

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

Therapeutic Research (2003.08) 24巻8号:1427～1433.

ESR法を用いたピタバスタチンの抗酸化作用の検討

住友和弘, 長谷部直幸, 菊池健次郎, 宍戸直美, 中村正雄

● 演 題 1

ESR 法を用いたピタバスタチンの抗酸化作用の検討

住友和弘¹⁾ 長谷部直幸¹⁾ 菊池健次郎¹⁾
 宍戸直美²⁾ 中村正雄²⁾

はじめに

スタチンには、内皮機能の改善や NO 合成の促進等、多様な性質があり、そのなかでも今回、われわれは抗酸化作用に注目し、ピタバスタチンのもつ化学的ラジカル消去作用について検討した (表 1)。

酸化ストレスとは、虚血・再灌流、炎症や運動等、種々の刺激によって活性酸素を発生する系がビタミン C, E や抗酸化酵素類等の活性酸

表 1 スタチンの多面的作用 (pleiotropic effect)

- ・内皮機能の改善
- ・NO 合成の促進
- ・組織因子の抑制
- ・血小板抑制
- ・抗酸化作用
- ・抗炎症作用 (CRP↓, 接着因子↓)
- ・MMP の減少
- ・TNF- α の減少
- ・平滑筋細胞増殖の抑制

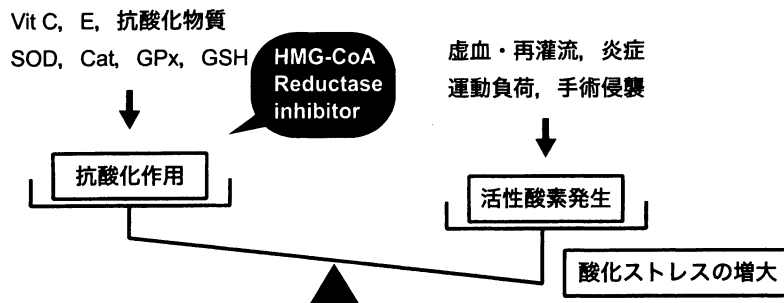
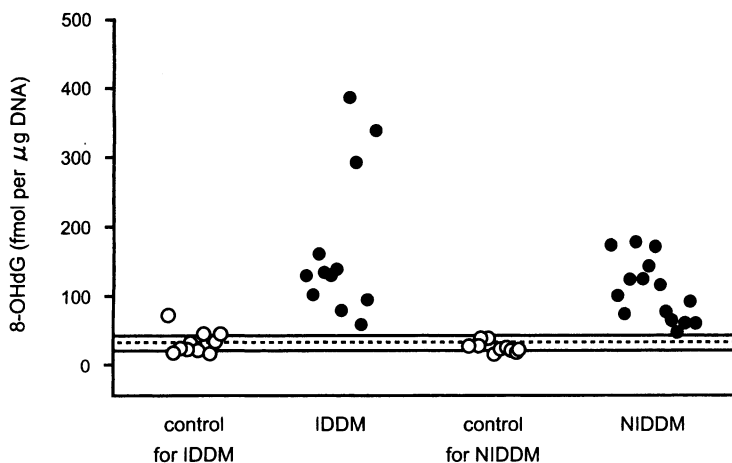


図 1 活性酸素消去系 (抗酸化作用) と活性酸素産生系のバランス



8-OHdG in IDDM and NIDDM patients and their respective controls
 Lines : median and interquartile range of controls for IDDM patients
 Lancet 1996;347:444-5.
 図 2 疾患と活性酸素

¹⁾ 旭川医科大学第一内科

²⁾ 旭川医科大学化学

4 スタチンに関する情報交換会

素消去系の活性を上回った不均衡状態をさす。今回、ピタバスタチンをはじめとするいくつかのスタチンにおいて、化学的、直接的にラジカルを消去する作用があるかどうかを、いくつかの方法で検討してみた(図1)。

疾患に活性酸素が関与していると考えられる例を二つ提示する。糖尿病では, IDDM, NIDDMの双方において, コントロール不良群においては DNA の酸化傷害マーカーである 8-OHdG が高値を示すことが 1996 年度の「Lancet」に報告されている(図2)。また, われわれの研究室で, 急性心筋梗塞症例の再灌流療法前後での 8-

OHdG の生成量を測定したところ, PTCA 前に対して, PTCA 後に 8-OHdG の生成量は有意に増加しており, この増加度が慢性期の左室機能に大きく関与することが明らかにされている。

表 2 ESR とは?

Electron Spin Resonance : 電子スピン共鳴法
= Electron Paramagnetic Resonance

磁場を利用した活性酸素のもつ不対電子の検出

使用機器：
日本電子 JOEL JES TE-300

測定条件：

Temp	RT
Freq	9.426 GHz
Power	4.0 mW
Field	335 mT
Sweep Time	2 min
MOD	0.1 mT
Amp	500
Time Constant	0.3 sec

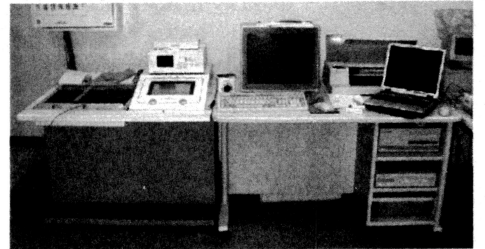
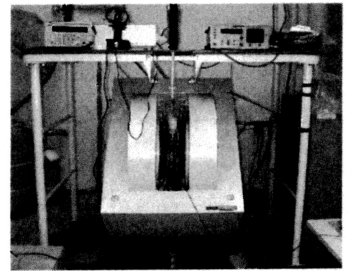


図 3 ESR 測定方法

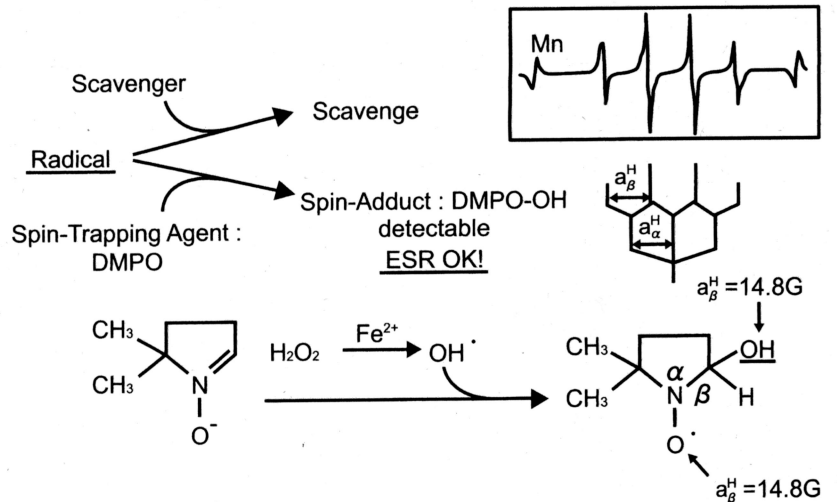


図 4 ESR 測定理論

DMPOと抗酸化物質の競合反応：シグナルを小さくする物質ほど抗酸化作用を有する。

実験方法 1

今回、われわれは電子スピン共鳴 (electron spin resonance) 法という、磁場を利用した活性酸素のもつ不対電子の検出方法を主に用いて、ピタバスタチンの抗酸化作用を検討した (表 2)。装置本体にはコイルが 1 対あり、その中央にサンプルをセットして磁場をかけることにより、特徴的なシグナルが得られるという装置である (図 3)。

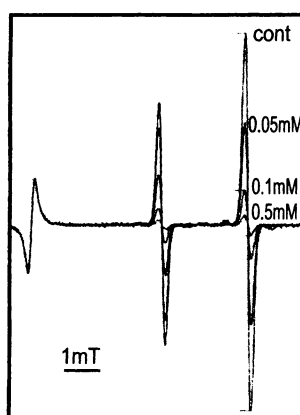
スピントラップ剤には DMPO という物質を用いた。そこに過酸化水素と 2 価の鉄を反応させる (フェントン反応) ことによってヒドロキシラジカルを生成させた。このヒドロキシラジカルが DMPO の二重結合の部位で反応し、DMPO-OH を作り、磁場によって 4 本の特徴的なシグナルを生じる (図 4)。薬物が存在しない状態でのコントロールのシグナルの強度を 100% として、ピタバスタチンや他のスタチン等のスカベンジャーのシグナルが 50% に抑制される濃度から 2 次反応速度定数を求めた。

ピタバスタチンを加えるとコントロールに対して濃度依存的にシグナルが減衰していく。約 0.05 mM の濃度でコントロールの 1/2 になり、この濃度から 2 次反応速度定数を求めると 6.8×10^{10} という数値が求められた。同じ方法で、プラバスタチン、セリバスタチン、フルバスタチンについても検討を行ったところ、ピタバス

タチンが最もヒドロキシラジカルの消去能が強いという結果が得られた (図 5)。

続いて、スーパーオキシドの消去能に関して検討を行った。キサンチンとキサンチンオキシダーゼでスーパーオキシドを一定量生成させ、このスーパーオキシドを海ホタルのルシフェリン誘導体である CLA で捕捉すると 380 nm の化学発光を生じる。この化学発光の強度を、薬物を加えない時を 100% として、50% ま

ピタバスタチンの hydroxyl radical 消去能



2 次反応速度定数

- Pitavastatin : $K_2 = 6.8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$
- Pravastatin : $K_2 = 5.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$
- Cerivastatin : $K_2 = 1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$
- Fluvastatin : $K_2 = 1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$

図 5 ピタバスタチンの hydroxyl radical 消去能と 2 次反応速度定数

50 mM PBS, pH 7.0 (Total 2 mL)	
CLA	5 μM
Catalase	0.08 μM
Drug	
Xanthine	0.1 mM

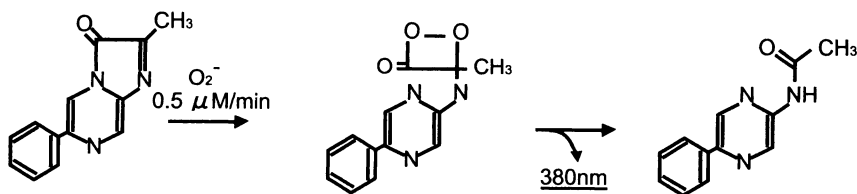
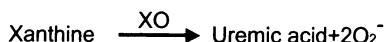
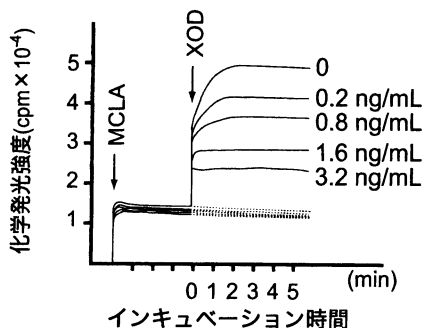


図 6 スーパーオキシドの消去能



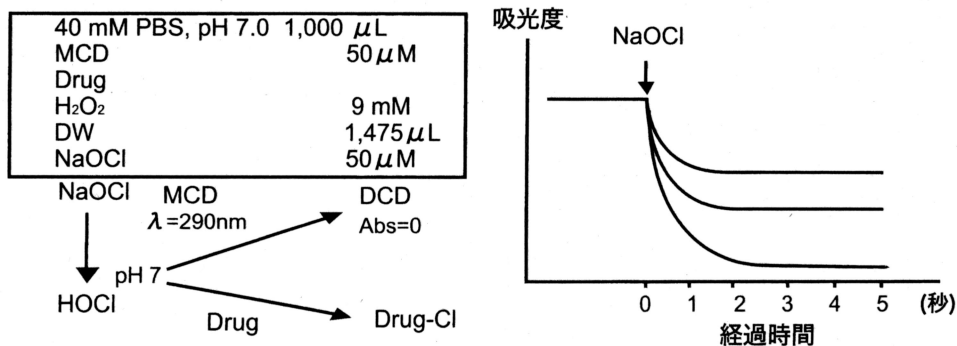


図 7 次亜塩素酸の消去能

	Pitavastatin	Pravastatin	Fluvastatin	Cerivastatin
溶解性	疎水性	親水性	疎水性	疎水性
分配係数	6.44(pH 7.77)	0.34(pH 7.0)	54.0(pH 7.0)	209.7(pH 7.0)
OH ⁻	6.8×10^{10}	5.0×10^{10}	1.3×10^{10}	1.6×10^{10}
O ₂ ⁻	<10	10	10 ²	10
HClO	評価不能	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵

2次反応速度定数 M⁻¹S⁻¹

図 8 HMG-CoA 還元酵素阻害薬の物性と抗酸化能

で抑制する濃度からスーパーオキシドに対する 2 次反応速度定数を求めた (図 6)。

さらに、次亜塩素酸の消去能を検討した。次亜塩素酸は白血球のミエロペロオキシダーゼから生成するもので、やはり炎症の場において発生し、生体を傷害するといわれている。次亜塩素酸を発生させ、モノクロジメドンと反応させると、モノクロジメドンがもつ 290 nm の吸光度が減衰していく。薬物を加えない時の一番低い状態の振幅を 100% として 50% まで抑制する濃度から反応定数を求めた (図 7)。

結果 1

ピタバスタチン、プラバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンの 4 種類のスタチンの活性酸素消去能を検討したところ、ヒドロキシ

ラジカルに関してはピタバスタチンが最も強かった。他のスタチンについても 2 次反応速度定数が 10¹⁰ のオーダーでトラップしている。ヒドロキシラジカルに対する生体内での有効定数に関しては、糖類が 10⁹ で反応することから 10⁹ 以上であれば生体内においても有効に作用していると考えられる。スーパーオキシドについては、いずれのスタチンもほとんど反応していないという数値が得られた。スーパーオキシドは生体内の SOD が 10⁵ のオーダーで反応することから、スタチンはスーパーオキシドを消去しないことがこの結果から示唆された。次亜塩素酸については生体内の蛋白類と 10⁵ のオーダーで反応し、どのスタチンとも有効に反応していると考えられた。ただし、ピタバスタチンに関しては、物質の吸光度が、今回測

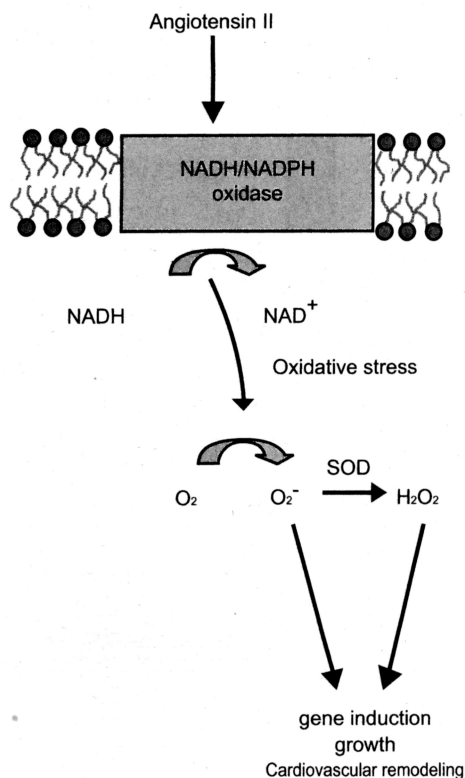
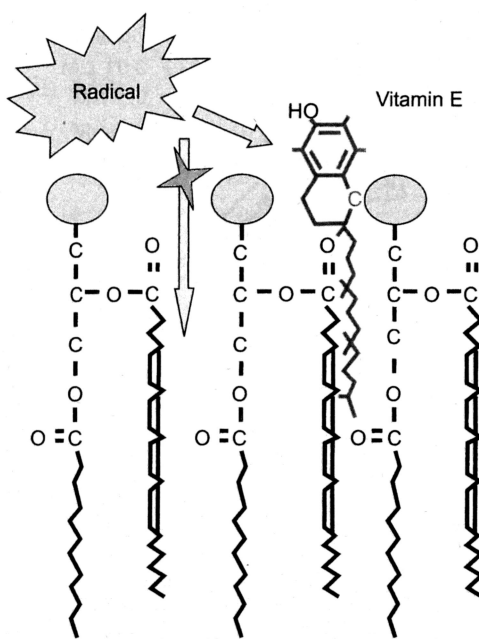


図 9 酸化ストレスと血管リモデリング



Hypertension 1997; 29:36.

定した 290 nm 近傍にあり、評価できなかった。化学構造式をみると、たとえばセリバスタチンのように二重結合、ジエンを有し、窒素原子を有している。このジエンと窒素原子の部分でラジカルをトラップすると考えられ、おそらく 10^5 以上の反応定数をもっていると考えられる (図 8)。

酸化ストレスは血管系にどのような影響を及ぼすのだろうか。そしてまたそれを消去することでどのようなメリットが享受できるのだろうか。アンジオテンシンIIやシェアストレス等、種々の刺激によって、膜に存在する NADPH オキシダーゼが活性化を受けてスーパーオキシドが生成される。このスーパーオキシドは SOD によって過酸化水素になり、さらに過酸化水素は鉄によってヒドロキシラジカルになる。こういったラジカル類は AP-1 とか NF- κ B 等の転写因子を活性化してリモデリングを起こすと考えられる。この生体膜に、構造上おそらくピタバスタチンも芳香環部を膜表面に出して、

長鎖の部分をもつ膜の中に差し込むような形で分布すると考えられる。ピタバスタチンは、プラバスタチンよりも疎水性であるが、他のスタチンよりもどちらかといえば親水性に近い性質ではないかと考えられる。そうすると膜の表面で、こうした膜のラジカルを有効にトラップできるのではないかと推測できる (図 9)。

これらの点について実際に培養細胞を用いて検討した。

実験方法 2

ラット胎児の心筋を使い、20 mM の高濃度の過酸化水素を加えて、MTT アッセイと medium に遊出してくる LDH の量を測定した。

結果 2

コントロール群に対して過酸化水素を加える 30 分前にピタバスタチンを処置しておくと、30 分、60 分では生存率が高いという結果が得られた。LDH の遊出率に関しても濃度依存

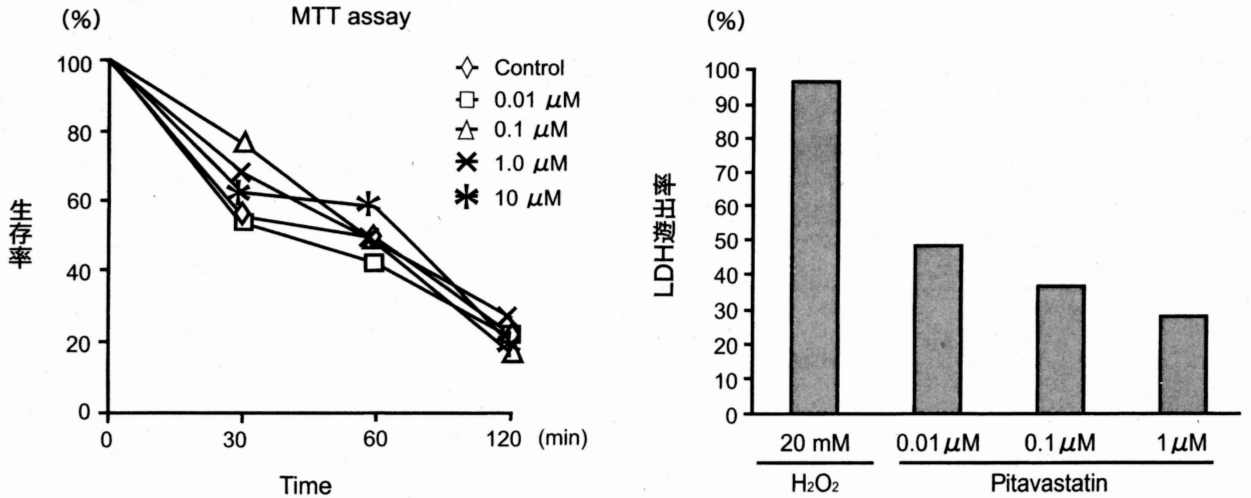


図 10 過酸化水素による心筋細胞障害に対するピタバスタチンの効果

表 3 まとめ

- ①HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンは主に OH[•], HClO の消去による抗酸化能を有する。
- ②ピタバスタチンは、高濃度の過酸化水素曝露による心筋細胞障害に対して、濃度依存的な改善効果を示し、直接的ラジカル消去作用を有するものと考えられた。

的に低下しており、細胞レベルでも抗酸化作用を示していることが示唆された (図 10)。

結 語

ピタバスタチンは主にヒドロキシラジカル、次亜塩素酸の消去による抗酸化能を有する。ピタバスタチンは、高濃度の過酸化水素曝露による心筋細胞障害に対して、濃度依存的な改善効果を示し、直接的ラジカル消去作用を有するものと考えられた (表 3)。

質 疑 応 答

野出 住友先生、どうもありがとうございます。ピタバスタチンがヒドロキシラジカルの抗酸化作用を有するという演題ですけれども、コメントや質問がございましたでしょうか。

高橋 培養を心筋細胞でしておられましたけれど、内皮や他の細胞でのデータをおもちでしたら教えていただきたい。

住友 平滑筋細胞でも培養して行ってみました。同じように生存率が改善していました。

代田 最後の、酸化ストレスで傷ついた心筋を保護したというデータですが、どのくらいの量であるような効果が得られるのですか。

住友 ヒトで応用した時、ピタバスタチンを通常量飲ませると血中濃度が 10nM になると聞いていたので、その濃度でどうかということで行ってみました。それでいてお示したように濃度依存的なんです。いちおう抑制効果がみられていて、10nM からは予防効果があると思います。

野出 心筋細胞でピタバスタチンが過酸化水素による細胞障害を抑えるということで

前半の内容とリンクさせますと抗酸化作用があるのではないのでしょうか。もう一点は、おそらくスタチン自身は、PI3 kinase を活性化して Akt をリン酸化してアポトーシスを抑える。ですからその実際の抗酸化作用で効いているのか、あるいはそれが先のシグナルを抑えてアポトーシスを抑えているのか、両方の可能性が考えられるのではないのでしょうか。もう一点は、先生のデータでは 30 分前に投与したほうが効いていますね。そのあたりの結果と、前半の内容と比べると、どういうメカニズムで作用が効いているかということです。

住友 今回は急性効果ということで、高濃度の過酸化水素を加えてその時に主にラジカルの化学物質としての捕捉作用を検討したかったので、過酸化水素を加える 30 分前にスタチンを加えておきました。ですから、今回の結果はシグナルを動かして蛋白を誘導したというよりは、化学物質としてのピタバスタチンの特性に由来するものだろうと考えています。もう一点は、まだ現在検討中なのが、慢性効果といいますか、常時飲ませている時や、24 時間前に加えた時はどうか検討していますが、24 時間前に加えておいても同じような結果が出てきて、シグナル系をいくつか動かしているようなデータが出始めています。

代田 スカベンジャーの効果というのは、慢性になるとかなり違った効果も出てくるのかもしれないと思っていました。この慢性実験でも同じような形だとすると、この効果はスカベンジの効果だけであるという理解ですか。

住友 おそらくスカベンジの効果は代謝されてどんどん減っていってしまいます。あとは入っていったピタバスタチンが、たとえば NOS を動かすとか、なかでいろいろな遺伝子を動かします。他にもわれわれはヒートショック等でも検討していますが、そういうものを動かしてよい効果を出しています。

代田 もう一つ、臨床的な話ですが、ビタミン E とか、抗酸化剤としてのビタミンは、臨床的にはそれほどよいデータが出ていませんね。ああいうタイプのものは膜の外側についていることが必ずしもプラスになっていないのではないかと僕は思っていますが、抗酸化剤一般としてどのあたりにあれば臨床的な効果があがりやすいのですか。

住友 たとえばビタミン C の場合は完全に水溶性で膜に分布していません。スタチンのように膜にある程度入れて、なおかつ、生体膜、細胞膜、ミトコンドリアとか、そういうラジカル産生する場所に効率よく分布できることが抗酸化作用を強く発揮できる目安になるのではないかと思います。

野出 スタチン群自体はたとえば糖尿病性の心筋障害とか血管障害に対しては LDL コレステロール 120 mg/dL くらいでも抑えます。ただビタミン C, E の混合カクテル療法では抑えられなかったというのは、おそらく先生がされているヒドロキシラジカルの産生とか、抗酸化作用でスタチンとビタミンとの違いがあるだろうということで、実際先生のデータでもそういう交差をするということですね。

住友 はい。そうです。

野出 どうもありがとうございました。