抗動脈硬化剤に関する研究 (第 2 報¹⁾) 1,3-Propanediol bis(2-*p*-chlorophenoxyisobutyrate) (CLY-503) の抗動脈硬化剤としての実験的研究²⁾

中西美智夫, 小早川敬博, 岡田忠夫, 後藤一洋
吉富製薬株式会社研究所³⁾

Studies on Anti-atherosclerotic Agents. II.¹⁾ Experimental Studies
of 1,3-Propanediol bis(2-*p*-Chlorophenoxyisobutyrate)
(CLY-503) for Anti-atherosclerotic Agents²⁾

MICHIO NAKANISHI, TOSHIHIRO KOBAYAKAWA, TADAOK OKADA
and KAZUHIRO GOTOH

Research Laboratories Yoshitomi Pharmaceutical Industries Ltd.³⁾

(Received August 25, 1969)

The following data have been obtained on antiatherosclerotic activity of 1,3-propanediol bis(2-*p*-chlorophenoxyisobutyrate) (CLY-503) compared with ethyl 2-*p*-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate).

Hypolipidemic activity of CLY-503 was more durable in rats, and more potent in rats and cholesterol-fed mice than clofibrate in continued administration. Cholesterol and triglyceride levels decreased and phospholipid levels were unchanged or increased a little in liver of rats treated with CLY-503 or clofibrate. While lipid levels were not decreased, antiatherosclerotic activity was pronounced in cholesterol-fed rabbits treated with either of these agents. Furthermore, depression of capillary vascular permeability in mice and activation of fibrinolytic activity in rats were recognized in both agents. However, stabilization of erythrocyte membrane of rats and inhibition of platelet aggregation of rabbits, considered as antiatherosclerotic factors other than lipids concerned, were especially noted in CLY-503.

緒 言

1,3-Propanediol bis-2-*p*-chlorophenoxyisobutyrate (CLY-503)⁴⁾ は前報において報告したように, 血中コレステロール低下作用がすぐれ毒性がより弱い化合物として選出されたが, 本剤のより詳細な抗動脈硬化作用を対照薬剤と考えられる ethyl 2-*p*-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) と比較実験を行ない, 血中脂質低下作用以外でも興味ある薬理学的知見を得たので報告したい。

実 験 の 部

使用薬物 CLY-503, clofibrate はいずれも著者らの研究所で合成され, 純品である事が確認された後に使用した。CLY-503 は水に不溶の白色結晶で, 融点 48—50° であり, clofibrate は水に不溶の微黄色油状液体であり, CPIB-A は白色結晶粉末であった。またいずれも水に不溶のため原則として 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁して使用した。その構造式は次に示すごとくである。

実験方法および結果

I. 急性毒性 dd 系マウス (体重 20—25 g) および Wistar 系ラット (95—115 g) を用いた 7 日間観察による LD₅₀ 値を Litchfield & Wilcoxon 法⁶⁾ により求めた。結果は Table I に示すように, CLY-503 の急性

1) 第 1 報: 中西美智夫, 小早川敬博, 岡田忠夫, 津曲立身, 薬誌, 90, 921 (1970).

2) 日本薬学会 第88年会で発表, 東京, 1968 年 4 月.

3) Location: 955 Koiwai, Yoshitomi-cho, Chikugo-gun, Fukuoka.

4) 一般名 simfibrate.

5) 一般名.

6) J.T. Litchfield, F. Wilcoxon, J. Pharmacol. & Exp. Therap., 96,99 (1949).

CLY-503

1,3-propanediol bis-(2-*p*-chlorophenoxyisobutyrate)

CPIB-A

2-*p*-chlorophenoxyisobutyric acid Clofibrate⁵⁾ethyl 2-*p*-chlorophenoxyisobutyrateTABLE I. Acute Toxicity of CLY-503 and Clofibrate (LD₅₀, *p.o.*)

Species	Sex	CLY-503	Clofibrate
Mice	male	3500 (2710—4520) ^{a)}	1450 (1330—1580)
	female	3300 (2560—4260)	
Rats	male	8000 (5840—9140)	2300 (1770—2990)
	female	7300 (5370—9930)	

^{a)} mg/kg, mean values (95% confidence Limit)

毒性は clofibrate に比し、マウスで 1/2 およびラットで 1/3 以下である事が判明した。

II. 各種動物の血中脂質に及ぼす影響 (1) 正常ラットにおける作用持続性実験——Wistar 系雄性ラット (体重 200—270 g) を 1 群 5—6 匹として対照群のみ 11 匹を用いた。処置群に被検薬 CLY-503, clofibrate および CPIB-A のいずれか 100 mg/kg を経口投与し, 1, 2, 4, 8, 16, 32 および 48 時間後に総頸動脈より採血を行なった。その際各動物は採血前 24 時間の絶食を行なった。⁷⁾ 血清コレステロールはオートアナライザー (テクニコン社製) によって定量,⁸⁾ 推計学的に平均値の有意性を検定した。

結果は Fig. 1 に示すように CPIB-A の作用持続時間はもっとも短く, clofibrate がそれにつき, CLY-503 の作用はもっとも長く安定している事が判明した。

(2) 正常ラットの血清コレステロールに対する長期投与時の作用——Wistar 系雄性ラット (体重 150—190 g) を 8 群 (5 匹/群), 別に対照群として 6 匹使用し, CLY-503 または clofibrate を公比 2 の等比級数的投与量にて 20 mg/kg より 160 mg/kg まで経口的に 21 日間連続投与を行なった。最終投与後 4 時間にて採血血清コレステロールの測定を行なった。⁹⁾ 薬物用量の対数値とコレステロール値との用量反応関係を最小 2 乗法により直線性の検定を行ない, また得られた回帰直線より対照群の平均コレステロール値より 30% の低下をもたらすに要すると考えられる薬物用量すなわち ED_{90%} 値を算出し効力の比較を行なった。

結果は Fig. 2 に示すように F 検定により有意の直線性が認められる ($p < 0.01$) dose response curve が得られた。また対照群と被検薬処置群の間でともに 40 mg/kg 以上の投与群に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。さらに CLY-503 と clofibrate の 80 mg/kg 処置群間における差は $p < 0.1$ であった。さらに回帰直線より ED_{90%} を求めると CLY-503 は 63 mg/kg/day, clofibrate は 93 mg/kg/day となり両者の効力比は 1.48 であった。

(3) 正常ラットの血清および肝中の各脂質に対する長期投与時の作用——Wistar 系雄性ラット (体重 200—250 g) を 2 群 (5 匹/群), 対照群として 10 匹を使用し, 各群に CLY-503 および clofibrate をおののおの, 200 mg/kg 21 日間経口的に投与した。最終投与後絶食せしめ 24 時間後に採血と肝の摘出を行なった。肝中脂質の測定はイソプロパノールにてホモジナイズした肝を用い血清とともに総コレステロールは前述の方法,⁸⁾ トリグリセライドは Van Handel & Zilversmit 法,⁹⁾ 磷脂質はシリカゲルクロマトの溶出液を Bartlett 法¹⁰⁾ を用いて行なった。

7) R. S. Jacobs, M. S. Grebner, D. L. Cook, *Pro. Soc. Exptl. & Med.*, **119**, 1117 (1965).8) A. Zlatkis, B. Zak, A. J. Boyle, *J. Lab. Clin. Med.*, **41**, 486 (1953).9) E. Van Handel, D. B. Zilversmit, *J. Lab. clin. Med.*, **50**, 152 (1957).10) G. R. Bartlett, *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959).

Fig. 1. Time Course of Changes in Serum Cholesterol Levels after Treatment with CLY-503, Clofibrate and CPIB-A at 100 mg/kg (*p.o.*) in Fasted Rats

●—●: CLY-503 ○—○: clofibrate △—△: CPIB-A
significance for control a) $0.05 < p < 0.1$
b) $0.01 < p < 0.05$
c) $p < 0.01$

Fig. 2. Effect of CLY-503 and Clofibrate in reducing Serum Cholesterol Levels in Rats

Serum cholesterol levels ($M \pm S.D.$) in rats not treated with drugs were 79.8 ± 12.8 mg/dl, $n=6$.
●—●: CLY-503 ○—○: clofibrate

TABLE II. Effect of CLY-503 and Clofibrate on Serum and Liver Lipid Concentration

Treatment		Control	CLY-503	Clofibrate
Dose (mg/kg)		—	200	200
No. of rats		10	5	5
Body weight (g)		257 ± 5.5	277 ± 9.4	275 ± 8.2
Serum lipid (mg/dl)	cholesterol	69.0 ± 3.8	44.6 ± 1.3^a	49.2 ± 3.7^a
	(% decrease)	(—)	(36.6%)	(28.7%)
	triglyceride	52.3 ± 8.3	27.6 ± 3.0^a	26.6 ± 3.2^a
	(% decrease)	(—)	(47.2%)	(49.1%)
phospholipid		48.7 ± 2.6	44.0 ± 0.6	43.4 ± 3.4
	(% decrease)	(—)	(9.7%)	(10.9%)
Liver lipid (mg/g)	cholesterol	6.1 ± 0.19	4.9 ± 0.10^a	4.8 ± 0.05^a
	(% decrease)	(—)	(19.8%)	(20.3%)
	triglyceride	7.0 ± 1.18	3.7 ± 0.51^a	3.4 ± 0.24^a
	(% decrease)	(—)	(47.2%)	(51.7%)
phospholipid		18.1 ± 0.32	18.9 ± 0.64	20.8 ± 0.17^a
	(% decrease)	(—)	(4.4% ↑)	(14.9% ↑)

Figures represent mean $\pm$ standard error.

↑ increased a) differs significantly from control group ($p < 0.05$)

TABLE III. Composition of Cholesterol Diet

Component	g/kg	Component	g/kg
Cholesterol	10	Powdered cellulose	20
Hydrogenated coconut oil	95	Sucrose	671
Cholic acid	2	Vitamin mixture	5
Casein	150	Choline chloride	2
Salt mixture	40	Vitamin oil	5

結果は Table II に示すように CLY-503 と clofibrate は似かよった変動を示し血中、肝中のコレステロールおよびトリグリセライド値を減少させるが磷脂質には著明な作用を及ぼさず、clofibrate は肝の磷脂質をかえて増加させる傾向がうかがわれた。以上より両薬剤ともに脂肪肝をもたらし事は考えられない結果を得た。

(4) コレステロール食高脂血症マウスに対する作用——dd 系雄性マウス (18—22 g) を 6 群 (6 匹/群)、別に対照群として 8 匹を使用し、コレステロール 1%、コール酸 0.2% を含む合成飼料 (日本 CLEA 製) にて 2 週間飼育して高脂血症とした。その組成を Table III に示す。被検薬はコレステロール食開始とともに 40—320 mg/kg まで前述の等比級数的投与量により 14 日間経口投与を行なった。最終投与 4 時間後採血し血清コレステロールの測定⁹⁾ と ED₅₀ 値の算出を行なった。

結果は Fig. 3 に示すように dose-response 関係に直線性が認められ ($p < 0.01$)、また 160 mg/kg 以上の処置群では CLY-503 と clofibrate の間に有意差が認められ ($p < 0.05$)、CLY-503 のコレステロール低下作用がより著明である事が認められた。さらに ED₅₀ 値は CLY-503 が 124 mg/kg であるに対し clofibrate は 780 mg/kg (外挿法による算出) と両者の効力比は 2.3 となった。

III. 実験的動脈硬化症防止作用 雄性白色家兎 (体重 2.2—2.7 kg) 60 頭の中より血清コレステロール値、体重および体型がそろったもの 16 頭を選び、1 群 5 頭として 2 群対照群として 6 頭を使用した。コレステロール 2%、牛脂 10% を含む固型飼料 (船橋農場製) に被検薬 0.25% を含有せしめ各動物に 1 日 100 g 与え、8 週間飼育した。2 週ごとに採血と血中脂質の測定を実験 II の方法で行なった。8 週目に瀉血致死せしめ、その大動脈のアテロームの度合を肉眼的に 1 より 4 度まで中間点も含め 8 段階村上的方法¹¹⁾ に従って分類し、3 人の判定者による平均値をその動脈の硬化度とした。その判定基準を Table IV に示す。またその結果より 8 週間の平均血清コレステロール値と大動脈硬化度との間における相関々係に検索を加えた。

結果は Fig. 4 に示すように CLY-503 および clofibrate ともに抗動脈硬化作用を示し平均の動脈硬化度と標準誤差は対照群が 2.11 ± 0.29 であるに対し CLY-503 群は 1.12 ± 0.13 および clofibrate 群は 1.40 ± 0.26 で対照群に対する差は CLY-503 群は $0.02 < p < 0.05$ 、clofibrate 群は $0.1 < p < 0.2$ であった。同時に測定した血清コレステロール値に関しては有意の差は見られなかった。これには 2000—3000 mg/dl という脂血症の範囲をこえた条件での実験である事が関与していると思われる。しかしながらその大動脈の硬化度と平均コレステロール値との間に Fig. 5 示すように各処置群内に著明な相関々係が認められたが CLY-503 と clofibrate には対照群と異った回帰が得られた。すなわち対照群の動脈硬化のでき方とは差異が認められ、血中コレステロール値の大小による関与以外での因子も考慮すべき結果を得た。

IV. 血液成分および血管透過性に対する作用 (1) 正常ラットでの血液凝固活性に対する作用 (連続投与)——Wistar 系雄性ラット (体重 150—200 g) に被検薬を経口的に 30 日間投与した後 Quick の一段変法¹²⁾ によりプロトロンビン時間を測定した。トロンボプラスチンとしてトロンボキナーゼ (ガイギー社) を使用した。

結果は Table V. に示すように対照群といずれの処置群間にも有意の差は認められなかったがやや延長傾向を示した。

Fig. 3. Effect of CLY-503 and Clofibrate in reducing Serum Cholesterol Levels in Mice Fed Cholesterol Diet

Serum cholesterol levels ($M \pm S.D.$) in mice not treated with drug were 423 ± 69 mg/dl, $n=8$.

●—● : CLY-503
○---○ : clofibrate

TABLE IV. Murakami's Macroscopic Evaluation of Atherosclerotic Plaque

Degree and area of atherom plaque in whole aorta	Atherosclerosis index
Minimal plaque less than 50%	1
Minimal plaque more than 50% or moderate plaque less than 50%	2
Moderate plaque more than 50% or severe plaque less than 50%	3
Severe plaque more than 50%	4

11) 村上 驥, 医学研究, 28, 4109 (1958).

12) A.J. Quick, *Am. J. Clin. Path.*, 10, 222 (1940).

atherosclerosis index				
	1	2	3	
nil (control)	•	•	•	•
CLY-503 0.25%	•	•	•	•
clofibrate 0.25%	•	•	•	•

Fig. 4. Effect of CLY-503 and Clofibrate on Experimental Atherosclerosis in Rabbits

(2) 抗凝固剤併用時の抗凝固活性に対する作用 (1 回投与)——Wistar 系雄性ラット (体重 170—230 g) を 1 群 7 匹とし、阿被検薬 200 mg/kg と抗凝固剤の Warfarin Sodium を 5 mg/kg を併用または単独、経口投与 17 時間後の血液凝固能をプラスマ—カルシウム再加凝固時間¹³⁾を用いて測定した。

結果は Table VI に示すように CLY-503 および clofibrate はともに Warfarin との併用によりその凝固時間延長を助長する傾向が認められたが clofibrate の作用は有意であるに対し CLY-503 のその作用は有意ではなかった。

(3) 線溶系に対する作用——雄性 Donryu 系ラット (体重約 130 g) を 1 夜絶食せしめ、被検薬を 1% Tween-80 を含む生理食塩水に懸濁して投与、3 時間後にエーテル麻酔下採血しクエン酸プラスマを得た。標準フィブリン平板法またはウロキナーゼ 100 U/ml を等量の試料と 37° 10 分間 preincubate して活性化した加熱フィブリン平板法によって溶解面積の比よりプラスマおよび euglobulin fraction の線溶能を測定した。¹⁴⁾

TABLE V. Effect of CLY-503 and Clofibrate on Prothrombin Time of Rats treated for 30 Days

Treatment	Dose mg/kg	No. of rats	Prothrombin time (M±S.D.) sec
Nil (control)	—	9	21.4±1.5
CLY-503	75	5	23.9±2.4
CLY-503	150	9	23.3±1.7
Clofibrate	75	8	22.7±1.9
Clofibrate	150	10	22.4±1.5

TABLE VI. Effect of CLY-503 Clofibrate on Plasma-recalcification Time of Rats pretreated with Warfarin Sodium

	Treatment	No. of rats	P.Ca.T. (sec) ^{a)}	Signi. A vs.	Signi. B vs.
A	Intact control	7	87±39	—	<0.01
B	Warfarin 5 mg/kg	7	180±30	<0.01	—
C	Warfarin 5 mg/kg + CLY-503 200 mg/kg	7	210±48	<0.01	>0.1
D	Warfarin 5 mg/kg + Clofibrate 200 mg/kg	7	239±79	<0.01	0.05< p <0.1

a) mean value±S.D.

13) 松岡松三, 診断と治療, 49, 42 (1961).

14) K.N. Von Kaulla, "Chemistry of Thrombolysis; Human Fibrinolytic Enzymes," Charles C. Thomas, Springfield, 1963.

Fig. 5. Correlation between Mean Serum Cholesterol Level and Atherosclerosis Index of Cholesterol-fed Rabbits treated with CLY-503 and Clofibrate

○—○ : control ●—● : CLY-503
×—× : clofibrate
significance a) 0.01< p < 0.05 b) p < 0.01

結果は Table VII に示すように CLY-503 および clofibrate とともに 500 mg/kg 投与群の euglobulin fraction の線溶活性にわずかの上昇が認められ有意であったが、プラズマ、ウロキナーゼ加プラズマおよびウロキナーゼ加 euglobulin の線溶活性は対照群との間に有意差が認められなかった。

TABLE VII. Effect of CLY-503 and Clofibrate on Fibrinolytic Activity in Rats

Treatment	Dose mg/kg	No. of rats	Fibrinolytic activity (mm ²)			
			Plasma ^{a)}	UK-plasma ^{b)}	Euglo. ^{a)}	UK-euglo. ^{b)}
Control	—	6	‡	134.8	172.7	164.5
CLY-503	100	6	‡	147.9	169.9	161.5
Control	—	8	‡	143.7	174.5	159.8
CLY-503	300	8	‡	157.4	205.1	147.6
Clofibrate	300	6	‡	138.1	170.3	160.4
Control	—	6	‡	127.7	151.0	163.8
CLY-503	500	6	‡	132.2	182.0 ^{c)}	166.3
Clofibrate	500	6	‡	134.7	187.5 ^{c)}	160.9

a) standard fibrin plate

b) heated fibrin plate, urokinase 100 u/ml, 37° 10 min preincubation

c) significant difference ($p < 0.05$)

(4) ラット赤血球膜安定化作用——E.M. Glenn ら¹⁵⁾ の方法に準じ、ラットのヘパリン加血液より得られた赤血球を 0.15M の磷酸 buffer (pH 7.4) に懸濁、被検薬を dimethyl sulfoxide に溶解せしめ、53° で 20 分間インキュベートし、遠心後 540 m μ の吸光度を測定、対照群の吸光度を 100 としてヘモグロビンの相対値で示した。

結果は Table VIII に示すように CLY-503 にのみ赤血球膜の安定化作用が認められたが clofibrate にはその作用はまったく認められなかった。

TABLE VIII. Effect of CLY-503 and Clofibrate on Stability of Erythrocyte Membrane of Rats *in Vitro*

Concentration (μ M)	500	250	100	50	25	10	5
Compounds							
CLY-503	83.0	77.5	63.3	77.3	82.2	90.5	91.5
Clofibrate	>100	91.8	95.2	97.1	97.5	98.2	100

Figures are relative hemolysis represented as % of control.

(5) 家兎血小板凝集反応に対する作用——Born の方法¹⁶⁾ に従い、シリコン系にて採血した絶食雄性家兎のクエン酸加血液より、platelet-rich plasma を分離、ADP の 5 μ M による血小板凝集を自記分光光度計 (日立 EPS-3T) を使用、波長 600 m μ における吸光度を測定した。

Fig. 6. Effect of CLY-503 and Clofibrate on Platelet Aggregation *in Vitro*

15) E.M. Glenn, B.J. Bowman, J.C. Koslowske, *Biochem. Pharmacol. Supplement*, 1968, 27.

16) G.V.R. Born, *Nature*, 194, 927 (1962).

結果は Fig. 6 に示すように CLY-503 にはその凝集抑制作用が認められたが clofibrate にはまったくその作用は認められなかった。

(5) 血管透過性に対する作用——dd 系雄性マウス (体重 20—25 g) を 1 群 10 匹とし、被検薬を公比 2 の等比級数的投与量によって経口投与 4 時間後、Brown らの方法¹⁷⁾ によってトリパンプルー静注マウスの耳の一方にキシロールを塗布、15 分後の青染度を 1—5 度に判定し、また左右の耳の重量差より浮腫の度合を判定した。対照群に対する 30% 抑制薬量すなわち ED_{30%} を求めた。

結果は Table IX に示すように両薬物ともに著明な抑制効果を示した。

TABLE IX. Inhibitory Effect of CLY-503 and Clofibrate on Vascular Permeability of Mice Earlobes irritated with Xylene

Compounds	ED _{30%} (mg/kg)	
	Bluing	Edema
CLY-503	270	140
Clofibrate	210	160

考 察

従来動脈硬化症の治療、予防を目的とした薬剤が数多く開発され臨床的にも使用されることもあったが clofibrate に関してはその有用性が認められつつある数少ない例であろう。その有効性の裏づけとなる薬理学的作用として血中脂質の是正作用の他にいくつかの興味ある知見を見出した。すなわち clofibrate および CLY-503 には血管透過性亢進の抑制作用と線溶系の軽度な活性化作用が見出された。

Clofibrate の血管透過性亢進の抑制作用は今まで報告されていないが、hydrocortisone や phenylbutazone のように脂質の低下作用を介することなく実験的動脈硬化症の抑制作用を有する化合物¹⁸⁾ が強力な血管透過性亢進の抑制作用を有する¹⁷⁾ ところからもかなり意義のある作用と考えられる。さらに線溶系の活性化は臨床的に clofibrate にも認められている¹⁹⁾ がわれわれの実験でもラットの euglobulin fraction にその作用が認められている。

一般に線溶系の亢進が抗動脈硬化的に働くことは認められているが、この程度の作用が有意義な結果をもたらすか否かについては今後の検討に待ちたい。CLY-503 については前述の作用に加えて clofibrate には認められない赤血球膜の安定化作用や血小板凝集の防止作用が本実験で認められた。前者については抗炎症剤がこの作用を有すところより¹⁵⁾ 動脈の炎症や浮腫を抑制する可能性があり抗動脈硬化症の要因と考えることができるであろう。また後者の作用は動脈硬化発生の因子の 1 つとして考えられている血栓生成に関係し、その防止という点から重要視されている因子であり、²⁰⁾ その作用を有すことは抗動脈硬化剤としてのぞましい特性といえる。以上のように CLY-503 は主作用と考える血中脂質低下作用においても対照群である clofibrate よりすぐれている上、血中脂質低下作用以外でも抗動脈硬化剤としてのぞまれるいくつかの特性を有している上に実験的動脈硬化症をも著明に防止するなど好ましい生物学的作用を有することが判明した。

一方主作用以外の薬理作用においては CLY-503 は clofibrate と比較すると前報¹⁾ で報告したように急性毒性が弱いことで示されるように副作用はより少ない化合物と考えられる。

17) D.M. Brown, R.D. Robson, *Nature*, **202**, 812 (1964).

18) J.M. Bailey, J. Butler, *Nature*, **212**, 731 (1966).

19) S.C. Srivastava, M.J. Smith, H.A. Dewar, *J. Atheroscler. Res.*, **3**, 640 (1963).

20) J.F. Mustard, M.A. Packham, H.C. Rowsell, L. Jrgensen, "Platelet; Their Role in Hemostasis and Thrombosis," T.K. Shattauer-Verlag, 1966, p. 261.