Simvastatin のラット血漿, 肝および小腸 ミクロソームにおける加水分解酵素

今井 直子, 大多和昌克

萬有製薬株式会社 開発研究所薬物代謝研究部 〒153 東京都目黒区下目黒2-9-3

Key words : simvastatin, rat, plasma, liver, intestine, carboxylesterase

Ring-opening hydrolases for simvastatin in plasma, liver and intestinal microsomes of rats

Naoko IMAI and Masakatsu OHTAWA

Development Laboratories, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.,
2-9-3 Shimomeguro, Meguro-ku, Tokyo 153, Japan

Summary

The characterization of the hydrolase responsible for the ring-opening hydrolysis of simvastatin (SV) to its open acid form (SVA) was carried out using rat plasma, liver and intestinal microsomes.

The optimum pHs for the ring-opening hydrolase in plasma, liver and intestine were found to be between pH 7-8.

The values of V_{max} for plasma, liver and intestine were 0.33, 0.97 and 0.24 nmol/min/mg protein, respectively, and the corresponding values of K_m were 21.9, 203.3 and 567.6 μ M, respectively. The value of V_{max}/K_m for plasma hydrolase showed the largest value of 0.0154 ml/min/mg protein, which is 3.2- and 38-fold larger than those for the liver and intestine, respectively.

The enzymatic hydrolysis of SV in the presence of plasma was inhibited by addition of diisopropyl fluorophosphate (DFP), bis (p-nitrophenyl) phosphate (BNPP), high concentration of physostigmine (Phys) and α -naphthyl acetate (α -NA). In liver, the enzymatic hydrolysis of SV was inhibited by DFP, BNPP, α -NA and EDTA. These results suggested that carboxylesterase might be, in part, responsible for the hydrolysis of SV in the plasma and liver. However, the difference in the inhibition patterns between plasma and liver indicated that different esterase isozymes might be responsible for the hydrolysis. On the other hand, the hydrolysis of SV by the intestine was not affected at all by the inhibitors and substrates mentioned above except EDTA, suggesting that the hydrolase in the intestine is different from those present in the plasma and liver.

緒 言

Simvastatin (SV) はラクトン型プロドラッグであり, HMG-CoA 還元酵素の特異的かつ強力な阻害剤であり¹⁾, 実験動物^{2~4)} およびヒト⁵⁾ において経口投与により著明なコレステロール低下作用が認められている. SV は投与後生体内でラクトン部分が加水分解し, 活性型のオープンアシッド体 (SVA) に変換される. SV のラクトン部分はラットおよびウサギ血漿中で速やかに加水分解を受けるが, イヌおよびヒト血漿中ではほとんど加水分解を受けないことはすでに報告されている⁶⁾. また, 以前われわれは, 雄ラットに SV を経口投与した後の, 血漿, 小腸, 肝臓, 胆汁中および尿中代謝物を分別定量し, 小腸では未変化体である SV と加水分解を受けた SVA はほぼ同程度存在するが, 血漿, 肝臓, 胆汁中および尿中ではラクトン体は極めて微量か, あるいはほとんど検出されないことを報告した⁷⁾. また, 肝臓中の主代謝物は SVA であったことより, SV は経口投与後, 肝臓に到達する以前に大部分が SVA に加水分解されると考えられている.

そこで今回, 雄ラットの血漿, 肝臓および小腸マイクロソームを用い, SV の加水分解酵素の性質を *in vitro* で調べ, ラットにおける体内動態にいくつかの考察を与えたので報告する.

実験材料および方法

1. 被験物質および試薬

SV とその開環体である SVA (Fig.1) および MK-803 (lovastatin) は, 米国 Merck 社より提供された. ラットアルブミン (フラクシ

ンV) は, Sigma 社製を使用した. その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した.

2. 実験動物および試料の採取

Sprague-Dawley 系雄性ラット (7 週齢) (日本チャールス・リバー) を用いた. 室温 24 ± 3 °C, 湿度 $55 \pm 15\%$, 12時間の照明サイクルの条件下で約1週間予備飼育した. 使用前15時間絶食させた. エーテル麻酔下で, 腹大動脈より血液を採取し, ヘパリン存在下3000rpm, 10分間遠心分離して血漿を得た. 肝臓は, 氷冷1.15% KCl/0.01Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) 約25ml を用いて灌流した後摘出し, 湿重量を測定した. 小腸は, 胃幽門部から10cm の下部および盲腸から10cm の上部を切断し, 内容物を1.15% KCl/0.01Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) にて洗浄後, 湿重量を測定した.

3. 肝および小腸マイクロソームの調製

肝臓は氷冷した1.15% KCl/0.01Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄後, 細切し, 3倍容 (v/w) の氷冷1.15% KCl/0.01Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) を加え, テフロン-ガラスホモジナイザーを用いて粗ホモジネートを調製した. 以上の操作はすべて氷冷下で行った. 粗ホモジネートを $10000 \times g$, 4°Cで20分間, 高速冷却遠心機 (HITACHI, SCR 20BA 型) にて遠心分離し, 得られた上清をS-10とした. S-10 3ml を $100000 \times g$, 4°Cで60分間, 超高速遠心機 (BECKMAN, L8-80M型) にて遠心分離した. 上清を廃棄した後, 沈渣に0.1Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2)

Fig. 1 Hydrolysis of SV to SVA

1.5mlを加え、ソニケーター (SEIKO INST. & ELECTRONICS LTD., SH-7040) を用いてホモジナイズし、得られた懸濁液をミクロソーム酵素標品として使用した。小腸は、細切した後、湿重量の3倍容の1.15% KCl/0.01Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) を添加後、POLYTRON® (KINEMATICA, GmbH) にてホモジナイズした。以後は肝ミクロソーム調製方法に従った。各ミクロソーム酵素標品および血漿の蛋白濃度は、ウシ血清アルブミンを標準溶液として、Lowry らの方法⁸⁾ により測定した。

4. 非酵素的加水分解反応 (pH の影響)

0.1M酢酸緩衝液 (pH 3.5, 4.0および5.0), 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.0, 7.0および8.0) および0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) を用いた。各 pH の緩衝液1.0ml に SV 100 μ M あるいは200 μ M (アセトン溶液) を添加し、37 $^{\circ}$ C, 10分間あるいは30分間インキュベートした。酢酸エチル3.0ml にて反応を停止後、遠心分離し、有機層2.0ml を分取した。濃縮乾固後、残渣を0.25ml のアセトニトリル/水=6/4 (v/v) に溶解し、HPLC にて生成した SVA を分離定量した。検量線の作成は、各 pH の緩衝液1.0ml に酢酸エチル3.0ml を添加した後 SVA 標品 (0.05~10 μ M) を添加し、同様の操作を行った。

5. アルブミンによる加水分解

4% (w/v) ラットアルブミン (フラクション V) 水溶液0.1ml を0.1Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) に添加し、1ml の反応溶液とした。37 $^{\circ}$ Cにて、SV100 μ M の添加によって反応を開始し、2, 5, 10, 20および30分間インキュベーション後、酢酸エチル3.0ml にて反応を停止した。以後の操作は、上記方法に従った。なお、対照としてラットアルブミン水溶液のかわりに生理食塩水0.1ml を用いた。

6. 酵素活性の測定

標準的なインキュベーション溶液は、血漿では、血漿 (0.1ml), 100 μ M の SV および0.1Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) を含む1.0ml の溶液とした。肝および小腸ミクロ

ソーム中では、各酵素 (1.1mg~2.2mg 蛋白), 200 μ M の SV および0.1Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) を含む1.0ml の溶液とした。

血漿は37 $^{\circ}$ Cで5分間のプレインキュベーションの後、SV を添加し反応を開始した。10分間のインキュベーションの後、酢酸エチル3.0ml を添加し反応を停止した。試料を攪拌後、遠心分離し、有機層2.0ml を分取し、濃縮乾固した。残渣を0.25ml のアセトニトリル/水=6/4 (v/v) に溶解し、HPLC で SVA を定量した。肝および小腸ミクロソームでは基質である SV を添加した後、直ちに反応を開始し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。以後の操作は血漿中酵素活性測定の方法に従った。検量線の作成は、おのおのの酵素標準溶液1.0ml に酢酸エチル3.0ml を添加した後、SVA 標品 (0.05~10 μ M) を添加し、同様の操作を行った。各酵素反応のブランクとして、血漿および各酵素標品のかわりに同容量の0.1Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) を添加したものをを用いた。

1) 至適 pH

0.1M酢酸緩衝液 (pH 3.5, 4.0および5.0), 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.0, 7.0および8.0) および0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) を用い、上述の方法に従い、おのおの pH における血漿、肝および小腸ミクロソームでの SV の加水分解反応を測定した。なお、各 pH における酵素反応のブランクとして、血漿および各酵素標品のかわりに同容量の0.1Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いた。

2) Kinetic constants の測定

基質 (SV) 濃度は、血漿では1 μ M から500 μ M、肝および小腸ミクロソームでは20 μ M から1000 μ M までを用いた。ただし、反応溶液は0.1Mナトリウム-カリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) を含む1ml とした。V_{max}および K_m 値の算出は Lineweaver-Burk の逆数プロット法⁹⁾ によった。

3) 各種阻害剤の影響

エステラーゼの阻害剤として、diisopropyl fluorophosphate (DFP), bis (p-nitrophenyl) phosphate (BNPP) および physostigmine

(Phys) を用いた。また、エステラーゼの競合的基質として α -naphthyl acetate (α -NA), phenyl acetate (PhA), acetylcholine (ACh), benzoylcholine (BzCh), mevalonolactone (MVL) および δ -gluconolactone (δ -GL) を用いた。なお、金属キレート剤として EDTA を用いた。DFP は、10, 50, 100 μ M を使用し、その他は 10, 100, 1000 μ M を使用した。MVL および EDTA は 20, 200, 2000 μ M を使用した。

各阻害剤および基質は、あらかじめ酵素反応溶液中に添加し、血漿では 5 分、肝および小腸ミクロソームでは 10 分間のプレインキュベーションの後、SV の添加により反応を開始した。ただし、MVL は基質との同時添加により反応を開始した。なお対照として各阻害剤および基質のかわりに、阻害剤および基質の調製に用いたアセトンまたは水を同容量添加した。

Fig. 2 HPLC profiles of SV and its metabolite formed by plasma from male rats.

a) SV (10 μ M) was incubated at 37°C for 10 min with plasma from male rats.
b) Blank: Male rat plasma was incubated at 37°C for 10 min in the absence of SV.

7. HPLC による SVA の分離定量

SV と各種酵素との反応後、生成した SVA を HPLC にて分離定量した。

HPLC は、UV 検出器 (UV-DEC-100-VI) を装備した TRI-ROTAR VI HPLC システム (日本分光)、あるいは UV 検出器 (875-UV) を装備した 801-SC system controller により制御される HPLC システム (日本分光) を用いた。カラムは、ガードカラム LiChroCART® 4-4 (LiChrospher® 100, RP-18e, 50 mm $\times$ 4.6 mm i.d., E. Merck) および分離カラム Wakopak (NUCLEOSIL 5C18, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 和光) を使用した。移動相は、アセトニトリル/25 mM H_3PO_4 /NH $_4$ H $_2$ PO $_4$ (pH 3.0) = 65/35 (v/v) 溶液を用い、流速 1 ml/min, カラム温度 35°C, 分析時間は 15 分とし、UV 238 nm の吸収を測定した。内部標準物質として MK-803 を用いた。代表的な HPLC クロマトグラフを Fig. 2 に示した。SVA の保持時間は 7.4 分、SV および MK-803 はそれぞれ 12.0 分および 9.5 分であった。なお、本法における SVA の定量限界は 0.05 nmol/ml であった。

実験結果

1. pH の影響

SV の加水分解に及ぼす pH の影響について検討した結果の一部を Fig. 3 に示した。SV は各 pH の緩衝液中において、37°C, 30 分間のインキュベーションでは、pH 6.0 以下でほとんど非酵素的に加水分解されなかったが、アルカリ側では速やかな分解がみられた。一方、酵素的加水分解の至適 pH は、血漿、肝臓および小腸では、pH 7~8 であった。なお、pH 7~8 において SV から生成する代謝物は SVA のみであった (血漿および小腸は未記載)。

2. アルブミンによる加水分解

4% ラットアルブミン水溶液 0.1 ml を用い、SV の加水分解について検討した。SV はアルブミンと 37°C で 10 分間インキュベートすることにより、わずかに加水分解を受け SVA を生成したが、その生成量は、同容量の血漿を用いた場合の約 12% であった。

Fig. 3 Effect of pH on the ring-opening hydrolysis of SV.

SV (200 μ M) was incubated with rat liver microsomes (●) or buffer solution (○) under various pHs at 37°C for 30min. Enzymatic hydrolysis (---) estimates as L-B.

Table I Kinetic constants for the ring-opening hydrolysis of SV by various tissues in rats

Tissues	$V_{\max}^{1)}$	$K_m^{2)}$	$V_{\max}/K_m^{3)}$
Plasma ⁴⁾	0.33 ± 0.06	21.9 ± 5.0	15.4 ± 1.4
Liver ⁵⁾	0.97 ± 0.13	203.3 ± 32.0	4.81 ± 0.61
Intestine ⁵⁾	0.24 ± 0.01	567.6 ± 15.7	0.407 ± 0.034

1) nmol/min/mg protein

2) μ M

3) 10^{-3} ml/min/mg protein

4) SV (100 μ M) was incubated at 37°C for 10 min.

5) SV (200 μ M) was incubated at 37°C for 30 min.

3. Kinetic constants

各組織中の SV から SVA への加水分解酵素の kinetic constants を Table I に示した。pH 7.2 における $V_{\max}$ 値は、血漿で 0.33 nmol/min/mg protein, 肝臓および小腸ではそれぞれ 0.97 および 0.24 nmol/min/mg protein であり、肝ミクロソームで最も高い値を示した。一方、 K_m 値は、血漿、肝臓および小腸でそれぞれ 21.9, 203.3 および 567.6 μ M であり、血漿で最小値を示した。また、代謝能を示す $V_{\max}/K_m$ 値

を比較すると血漿で最高値を示し、肝の 3.2 倍、小腸の 38 倍であった。

4. 阻害剤の影響

血漿、肝および小腸ミクロソームの SV 加水分解酵素活性に及ぼす各種エステラーゼ阻害剤ならびに基質の添加の影響について検討した結果の一部を Fig. 4~6 に示した。血漿 (Fig. 4) では、DFP の添加により加水分解反応はほぼ完全に阻害された。BNPP では、酵素反応は用量依存的

Fig. 4 Ring-opening hydrolysis of SV (100μM) by rat plasma in the presence of various reagents. Activities are given in per cent of the control values. The values represent the mean $\pm$ S.D. of 3 rats. Control values are 0.241 ± 0.056 nmol/min/mg protein. Significant differences from the control values are marked ; * ($p < 0.05$).

に阻害され、アセチルコリンエステラーゼおよびコリンエステラーゼの阻害剤である Phys の添加では高濃度でのみ阻害された。各種エステラーゼの基質を用いて同様にその影響について調べた結果、カルボキシルエステラーゼの基質である α -NA では用量依存的に阻害されたが、アセチルコリンエステラーゼおよびコリンエステラーゼの基質である ACh および BzCh によっては、何ら影響を受けなかった（データは未記載）。また、ラクトン環を持つ化合物である δ -GL および MVL の添加の影響について調べたが、SV から SVA への加水分解反応に何ら影響はみられなかった（データは未記載）。さらに、EDTA によっても酵素反応はほとんど影響を受けなかった。肝ミクロソーム (Fig.5) では、DFP および BNPP により SV の加水分解反応は用量依存的に阻害されたが、Phys では阻害されなかった。また、各特異的基質を用いてその影響を調べ

た結果、 α -NA では SV の加水分解反応は用量依存的に阻害されたが、ACh, BzCh, δ -GL および MVL によっては阻害されなかった（データは未記載）。また、EDTA では用量依存的に阻害された。一方、小腸ミクロソーム (Fig.6) では、DFP, BNPP および Phys のいずれによっても加水分解反応は阻害されなかった。さらに、アリルエステラーゼの基質である PhA によっても酵素反応は全く阻害されず、 α -NA, ACh, BzCh, δ -GL および MVL のいずれによっても同様に全く阻害を受けなかった（データは未記載）。また、EDTA では、わずかではあるが用量依存的に阻害された。

考 察

SV は pH 3.5~6.0 の範囲では安定であったが、pH 7 からアルカリ側において非酵素的に速やかに加水分解された。血漿、肝および小腸ミクロ

Fig. 5 Ring-opening hydrolysis of SV ($200\mu\text{M}$) by rat liver microsomes in the presence of various reagents. Activities are given in per cent of the control values. The values represent the mean $\pm$ S.D. of 3 rats. Control values are 0.527 ± 0.045 nmol/min/mg protein. Significant differences from the control values are marked ; * ($p < 0.05$).

ソームを用いて、各加水分解の至適 pH について検討した結果、いずれの酵素についても pH 7～8 付近であった。

アルブミンはエステラーゼ活性を持つことが知られている^{10,11)}。そこで、生体内の条件に近い4%ラットアルブミン(フラクションV)水溶液を用いて、加水分解反応を検討したが、SV はアルブミンによってわずかに加水分解を受け SVA を生成したが、その生成量は同容量の血漿を用いた場合の約12%であり、ラット血漿中でみられる高い SV 加水分解活性にはアルブミンの関与は少ないことが推察された。

各組織中加水分解酵素の kinetic constants は、各組織中酵素の至適 pH を考慮して、生体内 pH に近い pH 7.2 の条件下で測定し比較した。pH 7.2 における $V_{\max}$ 値は、血漿で $0.33\text{nmol/min/mg protein}$ 、肝臓および小腸でそれぞれ 0.97 および $0.24\text{nmol/min/mg protein}$ であり、肝ミ

クロソームで最も高い値を示した。一方、 K_m 値は、血漿、肝臓および小腸でそれぞれ 21.9 、 203.3 および $567.6\mu\text{M}$ であり、血漿で最小値を示した。代謝能を示す $V_{\max}/K_m$ 値を比較すると血漿が最も高い値を示し、肝の3.2倍、小腸の38倍であり、SV は主として血漿中で SVA へと代謝されるが、肝ミクロソーム中酵素も SV の加水分解反応に広く関与していることが推察される。これらのことから、SV は経口投与後、その多くが未変化体のまま小腸から吸収された後、肝臓に到達するまでの間に血漿中加水分解酵素によって速やかに加水分解されると思われる。加水分解を逃れた SV は肝臓においても広く加水分解されると考えられる。本結果は、以前われわれが報告した SV の経口投与後の臓器内分布試験において、小腸には SV と SVA (一部は非酵素的加水分解により生成) がほぼ同量存在し、肝および血漿中ではラクトン体はほとんど確認できなかった結

Fig. 6 Ring-opening hydrolysis of SV (200 μM) by rat intestinal microsomes in the presence of various reagents. Activities are given in per cent of the control values. The values represent the mean $\pm$ S.D. of 3 rats. Control values are 0.111 ± 0.029 nmol/min/mg protein. Significant differences from the control values are marked ; * ($p < 0.05$).

果⁷⁾を裏付けるものと思われる。

各種エステラーゼの阻害剤を用い、血漿、肝および小腸ミクロソームでの SV 加水分解反応に及ぼす影響について検討した。血漿では、有機リン剤である DFP により加水分解反応は完全に阻害され、カルボキシルエステラーゼの阻害剤である BNPP では用量依存的に阻害された。アセチルコリンエステラーゼおよびコリンエステラーゼの阻害剤である Phys は高濃度でのみ加水分解を阻害した。各種エステラーゼの基質を用いて加水分解反応に及ぼす影響を調べた結果、カルボキシルエステラーゼの基質である α -NA で用量依存的に阻害されたが、アセチルコリンエステラーゼおよびコリンエステラーゼの基質である ACh および BzCh によっては、何ら影響を受けなかった。また、 δ -GL および MVL はともに生体内に存在するラクトン環を持つ化合物であり、これらはそれぞれ δ -グルコノラクトンハイド

ロラーゼ¹²⁾ およびメバロノラクトンハイドロラーゼ¹³⁾ の特異的基質である。そこでこれら二種の基質による影響を調べたが、SV のラクトン環の加水分解反応には何の影響もみられなかった。また、金属キレート剤である EDTA の添加によっても加水分解反応は何の影響も受けなかった。有機リン剤である DFP および BNPP は、活性中心にセリン残基を持つカルボキシルエステラーゼに強く結合し、リン酸化によってその酵素活性を阻害することが知られている^{14,15)}。また、Phys はアセチルコリンエステラーゼおよびコリンエステラーゼの阻害剤であるが、ともに活性中心にセリン残基を持つコリンエステラーゼに結合し、カルバモイル化によってその酵素活性を阻害することが知られている¹⁰⁾。これらの結果から、血漿中の SV 加水分解酵素は、活性中心にセリン残基を持ったある種のカルボキシルエステラーゼである可能性が強く示唆された。肝ミクロソーム

ムでは、DFP および BNPP により加水分解反応は用量依存的に阻害されたが、Phys では阻害されなかった。各酵素の特異的基質を用いてその影響を調べたところ、 α -NA は SV 加水分解反応を用量依的に阻害したが、ACh, BzCh, δ -GL および MVL は全く阻害しなかった。また、EDTA は、加水分解反応を用量依的に阻害した。肝ミクロソーム中加水分解酵素も、血漿と同様にある種のカルボキシルエステラーゼである可能性が考えられるが、阻害パターンの違いから、血漿中加水分解酵素とは性質の異なる酵素であることが示唆された。一方、小腸ミクロソームでは、DFP, BNPP および Phys のいずれによっても SV の加水分解反応は阻害されなかった。一般に、カルボキシルエステラーゼやコリンエステラーゼは、DFP により酵素活性を著しく阻害されるが、アシルエステラーゼの活性は DFP では阻害されないことが知られている¹⁴⁾。そこで、アシルエステラーゼの基質である PhA を用いて、酵素活性に及ぼす影響を検討したが、SV の加水分解は阻害されなかった。同様に δ -GL や MVL などの基質による影響も調べたが、いずれによっても加水分解反応は阻害されなかった。また、EDTA による金属イオンの影響を調べたが、その阻害作用は弱い加水分解反応を用量依的に阻害した。これらの結果は SV の小腸での加水分解が、カルボキシルエステラーゼあるいはラクトンハイドロラーゼとは別の酵素によって起こっている可能性が考えられる。なお、肝および小腸ミクロソームでみられた EDTA による阻害効果は加水分解酵素に金属イオンが存在するのか、あるいは co-factor として必要であるのかは現在不明である。

本研究の結果より、SV は主として血漿中カルボキシルエステラーゼによって加水分解され、また、各組織中のエステラーゼはおおの性質が異なっており、特に小腸の加水分解酵素は、血漿および肝臓中の酵素とは全く性質の異なる酵素である可能性が示唆された。現在、この特異的な小腸エステラーゼの精製について検討を進めている。

要 約

雄性 Sprague-Dawley 系ラットの血漿、肝臓

および小腸ミクロソームを用いて、simvastatin (SV) からそのオープンアシッド体 (SVA) への加水分解酵素の性質について比較した。

1. SV は pH 3～6 の範囲では、37℃, 30 分間のインキュベーションによっても非酵素的加水分解をほとんど受けなかったが、pH 8 以上では速やかに加水分解された。

2. 血漿、肝および小腸ミクロソームの加水分解酵素活性に及ぼす pH の影響を調べた結果、血漿、肝および小腸ミクロソームでの至適 pH は 7～8 付近であった。

3. 各組織での pH 7.2 における V_{max} 値は、血漿で 0.33 nmol/min/mg protein であり、肝臓および小腸ではそれぞれ 0.97 および 0.24 nmol/min/mg protein であった。Km 値は、血漿、肝臓および小腸でそれぞれ 21.9, 203.3 および 567.6 μ M であった。 V_{max}/K_m 値を各組織間で比較すると血漿が最高値を示し、肝の 3.2 倍、小腸の 38 倍であった。

4. 各種のエステラーゼ阻害剤を用いて、SV から SVA への加水分解反応に及ぼす影響を調べた。血漿では、diisopropyl fluorophosphate (DFP) の添加によりその加水分解反応はほぼ完全に阻害され、bis (p-nitrophenyl) phosphate (BNPP) では用量依的に阻害された。また、physostigmine (Phys) では、高濃度の添加によるのみ阻害された。肝臓では、DFP および BNPP により用量依的に阻害されたが、Phys では何ら影響を受けなかった。一方、小腸では、DFP, BNPP および Phys のいずれによっても加水分解反応は阻害されなかった。また、EDTA の添加により、肝臓および小腸での加水分解反応は用量依的に阻害されたが、血漿では何ら影響を受けなかった。血漿中の SV 加水分解酵素は、その活性中心にセリン残基をもつある種のカルボキシルエステラーゼの可能性が示唆された。肝ミクロソームでの SV の加水分解反応にもカルボキシルエステラーゼの関与が示唆されたが、血漿中酵素とは性質が異なると思われた。一方、小腸ミクロソームでの加水分解反応は、血漿および肝ミクロソームとはまったく性質の異なる加水分解酵素の関与が示唆された。

文 献

- 1) Hoffman, W.F., Alberts, A.W., Anderson, P.S., Chen, J.S., Smith, R.L. and Willard, A.K. : 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. 4. side chain ester derivatives of mevinolin. *J. Med. Chem.*, **29** : 849-852 (1986).
- 2) Alberts, A.W., Chen, J., Huff, J., Hunt, V. and Kuron, G. : Comparative studies on the hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors mevinolin, MK-733, and CS-514. Proceedings of the 8th Intl. Symp. *Drugs Affect Lipid Metab. (Florence)*, : **8** (1986).
- 3) Ishida, F., Sato, A., Iizuka, Y., Sawasaki, Y., Aizawa, A. and Kamei, T. : Effects of MK-733, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, on absorption and excretion of [^3H]cholesterol in rabbits. *Biochem. Biophys. Acta.*, **963** : 35-41 (1988).
- 4) Kobayashi, M., Ishida, F., Takahashi, T., Taguchi, K., Watanabe, K., Ohmura, I. and Kamei, T. : Preventive effect of MK-733 (simvastatin), an inhibitor of HMG-CoA reductase, on hypercholesterolemia and atherosclerosis induced by cholesterol feeding in rabbits. *Japan J. Pharmacol.*, **49** : 125-133 (1989).
- 5) 中谷矩章, 五島雄一郎 : 抗高脂血症剤 MK-733の第I相臨床試験(第1報) 健康人における単回投与および連続投与試験成績. *臨床医薬*, **5** : 1097-1121 (1989).
- 6) Vickers, S., Duncan, C.A., Chen, I.-WU, Rosegay, A. and Duggan, D.E. : Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug. *Drug Metab. Dispos.*, **18** : 138-145 (1990).
- 7) 内山尚孝, 斉藤由子, 加々見弥生, 原 健一, 斉藤 郁, 沢崎芳男, 大多和昌克 : 高脂血症治療薬 Simvastatin の体内動態(第1報) : ラットにおける単回投与後の吸収・分布・代謝・排泄. *薬物動態*, **5** : 133-149 (1990).
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275 (1951).
- 9) 中村隆雄 : 酵素一反応速度論と機構, 学会出版センター : 92-95 (1986).
- 10) Williams, F.M., Mutch, E. and Blain, P.G. : Esterase activity in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **41**(4) : 527-531 (1991).
- 11) Ohta, N., Kurono Y. and Ikeda, K. : Esterase-like activity of human serum albumin II : reaction with N-trans-cinnamoylimidazoles. *J. Pharmac. Sci.*, **72** : 385-388 (1983).
- 12) Kawada, M., Kagawa, Y., Takiguchi, H. and Shimazono, N. : Purification of 6-phosphogluconolactonase from rat liver and yeast ; its separation from gluconolactonase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **57** : 404-407 (1962).
- 13) Wiley, M.H., Huling, S. and Siperstein, M.D. : Conversion of mevalonolactone to its open-chain salt by a serum enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88** : 605-612 (1979).
- 14) Brandt, E., Heymann, E. and Mentlein, R. : Selective inhibition of rat liver carboxylesterases by various organophosphorus diesters *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, **29** : 1927-1931 (1980).
- 15) Mackness, M.I. : Commentary, 'A'-esterases-Enzymes looking for a role. *Biochem. Pharmacol.*, **38**(3) : 385-390 (1989).