薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (5) 300-305 (1989)

抱合型薬物の代謝研究 (第2報¹⁾) 3-デオキシエストラジオール
17-サルフェート その2 その可能な代謝物の高速液体
クロマトグラフィーによる定量法の確立

渡辺一弘,^a 和田裕爾,^a 黒沢隆夫,^b 藤間貞彦,^b 吉沢逸雄*,^a
北海道薬科大学,^a 東日本学園大学薬学部^b

Studies on the Metabolism of Conjugated Drugs. II.¹⁾ 3-Deoxyestradiol
17-Sulfate. (2). Analytical Procedure for Determination by
High-Performance Liquid Chromatography
of Potential Metabolites

Kazuhiro WATANABE,^a Yuji WADA,^a Takao KUROSAWA,^b
Masahiko TOHMA,^b and Itsuo YOSHIZAWA*,^a
*Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences,^a Katsuraoka-cho, 7-1,
Otaru, Hokkaido, 047-02, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Higashinippon-Gakuen University,^b Ishikari-Tobetsu,
Hokkaido, 061-02, Japan*

(Received November 16, 1988)

To investigate the metabolic pattern of such a drug having two counter functional groups in the molecule: a hydrophilic sulfate group and a hydrophobic aromatic ring, as 17-sulfate of 17 β -hydroxyestra-1,3,5(10)-triene (3-deoxyestradiol) was incubated with rat hepatic microsomes under a reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-generating system. The metabolites assigned were mono- and dihydroxylated products hydroxylated only at the aromatic ring. The phenolic products having hydroxyl group at the position 2, 3, or 4 were detected in the male and female rats. The two catechol products having hydroxyl groups at 2, 3 and 3, 4 were detected only in the male rats. No other metabolites were formed except a phenol product hydroxylated at the position 1 in the case of the male rats. These metabolisms were confirmed to proceed without removal of the sulfate group.

A simple method for the determination of these metabolites was established by using reversed-phase high-performance liquid chromatography. The devised technique involves an elution with a mixture of 0.5% NH₄H₂PO₄ (pH 3.0) and methanol on a TSK-Gel ODS-120A column with electrochemical and/or ultraviolet detectors.

Keywords—conjugated drug; metabolism; 17 β -hydroxyestra-1,3,5(10)-triene (3-deoxyestradiol); 17 β -hydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (3-deoxyestradiol 17-sulfate); estrogen conjugate; rat liver microsome; HPLC

緒 言

薬物をはじめとする脂溶性の化合物が生体に取り込まれると、一般的にはまず、水酸基のような極性官能基の導入 (phase I 反応) を、ついでその抱合 (phase II 反応) という順序で代謝を受ける。ところが、内因性ステロイドホルモンの場合、特にその生合成経路においては、薬物の代謝パターンとは逆に、phase II 反応が先行するような代謝経路がごく普通に見られる。

ステロイド類のサルフェートも通常の遊離型のそれと同様に、酸化、還元あるいは異性化などを受けるが、その代謝は抱合基の影響を受けて位置特異的、立体特異的になるのが普通である。²⁾ 水酸化の場合は、硫酸抱合基か

らより離れた lipophilic 部位に起きるようだし,³⁻⁵⁾ 2重結合の還元, 例えばテストステロンの場合などは, 17位の抱合基の有無によって還元生成物の立体配位までもが大きく影響される.^{6,7)} 分子内に存在する抱合基は, ステロイド代謝を調節しているとも考えられる.

ステロイドホルモンに見られるこのような抱合型分子への官能基の導入が, 仮に薬物の代謝においても起きるならば, その代謝パターンは通常の phase I→II の経路でのそれとは異なると予想される.¹⁾ このような可能性を調べるために, 著者らは 17 β -hydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (3-deoxyestradiol 17-sulfate, **1**) をモデル化合物として選び, その代謝研究を計画した.

1 に注目した理由は前報¹⁾に述べたように次の 4 点に立脚している. ① 3-Deoxyestradiol が lipid-shifting 剤として実際に医薬品として使われていた.⁸⁾ ② 3-Deoxyestradiol の代謝については, 南原ら⁹⁻¹²⁾が家兎を使って詳細に検討しており, その結果が大いに参考になる. ③ 著者らが行ってきた estradiol 17-sulfate (**5**) の代謝の成果^{13,14)}が有効に利用できる. ④ 代謝を受けると **1** の大半は女性ホルモンのエストロジェンやカテコールエストロジェンに変換すると予想され, 薬物の薬理作用と代謝物の生理作用の相互作用に興味が持たれる.

1 の代謝研究においては, 代謝産物は硫酸抱合基が保持されたまま分析することが重要で, それらを遊離型にする操作はできるだけ避けたい. 加水分解操作の導入による代謝物の分解は避けがたく, そのためいきおい分析法は繁雑になるからである. 作業のスピードアップは, 酵素レベルの代謝を検討する場合には特に重要である. 多数の試料を簡便かつ迅速に処理する必要があるし, また, 多数の代謝物の生成が予想されるので, 可能な限り, それらの一斉分析法の確立が望ましい. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析は, このような要件を満たす最適な方法と思われる.

本論文は薬物の分子骨格の両端にそれぞれ親油基と親水基を持ち合わせた化合物 (**1**) が, ラット肝ミクロゾーム (Mic) でどのような代謝を受けるかを大まかに調べたもので, 代謝物の分析には HPLC による簡便な測定法を開発した.

実験材料及び方法

ステロイド化合物・試薬・溶媒類 用いたステロイドサルフェート類 (**1**—**9**) とそれらの合成法の出典については Table I にまとめた. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) 及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G-6-PDH) はオリエンタル酵母社製, Sep-pak C₁₈ カートリッジは Waters 社 (Milford, MA, U.S.A.) 製及びカラムガードは Millipore 社 (Bedford, MA, U.S.A.) 製を用いた. その他の試薬, 溶媒類はいずれも市販特級品をそのまま用いた.

ミクロゾーム (Mic) の調製 Wistar 系ラットのオス (体重約 240 g) 及びメス (体重約 200 g) を用いた. ラットは固形飼料 (オリエンタル酵母社, MF) と水を自由に摂取させ, 絶食させることなく飼育したものをを用いた. ラットは頸動脈切断によって殺し瀉血. 除血のため, 冷 1.15% KCl 水溶液で腹部下大動脈より灌流した後, 直ちに肝臓を摘出した. 肝の一定量に 2 倍量の 1.15% KCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え, Potter-Elvehjem 型のテフロンホモジナイザーを用いて, ホモジネートを調製した. ホモジネートを, 10000×g で 20 分間遠心分離し, その上清をさらに 105000×g, 60 分間遠心分離した. 沈渣は 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に懸濁させ, これを Mic 画分とした. Mic のタンパク量はウシ血清アルブミンを標準品として, Lowry らの方法¹⁷⁾で測定した.

インキュベーション及び後処理 反応液は, Mic 懸濁液 (1 mg タンパク相当), 90 mM KCl, 0.1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 5 mM G-6-P, 0.5 mM NADP, 5 mM MgCl₂, 0.6 unit G-6-PDH, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 及び基質 **1** 100 μ M からなり, その全量は 1.0 ml とした. 反応液は 37°C, 大気中で 30 分間, インキュベートした. 対照実験には Mic 無添加系を用いた. インキュベーション終了後, 反応液にアスコルビン酸 (約 1 mg) 及び内部標準物質 (**9**, 1.0 μ g) を加え, ついで反応液の加熱 (沸騰水浴中, 1 分間) により反応を停止した. これを 1500×g で 10 分間遠心分離, 得られた上清を Sep-pak C₁₈ カートリッジに付し, 水洗 (2 ml) 後, メタノール (4 ml) でステロイド化合物を溶出させた. メタノール溶出液は 40°C, N₂ 気流下で乾固. 得られた残渣はメタノール 100 μ l に溶解後, いったんカラムガードで汙過, 汙液の一定量を HPLC に注入した.

反応液のエーテル抽出 反応液の一部はエーテルで連続抽出 (48 時間) し, 抽出液を水洗, 乾燥後, HPLC¹⁸⁾ に付した.

HPLC 本体は 803D 型高速液体クロマトグラフ (東ソー, 東京) を用い, カラムには TSK-Gel ODS-120A ($5\ \mu$, $250 \times 4.6\ \text{mm i.d.}$, 東ソー) を使用. カラムは循環温水浴中で 40°C に保った. 検出器には電気化学検出器 (ECD) として EC-8 型 ($0.9\ \text{V vs. Ag/AgCl}$, 東ソー) を, また紫外外部吸収検出器 (UVD) として Uvidec 100-II 型 ($280\ \text{nm}$, 日本分光, 東京) の 2 種を用いた. 移動相には 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH } 3.0$) とメタノールの混液 ($55:45$, v/v) を用い, 流速は $1.10\ \text{ml/min}$ に保った.

定量法 ① 標準曲線——代謝物の定量法には内部標準法を採用, 内部標準物質には **9** を用いた. 内部標準物質の一定量を含有した標品の各サルフェートのメタノール溶液を HPLC に注入, 内部標準物質に対する各サルフェートの添加量の比とピークの面積比との関係をプロットした. 各サルフェートの濃度の異なったメタノール溶液 (6 種) を作製, それぞれ 5 回の実験を行って, その平均値を用いた. 各標準曲線については, 下表のような結果が得られた.

化 合 物	回帰直線式	相 関 係 数
2	$y=1.158x-0.008$	1.000
3	$y=1.123x+0.021$	1.000
4	$y=0.682x+0.053$	0.999
5	$y=0.816x+0.000$	1.000
6	$y=0.635x-0.001$	1.000

y , ピーク面積比; x , 添加量の比

② 回収率——基質を含まない反応液に標品の各サルフェートの一定量を添加, 直ちに熱処理後, 内部標準物質を添加, Sep-pak C_{18} カートリッジで処理し, HPLC に注入.

TABLE I. The Structures of Authentic Steroids

Sulfates	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
17 β -Hydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (1) ¹⁾	H	H	H	H	H
2,3,17 β -Trihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (2) ^{1b)}	OH	OH	H	H	H
3,4,17 β -Trihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (3) ^{1b)}	H	OH	OH	H	H
2,17 β -Dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (4) ¹⁾	OH	H	H	H	H
3,17 β -Dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (5) ¹⁾	H	OH	H	H	H
4,17 β -Dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (6) ¹⁾	H	H	OH	H	H
6 α ,17 β -Dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (7) ¹⁾	H	H	H	OH	H
6 β ,17 β -Dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (8) ¹⁾	H	H	H	H	OH
2-Methoxy-3,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (9) ^{1b)}	OCH_3	OH	H	H	H

結果及び考察

標品サルフェート及び生成物の HPLC

はじめに、代謝物と予想される標品サルフェートを用い、それらの HPLC による分離条件を検討した。代謝物の検出には基質と同様に UVD が使えるが、これは感度の点で十分ではない。一方、ECD は感度の点で UVD より勝れているが、芳香環の水酸化されたフェノールあるいはカテコールしか検出できない。したがって、検出には UVD と ECD の 2 種を適時使い分けた。

Fig. 1 (a) には **1** の代謝物として予想される標品及び内部標準物質 (**9**) の HPLC を示した。実線あるいは点線で示したピークは、それぞれ ECD と UVD の両検出器で、あるいは UVD のみで検出されるサルフェートを示している。各ステロイドはいずれも十分に分離し、それらの定量が可能となった。

Fig. 1 の (b) と (c) に、オス及びメスラット肝 Mic による **1** の生成物の HPLC を示した。オス、メス共に芳香環の水酸化された代謝物として、A 環 **2**, **3** 及び **4** 位の水酸化されたモノヒドロキシ体 (**4**, **5** 及び **6**), **2** 及び **3** 位の双方が水酸化されたカテコール (**2**) の生成が見られる。オスの場合には、わずかではあるが明らかに **3,4**-カテコール (**3**) の生成も認められる。さらに、オスでは標品のサルフェートのいずれとも一致しない生成物のピーク (**10**) が認められるが、これは ECD で検出されること、その保持時間がフェノール性化合物の領域にあるこ

Fig. 1. HPLC of Authentic Conjugates (a), Incubation Products of 17β -Hydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-Sulfate (**1**) of Liver Microsomes from Male (b) and Female (c) Rats

1: 17β -Hydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **2**: 2,3,17 β -trihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **3**: 3,4,17 β -trihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **4**: 2,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **5**: 3,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **6**: 4,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **7**: 6 α ,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **8**: 6 β ,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate; **9**: 2-methoxy-3,17 β -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-sulfate (internal standard); **10**: unknown metabolite; AsA: ascorbic acid.

とから、芳香環の 1 位が水酸化された代謝物と推定される。

一方、6 位水酸化代謝物 (7 又は 8) は全く検出されなかった。

以上の結果から、1 はラット肝 Mic の酵素系の基質になり得ること、しかしその代謝は、恐らく 17 位硫酸抱合基の影響を受けたためと思われるが、芳香環に限定されることが分かった。

定量法の検討

ラット肝 Mic による 1 の代謝は芳香環の水酸化であり、生成物はフェノールあるいはカテコールと判明したので、ECD を用いてこれらの定量条件を検討した。

定量は内部標準法により行い、内部標準物質として 9 を用いた。同法による標準曲線は、いずれの化合物 (2—6) の場合も 0.05—2.50 μg (注入量: 20 μl) の範囲で直線性を示し、その範囲での定量が可能になった。

次に標品各サルフェートの全操作過程における回収率を求めた。生成量の少ないサルフェート (6) については、その添加量 0.05 μg 及び 0.5 μg の 2 点について検討したが、他のサルフェート (2—5) については、それらの生成量のはるかに多いので 50 μg 添加まで検討した。

Table II に結果を示したが、サルフェートの違いによって回収率に若干の差が認められる。カテコール (2, 3) の回収率が定量的であるのに対し、フェノール (4, 5) のそれは若干低い傾向にある。また、カテコール (2, 3) 0.05 μg 添加の場合、回収率が高いが、これは内部標準 (1 μg) に比し、その量が極めて少ないので、若干の誤差を伴うためであろう。しかし、いずれのサルフェートも、添加量の多寡にかかわらずほぼ一定の割合で回収されているので、分析に支障はないと考えられる。

以上、1 の *in vitro* 代謝研究を遂行するに必要な定量法が確立された。

TABLE II. Recoveries of Various Hydroxylated Conjugates from the Incubation Media after the Whole Clean-up Procedure

Added (μg)	Recovery (%)				
	2(2,3-diOH)	3(3,4-diOH)	4(2-OH)	5(3-OH)	6(4-OH)
50	93.2 $\pm$ 3.6	99.7 $\pm$ 3.6	87.5 $\pm$ 0.6	90.3 $\pm$ 0.9	—
5	97.2 $\pm$ 3.3	98.2 $\pm$ 2.0	89.0 $\pm$ 2.1	88.5 $\pm$ 1.2	—
0.5	97.0 $\pm$ 2.0	96.0 $\pm$ 1.5	88.0 $\pm$ 0.9	92.8 $\pm$ 2.1	95.6 $\pm$ 3.0
0.05	101.0 $\pm$ 2.4	101.3 $\pm$ 2.6	—	—	93.2 $\pm$ 2.0

Each steroid was dissolved in the incubation medium (1.0 ml), and the mixtures were heated immediately in boiling water for 1 min, followed by the same treatment as described in the text. Each value is expressed as the mean $\pm$ S.D. ($n=4-6$). —, not determined.

代謝物の定量

定量法が確立されたので、つぎに、代謝物の定量を行った。Table III は基質濃度を 100 μM とし、30 分間インキュベートしたときの代謝物の生成量を示す。著しい性差が認められ、全代謝物の生成量では、オスの方がメスのそれより約 6 倍強上まわっている。各代謝物の生成量にも著しい性差が見られる。フェノール性代謝物では、オスとメス共に 4 及び 5 の順で生成量が高く、それぞれオスでの生成量がメスのそれを、約 10 倍及び約 2 倍、上まわった。また、6 の生成量は、4 と 5 のそれより少ないが、メスでの生成量がオスのそれより約 4 倍高かった。

一方、カテコール性代謝物の 2 及び 3 の生成はメスではほとんど認められないのに対し、オスでは両カテコールの生成が認められ、かつ両者の生成量には有意の差が認められた。特に、4 は 5 に次いでその生成量が多かった。オスで見られるカテコールは、恐らくフェノール性代謝物から 2 次的に生成した代謝物と思われる。

代謝物 (2—6) はいずれもインキュベーションにおいて、基質の 17 位硫酸根の保持されたまま水酸化を受けたものと考えられる。なぜなら、この条件下では 5 及びそれらの代謝物は、全く加水分解を受けない^{13,14)}からである。しかし、念のため、1 の反応生成物をエーテル抽出、抽出液を HPLC¹⁸⁾ で調べたところ、3-deoxyestradiol はもちろん、その他遊離型のステロイドは痕跡程度も検出されなかった。

以上、1 のラット肝 Mic における代謝では、水酸化は 17 位の抱合基からより遠く離れた部位の A 環だけに起きる傾向が見られる。この傾向は、遊離型の 3-デオキシエストロジェンの代謝と比較して大きな違いを示す。遊離型の場合⁹⁻¹²⁾、水酸化は位置特異性を失って、いわば at random となり、A 環 (2 及び 3 位) はもちろん、

TABLE III. Amounts of Ring-A Hydroxylated Metabolites Produced from 17 β -Hydroxyestra-1,3,5(10)-triene 17-Sulfate by Rat Liver Microsomes

Sex	Catechol metabolite		Phenol metabolite			Total
	2 (2,3-diOH)	3 (3,4-diOH)	4 (2-OH)	5 (3-OH)	6 (4-OH)	(2-6)
Male	5.2 $\pm$ 1.3	0.3 $\pm$ 0.0	69.7 $\pm$ 8.2	9.1 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.0	84.5 $\pm$ 8.3
Female	0.1 $\pm$ 0.0	0	6.6 $\pm$ 1.3	5.6 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.2	13.3 $\pm$ 1.4

Values represent % of the substrate employed and mean $\pm$ S.D. (n=5).

B 環 (6 位) あるいは D 環 (15 位) にも起き、多数の生成物が生じる。

今回の実験の結果から、以下の問題が生じた。① **1** とその遊離型 (3-deoxyestradiol) の対応する各部位の水酸化に参与する酵素は同一か否か。② **1** の 2, 3 あるいは 4 位水酸化酵素は同一か否か。③ 3 種のカテコール (**2** 及び **3**) は恐らくその前駆体のフェノール (**4**, **5** 及び **6**) から、どのような生成比で生じたか。

引用文献

- 1) 第 1 報: 和田裕爾, 黒沢隆夫, 渡辺一弘, 高木英利, 藤間貞彦, 吉沢逸雄, 薬誌, **107**, 964 (1987).
- 2) S. Bernstein, S. Solomon, "Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation," Springer-Verlag, 1970, Chapters 5-8.
- 3) M. Ingelman-Sundberg, A. Rane, J. A. Gustafsson, *Biochemistry*, **14**, 429 (1975).
- 4) J. A. Gustafsson, M. Ingelman-Sundberg, *FEBS Lett.*, **31**, 292 (1973).
- 5) J. A. Gustafsson, M. Ingelman-Sundberg, *J. Biol. Chem.*, **250**, 3451 (1975).
- 6) M. Matsui, F. Abe, M. Kunikane, M. Okada, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 558 (1973).
- 7) M. Matsui, F. Abe, K. Kimura, M. Okada, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1913 (1972).
- 8) A. H. Goldkamp, W. M. Hoehn, R. A. Mikulec, E. F. Nutting, D. L. Cook, *J. Med. Chem.*, **8**, 409 (1965).
- 9) T. Nambara, M. Numazawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 383 (1968).
- 10) T. Nambara, M. Numazawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1200 (1969).
- 11) T. Nambara, Y. H. Bao, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 2119 (1970).
- 12) T. Nambara, M. Numazawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 990 (1971).
- 13) K. Watanabe, R. Kimura, I. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2745 (1984).
- 14) K. Watanabe, I. Yoshizawa, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **5**, 340 (1982).
- 15) 吉沢逸雄, 中川明子, 神谷恵利子, 伊藤慎二, 薬誌, **100**, 867 (1980).
- 16) K. Watanabe, I. Yoshizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3231 (1982).
- 17) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 18) K. Watanabe, I. Yoshizawa, *J. Chromatogr.*, **277**, 71 (1983).