Corticosteroid 水溶性誘導体の製剤学的研究 (第 5 報¹⁾) Corticosteroid
21-Ester 類と血清たんぱくとの結合²⁾

河村光雄, 藤沢正計
塩野義製薬株式会社研究所³⁾

Pharmaceutical Studies on Water-soluble Corticosteroid Derivatives. V.¹⁾
Binding of Corticosteroid 21-Esters to Serum Proteins²⁾

MITSUO KAWAMURA and SHŌKEI FUJISAWA
Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.³⁾

(Received March 8, 1971)

Binding of corticosteroid 21-ester derivatives with serum protein was examined by the equilibrium dialysis method. For serum proteins, bovine serum albumin, bovine serum α -globulin, rabbit serum, and human serum were used. Parameters for the binding of 18 kinds of derivatives with bovine serum albumin were examined under the condition of 15° and pH 7.4, and all the derivatives were found to follow the Langmuir-type binding formula. In the case of hemiester derivatives, a correlation was found to exist between the binding constant, K , and apparent pK_a value, suggesting that electrostatic binding is dominant in these cases. In general, binding rate was found to be greater in carboxylic acid derivatives than in amine derivatives. Examinations were also made on the binding rate of these derivatives with bovine serum α -globulin, rabbit serum, and human serum, and the results therefrom suggested that these derivatives were chiefly bound to albumin in these sera. Effect of pH on the binding of some of the derivatives with bovine serum albumin was also examined.

一般に薬物は、たんぱく結合することによって血液中に保持され、その血中濃度は持続性の様相を呈することになるが、この現象は一方では、組織への薬物移行量が低下する結果になる。抗炎症剤は、炎症をおこしている部位の組織たんぱくと何らかの形で結合することによってその効力を発揮するものと考えられ、抗炎症剤の効力を評価する方法として、水島ら^{4,5)}は、非ステロイド系抗炎症剤を用いて、それらのたんぱく結合の程度から、効力を評価する方法を試みている。一方、抗炎症剤の投与形態が局所投与でない限り、それらと血漿あるいは血清たんぱくとの結合がそれらの体内分布を支配するもっとも重要な因子の一つであることを考え合わせた場合、薬物のたんぱく結合性を論ずることは、重要な意義を有するものと考えられる。Corticosteroid 類についても、従来、それらのたんぱく結合に関するいくつかの報告⁶⁾が見うけられる。著者らは、Table I に示す各種 corticosteroid 21-ester 誘導体を用いて、それらと血清たんぱくとの結合性を *in vitro* 試験法で評価することを試みた。

- 1) 第 4 報：河村光雄，山本隆一，藤沢正計，薬誌，91，879(1971)。
- 2) 一部は日本薬学会第 90 年会で発表，札幌，1970 年 7 月。
- 3) Location: Sagisukami-2, Fukushima-ku, Osaka.
- 4) Y. Mizushima, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **149**, 1 (1964).
- 5) Y. Mizushima, H. Suzuki, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **157**, 115 (1965).
- 6) a) E.A. Peets, M. Staub, S. Symchowicz, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1655 (1969); b) W.H. Daughaday, *Physiol. Rev.*, **39**, 885 (1959); c) W.R. Slaunwhite Jr., H. Rosenthal, A.A. Sandberg, *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 486 (1963); d) W.K. Brunkhorst, E.L. Hess, *ibid.*, **111**, 54 (1965); e) K.J. Kripalani, D. L. Sorby, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 687 (1967); f) J.R. Florini, D.A. Buyske, *J. Biol. Chem.*, **236**, 247 (1961); g) U. Westphal, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **41**, 481 (1964); h) J. B. Stenlake, W. D. Williams, A. G. Davidson, W. Downie, K. Whaley, *J. Pharm. Pharmacol.*, **21**, 451 (1969).

TABLE I. Binding Parameters of Corticosteroid 21-Esters and Apparent pK_a Values

No.	Hydrocortisone 21-ester	pK'_a	n	K (l/mole)
I	hemisuccinate	5.50	1.0	1.39 ($\times 10^4$)
II	hemisuberate	5.50	1.0	0.63
III	hemipthalate	4.67	2.0	1.74
IV	hemiterephthalate	4.82	2.0	0.79
V	4-carboxymethylphenylacetate	5.84	2.0	0.43
VI	hemitartrate	4.28	1.0	1.00
VII	hemi-2,3-dimethylsuccinate	5.86	1.0	0.80
VIII	hemimaleate	4.20	1.0	2.90
IX	hemifumarate	4.29	1.0	0.89
X	hemimuconate	4.92	1.0	0.48
XI	diethylaminoacetate	6.62	0.25	18.0
XII	piperidinoacetate	6.47	0.20	7.84
XIII	α -dimethylaminopropionate	6.32	0.25	1.17
XIV	β -diethylaminopropionate	8.00	0.25	26.1
XV	β -morpholinopropionate	5.65	0.20	1.35
XVI	<i>m</i> -sulfobenzoate		1.0	20.5
XVII	sulfate		1.0	1.56
XVIII	phosphate ^{a)}		0.5	18.4

a) prednisolone derivative

実 験 の 部

実験試料 1) Hydrocortisone 21-Ester 誘導体——第 1 報—第 3 報⁷⁾ で合成したものを用いた。

2) Prednisolone 21-Phosphate——元素分析値の合致したものを用いた。

3) 牛血清アルブミン——BSA crystallized and lyophilized, Sigma Chemical Co., Lot No. 68B—8190 を用い、分子量は 70000 として以下の計算を行なった。

4) 牛血清 α -グロブリン——Bovine α -globulins, Fraction IV, B grade, pH 7 refrigerate. Calbio Chemical Co., Lot No. 900515 を用いた。

5) 20% (v/v) 家兎血清および 20% (v/v) ヒト血清——それぞれ静脈より採血、常法によって血清画分を得、pH 7.4, 0.05M リン酸緩衝液で 20% に希釈して調製。

実験方法 (平衡透析) 各種誘導体の 2.0×10^{-5} — 10.0×10^{-5} M 溶液 6.0 ml を 10 本の試験管にとり、その中に所定濃度のたんぱく質溶液 1.5 ml を入れた Visking seamless cellulose tube (8/32) を浸して、15° で 24—48 hr 放置して平衡に達しさせたのち、外液について定量を行なう。別にたんぱく質溶液のかわりに緩衝液のみを用いたもの、および誘導体溶液のかわりに緩衝液のみを用いたものを調製して対照実験を行なった。Visking seamless cellulose tube は、使用前約 1 hr 流水で洗浄し、さらに蒸留水で洗浄した。とくに記載する以外は、NaCl でイオン強度を 0.16 に調整した pH 7.4, 0.05M リン酸緩衝液を用いて平衡温度 15° で透析実験を行ない、また実験中に試料が分解しないことを確かめた。なお、ドナン平衡による濃度差は無視できるものとしてそのための補正は行なわなかった。

結 果 と 考 察

Klotz によれば、低分子化合物がたんぱく質と可逆化合物をつくるとき、結合量と濃度との関係は、Langmuir 型吸着式 (1) で示される。

$$r = \frac{nKc}{1+Kc} \quad (1)$$

ここで c は遊離低分子化合物またはイオンの濃度、 r はたんぱく質 1 分子あたりの結合量、 K は結合の強さを示す定数、 n は飽和結合量である。

(1) 式は、(2) 式に書きなおすことができ、

7) a) 第 1 報：山本隆一、藤沢正計、河村光雄、薬誌、91, 855 (1971). b) 第 2 報：河村光雄、山本隆一、藤沢正計、薬誌、91, 863 (1971). c) 第 3 報：河村光雄、山本隆一、藤沢正計、薬誌、91, 871 (1971).

Fig. 1. Effect of Increasing Corticosteroid 21-Ester Concentration on the Fraction of Corticosteroid 21-Ester Bound by 1.0% BSA in 0.05M Phosphate Buffer at pH 7.4 and 15.0°

—○—: I, —●—: XIV, —○—: XVI, —●—: XVIII

離の誘導体濃度との関係は, Fig. 2 に示すように, Langmuir 型吸着式にしたがうことが認められた。

Fig. 2. Binding of Corticosteroid 21-Esters to 1% Bovine Serum Albumin at pH 7.4 and 15.0°

そこで, これらの結合定数の対数と, みかけの pK_a 値との間の関係を求めると, Fig. 3 および 4 に示すように, hemiester 誘導体の場合は, 相関性が認められ, BSA とこれら誘導体との結合は静電的なものであることが推定される。

iii) 結合におよぼす pH の影響 I, III および XVII を用いて, 結合におよぼす pH の影響について検討した。いずれの誘導体についても, その pK_a 値に関係なく, 中性 pH 領域において結合定数の値が最小になることが認められた。その結果を Fig. 5 に示す。

これらの事実, BSA の等電点と何らかの関係があるものと推測される。なお, 使用した緩衝液は, pH 4—6 の 0.05M 酢酸緩衝液, pH 6—8 の 0.05M リン酸緩衝液および pH 8—9 の 0.05M ホウ酸緩衝液であり, いずれもイオン強度を 0.16 に調節した。

牛血清 α -グロブリン (BSG) との結合

血清中のたんぱく含量は, 動物種および各個体によって差異が認められるが, ヒト血清中の総たんぱく量は, 約 6.5—7.0% で, その約 50% がアルブミンであり, ほかに α -グロブリン群が約 15% であるとされている。⁸⁾

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{nK} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{n} \quad (2)$$

(2) 式から定数 K および n の値を知ることができる。たんぱく源としては, まず, 牛血清アルブミンを用いて誘導体との結合定数および飽和結合量などを求め, さらに牛血清 α -グロブリンとの結合, 家兎血清およびヒト血清との結合についても比較検討した。

牛血清アルブミン (BSA) との結合

i) 結合におよぼす誘導体濃度の影響 I, XIV, XVI, および XVIII を用いて, それぞれ濃度を变化させて 1.0% (w/v) 牛血清アルブミンに対する結合率を求めた。溶液中における遊離の誘導体濃度とその濃度における結合率との関係は, Fig. 1 のようになった。

この関係から, 濃度が増加すれば, 結合率は低下し, 結合量は飽和に近づくものと考えられる。

ii) 結合定数および飽和結合量 Table I に示す 18 種の誘導体を用いて, それぞれ濃度を 1.0×10^{-5} — 10×10^{-5} M まで变化させて, 1.0% (w/v) BSA との結合について検討した。その結果, いずれの場合にもその結合量と遊

8) 生物化学編集委員会編, “生物化学ハンドブック,” 技報堂, 昭和 28, p. 142.

Fig. 3. Plots of Apparent pK_a vs. $\log K$ for the Binding of the Hydrocortisone 21-Hemiesters to 1% Bovine Serum Albumin
 $r = -0.800$

Fig. 4. Plots of Apparent pK_a vs. $\log K$ for the Binding of the Hydrocortisone 21-Aminoalkylcarboxylates to 1% Bovine Serum Albumin
 $r = 0.787$

Hydrocortisone は, hydrocortisone-binding globulin (transcortin) とよばれる一種のグロブリンと特異的に結合し, その結合定数は, $7 \times 10^8 \text{ liter/M}$ (4°), $3.2 \times 10^8 \text{ liter/M}$ (37°) 程度であり, 結合はほとんど非可逆的であるとされている.⁹⁾ このような観点から, これら誘導体と α -グロブリンとの結合性について検討することは興味あるところである.

そこで著者らは, たんぱく源として, BSG を用いて誘導体との結合について検討した. 各誘導体について, $3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ の一定濃度溶液とし, これに対する BSG 濃度を 1.0% (w/v) として, BSA の場合と同様にして検討した. その結果, これら誘導体については, BSA との結合率より低い値が得られ, かつ誘導体間でその値に顕著な差異は認められなかった (Table II). これらの結果から, これら誘導体は, 血清 α -グロブリンよりも, むしろアルブミンにより多く結合し, 血清中に占めるそれらたんぱく質の含量を考慮するとき, 血清中では, アルブミンとの結合が支配的になっているものと考えられる.

20% (v/v) 家兎血清および 20% (v/v) ヒト血清との結合

たんぱく源として, 20% (v/v) 家兎血清および 20% (v/v) ヒト血清を用い, 各誘導体について, $3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ の一定濃度溶液として, BSA の場合と同様にして検討した. これら誘導

Fig. 5. Plots of pH vs. K for the Binding of Hydrocortisone 21-Esters to 1% Bovine Serum Albumin at 15.0°
—●—: I, —○—: III, ...○...: XVII

TABLE II. Degree of the Binding of Corticosteroid 21-Esters ($3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) by Serum Proteins at pH 7.4 and 15.0°

No.	1% BSA	1% BSG	20% Rabbit serum	20% Human serum
I	29.4 (%)	5.3 (%)	53.9 (%)	36.2 (%)
II	16.8	4.0	7.6	—
III	45.7	26.0	79.1	54.0
IV	27.9	10.9	28.5	—

9) W.H. Daughaday, I.K. Mariz, *Metab. Clin. & Exptl.*, 10, 936 (1961).

V	19.0	10.0	52.7	—
VI	14.1	2.2	32.6	—
VII	20.3	3.2	53.7	—
VIII	30.3	11.2	67.9	38.5
IX	19.0	8.7	31.8	—
X	13.5	—	19.8	—
XI	14.9	5.3	30.2	11.3
XII	15.6	7.0	23.4	3.3
XIII	3.9	—	21.7	—
XIV	17.4	4.6	30.8	13.3
XV	3.7	10.1	27.9	—
XVI	70.0	—	—	—
XVII	24.1	10.4	37.2	28.6
XVIII	42.1	10.2	22.2	31.6

Fig. 6. Plots of Binding Ratio of Hydrocortisone 21-Esters ($3.0 \times 10^{-5}M$) to 1% BSA and to 20% Rabbit Serum at pH 7.4 and 15.0°

Fig. 7. Plots of Binding Ratio of Hydrocortisone 21-Esters ($3.0 \times 10^{-5}M$) to 1% BSG and to 20% Rabbit Serum at pH 7.4 and 15.0°

体と、それぞれの血清たんぱくとの結合を、その結合率によって比較すると、BSA を用いた場合と同様な傾向が認められた。それらの結果を Table II および Fig. 6 および 7 に示す。なお、血清中のたんぱく含量は、BSA を標準物質として Lowry らの方法¹⁰⁾ によって定量した。

一般に結合率は、カルボン酸系誘導体の方がアミン系誘導体よりも、その値の大きいことが認められた。また XI—XV および XVIII の n 値は 1 より小さい結果が得られた。したがって、これら誘導体の K 値を他の誘導体の K 値と比較することはできない。

謝辞 終りに、御指導御鞭撻を賜った恩師京都大学教授 掛見喜一郎博士および同助教授 瀬崎 仁博士、つねにかたわらにあって御指導いただいた山本隆一博士に謹謝致します。また実験に協力された久保嘉津子氏に感謝致します。

10) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).