

フルバスタチン及びその主要代謝物の抗酸化作用に関する研究 (第2報)

中島昭典,* 大多和昌克, 増田直記, 森川裕司, 岩崎一秀
ノバルティスファーマ株式会社筑波研究所

Antioxidative Effects of Fluvastatin, and Its Major Metabolites [III]

Akinori NAKASHIMA,* Masakatsu OHTAWA, Naoki MASUDA,
Hiroshi MORIKAWA, and Kazuhide IWASAKI
Tsukuba Research Institute, Novartis Pharma K.K., 8, Ohkubo, Tsukuba 300-2611, Japan

(Received August 11, 2000; Accepted September 28, 2000)

We investigated the antioxidative effects of fluvastatin (FV or (±)-FV), each enantiomer ((+)-FV, (-)-FV) and its major metabolites on lipid peroxidation using rat and human liver microsomes. The extent of NADPH induced microsomal (Ms) lipid peroxidation was determined by thiobarbituric acid (TBA) assay. The antioxidative effect of each compound was shown as the percentage of inhibition on the formation of TBA reactive substance (TBARS) against vehicle control. The antioxidative effects of alpha-tocopherol (Toc), a potent antioxidative vitamin, probucol (PR), a potent antioxidative drug, pravastatin (PV) and simvastatin (SV), HMG-CoA reductase inhibitors, were also tested. The (±)-FV inhibit the formation of TBARS by 40 to 70% depending on Ms concentrations. The antioxidative effects of PR and Toc were comparable to those of FV. The inhibitory effects of PV and SV on the formation of TBARS were less potent than (±)-FV, PR and Toc. (+)-FV, (-)-FV, and (±)-FV inhibited the formation of TBARS by approximately 50% using rat hepatic microsomes. The antioxidative effects of (+)-FV was comparable to that of (-)-FV using human hepatic microsomes. These results indicated that the antioxidative effects of (+)-FV were comparable to those of (-)-FV, although the HMG-CoA reductase inhibitory activity of (+)-FV was 30-fold higher than that of (-)-FV.

Key words—antioxidative effect; HMG-CoA reductase inhibitor; fluvastatin; pravastatin; simvastatin

緒 言

Fluvastatin (FV 若しくは(±)-FV)は、3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA)還元酵素阻害作用を有する高コレステロール血症治療薬である。¹⁾FVはコレステロール低下作用に加え、抗酸化作用を併せ持ち、動脈硬化の進展抑制に寄与することが報告されている。²⁾FVの主排泄経路は胆汁を介した糞中で、血漿中に認められない代謝物が糞中に多く認められている。^{3,4)}また、^[14C]FVをラットに経口投与後の肝臓中放射能濃度は血漿の約50~100倍と報告されている。⁵⁾しかし、これまでFVとその代謝物の抗酸化作用についての報告は血管内での作用に限定され、肝臓内における作用については報告されていない。FV投与後の抗酸化作用全体を把握するには、血管内だけでなく、肝臓中におけるFVとその代謝物の抗酸化作用の寄与についても検討する必要がある。前報において、我々はラット肝ミクロソームにNADPHを添加することによって惹起される脂質過酸化反応に対するFV及びその主要代謝物の抗酸化作用に関する報告を行った。⁷⁾本研究では、ラット及びヒト肝ミクロソームにNADPHを添加する反応系を用いて、FV及びその

主要代謝物の抗酸化作用を、さらに詳細に検討した結果を報告する。

実験の部

1. 薬物及び試薬 FV及びその主要代謝物5種の化学構造式をFig. 1に示す。(+)FV, (-)FV, (±)FV, 代謝物M-4, 及びM-7は第一化学薬品にて合成された。代謝物M-5はNovartis Pharmaceuticals Corporation (East Hanover, NJ, USA)より供与された。代謝物M-2及びM-3は田辺製薬株式会社より供与された。Pravastatin (PV)及びsimvastatin (SV)は市販製剤より単離、精製したものをを用いた。Probucol (PR), alpha-tocopherol (Toc), Thiobarbituric acid (TBA), 及びBovine serum albumin (BSA)はSigma社 (Tokyo, Japan)より購入した。ラット及びヒト肝ミクロソームは日本農産工業より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品以上のものをを用いた。

2. 脂質過酸化の測定⁶⁾ 上記反応液、30% (W/V) トリクロロ酢酸溶液、0.5%酢酸ナトリウム(0.75% TBA含有)溶液を、それぞれ1 mlずつ混和させ、沸騰水浴中にて20分間加熱し発色させた。その後、氷冷水浴中で速やかに室温まで冷却し

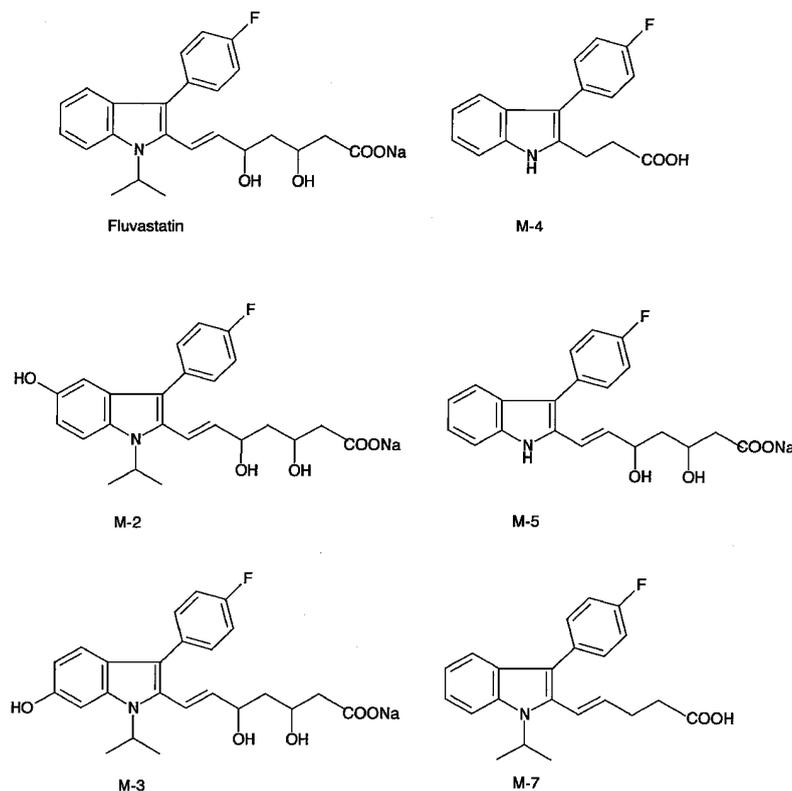


Fig. 1. Chemical Structures of Fluvastatin and Its Metabolites

た。さらに 3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い上層を分光光度計にて 532 nm の波長で測定を行い TBA reactive substance (TBARS) 量に換算した。

TBARS(nmol MDA/min/mg)

$$= (\text{O.D.} \times 3.84) / \text{protein conc. (mg/ml)}$$

なお、TBARS 量の control としては、溶媒 (メタノール) のみを添加時の値とした。

3. 各薬物の阻害率⁶⁾ 各薬物添加の影響は、薬物の代わりに溶媒 (メタノール) のみを添加時の TBARS 量を control とし、薬物添加時との差を求め、薬物無添加時の TBARS 量で割った値の百分率とし、各薬物の阻害率 (percentage of inhibition on the formation of TBARS) として表記した。

$$\text{阻害率} = \left\{ \frac{\text{薬物無添加時の TBARS 量} - \text{薬物添加時の TBARS 量}}{\text{薬物無添加時の TBARS 量}} \right\} \times 100$$

結果と考察

ラット肝ミクロソームを終濃度 0.025, 0.05, 0.1 及び 0.2 mg/ml, 各薬物を終濃度 0.1 mM で添加したときの各薬物の阻害率を Fig. 2 に示す。(±)-FV の阻害率はラット肝ミクロソーム濃度 (0.025—0.2 mg protein/ml) 増加に伴い増大した (40—70%)。Toc 及び PR の阻害率は、いずれのミクロソーム濃度においても (±)-FV の阻害率とほぼ同等の値を示した。Toc の阻害パターンは、前報で行った

PR, 代謝物 M-2, M-3, 及び M-5 の阻害パターンとほぼ同等であった。⁶⁾ 一方、PV の阻害率は 0.025 mg protein/ml で 25% を示した以外は、いずれの濃度においても 20% 以下、SV の阻害率はいずれの濃度においても 10% 以下であった。

FV と同様の化学構造を有する HMG-CoA 還元酵素阻害薬、PV, SV の阻害率は FV より低く、ミクロソーム濃度増加により阻害率は変化が認められなかった。したがって、FV の脂質過酸化阻害作用は FV 特有のものであり、HMG-CoA 還元酵素阻害作用との関連は低いことが示唆された。

ラット肝ミクロソームを終濃度 0.1 mg protein/ml, (+)-FV, (-)-FV, 及び (±)-FV を終濃度 0.1 mM で添加したときの各薬物の阻害率を Table 1 に示す。(+)FV, (-)FV, 及び (±)-FV の阻害率はそれぞれ 48.2, 49.3, 及び 52.4% といずれも同等の値を示した。(-)-FV のコレステロール低下作用は (+)-FV の 1/30 程度であるにもかかわらず,⁷⁾ エナンチオマー間での脂質過酸化作用は同等であることから、FV の脂質過酸化阻害作用は HMG-CoA 還元酵素阻害作用との関連はないと考えられた。

ヒト肝ミクロソームを終濃度 0.2 mg protein/ml, (+)-FV 及び (-)-FV を終濃度 0.01, 0.1, 及び 1 mM で添加したときの TBARS 量に与える阻害率を Table 2 に示す。(+)FV 及び (-)FV を終濃度 1 mM で添加した場合の阻害率はいずれも 22.9% と

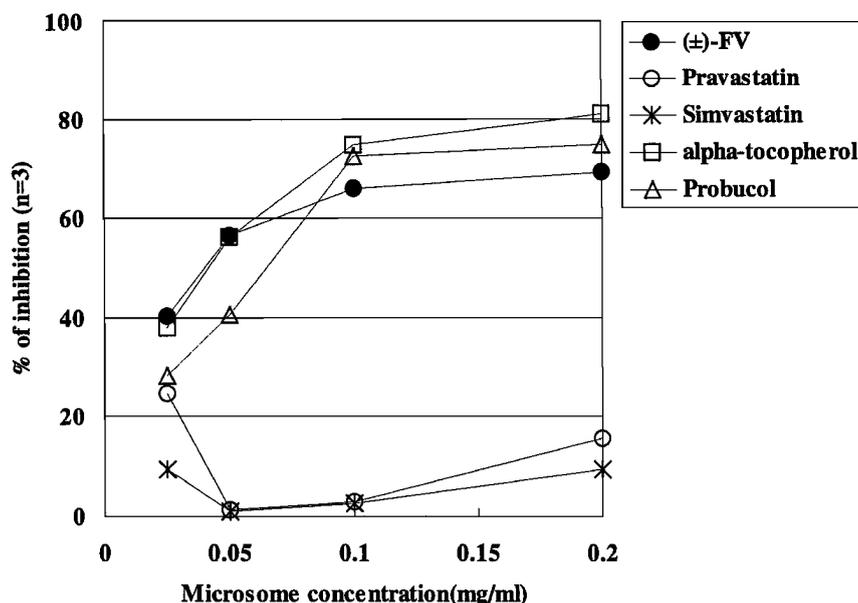


Fig. 2. Effects of Antioxidants and HMG-CoA Reductase Inhibitors on the Formation of TBARS by Rat Liver Microsomes

Table 1. Effect of FV on the TBARS Formation by Rat Liver Microsomes

| Compound | % of inhibition |
|----------|-----------------|
| (+)-FV | 48.2±3.6 |
| (-)-FV | 49.3±1.1 |
| (±)-FV | 52.4±0.2 |

Data represent mean±SEM (n=3).

Table 2. Effect of FV on the TBARS Formation by Human Liver Microsomes

| Final cont. (mM) | % of inhibition | |
|---------------------|-----------------|--------|
| | (+)-FV | (-)-FV |
| 0.01 | 7.1 | 2.9 |
| 0.1 | 7.1 | 8.6 |
| 1 | 22.9 | 22.9 |

Data represent mean value (n=2).

同等であった。ヒト肝ミクロソームを用いた場合でも、エナンチオマー間での脂質過酸化作用は同等であると考えられた。しかし、ラット肝ミクロソームの場合と比較すると脂質過酸化抑制作用は低かった。その一因として、ヒト肝ミクロソームの Control TBARS 量がラット肝ミクロソームを用いた場合の 1/3 程度であることが考えられた。Control TBARS 量の低下は、1) ヒトとラットの種差、2) ヒトの場合、臓器摘出からミクロソーム調製までの時間差がもたらす各種酵素活性へのダメージ、3) ヒトの場合、灌流が十分でなく残存する血液成分の影響などが考えられた。今回は、血液成分中のアルブミンの影響について着目した。アルブミンは抗酸化作用を有する生体成分であることが知られている。⁸⁾ ヒト肝ミクロソームに混在するアルブミンの影響により脂質過酸化反応が質的に変化し、FV の脂質過酸化阻害作用が低い値を示したものと考えられた。そこで、ラット肝ミクロソーム反応系に BSA を添加し、阻害率への影響を検討した。

ラット肝ミクロソームの終濃度を 0.2 mg protein/ml、各薬物を 1 mM で添加したときの各薬物

Table 3. Effect of Bovine Serum Albumin (BSA) on the TBARS by Rat Liver Microsomes

| BSA conc. (mg/ml) | % of inhibition of each compound | | | | | | | |
|----------------------|----------------------------------|------|------|------|------|------|-------------|---------|
| | (±)-FV | M-2 | M-3 | M-4 | M-5 | M-7 | Pravastatin | Probuco |
| 0 | 50.2 | 85.1 | 75.4 | 31.3 | 74.7 | 22.1 | 6.4 | 80.8 |
| 1 | 55.7 | 83.5 | 75.9 | 44.3 | 76.6 | 7.6 | -16.5 | 60.1 |
| 2 | 69.1 | 78.7 | 56.4 | 62.8 | 51.1 | 7.4 | 13.8 | 37.2 |

Data represent mean value (n=3).

の阻害率, さらに BSA を 1 若しくは 2 mg/ml 添加した場合の阻害率を Table 3 に示す. (±)-FV の阻害率は BSA 濃度増加に伴い増大した. したがって, アルブミンの影響により FV の脂質過酸化阻害作用が低い値を示したとは考えられず, 詳細は不明である.

一方, アルブミン添加時の FV の各代謝物, PR 及び PV の脂質過酸化阻害作用も併せて検討した. M-4 は BSA 濃度増加に伴い阻害率が増大した. 一方, 代謝物 M-7 及び PR は BSA 濃度増加に伴い阻害率が減少した. 代謝物 M-2, M-3, 及び M-5 は, BSA 2 mg/ml 添加時に阻害率が減少した. これらの結果は, 各薬物が抑制する活性酸素分子種の種類と量が異なることに起因すると考えられた.⁹⁾

REFERENCES

- 1) Yuan J., Tsai M. Y., Hegland J., Hunnighake, D. B., *Atherosclerosis*, **87**, 147-157 (1991).
- 2) Hussein, O., Schlezinger S., Rosenblat M., Keidar S., Aviram M., *Atherosclerosis*, **128**, 147-157 (1997).
- 3) Tse F. L. S., Jaffe J. M., Troendle A., *J. Clin. Pharmacol.*, **32**, 630-638 (1992).
- 4) Dain J. G., Fu E., Gorski J., Nicoletti J., Scallen J., *Drug. Metab. Dispos.*, **21**, 567-572 (1993).
- 5) Masuda N., Akasaka I., Ohtawa M., *Xenobio. Metab. Dispos.*, **10**, 513-528 (1995).
- 6) Nakashima A., Ohtawa M., Masuda N., Morikawa H., Bando T., *Yakugaku Zasshi*, **119**, 93-99 (1999).
- 7) Corsini A., Mazzotti M., Raiteri M., Soma M. R., Gabbiani G., Fumagalli R., Paoletti R., *Atherosclerosis*, **101**, 117-125 (1993).
- 8) Hiramitsu T., *Gendai Iryo*, **25**, 3393-3396 (1993).
- 9) Nakashima A., Ohtawa M., Masuda N., Morikawa H., Bando T., Iwasaki M., Wada M., Kuroda N., Nakashima K., Abstracts of papers, The 119th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokushima, March 1999, **2**, p. 179.