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

中島昭典,^{*,a} 大多和昌克,^a 増田直記,^a 森川裕司,^a 坂東 勉^b
ノバルティス ファーマ(株)筑波研究所,^a 同・宝塚研究所^b

Antioxidative Effects of Fluvastatin, and Its Major Metabolites

Akinori NAKASHIMA,^{*,a} Masakatsu OHTAWA,^a Naoki MASUDA,^a
Hiroshi MORIKAWA,^a and Tsutomu BANDO^b

*Tsukuba Research Institute, Novartis Pharma K.K.,^a Ohkubo 8, Tsukuba-shi,
Ibaraki 300-2611, Japan and Takarazuka Research Institute, Novartis
Pharma K.K.,^b 10-66, Miyuki-cho, Takarazuka, 665-0042, Japan*

(Received August 4, 1998)

Fluvastatin (FV) is a highly potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase. Recently, its antioxidant effect caused by inhibiting the formation of low density lipoproteins (LDL) *in vitro* has been reported. In this study, we reported the antioxidant effects of FV and its major metabolites in human (M-2, M-3, M-4, M-5, and M-7) on lipid peroxidation using rat liver microsomes. The extent of NADPH- induced microsomal (Ms) lipid peroxidation was determined by the thiobarbituric acid (TBA) assay. The antioxidant effect of each compound was shown as the percentage of inhibition on the formation of TBA reactive substances (TBARS) against the vehicle control. Probucol (PR), a potent antioxidant drug, was used as a reference control. The concentration of each compound in this experiment was set at 0.1 mM (final conc.). FV inhibited the formation of TBARS by 30 to 60% without depending on the used Ms concentrations (0.025–0.2 mg protein/ml). The antioxidant effects of M-2, M-3, and M-5 were comparable to that of FV at low Ms concentrations. At the highest Ms concentration, however, the antioxidant effects of these metabolites were considerably higher than that of FV. Inhibition of the formation of TBARS by M-4 or M-7 was approximately 30% of the control and independent of the used Ms concentrations. The antioxidant effect of PR was comparable to those of M-2, M-3, and M-5 in this study. Pravastatin (PV), a potent inhibitor of HMG-CoA reductase, reduced the formation of TBARS around 20% at 0.25 or 0.5 mg protein/ml of Ms concentrations. But the value of percentage of inhibition was around 5% at 0.1 or 0.2 mg protein/ml of Ms concentrations. In conclusion, the antioxidant effects of FV, M-2, M-3, and M-5 were found to be comparable to that of PR.

Key words—antioxidant effect; HMG-CoA reductase inhibitor; fluvastatin; pravastatin; probucol

緒 言

FV, (±)-(3*RS*,5*SR*,6*E*)-sodium-7-[3-(4-fluorophenyl)-1-(1-methyl)-1*H*-indole-2-yl]-3,5-dihy-

droxy-6-heptenoate は、インドール環を基本骨格として全化学合成された高コレステロール血症治療薬である。FV はコレステロール合成系の律速段階である HMG-CoA 還元酵素活性を特異的に阻害することにより血中コレステロール値を低下させる。^{1,2)}

近年、FV にはコレステロール低下作用に加え、抗酸化作用も併せ持ち、動脈硬化の進展抑制に寄与することが報告されている。³⁾ しかし、これらの抗酸化作用に関する知見はいずれも未変化体の血管内での抗酸化作用に限定されており、肝臓中での抗酸化作用については報告されていない。

一方、FV をヒトに経口投与後の吸収率は約 90% と良好であるものの、バイオアベイラビリティは約 30% で、FV は広範な代謝を受けることが知られている。FV 及びその代謝物の主排泄経路は胆汁を介した糞中であり、血漿中には認められない代謝物が糞中に多く認められている。^{4,5)} 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。⁶⁾

したがって、FV の抗酸化作用の全体を把握するには、血管内だけではなく FV 及びその代謝物の肝臓中における抗酸化作用の寄与についても検討する必要がある。

Table 1. The Structure-Activity Relationship of Fluvastatin, Its Metabolites, and Its Derivatives

Compounds	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	% of inhibition ^{a)}
FV	H	H	iso-Pr		48
M-2	OH	H	iso-Pr		89
M-3	H	OH	iso-Pr		87
M-4	H	H	H		47
M-4'-CHO	H	H	H	-CHO	20
M-4'-CO ₂ Et	H	H	H		90
M-5	H	H	H		85
M-7	H	H	iso-Pr		23
M-7'-CHO	H	H	iso-Pr	-CHO	43
6,7-Dihydro FV	H	H	iso-Pr		>0

a) The percentage of inhibition on the formation of TBARS.

Fig. 1. Chemical Structure of Each Compounds

今回、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**, その主要代謝物, 並びに **FV** の構造類似体の抗酸化作用について検討した. また, 強力な抗酸化作用を示す **PR** 及び他の **HMG-CoA** 還元酵素阻害剤である **PV** との抗酸化作用の比較検討を実施したので併せて報告する.

実 験 の 部

1. 薬物及び試薬 **FV**, その主要代謝物 5 種及び **FV** の構造類似体 4 種の化学構造式を Table 1 に示す. **FV** 及び代謝物 **M-5** は Novartis Pharmaceuticals Corporation (East Hanover, NJ, U.S.A.) 社より提供された. 代謝物 **M-2**, **M-3** 及び 6,7-dihydro **FV** は, 田辺製薬株式会社より供与された. 代謝物 **M-4**, **M-7**, また **FV** の構造類似体 4 種は第一化学薬品にて合成されたものを用いた.

PV は市販製剤より単離, 精製し, **HPLC** にて純度検定を行い, **PV** 以外のピークがないことを確認したものを用いた. **PR** は Sigma 社のものを用いた. **FV**, **PV**, 及び **PR** の化学構造式を Fig. 1 に示す. **TBA** は Sigma 社のものを用いた. ラット肝ミクロソームは市販 (**Xenotech** 社, **R1073**) のものを用いた. その他の試薬はすべて市販の特級規格品を用いた.

2. 反応条件⁷⁾ 反応液の組成及びその終濃度を以下に示す. **NADPH** を除いた組成を 37°C で 2 分間プレインキュベーション後, **NADPH** を加えてさらに 37°C で 5 分間インキュベーションした.

上記の反応条件で各薬物の抗酸化作用を検討するに当たって, 薬物, **NADPH**, ミクロソーム濃度については予備検討を行った.

薬物濃度は, 反応液に **FV** 添加後の阻害率が 50% 前後, すなわち, **IC₅₀** 付近になる濃度 (終濃度 0.1 mM) に設定した.

NADPH 量については, 文献値^{7,8)} を参考に検討したが, いずれの濃度でも **FV** の阻害率に影響は認められず, 文献値を採用した.

ミクロソーム濃度については, 文献値^{7,8)} で反応を行った場合, **TBARS** 量が高値を示し分光光度計の測定可能範囲を上回った. 活性酸素の発生源であるミクロソーム濃度を 1 mg protein/ml に希釈した場合, **FV** の阻害率は **IC₅₀** 値付近を示した. しかし, ミクロソームのロットを変更したところ, 阻害率も変化する場合が認められた. そこでミクロソーム濃度は実験の部に記載した 4 濃度, すなわち終濃度 0.025, 0.05, 0.1, 及び 0.2 mg/ml で検討することとした.

組成	終濃度
ラット肝ミクロソーム	0.025—0.2 mg protein/ml
Ferric pyrophosphate	50 μM
KCl	0.15 M
Tris-HCl (pH 7.4)	25 mM
薬物 (メタノール溶液)	0.1 mM (10%)
NADPH	0.5 mM

3. 脂質過酸化の測定⁸⁾ 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た. さらに 3000 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 TBARS 量に換算した.

$$\text{TBARS (nmol malondialdehyde (MDA)/min/mg)} = (\text{O.D.} \times 3.84) / \text{protein conc. (mg/ml)}$$

なお, TBARS 量の control としては, 溶媒 (メタノール) のみを添加時のものとした.

4. 各薬物の阻害率 各薬物添加の影響は, 薬物のかわりに溶媒 (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.

$$\text{阻害率} = \{(\text{薬物無添加時の TBARS 量} - \text{薬物添加時の TBARS 量}) / \text{薬物無添加時の TBARS 量}\} \times 100$$

結 果 と 考 察

FV, 各代謝物, PR 及び PV の阻害率 ラット肝ミクロソームの終濃度 0.025, 0.05, 0.1, 及び 0.2 mg protein/ml の条件下で, FV, 各代謝物, PR 及び PV をそれぞれ終濃度 0.1 mM で反応後の各阻害率を Fig. 2 に示した.

FV の阻害率はラット肝ミクロソーム濃度が 0.025, 0.05 及び 0.1 mg/ml のとき, それぞれ 41.3, 63.1, 及び 69.0% と, ミクロソーム濃度上昇に伴い上昇した. しかし, 0.2 mg protein/ml では, その阻害率は 50.2% であった.

代謝物 M-2 の阻害率は, ミクロソーム濃度 0.025 及び 0.05 mg protein/ml では FV と同等か少し低い値を示した. しかし, ミクロソーム濃度が 0.1 及び 0.2 mg protein/ml では, それぞれ 75.9 及び 85.1% と FV より有意に高い値を示した ($p < 0.01$).

代謝物 M-3 及び M-5 の阻害率は, ミクロソーム濃度 0.025—0.1 mg protein/ml の範囲では FV と同等か又はやや低い値を示した. しかし, 最も高いミクロソーム濃度 (0.2 mg protein/ml) では, それぞれ 75.4 及び 74.7% と FV より有意に高い値を示した ($p < 0.01$).

このように, 代謝物 M-2, M-3 及び M-5 の阻害率はミクロソーム濃度上昇に伴い, いずれも上昇した.

一方, 代謝物 M-4 の阻害率は, 今回実験したミクロソーム濃度範囲 (0.025—0.2 mg protein/ml) で, いずれも 30% 前後と, M-4 の阻害率はミクロソーム濃度に依存しないものと考えられた. 同様に, 代謝物 M-7 の阻害率についても 21.4—34.0% とその阻害率に濃度依存性は認められなかった.

PR を添加したときの阻害率は, ミクロソーム濃度上昇に伴い上昇し, 代謝物 M-2, M-3, 及び M-5 と同様の阻害パターンを示した.

PV の場合, ミクロソーム濃度 0.025 及び 0.05 mg protein/ml での阻害率は, それぞれ約 20% であった. この値は FV の 1/2 以下であり, 各代謝物, 及び PR と同等かやや低い値であった. しかし, ミクロソーム濃度が 0.1 及び 0.2 mg protein/ml での阻害率は約 5% と, FV, 各代謝物及び PR より有意に低い値を示した ($p < 0.01$).

これらの結果から, ミクロソーム濃度 0.1—0.2 mg protein/ml の範囲では, FV とその各代謝

Fig. 2. The Percentage of Inhibition on the Formation of TBARS

物の抗酸化作用は、PV より強力であることが示された。

FV, 各代謝物, PR 及び PV のミクロソーム濃度変化による阻害パターン 各薬物の阻害率をミクロソーム濃度に対してプロットした場合の阻害パターンを4種に分類し Fig. 2 に示した。これらの阻害パターンの差は、各薬物が抑制可能な活性酸素分子種の種類と量に依存していると考えられる。

FV の場合 (Fig. 2A), ミクロソーム濃度 0.1 mg protein/ml までは他の代謝物と同様に阻害率も上昇するが、ミクロソーム濃度 0.2 mg protein/ml での阻害率はミクロソーム濃度 0.05 及び 0.1 mg protein/ml の場合の阻害率より低い値を示した。このことは、0.1 mg protein/ml までは濃度に依存して阻害率も上昇していくものの、それ以上になると FV が抑制可能な活性酸素分子種の量が枯渇し、他の活性酸素分子種による TBARS 量の割合が増加し、FV 添加時の阻害率が低下したと推察されるが、詳細は不明である。

代謝物 M-2, M-3, M-5 及び PR の場合 (Fig. 2B), その阻害率はミクロソーム濃度上昇に伴い、いずれも上昇した。これらの薬物の抑制可能な活性酸素分子種、すなわち過酸化脂質の割合がミクロソーム濃度の上昇に伴い増大したためと考えられる。

代謝物 M-4 及び M-7 の阻害率については (Fig. 2C), ミクロソーム濃度に対する依存性はないものと考えられた。本実験で検討したミクロソーム濃度の範囲内では、M-4 及び M-7 が抑制可能な活性酸素分子種の割合がほぼ一定であるためと思われた。

PV では (Fig. 2D), ミクロソーム濃度が低いほうが阻害率は高く (約 20%), ミクロソーム濃

度が高い場合、阻害率は約 5% と低い値を示した。この結果は、先述した代謝物 **M-2**, **M-3**, **M-5** 及び **PR** とは逆のパターンを示している。このことは、ミクロソーム濃度の増減により、反応液の脂溶性もしくは水溶性が変化し、被験薬物の阻害率が変化したと考えられるが、詳細は不明である。

FV, 各代謝物及び構造類似体の化学構造と阻害率との関連性 **FV** 及びその主要代謝物 5 種に加え、**FV** の構造類似体 4 種をミクロソーム濃度 0.2 mg protein/ml で反応後の阻害率と化学構造との関連性について Table 1 に示した。

FV の構造類似体 4 種 **M-4'-CHO**, **M-4'-CO₂Et**, **M-7'-CHO** 及び 6,7-dihydro **FV** の阻害率はそれぞれ 20%, 90%, 43% 及び 0% であった。

FV の代謝部位は、Table 1 に示されるように 4 個所で、5, 6-位の水酸化 (Table 1, **R₁**, **R₂**), *N*-脱イソプロピル化 (Table 1, **R₃**), 及び β -酸化 (Table 1, **R₄**) である。

FV より高い阻害率を示した薬物には、**M-2**, **M-3**, **M-4'-CO₂Et** 及び **M-5** があり、その値は、それぞれ 89, 87, 90 及び 85% であった。

これらの化学構造の共通点として、Table 1 で示した基本骨格であるインドール骨格と **R₄** が二重結合により結ばれて共役し、さらに水酸基もしくは *O*-エチルエステル基が存在していることが挙げられる。逆に、基本骨格と **R₄** が二重結合により結ばれていない。すなわち、共役していない **M-4**, **M-4'-CHO**, **M-7'-CHO** 及び 6,7-dihydro **FV** については、いずれも **FV** より低い阻害率を示した。とくに 6,7-dihydro **FV** では、**FV** との化学構造上の相違点が、基本骨格と **R₄** 間の二重結合が還元されたのみであるにもかかわらず抗酸化作用をほぼ完全に消失する。**FV** が抗酸化作用を示すためには、二重結合により基本骨格と水酸基もしくは *O*-エチルエステル基が共役することが、より強力な抗酸化作用の発現に不可欠であると考えられた。

他の阻害活性の増強因子として、5,6-位の水酸化、とくに 5 位の水酸化が挙げられる。

インドール骨格を所有する cycloalkeno[1,2-*b*] indole 誘導体は、5 位に水酸基が付加されたものの脂質過酸化に対する IC₅₀ は低値を示し、⁹⁾ indole-2-carboxamide 誘導体でも同様の結果が得られている。⁹⁾

5-位水酸化体 **M-2** の活性が増強されたのも、これらの 2 種の indole 誘導体と同様のメカニズムに起因すると考えられる。

もうひとつの阻害活性増強因子としては、*N*-脱イソプロピル化が考えられる。代謝物 **M-5** は *N*-脱イソプロピル化により阻害率の有意な増強が認められた。しかし、*N*-脱イソプロピル化された他の代謝物 **M-4**, 及び構造類似体 **M-4'-CHO** 及び **M-4'-CO₂Et** の中で、抗酸化活性が増強されたものは **M-4'-CO₂Et** のみであった。**M-5** と **M-4'-CO₂Et** は、*N*-脱イソプロピル化の他に、先述の基本骨格と **R₄** が共役し、水酸基もしくは *O*-エチルエステル基も存在する。そのため、*N*-脱イソプロピル化によって阻害活性の増強の可能性はあるものの、基本骨格と水酸基や *O*-エチルエステル基が共役する場合とくらべれば、抗酸化作用の増強作用は低いものと考えられた。

FV の生体内変換と抗酸化作用との関連性 **FV** をヒトに経口投与後の血漿中には未変化体がもっとも多く認められた。ついで **M-4** が多く認められた。**M-7** 及び他の代謝物はわずかであった。⁵⁾ このことから血漿中においては、血漿中での抗酸化作用に対する寄与は **FV** が最も高いものと考えられた。

一方、**FV** をヒトに経口投与後の糞中には **M-2**, **M-3** 及び **M-5** が多く認められたことから、⁵⁾ ヒト肝臓中においては、これらの代謝物が主として抗酸化作用を示すものと考えられた。

結 論

FV の阻害率は、今回検討したミクロソーム濃度 (0.025—0.2 mg protein/ml) では約 40—70% で、0.1 mg protein/ml までは濃度に依存し上昇した。しかし、0.2 mg protein/ml では約 50%、0.1 mg protein/ml での阻害率 (69%) より低下した。代謝物 M-2, M-3 及び M-5 の阻害率は、ミクロソーム濃度 0.1 mg protein/ml までは FV とほぼ同等であったが、0.2 mg protein/ml では FV より有意に高い阻害率を示した ($p < 0.01$)。代謝物 M-4 と M-7 の阻害率はいずれも約 30% でミクロソーム濃度に依存しなかった。PR は代謝物 M-2, M-3 及び M-5 とほぼ同等の阻害パターンを示した。PV はいずれのミクロソーム濃度においても他の薬物と同等か、より低い阻害率を示した。FV とその各代謝物の抗酸化作用はミクロソーム濃度 0.1—0.2 mg protein/ml の範囲では、FV と M-2, M-3 及び M-5 の抗酸化作用は、PR と同程度に強いと考えられた。

引 用 文 献

- 1) Kathawala F. G., *Med. Res. Rev.*, **11**, 121—146 (1991).
- 2) Yuan J., Tsai M. Y., Hegland J., Hunninghake D. B., *Atherosclerosis*, **87**, 145—157, (1991).
- 3) Hussein O., Schlezinger S., Rosenblat M., Keidar S., Aviram M., *Atherosclerosis*, **128**, 11—18 (1997).
- 4) Tse F. L. S., Jaffe J. M., Troendle A., *J. Clin. Pharmacol.*, **32**, 630—638 (1992).
- 5) Dain J. G., Fu E., Gorski J., Nicoletti J., Scallen J., *Drug. Metab. Dispos.*, **21**, 567—572 (1993).
- 6) 増田直記, 赤坂和泉, 大多和昌克, 薬物動態, **10**, 513—528 (1995).
- 7) Davis H. W., Suzuki T., Schenkman J. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**, 218—228 (1987).
- 8) Jordan R. A., Schenkenman J. B., *Biochem. Pharmac.*, **31**, 1393—1400 (1982).
- 9) Kuehm-C. C., Caubere P., Jamart-G. B., Negre-S. A., Bonnefont-R. D., Bizot-E. J. G., Pfeizffer B., Gaignard D. H., Guardiola-L. B., Renard P., *J. Med. Chem.*, **40**, 1201—1210 (1997).