

抗高脂血症剤 Bezafibrate の薬理学的研究 (2)

—血清トリグリセライドおよびコレステロール低下作用機作の解析—

草間 寛, 西山 雅彦, 松原 靖人, 池田 滋

キッセイ薬品工業(株)中央研究所*

(昭和63年6月1日〔特〕)

要約: bezafibrate の血清トリグリセライド (TG) および血清総コレステロール (TC) 低下作用機序についてラットを用いて検討した. bezafibrate は ^{14}C -酢酸の肝および血清 TG への取り込みを抑制し, 肝 acetyl CoA carboxylase 活性を阻害した. また, bezafibrate は脂肪酸の β 酸化を亢進した. さらに, bezafibrate は組織リポ蛋白質リパーゼ活性を増強し, Intralipid® 負荷時における血中からの TG 消失を促進した. 一方, 末梢脂肪分解および肝臓からの TG 分泌機能には影響を及ぼさなかった. bezafibrate は ^{14}C -酢酸の肝コレステロールへの取り込みおよび肝 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 活性を抑制した. 一方, コレステロールの吸収および排泄には影響を及ぼさなかった. これらの結果より本剤の血清 TG 低下作用は, TG 合成の抑制と血中からの TG 異化促進に基づくことが示唆された. また, 血清 TC 低下作用はコレステロール合成の抑制に基づくことが示唆された.

緒 言

2-[p-{2-(p-chlorobenzamido)ethyl}phenoxy]-2-methylpropionic acid (図1, 以下 bezafibrate と省略) は, 西ドイツの Boehringer Mannheim 社で合成された化合物である. bezafibrate は正常ラットおよび実験的高脂血症ラットにおいて血清脂質低下作用が認められ¹⁾, 臨床での高脂血症治療への適用が期待されている.

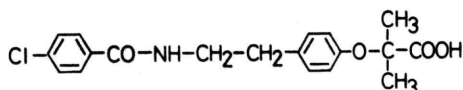


Fig. 1 Chemical structure of bezafibrate.

今回, 著者らは前報¹⁾で報告した bezafibrate の血清トリグリセライド (TG) および血清総コレステロール (TC) 低下作用機序について検討し, clinofibrate および clofibrate と比較したので報告する.

実験材料

1. 使用薬物

bezafibrate は分子量 361.83 の白色の結晶性の粉末

で, 臭いはなく, エタノールにやや溶けにくく, クロロホルムに溶けにくく, 水にはほとんど溶けない. また, その他本試験には主な薬物として clinofibrate (住友製薬, リボクリン錠® より抽出), clofibrate (静岡カフエイン工業), clofibric acid (Sigma), adrenaline (三共, ボスミン注), Intralipid® (Kabi Vitrum AB), Triton WR-1339 (半井化学), L-[^{14}C (U)]leucine (New England Nuclear, 比放射能; 328.5 mCi/mmol), sodium [^{14}C]acetic acid (Amersham, 比放射能; 56 mCi/mmol), sodium [^{14}C]bicarbonate (Amersham, 比放射能; 55 mCi/mmol), [^{14}C]palmitic acid (Amersham, 比放射能; 58 mCi/mmol), glycerol tri[^{14}C]oleate (Amersham, 比放射能; 59 mCi/mmol), N,N-dibenzyl-ethylenediamine-di-DL-[$^{2-^{14}\text{C}}$]mevalonate (Amersham, 比放射能; 53 mCi/mmol), 3-hydroxy-3-methyl [$^{3-^{14}\text{C}}$]glutaryl coenzyme A (Amersham, 比放射能; 52 mCi/mmol), [^{14}C]cholesterol (Amersham, 比放射能; 55 mCi/mmol) および [$^{1,2-^3\text{H}}$ (N)]cholesterol (New England Nuclear, 比放射能; 58.0 mCi/mmol) を用いた.

2. 実験動物

体重 160~470 g の雄性 Sprague-Dawley 系ラット (静岡実験動物協同組合) を用いた.

* ㊟399 松本市芳野19番48号

実 験 方 法

1. 薬物投与量および投与法

各薬物の投与用量は正常ラットに対して明らかな血清脂質低下作用を示す bezafibrate (10 および 30 mg/kg/day, p.o.), clinofibrate (30 mg/kg/day, p.o.) および clofibrate (100 mg/kg/day, p.o.) を, 特に文中に記さない限り 1% メチルセルロース 50 cp (和光純薬) に懸濁して, 5 ml/kg の用量にて 1 日 1 回 7 日間投与した。また, その他の薬物の使用については各種実験方法の項に記した。

2. 血清リポ蛋白合成に及ぼす影響

生理食塩水に溶解した L-[1-¹⁴C(U)] leucine (¹⁴C-ロイシン) 12 μ Ci/body を尾静脈内投与後 2 時間にエーテル麻酔下に腹部大動脈より採血した。血液は室温にて 3 時間以上放置し, 凝固させた後遠心分離により得られた血清を Hatch and Lees²⁾ の方法に準じて, 超遠心法により超低比重リポ蛋白 (VLDL, density < 1.006), 低比重リポ蛋白 (LDL, 1.006 < density < 1.063) および高比重リポ蛋白 (HDL, 1.063 < density < 1.21) を分離した。分離したリポ蛋白は, 5% トリクロロ酢酸溶液を加え蛋白を沈澱させ, 沈澱を洗浄した後に脱脂操作を行ない, 沈澱中の放射活性を測定した。

3. 肝および血清 TG 合成に及ぼす影響

薬物の最終投与 2 時間後に生理食塩水に溶解した sodium [1-¹⁴C] acetic acid (¹⁴C-酢酸) 100 μ Ci/body を尾静脈内投与して 20 分後にエーテル麻酔下に腹部大動脈より採血し, 同時に肝臓を摘出した。肝臓および血清 TG 分画に取り込まれた放射活性は, 総脂質を Folch ら³⁾ の方法に準じて抽出後, 薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: 石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 = 80/20/1) にて分離し, 測定した。

4. acetyl coenzyme A carboxylase に及ぼす影響

ラットを脱血致死後肝臓を摘出し, Nakanishi and Numa⁴⁾ の方法に準じて酵素液を調製した。すなわち, 1.5 倍量の 5 mM 2-mercaptoethanol および 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含有した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて肝臓をホモジナイズし, 53,700 × g で 90 分間遠心分離後, その上清を粗酵素液として用いた。

acetyl coenzyme A carboxylase (ACoAC) 活性の測定は Nakanishi and Numa⁴⁾ の方法に準じて行なった。すなわち, 粗酵素液を 10 mM クエン酸カリウム, 10 mM 塩化マグネシウム, 3.75 mM glutathione およ

び 0.75 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA) を含有した 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中にて 37°C で, 30 分間ブレインキューベーションし, 本溶液に 3.7 mM adenosine triphosphate (ATP), 0.125 mM, acetyl coenzyme A および sodium (¹⁴C) bicarbonate (3 × 10⁶ counts/min, 以下 C.P.M. と省略) 含有の 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を添加して反応を開始した。37°C で 10 分間反応させた後 5 N HCl 0.2 ml にて反応を停止させた。反応停止後遠心分離により得られた上清を 80°C, 60 分間加熱し上清中の放射活性を測定した。薬物処置は bezafibrate, clinofibrate および clofibric acid を当量の水酸化ナトリウム溶液に溶解してブレインキューベーションの段階より反応液に加えることにより行なった。各薬物の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は対照群に対する酵素活性の阻害率より算出した。

5. TG 分泌能に及ぼす影響

薬物の最終投与 2 時間後に Triton WR-1339 を 200 mg/kg 尾静脈内投与し, 4 時間後にエーテル麻酔下に腹部大動脈より採血した。血液は室温にて 3 時間以上放置し, 凝固させた後遠心分離により得られた血清の TG をトリグリセライド E テスト・ワコー (和光純薬) により測定した。

6. 脂肪分解に及ぼす影響

薬物の最終投与 2 時間後に脱血致死させ副睾丸脂肪組織を摘出した。脂肪組織を細切後 1 mg/ml の collagenase 含有 Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.4) 中にて 37°C で, 60 分間インキューベーションした。インキューベーション後遠心分離により脂肪細胞のみを分取し, 生物ガス (95% O₂ + 5% CO₂) を通気した 3% BSA 含有 Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.4) 中に浮遊させた。adrenaline を最終濃度として 10⁻⁵ M 添加し, 37°C で 60 分間インキューベーションした。反応終了後メディウム中に放出された遊離脂肪酸 (FFA) 量を NEFA C テスト・ワコー (和光純薬) により測定した。adrenaline による脂肪分解活性は組織 1 g が 1 時間で遊離する遊離脂肪酸量 (μ Eq/hr/g tissue) で表した。

7. 脂肪酸 β 酸化に及ぼす影響

薬物の最終投与 2 時間後に脱血致死させ, 肝臓を Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.4) にて灌流後摘出した。灌流組織を細切し, その 20 mg に生物ガスを通気した 3% BSA 含有 Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を加えた。BSA と結合させた [1-¹⁴C] palmitic acid (¹⁴C-パルミチン酸) 1.0 μ Ci を反応液中

に加え、37°C で60分間インキュベーションした。6 N H₂SO₄ を添加して反応を停止させ、発生した ¹⁴C-CO₂ を Passman ら⁵⁾の方法に準じて捕集し放射活性を測定した。脂肪酸β酸化は肝組織 1 g が反応中に生成した ¹⁴C-CO₂ 量で表した。

8. 血中トリグリセライドの消失に及ぼす影響

薬物の最終投与2時間後に Intralipid® を 0.1 ml/kg 尾静脈内投与し、5, 10, 15 および 20 分後に眼窩静脈叢より採血した。血液は室温にて3時間以上放置し、凝固させた後遠心分離により得られた血清の TG を測定することにより、Intralipid® 負荷により増加した TG の血中からの消失半減期を求めた。

9. 組織リポプロテインリパーゼに及ぼす影響

薬物の最終投与2時間後に副辜丸脂肪組織および大腿部骨格筋組織を分離し、各組織を細切した。脂肪組織は 100 mg を、骨格筋は 300 mg を分取して生物ガスを通気したノボ・ヘパリン 5 U/ml および 4% BSA を含有した Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.4) 2 ml 中に加えた。25°C で15分間振とうし、遠心分離後、その上清を酵素液とした。リポプロテインリパーゼ (LPL) 活性の測定は森と村瀬⁶⁾の方法に準じて行なった。すなわち、glycerol tri[1-¹⁴C]oleate 2 μCi および 0.0133 g トリオレインに 0.9 ml の 1% Triton X-100 および 0.9 ml の 4% BSA を加えて、氷上で3分間超音波処理して基質を作製した。反応は基質液 0.4 ml、生物ガスを通気した 4% BSA 含有トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 0.1 ml、ラット血清 0.05 ml および酵素液 0.5 ml 中で行ない、骨格筋の場合は 37°C で90分間、脂肪組織は 37°C で30分間各々インキュベーションした。反応は 3N H₂SO₄-イソプロパノール (1:40) 4 ml を加えて停止し、2 ml の蒸留水およびヘキサン 4 ml を加え振とう後に30分間静置した。静置後ヘキサン層を分取し、0.1 N KOH 1 ml を加え振とう後に下層 1 ml を採取し、その放射活性を測定した。LPL 活性は組織 1 g が1時間にトリオレインを分解することにより生ずる FFA 量 (μmol FFA/hr/g tissue) で表わした。

10. コレステロール合成に及ぼす影響

1) in vivo

ラットを昼夜逆転室 (午前10時～午後10時消灯) にて2週間飼育後、bezafibrate, clonofibrate および clofibrate を1日1回7日間午前9～10時の間に経口投与した。最終投与後、コレステロール合成能の高まる深夜に相当する午後2時に生理食塩水に溶解した ¹⁴C-酢酸を 100 μCi/body 尾静脈内投与した。1時間後、脱血致死

させ肝臓を摘出し、水酸化カリウムにてケン化した。非ケン化分画を石油エーテルにて抽出し、ジキトニンにより沈澱する分画の放射活性を測定することにより、コレステロール合成能の指標とした⁷⁾。

2) ex vivo

薬物の投与は1)と同様に行なった。最終投与日の午後2時に脱血致死させ、肝臓を Krebs-Ringer リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて灌流後摘出した。細切した肝臓約 100 mg に O₂ ガスを通気した Krebs-Ringer リン酸緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を加えた。 ¹⁴C-酢酸 1.0 μCi または N, N-dibenzyl-ethylenediamine-di-DL-[2-¹⁴C] mevalonate (¹⁴C-メバロン酸) 0.5 μCi を添加し、37°C で2時間インキュベーションを行なった後、1)に記述した方法によりジキトニン沈澱分画に取り込まれた放射活性を測定した。

11. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase に及ぼす影響

1) in vitro

ラットを午前2時に脱血致死させ、肝臓を冷却した生理食塩水で灌流した後摘出した。肝臓からのミクロソーム分画の分離は Ness ら⁸⁾の方法に準じて行なった。すなわち、3倍量の 4 mM 塩化マグネシウム、1 mM EDTA および 10 mM 2-mercaptoethanol を含有した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にてホモジナイズ後、16,000×g で15分間遠心し、その上清を再度 105,000×g で45分間遠心してその沈澱分画をミクロソーム分画とした。3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-R) 活性の測定は Ness ら⁸⁾の方法に準じて行なった。すなわち、4 mM dithiothreitol, 4 mM glucose-6-phosphate, 1 mM β-nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADP), 0.5 U glucose-6-phosphate dehydrogenase を含有した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中にミクロソーム蛋白 0.2 mg および 3-hydroxy-3-methyl[3-¹⁴C] glutaryl coenzyme A (1×10⁶ c.p.m.) を加え 37°C で15分間インキュベーションした。0.1 ml の 2.4 N HCl により反応を停止し、さらに15分間インキュベーションを行なった後、反応生成物である ¹⁴C-メバロン酸ラクトンを薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: アセトン/ベンゼン=1/1) により分離し、その分画中の放射活性を測定した。薬物処置は bezafibrate, clonofibrate および clofibric acid を当量の水酸化ナトリウム溶液に溶解し、反応開始1分前に添加することにより行なった。各薬物の IC₅₀ はメバロン酸ラクトン生成に対する阻害率より求めた。

2) ex vivo

薬物の投与は 10.1) と同様に行なった。最終投与日の午後 2 時に肝臓を摘出し、1) に記した方法により HMG-R 活性を測定した。また、ミクロソーム分画中の蛋白質の定量はビュレット法⁹⁾により行なった。HMG-R 活性はミクロソーム蛋白 1 mg により 1 時間あたりに生成された ¹⁴C-メバロン酸ラクトン量 (nmol/hr/mg protein) で表した。

12. コレステロール吸収に及ぼす影響

bezafibrate (10~100 mg/kg) を 1 日 1 回 7 日間経口投与した。アイソトープ投与前に 16 時間絶食し、アイソトープ比率法¹⁰⁾によりコレステロール吸収に対する影響を検討した。すなわち、[1, 2, ³H (N)] cholesterol 4.4 μ Ci を尾静脈内投与し、直ちに [1-¹⁴C] cholesterol 4.8 μ Ci を経口投与した。アイソトープ投与後 72, 96 および 120 時間に眼窩静脈叢より採血した。各時間の血漿中の ³H および ¹⁴C を測定して、下記の式により算出した各時間の値の平均をコレステロール吸収率とした。

$$\text{吸収率} = \frac{\text{血漿中の } ^{14}\text{C}/^{14}\text{C 投与量 (p.o.)}}{\text{血漿中の } ^3\text{H}/^3\text{H 投与量 (i.v.)}} \times 100$$

13. コレステロール排泄に及ぼす影響

[1-¹⁴C]cholesterol を 3.3 μ Ci/body 尾静脈内投与後、直ちに bezafibrate (10~100 mg/kg) を経口投与し、以後 1 日 1 回計 14 日間投与した。コレステロールの排泄量は 24 時間毎に糞を代謝ケージにて回収し、放射活性を測定することにより求めた。

14. 放射活性の測定

放射活性の測定は試料中にシンチゾール EX-H (同仁化学) を加え、また、糞中の放射活性の測定はサンプルオキシダイザー (PACKARD 306B) を用いて燃焼後、いずれも液体シンチレーションカウンター (PACKARD

TRI-CARB 4640) で測定した。

実 験 結 果

1. 血清リポ蛋白合成に及ぼす影響

表 1 に示したように bezafibrate は ¹⁴C-ロイシンの血清 VLDL 分画への取り込みを 10 mg/kg/day より用量依存的に有意に抑制した。また、血清 LDL 分画への取り込みに対し 10 mg/kg/day より用量依存的な抑制傾向を示した。一方、血清 HDL 分画への取り込みに対しては作用を示さなかった。

2. 肝および血清 TG 合成に及ぼす影響

bezafibrate は ¹⁴C-酢酸を投与した際の肝臓 TG 分画への放射活性の取り込みを、10 mg/kg/day より用量依存的に抑制した。clonofibrate 30 mg/kg/day および clofibrate 100 mg/kg/day も抑制作用を示し、clonofibrate の作用は有意であった (図 2-A)。また、血清 TG 分画への ¹⁴C-酢酸の放射活性の取り込みを bezafibrate は 10 mg/kg/day より用量依存的に抑制した。clonofibrate 30 mg/kg/day および clofibrate 100 mg/kg/day も同様に抑制作用を示した (図 2-B)。

3. acetyl coenzyme A carboxylase に及ぼす影響

bezafibrate, clonofibrate および clofibric acid はラット肝 ACoAC 活性を濃度依存的に抑制し、各々の IC₅₀ は 1.6×10^{-3} M, 2.3×10^{-4} M および 1.9×10^{-3} M であった。

4. TG 分泌能に及ぼす影響

Triton WR-1339 の静脈内投与により投与 4 時間後の血清 TG は 1,448 mg/dl と無処置ラットの血清 TG レベルに比し明らかに増加した。bezafibrate は 10 mg/kg/day よりこの血清 TG の増加を用量依存的に抑制し、30 mg/kg/day ではその作用は有意であった。

Table 1 Effect of bezafibrate on the incorporation of ¹⁴C-leucine into serum lipoproteins

Treatment	Dose (mg/kg/day)	d.p.m. $\times 10^{-2}$		
		VLDL	LDL	HDL
Control	—	7.94 \pm 1.20	10.86 \pm 1.75	38.24 \pm 3.10
Bezafibrate	10	3.87 \pm 1.18*	9.44 \pm 1.44	37.32 \pm 2.01
	30	2.36 \pm 0.53**	7.52 \pm 0.76	35.57 \pm 1.50

Drug was administered orally for 7 days. Each value represents the mean \pm S.E. of 5~6 rats. * and **: Significantly different from the control at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. VLDL: Very low density lipoprotein (density < 1.006), LDL: Low density lipoprotein ($1.006 < \text{density} < 1.063$), HDL: High density lipoprotein ($1.063 < \text{density} < 1.21$).

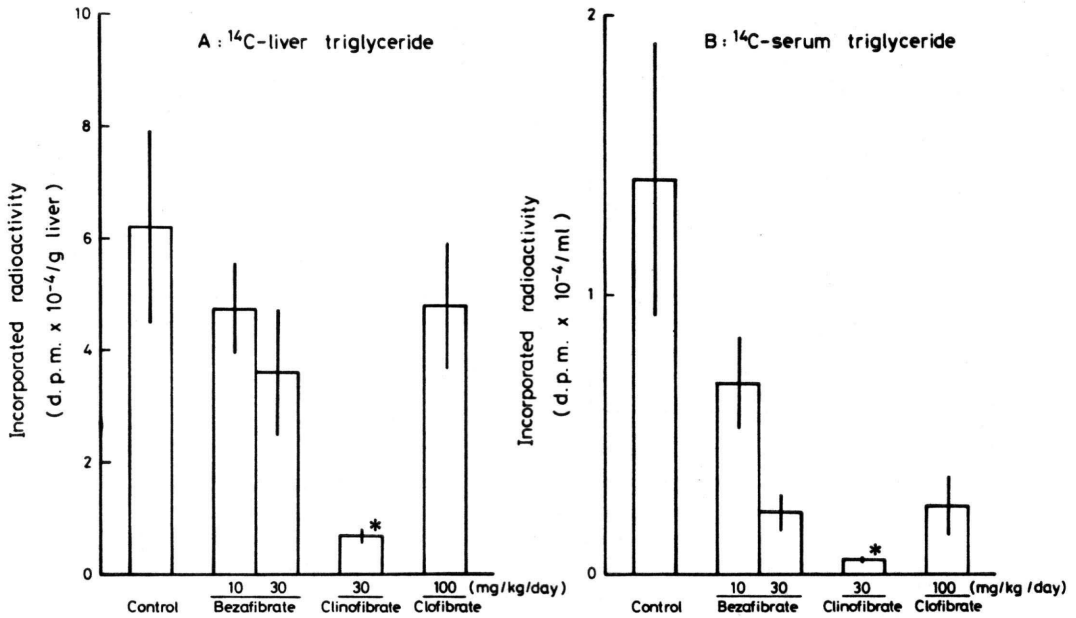


Fig. 2 Effects of bezafibrate, clinofibrate and clofibrate on the incorporation of ^{14}C -acetic acid into liver (A) and serum (B) triglyceride. Drugs were administered orally for 7 days. Each column indicates the mean of 5~7 rats. Vertical bars indicate S.E. of the mean. *: Significantly different from the control at $P < 0.05$.

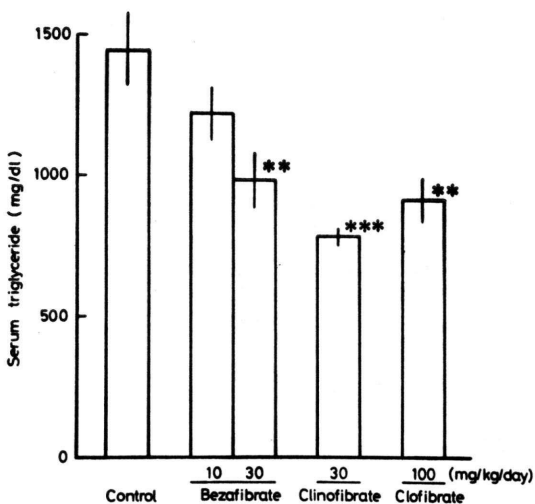


Fig. 3 Effects of bezafibrate, clinofibrate and clofibrate on serum triglyceride in Triton WR-1339 treated rats. Drugs were administered orally for 7 days. Each column indicates the mean of 9~11 rats. Vertical bars indicate S.E. of the mean. ** and ***: Significantly different from the control at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

clinofibrate 30 mg/kg/day および clofibrate 100 mg/kg/day も血清 TG の増加を有意に抑制した (図 3)。

5. 脂肪分解に及ぼす影響

bezafibrate 10 および 30 mg/kg/day は adrenaline 誘発脂肪分解に影響を及ぼさなかった。一方, clinofibrate 30 mg/kg/day および clofibrate 100 mg/kg/day は脂肪分解を有意に抑制した (図 4)。

6. 脂肪酸 β 酸化に及ぼす影響

bezafibrate は 10 mg/kg/day より用量依存的に脂肪酸 β 酸化を亢進させ, 30 mg/kg/day ではその作用は有意であった。また, clofibrate 100 mg/kg/day も脂肪酸 β 酸化を亢進した。一方, clinofibrate 30 mg/kg/day は作用を示さなかった (図 5)。

7. 血中トリグリセライドの消失に及ぼす影響

Intralipid® 0.1 ml/kg を尾静脈内投与した際, 血中 TG は増加するが, この増加した TG の消失半減期 ($T_{1/2}$) は対照群において 6.2 ± 0.6 分であった。bezafibrate は 10 mg/kg/day より用量依存的に有意に $T_{1/2}$ を短縮し, clinofibrate 30 mg/kg/day および clofibrate 100 mg/kg/day も $T_{1/2}$ を短縮したが有意ではなかった (表 2)。

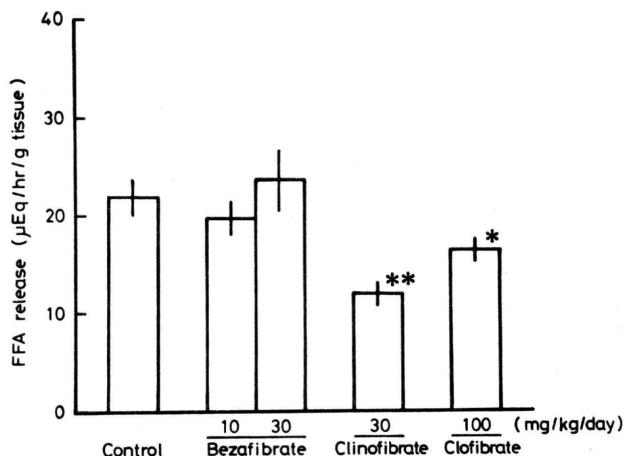


Fig. 4 Effects of bezafibrate, clinofibrate and clofibrate on adrenaline induced lipolysis in the adipose tissue. Drugs were administered orally for 7 days. Each column indicates the mean of 6 rats. Vertical bars indicate S.E. of the mean. * and **: Significantly different from the control at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively. FFA: Free fatty acid.

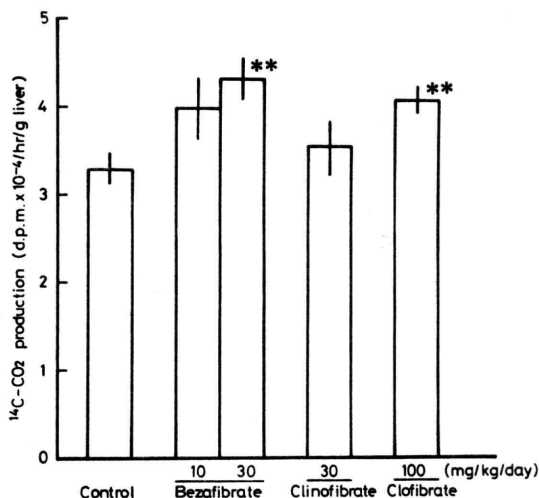


Fig. 5 Effects of bezafibrate, clinofibrate and clofibrate on liver β -oxidation. Drugs were administered orally for 7 days. Each column indicates the mean of 6~7 rats. Vertical bars indicate S.E. of the mean. **: Significantly different from the control at $P<0.01$.

8. 組織リポ蛋白質リパーゼに及ぼす影響

bezafibrate は脂肪組織および骨格筋組織中の LPL 活性を 10 mg/kg/day より用量依存的に増強した。clofibrate 100 mg/kg/day も両組織中の LPL 活性を増強した。一方, clinofibrate は脂肪組織中の LPL 活

Table 2 Effects of bezafibrate, clinofibrate and clofibrate on the half life time of serum triglyceride in the Intralipid® tolerance test

Treatment	Dose (mg/kg/day)	T _{1/2} (min)
Control	—	6.2±0.6
Bezafibrate	10	4.9±0.3*
	30	4.3±0.4*
Clinofibrate	30	4.8±0.6
Clofibrate	100	5.1±1.3

Drugs were administered orally for 7 days. Each value represents the mean \pm S.E. of 7~8 rats. *: Significantly different from control at $P<0.05$. T_{1/2}: Half life time.

性を増強したが, 骨格筋組織中の LPL 活性には作用を及ぼさなかった (図 6)。

9. コレステロール合成に及ぼす影響

1) in vivo

bezafibrate は ^{14}C -酢酸からのコレステロール合成を 10 mg/kg/day より用量依存的に有意に抑制した。clofibrate 100 mg/kg/day も有意な抑制を示したが, clinofibrate 30 mg/kg/day の抑制は有意ではなかった (図 7)。

2) ex vivo

^{14}C -酢酸からのコレステロール合成を bezafibrate は

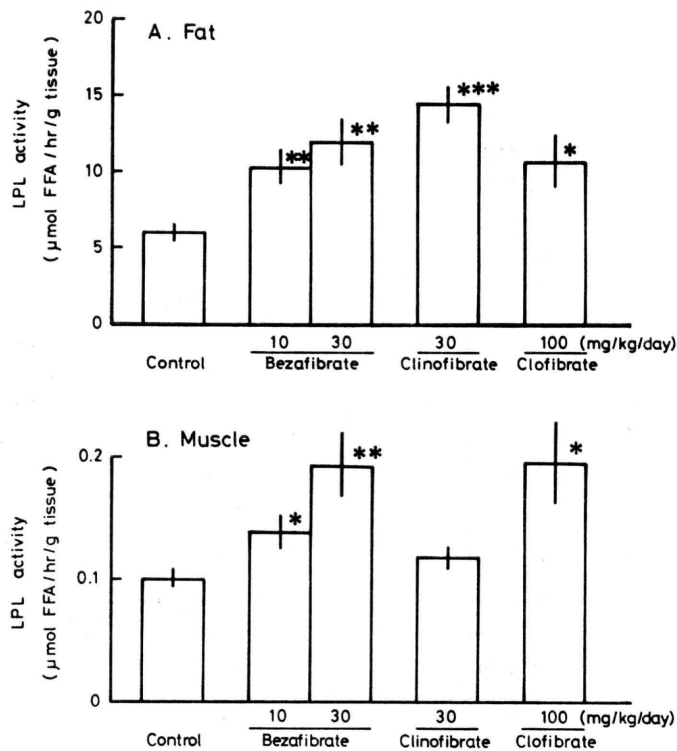


Fig. 6 Effects of bezafibrate, ciprofibrate and clofibrate on the fat (A) and skeletal muscle (B) lipoprotein lipase activity. Drugs were administered orally for 7 days. Each column indicates the mean of 8~9 rats. Vertical bars indicate S.E. of the mean. *, ** and ***: Significantly different from the control at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively. LPL: Lipoprotein lipase. FFA: Free fatty acid.

10mg/kg/day より用量依存的に抑制し、30mg/kg/day ではその作用は有意であった。clofibrate 100mg/kg/day も同程度の抑制を示した。ciprofibrate 30mg/kg/day も抑制を示したが有意ではなかった。また ^{14}C -メバロン酸からのコレステロール合成に対して bezafibrate および ciprofibrate は影響を及ぼさなかったが、clofibrate はコレステロール合成を増強した (表3)。

10. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase に及ぼす影響

1) in vitro

bezafibrate, ciprofibrate および clofibrate の HMG-R 活性に対する IC_{50} は各々 $3.1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $4.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ および $6.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった。

2) ex vivo

bezafibrate 10 および 30mg/kg/day は HMG-R 活性を有意に抑制した。clofibrate 100mg/kg/day も

有意な抑制を示したが、ciprofibrate 30mg/kg/day は作用を示さなかった (表4)。

11. コレステロール吸収に及ぼす影響

対照群のコレステロール吸収率は63.4%であった。bezafibrate (10~100mg/kg/day) はコレステロールの吸収に影響を及ぼさなかった (表5)。

12. コレステロール排泄に及ぼす影響

$[1-^{14}\text{C}]$ cholesterol は対照群において投与後14日までに糞中に投与量の約66%が排泄された。bezafibrate (10~100mg/kg/day) はコレステロール排泄に顕著な作用を及ぼさなかった (図8)。

考 察

bezafibrate の血清 TG および TC 低下作用機序についてラットを用いて検討し、同時に ciprofibrate および clofibrate と比較を行なった。

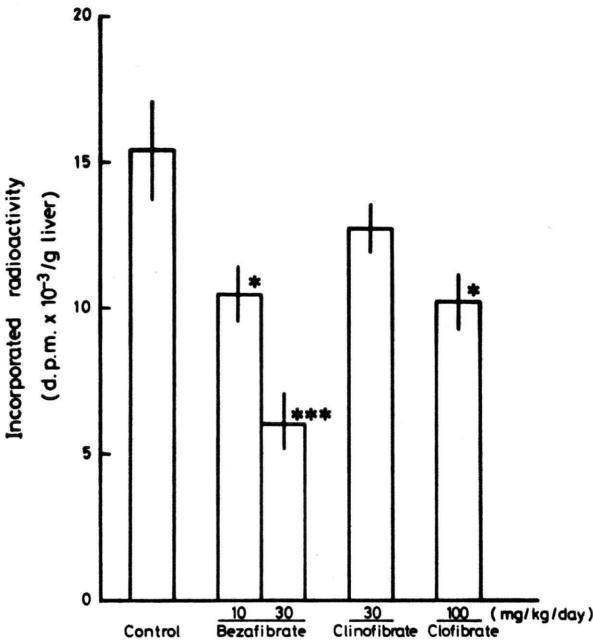


Fig. 7 Effects of bezafibrate, clinofibrate and clofibrate on the incorporation of ¹⁴C-acetic acid into digitonin precipitable sterols in the in vivo study. Drugs were administered orally for 7 days. Each column indicates the mean of 12 rats. Vertical bars indicate S.E. of the mean. * and ***: Significantly different from the control at P<0.05 and P<0.001, respectively.

Table 3 Effects of bezafibrate, clinofibrate and clofibrate on the incorporation of ¹⁴C-acetic acid and ¹⁴C-mevalonic acid into DPS in the ex vivo study

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Incorporation of radioactivity into DPS (d.p.m. × 10 ⁻² /g liver)	
		¹⁴ C-acetic acid	¹⁴ C-mevalonic acid
Control	—	52.03±6.00	53.86± 8.98
Bezafibrate	10	39.57±5.61	69.57± 6.08
	30	18.44±3.57***	66.00±10.28
Clinofibrate	30	39.11±6.97	70.49± 8.29
Clofibrate	100	14.98±1.30***	80.70± 8.24*

Drugs were administered orally for 7 days. Each value represents the mean ±S.E. of 8~10 rats. * and ***: Significantly different from the control at P<0.05 and P<0.001, respectively. DPS: Digitonin precipitable sterols.

bezafibrate は血清 VLDL への ¹⁴C-ロイシンの取り込みを用量依存的に抑制した。VLDL は TG に富んだリポ蛋白であり、このことから bezafibrate は TG 合成および分泌を抑制する可能性が示唆された。bezafibrate は ¹⁴C-酢酸の肝臓および血清 TG 分画中への放射活性の取り込みを抑制した。この作用は clinofibrate

と比較すると弱いものの、clofibrate よりは強かった。また、ACoAC に対して各薬剤はともに抑制作用を示し、その強さは clinofibrate>bezafibrate>clofibrate の順であり、これらの作用は in vivo における肝臓での TG 合成抑制の強さに対応するものであった。また、bezafibrate 10, 30 mg/kg 経口投与および clofibrate

Table 4 Effects of bezafibrate, clonofibrate and clofibrate on liver HMG-CoA reductase activity

Treatment	Dose (mg/kg/day)	HMG-CoA reductase activity (nmol/hr/mg protein)
Control	—	3.87±0.24
Bezafibrate	10	2.46±0.22***
	30	2.47±0.28**
Clinofibrate	30	3.82±0.25
Clofibrate	100	2.88±0.33*

Drugs were administered orally for 7 days. Each value represents the mean±S.E. of 6~9 rats. *, ** and ***: Significantly different from the control at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively. HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A.

Table 5 Effect of bezafibrate on cholesterol absorption

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Absorption percent
Control	—	63.4±3.6
Bezafibrate	10	72.5±5.9
	30	70.7±5.9
	100	61.6±5.3

Drug was administered orally for 7 days. Each value represents the mean±S.E. of 5 rats.

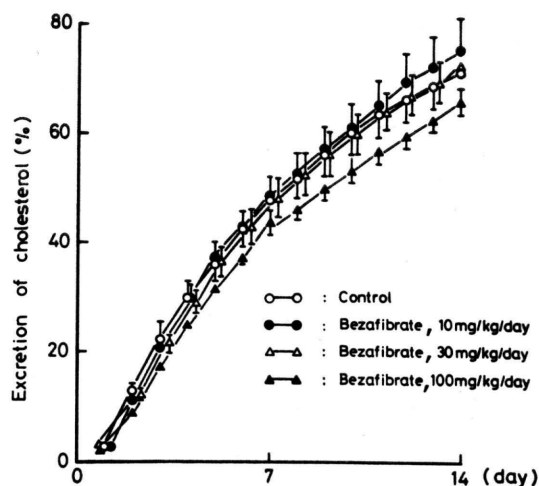


Fig. 8 Effect of bezafibrate on cholesterol excretion. Drug was administered orally for 14 days. Each point indicates the mean of 4~5 rats. Vertical bars indicate S.E. of the mean.

(75 mg/kg, p.o.) 投与後のラット最高血中濃度は各々 30 $\mu\text{g/ml}$ (約 10^{-4}M), 100 $\mu\text{g/ml}$ (約 $3\times 10^{-4}\text{M}$) および 150 $\mu\text{g/ml}$ (約 $6\times 10^{-4}\text{M}$) に達し、肝臓への薬物の分布も両薬剤とも最高値で約 $3\times 10^{-4}\text{M}$ 以上に達することが報告されており^{11,12)}、本実験においても血中および肝中における薬物濃度は ACoAC に対する IC₅₀ 値付近に達しているものと推測される。以上より bezafibrate および clofibrate による血清 TG の低下は肝臓での ACoAC 阻害作用による TG 合成の抑制が関与しているものと考えられる。また、clinofibrate は血中および肝中の薬物濃度に関するデータは不明であるが、in vivo および in vitro での作用の強さが相関することより、本剤も ACoAC に対する阻害作用に基づき、血清 TG 低下作用を示すものと考えられる。さらにこの結果はヒト遊離肝細胞において bezafibrate が TG 合成を抑制するという Kosykh ら¹³⁾ の報告と一致するものであった。Triton WR-1339 を静脈内に投与した際には、血中からのリポ蛋白の除去が阻害されるため¹⁴⁾、血清 TG の増加は主に肝臓からの TG 分泌量が反映したものと考えられる。bezafibrate は Triton 処置ラットにおいて血清 TG の増加を抑制したが、その程度は肝臓における TG 合成抑制のそれとほぼ同等であったことから、この抑制はリポ蛋白の分泌機能に対する作用によるものではなく、肝臓での TG 合成抑制に基づき出現したものと考えられる。一方、clofibrate による抑制は肝臓での TG 合成抑制の程度と比較して強いことより、リポ蛋白分泌に対しても抑制を示している可能性が示唆される。bezafibrate は脂肪組織の adrenaline による脂肪分解に対して作用を示さなかった。一方、clinofibrate および clofibrate はこの脂肪分解を抑制した。脂肪分解により血中に放出された FFA は肝臓中に取り込まれ、TG 合成に利用されることから¹⁵⁾、clinofibrate および clofibrate は肝臓への FFA 供給を低下させ、肝臓での TG 合成を抑制することが血清 TG 低下の一因になっていると考えられる。一方、bezafibrate の血清 TG の低下作用にはこのような作用の関与はないものと考えられる。

clofibrate は β 酸化を亢進することが報告¹⁶⁾ されているが、bezafibrate も同様に脂肪酸の β 酸化を亢進した。一方、clinofibrate は β 酸化に対して作用を示さなかった。bezafibrate および clofibrate による脂肪酸 β 酸化の亢進は、肝臓での遊離脂肪酸供給を低下させ、TG 合成抑制の一因となっているものと考えられる。

Intralipid® は静脈内投与した場合、血中において

TG と同様な挙動を示すことが報告¹⁷⁾されているが, bezafibrate は Intralipid® 負荷により増加した TG の血中からの消失半減期を短縮した. この作用は clinofibrate および clofibrate に比し強い作用であった. また, bezafibrate は TG 異化に関与する LPL 活性を増強し, その作用は clofibrate に比しより強い作用であった. 以上の結果より bezafibrate の血清 TG 低下作用には, LPL 活性の増強に基づく血清 TG 異化促進に関与しているものと考えられる.

bezafibrate は in vivo および ex vivo において ¹⁴C-酢酸からのコレステロール合成を抑制したが, ¹⁴C-メバロン酸からのコレステロール合成に対して作用を示さなかった. 以上より, bezafibrate は肝臓において酢酸からメバロン酸が合成される過程を抑制することにより, コレステロールの合成を阻害し, 血清 TC を低下させるものと考えられる. clofibrate も bezafibrate と比較して作用は弱いものの, 同様の機序により血清 TC を低下させるものと考えられる. 一方, clinofibrate はコレステロール合成に対する抑制は弱く, 血清 TC の低下は bezafibrate とは異なる機序によるものと考えられる. コレステロール合成の調節酵素である HMG-R 活性に対する各薬剤の阻害の強さは clinofibrate > bezafibrate > clofibrate の順であったが, ex vivo における抑制作用の強さは, 肝臓でのコレステロール合成抑制のそれと対応するものであった. 以上の結果より bezafibrate および clofibrate は肝臓の HMG-R 活性を阻害することにより, コレステロール合成を抑制することが明らかになった. また, bezafibrate および clofibrate の IC₅₀ 値は各々のラット最高血中濃度および肝への分布濃度よりも約10倍程度高く, HMG-R に対する作用は酵素への直接的な阻害に加えて異なる機序に基づく阻害作用が関与している可能性が考えられる.

HMG-R 活性は日内変動を示すことが知られており, この変動は酵素タンパクの合成速度の変化によるといわれている¹⁸⁾. また, HMG-R のリン酸化-脱リン酸化による活性の調節も報告¹⁹⁾されており, bezafibrate による抑制は, このような生体内での調節機構に対する作用や, あるいは HMG-R の基質との親和性を低下させる作用等に基づく可能性もあり今後の検討が必要と考えられる. bezafibrate はコレステロールの吸収および排泄に対して影響を及ぼさなかったことにより, 本剤の血清 TC 低下作用には, これらへの作用の関与はないものと考えられる.

著者らは前報¹⁾において bezafibrate が高コレステ

ール食負荷高コレステロール血症ラットにおいて血清 TC の増加を抑制することを報告した. 高コレステロール食負荷時には肝臓での内因性コレステロール合成は通常より低下することが報告²⁰⁾されていることから, モデルにおける bezafibrate の作用は, 肝臓における HMG-R 活性の抑制作用のみでは説明できず, さらに異なる作用の関与も示唆される. ヒトにおいて bezafibrate は血中コレステロールの細胞内取り込みに関与する LDL receptor 活性の上昇を介した LDL 異化促進作用を示すことが報告²¹⁾されており, ラットにおける bezafibrate の血清 TC 低下作用にも同様な作用が関与しているかもしれない.

bezafibrate は TG 合成の抑制および TG 異化促進作用により血清 TG を低下させることが明らかとなった. カイロミクロンおよび VLDL のような TG に富むリポ蛋白は, 血中で代謝される過程において, 抗動脈硬化性リポ蛋白と言われている HDL を形成することが報告²²⁾されており, bezafibrate は TG 異化促進に伴う VLDL の低下を示すと同時に HDL の増加をもたらす可能性が考えられる. また, bezafibrate は HMG-R 活性の抑制により血清 TC を低下させることが明らかになった.

bezafibrate は従来の fibrate 系薬剤の持つ TG 低下作用ならびに他の fibrate 系の薬剤に比しより強力な HMG-R 活性の抑制作用を伴わせ持つことが特徴と考えられる.

文 献

- 1) 草間 寛, 西山雅彦, 池田 滋: 日薬理誌 **92**, 175 (1988)
- 2) Hatch, F.T. and Lees, R.S.: Adv. Lipid Res. **6**, 1 (1968)
- 3) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S.: J. Biol. Chem. **226**, 497 (1957)
- 4) Nakanishi, S. and Numa, S.: Eur. J. Biochem. **16**, 161 (1970)
- 5) Passman, J.M., Radin, N.S. and Cooper, J.A.D.: Anal. Chem. **28**, 484 (1956)
- 6) 森 夏子, 村瀬敏郎: 統生化学実験講座 **3**, 膜脂質と血漿リポタンパク質下, 日本生化学会, p. 647, 東京化学同人, 東京 (1986)
- 7) 入倉 勉, 岡田孝道: 新薬開発のための薬効スクリーニング法 —最近の動向と実際—, 小澤 光, Vol. **I**, p. 83, 清至書院, 東京 (1984)
- 8) Ness, G.C., Dugan, R.E., Lakshmanan, M.R. and Nepokroeff, C.M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **70**, 3839 (1973)
- 9) Gorrall, A.G., Bardawill, C.S. and David,

- M.M.: J. Biol. Chem. **177**, 751 (1949)
- 10) Zilversmit, D.B. and Hughes, L.B.: J. Lipid Res. **15**, 465 (1974)
- 11) 西山雅彦, 草間 寛, 宮城政春, 池田 滋, 神 義容, 江角凱夫: 医薬品研究 **19** (1988) 印刷中
- 12) Cayen, M.N.: Drug Metab. Rev. **11**, 291 (1980)
- 13) Kosykh, V.A., Podrez, E.A., Novikov, D.K., Victorov, A.V., Dolbin, A.G., Repin, V.S. and Smirnov, V.N.: Atherosclerosis **68**, 67 (1987)
- 14) Sochotz, M.C., Scanu, A. and Page, I.H.: Am. J. Physiol. **188**, 399 (1957)
- 15) Heimberg, M., Weinstein, I., Klausner, H. and Watkis, M.L.: Am. J. Physiol. **202**, 353 (1962)
- 16) Lazarow, P.B.: Science **197**, 580 (1977)
- 17) Carlson, L.A. and Hallberg, D.: Acta Physiol. Scand. **59**, 52 (1963)
- 18) Edwards, P.A. and Gould, R.G.: J. Biol. Chem. **247**, 1520 (1972)
- 19) Nordstrom, J.L., Rodwell, V.W. and Mitschelen, J.J.: J. Biol. Chem. **252**, 8924 (1977)
- 20) Siperstein, M.D. and Guest, M.J.: J. Clin. Invest. **39**, 642 (1960)
- 21) Stewart, J.M., Packard, C.J., Lorimer, A.R., Boag, D.E. and Shepherd, J.: Atherosclerosis **44**, 355 (1982)
- 22) Patch, J.R., Gotto, A.M. Jr., Olivecrona, T. and Eisenberg, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 4519 (1978)

Abstract—Pharmacological investigation of bezafibrate, a hypolipidemic agent (2). Mechanism of the hypolipidemic action of bezafibrate in rats. Hiroshi KUSAMA, Masahiko NISHIYAMA, Yasuhito MATSUBARA and Shigeru IKEDA (Central Research Laboratories, Kissei Pharmaceutical Co., Ltd., Matsumoto 399, Japan). *Folia pharmacol. japon.* **92**, 181~191 (1988)

The mechanism of the hypolipidemic action of bezafibrate was investigated in rats. Bezafibrate decreased the incorporation of ^{14}C -acetic acid into the liver and serum triglyceride and inhibited liver acetyl CoA carboxylate activity. Bezafibrate increased liver β -oxidation, but it had no effect on lipolysis and triglyceride secretion from the liver. Bezafibrate accelerated the elimination of serum triglyceride in Intralipid® injected rats and increased tissue lipoprotein lipase activity. Bezafibrate decreased the incorporation of ^{14}C -acetic acid into liver cholesterol and inhibited liver HMG-CoA reductase activity. Bezafibrate had no effect on cholesterol absorption and excretion. These results suggest that the hypotriglyceridemic actions of bezafibrate are due to inhibition of triglyceride synthesis and acceleration of triglyceride elimination and that the hypocholesteridemic action of bezafibrate is mainly due to inhibition of liver HMG-CoA reductase activity.