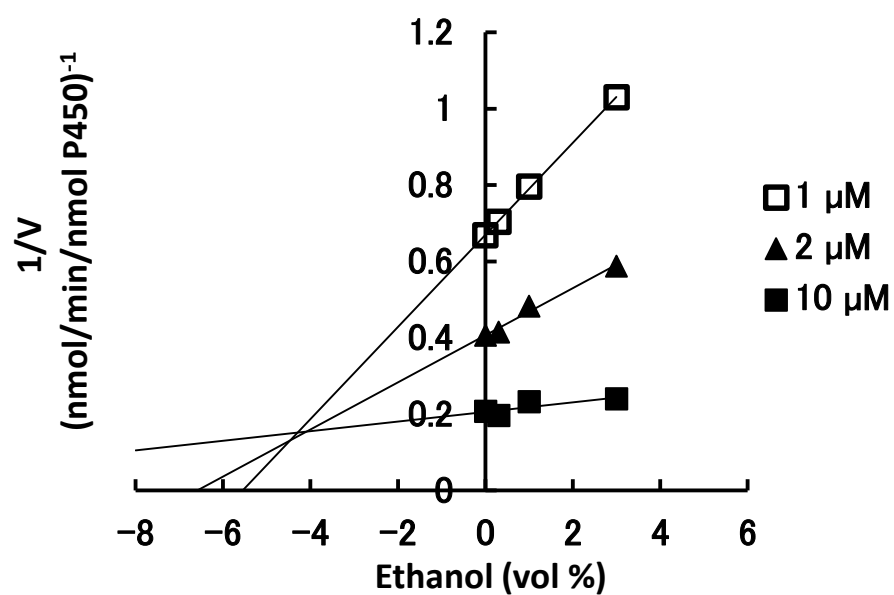


Fig. 1-12. Dixon plot for the inhibition of diclofenac 4'-hydroxylation by ethanol in recombinant human CYP2C9.1.

□, diclofenac 1  $\mu$ M ; ▲, diclofenac 2  $\mu$ M ; ■, diclofenac 10  $\mu$ M. Data are expressed as mean values ( N = 3 ).



## 第4節 考 察

### 4-1. 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

今回、*S*-および *R*-ワルファリンエナンチオマーを用いたヒト血清アルブミンへの結合性に及ぼすエタノールの立体選択的な影響を検討した。ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合は1つの高親和性サイトと低親和性サイトの2か所<sup>46)</sup>からなるが、本研究では主たる結合サイトの高親和性サイトにおいて解析した。その結果、ヒト血清アルブミンではエタノールの添加により *S*-エナンチオマーでは解離定数が低下し、一方、*R*-エナンチオマーの解離定数は上昇することが観察され、エナンチオマー間でのヒト血清アルブミンへの結合性に立体選択的な違いのあることが明らかとなった。薬物併用によるヒト血清アルブミンへの結合性が増加することを認めた報告は少ない。アルブミンに対する長鎖脂肪酸のモル比が3程度であるとき、ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合性が増加する報告<sup>52-56)</sup>や、同様に長鎖脂肪酸の存在で *R*-エトドラクの結合性が上昇するといった報告<sup>24)</sup>や、*S*-酢酸ロラゼパムが *S*-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を増加させるといった報告<sup>25)</sup>がある。これらの検討は、アルブミン分子の構造研究から長鎖脂肪酸がヒト血清アルブミン内のワルファリン結合サイト近傍の脂肪酸結合サイト (FA2) に結合することにより、結合ポケット内の結合環境を疎水性にすることによってワルファリンの結合性を増大すると推察したものである。また、アロステリックな相互作用による微環境の変化であることも示唆している<sup>25)</sup>。したがって、サイトIのポケットは比較的大きく同時に2種類の違った化合物と結合可能であること<sup>57)</sup>から、今回の *S*-エナンチオマーの結合親和性の増加は、エタノールがサイトIのポケットへの何らかの立体構造変化を生じさせたことにより、*S*-エナンチオマーが結合し易くなった結果であると考えられる。また、ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合パラメータのこれまでの報告では、Table 1-4 に示すように、アルブミン1分子あたりの結合部位数は、*S*-エナンチオマーで0.87~1.7、*R*-エナンチオマーで0.91~1.9、解離定数は *S*-エナンチオマーで0.7~4.1  $\mu\text{M}$ 、*R*-エナンチオマーでは0.7 ~ 4.9  $\mu\text{M}$ であった<sup>12, 42, 58-60)</sup>。このバラツキはアル

ブミンの種類や濃度そして実験条件による違いであると考えられる。Olsen ら<sup>12)</sup>の Defatted HSA ( Fatty acid-free albumin ) のアルブミン 1 分子あたりの結合部位数および解離定数の解析結果は、今回のヒト血清アルブミンの値とほぼ一致していた。

Table 1-4. Comparison of apparent binding parameters for warfarin enantiomers binding to HSA

Albumin	Method	Warfarin	n	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M )	References
Repeated crystallization from Cohn's Fraction V	ED	<i>S</i> -warfarin	1.7	4.1	O'Reilly <sup>58)</sup>
	pH7.4 27°C	<i>R</i> -warfarin	1.9	4.9	
Rechromatographed	ED	<i>S</i> -warfarin	0.9	1.1	Dianae <i>et al.</i> <sup>59)</sup>
	pH7.4 4°C	<i>R</i> -warfarin	1.2	2.1	
Crystallized and lyophilized	FL	<i>S</i> -warfarin	1	1.7	Otagiri <i>et al.</i> <sup>42)</sup>
	pH7.4 22°C	<i>R</i> -warfarin	1	1.9	
Rechromatographed and without further purification	ED	<i>S</i> -warfarin	1	0.7	Veronich <i>et al.</i> <sup>60)</sup>
	pH7.4 4°C	<i>R</i> -warfarin	1	0.7	
Defatted	UF pH7.4 37°C	Racemic warfarin	0.9	6.3	Olsen <i>et al.</i> <sup>12)</sup>

Abbreviations : ED, equilibrium dialysis ; FL, fluorescence ; UF, ultrafiltration

エタノールにより、ワルファリンエナンチオマーのアルブミンへの結合性に立体選択的な相違が認められたことから、次にメタノール、1-プロパノール、2-プロパノールを用いて検討したところ、エタノール、1-プロパノールでは、非結合型 *R*-エナンチオマー濃度は上昇したが、非結合型 *S*-エナンチオマー濃度は減少した。一

方、2-プロパノールでは、非結合型 *R*-エナンチオマー濃度は低下し、非結合型 *S*-エナンチオマー濃度も大幅に低下した。メタノールからブタノールまでのアルコールによる球状タンパク質への変性作用を検討し、炭素数が増えるに従って、また直鎖状になるに従って、変性作用の大きいことが報告されている<sup>50)</sup>。今回の結果では、直鎖状のアルコールで炭素数が増えるに従って、*R*-エナンチオマーの非結合型濃度は上昇し、*S*-エナンチオマーの非結合型濃度は低下した一方で、分岐状のアルコールでは *R*-および *S*-エナンチオマー共に非結合型濃度の低下を認めていることから、アルコールはヒト血清アルブミンの立体構造を変化させる作用を有するが、サイト I の結合環境への影響はアルコールの種類によって異なることが明らかになった。今後、中鎖アルコールを用いた検討が必要と考えられる。

エタノールは、ヒト血清アルブミンの  $\alpha$ -ヘリックス構造に影響を及ぼすことが報告<sup>61)</sup>されている。また、エタノールはヒト血清アルブミンやウシ血清アルブミンの立体構造を変化させることが報告されており<sup>62-64)</sup>、ビール飲酒においてもヒト血清アルブミンの立体構造を変化させることが示唆されている<sup>65, 66)</sup>。また、特異的疎水性結合部位へのエタノールの直接結合による置換作用<sup>67)</sup>や、0.5 vol%以上のエタノールにより、ラセミ体のワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合に置換作用およびヒト血清アルブミンの構造変化による作用も示唆されている<sup>68)</sup>。エタノールは、*S*-エナンチオマー結合性を増大させるとともに、*R*-エナンチオマーの結合性を阻害したことから、今回のエタノールによる非結合型ワルファリン濃度の立体選択的な変動は、置換作用よりも、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の立体構造に対して変化を生じさせたことによると推察された。

ワルファリンエナンチオマーの 4 種類の市販アルブミン製剤への結合性に及ぼすエタノールの影響を検討した結果、すべての市販アルブミン製剤におけるエナンチオマーの非結合型濃度は、ヒト血清アルブミンにおけるエナンチオマーの非結合型濃度に比べ高値を示した。エタノールの添加により、ヒト血清アルブミンでは *S*-エナンチオマーの非結合型濃度の減少傾向を認めたが、*R*-エナンチオマーの非結合型濃度の上昇を認めた。一方、市販アルブミン製剤においてはエタノール添加により *S*-および *R*-エナンチオマーとともに非結合型濃度の上昇を認めた。また、アルブミン 5% および プミネート 5% は、献血アルブミン (5%) -Wf および アルブミン (5%)・カッターに比べ *S*-および *R*-エナンチオマーの非結合型濃度が大き

く上昇し、同じアルブミン製剤間でもワルファリンエナンチオマー結合性に相違が認められた。遊離脂肪酸はヒト血清アルブミンへの結合により、ヒト血清アルブミンの可逆的な構造変化を引き起こしサイト I およびサイト II 結合物質にアロステリックな置換作用を示すこと<sup>57)</sup> や、サイト I 結合薬物の市販アルブミン製剤への結合に、市販アルブミン製剤中に含有される遊離脂肪酸が影響すること<sup>69)</sup> が報告されている。そこで、各種の市販アルブミン製剤中に含まれる遊離脂肪酸濃度の定量を行った。市販アルブミン製剤に含有される遊離脂肪酸濃度が約 4 mM と健常人における血中濃度 0.1~1.0 mM に比べ高値を示した。これは、安定化剤として添加される中鎖脂肪酸であるカプリル酸ナトリウムも測定値に含まれていることが考えられた。これまでに、ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合性が高濃度の長鎖脂肪酸添加により低下すること<sup>52-56)</sup> や、ワルファリンのサイト I への結合性に中鎖脂肪酸の影響すること<sup>70)</sup> が報告されていることから、今回のヒト血清アルブミンに比べ市販アルブミン製剤の非結合同型エナンチオマー濃度の上昇は、市販アルブミン製剤中に含有される遊離脂肪酸の影響であることが考えられた。また、アルブミン 5% およびブミネート 5% に含有される遊離脂肪酸濃度は、アルブミン (5%)・カッターに含有される遊離脂肪酸濃度に比べ高値を示した。アルブミン 5% およびブミネート 5% は、アルブミン (5%)・カッターに比べ、エタノール添加による非結合同型 *S*-および *R*-エナンチオマー濃度の大きな上昇を認めたことから、遊離脂肪酸を含有する市販アルブミン製剤中のタンパク質へのワルファリンエナンチオマーの結合にエタノールが影響することにより、非結合同型エナンチオマー濃度の増加が認められたものと考えられた。

そこで、エタノール添加によるタンパク結合への影響の検討時、非結合同型エナンチオマー濃度の上昇率が高かったアルブミン 5% を選択し、ワルファリンエナンチオマーのアルブミン 5% 中タンパク質への結合性に及ぼすエタノールの影響について検討した。エタノールの添加により、アルブミン 1 分子あたりの結合部位数に変化は認められなかったが、*S*-および *R*-エナンチオマーの解離定数は増加した。エタノールを添加した場合のヒト血清アルブミンとアルブミン 5% の結合パラメータを比較したところ、*S*-エナンチオマーではアルブミン 1 分子あたりの結合部位数がアルブミン 5% では増加した。一方、*R*-エナンチオマーではアルブミン 1 分子あたりの結合部位数がアルブミン 5% では減少していた。そして、*S*-および *R*-両エナンチオマー

共に解離定数がヒト血清アルブミンに比べアルブミナーの方で高値を示した。遊離脂肪酸の添加により、ワルファリンのヒト血清アルブミンへの1分子あたりの結合部位数が変化し、非競合的な遊離脂肪酸の結合による影響が示唆されている<sup>71)</sup>。本研究でのヒト血清アルブミンとアルブミナーの比較から、アルブミン1分子あたりの結合部位数の変化があることから、同様に非競合的な脂肪酸の結合による影響が考えられた。ウシ血清アルブミンにおいて3~5の脂肪酸結合サイトにエタノールが直接結合し、置換作用を起こすことが示唆されている<sup>67)</sup>。しかし、アルブミナー中タンパク質へのワルファリンエナンチオマーの結合にエタノールは競合的阻害を示したため、今回の非結合型エナンチオマー濃度の上昇の結果は、エタノールが脂肪酸結合サイトに結合したことによるアロステリックな影響の可能性は低いと考えられた。

エタノールの添加により *S*-エナンチオマーのヒト血清アルブミンへの結合性の増大が認められた。一方、アルブミナーでは結合性の低下が認められるといった相反する結果となった。*R*-エナンチオマーでは両方で結合性の低下が認められていることから、これはエタノールによる構造変化よりも、ワルファリンエナンチオマーのアルブミナー中のタンパク質への結合性に、アルブミナー中に含有される遊離脂肪酸のアルブミンへの結合による影響が強く現れた結果であると考えられた。ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合性が高濃度の長鎖脂肪酸により低下すること<sup>52-56)</sup>や、ワルファリンのサイトIへの結合性が中鎖脂肪酸により影響されること<sup>70)</sup>が報告されている。サイトIの結合ポケットは比較的大きいため、ビリルビンも結合することができ、そして同時に2種類の違った化合物とも結合可能であることが報告されている<sup>57)</sup>。したがって、エタノールによりサイトIの立体構造変化が生じたことにより、アルブミナー中の遊離脂肪酸がサイトIに対してさらに結合しやすくなった結果、あるいは複数の遊離脂肪酸が結合することになった結果、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による阻害作用が強く現れたと推測された。

また、12.5  $\mu\text{M}$  以上のワルファリンエナンチオマー濃度を用いて解析を行ったが、通常服用されている1日1~3 mgを服用した場合の血中濃度から臨床的な濃度として1  $\mu\text{M}$  を選び、その非結合率を算出した (Table 1-5)。エタノール添加により、遊離脂肪酸を含有しないアルブミンにおける *S*-エナンチオマーの非結合率は2.7%か

ら 2.3%に低下し、遊離脂肪酸を含有しないアルブミンにおける *R*-エナンチオマーの非結合率は 2.8%から 3.6%に上昇した。また、アルブミンにおける *S*-および *R*-エナンチオマーの非結合率はエタノール添加によりそれぞれ 3.6%から 4.1%に、4.5%から 5.9%に上昇した。ワルファリンエナンチオマーが低濃度の場合においても今回の実験結果と同様の結合性への影響が確認され、実臨床においてもエタノールによりワルファリンエナンチオマーの結合性が影響される可能性が推察された。

Table 1-5. Simulated unbound percent of warfarin enantiomers

	% unbound	
	Fatty acid-free albumin	Albuminar
<i>S</i> -warfarin	2.7	3.6
<i>S</i> -warfarin with ethanol	2.3	4.1
<i>R</i> -warfarin	2.8	4.5
<i>R</i> -warfarin with ethanol	3.6	5.9

Each value is calculated from the data of Table 1-1 and 1-3. Fatty acid-free albumin and Albuminar : 615  $\mu$ M. Warfarin enantiomer : 1  $\mu$ M. Ethanol : 2.9 vol% (500 mM).

一般的に、エタノールの 0.01 vol%程度の血中濃度で軽い酩酊状態がみられ始め、0.3~0.4 vol%で昏迷、昏睡状態になり、0.5 vol%程度でしばしば死亡することもあるとされる。今回の検討は昏迷、昏睡状態の濃度の 10 倍近い濃度である。タキソール注 200mg を投与する場合、点滴液中のエタノール濃度は約 3.3 vol%となり投与局所を想定したものである。しかし、ビール飲酒によるヒト血清アルブミンの変性を示唆した報告<sup>65, 66)</sup>もあることから、日常起こりえる血中濃度においても、局所部位ではエタノール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立体選択的な影響を及ぼすことも考えられる。

製剤添加物として使用されているエタノールが、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立体選択的な影響を及ぼすことが明らかとなった。そのため、ワルファリンの投与時には併用薬剤だけでなく製剤添加物も含めて影響を考慮し相互作用に注意する必要があることが示唆された。また、エタノール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立体選択性が認められたことから、ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合を検討する場合において、薬理活性の相違も考慮して、*S*-と *R*-エナンチオマーを別々に分離して考える必要性が示唆された。

また、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に及ぼすエタノールの影響について検討した結果、エタノールによる影響と共に、市販アルブミン製剤中の遊離脂肪酸による非結合型ワルファリンエナンチオマー濃度の増加が認められ、ヒト血清アルブミンとの結合性に相違が認められた。そのため、市販アルブミン製剤の投与により、体内の血清アルブミンに占める市販アルブミン製剤中タンパク質の割合が増加し結合性が変化する結果、ワルファリンを含めた種々の薬剤における体内動態に変化を生じさせることが考えられる。臨床において、市販アルブミン製剤は出血性ショック時や周術期、重度熱傷時等にしばしば大量投与されることがある。例えば、5%市販アルブミン製剤 1 ボトル 250 mL を投与した場合、血漿中の約 10%のアルブミンが市販アルブミン製剤のアルブミンで占められることになる。1 回に 3 ボトル 750 mL を投与する場合でも、血漿中の約 30%のアルブミンが市販アルブミン製剤で占められることになり、遊離脂肪酸が高濃度存在した状態となる結果、アルブミンの薬物結合性が異なる状態になり得る。特に今回の結果より、遊離脂肪酸を高濃度に含有した製剤を選択した場合では、薬物のタンパク結合率が変動することが考えられる。したがって、このような市販アルブミン製剤との体内での相互作用は重要な問題であり、今後検討する必要性が示唆された。

#### 4-2. 遺伝子組換え CYP2C9.1 による薬物代謝に及ぼすエタノールの影響

今回、ヒト CYP2C9.1 による *S*-ワルファリン 7-水酸化代謝およびジクロフェナク 4'-水酸化代謝がエタノールによって阻害された。しかしながら、CYP2C9.1

による *S*-ワルファリンの 7-水酸化代謝に及ぼすエタノールの阻害効果は、ジクロフェナクの 4'-水酸化代謝に対するものとは濃度や阻害様式において大きく異なっていた。CYP2C9.1 による *S*-ワルファリンの 7-水酸化代謝は、0.1 vol% (17 mM) の低いエタノール濃度から阻害された。また、*S*-ワルファリンの 7-水酸化代謝の  $V_{\max}$  はエタノール濃度の増加と共に減少したが  $K_m$  は影響されず、Dixon plot から非競合阻害を示すことがわかった。一方で、CYP2C9.1 によるジクロフェナクの 4'-水酸化代謝へのエタノールによる阻害は、30 倍も高濃度である 3 vol% (510 mM) で観察された。また、ジクロフェナクの 4'-水酸化代謝の  $K_m$  は、コントロールと比べ 3 vol% (510 mM) エタノールで増大が認められたが、 $V_{\max}$  は 3 vol% (510 mM) までは有意な変化が観察されなかった。さらに、Dixon plot からエタノールはジクロフェナクの代謝に対して競合的阻害を示すことがわかった。Busby ら<sup>39)</sup> は、CYP2C9 によるジクロフェナクの 4'-水酸化活性は、0.3~3 vol%のエタノールでは阻害されないことを報告している。この報告と今回の結果の相違は、彼らの研究は高濃度 (15  $\mu$ M) のジクロフェナクで行われたものであり、本研究では薬物治療中の血清中濃度に相当する 1~10  $\mu$ M の比較的低濃度のジクロフェナクで行われていることなどから、実験条件における違いによるものと考えられる。結晶構造解析から、CYP2C9 の基質代謝部位における結合ポケットは比較的広く、ワルファリンと更に基質をもう 1 分子結合することができること、また、その結合ポケットは可動性で、その形状を変化させて *S*-ワルファリンを代謝部位へ到達させる一方で、代謝部位付近は固定されており代謝時の基質配座はほぼ一定であることが報告されている<sup>72,73)</sup>。エタノールは球状のタンパク質の立体構造を変化させることが報告されている<sup>50)</sup> ことから、低濃度のエタノールが CYP2C9.1 の結合ポケットや代謝部位付近の立体構造変化を生じさせたことにより、CYP2C9.1 による *S*-ワルファリンの 7-水酸化代謝に影響を及ぼしたと考えられる。一方、CYP2C9.1 によるジクロフェナクの 4'-水酸化代謝に低濃度のエタノールは影響を与えず、代謝される基質により異なったエタノールの影響が観察された。これは、立体的な構造を有する *S*-ワルファリンと平面構造を有するジクロフェナクの構造の違いによることが考えられる。*S*-ワルファリンに比べ、ジクロフェナクでは  $V_{\max}$  が 100 倍程度大きいことから比較的低濃度の代謝部位へのアプローチがし易いため、結合サイトへのエタノールの影響を受けにくかったと考えられる。また、Busby ら<sup>39)</sup> は溶剤の阻害効果は個々の



CYP に対して代謝される基質により影響が異なることを報告している。CYP2C9 による様々な薬物の代謝において、アセトニトリルが基質によって異なる阻害効果を示すことが報告されている<sup>74)</sup>。

エタノールは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に立体選択的に影響することが明らかになった。しかしながら、本研究は 2.9 vol% (500 mM) のエタノールで実施した。エタノールは CYP2C9.1 による *S*-ワルファリンの 7-水酸化代謝に対し、ヒト血清アルブミンに影響したエタノール濃度よりも低い 0.1 vol% のエタノールで阻害を示した。したがって、エタノールとの相互作用は、ワルファリンの薬物動態のうち特に代謝過程において注意を要すると考えられる。

製剤添加物としてエタノールを含有する製剤との併用時には、多角的に相互作用について注意を払う必要があると考える。特に CYP2C9.1 においては、基質により低濃度のエタノールで代謝が阻害されるものがあることが明らかになった。今後、薬物個々での検討や評価が必要であると考えられる。また、CYP2C9.1 において *S*-ワルファリンとジクロフェナクで異なるエタノールの作用が確認されたことから、ヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性においても異なる基質を用いた検討が必要であると考えられる。そこで、第 2 章ではヒト血清アルブミンによる 3 種類の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を検討した。

## 第5節 小 括

ワルファリンエナンチオマーのヒト血清アルブミンおよび市販アルブミン製剤中タンパク質への結合性に及ぼすエタノールの影響とともに、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及ぼす各種アルコールの影響を検討した。さらに、CYP2C9 代謝に及ぼすエタノールの影響を検討した結果、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ヒト血清アルブミンへの結合性に影響し、エタノールにより *S*-エナンチオマーの結合性は上昇し、一方、*R*-エナンチオマーの結合性は低下した。
2. ワルファリンの市販アルブミン製剤中タンパク質への結合性に市販アルブミン製剤間でエタノールの影響に相違が認められ、アルブミンではエタノールにより *S*-および *R*-両エナンチオマーの結合性は低下した。また、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タンパク結合性へのエタノールの作用に製剤中に含有される遊離脂肪酸が影響することが示唆された。
3. エタノールは *S*-ワルファリンの CYP2C9 による代謝を阻害し、阻害を示すエタノール濃度はジクロフェナクの CYP2C9 による代謝を阻害する濃度よりも低濃度であった。

以上より、エタノールが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と CYP2C9 代謝に影響すること、アルブミン結合性へのエタノールの影響がアルブミンの製剤間で異なることを認めたことから、次章においては、3 種類のエステル型薬物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に及ぼすエタノールの影響についてヒト血清アルブミン製品製造ロット間での相違を検討することにした。

## 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節 緒言

序論でも述べた通り、ヒト血清アルブミンは 585 個のアミノ酸残基からなるタンパク質で、単量体であるが、3 つの構造的に類似した  $\alpha$ -ヘリックスからなるドメイン (I-III) を有し、各ドメインはそれぞれ 6 つと 4 つの  $\alpha$ -ヘリックスからなるサブドメイン A と B に分けられる<sup>1, 4)</sup>。結晶構造解析により、ヒト血清アルブミンにおける主要な薬物結合サイトであるサイト I とサイト II は、それぞれサブドメイン II A と III A にあることが確認されている<sup>2, 5)</sup>。

ヒト血清アルブミンは血漿において最も豊富なタンパク質であり、多くの内因性および外因性の化合物の輸送や貯蔵に寄与している。また、血液の浸透圧維持においても重要な役割を持っている。この多機能なタンパク質は、エステル型薬物などを加水分解する酵素特性 (エステラーゼ活性) も有している。ヒト血清アルブミンは、サイト I においてアスピリン (Fig. 2-1)<sup>75)</sup>、スルベニシリン<sup>76)</sup>、ジフルニサルグルクロニド<sup>77)</sup>などを加水分解し、サイト II において *p*-ニトロフェニルアセテート<sup>78-81)</sup>、いくつかの *N*-カルボベンゾキシ-D(L)-アラニン *p*-ニトロフェニルエステル<sup>82)</sup> やカルプロフェングルクロニド<sup>83)</sup>などを加水分解するエステラーゼ活性を有することが報告されている。

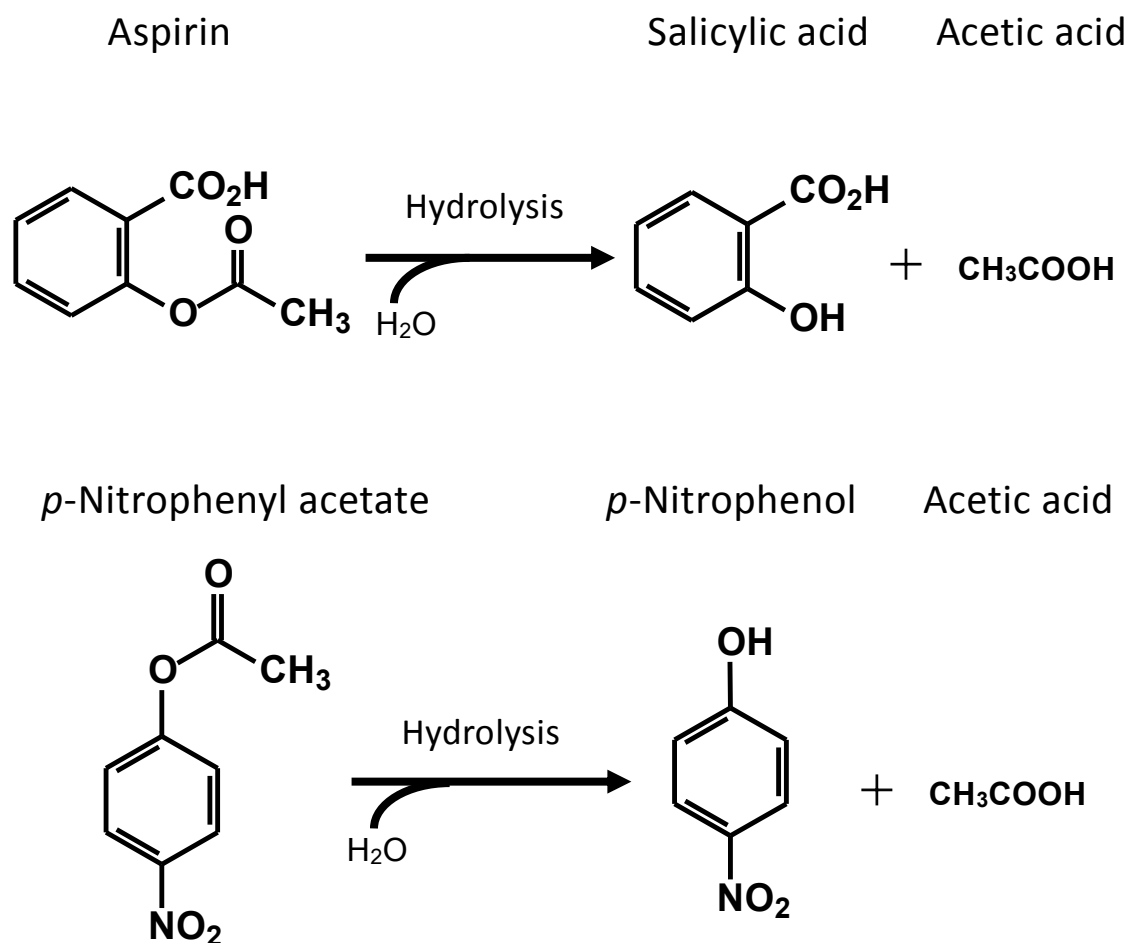


Fig. 2-1. Hydrolysis of aspirin and *p*-nitrophenyl acetate.

エステル結合をもつプロドラッグのオルメサルタンメドキシミルはヒト血清中で約 40%がヒト血清アルブミンにより加水分解されてオルメサルタンとなり、アンジオテンシンⅡ受容体拮抗作用を示すと考えられている<sup>84, 85)</sup> (Fig. 2-2)。オルメサルタンメドキシミルはヒト血清アルブミンのサイトⅠおよびⅡの両サイトにおいて加水分解されることが認められている<sup>84)</sup>。

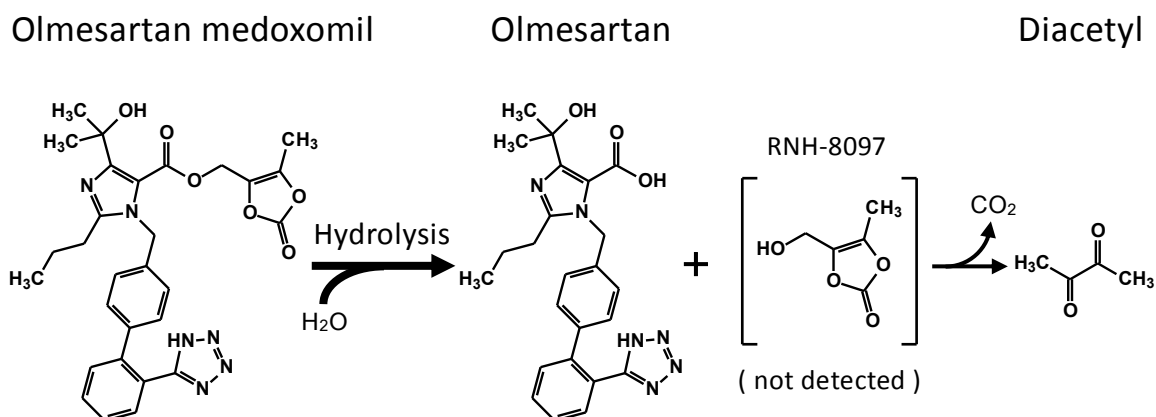


Fig. 2-2. Hydrolysis of olmesartan medoxomil.

市販アルブミン製剤間<sup>12)</sup>や、ウシ血清アルブミン製品の製造ロット間<sup>86)</sup>において、薬物の結合性における相違が報告されている。さらに、*Oryza sativa*において発現された組換えヒト血清アルブミンにおいても高分子量凝集物の生成量や糖化割合におけるロット間での相違<sup>87)</sup>も報告されている。また、コリンエステラーゼのコンタミネーションによる製造ロット間および販売会社間でのヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性における相違<sup>88)</sup>も報告されている。しかしながら、ヒト血清アルブミン製品の製造ロット間での相違について検討した報告はほとんど見られない。

第1章では、エタノールがワルファリンエナンチオマーのヒト血清アルブミン結合性に立体選択的な影響を示すことが明らかとなった。そして市販アルブミン製剤間でのワルファリンエナンチオマーの結合性に相違を認めた。また、エタノールは*S*-ワルファリンのCYP2C9による代謝を阻害し、阻害するエタノール濃度はジクロフェナクのCYP2C9による代謝を阻害する濃度よりも低濃度であった。このように、エタノールによるヒト血清アルブミンへの薬物の結合性が薬物の立体構造の相違によっても異なる影響を受けること、そしてCYP2C9酵素活性に及ぼすエタノールの影響が基質により大きく変わることが判明した。このことから、ヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性においてもエタノールの影響が基質によって異なることが考

えられる。さらに製剤添加物の含まれた市販アルブミンの製剤間においてもエタノールによるアルブミン結合への影響に相違が認められたことから、市販アルブミン製剤間だけでなく、ヒト血清アルブミン製品の製造ロット間においてもエステラーゼ活性が異なる可能性が考えられた。

そこで本章では、種々の製造ロットのヒト血清アルブミン製品を用いて、そのヒト血清アルブミンによる 3 種類のエステル型薬物の加水分解に及ぼすエタノールの影響を検討した。エステル型薬物としては、サイト I に対するモデル化合物としてアスピリンを、サイト II に対するモデル化合物として *p*-ニトロフェニルアセテートを、さらに両サイトで加水分解されるモデル化合物としてオルメサルタンメドキシミルを用いた。さらに、アスピリンと併用されることのある抗凝固薬でサイト I に結合するワルファリンや、非ステロイド性抗炎症薬のうちサイト I に結合するインドメタシンおよびサイト II に結合するナプロキセンによる影響についてエタノールによる影響と比較した。

## 第 2 節 実験材料及び方法

### 2-1. 実験材料及び試薬

アスピリン、サリチル酸ナトリウム、*p*-ニトロフェニルアセテート、*p*-ニトロフェノール、ワルファリンナトリウム、インドメタシン、ナプロキセン、エタノール、*o*-トルイル酸、5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)、ドデシル硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸水溶液 (pH 8.0) および NEFA C-テストワコーは和光純薬工業株式会社から購入した。オルメサルタン、オルメサルタンメドキシミル、エゼリンおよびアルブミン ヒト血清由来 (凍結乾燥末、遊離脂肪酸除去、グロブリン除去、 $\geq 99\%$ ) は Sigma-Aldrich 社から購入した。なお、ヒト血清由来アルブミン製品 (ヒト血清アルブミン製品) は、113K7601、085K7541、090M7001V、および SLBD7204V の 4 製造ロットを用いた。インドキシル硫酸および 3-インドール酢酸はナカライテスク社から購入した。アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用 (Sigma-Aldrich 社) を使い、その他の試薬は特級規格品を使用した。

## 2-2. ヒト血清アルブミンによるエステル型薬物の代謝実験

### 2-2-1. ヒト血清アルブミンによるアスピリンの代謝実験

Ma ら<sup>84)</sup>の方法を一部改変して行った。ヒト血清アルブミン（最終濃度 200  $\mu\text{M}$ ）単独、あるいは、それにワルファリン、インドメタシン、ナプロキセン（それぞれ最終濃度 200  $\mu\text{M}$ ）またはエタノール（最終濃度 2 vol%）を添加したものを 67 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、37°C で 5 分間プレインキュベートした。これに予め 37°C でプレインキュベートしたアスピリン（最終濃度 100  $\mu\text{M}$ ）を添加することで 37°C の温度条件下、代謝反応を開始した。なお、最終反応容量は 0.13 mL とし、インキュベートは 2 本ずつ行い、平均値を算出した。1、2、3 あるいは 4 時間後に氷冷したアセトニトリル 0.4 mL を添加して反応を停止させた。その後、62.5  $\mu\text{M}$ （インドメタシン添加時以外）または 3.125 mM（インドメタシン添加時）の *o*-トリル酸（内標準物質）を含む 0.1 M リン酸二水素ナトリウム（pH 2.0）0.1 mL を添加し、18,620 $\times g$ 、4°C（微量高速遠心機 CF16RN、日立工機株式会社）で 5 分間遠心して上清を回収した。上清を濾過（PTFE 0.45  $\mu\text{m}$ ）した後、その濾液を定量に供した。

なお、速度論的分析ではアスピリン濃度を 50-400  $\mu\text{M}$ 、インキュベーション時間を 2 時間として上記と同様に行った。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）中でのアスピリンの加水分解反応も測定し、ヒト血清アルブミンによる加水分解の擬 1 次速度定数（ $k_{\text{obs}}$ ）を補正して算出した。

### 2-2-2. ヒト血清アルブミンによる *p*-ニトロフェニルアセテートの代謝実験

Ikeda ら<sup>79)</sup>の方法を改変して行った。ヒト血清アルブミン（最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ）単独、あるいは、それにワルファリン、インドメタシン、ナプロキセン（それぞれ最終濃度 50  $\mu\text{M}$ ）、エゼリン（最終濃度 20  $\mu\text{M}$ ）またはエタノール（最終濃度 2 vol%）を添加したものを 67 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、25°C で 5 分間プレイ

ンキュベートした。これに予め 25℃でプレインキュベートした *p*-ニトロフェニルアセテート（最終濃度 10  $\mu$ M）を添加することで 25℃の温度条件下、代謝反応を開始した。なお、最終反応容量は 1.25 mL とした。生成する *p*-ニトロフェニルアセテート代謝物（*p*-ニトロフェノール）濃度を 220 型ダブルビーム分光光度計により波長 400 nm で経時的に定量した。

なお、速度論的分析ではヒト血清アルブミン濃度を 30  $\mu$ M、*p*-ニトロフェニルアセテート濃度を 12.5～100  $\mu$ M、インキュベーション時間を 60 秒、最終反応容量を 0.5 mL、冷却したエタノールにより反応を終了させたこと以外は上記と同様に行った。

### 2-2-3. 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代謝実験

Ma ら<sup>84)</sup>の方法を一部改変して行った。ヒト血清アルブミン（最終濃度 200  $\mu$ M）単独、あるいは、それにワルファリン、インドメタシン、ナプロキセン（それぞれ最終濃度 200  $\mu$ M）またはエタノール（最終濃度 2 vol%）を添加したものを 67 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解し、37℃で 5 分間プレインキュベートした。これに予め 37℃でプレインキュベートしたオルメサルタンメドキシミル（最終濃度 40  $\mu$ M）を添加することで 37℃の温度条件下、代謝反応を開始した。なお、最終反応容量は 0.13 mL とし、インキュベートは 2 本ずつ行い、平均値を算出した。2、3、4 あるいは 5 分後に氷冷したエタノール 0.4 mL 添加にて反応停止後、200  $\mu$ M または 2.5 mM（インドメタシン添加時）の *o*-トリル酸（内標準物質）を含む 0.1 M リン酸二水素ナトリウム（pH 2.0）0.1 mL を添加した。18,620 $\times g$ 、4℃（微量高速遠心機 CF16RN）で 5 分間遠心して上清を回収した。上清を濾過（PTFE 0.45  $\mu$ m）した後、その濾液を定量に供した。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）中でのオルメサルタンメドキシミルの加水分解反応も測定し、ヒト血清アルブミンによる加水分解の擬 1 次速度定数（ $k_{\text{obs}}$ ）を補正して算出した。



## 2-3. 代謝物の定量

### 2-3-1. アスピリン代謝物の定量

Fogel ら<sup>89)</sup>の方法を一部改変して行った。既知濃度のサリチル酸と *o*-トルイル酸（内部標準物質）を調製し、紫外分光光度計検出器または蛍光検出器を備えた HPLC を用いてサリチル酸と内部標準物質のピーク面積比をサリチル酸の濃度に対してプロットして検量線を作成することで、アスピリン代謝物であるサリチル酸の定量を行った。Fig. 2-3 および Fig. 2-4 にサリチル酸と内部標準物質の HPLC クロマトグラムを示す。

使用した HPLC 分析条件は次の通りである。

システムコントローラ：島津 SCL-10Avp

オートインジェクタ：島津 SIL-10ADvp

ポンプ：島津 LC-10ADvp

分光蛍光検出器：島津 RF-10A<sub>XL</sub> [励起波長：296 nm、蛍光波長：405 nm<sup>90)</sup>（インドメタシン添加時）]

紫外分光光度計検出器：島津 SPD-10Avp [波長：295 nm（インドメタシン添加時以外）]

カラム：Wakopak Wakosil 5C18 AR

(4.6 mm I.D.×250 mm、和光純薬工業株式会社)

カラム温度：40℃

溶出液：0.1 M リン酸二水素ナトリウム (pH 2.0) / アセトニトリル = 69.5 / 30.5 (vol / vol) (ワルファリン添加時)

0.1 M リン酸二水素ナトリウム (pH 2.0) / アセトニトリル = 69 / 31 (vol / vol) (ワルファリン添加時以外)

流速：0.5 mL / min

注入量：25 μL

保持時間	アスピリン	13 分
	インドメタシン	16 分
	サリチル酸	18 分

<i>o</i> -トルイル酸 (内部標準)	24 分
ナプロキセン	67 分
ワルファリン	123 分

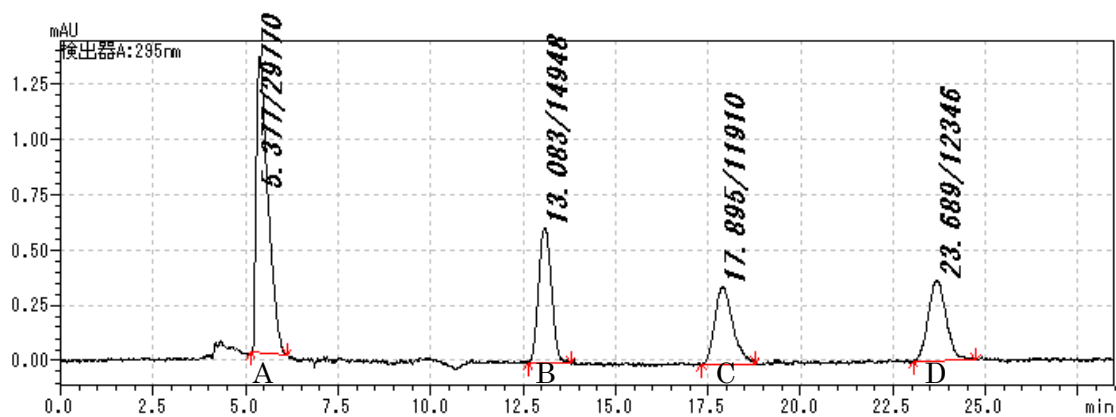


Fig. 2-3. HPLC chromatogram of aspirin and its hydrolysis product by ultraviolet analysis ( absorbance at 295 nm ).

Peaks : A = solvent peak ; B = aspirin ( 13 min ) ; C = salicylic acid ( 18 min ) ; D = *o*-toluic acid ( 24 min )

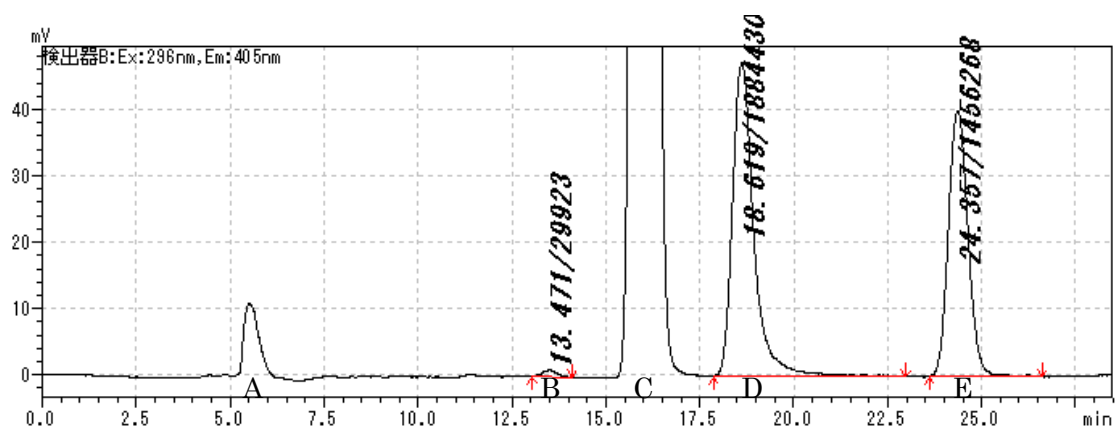


Fig. 2-4. HPLC chromatogram of aspirin and its hydrolysis product by fluorescence analysis ( excitation at 296 nm and emission at 405 nm ).

Peaks : A = solvent peak ; B = aspirin ( 13 min ) ; C = indomethacin ( 16 min ) ; D = salicylic acid ( 18 min ) ; E = *o*-toluic acid ( 24 min )

### 2-3-2. オルメサルタンメドキシミル代謝物の定量

Ishizuka ら<sup>91)</sup>の方法を一部改変して行った。既知濃度のオルメサルタンと *o*-トルイル酸（内部標準物質）を調製し、紫外分光光度計検出器を備えた HPLC を用いて波長 254 nm におけるオルメサルタンと内部標準物質のピーク面積比をオルメサルタンの濃度に対してプロットして検量線を作成することで、オルメサルタンメドキシミル代謝物であるオルメサルタンの定量を行った。ただし、インドメタシン添加時には分光蛍光検出器を用いて励起波長：260 nm、蛍光波長：370 nm で測定を行った。Fig. 2-5 および Fig. 2-6 にオルメサルタンと内部標準物質の HPLC クロマトグラムを示す。

使用した HPLC 分析条件は次の通りである。

システムコントローラ：島津 SCL-10Avp

オートインジェクタ：島津 SIL-10ADvp

ポンプ：島津 LC-10ADvp

分光蛍光検出器：島津 RF-10A<sub>XL</sub> [励起波長：260 nm、蛍光波長：370 nm<sup>84)</sup>（インドメタシン添加時）]

紫外分光光度計検出器：島津 SPD-10Avp [波長：254 nm（インドメタシン添加時以外）]

カラム：Wakopak Wakosil 5C18 AR  
(4.6 mm I.D.×250 mm、和光純薬工業株式会社)

カラム温度：40℃

溶出液：0.1 M リン酸二水素ナトリウム (pH 2.0) / アセトニトリル = 69 / 31 (vol / vol)

流速：0.5 mL / min

注入量：25 μL

保持時間：	オルメサルタン	9 分
	インドメタシン	15 分
	<i>o</i> -トルイル酸（内部標準）	22 分
	オルメサルタンメドキシミル	28 分
	ナプロキセン	67 分

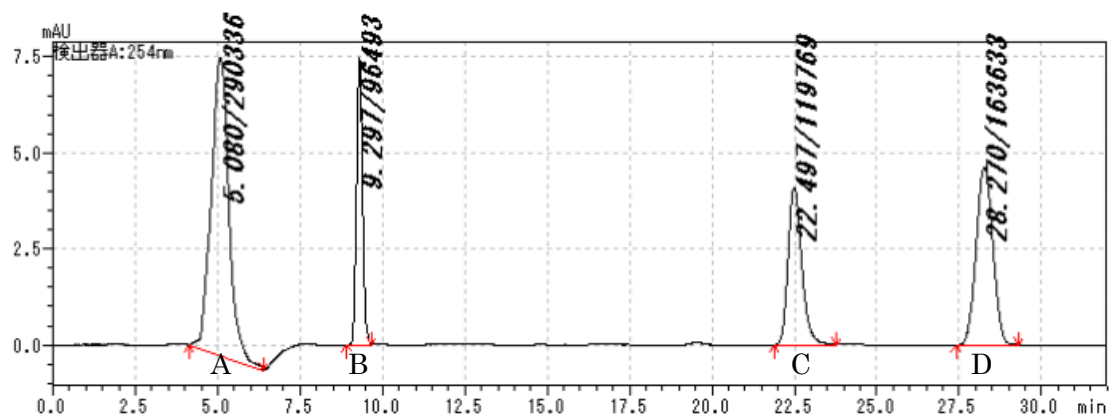


Fig. 2-5. HPLC chromatogram of olmesartan medoxomil and its hydrolysis product by ultraviolet analysis ( absorbance at 254 nm ).  
 Peaks : A = solvent peak ; B = olmesartan ( 9 min ) ; C = *o*-toluic acid ( 22 min ) ;  
 D = olmesartan medoxomil ( 28 min )

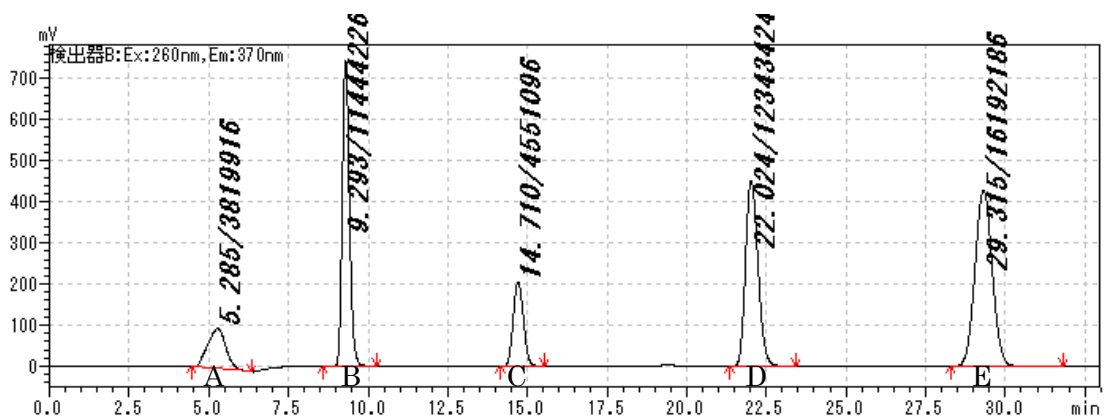


Fig. 2-6. HPLC chromatogram of olmesartan medoxomil and its hydrolysis product by fluorescence analysis ( excitation at 260 nm and emission at 370 nm ).  
 Peaks : A = solvent peak ; B = olmesartan ( 9 min ) ; C = indomethacin ( 14 min ) ;  
 D = *o*-toluic acid ( 22 min ) ; E = olmesartan medoxomil ( 29 min )

## 2-4. インドキシル硫酸および 3-インドール酢酸の定量

各種製造ロットのヒト血清アルブミン製品は 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解し、4%溶液を調製した。これに 2 倍量の氷冷したアセトニトリルを加えた後、 $18,620\times g$ 、4°C (微量高速遠心機 CF16RN) で 5 分間遠心して上清を回収した。上清を濾過 (PTFE 0.45  $\mu\text{m}$ ) した後、その濾液を定量に供した。

インドキシル硫酸の定量は、de Loor ら<sup>92)</sup> および Banoglu ら<sup>93)</sup> の方法を一部改変して行った。上記と同様の HPLC システムを用い、次の条件により分析を行った。

分 光 蛍 光 検 出 器 : 島津 RF-10AXL (励起波長 : 280 nm、蛍光波長 : 390 nm)

カ ラ ム 温 度 : 40°C

溶 出 液 : 25 mM リン酸二水素ナトリウム (pH 2.0) / アセトニトリル = 90 / 10 (vol / vol)

流 速 : 0.7 mL / min

保 持 時 間 : インドキシル硫酸 17 分

3-インドール酢酸の定量は、Martínez ら<sup>94)</sup> および Kelen ら<sup>95)</sup> の方法を改変して行った。上記と同様の HPLC システムを用い、次の条件により分析を行った。

分 光 蛍 光 検 出 器 : 島津 RF-10AXL (励起波長 : 280 nm、蛍光波長 : 340 nm)

カ ラ ム 温 度 : 40°C

溶 出 液 : 0.1 M リン酸二水素ナトリウム (pH 2.0) / アセトニトリル = 69 / 31 (vol / vol)

流 速 : 0.7 mL / min

保 持 時 間 : 3-インドール酢酸 10 分

インドキシル硫酸および 3-インドール酢酸の検出限界はそれぞれ 0.08  $\mu\text{M}$ 、0.04  $\mu\text{M}$  であった。

## 2-5. 遊離脂肪酸の定量

各種製造ロットのヒト血清アルブミン製品の 4%溶液中に含まれる遊離脂肪酸量は、NEFA C-テストワコーの異なる 2 ロットを用いて、第 1 章の 2-4 と同様に行った。

## 2-6. スルフヒドリル基の定量

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スルフヒドリル基の含量は、Takabayashi ら<sup>96)</sup>の方法により測定した。各ロットのヒト血清アルブミンは、50 mM のリン酸緩衝液 (pH 8.0) で溶解し 6 mg/mL 溶液とした。その溶液 0.5 mL と、同じくリン酸緩衝液で溶解した 2.5% ドデシル硫酸ナトリウム 0.4 mL、そして 2 mM エチレンジアミン四酢酸を含んだ 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 8.0) で溶解した 4 mg/mL の 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) 0.1 mL を混合した。室温にて 30 分間放置後、試料ブランクを対照にして波長 412 nm における吸光度を測定した。なお、スルフヒドリル濃度はモル吸光係数  $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  により算出した。ヒト血清アルブミン濃度は、波長 279 nm における吸光度を測定し、モル吸光係数  $36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  から算出した。

## 2-7. グリコアルブミンの定量

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<sup>97)</sup>により測定した。

測定は次のとおりに行った。試料中のグリコアルブミンはプロテアーゼの作用により糖化アミノ酸を生成させた。生成した糖化アミノ酸はケトアミンオキシダーゼの作用により、グルコソン、アミノ酸および過酸化水素を生成した。生成した過酸

化水素は、ペルオキシダーゼの作用により *N,N*-Bis(4-sulfobutyl)-3-methylamine, sodium salt と 4-アミノアンチピリンを縮合させ青紫色の色素を生成させた。この色素の吸光度を測定しグリコアルブミン濃度を求めた。試料中のアルブミンはドデシル硫酸ナトリウムを含む 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) でスルフヒドリル基を修飾し、ついでブロムクレゾールパープルを作用させ青紫色結合体を生成させた。この結合体の吸光度を測定し、アルブミン濃度を求めた。

## 2-8. エステラーゼ活性の解析

アスピリンおよびオルメサルタンメドキシミルに対するヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性の指標には、擬 1 次速度定数 ( $k_{\text{obs}}$ ) を用いた。その際、時間に対するヒト血清アルブミンを含む溶液中のアスピリン濃度あるいはオルメサルタンメドキシミル濃度の減少からヒト血清アルブミンを含まない溶液中のアスピリン濃度あるいはオルメサルタンメドキシミル濃度の減少を差し引いた片対数回帰分析により  $k_{\text{obs}}$  を算出した。

*p*-ニトロフェニルアセテートに対する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には、 $k_{\text{obs}}$  を使い、時間に対する *p*-ニトロフェニルアセテート濃度の減少の片対数回帰分析により算出した。なお、この *p*-ニトロフェニルアセテートの  $k_{\text{obs}}$  は溶液コントロールに対して 100 倍以上と非常に大きかったことから、補正は行わなかった。

## 2-9. 統計解析

ヒト血清アルブミン製品の製造ロット間におけるエステラーゼ活性および各パラメータの比較は、実験結果 ( $N = 3$  または  $4$ ) を平均値  $\pm$  S.D. で示し、検定は Student's *t*-test あるいは Tukey's *t*-test を用いた。コントロールのエステラーゼ活性と、各ヒト血清アルブミン結合薬物、エゼリンあるいはエタノールとの比較は、実験結果 ( $N = 3$ ) を平均値  $\pm$  S.D. で示し、検定は Student's *t*-test あるいは Dunnett's pairwise

multiple comparison  $t$  test を用いた。

この研究において有意水準は  $p < 0.05$  とした。



### 第3節 結 果

#### 3-1. アスピリンの加水分解に及ぼすエタノールと薬物の影響における製造ロット間での相違

エタノール (2 vol% ; 340 mM) 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それぞれ 22%と 35%阻害した (Table 2-1)。一方、113K7601 および 085K7541 のヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解には影響しなかった。

Table 2-1. Effect of ethanol on the hydrolysis of aspirin by human serum albumin from 4 different lot preparations

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

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (N = 3). HSA: 200  $\mu\text{M}$ . Aspirin: 100  $\mu\text{M}$ . Ethanol: 2 vol%. NS: not significant. <sup>a</sup>: not detected fatty acids, <sup>b</sup>: detected low levels of fatty acids by NEFA C-Test Wako (ref. Table 2-6) .

ヒト血清アルブミン製品の 4 つの異なる製造ロット間におけるアスピリンの加水分解の相違と、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、Fig. 2-7 に示す。コントロール群においては、アスピリンの加水分解に製造ロット間の相違が認められ、090M7001V と SLBD7204V の製造ロットでのアスピリンのエステラーゼ活性は 113K7601 や 085K7541 のエステラーゼ活性よりも高かった。090M7001V と SLBD7204V のエステラーゼ活性は、ワルファリンやインドメタシンの添加によって有意に減少し、113K7601 や 085K7541 のエステラーゼ活性よりも大きく減少した。アスピリンに対する加水分解は、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によって、より強く阻害された。

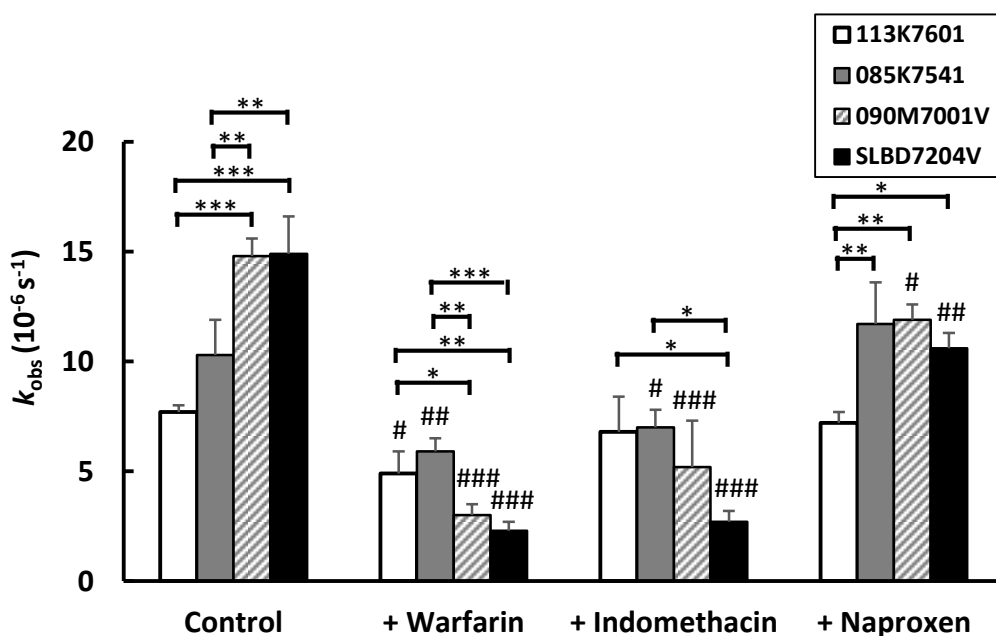


Fig. 2-7. Effects of warfarin, indomethacin, and naproxen on the hydrolysis of aspirin by human serum albumin from 4 different lot preparations.

Data are expressed as mean values  $\pm$  S.D. (N = 3). HSA: 200  $\mu$ M. Aspirin: 100  $\mu$ M. Inhibitor: 200  $\mu$ M. \* $p$ <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).

ヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解におけるパラメータを Table 2-2 に示す。085K7541 と 090M7001V の製造ロット間で  $V_{\max}$ 、 $K_m$  および  $V_{\max} / K_m$  の全てのパラメータに有意な差は認められなかった。

Table 2-2. Kinetic parameters for hydrolysis of aspirin by human serum albumin

Manufacturing lots of HSA	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mmol}$ HSA)	$K_m$ (mM)	$V_{\max} / K_m$ (ml/min/mmol HSA)
085K7541	2.11 $\pm$ 1.06	1.07 $\pm$ 0.80	2.18 $\pm$ 0.39
090M7001V	3.21 $\pm$ 2.40	1.35 $\pm$ 1.13	2.55 $\pm$ 0.37

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (N = 4).

### 3-2. *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と薬物の影響における製造ロット間での相違

エタノール (2 vol%; 340 mM) は、全ての製造ロットでヒト血清アルブミンによる *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解を有意に阻害した (Table 2-3)。113K7601 の製造ロットでの *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解は、エタノール添加により 15%阻害されたが、他の 3 つの製造ロットでは約 50%阻害された。

Table 2-3. Effect of ethanol on the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by human serum albumin from 4 different lot preparations

Manufacturing lots of HSA	$k_{\text{obs}}$ for <i>p</i> -nitrophenyl acetate ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )		Student's <i>t</i> -test results
	Control	With ethanol	
113K7601	4.1 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.2	$p < 0.05$
085K7541	22.1 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.1	$p < 0.001$
090M7001V	17.1 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.3	$p < 0.001$
SLBD7204V	20.6 $\pm$ 0.4	10.6 $\pm$ 0.4	$p < 0.001$

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (  $N = 3$  ). HSA: 50  $\mu\text{M}$ . *p*-Nitrophenyl acetate: 10  $\mu\text{M}$ . Ethanol: 2%.

ヒト血清アルブミン製品の 4 製造ロット間における *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解の相違と、そ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 Fig. 2-8 に示す。コントロール群において顕著な製造ロット間の相違が認められ、特に 113K7601 のエステラーゼ活性が低かった。サイト I に結合する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より強く阻害した。コントロールと比較したワルファリン、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割合は、何れの製造ロットにおいても同程度であった。

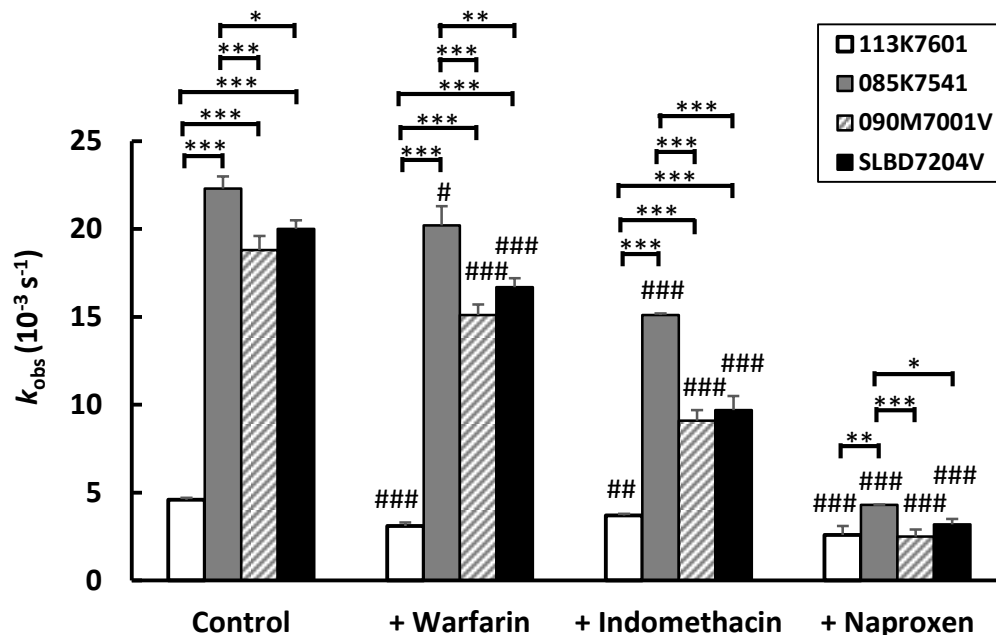


Fig. 2-8. Effects of warfarin, indomethacin, and naproxen on the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by human serum albumin from 4 different lot preparations.

Data are expressed as mean values  $\pm$  S.D. ( N = 3 ). HSA: 50  $\mu$ M. *p*-Nitrophenyl acetate: 10  $\mu$ M. Inhibitor: 50  $\mu$ M. \* $p$ <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 ).

ヒト血清アルブミンによる *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解におけるパラメータを Table 2-4 に示す。他の製造ロットのものに比べ、113K7601 の  $V_{\max}$  は有意に高く、 $K_m$  は約 3 倍高く、 $V_{\max} / K_m$  は半分程度低かった。090M7001V の  $V_{\max} / K_m$  は、085K7541 および SLBD7204V よりもやや低かった。

Table 2-4. Kinetic parameters for hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by human serum albumin

Manufacturing lots of HSA	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol HSA}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max} / K_m$ ( $\text{ml}/\text{min}/\mu\text{mol HSA}$ )
113K7601	$1.86 \pm 0.18$	$143.6 \pm 20.7$	$13.0 \pm 0.7$
085K7541	$1.43 \pm 0.22^{**}$	$46.2 \pm 5.2^{**}$	$30.7 \pm 1.7^{**}, \#$
090M7001V	$1.41 \pm 0.10^{**}$	$51.9 \pm 5.1^{**}$	$27.2 \pm 1.6^{**}$
SLBD7204V	$1.51 \pm 0.02^*$	$49.9 \pm 2.1^{**}$	$30.2 \pm 1.4^{**}, \#$

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (  $N = 4$  ).  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  significantly different from 113K7601 ( Tukey's  $t$ -test ).  $\#p < 0.05$  significantly different from 090M7001V ( Tukey's  $t$ -test ).

ヒト血清アルブミンによる *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解に及ぼすコリンエステラーゼ阻害薬であるエゼリンの影響は、何れの製造ロットにおいても認められなかった (Table 2-5)。

Table 2-5. Effect of eserine on esterase activities of human serum albumin from different manufacturing lot preparations

Manufacturing lots of HSA	$k_{\text{obs}}$ for <i>p</i> -nitrophenyl acetate ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )		Student's <i>t</i> -test results
	Control	With eserine	
113K7601	4.6 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.7	NS
085K7541	22.3 $\pm$ 0.7	21.2 $\pm$ 1.0	NS
090M7001V	18.8 $\pm$ 0.8	17.9 $\pm$ 1.6	NS
SLBD7204V	20.0 $\pm$ 0.5	20.1 $\pm$ 0.5	NS

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (  $N = 3$  ). HSA: 50  $\mu\text{M}$ . *p*-Nitrophenyl acetate: 10  $\mu\text{M}$ . Eserine: 20  $\mu\text{M}$ . NS: not significant.

ヒト血清アルブミン製品の糖化割合、非エステル結合型脂肪酸含量およびスルフヒドリル含量を Table 2-6 に示す。113K7601 および SLBD7204V のヒト血清アルブミン製品に含まれるグリコアルブミン量は、085K7541 と 090M7001V のグリコアルブミン量に比べて高かった。一方で、113K7601 および 085K7541 のヒト血清アルブミン製品中の NEFA 含量は、ヒト血清アルブミン 1 mol 当たり 0.01 mol 以下であったが、090M7001V および SLBD7204V ではヒト血清アルブミン 1 mol 当たり 0.1~0.2 mol の NEFA 含量であり、113K7601 および 085K7541 に比べ NEFA 含量が 10 倍以上高かった。また、スルフヒドリル含量については NEFA 含量と類似し、113K7601 および 085K7541 のヒト血清アルブミン製品に比べ、090M7001V および SLBD7204V でやや高い値を示した。

Table 2-6. Glycated albumin values, NEFA contents and sulfhydryl contents of human serum albumin from 4 different lot preparations

Manufacturing lots of HSA	Glycated albumin value (%)	NEFA content (mol/mol HSA)	Sulfhydryl content (mol/mol HSA)
113K7601	20.5	0.006 $\pm$ 0.006	0.182 $\pm$ 0.001
085K7541	12.4	0.006 $\pm$ 0.005	0.162 $\pm$ 0.004
090M7001V	13.2	0.223 $\pm$ 0.017	0.200 $\pm$ 0.005
SLBD7204V	25.1	0.109 $\pm$ 0.020	0.236 $\pm$ 0.001

Each value of glycated albumin represents the mean ( N = 2 ). Each value for the content of NEFA represents the mean  $\pm$  S.D. ( N = 5 ). Each value for sulfhydryl content represents the mean  $\pm$  S.D. ( N = 3 ).

ヒト血清アルブミン製品の全ての製造ロットにおいて、内因性のサイトⅡ高親和性物質であるインドキシル硫酸および 3-インドール酢酸は検出限界以下であったため、アルブミン 1 分子当たり 0.001 分子以下と考えられた。

### 3-3. 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製造ロット間での相違

コントロール群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、アルブミンの製造ロット間による相違は認められなかった (Table 2-7)。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対するエタノール (2 vol% ; 340 mM) による阻害の影響は、全ての製造ロットにおいて認められなかった。一方、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



加水分解は、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。しかしながら、各製造ロット間における阻害割合は、ワルファリンの添加で 33～43%、インドメタシン添加で 34～49%を示したが、ナプロキセン添加では 35～72%と製造ロット間での阻害の程度に違いが認められた。

Table 2-7. Effects of ethanol, warfarin, indomethacin, and naproxen on the hydrolysis of olmesartan medoxomil by human serum albumin from 4 different lot preparations

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

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (  $N = 3$  ). HSA: 200  $\mu\text{M}$ . Olmesartan medoxomil: 40  $\mu\text{M}$ . Ethanol: 2%. Warfarin, indomethacin, and naproxen: 200  $\mu\text{M}$ .

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  significantly different from the control (Dunnett's pairwise multiple comparison  $t$ -test).

## 第4節 考 察

4 つの異なる製造ロットのヒト血清アルブミン製品による 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）の加水分解に及ぼすエタノールとサイト I および II に結合する薬物の影響を検討した。

### 4-1. アスピリンの加水分解

エタノールは 090M7001V と SLBD7204V の製造ロット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 と 085K7541 のヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解にはエタノールは影響を及ぼさなかった。その際、アスピリンの加水分解については、ヒト血清アルブミンを含まないリン酸緩衝液中でのアスピリンの加水分解反応も測定することで、ヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解の  $k_{\text{obs}}$  を補正していた。しかし、アスピリンもヒト血清アルブミンに結合性を示すため、アスピリンのヒト血清アルブミンへの結合性と加水分解の関係を考察することとした。

各製造ロットにおけるアスピリンのヒト血清アルブミンへの結合率を第 1 章で用いた限外濾過法で測定したところ、Table 2-8 に示す結果を得た。コントロールにおけるアスピリンの非結合型濃度に製造ロット間で相違が認められ、特に 113K7601 の製造ロットにおけるアスピリンの非結合型濃度が高値を示した。また、エタノールはアスピリンの非結合型濃度を上昇させ、特に 113K7601 以外での製造ロットにおける非結合型濃度を大きく上昇させた。そこで、Table 2-1 と Table 2-8 の値を用いて非結合型アスピリン濃度とアスピリンの加水分解速度の関係を検討したところ、Fig. 2-9 に示すように非結合型アスピリン濃度の上昇にともない、アスピリンの加水分解が低下した。

Table 2-8. Effect of ethanol on the binding of aspirin to human serum albumin from 4 different lot preparations

Manufacturing lots of HSA	Unbound concentration of aspirin ( $\mu\text{M}$ )		Student's <i>t</i> -test results
	Control	With ethanol	
113K7601	80.8 $\pm$ 1.2 ##	87.6 $\pm$ 1.2 ##	$p < 0.01$
085K7541	36.5 $\pm$ 1.7 **,##	66.8 $\pm$ 0.3 **,##	$p < 0.01$
090M7001V	44.8 $\pm$ 1.4 **	72.0 $\pm$ 0.3 **	$p < 0.01$
SLBD7204V	35.5 $\pm$ 0.5 **,##	68.6 $\pm$ 1.0 **,##	$p < 0.01$

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (  $N = 3$  ). HSA: 200  $\mu\text{M}$ . Aspirin: 100  $\mu\text{M}$ . Ethanol: 2 vol%. \*\* $p < 0.01$  significant difference from 113K7601 ( Tukey's *t*-test ). ## $p < 0.01$  significantly different from 090M7001V ( Tukey's *t*-test ).

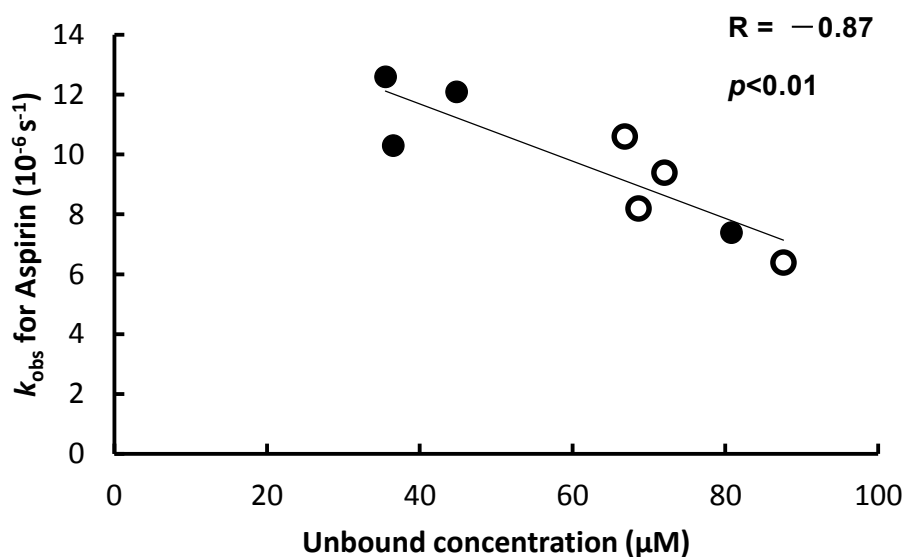


Fig. 2-9. Relationship between the protein binding of aspirin and  $k_{\text{obs}}$  for aspirin with (○) and without (●) ethanol in 4 different lot preparations.

Data are expressed as mean values (N = 3).

そこで、タンパク結合の影響も考慮に入れ、ヒト血清アルブミンを含まないリン酸緩衝液中での加水分解反応にこのアルブミンへの結合率を加味して、結合率からヒト血清アルブミンに結合していない溶液中のアスピリン濃度を算出し、その濃度を用いて  $k_{\text{obs}}$  の補正を行った (Table 2-9)。その結果、補正した  $k_{\text{obs}}$  値は上昇したが、タンパク結合率を補正しない形でエタノールの影響を比較した結果 (Table 2-1) とタンパク結合率を補正してエタノールの影響を比較した結果 (Table 2-9) は対応していた。そのため、エタノールの効果に製造ロット間で相違のあることが、タンパク結合率で補正した  $k_{\text{obs}}$  による結果によっても確認できた。エタノールの影響に製造ロット間の相違が認められたことから、さらに、サイト I に結合するワルファリンとインドメタシン、サイト II に結合するナプロキセンを用いて、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影響を検討した。ワルファリンは全ての

製造ロットで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。インドメタシンは 1 製造ロットを除く 3 製造ロットでアスピリンの加水分解を阻害した。ワルファリンおよびインドメタシン共に 090M7001V と SLBD7204V の製造ロットでのヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解を強く阻害した。ナプロキセンは、113K7601 と 085K7541 の製造ロットで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なかったが、090M7001V と SLBD7204V の製造ロットではアスピリンの加水分解を阻害した。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から、アスピリンの加水分解にはサイト I が強く関与していることが示唆された。

Table 2-9. Effect of ethanol on the hydrolysis of aspirin by human serum albumin from 4 different lot preparations (corrected by the protein binding of aspirin)

Manufacturing lots of HSA	$k_{\text{obs}}$ for aspirin ( $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ )		Student's $t$ -test results
	Control	With ethanol	
113K7601	11.3 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 1.3	NS
085K7541	19.6 $\pm$ 3.1 **	16.8 $\pm$ 1.7 **	NS
090M7001V	20.9 $\pm$ 1.8 **	14.6 $\pm$ 0.9 **	$p < 0.01$
SLBD7204V	22.6 $\pm$ 2.1 **	13.5 $\pm$ 0.3 *,#	$p < 0.01$

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. (  $N = 3$  ). HSA: 200  $\mu\text{M}$ . Aspirin: 100  $\mu\text{M}$ . Ethanol: 2 vol%. NS: not significant. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  significant difference from 113K7601 ( Tukey's  $t$ -test ). # $p < 0.05$  significantly different from 085K7541 ( Tukey's  $t$ -test ).

ヒト血清アルブミンに結合した遊離脂肪酸は構造変化を引き起こし<sup>98)</sup>、ヒト血清アルブミン 1 mol あたり 3 mol まであるいは 8 mol までの脂肪酸の存在はサブドメイン II A におけるヒト血清アルブミンへのワルファリンやアスピリンの結合を増加させることが報告されている<sup>52, 99)</sup>。また、サイト I への 5- (ジメチルアミノ) ナフトレン-1-スルホンアミド (DNSA) の結合率は、ヒト血清アルブミン 1 mol 当たり脂肪酸 3 mol までの市販アルブミン製剤への添加により上昇することが報告されている<sup>53)</sup>。また、アスピリンの加水分解にはヒト血清アルブミンの Lys-199、His-242 および Arg-257 が重要であり、さらに Lys-199 の脱プロトン化と Lys-195 のプロトン化によって促進されることが報告されている<sup>100, 101)</sup>。そしてヒト血清アルブミンへの遊離脂肪酸の結合は、サイト I の結合ポケットの Tyr-150 および Arg-257 を移動させることによって周辺環境を変化させて構造変化を引き起こし、その結果としてヒト血清アルブミンへのワルファリンやアスピリンの結合性を増加させる<sup>18, 52, 98, 99)</sup>。そこで、ヒト血清アルブミン製品中の各製造ロットの遊離脂肪酸含量を測定したところ、113K7601 と 085K7541 の製造ロットのヒト血清アルブミン製品ではほとんど検出されなかったが、090M7001V や SLBD7204V のものでは少量の遊離脂肪酸が検出された。したがって、少量の遊離脂肪酸を含有した 090M7001V と SLBD7204V の製造ロットのものでは、遊離脂肪酸を含まない 113K7601 と 085K7541 のものよりもヒト血清アルブミンへのアスピリンの結合性が強いために、ヒト血清アルブミンのエステラーゼ活性が高かったものと考えられる。一方、少量の遊離脂肪酸を検出したヒト血清アルブミン製品において、ワルファリンやインドメタシンはアスピリンの加水分解を顕著に阻害した。ヒト血清アルブミンへのアスピリンの親和性や結合率はサリチル酸よりも低く<sup>86, 102)</sup>、ヒト血清アルブミンへのサリチル酸の親和性はワルファリンやインドメタシンよりも低い<sup>103, 104)</sup>。したがって、アスピリンのヒト血清アルブミンへの結合性よりもワルファリンやインドメタシンの結合性が強いために、少量の遊離脂肪酸を含有したヒト血清アルブミン製品ではワルファリンやインドメタシンによるアスピリンの加水分解の阻害が強く表れたものと考えられる。また、エタノールも少量の遊離脂肪酸を含有した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。エタノールは、ヒト血清アルブミンと 76% の配列相同性を有するウシ血清アルブミンの疎水性脂肪酸結合サイトに結合し、脂肪酸と置換するすることが報告されている<sup>67)</sup>。一方で、エタノールは結合サ

イトにおける立体構造変化を引き起こし、ワルファリンのヒト血清アルブミンへの結合における Trp-214 の蛍光強度に有意な影響を及ぼすことが報告されている<sup>68)</sup>。これらのことから、少量の遊離脂肪酸を含んだヒト血清アルブミン製品でのヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解の増大を、エタノールが脂肪酸の置換やサイトⅠの周辺環境を変化させることで阻害したものと考えられる。

#### 4-2. *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解

エタノールは、脂肪酸の有無にかかわらず、全ての製造ロットでのヒト血清アルブミンによる *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解を阻害した。さらに、サイトⅠに結合するワルファリンとインドメタシン、サイトⅡに結合するナプロキセンによる影響を検討したところ、*p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解ではワルファリンおよびインドメタシンよりもナプロキセンによってより強く阻害された。そのため、ヒト血清アルブミンによる *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解はサイトⅡが強く関与していることを示唆した。

ヒト、ウシ、ウサギ、イヌ、ラットおよびウマの全ての種でヒト血清アルブミンのサイトⅡにおける *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解に対して主要な残基である Tyr-411 および Arg-410 は完全に保存されているが<sup>80)</sup>、その *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解は human > bovine > rabbit > dog > rat > horse と、種依存性であることが報告されている<sup>105)</sup>。そして Kragh-Hansen<sup>106)</sup> はそのエステラーゼ活性の種依存性はアルブミン分子の微小環境における違いであると指摘している。この僅かな微小環境の相違によりエステラーゼ活性が影響を受けること、また、エタノールはヒト血清アルブミンの結合サイトにおける周辺環境の構造変化を引き起こすことから<sup>61, 68)</sup>、ヒト血清アルブミンによる *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は、エステラーゼ様加水分解サイトにおける微小環境および構造の変化によって引き起こされたものと推測される。

アスピリンおよび *p*-ニトロフェニルアセテートに対するヒト血清アルブミン製品のエステラーゼ活性において製造ロット間に大きな相違が認められた。そして、各製造ロットにおけるアルブミンへの結合率で補正したアスピリンに対するエステラーゼ活性と *p*-ニトロフェニルアセテートのエステラーゼ活性に関連性が認めら

れた (Fig. 2-10)。そのため、ヒト血清アルブミン製品は原料段階や製造工程段階でエステラーゼ活性部位に何らかの影響を受けていることが考えられる。

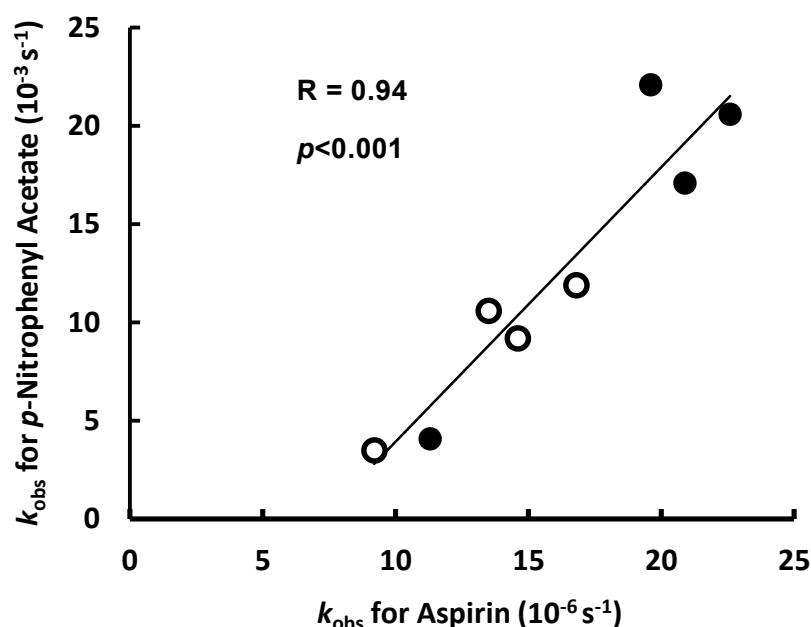


Fig. 2-10. Relationship between  $k_{\text{obs}}$  for aspirin corrected by the protein binding of aspirin and  $k_{\text{obs}}$  for *p*-nitrophenyl acetate with (○) and without (●) ethanol in 4 different lot preparations.

Data are expressed as mean values (  $N = 3$  ).

Chapuis ら<sup>88)</sup> は、血清アルブミンのエステラーゼ活性の一部は市販のヒト血清アルブミン製品におけるコリンエステラーゼのコンタミネーションによるものであることを明らかにし、さらに市販の製剤間やロット間においてエステル型薬物で脳循環改善薬として市販されていたモキシシリトに対するエステラーゼ活性に有意な違いのあることを報告している。そこで、本研究で用いた異なる製造ロットのヒト血清アルブミン製品へのコリンエステラーゼのコンタミネーションの有無に関して検討した。コリンエステラーゼ阻害剤であるエゼリンの有無における *p*-ニトロフェニルアセテートのエステラーゼ活性を測定したところ、何れの製造ロットにおいて



も有意な差は認められず、コリンエステラーゼのコンタミネーションは無いことが確認された。また、Chapuis ら<sup>88)</sup> も本研究で用いた Sigma-Aldrich 社の A3782 のヒト血清アルブミンにおけるコリンエステラーゼのコンタミネーションを認めていない。また、113K7601 の製造ロットのヒト血清アルブミン製品における *p*-ニトロフェニルアセテートのエステラーゼ活性が特に低く、さらに *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解に対する 113K7601 の  $K_m$  値は他の製造ロットのものよりも高かった。ヒト血清アルブミンのサイト II に結合する内因性物質<sup>107)</sup> であるインドキシル硫酸および 3-インドール酢酸は、今回検討に用いたヒト血清アルブミンにおいて検出されず、また、試料で用いたヒト血清アルブミンは高純度 (99%以上) のものであることから、113K7601 のみがヒト血清アルブミンに結合する何らかのコンタミネーションがあったとは考えにくい。しかしながら、*p*-ニトロフェニルアセテートに対する 113K7601 の加水分解は他の製造ロットのものと同様にナプロキセン、インドメタシンおよびワルファリンによっても阻害されている。エステラーゼ活性を示す領域周辺における翻訳後修飾のような構造変化による影響も考えられることから、メルカプトアルブミンとノンメルカプトアルブミンに関する酸化ストレスによるヒト血清アルブミンの Cys-34 における翻訳後修飾を検出する目的でスルフヒドリル含量を測定した。また、Anraku ら<sup>108)</sup> はヒト血清アルブミンの酸化はサイト II に存在する塩基性アミノ酸残基、特に Arg-410 が酸化され、立体構造の変化が起こり、リガンド結合能やエステラーゼ様活性を顕著に低下させることを報告している。本研究で用いた 113K7601 および 085K7541 のスルフヒドリル含量は、Minami ら<sup>109)</sup> の報告と同様に、090M7001V および SLBD7204V のスルフヒドリル含量よりも低かった。脂肪酸の結合量とスルフヒドリル含量の関連性はウシ血清アルブミンで観察<sup>96)</sup> されているが、その報告と同様に脂肪酸を含有したヒト血清アルブミン製品でスルフヒドリル含量は高かった。しかしながら、113K7601 のスルフヒドリル含量は 085K7541 よりも高く、113K7601 が酸化ストレスを強く受けていないことが確認された。

各製造ロットのヒト血清アルブミン製品に含有されるグリコアルブミン量の測定結果からは、アルブミンの糖化とヒト血清アルブミンによるアスピリンや *p*-ニトロフェニルアセテートのエステラーゼ活性に関連性は認められなかった。サイト I やサイト II の高親和性結合薬物への糖化アルブミンの影響の有無については相反す

る報告<sup>110-114)</sup>がなされている。アルブミンの糖化された部位などによる影響の相違も考慮されるため更なる検討が必要であると考えられる。メチルグリオキサール由来のヒドロイミダゾロンはアルブミンの主要な糖化付加物であり、メチルグリオキサールにより修飾されたヒト血清アルブミンの *p*-ニトロフェニルアセテートに対するエステラーゼ活性は減少することが報告されている<sup>115)</sup>。しかしながら、一般的な血液中での修飾の程度は僅かであることから、メチルグリオキサール由来のヒドロイミダゾロンの影響はこの製造ロット間におけるエステラーゼ活性の相違の原因としては考慮しにくい。また、30 種類以上の変異アルブミンの存在が報告されているが、小児において 15,581 人中 48 人でその頻度は 0.3%と報告されており、このような患者由来のものの混入による影響は考慮しがたい<sup>116)</sup>。本研究で用いたヒト血清アルブミンは高純度のものであることから、この製造ロット間におけるエステラーゼ活性の相違は、ヒト体内での状態も含めた原料段階、あるいは製品の製造工程で形成された翻訳後修飾や構造変化が原因である可能性が考えられる。

主にサイトⅡが関与する *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解よりも、主にサイトⅠが関与するアスピリンの加水分解は遅いことを認めた。これはサイトⅠの加水分解に重要とされる Lys-199、His-242 および Arg-257 周囲の立体構造とサイトⅡの加水分解に重要とされる Arg-410 および Tyr-411 周囲の立体構造の相違によることが推察される。Fig. 2-9 に示したようにアスピリンではタンパク結合率が低下すると加水分解も低下することを認めた。*p*-ニトロフェニルアセテートについてはアルブミンにより加水分解されやすく、そのタンパク結合率についての検討が困難であるが、4%のアルブミン濃度で代謝物の *p*-ニトロフェノールの結合率が約 90%と高いことが報告されている<sup>117)</sup>。*p*-ニトロフェノールより脂溶性の *p*-ニトロフェニルアセテートの結合率は *p*-ニトロフェノールよりも高いことが考えられる。したがって、アスピリンのタンパク結合率が *p*-ニトロフェノールの結合率よりも低いことがアスピリンの加水分解が遅かった原因である可能性が推測された。

#### 4-3. オルメサルタンメドキシミルの加水分解

エタノールは、ヒト血清アルブミンによるアスピリンおよび *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解に影響を及ぼしたが、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エタノールは有意な影響を示さなかった。一方、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は、アスピリンおよび *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解への影響と同様に、ワルファリン、インドメタシンおよびナプロキセンによって阻害された。このオルメサルタンメドキシミルの加水分解がサイト I およびサイト II の高親和性薬物によって阻害された結果は、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がワルファリンやサイト II のリガンドであるイブプロフェンによって阻害されることを示した Ma ら<sup>84)</sup> の報告と同様であった。コントロールにおけるアスピリンとオルメサルタンメドキシミル間、および *p*-ニトロフェニルアセレートとオルメサルタンメドキシミル間の製造ロット個々での  $k_{\text{obs}}$  に関連性は認められず、さらにエタノール、ワルファリン、インドメタシンおよびナプロキセンのいずれの添加によるコントロールに対する  $k_{\text{obs}}$  の阻害の程度も基質間で製造ロット個々での関連性は認められなかった。したがって、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の影響が基質により異なることが示唆された。

ヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解は、サイト I において主要な触媒作用を示す残基である Lys-199 と共に Lys-195、His-242 および Arg-257 が重要であることが報告されている<sup>100, 101, 106)</sup>。Ma ら<sup>84)</sup> はオルメサルタンメドキシミルにおいては、アスピリンと同様に Lys-199 が主要な触媒作用を示す残基であるが、それと共に Glu-292 が重要な触媒残基であると推測している。また、オルメサルタンメドキシミルの加水分解メカニズムは、*p*-ニトロフェニルアセレートとほぼ同様であるが、*p*-ニトロフェニルアセレートの加水分解に関与している Arg-410 の代わりに、オルメサルタンメドキシミルの加水分解では Lys-414 が関与していると考えられている。すなわち、この Lys-414 が Arg-410 に代わって主要な触媒残基である Tyr-411 のオキシアニオンホール形成に関わっていることが示唆されている<sup>84)</sup>。これまでに、アルブミンへのオレイン酸の結合が Arg-257 および Arg-410 の側鎖の構造変化を来し、パラオキソンに対するエステラーゼ活性に影響することが報告されている<sup>118)</sup>。このように、Arg-257 および Arg-410 の側鎖は構造変化を受けやすいことが予想され、エタノールが影響することもあると考えられる。しかしながら、オルメサルタンメドキシミルの触媒作用に Arg-257 および Arg-410 の残基が関わっていないため、オルメサルタンメドキシミルの加水分解にエタノールが影響を及ぼさなかつ

たものと推察される。これらの触媒残基の相違や微小環境への影響の相違が、エタノールによるオルメサルタンメドキシミルとアスピリンあるいは *p*-ニトロフェニルアセテートとの間でのエステラーゼ活性に相違を生じさせたと考えられる。

本研究は、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の影響が、薬物によって異なることを明らかにした。パクリタキセルやフェニトインなどのような不溶性薬物を含有した注射剤には高濃度のエタノールが含まれており、これらの製剤では 5~10 vol% のエタノールが血流に直接注入されることになる。本章では 2 vol% エタノールでの検討であるが、少なくとも投与部位周辺あるいは投与初期において、エタノールはヒト血清アルブミンにより加水分解される薬物の体内動態に影響する可能性が示唆された。また、ヒト血清アルブミンによる薬物の加水分解に及ぼすエタノールの影響は基質によっても大きく異なることから、ヒト血清アルブミンにより加水分解される薬物とエタノールとの併用時には、薬物個々で評価しながら注意深く観察していく必要があると考えられる。

また、ヒト血清アルブミン製品の製造ロット間におけるサイト I およびサイト II におけるエステラーゼ活性の相違が明らかになったことから、市販アルブミン製剤などのヒト血清アルブミンを含有した製剤の使用、特に大量投与時には、製造ロット間の相違でヒト血清アルブミンにより加水分解される薬物の体内動態に影響を及ぼすことが予想され、さらに、そのエステラーゼ活性はヒト血清アルブミンの高親和性薬物やエタノールの存在によって変動する可能性が示唆された。したがって、市販アルブミン製剤などのヒト血清アルブミンを含有した製剤は、画一的に投与するのではなく、製造ロット間での変動や併用薬物による影響にも注意して薬物療法を進めていく必要性が示唆された。

これらのことから、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おいては、薬物間だけでなく製剤添加物と薬物間の相互作用についても注意が必要であると考えられる。

## 第5節 小 括

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 (2 vol%) およびサイト I あるいはサイト II への高結合親和性薬物の影響、さらにヒト血清アルブミン製品の製造ロット間での相違を検討した結果、以下の結論を得た。

1. ヒト血清アルブミンによるアスピリンの加水分解は、遊離脂肪酸をほとんど含まないヒト血清アルブミンに比べ、少量を含んだヒト血清アルブミンがサイト I 結合薬物やエタノールによって、より強く阻害された。
2. エタノールやサイト II 結合薬物はヒト血清アルブミンによる *p*-ニトロフェニルアセテートの加水分解を阻害した。
3. サイト I 結合薬物およびサイト II 結合薬物は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を阻害した。しかし、エタノールは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を阻害しなかった。

本章において、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が明らかとなった。そして、ヒト血清アルブミンによるエステル型薬物の加水分解は、製造ロット間で異なることが判明した。さらに、エステル型薬物によっては、サイト I あるいはサイト II への高結合親和性薬物とエタノールによる加水分解への影響が大きく異なることが明らかになった。

## 総 括

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た。その結果、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は製造ロット間で相違を示した。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って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。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました薬剤学研究室 岩川精吾教授に衷心より感謝申し上げます。

本研究の論文審査にあたり、種々の有益な御助言、御指導を賜りました薬品物理化学研究室 向高弘教授、医療薬学研究室 力武良行教授、製剤学研究室 坂根稔康教授に深謝いたします。

本研究に対し、数々の貴重な御助言と幾多の御協力を賜りました薬剤学研究室 上田久美子講師、細川美香助教、田中章太特任助教、平井由華元助手に深謝いたします。

本研究において、種々の貴重な御意見と励ましの御言葉、多大なる御協力を賜りました薬学臨床教育センター 濱口常男教授に心より感謝いたします。

また、多大なる御協力とあたたかい御理解を賜りました薬学臨床教育センター 杉山正敏前教授、沼田千賀子教授、田内義彦教授、國正淳一教授、波多江崇准教授、猪野彩講師、河内正二講師、竹下治範講師、横山郁子助手ならびに薬学臨床教育センターの諸先生方、近畿大学薬学部医療薬剤学分野 小竹武教授、立命館大学薬学部医療薬学系分野 富田尚子講師に深謝いたします。

本研究の機会を与えていただくとともに、種々の有益な御助言と幾多の御協力を賜りました兵庫医科大学病院薬剤部 門林宗男前部長をはじめとする兵庫医科大学病院の諸先生方に心より感謝いたします。

さらに、実験の一部に御協力いただきました薬剤学研究室 池上友基学士、森井涼子学士をはじめとする薬剤学研究室の諸氏、薬学臨床教育センター 稲垣喜裕学士、榎田葵学士、岡田雅弥学士、井上祥代学士をはじめとする薬学臨床教育センターの諸氏に感謝いたします。

最後に、長きにわたり様々な面で研究生活を支えてくれた家族ならびに友人たちに深く感謝いたします。

## 文 献

- 1 ) He, X.M., Carter, D.C. : Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, **358** : 209-215 (1992).
- 2 ) Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., Franks, N. : Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat. Struct. Biol.*, **5** : 827-835 (1998).
- 3 ) Bhattacharya, A.A., Grune, T., Curry, S. : Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.*, **303** : 721-732 (2000).
- 4 ) Carter, D.C., Ho, J.X. : Structure of serum albumin. *Adv. Protein. Chem.*, **45** : 153-203 (1994).
- 5 ) Sudlow, G., Birkett, D.J., Wade, D.N. : The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.*, **11** : 824-832 (1975).
- 6 ) Peters, T. Jr. "All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications", Academic Press, San Diego and London, 1996.
- 7 ) Chuang, V.T., Otagiri, M. : Stereoselective binding of human serum albumin. *Chirality*, **18** : 159-166 (2006).
- 8 ) Rege, B.D., Kao, J.P., Polli, J.E. : Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16** : 237-246 (2002).
- 9 ) Wandel, C., Kim, R.B., Stein, C.M. : "Inactive" excipients such as Cremophor can affect in vivo drug disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **73** : 394-396 (2003).
- 10) Tayrouz, Y., Ding, R., Burhenne, J., Riedel, K.D., Weiss, J., Hoppe-Tichy, T., Haefeli, W.E., Mikus, G. : Pharmacokinetic and pharmaceutic interaction between digoxin and Cremophor RH40. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **73** : 397-405 (2003).
- 11) Grindel, J.M., Jaworski, T., Emanuele, R.M., Culbreth P. : Pharmacokinetics



- of a novel surface-active agent, purified poloxamer 188, in rat, rabbit, dog and man. *Biopharm. Drug Dispos.*, **23** : 87-103 (2002).
- 12) Olsen, H., Andersen, A., Nordbø, A., Kongsgaard, U.E., Børner, O.P. : Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro. *BMC Clin. Pharmacol.*, **4** : 1-9 (2004).
  - 13) Fasco, M.J., Hildebrandt, E.F., Suttie, J.W. : Evidence that warfarin anticoagulant action involves two distinct reductase activities. *J. Biol. Chem.*, **257** : 11210-11212 (1982).
  - 14) O'Reilly, R.A., Aggeler, P.M., Leong, L.S. : Studies on the coumarin anticoagulant drugs: A comparison of the pharmacodynamics of dicumarol and warfarin in man. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **11** : 1-22 (1964).
  - 15) Yacobi, A., Levy, G. : Protein binding of warfarin enantiomers in serum of humans and rats. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **5** : 123-131 (1977).
  - 16) O'Reilly, R.A. : Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16** : 348-354 (1974).
  - 17) Burton, M.E., Shaw, L.M., Schentag, J.J., Evans, W.E. "Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics" 4th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2005, pp715-751.
  - 18) Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Twine, S., East, M., Curry, S. : Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J. Biol. Chem.*, **276** : 22804-22809 (2001).
  - 19) Sellers, E.M., Koch-Weser, J. : Interaction of warfarin stereoisomers with human albumin. *Pharmacol. Res. Commun.*, **7** : 331-336 (1975).
  - 20) Iwakawa, S., Spahn, H., Benet, L.Z., Lin, E.T. : Stereoselective binding of the glucuronide conjugates of carprofen enantiomers to human serum albumin. *Biochem. Pharmacol.*, **39** : 949-953 (1990).
  - 21) Lee, E.J., Williams, K., Day, R., Graham, G., Champion, D. : Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **19** : 669-674 (1985).
  - 22) Knadler, M.P., Brater, D.C., Hall, S.D. : Plasma protein binding of

- flurbiprofen: Enantioselectivity and influence of pathophysiological status. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249** : 378-385 (1989).
- 23) Cheruvallath, V.K., Riley, C.M., Narayanan, S.R., Lindenbaum, S., Perrin, J.H. : The effect of octanoic acid on the binding the enantiomers of ibuprofen and naproxen to human serum albumin: A chromatographic implication. *Pharm. Res.*, **13** : 173-178 (1996).
- 24) Mignot, I., Presle, N., Lapicque, F., Monot, C., Dropsy, R., Netter, P. : Albumin binding sites for etodolac enantiomers. *Chirality*, **8** : 271-280 (1996).
- 25) Fitos, I., Visy, J., Kardos, J. : Stereoselective kinetics of warfarin binding to human serum albumin: Effect of an allosteric interaction. *Chirality*, **14** : 442-448 (2002).
- 26) Jiang, X., Williams, K.M., Liauw, W.S., Ammit, A.J., Roufogalis, B.D., Duke, C.C., Day, R.O., McLachlan, A.J. : Effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **57** : 592-599 (2004).
- 27) Cochrane injuries group albumin reviewers. : Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomized controlled trials. *BMJ.*, **317** : 253-240 (1998).
- 28) Anraku, M., Tsurusaki, Y., Watanabe, H., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. : Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: octanoate and N-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1702** : 9-17 (2004).
- 29) Doody, M.C., Gotto, A.M.Jr., Smith, L.C. : 5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonic acid, a fluorescent probe of the medium chain fatty acid binding site of serum albumin. *Biochemistry*, **21** : 28-33 (1982).
- 30) Wells, P.S., Holbrook, A.M., Crowther, N.R., Hirsh, J. : Interactions of warfarin with drugs and food. *Ann. Intern. Med.*, **121** : 676-683 (1994).
- 31) Harder, S., Thurmann, P. : Clinically important drug interactions with anticoagulants. An update. *Clin. Pharmacokinet.*, **30** : 416-444 (1996).
- 32) Rettie, A.E., Korzekwa, K.R., Kunze, K.L., Lawrence, R.F., Eddy, A.C.,

- Aoyama, T., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J., Trager, W.F. : Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-450C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.*, **5** : 54-59 (1992).
- 33) Kaminsky, L.S., Zhang, Z.Y. : Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol. Ther.*, **73** : 67-74 (1997).
- 34) Leemann, T., Transon, C., Dayer, P. : Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci.*, **52** : 29-34 (1993).
- 35) Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M.J., Pfeifer, A., Castell, J. : Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem. Pharmacol.*, **58** : 787-796 (1999).
- 36) Weathermon, R., Crabb, D.W. : Alcohol and medication interactions. *Alcohol Res. Health*, **23** : 40-54 (1999).
- 37) Lieber C. S. "Medical Disorders of Alcoholism-Pathogenesis and Treatment" ed. by Lieber C. S., Saunders, Philadelphia, 1982, pp. 237-258.
- 38) Hamitouche, S., Poupon, J., Dreano, Y., Amet, Y., Lucas, D. : Ethanol oxidation into acetaldehyde by 16 recombinant human cytochrome P450 isoforms: role of CYP2C isoforms in human liver microsomes. *Toxicol. Lett.*, **167** : 221-230 (2006).
- 39) Busby, W.F.Jr., Ackermann, J.M., Crespi, C.L. : Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab. Dispos.*, **27** : 246-249 (1999).
- 40) Borgå, O., Borgå, B. : Serum protein binding of nonsteroidal antiinflammatory drugs: A comparative study. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **25** : 63-77 (1997).
- 41) Wilting, J., van der Giesen, W.F., Janssen, L.H., Weideman, M.M., Otagiri, M., Perrin, J.H. : The effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin. The dependence of the binding of warfarin to human serum albumin on the hydrogen, calcium, and chloride ion concentrations as

- studied by circular dichroism, fluorescence, and equilibrium dialysis. *J. Biol. Chem.*, **255** : 3032-3037 (1980).
- 42) Otagiri, M., Otagiri, Y., Perrin, J.H. : Some fluorescent investigations of the interaction between the enantiomers of warfarin and human serum albumin. *Int. J. Pharm.*, **2** : 283-294 (1979).
- 43) Wright, J.D., Boudinot, F.D., Ujhelyi, M.R. : Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin. Pharmacokinet.*, **30** : 445-462 (1996).
- 44) Takahashi, H., Kashima, T., Nomizo, Y., Muramoto, N., Shimizu, T., Nasu, K., Kubota, T., Kimura, S., Echizen, H. : Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different CYP2C9 and CYP2C19 genotypes. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **63** : 519-528 (1998).
- 45) Shimizu, S., Yasui, K., Tani, Y. and Yamada, H. : Acyl-CoA oxidase from *Candida tropicalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91** : 108-113 (1979).
- 46) Taira, Z., Terada, H. : Specific and non-specific ligand binding to serum albumin. *Biochem. Pharmacol.*, **34** : 1999-2005 (1985).
- 47) Wright, J.D., Boudinot, F.D., Ujhelyi, M.R. : Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin. Pharmacokinet.*, **30** : 445-462 (1996).
- 48) Iwakawa, S., Miyashita, K., Hashimoto, Y., Kuroda, T. : Effect of glimepiride and glibenclamide on *S*-warfarin 7-hydroxylation by human liver microsomes, recombinant human CYP2C9.1 and CYP2C9.3. *Biol. Pharm. Bull.*, **29** : 1983-1985 (2006).
- 49) Kaphalia, L., Kaphalia, B.S., Kumar, S., Kanz, M.F., Treinen-Moslen, M. : Efficient high performance liquid chromatograph/ultraviolet method for determination of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in rat serum. *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **830** : 231-237 (2006).
- 50) Herskovits, T.T., Gadegbeku, B., Jailliet, H. : On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *J. Biol. Chem.*, **245** : 2588-2598 (1970).
- 51) Dixon, M. : The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J.*, **55** : 170-171 (1953).

- 52) Vorum, H., Honoré, B. : Influence of fatty acids on the binding of warfarin and phenprocoumon to human serum albumin with relation to anticoagulant therapy. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48** : 870-875 (1996).
- 53) Birkett, D.J., Myers, S.P. Sudlow, G. : Effects of fatty acids on two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.*, **13** : 987-992 (1977).
- 54) Nilsen, O.G., Storstein, L., Jacobsen, S. : Effect of heparin and fatty acids on the binding of quinidine and warfarin in plasma. *Biochem. Pharmacol.*, **26** : 229-235 (1977).
- 55) Wilding, G., Feldhoff, R.C., Vesell, E.S. : Concentration-dependent effects of fatty acids on warfarin binding to albumin. *Biochem. Pharmacol.*, **26** : 1143-1146 (1977).
- 56) Wosilait, W.D., Ryan, M.P. : The effects of oleic acid, tolbutamide, and oxyphenbutazone on the binding of warfarin by human serum albumin. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **25** : 577-586 (1979).
- 57) Otagiri, M. : A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20** : 309-323 (2005).
- 58) O'Reilly, R.A. : Interaction of several coumarin compounds with human and canine plasma albumin. *Mol. Pharmacol.*, **7** : 209-218 (1971).
- 59) Diana, F.J., Veronich, K., Kapoor, A.L. : binding of nonsteroidal anti-inflammatory agents and their effect on binding of racemic warfarin and its enantiomers to human serum albumin. *J. Pharm. Sci.*, **78** : 195-199 (1989).
- 60) Veronich, K., White, G., Kapoor, A. : Effect of phenylbutazone, tolbutamide, and colfibric acid on binding of racemic warfarin and its enantiomers to human serum albumin. *J. Pharm. Sci.*, **68** : 1515-1520 (1979).
- 61) Lin, S.Y., Wei, Y.S., Li, M.J., Wang, S.L. : Effect of ethanol or/and captopril on the secondary structure of human serum albumin before and after protein binding. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57** : 457-464 (2004).
- 62) Lubas, B., Soltysik-Rasek, M., Leśniewska, I. : Proton nuclear resonance study of the association of monovalent and divalent alcohols with bovine

- serum albumin. *Biochemistry*, **18** : 4943-4951 (1979).
- 63) Rosenberg, R.M., Rogers, D.W., Haebig, J.E., Steck, T.L. : The interaction of serum albumin with ethanol. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97** : 433-441 (1962).
- 64) Ostrovsky, Yu.M., Stepuro, I.I., Artsukevich, A.N., Zavodnik, I.B., Konovalova, N.V., Lapshina, E.A. : Interaction of ethanol with blood proteins. *Alcohol Alcohol.*, *Suppl.* **1** : 283-287 (1987).
- 65) Gorinstein, S., Caspi, A., Goshev, I., Moncheva, S., Zemser, M., Weisz, M., Libman, I., Lerner, H.T., Trakhtenberg, S., Martín-Belloso, O. : Beer consumption and changes in stability of human serum proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **49** : 1441-1445 (2001).
- 66) Gorinstein, S., Caspi, A., Rosen, A., Goshev, I., Zemser, M., Weisz, M., Añon, M.C., Libman, I., Lerner, H.T., Trakhtenberg, S. : Structure characterization of human serum proteins in solution and dry state. *J. Peptide Res.*, **59** : 71-78 (2002).
- 67) Avdulov, N.A., Chochina, S.V., Daragan, V.A., Schroeder, F., Mayo, K.H., Wood, W.G. : Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: A fluorescent and <sup>13</sup>C NMR multiplet relaxation study. *Biochemistry*, **35** : 340-347 (1996).
- 68) Ha, C.E., Petersen, C.E., Park, D.S., Harohalli, K., Bhagavan, N.V. : Investigations of the effects of ethanol on warfarin binding to human serum albumin. *J. Biomed. Sci.*, **7** : 114-121 (2000).
- 79) Birkett, D.J., Myers, S.P., Sudlow, G. : The fatty acid content and drug binding characteristics of commercial albumin preparations. *Clin. Chim. Acta.*, **85** : 253-258 (1978).
- 70) Noctor, T.A., Wainer, I.W., Hage, D.S. : Allosteric and competitive displacement of drugs from human serum albumin by octanoic acid, and revealed by high-performance liquid affinity chromatography, on a human serum albumin-based stationary phase. *J. Chromatogr.*, **577** : 305-315 (1992).
- 71) Zatón, A.M., Ferrer, J.M., Ruiz de Gordo, J.C., Marquínez, M.A. : Binding of coumarins to site I of human serum albumin: Effect of the fatty acids. *Chem. Biol. Interact.*, **97** : 169-174 (1995).

- 72) Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinković, D., Jhoti, H. : Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*, **424** : 464-468 (2003).
- 73) Seifert, A., Tatzel, S., Schmid, R.D., Pleiss, J. : Multiple molecular dynamics simulations of human p450 monooxygenase CYP2C9: the molecular basis of substrate binding and regioselectivity toward warfarin. *Proteins*, **64** : 147-155 (2006).
- 74) Tang, C., Shou, M., Rodrigues, A.D. : Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) activity. *Drug Metab. Dispos.*, **28** : 567-572 (2000).
- 75) Yang, F., Bian, C., Zhu, L., Zhao, G., Huang, Z., Huang, M. : Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J. Struct. Biol.*, **157** : 348–355 (2007).
- 76) Tsuda, Y., Tsunoil, T., Watanabe, N., Ishida, M., Yamada, H., Itoh, T. : Stereoselective binding and degradation of sulbenicillin in the presence of human serum albumin. *Chirality*, **13** : 236–243 (2001).
- 77) Williams, A.M., Dickinson, R.G. : Studies on the reactivity of acyl glucuronides—VI. Modulation of reversible and covalent interaction of diflunisal acyl glucuronide and its isomers with human plasma protein in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, **47** : 457–467 (1994).
- 78) Means, G.E., Bender, M.L. : Acetylation of human serum albumin by *p*-nitrophenyl acetate. *Biochemistry*, **14** : 4989–4994 (1975).
- 79) Ikeda, K., Kurono, Y., Ozeki, Y., Yotsuyanagi, T. : Effects of drug bindings on esterase activity of human serum albumin. Dissociation constants of the complexes between the protein and drugs such as N-arylanthranilic acids, coumarin derivatives and prostaglandins. *Chem. Pharm. Bull.*, **27** : 80-87 (1979).
- 80) Watanabe, H., Tanase, S., Nakajou, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. : Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem. J.*, **349** : 813–819 (2000).

- 81) Lockridge, O., Xue, W., Gaydess, A., Grigoryan, H., Ding, S.J., Schopfer, L.M., Hinrichs, S.H., Masson, P. : Pseudo-esterase activity of human albumin: slow turnover on tyrosine 411 and stable acetylation of 82 residues including 59 lysines. *J. Biol. Chem.*, **283** : 22582–22590 (2008).
- 82) Kurono, Y., Kushida, I., Tanaka, H., Ikeda, K. : Esterase-like activity of human serum albumin. VIII. Reaction with amino acid *p*-nitrophenyl esters. *Chem. Pharm. Bull.*, **40** : 2169–2172 (1992).
- 83) Georges, H., Presle, N., Buronfosse, T., Fournel-Gigleux, S., Netter, P., Magdalou, J., Lapique, F. : In vitro stereoselective degradation of carprofen glucuronide by human serum albumin. Characterization of sites and reactive amino acids. *Chirality*, **12** : 53–62 (2000).
- 84) Ma, S.F., Anraku, M., Iwao, Y., Yamasaki, K., Kragh-Hansen, U., Yamaotsu, N., Hirono, S., Ikeda, K., Otagiri, M. : Hydrolysis of angiotensin II receptor blocker prodrug olmesartan medoxomil by human serum albumin and identification of its catalytic active sites. *Drug Metab. Dispos.*, **33** : 1911-1919 (2005).
- 85) Kragh-Hansen U., Chuang V.T., Otagiri M. : Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, **25** : 695-704 (2002).
- 86) Aarons, L., Clifton, P., Fleming, G., Rowland, M. : Aspirin binding and the effect of albumin on spontaneous and enzyme-catalysed hydrolysis. *J. Pharm. Pharmacol.*, **32** : 537–543 (1980).
- 87) Frahm, G.E., Smith, D.G., Kane, A., Lorbetskie, B., Cyr, T.D., Girard, M., Johnston, M.J. : Determination of supplier-to-supplier and lot-to-lot variability in glycation of recombinant human serum albumin expressed in *Oryza sativa*. *PLoS ONE*, **9** : e109893 (2014).
- 88) Chapuis, N., Brühlmann, C., Reist, M., Carrupt, P.A., Mayer, J.M., Testa, B. : The esterase-like activity of serum albumin may be due to cholinesterase contamination. *Pharm. Res.*, **18** : 1435–1439 (2001).
- 89) Fogel, J., Epstein, P., Chen, P. : Simultaneous high-performance liquid



- chromatography assay of acetylsalicylic acid and salicylic acid in film-coated aspirin tablets. *J. Chromatogr.*, **317** : 507-511 (1984).
- 90) Bahar, F.G., Imai, T. : Aspirin hydrolysis in human and experimental animal plasma and the effect of metal cations on hydrolase activities. *Drug Metab. Dispos.*, **41** : 1450-1456 (2013).
- 91) Ishizuka, T., Fujimori, I., Nishida, A., Sakurai, H., Yoshigae, Y., Nakahara, K., Kurihara, A., Ikeda, T., Izumi, T. : Paraoxonase 1 as a major bioactivating hydrolase for olmesartan medoxomil in human blood circulation: molecular identification and contribution to plasma metabolism. *Drug Metab. Dispos.*, **40** : 374-380 (2012).
- 92) de Loor, H., Meijers, B.K., Meyer, T.W., Bammens, B., Verbeke, K., Dehaen, W., Evenepoel, P. : Sodium octanoate to reverse indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate albumin binding in uremic and normal serum during sample preparation followed by fluorescence liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216** : 4684-4688 (2009).
- 93) Banoglu, E., King, R.S. Sulfation of indoxyl by human and rat aryl (phenol) sulfotransferases to form indoxyl sulfate. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **27** : 135-140 (2002).
- 94) Martínez, E., Artigas, F., Suñol, C., Tusell, J.M., Gelpí, E. : Liquid-chromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in human plasma. *Clin. Chem.*, **29** : 1354-1357 (1983).
- 95) Kelen, M., Demiralay, E.C., Sen, S., Ozkan, G. : Separation of abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid in 99 R (*Vitis berlandieri*×*Vitis rupestris*) and rose oil (*Rosa damascena* Mill.) by reversed phase liquid chromatography. *Turk. J. Chem.*, **28** : 603-610 (2004).
- 96) Takabayashi, K., Imada, T., Saito, Y., Inada, Y. : Coupling between fatty acid binding and sulfhydryl oxidation in bovine serum albumin. *Eur. J. Biochem.*, **136** : 291-295 (1983).
- 97) Kouzuma, T., Uemastu, Y., Usami, T., Imamura, S. : Study of glycated amino

- acid elimination reaction for an improved enzymatic glycated albumin measurement method. *Clin. Chim. Acta.*, **346** : 135-143 (2004).
- 98) Curry, S., Brick, P., Franks, N.P. : Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1441** : 131-140 (1999).
- 99) Bojko, B., Sułkowska, A., Maciazek, M., Równicka, J., Njau, F., Sułkowski, W.W. Changes of serum albumin affinity for aspirin induced by fatty acid. *Int. J. Biol. Macromol.*, **42** : 314-323 (2008).
- 100) Phuangswai, O., Hannongbua, S., Gleeson, M.P. : Elucidating the origin of the esterase activity of human serum albumin using QM/MM calculations. *J. Phys. Chem. B*, **118** : 11886-11894 (2014).
- 101) Díaz, N., Suárez, D., Sordo, T.L., Merz, K.M. : Molecular dynamics study of the IIA binding site in human serum albumin: influence of the protonation state of Lys195 and Lys199. *J. Med. Chem.*, **44** : 250-260 (2001).
- 102) Lee, S., Johnson, D., Klein, J., Eppler, J. : Protein binding of acetylsalicylic acid and salicylic acid in porcine and human serum. *Vet. Hum. Toxicol.*, **37** : 224-225 (1995).
- 103) Kragh-Hansen, U. : Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol. Rev.*, **33** : 17-53 (1981).
- 104) Honoré, B., Brodersen, R. : Albumin binding of anti-inflammatory drugs. Utility of a site-oriented versus a stoichiometric analysis. *Mol. Pharmacol.*, **25** : 137-150 (1984).
- 105) Sakurai, Y., Ma, S.F., Watanabe, H., Yamaotsu, N., Hirono, S., Kurono, Y., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. : Esterase-like activity of serum albumin: characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. *Pharm. Res.*, **21** : 285-292 (2004).
- 106) Kragh-Hansen, U. : Molecular and practical aspects of the enzymatic properties of human serum albumin and of albumin-ligand complexes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1830** : 5535-5544 (2013).
- 107) Sakai, T., Maruyama, T., Imamura, H., Shimada, H., Otagiri, M. :

- Mechanism of stereoselective serum binding of ketoprofen after hemodialysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278** : 786–792 (1996).
- 108) Anraku, M., Yamasaki, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. : Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm. Res.*, **18** : 632–639 (2001).
- 109) Minami, T., Terada, T., Takahashi, T., Arikawa, H., Matsuyama, Y., Kizaki, K., Era, S. : Comparative studies on the heterogeneity of plasmaderived and recombinant human albumins in laboratory use. *Int. J. Biol. Macromol.*, **69** : 79–87 (2014).
- 110) Nakajou, K., Watanabe, H., Kragh-Hansen, U., Maruyama, T., Otagiri, M. : The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1623** : 88–97 (2003).
- 111) Mereish, K.A., Rosenberg, H., Cobby, J. : Glucosylated albumin and its influence on salicylate binding. *J. Pharm. Sci.*, **71** : 235–238 (1982).
- 112) Tsuchiya, S., Sakurai, T., Sekiguchi, S. : Nonenzymatic glucosylation of human serum albumin and its influence on binding capacity of sulfonylureas. *Biochem. Pharmacol.*, **33** : 2967–2971 (1984).
- 113) Wörner, W., Preissner, A., Rietbrock, N. : Drug–protein binding kinetics in patients with type I diabetes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **43** : 97–100 (1992).
- 114) Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Bourdon, E., Rondeau, P. : Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin. *Biochimie*, **94** : 1960–1967 (2012).
- 115) Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M., Thornalley, P.J. : Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J. Biol. Chem.*, **280** : 5724–5732 (2005).
- 116) Putnam, F.W. : Electrophoretic and structural characterization of genetic variants of human serum albumin. *生物物理化学*, **36** : 3–19 (1992).
- 117) Mizuma, T., Komori, M., Ueno, M., Horikoshi, I. : Sulphate conjugation

enhances reversible binding of drug to human serum albumin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **43** : 446-448 (1991).

- 118) Belinskaia, D.A., Taborskaya, K.I., Avdomin, P.V., Goncharov, N.V. : Modulation of the albumin – paraoxon interaction sites by fatty acids: analysis by the molecular modeling methods. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **43** : 359–367 (2017).