

—総説—

肝臓由来の薬物水解酵素の精製と諸性質の検討

杉山 正^{a)*}、片桐義博^{a)}、白井茂之^{b)}、平野和行^{b)}

要約: ラット、ブタ、ヒトの肝臓からカルボキシルエステラーゼを精製し、その基質特異性などの諸性質を検討した。ラットからは carboxylesterase pI 6.0 と carboxylesterase pI 6.2、ブタからはインドメタシン水解酵素、ヒトからは carboxylesterase pI 5.3 と carboxylesterase pI 4.5 を得た。これらの酵素のうちラット由来の carboxylesterase pI 6.2 のみがブランルカストに対して水解活性を示し、この基質特異性の差がヒトとラットでのブランルカストの代謝経路の違いの原因であると考えられた。ブタ由来のインドメタシン水解酵素は、カルボキシルエステラーゼの一般的な基質である α -naphthyl acetate に対して水解活性を示さず、アミノ酸配列の解析から新規の酵素であると考えられた。ヒト由来の 2 種類のカルボキシルエステラーゼの基質特異性は大きく異なっていた。これらの結果は、カルボキシルエステラーゼの種差および基質特異性の情報はエステル型およびアミド型薬物の代謝を理解する上で重要であることを示している。なお、本研究では基質特異性の検討を簡便かつ短時間に行うために HPLC での移動相の簡便な選択法の開発を行った。

索引用語: カルボキシルエステラーゼ、基質特異性、種差、分子種、薬物代謝、高速液体クロマトグラフ法

Purification and Characterization of Drug Hydrolyzing Enzymes from the Liver

Tadashi SUGIYAMA^{a)*}, Yoshihiro KATAGIRI^{a)}, Shigeyuki USUI^{b)}, Kazuyuki HIRANO^{b)}

Abstract: Carboxylesterases designated as carboxylesterase pI 6.0 and pI 6.2, indomethacin hydrolyzing enzyme, and carboxylesterase pI 5.3 and pI 4.5 from the livers of rat, pig, and human, respectively, were purified to electrophoretic homogeneity by several stages of column chromatography. Some properties, especially the substrate specificity, of these esterases were clarified. Pranlukast was effectively hydrolyzed by carboxylesterase pI 6.2 from rat but not by another esterases, suggesting that the substrate specificity of carboxylesterases from rat and human reflects the difference in pranlukast metabolism between the two species. Indomethacin hydrolyzing enzyme from pig exhibited no catalytic activity for α -naphthylacetate, which is a typical substrate of carboxylesterases. Amino acid sequence analysis of this hydrolyzing enzyme revealed it to be a novel esterase. The substrate specificity of carboxylesterase pI 5.3 and pI 4.5 from human was observed to be quite different. These results imply that the differences in the substrate specificity of carboxylesterases between species is helpful to understand the metabolism of ester- and amide-type drugs. In this study, a convenient method was developed to select the mobile phase to separate drugs commonly used in clinical therapy, using high-performance liquid chromatography (HPLC), and applied to assay for the substrate specificity of carboxylesterases. Using this method, the time required for not only the setting of HPLC conditions, but also the analysis was shortened.

Keyphrases: carboxylesterase, substrate specificity, species specificity, isozyme, drug metabolism, HPLC

緒言

近年、薬物代謝酵素に関する研究は、cytochrome P450 を中心に幅広く進められており、代謝酵素のアイソザイ

ムを単離して基質特異性などの諸性質の解明が行われている。これらの研究の成果は、臨床においては薬物の代謝経路の解明、薬物間相互作用のメカニズムの解明、あるいは薬物間相互作用の予測に利用され、薬物の適正使

a) 岐阜大学医学部附属病院薬剤部 (〒500-8705 岐阜市司町 40)

Department of Pharmacy, Gifu University Hospital (40, Tsukasa-machi, Gifu 500-8705, JAPAN)

b) 岐阜薬科大学薬剤学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5 丁目 6-1)

Laboratory of Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University (5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

用に貢献している。カルボキシルエステラーゼは、cytochrome P450と同様に薬物代謝に大きく関与している酵素であり、カルボキシルエステル結合、アミド結合、あるいはチオエステル結合の加水分解を触媒する^{1,3)}。

カルボキシルエステラーゼは動物の組織に広く分布し^{4,6)}、特に肝臓のミクロソームに多く存在する。これらのカルボキシルエステラーゼは、多くの哺乳類ではさまざまな内因性物質および外因性化合物の加水分解を行い、薬物代謝においてはプロドラッグの活性化に関与しており^{7,8)}、更に、薬物の解毒反応、あるいはアシル Co-A の加水分解などの脂質の代謝に重要な役割を担っている⁹⁾。

一般に、カルボキシルエステラーゼの基質特異性は広いと考えられており、動物間の種差、あるいは個々のアイソザイムについての基質特異性の差異については十分に検討されていない。最近、ロイコトリエン受容体拮抗剤のプラナルカストは、ヒトとラットで代謝経路が異なることが報告されており¹⁰⁾、その原因としてラットに存在するカルボキシルエステラーゼのみがプラナルカストを基質とするためであると推定されている。このことは、カルボキシルエステラーゼにも種差、あるいはアイソザイム間での基質特異性の差異が存在し、その差異が臨床的に重要であることを示している。したがって、カルボキシルエステラーゼに関しても、各種動物からアイソザイムを単離して基質特異性などの諸性質を解明することは、ヒトでの薬物の代謝および毒性を予想する上で重要な情報となると考えられる¹¹⁾。

そこで本研究では、ラット肝臓からプラナルカストのアミド結合水解酵素の分離精製を行い、その基質特異性などの酵素学的性質について検討した。また、プラナルカストと同様にアミド結合を有する薬物としてインドメタシンを対象とし、ブタ肝臓からインドメタシンのアミド水解酵素の分離精製を行い、基質特異性などについて検討した。さらに、ヒト肝臓からはカルボキシルエステラーゼの一般的な合成基質である α -naphthyl acetate の水解活性を指標に 2 種類のカルボキシルエステラーゼを分離精製し、その基質特異性などについて検討した。これらの結果に基づき、カルボキシルエステラーゼの種差および基質特異性の差異について総合的に考察を行った。

本研究ではカルボキシルエステラーゼの基質特異性の検討に多種類の薬物を定量する必要がある。薬物を定量する方法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が繁用されており、本研究においても HPLC を用いることとした。HPLC では対象とする薬物毎に分析条件の設定を行う必要があり、通常は文献など既知の資料から測定条件が参照できる。しかし、多種類の薬物の定量が必要な場合には、薬物毎に移動相の成分、分離カラムなどの分析条件が異なると分析に膨大な時間が必要になる。そ

こで、本研究では、主題であるカルボキシルエステラーゼに関する研究の前段階として、多種類の薬物の HPLC 測定を効率よく定量するための分離条件の簡便な設定法を検討した。

実 験

1. 実験材料

試薬及び材料：Sephadex G-150、PBE 94、Q-Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose、Blue-Sepharose、Polybuffer 74、Con A-Sepharose は Pharmacia 社から、Red-Sepharose はクラボウから、DEAE-cellulose、phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) はシグマ社から購入した。*p*-ヒドロキシ安息香酸 (BA)、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル (MP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル (EP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-プロピル (PP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-ブチル (BP) は和光純薬から、 α -naphthyl acetate、*p*-nitrophenyl acetate は和光純薬から、bis (*p*-nitrophenyl) phosphate (BNPP)、4-amino-antipyrine、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、ルブロールはナカライテスクから購入した。プラナルカストの原末は小野薬品工業(株)から、インドメタシンの原末は住友製薬(株)から、アニラセタムの原末は富山化学(株)から提供を受けた。その他の医薬品の原末は各製薬会社から提供を受けた、あるいは和光純薬から購入した。他の試薬は全て特級あるいはクロマトグラフィー用を用いた。

動物：Sprague-Dawley 雄性ラット (8 週令) は日本 SLC 社から購入した。

HPLC 装置：HPLC 装置は島津(株)の製品を用いた。システムは、2 機のポンプ (LC-10AD)、グラジエントミキサー (FCV-10AL)、カラムオープン (CTO-10A)、自動インジェクター (SIL-10A XL)、UV 検出器 (SPD-10A)、データ処理装置 (Chromatopac C-R10AX) から構成した。分離カラムは octadecyl-silica (ODS) を担体とした Cosmosil 5C18-MS (4.6 × 250 mm ID., 10 mm, ナカライテスク) を用いた。

2. HPLC による薬物分析における移動相の簡便な設定法の検討

分析条件：10 mM リン酸緩衝液 (pH 4.2) とアセトニトリルの混合液 (以下、M4.2)、あるいは 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) とアセトニトリルの混合液 (以下、M2.5) の 2 種類の移動相を用いた。流速は 1.5 mL/min、カラム温度は 50℃ とした。検出波長は各薬物毎に最適な波長を用いた。各薬物の測定は、分析中に移動相の配合比を変化させないアイソクラティック測定で行うこととした。アイソクラティック測定における移動相中の配合比を設定

するために、以下に示したプログラムによるグラジエント測定を行った。

グラジエントプログラム：移動相中のアセトニトリルの比率を、0~2分は0%、2~9.5分は0%~75%の直線的グラジエント、9.5~15分は75%として測定した。

3. ラット肝臓由来のブランルカスト水解酵素に関する検討

ラット肝臓からの carboxylesterase pl 6.0 および carboxylesterase pl 6.2 の精製：すべての精製過程は4℃の条件下で行った。新鮮なラット肝臓の重量を測定し、氷冷した4倍量の1.15% KClを加えてホモジナイザーを用いてホモジナイズした。9,000×gで20分間遠心した後、上清をさらに105,000×gで一時間超遠心した。沈殿したミクロソーム画分をpH 8.0の10 mM Tris-HCl 緩衝液に懸濁させ、同緩衝液で一晩透析を行った。

透析液をさらに105,000×gで一時間超遠心し、得られた上清を30~70%の硫酸アンモニウム液で硫酸分画した。残渣をpH 8.0の10 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解し、同緩衝液を用いて十分に透析した。得られた酵素をpH 8.0の10 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose カラム (2.2×15.0 cm) に添加し、カラムを同緩衝液で十分に洗浄した後に、酵素を塩化ナトリウムの直線的グラジエント (0~0.4 M) により溶出した。エステラーゼ活性のある画分を分取し、0.1 M 塩化ナトリウムと0.02%のアジ化ナトリウムを含むpH 7.0の25 mM リン酸緩衝液で平衡化した Sephadex G-150 カラム (3.0×66.0 cm) に添加してゲルろ過を行った。活性画分をpH 7.4の25 mM イミダゾール-塩酸緩衝液で平衡化したクロマトフォーカシングゲル PBE 94 カラム (1.0×10.6 cm) に添加し、Polybuffer 74-HCl による直線的グラジエント (pH 7.4~4.0) により溶出した。活性画分を集め、0.2 M 塩化ナトリウムと0.02%のアジ化ナトリウムを含むpH 7.0の50 mM リン酸緩衝液で透析した。

α-Naphthyl acetate の水解活性の測定：1.3 mM のα-naphthyl acetate、2 mM の4-aminoantipyrine、0.05%のTriton X-100を含むpH 8.0の50 mM Tris-HCl 緩衝液を基質溶液とした。10 μLの酵素溶液を2 mLの基質溶液に加え、37℃で10分間インキュベートした後、反応液に3 mM のフェリシアン化カリウムおよび130 mM のホウ酸を含むpH 7.5の50 mM Tris-HCl 緩衝液を2 mL 加えて反応を停止させた。酵素活性は反応液の500 nmにおける吸光度を測定して計算した。1分間に1 mmolのα-naphtholを生成する酵素量を1 unitとした¹²⁾。

p-Nitrophenyl acetate の水解活性の測定：1 mM のp-nitrophenyl acetateを含むpH 8.0の0.1 M Tris-HCl 緩衝液を基質溶液とした。10 μLの酵素溶液を2 mLの基質溶液

に加えて、30℃でインキュベートした。p-nitrophenyl acetate の加水分解の反応速度は、反応液の405 nmにおける吸光度を測定して求めた^{13,14)}。1分間に1 mmolのp-nitrophenolを生成する酵素量を1 unitとした。

ブランルカストの加水分解：ブランルカストの水解活性は、HPLC法によって求めた。27 μMのブランルカストを含むpH 7.4の26 mM リン酸緩衝液を基質溶液とした。50 μLの酵素溶液を150 μLの基質溶液に加えて37℃で30分間インキュベートした。内部標準物質として5 mmのp-ヒドロキシ安息香酸n-ブチルを溶解した2 mLのアセトニトリルを反応液に加えて反応を停止させ、1,200 rpmで10分間遠心した。上清50 μLをHPLCに注入して、ブランルカストおよびその水解代謝物の含量を測定し代謝活性を算出した。30分間に1 μmolのブランルカストを加水分解する酵素量を1 unitとした。

カルボキシルエステラーゼによる薬物の加水分解：精製酵素と各種薬物をpH 7.4の20 mM リン酸緩衝液中で37℃にて30~60分間反応を行い、反応液にアセトニトリルを加えて酵素反応を停止した。1,200 rpmで10分間遠心した後、上清50 mLをHPLCに注入して薬物およびその代謝物の含量を測定し代謝活性を算出した。

タンパク量の測定法：タンパク量は280 nmにおける吸光度を測定して算出した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)：SDS-PAGEはLaemmli¹⁵⁾の方法に従い、9.0%-ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。タンパクの染色はクマシーブリリアントブルー R-250を用いて行った。

N-末端アミノ酸配列の解析：精製酵素100 μgを精製水で透析した後に凍結乾燥し、70%のギ酸中でシアン化プロマイドと室温にて24時間反応させペプチドの断片化を行った。反応混液に10倍量の精製水を加えて凍結乾燥した¹⁶⁾。残渣を0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解し、逆相 HPLC により断片化したペプチドの分離を行った。カラムは親和化学 ULTRON 300-C4 (4.6 mm I.D. × 150 mm) を使用し、溶出は0.1% トリフルオロ酢酸存在下0~60%のアセトニトリルの直線的グラジエントにより行った。ペプチドの検出は210 nmの吸光度で行った。得られたペプチドのN-末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー (model 473A, Applied Biosystems) を用いて解析した。

4. ブタ肝臓由来のインドメタシン水解酵素に関する検討

ブタ肝臓からのインドメタシン水解酵素の精製：すべての精製過程は4℃の条件下で行った。ブタ肝臓は屠殺直後に摘出した新鮮な肝臓を入手して用いた。ブタ肝臓50 gに氷冷した4倍量の1.15% KClを加えてホモジナイ

ザーを用いてホモジナイズした。9,000×g で 20 分間遠心した後、上清をさらに 105,000×g で一時間超遠心した。沈殿したミクロソーム画分を pH 7.4 の 20 mM Tris-HCl 緩衝液 40 mL に懸濁させた後、2% (w/v) のルブロールを最終濃度が 0.4% になるように攪拌しながら少量ずつ加え、一晚攪拌して可溶化を行った。105,000×g で 60 分間超遠心した後に、上清を pH 7.4 の 20 mM Tris-HCl 緩衝液に対して十分に透析を行った。

得られた粗酵素を pH 7.4 の 20 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Q-Sepharose Fast Flow カラム (1.7×7.0 cm) に添加し、カラムを同緩衝液で十分に洗浄した後に、酵素を塩化ナトリウムの直線的グラジエント (0–0.5 M) により溶出させた。インドメタシン水解活性のある画分を分取し、pH 7.4 の 20 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した Red-Sepharose カラム (0.8×4.0 cm) に添加した。素通り画分を同緩衝液で平衡化した Blue-Sepharose カラム (2.5×1.7 cm) に添加して pH 7.4 の 20 mM Tris-HCl 緩衝液で十分に洗浄した。さらに 0.5 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で洗浄した後に 2.0 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出した。活性画分を集め、pH 7.4 の 20 mM Tris-HCl 緩衝液に対して透析しインドメタシン水解酵素の精製酵素とした。

ブタ肝臓からのカルボキシルエステラーゼの精製：前項のブタ肝臓からのインドメタシン水解酵素の精製過程において Q-Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィーで溶出されたエステラーゼ活性画分について、クロマトフォーカシングゲル PBE94 による等電点カラムクロマトグラフィー、および Sephadex G-150 によるゲルろ過を行い、カルボキシルエステラーゼの精製酵素とした。

インドメタシン水解活性の測定法：酵素溶液 90 μL と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 100 μL を 37℃ にて 5 分間プレインキュベーションした後、500 μM のインドメタシンを 10 μL 加え 37℃ で 60 分間反応を行った。内部標準物質として 0.555 mM の *p*-ヒドロキシ安息香酸 *n*-プロピルを含むメタノール溶液 2 mL を加えて反応を停止させた後、1,200 rpm で 10 分間遠心した。上清を減圧乾固し、その残渣を HPLC の移動相 200 μL に溶解後、その 50 μL を HPLC 分析に供した。インドメタシンおよびインドメタシンの水解代謝物である *p*-クロロ安息香酸の含量を測定し代謝活性を算出した。1 分間に 1 nmol の *p*-クロロ安息香酸を産生する酵素量を 1 unit とした。

抗インドメタシン水解酵素抗体の作製：約 100 μg の精製酵素を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を同量の Freund コンプリートアジュバンドに乳濁させ、メス白色家兎の四肢の爪の下に皮下注射した。その後 10 日ごとに同様に背中皮下に 3 回免疫を行った。兎頸動脈から採取した血液を 10,000×g で 10 分間遠心して得られた抗血清

に同量の PBS を加え、56℃ にて 30 分間加温して補体の非働化を行った後、33% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。10,000×g で 10 分間遠心して得られた沈殿を少量の PBS に溶解後に PBS に対して透析し、ウサギ抗ブタ肝臓インドメタシン水解酵素抗体とした。

5. ヒト肝臓由来のカルボキシルエステラーゼの薬物水解作用に関する検討

ヒト肝臓からの carboxylesterase pI 5.3 および carboxylesterase pI 4.5 の精製：すべての精製過程は 4℃ の条件下で行った。肝組織は愛知ガンセンターの病理部で剖検時に摘出したものを使用まで -80℃ で冷凍保存して用いた。

ヒトの肝臓 64 g を 260 mL のリン酸緩衝液に入れ、Polytron を用いてホモジナイズした。105,000×g で一時間超遠心した後、上清を 0.02% のアジ化ナトリウムを含む pH 8.0 の 10 mM リン酸緩衝液で透析し、同じ緩衝液で平衡化した Q-Sepharose カラム (2.0×22.5 cm) に添加した。カラムを同じ緩衝液で十分に洗浄した後に、酵素を塩化ナトリウムの直線的グラジエント (0–0.5 M) により溶出した。

エステラーゼ活性を示す最初のピーク (pI 5.3) を濃縮し、0.1 M 塩化ナトリウムと 0.02% のアジ化ナトリウムを含む pH 7.0 の 25 mM リン酸緩衝液で平衡化した Sephadex G-150 カラム (3.0×71.0 cm) に添加してゲルろ過を行った。さらに、酵素を pH 7.4 の 25 mM イミダゾール塩酸緩衝液で平衡化したクロマトフォーカシングゲル PBE 94 カラム (1.0×10.6 cm) に添加し、Polybuffer 74-HCl による直線的グラジエント (pH 7.4–4.0) により溶出した。活性画分 (pI 5.3) を集めて濃縮し、0.2 M 塩化ナトリウムと 0.02% のアジ化ナトリウムを含む pH 7.0 の 50 mM リン酸緩衝液で平衡化した Con A-Sepharose カラム (1.3×10.5 cm) に添加した。0.2 M α -methyl-D-mannopyranoside を含む同緩衝液で酵素を溶出した。Q-Sepharose カラムからの溶出でエステラーゼ活性を示した 2 番目のピーク (pI 4.5) を濃縮し、同様の条件で Con A-Sepharose カラムと Sephadex G-150 カラムを用いて精製した。得られた酵素をメンブランフィルター (YM-10) を用いて濃縮し、精製酵素とした。精製酵素は、使用するまでは 4℃ で保存した。

抗体の作成： Freund コンプリートアジュバンドに乳濁した carboxylesterase pI 5.3 をメス白色家兎の四肢の爪の下に皮下注射した後、2 週間経時的に免疫を繰り返した。最初の免疫の 6 週後に家兎動脈から採取した血液から、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーおよび protein A-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

結果

1. HPLC による薬物分析における移動相の簡便な設定法の検討

グラジエントおよびアイソクラティック溶出時の保持時間：*p*-ヒドロキシ安息香酸、および 4 種類の *p*-ヒドロキシ安息香酸エステルについて、M4.2 および M2.5 を移動相としてグラジエント溶出を行った場合の各薬物の保持時間を Table 1 に示した。エステル基の炭素数が多くなるに従い、保持時間は長くなった。またアイソクラティック溶出における、移動相中のアセトニトリルの比率と各薬物の保持時間の関係を Fig. 1 に示した。各薬物ともに移動相中のアセトニトリルの比率が高くなるに従い保持時間は短くなった。

Fig. 1 から、アイソクラティック溶出において各薬物の保持時間が約 5 分となるための移動相中のアセトニトリルの比率を求め、その値と各薬物のグラジエント溶出における保持時間との関係を Fig. 2 に示した。両値の間には式(1)に示す良好な直線関係が認められた。

Table 1 Chemical structures and retention times (min) for *p*-hydroxybenzoate derivatives under the gradient condition with M4.2 and M2.5

Compound	R	Retention time	
		M4.2	M2.5
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (BA)	H	<4	8.32
Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (MP)	CH ₃	10.20	10.11
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (EP)	C ₂ H ₅	10.96	10.87
<i>n</i> -Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (PP)	<i>n</i> -C ₃ H ₇	11.67	11.60
<i>n</i> -Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (BP)	<i>n</i> -C ₄ H ₉	12.34	12.26

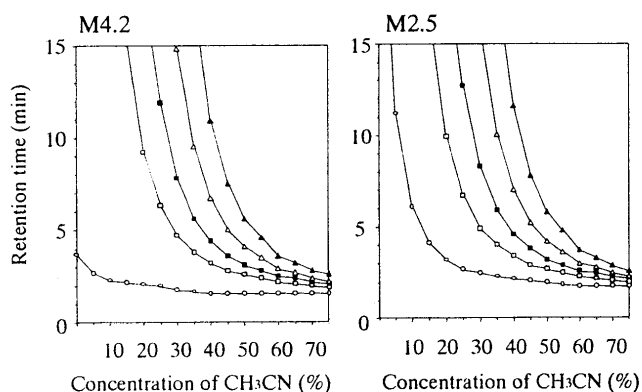
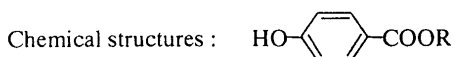


Fig. 1. Retention time values for BA and its esters in the isocratic elution with M4.2 and M2.5.

○, BA; □, MP; ■, EP; △, PP; ▲, BP.

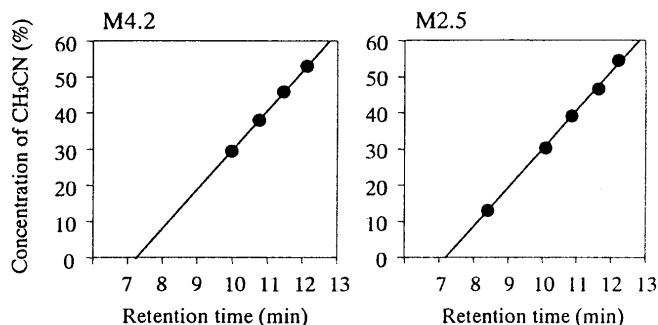


Fig. 2. Relationship between retention time and concentration of acetonitrile in M4.2 and M2.5

Retention time of BA and its esters was measured under the gradient condition with M4.2 and M2.5 as a mobile phase. The concentration of acetonitrile was estimated when the retention time value of *p*-hydroxybenzoates was 5 min.

$$A = 10B - 70 \quad \dots\dots\dots (1)$$

A : アイソクラティック溶出において各薬物の保持時間が約 5 分となるための移動相中のアセトニトリルの比率 (%)

B : 各薬物のグラジエント溶出における保持時間 (min)

各薬物の HPLC 分析における移動相組成の決定：各薬物のアイソクラティック溶出における移動相の組成は、グラジエント溶出における保持時間を求め、式(1)にその値を代入することにより設定できると考えられる。その方法を Fig. 3 に示した。まず最初に、M4.2 の移動相を用いてグラジエント溶出を行う。保持時間が 7 分以上の場合には式(1)に従い、アイソクラティック溶出における移動相中のアセトニトリルの比率を算出する。算出した移動相の組成を用いてアイソクラティック溶出を行った結果、保持時間が 5 分付近となり、測定薬物に対するカラムの理論段数が 1,000 以上の場合¹⁷⁾には、その移動相の組成を分析条件として設定する。グラジエント溶出において保持時間が 7 分未満の場合、あるいはアイソクラティック溶出における理論段数が 1,000 未満の場合には M2.5 を用いて同様の測定を行い移動相の組成を設定する。M4.2 および M2.5 のいずれの溶出によっても保持時間が 5 分付近となり、測定薬物に対するカラムの理論段数が 1,000 以上となる測定条件が設定できない場合は、他の測定系を考慮する。

各薬物の測定条件の検討：臨床で使用されている薬物のうち原末が入手できた 75 種類の薬物について、Fig. 3 に従い HPLC 分析条件の設定を試みた。75 種類の薬物のうち 72 種類の薬物について本法で分離条件が設定できた (Table 2)。M4.2 および M2.5 のいずれの移動相でも分離条件が設定できなかった薬物は、クラリスロマイシン、ホスフェストロール、リン酸クリンダマイシンであり、いずれも極めて極性の高い酸性薬物であった。

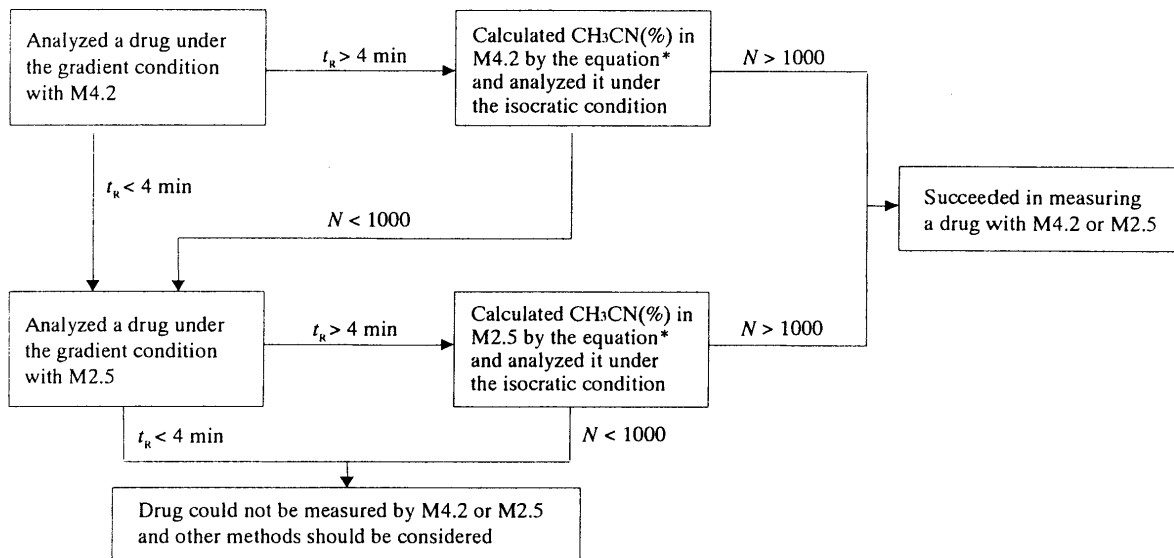


Fig. 3. Flow chart for setting the composition of mobile phase

*, A = 10 B - 70. t_R , retention time; N, theoretical plate number.

Table 2 Analysis of drugs used clinically under the isocratic condition

Drug	Gradient elution		Isocratic elution		Drug	Gradient elution		Isocratic elution	
	t_R (min)	t_R (min)	CH ₃ CN (%)*	t_R (min)		t_R (min)	t_R (min)	CH ₃ CN (%)*	t_R (min)
Analyses by M4.2									
Aciclovir	7.0	0	8.0	Hydrocortisone acetate	12.1	50	4.9		
Acetazolamide	7.9	10	4.2	Diazepam	12.5	60	4.0		
Aniracetam	8.6	30	5.9	Cyclophosphamide	9.9	30	4.6		
Allopurinol	7.3	1	4.4	Digoxin	9.0	25	4.5		
Imidapril	10.1	30	5.8	Cimetidine	7.5	8	5.6		
Irinotecan	9.2	20	6.7	Cilazapril	10.7	35	6.5		
Indomethacin	12.6	50	5.3	Dilazep	10.6	40	4.7		
Ethosuximide	9.0	20	4.2	Diltiazem	10.2	40	5.6		
Eperison	8.7	20	5.8	Spirolactone	12.4	50	5.8		
Carbamazepine	10.8	40	4.2	Sultiame	9.3	20	5.0		
Quinapril	10.5	40	5.5	Sulpiride	7.6	7	5.8		
Clonazepam	11.3	40	5.3	Zonisamide	9.5	20	5.7		
Clofibrate	15.0	75	4.9	Dexamethazone	10.9	40	4.3		
Delapril	11.9	40	7.0	Pranlukast	13.4	50	6.7		
Docarpamine	11.4	40	6.5	Primidone	8.9	20	4.8		
Tranilast	10.5	30	6.2	Fluconazole	9.2	20	5.2		
Triamcinolone	11.2	40	5.1	Flutamide	12.7	60	4.3		
Tolbutamide	11.6	40	6.2	Prednisolone	10.3	30	6.4		
Nitrazepam	11.2	40	5.0	Betamethazone	10.8	40	4.1		
Nifedipine	11.9	50	4.7	Benazepril	11.5	40	4.8		
Nefiracetam	9.7	30	4.3	Pentobarbital	10.9	40	4.5		
Pindolol	8.3	15	4.5	Fominoben	12.6	60	4.3		
Phenytoin	10.8	40	4.1	Maprotiline	10.5	40	4.9		
Phenobarbital	10.0	30	5.2	Camostat mesilate	8.8	20	4.8		
Fenbufen	11.8	40	6.6	Methotrexate	8.0	10	4.5		
Pranoprofen	10.4	30	5.4	Warfarin	12.0	40	4.0		
Analyses by M2.5									
Aspirin	10.0	30	4.2	Cefotiam	7.2	4	5.0		
Acetaminophen	7.9	8	4.7	Tulobuterol	8.9	20	4.0		
Alacepril	10.9	40	4.1	Theophylline	8.0	8	5.6		
Ampicillin	7.9	10	5.4	Tegafur	8.4	15	4.4		
Enalapril	9.9	30	4.1	Temocapril	12.3	50	5.7		
Ofloxacin	8.3	15	4.2	Sultamicillin tosilate	8.3	15	4.3		
Caffeine	8.5	15	4.0	Procaine	7.9	10	4.0		
Carbenicillin	9.5	25	6.0	Procaïnamide	7.4	5	4.3		
Cromoglicate Na	8.9	15	5.3	Propranolol	9.6	25	6.1		
Chlorpromazine	10.8	30	4.6	Loperamide	11.6	40	6.0		

* Acetonitrile concentration (%) in mobile phase. t_R , retention time.

2. ラット肝臓由来のプラシルカスト水解酵素に関する検討

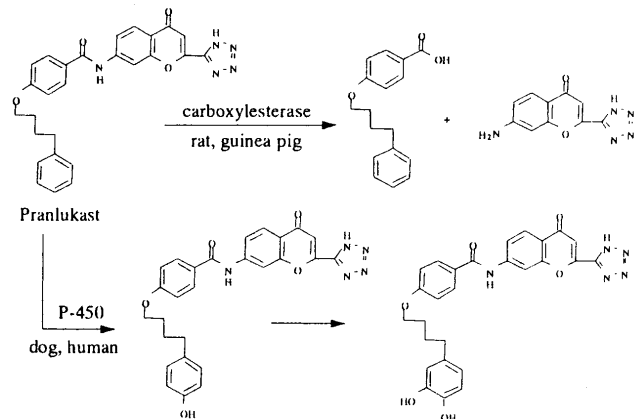


Fig. 4. Scheme for metabolism of pranlukast in rat, guinea pig, dog and human

ラット肝臓からの carboxylesterase pl 6.0 および carboxylesterase pl 6.2 の精製：DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーによって α -naphthyl acetate およびプラシルカストに対する水解活性が 2 つのピークとして検出された。最初のピーク（以下、A 画分）は 40 mM の NaCl で溶出し、 α -naphthyl acetate およびプラシルカストに対して水解活性を示した。2 番目のピーク（以下、B 画分）は 70 mM の NaCl で溶出し、 α -naphthyl acetate に対して水解活性を示し、プラシルカストに対してはほとんど水解活性を示さなかった (Fig. 5)。A 画分は Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィーによって 60 kDa 付近に溶出され、B 画分は 60 kDa および 174 kDa 付近に溶出された。

Table 3 Purification of carboxylesterases pI 6.2 and 6.0 from rat liver microsomes

Fraction	Total Protein (mg)	Total activity		Specific activity		Yield	
		α -Naphthyl acetate (units)	Pranlukast (units)	α -Naphthyl acetate (units / mg protein)	Pranlukast (units / mg protein)	α -Naphthyl acetate (%)	Pranlukast (%)
Crude Enzyme	1813.6	18083.7	150.6	10.0	0.08	100	100
Ammonium sulfate fract. (30 -70%)	374.2	12648.0	121.4	33.8	0.32	69.9	80.6
Carboxylesterase pI 6.2							
DEAE -cellulose	14.0	2058.5	29.7	147.0	2.12	16.3	19.7
Sephadex G-150	2.6	688.6	8.1	264.9	3.12	3.8	5.4
Isoelectrofocusing	1.1	449.6	4.9	408.7	4.45	2.5	3.3
Carboxylesterase pI 6.0							
DEAE -cellulose	14.5	2074.2	13.9	143.0	0.96	11.5	9.2
Sephadex G-150	2.3	614.5	0.8	267.2	0.36	3.4	0.6
Isoelectrofocusing	0.9	370.2	0.3	411.3	0.33	2.1	0.2

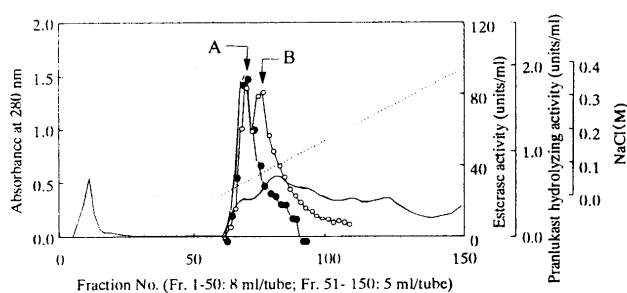


Fig. 5. DEAE-cellulose column chromatography of carboxylesterases from rat liver microsomal fraction

Crude enzyme was applied to a column (2.2 x 15 cm) of DEAE-cellulose equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, and the enzyme was eluted with a linear gradient of sodium chloride (0 — 0.4 M). -----, Concentration of sodium chloride; ———, absorbance at 280 nm; ●, pranlukast hydrolyzing activity (unit/ml); ○, esterase activity against α -naphthyl acetate (unit/ml).

クロマトフォーカシングカラムクロマトグラフィーの結果、A 画分は等電点 6.2、B 画分は等電点 6.0 のシングルピークとしてエステラーゼ活性が認められた。A 画分のカルボキシルエステラーゼを carboxylesterase pI 6.2、B 画分のカルボキシルエステラーゼを carboxylesterase pI 6.0 とした。二つの carboxylesterases の精製過程における酵素活性を Table 3 に示した。比活性では carboxylesterase pI 6.2 は粗酵素に比べ α -naphthyl acetate の水解活性が約 40 倍、プラニルカストの水解活性が約 55 倍に上昇した。Carboxylesterase pI 6.2 は粗酵素に比べ α -naphthyl acetate の水解活性が約 40 倍に上昇したが、プラニルカストの水解活性は精製が進むにしたがい減少した。

精製酵素の諸性質：精製酵素の SDS-PAGE の結果では、carboxylesterase pI 6.2 のバンドは 60 kDa、carboxylesterase pI 6.0 のバンドは 58 kDa にそれぞれ単一のピークとして出現した。精製酵素の諸性質を Table 4 に示した。SDS-

PAGE と Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィーの結果、carboxylesterase pI 6.2 は単量体、carboxylesterase pI 6.0 は 3 量体であることが示唆された。プラニルカストに対しては carboxylesterase pI 6.2 が carboxylesterase pI 6.0 の約 15 倍高い水解活性を示した。各種阻害剤の影響では、両酵素ともにセリン酵素阻害剤の BNPP および PMSF ではほぼ完全に阻害され、金属酵素阻害剤の EDTA では阻害されなかった。

N-末端アミノ酸配列の解析：Carboxylesterase pI 6.2 および carboxylesterase pI 6.0 はブロムシアン分解によってそれぞれ 5 個および 3 個のペプチド断片を得ることがで

Table 4 Some properties of carboxylesterases pI 6.2 and pI 6.0 from rat liver

Properties	Carboxylesterase pI 6.2	Carboxylesterase pI 6.0
Isoelectric point (pI)	6.2	6.0
Molecular weight (kDa)		
SDS-PAGE	60	58
SephadexG-150	60	174
Specific activity (units/mg protein)		
α -naphthylacetate	408.7	411.3
pranlukast	148×10^{-3}	11×10^{-3}
p-nitrophenylacetate	112.4	61.5
Inhibition (%)		
PMSF (1mM)	97.8	95.0
BNPP (1mM)	98.3	96.5
EDTA (1mM)	0	0

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; BNPP, Bis-(4-nitrophenyl) phosphate; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid.

Table 5 Substrate specificity of carboxylesterases pI 6.2 and pI 6.0 from rat liver

Substrate	Carboxylesterase pI 6.2		Carboxylesterase pI 6.0	
	Km	Vmax	Km	Vmax
Ester-type drugs				
Benazepril	80.4	136.0	100.2	41.6
Camostat mesilate	141.0	44.0	232.4	217.4
Delapril	120.2	44.8	68.8	24.4
Diltiazem	38.0	3.0	84.2	0.8
Imidapril	407.5	37.4	329.7	30.8
Irinotecan	499.2	20.4	715.1	30.7
Temocapril	467.8	1533.6	229.0	176.2
Oxybutynin	—	—	928.4	29.3
Procaine	—	—	117.7	28.9
Dilazep	—	—	±*	—
Propiverine	—	—	—	—
Zopiclone	—	—	—	—
Amide-type drugs				
Pranlukast	61.0	234.4	51.2	11.0
Aniracetam				
to anisic acid	150.0	0.8	68.9	76.6
to anisamide	126.0	1.1	70.2	6.9
butyric acid	—	—	—	—
Capsaicin	—	—	133.6	8.5
Fominoben	—	—	±*	—
Flutamide	—	—	—	—
Indomethacin	—	—	—	—

Vmax, nmol/mg protein/min; Km, μ M;
 ±*, below 1.0 nmol/mg protein/min; —, not detected.

きた。Carboxylesterase pI 6.2 のペプチド断片のアミノ酸配列は Yan ら¹⁸⁾ が報告している hydrolase B のアミノ酸配列の各部分と一致した。一方、carboxylesterase pI 6.0 のペプチド断片のアミノ酸配列は Yan ら¹⁸⁾ が報告している hydrolase A のアミノ酸配列の各部分と一致した。

薬物に対する基質特異性：エステル結合およびアミド結合を持った薬物に対する carboxylesterase pI 6.2 と carboxylesterase pI 6.0 の基質特異性を Table 5 に示した。両酵素ともにさまざまな薬物に対して水解活性を示し、特に Carboxylesterase pI 6.0 が多くの薬物に対して水解活性を示した。

3. ブタ肝臓由来のインドメタシン水解酵素に関する検討

ブタ肝臓からのインドメタシン水解酵素の精製：Q-Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィーによってインドメタシンに水解活性を示すピークが 0.1–0.15 M NaCl 付近で溶出された。それに引き続いてエステラーゼ活性を示すピークが溶出された。(Fig. 7)。インドメタシン

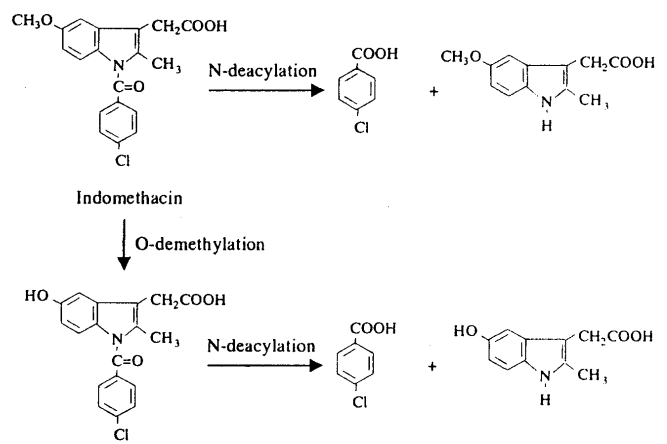


Fig. 6 Metabolic pathway of indomethacin

ン水解活性を示す画分は Red-Sepharose カラムには親和性がなく吸着しなかったが、Blue-Sepharose カラムに対する親和性は高く、Blue-Sepharose カラムからは 2.0 M NaCl の高濃度で溶出された。本酵素は高濃度の塩の存在下では比較的不安定であったため、速やかに透析を行い精製酵素を得た。インドメタシン水解酵素の精製過程を Table 6 に示した。粗酵素からの収率は 5.9%であった。

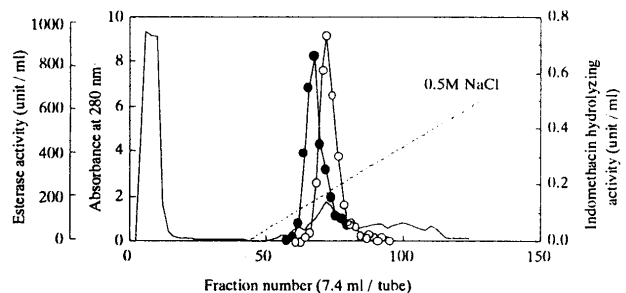


Fig. 7 Q-Sepharose Fast Flow column chromatography of indomethacin hydrolyzing enzyme from pig liver

Crude enzyme in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 was applied to a column of Q-Sepharose Fast Flow (1.7x 7.0 cm) equilibrated with the same buffer at 4°C. The enzyme was eluted with a linear gradient of NaCl (0–0.5 M) in the buffer. -----, Concentration of sodium chloride; ———, absorbance at 280 nm; ●, indomethacin hydrolyzing activity (unit/ml); ○, esterase activity against α -naphthyl acetate (unit/ml).

Table 6 Purification of indomethacin hydrolyzing enzyme from pig liver

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude enzyme after Lubrol treatment	807	15.3	0.019	100
Q-Sepharose Fast Flow	37.0	28.6	0.774	187
Blue-Sepharose	0.525	0.9	1.71	5.87

Table 7 Some properties of indomethacin hydrolyzing enzyme from pig liver

Optimum pH	9.0	
pH Stability	9.0 - 11.0	
Molecular weight (kDa)	65 (SDS-PAGE)	
Inhibitor	Inhibition (%)	
PMSF	100	
BNPP	100	
EDTA	0	
Substrate specificity	Km (μM)	Vmax (nmol/min/mg protein)
α -Naphthyl acetate	—	—
<i>p</i> -Nitrophenylacetate	—	—
Indomethacin	67.8	9.02
Aniracetam	560	7.69
Nitrazepam	—	—
Prazosin	—	—
Fominoben	—	—
Tiamamide	—	—
Flutamide	—	—

—, not hydrolyzed.

精製酵素の諸性質：精製酵素の SDS-PAGE の結果、インドメタシン水解酵素のバンドは 65 kDa 付近に単一のピークとして出現した。オクタロニー法による免疫沈降反応の検討では、ウサギ抗ブタ肝臓インドメタシン水解酵素抗体はインドメタシン水解酵素とは沈降線を形成したが、ブタ肝臓カルボキシルエステラーゼとは沈降線を形成しなかった。

精製酵素の諸性質および基質特異性を Table 7 にまとめた。本酵素はカルボキシルエステラーゼの一般的な基質である α -naphthyl acetate および *p*-nitrophenyl acetate に対して水解活性を示さなかった。薬物に対する基質特異性では、インドメタシンおよびアニラセタムのアミド結合を水解した。アニラセタムには 2 つのアミド結合が存在

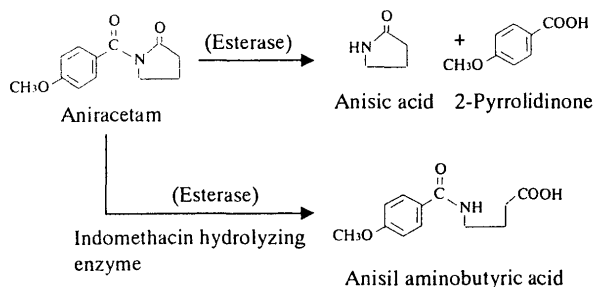


Fig. 8 Metabolism of aniracetam by indomethacin hydrolyzing enzyme from pig liver

するが、インドメタシン水解酵素は一つのアミド結合のみを水解した (Fig. 8)。インドメタシン水解酵素はエステル型薬物に対しては水解活性を示さなかった。

N-末端アミノ酸配列：シアン化プロマイドで切断して得られた二つのペプチド断片のアミノ酸配列は、マウスカルボキシルエステラーゼのアイソザイムである Es-male のアミノ酸配列¹⁹⁾ とそれぞれ 70.0% および 55.6% の相同性を有していた。

4. ヒト肝臓由来のカルボキシルエステラーゼの薬物水解作用に関する検討

ヒト肝臓からの carboxylesterase pI 5.3 および carboxylesterase pI 4.5 の精製：カルボキシルエステラーゼは Q-Sepharose カラムによって 2 つのピークとして検出された (Fig. 9)。最初のピークは Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィーによって 120 kDa 付近に溶出され、2 番目のピークは 60 kDa 付近に溶出された。両方のピークともに Con. A-Sepharose カラムに吸着され、 α -methyl-D-mannopyranoside によって溶離された。クロマトフォーカシングカラムクロマトグラフィーの結果、最初のピークの等電点は 5.3、2 番目のピークの等電点は 4.5 であった。二つの carboxylesterases の精製過程を Table 8 に示した。粗酵素からの carboxylesterase pI 5.3 の収率は 1.2%、carboxylesterase pI 4.5 の収率は 1.0% であった。

精製酵素の諸性質：精製酵素の SDS-PAGE の結果、carboxylesterase pI 5.3 のバンドは 61 kDa、carboxylesterase pI 4.5 のバンドは 64 kDa にそれぞれ単一のピークとして出現した。Western blotting の結果、carboxylesterase pI 5.3 に対する抗体は carboxylesterase pI 5.3 に対して免疫反応を示し、carboxylesterase pI 4.5 に対してはわずかに免疫反応を示した。

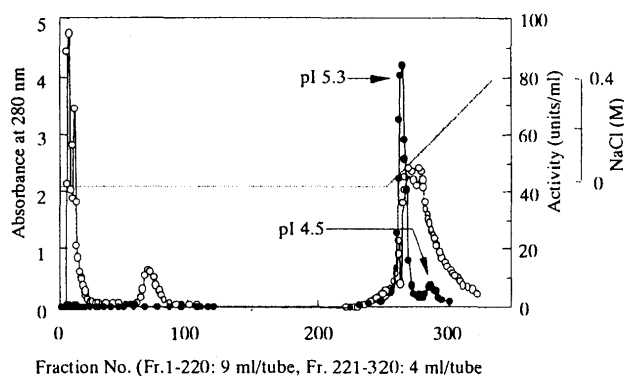


Fig. 9 Q-Sepharose column chromatography of carboxylesterases from human liver

Crude enzyme in 10 mM phosphate buffer, pH 8.0 was applied to a column (2.0 x 22.5 cm) of Q-Sepharose equilibrated with the same buffer at 4° C. The enzyme was eluted with a linear gradient of NaCl (0 — 0.5 M) in the buffer. -----, Concentration of sodium chloride; ○, Absorbance at 280 nm; ●, esterase activity (units/ml).

Table 8 Purification of human liver carboxylesterases

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Carboxylesterase pI 5.3				
Crude enzyme	5720.00	16617.0	2.91	100.0
Q-Sepharose	522.20	4768.5	9.13	28.7
Sephadex G-50	26.85	1947.2	72.50	11.7
Isoelectrofocusing	8.89	806.8	90.65	4.9
Con A-Sepharose	2.07	199.4	96.56	1.2
Carboxylesterase pI 4.5				
Crude enzyme	5720.00	16617.0	2.91	100.0
Q-Sepharose	302.24	893.7	2.96	5.4
Con A-Sepharose	10.35	387.0	37.39	2.3
Sephadex G-50	1.73	175.2	101.21	1.0

精製酵素の諸性質を Table 9 に示した。SDS-PAGE と Sephadex G-150 カラムクロマトグラフィーの結果、carboxylesterase pI 5.3 は 2 量体、carboxylesterase pI 4.5 は単量体であることが示された。Con A-Sepharose カラムに対しては両酵素ともに結合し、両酵素ともに分子内に糖鎖を持っていることが示された。各種阻害剤の影響では、両酵素ともに BNPP および PMSF で強く阻害され、EDTA では阻害されなかった。

薬物に対する基質特異性：臨床で使用されている薬物に対する carboxylesterase pI 5.3 と carboxylesterase pI 4.5 の基質特異性を Table 10 に示した。エステル結合を持つ薬

Table 9 Some properties of carboxylesterases pI 5.3 and pI 4.5 from human liver

Properties	Carboxylesterase pI 5.3	Carboxylesterase pI 4.5
Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$)		
α -naphthyl acetate	96.6	101.2
<i>p</i> -nitrophenyl acetate	1.3	16.3
Molecular weight (kDa)		
SDS-PAGE	61	64
Sephadex G-150	120	64
Isoelectric point (pI)	5.3	4.5
ConA affinity	+	+
Optimum pH	8.0	7.0
pH stability (37°C, 30 min)		
more than 65% of original activity	7.0-10.0	8.0-9.0
Inhibition (%)		
BNPP (0.1 mM)	99.3	99.3
PMSF (0.1 mM)	96.9	98.1
EDTA (0.1 mM)	15.8	5.2

物に対しては、carboxylesterase pI 5.3 はメシル酸カモスタットおよびアンジオテンシン変換酵素阻害剤を加水分解したが、carboxylesterase pI 4.5 はこれらに対して全く水解活性を示さないか、あるいは極めて弱い活性を示した。一方、carboxylesterase pI 4.5 はアスピリン、プロカインおよびオキシブチニンに対して水解活性を示したが、carboxylesterase pI 5.3 はこれらに対して活性を示さなかった。

アミド結合を持つ薬物に対しては、両酵素ともにアニラセタムの2つのアミド結合 (Fig. 8) を水解したが、水解する部位の比は両酵素間で大きく異なっていた。

N-末端アミノ酸配列：シアン化プロマイドで切断して得られたフラグメントのアミノ酸配列は、Carboxylesterase pI 5.3 がウサギの carboxylesterase form 1、carboxylesterase pI 4.5 がウサギの carboxylesterase form 2 と高い相同性を示した。また、carboxylesterase pI 5.3 のアミノ酸配列は Kroetz らが報告している HU1²⁰⁾ の cDNA から翻訳したアミノ酸配列と一致し、carboxylesterase pI 4.5 は Pindel らが報告している human carboxylesterase (hCE-2)²¹⁾ と一致した。

Table 10 Substrate specificity of carboxylesterases pI 5.3 and pI 4.5 from human liver

Drugs	Carboxylesterase pI 5.3		Carboxylesterase pI 4.5	
	Km	Vmax	Km	Vmax
Ester-type drugs				
Camostat mesilate	0.707	0.958	2.700	0.090
Dilazep	0.154	0.112	0.089	0.118
Irinotecan	1.453	0.082	0.241	0.074
Benazepril	0.734	0.886	0.785	0.330
ONO-5056	1.060	0.132	2.080	0.476
Quinapril	0.134	0.184	0.122	0.034
Temocapril	0.786	4.762	0.325	0.402
Delapril	1.502	1.569	—	—
Imidapril	0.287	0.195	—	—
Aspirin	—	—	2.270	0.244
Oxybutynin	—	—	1.124	0.353
Procaine	—	—	3.330	0.029
Alacepril	—	—	—	—
Diltiazem	—	—	—	—
Amide-type drugs				
Aniracetam				
to anisilic acid	0.085	0.009	0.301	0.020
to anisamido butyric acid	0.095	0.007	0.412	0.349
Capsaicin	—	—	—	—
Pranlukast	—	—	—	—
Indomethacin	—	—	—	—
Indomethacin	—	—	—	—

Km, mM; Vmax, $\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$; —, not detected.

考 察

本研究では、先ず薬物の HPLC による分析条件を簡便に設定する方法を検討した。その結果、移動相としてリン酸緩衝液とアセトニトリルを用い、その混合比率あるいは緩衝液の pH を変えることによって多くの薬物の HPLC 測定が可能であることが明らかとなった。緩衝液の混合比率は、あらかじめグラジエント分析を行うことによって容易に設定することが可能であった。本方法を多種類の薬物を扱う研究に適用した場合には、分析条件の設定に要する時間、および分析に要する時間が大幅に短縮できると考えられる²²⁾。

薬物水解酵素の研究では、ラット、ブタ、ヒトの肝臓から各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせて薬物水解酵素の精製を行い、5種類の酵素を単離した。5種類の酵素の諸性質および基質特異性の比較を Table 11 および Table 12 に示した。これらの検討により薬物水解酵素について以下に示す知見を得た²³⁻²⁵⁾。

- 1) SDS-PAGE で求めた各酵素のサブユニット分子量はほぼ 60 kDa であり一致していた。また、各種阻害剤の検討からいずれの酵素も活性中心にセリンが存在することが示唆された。一方、等電点には大きな差が認められ、一次構造の違いが示唆された。
- 2) ブタ肝臓から精製したインドメタシン水解酵素は、カルボキシルエステラーゼの合成基質として一般的に用いられる α -naphthyl acetate、および他の酵素がいずれも水解活性を示したエステル型薬物に対して水解活性を示さず、アミノ酸配列の検討から新規の酵素と考えられた。本酵素はインドメタシンと同様にアミド型薬物のアニラセタムに対しては水解活性を示すことから特異的な基質

Table 11 Comparison of some properties of drug hydrolases purified in this study

Properties	Human hydrolase		Rat hydrolase		Pig hydrolase
	pI 5.3	pI 4.5	pI 6.2	pI 6.0	
Molecular weight (kDa)					
SDS-PAGE	61	64	60	58	65
Sephadex	120	64	60	174	**
Isoelectric point (pI)	5.3	4.5	6.2	6.0	**
Inhibition					
BNPP	↓	↓	↓	↓	↓
PMSF	↓	↓	↓	↓	↓
EDTA	—	—	—	—	—
Specific activity* (μ mol/mg protein/min)	96.6	101.2	408.7	411.3	0

↓, inhibited; —, not inhibited; *, esterase activity against α -naphthyl acetate; **, not determined.

認識性が存在すると考えられた。

3) プランルカストの水解活性は、ラットから精製したカルボキシルエステラーゼのみに認められ、ヒトから精製したカルボキシルエステラーゼおよびヒト肝ホモジネートでは認められなかった。このことは、カルボキシルエステラーゼが関与する薬物代謝に種差が存在し、ヒトと動物で代謝経路が全く異なる場合があることを示している。したがって、カルボキシルエステラーゼによる代謝に関しても実験動物によって得られたデータをそのままヒトに外挿することは困難であり、ヒトでの代謝の検討が必要であると考えられた。

4) ヒト由来の2種類のカルボキシルエステラーゼは比較的広い基質特異性を有していた。しかし、その基質特異性は互いに異なっていた。個々の薬物については、2種類の酵素によりいずれも代謝される薬物、あるいは一方の酵素のみに代謝される薬物があった。特定のアイソザイムのみで代謝される薬物では、酵素含量により体内動態が大きく変動する可能性がある。したがって、cytochrome P450による代謝と同様にカルボキシルエステラーゼによって代謝される薬物においても、薬物の開発および治験段階で薬物毎に代謝するアイソザイムが解明されるべきであると考えられた。

カルボキシルエステラーゼにより代謝される薬剤の特徴としてプロドラッグが多く、代謝された後に薬理活性

Table 12 Comparison of substrate specificity of drug hydrolases purified in this study

Drugs	Human hydrolase		Rat hydrolase		Pig hydrolase
	pI 5.3	pI 4.5	pI 6.2	pI 6.0	
Ester-type drugs					
Camostat mesilate	+	+	+	+	—
Dirazep	+	+	+	+	—
Irinotecan	+	+	+	+	—
Benazepril	+	+	+	+	—
Temocapril	+	+	+	+	—
Delapril	+	—	+	+	—
Imidapril	+	—	+	+	—
Procaine	—	+	—	+	—
Diltiazem	—	—	+	+	—
Oxybutynin	—	+	—	+	—
Amide-type drugs					
Aniracetam (ratio)*	+	+	+	+	+
	59:31	7:93	36:64	92:8	0:100
Indomethacin	—	—	—	—	+
Pranlukast	—	—	+	+	—
Capsaisin	—	—	—	+	—

+, hydrolysed; —, not hydrolysed;

*, metabolic ratio to anisilic acid and anisamidobutyric acid.

を表すことが挙げられる^{26, 27)}。カルボキシルエステラーゼは生体内のさまざまな臓器に存在しており、それぞれの臓器、あるいは細胞の種類によって異なったアイソザイムが存在し、それぞれ基質特異性が異なっていると考えられる。プロドラッグ化の目的の一つに吸収率の改善が挙げられるが、経口抗生物質などの小腸で代謝されるプロドラッグは小腸で代謝された後に体循環に移行するまでに能動輸送が必要と考えられ、十分な吸収率が得られていない²⁸⁾。従って、アイソザイムの基質特異性の違いを利用して肝臓で特異的に代謝される薬剤を開発することにより十分な吸収率が得られると予想される。また、抗癌剤などの副作用が大きい薬剤では、癌細胞などの標的部位で特異的に代謝されるプロドラッグを開発することによって副作用が軽減できると考えられる²⁹⁾。このように、カルボキシルエステラーゼのアイソザイム間での基質特異性の差は医薬品の開発に応用できる^{30, 31)}。今後、カルボキシルエステラーゼの基質特異性に関する研究をさらに進め、化学構造と基質特異性との関連を解明することが必要であると考えられる。

引用文献

- 1) Satoh T., Hosokawa M., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 257-288 (1998).
- 2) Heymann E., "Enzym. Basis of Detoxication," Vol. 2, ed. by Jakoby W. B., Bend R. R., Caldwell J., Academic Press, New York, 1980. pp. 291-323.
- 3) Scott D., F., Chacko T., L., Maxwell D., M., Schlager J. J., Lanclos K. D., *Protein Express. Purif.*, **17**, 16-25 (1999).
- 4) Yan B., Matoney L., Yang D., *Placenta*, **20**, 599-607 (1999).
- 5) Guichard S., Terret C., Hennebelle I., Lochon I., Chevreau P., Fretigny E., Selves J., Chatelut E., Bugat R., Canal P., *Cancer*, **80**, 364-370 (1999).
- 6) Bogdanffy M. S., Sarangapani R., Kimbell J. S., Frame S. R., Plowchalk D. R., *Toxicol. Sciences*, **46**, 235-46 (1998).
- 7) Mentlein R., Heymann E., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1243-1248 (1984).
- 8) Satoh T., *In Reviews in Biochem. Toxicol.* (Hodgson E., Bend J. R., Philpot R. M., Eds.), **8**, 155-181 (1987).
- 9) Park Y. H., Lee S. S., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**, 351-360 (1994).
- 10) 石堂雅恒, 柴川公雄, 高本まゆみ, 梶原郁郎, 澤田正文, 愛下秀毅, *薬物動態*, **8**, 49-66 (1993).
- 11) Huang T. L., Shiotsuki T., Uematsu T., Borhan B., Li Q. X., Hammock B. D., *Pharm. Res.*, **13**, 495-500 (1996).
- 12) Sugiura M., Iizumi Y., Adachi T., Ito Y., Hirano K., Sawaki S., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2920-2927 (1981).
- 13) Heymann E., Mentlein R., *Methods Enzymol.*, **77**, 333-344 (1981).
- 14) Krisch K., *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 265-280 (1966).
- 15) Laemmli U. K., *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970).
- 16) Gross E., *Methods Enzymol.*, **11**, 238-255 (1967).
- 17) 河合 聡, *ガスクロマトグラフィ入門*, 三共出版, p17-24 (1980).
- 18) Yan B., Yang D., Brady M., Parkinson A., *J. Biol. Chem.* **269**, 29688-29696 (1994).
- 19) Aida K., Moore R., and Negishi M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1174**, 72-74 (1993).
- 20) Kroetz D. L., McBride O. W., Gonzalez F. J., *Biochemistry*, **32**, 11606-11617 (1993).
- 21) Pindel E. V., Kedishvili N. Y., Abraham T. A., Brzezinski M. R., Zhang J., Dean R. A., Bosron W. F., GenBank-today HSU60553.
- 22) Sugiyama T., Matsuyama R., Usui S., Katagiri Y., Hirano K., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 274-278 (2000).
- 23) Luan L., Sugiyama T., Takai S., Usami Y., Adachi T., Katagiri Y., Hirano K., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 71-75 (1997).
- 24) Terashima K., Takai S., Usami Y., Adachi T., Sugiyama T., Katagiri Y., Hirano K., *Pharm. Res.*, **13**, 1327-1330 (1996).
- 25) Takai S., Matsuda A., Usami Y., Adachi T., Sugiyama T., Katagiri Y., Tatematsu M., Hirano K., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 869-873 (1997).
- 26) Danks M. K., Morton C. L., Krull E. J., Cheshire P. J., Richmond L. B., Naeve C. W., Pawlik C. A., Houghton P. J., Potter P. M., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 917-924 (1999).
- 27) Hikima T., Tojo K., *Pharm. Res.*, **14**, 197-202 (1997).
- 28) Cook C. S., Karabatos P. J., Schoenhard G. L., Karin A., *Pharm. Res.*, **12**, 1158-1164 (1995).
- 29) Miwa M., Ura M., Nishida M., Sawada N., Ishikawa T., Mori K., Shimma N., Umeda I., Ishitsuka H., *Eur. J. Cancer*, **34**, 274-281 (1998).
- 30) Zhang J., Burnell J. C., Dumauval N., Bosron W. F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 314-318 (1999).
- 31) Takayama H., Watanabe A., Hosokawa M., Chiba K., Satoh T., Aimi N., *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **8**, 415-418 (1998).

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第 246 号）の内容を中心にとまとめたものである。