dexamethasone 21-palmitate の生体各種試料による加水分解

岡本浩之・渡辺正弘・大柳治正・斎藤洋一*

In vitro Hydrolysis of Dexamethasone 21-palmitate Dexamethasone 21-palmitate (DP) is a main ingredient of Liposteroid which is an injectable anti-inflammatory preparation, in a form of fat emulsion. DP is considered to be a pro-drug. Many steroid esters used therapeutically are known to be rapidly hydrolyzed *in vivo*. However, the hydrolysis rate of steroid esters vary with chain length. It is, therefore, very important to know the hydrolysis rate of DP and tissue distribution of hydrolyzing enzymes in relation to its pharmacology, toxicity and metabolism *in vivo*. The hydrolyzing activities were found in serum, liver and macrophages of rat and also in liver and monocytes of human. The affinity of DP to the enzymes is very low and DP was found to be more slowly hydrolyzed *in vitro*. DP is likely to be hydrolyzed by non-specific carboxylesterases. These results suggest that DP is hydrolyzed gradually and continuously to dexamethasone and exhibits a more prolonged activity *in vivo*.

Hiroyuki Okamoto・Masahiro Watanabe・Harumasa Ohyanagi・Yohichi Saitoh
First Department of Surgery, Kobe University, School of Medicine

副腎皮質ホルモンは1951年小田ら¹⁾が、わが国ではじめて臨床使用して以来、強力な抗炎症効果と免疫抑制作用などの薬理作用を有することと、その適応症の広さから多種多様の合成副腎皮質ホルモン剤が臨床使用されてきた。近年、その副作用と離脱の困難さから、その使用は非ステロイド性抗炎症剤にとってかわられつつある。しかし、本剤の確実かつ強力な薬効は捨てがたく、副作用が軽減できるような製剤の工夫が望まれている。

その一つとして、最近、副腎皮質ホルモンの効果と副作用の分離を指向した薬剤 (Liposteroid, LS) の開発が試みられている。LS は主薬である dexamethasone 21-palmitate (D-PAL) を油相に溶解させた注射用脂肪乳剤であり、病巣部位への積極的集積と持続効果に伴う投与回数の低減化を特徴としている^{2,3)}。

一方、dexamethasone (D) などの副腎皮質ホルモン剤は可溶化するため、種々のエステル体が必要であるが、その薬理作用はエステルの種類⁴⁻⁶⁾や投与部位⁷⁾によって差があることが報告されている。これはエステルの加水分解の難易性と関係し、生体内で速やかに加水分解されるエステル体ほど効力が強いことが知られている^{8,9)}。

この加水分解には、大部分エステラーゼが関与している。corticosteroid esters とエステラーゼとの加水分解に関しては、炭素鎖長が10以下のものについては報告されているが^{8,9)}、D-PAL のような長鎖エステルについて報告はほとんどない⁹⁾。このような事実から、D-PAL はプロドラッグと推定されている。

今回、本剤が臨床使用された際、ヒト生体内でどの部位でどの程度活性型に変換されるかを明らかにする目的で、ヒト血漿、肝、マクロファージ(Mφ)を用い *in vitro* での加水分解の有無を検討し、ラットでの活性と比較検討した。

材料と方法

(1) 試薬

D-PAL, LS およびウシ胎仔血清はミドリ十字から与えられたものを、Dおよび methyl prednisolone (MP) はそれぞれルセル・ユクラフ (フランス) およびコートラム (ポルトガル) から購入したものを使用した。RPMI 1640 培地は日水製薬製を使用した。carboxyl esterase (160単位/mg 蛋白, ブタ肝由来) は Sigma 社製のものを、エステラーゼ阻害剤である diisopropyl fluorophosphate (DFP) は, Fluka 社製のものを、*p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB) は 和光純薬製のものをそれぞれ使用した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

(2) 動物

Sprague-Dawley (SD) 系、体重 200~250 g、雌性ラットを使用した。

(3) 酵素原

① 血漿

ラットについては、ラットをクロロホルム麻酔下、ヘパリン化注射筒を用い心臓採血し、また、ヒトについては、健常男子成人3名の肘静脈からヘパリン化注射筒で採血した。それぞれの血液から遠心分離 (3,000 rpm × 20 min) により血漿を得、これを試験に供した。

* 神戸大学医学部第一外科学教室

② 肝ホモジネイト

ラットについては、ラットを断頭放血致死後、肝を摘出した。また、ヒトについては、肝癌患者からの切除肝で、癌組織からできるだけ離れた正常肝と思われる部分を選出した。それぞれの肝湿重量の4倍容の0.25 M ショ糖溶液を加え、氷冷下 Potter-Elvehjem 型テフロンホモジナイザーにより均質化し、これを試験に供した。

③ 肝細胞内分画

肝湿重量の9倍容の0.25 M ショ糖溶液を加え、氷冷下 Potter-Elvehjem テフロンホモジナイザーで均質化し、de Duve ら¹⁰⁾の方法に準じ、遠心分離法により、mitochondra (Mt), microsome (Ms), および cytosol (Cy) に分画した。

④ マクロファージ (Mφ)

ラット腹腔 Mφ の調製は以下の方法で行った。2% Casein をラット腹腔へ 10 ml 投与し、72 時間後に冷 Hanks 液を用いて腹腔細胞を採取した。Hanks 液で洗浄後、Mφ 分離用キット付属の培養液に浮遊させ、Mφ 分離用シャーレに加え、5% CO₂ 中 37°C で1時間インキュベーションした。冷 Hanks 液で非附着細胞を取り除き、氷冷した剥離液を加え、4°C 30 min インキュベーションした。回収した細胞を 10% 胎仔ウシ血清 (FCS) 加 RPMI 1640 培地で洗浄後、同培地に浮遊させ、これを試験に供した。

一方、ヒトの Mφ の調製は以下の方法で行った。健康成人末梢静脈よりヘパリン採血後、buffy coat を Ficoll-Conray 400 に重層し、1,500 rpm で 30 min 遠心し、単球、リンパ球画分を採取した。RPMI 培地で5回洗浄し、10% FCS 加 RPMI 1640 培養液に浮遊させた。この浮遊液を plastic dish に添加 (2×10⁷/12 ml) し、5% CO₂ 中 37°C で 17 時間静置した。附着細胞を dish から剥離し、上記培養液に浮遊させた。これを再び plastic dish に添加し、同様の操作で 1.5 時間静置し、得られた附着細胞を単球源とした。一方、第1回附着操作による未吸着細胞を回収し、再度 5% CO₂ 中に 37°C で 1.5 時間静置し、この未吸着細胞をリンパ球とした。また、Ficoll-Conray による遠心分離で得た顆粒球画分を 0.87% 塩化アンモニウム液を用い、溶血処理後、RPMI 培養液で洗浄し、これを顆粒球画分とした。

(4) 蛋白の定量

Lowry ら¹¹⁾の方法で行った。

(5) デキサメタゾンの定量

加水分解産物 (デキサメタゾン) は、高速液体クロマトグラフ法で定量した。その条件は以下のとおりである。カラム; Lichrosorb RP-18 (5 μm) を充填した 4 mm (i.d.)×25 cm カラム (Merck 社)。移動相; テトラヒドロフラン/水=35/65 (v/v)。流速; 0.6 ml/min。検出; 254 nm, 0.04 AUFS。内部標準物質; メチルプレ

図 1 high-performance liquid chromatographic pattern of dexamethasone

MP: methyl prednisolone (I.S.)
Dexa: dexamethasone limit of detection: 0.02 μg/ml. limit of quantitative analysis: 0.05 μg/ml conditions for HPLC were as follows:

column: 4 mm φ × 25 cm
length column packed with Lichrosorb RP-18 (5 μm) (Merck)
mobile phase: THF/water = 35/65 (V/V) flow rate: 0.6 ml/min
detection: 254 nm

ドニゾロン (MP)。

実験結果

(1) 液体クロマトグラフ法によるデキサメタゾンの定量

D-PAL の加水分解生成物である D を高速液体クロマトグラフ法で定量した。図 1 に示した典型的なクロマトグラムから明らかなように、D と MP (IS) の保持時間はそれぞれ 11.80 分および 10.13 分であり、良好な分離を示した。なお、本条件で D-PAL は溶出されない。検量線は D と MP の重量比で 0.1~20 まで、そのピーク面積比は直線性を示した。

(2) 加水分解活性

① 血漿での加水分解

D-PAL は、健康成人血漿でその基質濃度を 1.0 mM まで増加しても水解されなかった。しかし、ラット血漿では反応時間、基質濃度依存的に D の遊離が認められた (図 2)。

② 肝での加水分解

D-PAL は、肝ホモジネイトで基質濃度および反応時間依存的に加水分解され、D を遊離した。その比活性はラットのほうがヒトより約 2 倍程度高かった (図 3)。図 4 は、肝 Ms, Mt および Cy 各画分での D-PAL の加水分解速度と基質濃度との関係を示す。ラット、ヒトともに Mt 画分および Cy 画分の加水分解活性は弱く、活性の大部分は Ms 画分に存在していた。この条件下ではラットとヒトの活性はほぼ同程度で大きな差は認められなかった。

図2 *in vitro* hydrolysis of dexamethasone palmitate by plasma

図3 *in vitro* hydrolysis of dexamethasone palmitate by liver homogenate in rat (A) and in human (B)

Liver homogenate and substrate (0.25~1.0 mM) was incubated in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 60 min. and released dexamethasone was determined by a HPLC method.

③ Mφ などによる加水分解

ラット腹腔 Mφ およびヒト単球, リンパ球および顆粒球における D-PAL の加水分解速度と基質濃度との関係を示す (図5)。

ヒト由来の細胞間の比較では, 単球の活性がもっとも高く, ついでリンパ球, 顆粒球の順であった。リンパ球と顆粒球とでは, 大きな差は認められなかった。また, ラット腹腔 Mφ とヒト末梢血由来単球は, ほぼ同程度の活性が認められた。各組織の D-PAL に対する Lineweaver-

表1 kinetic parameters for dexamethasone palmitate in some enzymatic sources

sources	species	K _m (M)	V _{max} n moles·min ⁻¹ · (mg protein) ⁻¹
plasma	rat	(a) 4.9×10^{-4}	0.044
	human	(e) —	—
liver homogenate	rat	(a) 4.4×10^{-4}	0.24
	human	6.0×10^{-4}	0.17
liver microsomes	rat	(b) 1.8×10^{-4}	0.44
	human	8.4×10^{-5}	0.30
macro phages	rat (peritoneal)	(c) 1.7×10^{-5}	(d) 2.4
	human (peripheral)	1.2×10^{-5}	1.7

Data were obtained by Lineweaver-Burk plots using

- (a) 0.25 to 1.0 mM,
- (b) 25 to 500 μ M, and
- (c) 5 to 100 μ M of dexamethasone palmitate
- (d) n mol·min⁻¹·(10⁹ cells)⁻¹
- (e) Negligible esterase activity was found

表2 effects of several inhibitors on rat liver esterase activity

inhibitor	concentration(M)	% of inhibition
DFP	10^{-5}	7.7
	10^{-4}	45.3
	10^{-3}	93.9
PCMB	10^{-5}	11.5
	10^{-4}	48.7
	10^{-3}	64.1
cholesterol oleate	3.5×10^{-6}	18.8
	3.5×10^{-5}	47.9

DFP: diisopropylfluorophosphate

PCMB: *p*-chloromercuribenzoic acid

Rat liver homogenate was incubated at a concentration of 3.5 μ M Dexamethasone palmitate with or without each inhibitor and inhibition rate was calculated.

Burk plots から得た K_m および V_{max} を表1に示す。K_m は 10^{-4} ~ 10^{-5} M の範囲であった。

(3) 阻害剤の影響

ラット肝ホモジネイトでの D-PAL の加水分解活性に対する 3 種の酵素阻害剤の影響を表2に示す。有機リン剤である DFP は, 10^{-3} M で 90% 以上の阻害がみられたのに対し, 有機水銀剤である PCMB は同濃度で約60%阻害した。cholesterol oleate による阻害は基質である D-PAL の10倍高濃度である 35 μ M 加えたときにも 50%以下の阻害であり, cholesterol oleate による影響は小さかった。

図4 subcellular distribution of enzymatic activity hydrolyzing dexamethasone palmitate to dexamethasone in rat liver(A) and in human liver (B)

Each fraction was incubated with dexamethasone palmitate in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 20 min. Released dexamethasone was determined by a HPLC method.

考察

近年、薬物の効力を調節したり、副作用を軽減する目的で、種々な製剤の工夫がなされてきている。エステル結合を有するプロドラッグの開発も比較的容易にできる製剤の工夫の一つである。

D-PAL を主薬とする LS は、静注剤であり、ラットアジュバント関節炎における抗炎症作用、抗体産生抑制能、白血球遊走阻止作用など²²⁾が市販のリン酸デキサメタゾン製剤に比し2～5倍強いことから、病巣部位へ積極的に集積しやすい薬剤と考えられている。したがって、D-PAL の代謝・薬効・毒性を知るうえで、どの組織でどの程度加水分解され活性化されるかを調べることは重要である。今回、本薬物の投与経路や体内分布上重要と推定される血漿・肝およびMφでの加水分解の程度をラットおよびヒトにつき検討した。

まず、D-PAL は、ラット血漿および肝ホモジネイトでそれぞれ0.044 および 0.24 nmol · min⁻¹ · (mg protein)⁻¹ の速度で加水分解されDを遊離し、有機リン剤で著明に阻害され、有機水銀剤であまり強く阻害されないことから、D-PAL は、エステラーゼの一種である非特異的カルボキシエステラーゼBで、加水分解されると推定された。

D-PAL は、健常人血漿でほとんど加水分解されな

図5 *in vitro* hydrolysis of Liposteroid by rat peritoneal macrophages (A) and human peripheral macrophages (B)

Each cell fraction suspended in RRMI medium containing 10% bovine fetus serum was incubated with substrate (10% soybean oil emulsion containing dexamethasone 21-palmitate in oil phase) at 37°C for 17 hours under 5% CO₂ atmosphere.

ったが、ラットでは 0.044 nmol · min⁻¹ · (mg protein)⁻¹ で水解された。これはヒト血漿エステラーゼは、ラットのそれと基質特異性が異なること、および活性が約1/1,000程度しかないこと¹²⁾によると考えられる。

一方、D-PAL は、ラット肝ホモジネイトおよび Ms で比較的良好に加水分解され、その活性は血漿の6～60倍強く、ヒトにおいてもラットとほぼ同程度の活性を有した(表1)。

今回行ったラット肝 Ms の D-PAL に対する Km 値 (0.8～1.8 × 10⁻⁴ M) および V_{max} 値 (0.3～0.44 n mol · min⁻¹ · (mg protein)⁻¹) は、Hattori ら¹³⁾のラット肝 Ms から精製したステロイドホルモンの methylprednisolone 21-hemisuccinate や 21-acetate に対する Km 値とはほぼ同じであったが、V_{max} 値は 10⁻¹～10⁻³ と低く、Schöttler ら⁹⁾の豚肝 Ms 中のカルボキシエステラーゼの corticosterone 21-acetate, methylprednisolone 21-diethylaminoacetate および 11-deoxycorticosterone 21-acetate に対する Km 値の約1/10であったが、V_{max} 値は 10⁻³～10⁻⁴ ときわめて小さな活性を示したにすぎなかった。これはカルボキシエステラーゼは炭素鎖長がなが

くなるほど水解活性が弱く、炭素数14以上の長鎖脂肪酸エステルをほとんど加水分解しないこと⁸⁾とよく一致した。

さらに、LSは静注後肝・脾・骨髓などの網内系や、炎症部位のMφなどに貪食されること²⁾から、ラット腹腔Mφやヒト末梢血由来単球などでの加水分解活性を調べた。ラットMφおよびヒト単球は、D-PALをそれぞれ $1.7 \text{ n mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (10^9 \text{ cells})^{-1}$ および $2.4 \text{ n mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (10^9 \text{ cells})^{-1}$ で水解することが明らかとなった。

以上の成績および考察から、脂肪乳剤の形態で静注されたD-PALは、ヒト血漿ではほとんど加水分解を受けず、肝・脾など網内系や炎症巣などに主に取り込まれ、そこでカルボキシエステラーゼ様酵素で緩徐に加水分解され活性型のDに変換し、その一部はその部位で、他の一部は血液を通り、他の組織に移行し、その生物活性を発揮すると考えられる。

文 献

- 1) 小田俊郎, 梅原千治: コルチゾンによる慢性リウマチの治験例. 臨床 4: 788, 1951.
- 2) Mizushima, Y., Hamano, T., Yokoyama, K.: Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. Ann. Rheum. Dis. 41: 263, 1982.
- 3) Mizushima, Y., Kaneko, K., Hoshi, K.: Targeting steroid therapy in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 42: 479, 1983.
- 4) 北川晴雄, 毛利哲郎, 北川正敏: Dexamethasone, Prednisolone 各エステルの比較研究, リン酸および硫酸エステルの抗 Carrageenin 浮腫効果とステロイドの血中濃度変化. 薬学雑誌 91(8): 909, 1971.
- 5) 増岡通夫, 近藤貴雄, 堀 龍彦, 松沢 允, 中山亮, 島本暉朗: Dexamethasone 21-phosphate, および 21-sulfate の cotton-pellet 法による抗炎症作用ならびに酵素による加水分解 (*in vitro*) の比較検討. 薬理と治療 2(10): 1611, 1974.
- 6) 中村 毅, 宮保 進: 合成副腎皮質ステロイドの代謝. (2) 静注用 Dexamethasone のエステルによる差. 臨床薬理 10(4): 601, 1979.
- 7) McKenzie, A.W., Atkinson, R.M.: Topical Activities of Betamethasone Esters in Man. Arch. Derm. 89: 741, 1964.
- 8) O'Neill, R.C., Carless, J.E.: Influence of side chain on the hydrolysis of some hydrocortisone esters. J. Pharm. Pharmacol. 32(12): Suppl. 10p, 1980.
- 9) Schöttler, C., Krisch, K.: Hydrolysis of steroid hormone esters by an unsepcific carboxylesterase from pig liver microsomes. Biochem. Pharmacol. 23: 2867, 1974.
- 10) De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Applemans, F.: Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem. J. 60: 604, 1955.
- 11) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
- 12) Hashinotsume, M., Higashino, K., Hada, T., Yamamura, Y.: Purification and Enymatic Properties of Rat Serum Carboxylesterase. J. Biochem. 84(6): 1325, 1978.
- 13) Hattori, K., Kamio, M., Nakajima, E., Oshima, T., Satoh, T., Kitagawa, H.: Characterization of Steroid Hormone Ester Hydrolyzing Enzymes in Liver Microsomes. Biochem. Pharmacol. 30(15): 2051, 1981.