

AMCoR

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

Progress in Medicine (2003.05) 23巻5号:1483～1486.

カルシウム拮抗薬Azelnidipine(カルブブロック)の抗酸化作用の検討

住友和弘, 長谷部直幸, 宍戸直美, 中村正雄, 菊池健次郎

カルシウム拮抗薬 Azelnidipine (カルブブロック)の抗酸化作用の検討

Sumitomo Kazuhiro
住友 和弘¹⁾
Kikuchi Kenjiro
菊池健次郎¹⁾

Hasebe Naoyuki
長谷部直幸¹⁾

Shishido Naomi
宍戸 直美²⁾

Nakamura Masao
中村 正雄²⁾

要 旨

カルシウム拮抗薬は、抗狭心症作用、抗不整脈作用のみならず、その優れた降圧作用に基づく脳、心、腎の臓器保護作用や動脈硬化抑制作用を有しており、高血圧治療薬として幅広く使用されている。近年、本来の降圧作用とは別にNO産生刺激作用、血管リモデリング抑制作用、抗酸化作用など種々の生物学的作用が報告され、カルシウム拮抗薬のpleiotropic effectが抗動脈硬化作用や心筋保護作用に寄与することが示唆されている。Pleiotropic effectの1つである抗酸化作用についていくつかのカルシウム拮抗薬で検討が行われているものの、研究方法によってその成績には幅があり、客観的に比較することが難しい。われわれはヒドロキシラジカルとカルシウム拮抗薬の反応速度定数について比較検討した。被検薬はアゼルニジピン、アムロジピン、ニフェジピンであり、ヒドロキシラジカルとの反応性はスピントラップ剤としてPBNを用いたESR法により検討した。結果はアゼルニジピン 1.1×10^{10} 、アムロジピン 2.3×10^9 、ニフェジピン 1.6×10^9 (2次反応定数 $M^{-1}S^{-1}$)の順になった。生体内で発生する活性酸素のうち、ヒドロキシラジカルは最も酸化力が強く、それゆえ細胞毒性が強い。したがって細胞障害を抑える上でアゼルニジピンのような高い脂溶性の性質をもち、細胞膜に分布可能なカルシウム拮抗薬の方が抗酸化作用をより強く発揮できる可能性がある。

Key words : 抗酸化作用, アゼルニジピン, アムロジピン, PBN, ESR法

背 景

カルシウム拮抗薬は高血圧治療薬として安全性が確立しており、日常診療に不可欠な薬剤である。電位依存性L型カルシウムチャンネルをブロックすることにより、血管平滑筋細胞や心筋細胞内のカルシウム濃度を低下させ、血管拡張作用、陰性変時作用、陰性変力作用を発揮することが知られている。最近の研究では、これらの作用のほかに抗動脈硬化作用、虚血・再灌流障害に対する心筋保護作用を有していることが明らかになってきた。抗動脈硬化作用や心筋保護作用はNO産

生刺激作用、内皮機能改善作用、抗炎症作用、抗酸化作用などによってもたらされることが知られるようになり、高脂血症治療薬のスタチン系薬剤に認められるpleiotropic effectと同様の性質をカルシウム拮抗薬がもつと考えられる。

酸化ストレスの亢進とは、活性酸素発生とそれを消去する抗酸化作用のバランスが活性酸素発生側に傾いた状態をいう。近年の研究から、定常的に発生する活性酸素はセカンドメッセンジャーの役割を果たし、レドックス制御を介して細胞機能をコントロールしていることがわかってきた。一方、過剰発生した活性酸素はアポトーシスやネクローシスなどの細胞障害をもたらす。循環器分野においては動脈硬化形成過程やプレコンディショニング効果の誘導、心不全の発生など多

1) 旭川医科大学第一内科 2) 同化学

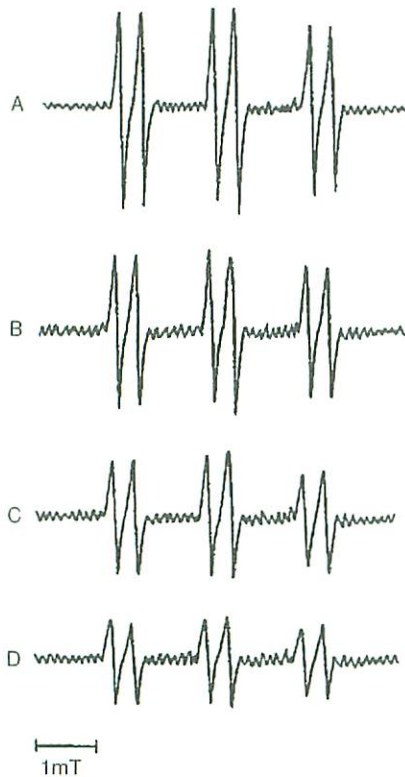


図1 a アゼルニジピンの濃度依存的ESRシグナルの減衰

A: コントロール; 薬剤非添加
 B: 0.1 mMアゼルニジピン
 C: 0.2 mMアゼルニジピン
 D: 0.4 mMアゼルニジピン
 下線は1 mT.

くの病態で活性酸素の関与が指摘され、今後、酸化ストレス制御(レドックス制御)による抗酸化療法の臨床への応用が期待される。

PREVENT試験の成績以後、カルシウム拮抗薬アムロジピンの抗酸化作用が心血管保護作用に寄与している可能性が示唆されている。その後の研究で、アムロジピンには抗酸化作用のほかにNO産生刺激作用、平滑筋増殖抑制作用などが確認されている。すなわち、日常診療において汎用されるカルシウム拮抗薬は、レドックス制御戦略のデバイスの1つとしても有用である可能性が考えられるのである。

われわれの研究室のSugawaraら¹⁾が、ラット心筋細胞膜を用いてカルシウム拮抗薬の過酸化脂質の生成抑制効果を検討した結果、その抗酸化作用はニルバジピン>ニソルジピン>フェロジピン>ニカルジピン>ベラパミル>ベニジピンの順になり、ニトレンジピン、ニフェジピン、ジルチアゼムの効果は極めて弱いと考えられた。

今回われわれは生体内で発生するラジカルのうち、

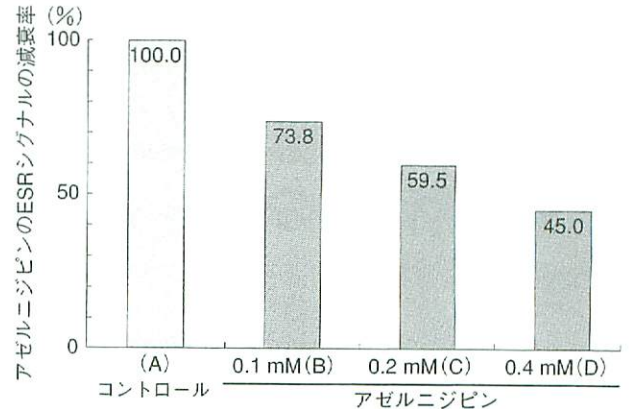


図1 b アゼルニジピンのヒドロキシラジカル消去能

ヒドロキシラジカル消去能の測定をESR法にてPBNシグナルを検出した。コントロールを100%とし、各薬物濃度の減衰率を求めた。

細胞毒性の最も強いヒドロキシラジカル(HO[•])に注目し、次世代カルシウム拮抗薬として期待されるアゼルニジピンの反応性をESR法を用いて検討した。

研究目的

動脈硬化、虚血・再灌流、炎症などの種々の病態に関連して生体内で発生すると考えられるヒドロキシラジカルに対して、アゼルニジピンをはじめとする各種カルシウム拮抗薬の反応速度を測定し、おのおのの抗酸化作用について検討した。

研究方法

1. ヒドロキシラジカル消去能の検討

カルシウム拮抗薬は疎水性のため、溶媒にdimethylsulfoxide (DMSO)を用い、スピントラップ剤にPBN (α -phenyl-N-tert-butyl nitron)を用いるEli Finkelsteinらの方法²⁾に従ってESR (Nippon denshi: JOEL JES TE-300)による検討を行った。カルシウム拮抗薬をDMSOに溶解後、最終濃度が0.1, 0.2, 0.4 mM溶液になるように調製し、10 mM PBN, 1 mM過酸化水素, 0.3 mM塩化鉄(II), 50 μ M DETAPAC (diethylenetriamine penta-acetic acid)を混和し反応を開始した。混和後1分後に溶液をフラットセルに移し、ESRでシグナル強度を測定した。Fenton反応により発生したヒドロキシラジカルは、PBNと速やかに反応して測定可能なシグナルを得る。薬物を加えないときのシグナル強度を100%とし、薬物添加による競合反応により、シグナル強度が50%に抑制される薬物濃度から各薬物の2

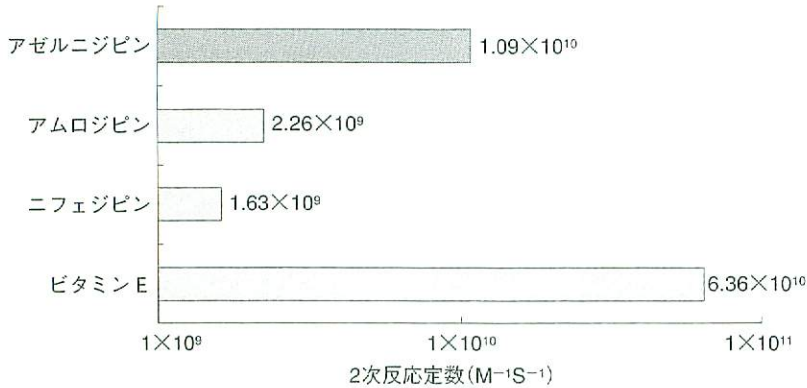


図2 ヒドロキシラジカルに対するカルシウム拮抗薬およびビタミンEの2次反応定数

表1 各種カルシウム拮抗薬の活性酸素種消去能

薬剤名	ヒドロキシラジカル	スーパーオキシド
アゼルニジピン	1.09 × 10 ¹⁰	2.0 × 10 ⁴
アムロジピン	2.26 × 10 ⁹	1.0 × 10 ⁵
ニフェジピン	1.63 × 10 ⁹	2.0 × 10 ⁴
ビタミンE	6.36 × 10 ¹⁰	—

2次反応定数: M⁻¹S⁻¹

次反応定数を求めた。また、抗酸化作用の強さの指標にビタミンEを用いて同様の測定を行った。

ESRの測定条件はFreq 9.426 GHz, Power 4 mW, Field 335 ± 5 mT, Sweep time 2 min, MOD 0.1 mT, Amp 500, Time Constant 0.3 secとした。

2. スーパーオキシド消去能の化学発光法による検討

キサランチンとキサランチンオキシダーゼの反応によってスーパーオキシドを産生し、スーパーオキシドがルシフェリン誘導体(MCLA)と反応したときに発する波長380nmの化学発光強度を測定した。0.1mMキサランチン, 5 μMルシフェリン誘導体, 0.08 μMカタラーゼを50mM PBS (pH: 7.0)に溶解後(全量 2 mL), キサランチンオキシダーゼを添加してスーパーオキシド産生速度0.5 μM/minとなるようにした。このときの発光強度を100%とし、薬物添加により発光強度が50%に抑制される薬物濃度から各薬物の2次反応定数を求めた。化学発光の測定には、ALOKA社 Luminescence reader BLR-301を使用した。

ラジカル測定の溶媒にDMSOを用い、スピントラップ剤にはPBNを用いたダブルスピントラップ法によって2次反応定数を求めた。過酸化水素と2価鉄のFenton反応によって生じたヒドロキシラジカルは、DMSOと反応してメチルラジカルを生成する。このメチルラジカルとPBNの反応生成物のシグナルをESRによって測定した。PBNとヒドロキシラジカルの2次反応定数 $K_2 = 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ から薬物の2次反応定数を求めた。アゼルニジピンの実測図(図1a, 図1b)を示すが、濃度依存的なシグナルの減衰が明らかである。アゼルニジピン, アムロジピン, ニフェジピンの2次反応定数からみたヒドロキシラジカル消去能の比較では、アゼルニジピンはアムロジピンの約5倍の抗酸化能を有することが示された(表1, 図2)。

スーパーオキシド消去能については、アムロジピン $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$, アゼルニジピンとニフェジピンはともに $2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ であった(表1)。

考 察

高血圧や動脈硬化の成立過程において、カルシウムは重要な役割を果たしており³⁾, カルシウム拮抗薬は種々の機序を介して抗動脈硬化作用を発揮する。カルシウム拮抗薬は、血小板凝集を抑制し、凝集血小板から放出される増殖因子(PDGF)の遊離を遅延・抑制する。その結果、血管平滑筋細胞の増生や細胞外マトリックスの増加が阻害され、血管壁リモデリングが抑制されるため、抗動脈硬化作用を発現するとされる。また、カルシウム拮抗薬は血管平滑筋細胞内の酸性および中性コレステロールエステル分解酵素(ACEH, NCEH)の活性亢進によるコレステロールの細胞内蓄

結 果

アゼルニジピンは疎水性が強いため、ヒドロキシラ

積の抑制や、細胞内からのコレステロールの放出の促進など、血管壁におけるLDLの代謝を改善し、変性LDLの貪食によるマクロファージの泡沫細胞化を抑制する。加えて、NOの産生・分泌の維持、細胞内のカルシウム過負荷防止作用なども、血管リモデリング、動脈硬化進展の抑制をもたらす⁴⁾。

動脈硬化の発症・進展の機序には、LDLなどのリポ蛋白や細胞(脂質)膜に対する活性酸素による酸化変性が重要な役割を果たしており、抗酸化薬が動脈硬化を抑制することが知られている。Janeroらはジヒドロピリジン(DHP)系カルシウム拮抗薬を用い、キサンチンオキシダーゼが産生する O_2^- と $ADP-Fe^{3+}$ により誘導される心筋リン脂質リポソムの過酸化反応に対する抗酸化作用を比較検討した結果、一部のカルシウム拮抗薬で強い抗酸化作用が認められ、DHP環の3位のエチルエステルと5位の疎水性長鎖エステルが抗酸化効果に重要であろうと推測している⁵⁾。

一般に、抗酸化作用には活性酸素・フリーラジカルの産生自体を抑制する予防的抗酸化作用と、活性酸素・フリーラジカルを捕捉してラジカルによる細胞の連鎖反応を抑制するラジカル捕捉型の抗酸化作用が知られている。さらに、酸化ストレスによって生じた蛋白質、核酸の障害を修復・再生する作用も広義の抗酸化作用と考えられる。Janeroらは、カルシウム拮抗薬の抗酸化作用機序の詳細は不明であるが、スーパーオキシドの産生自体は影響を受けないことから、スーパーオキシドから脂質ラジカルが二次的に産生される過程、すなわちラジカル捕捉型の抗酸化作用が主体であろうと述べている⁵⁾。今回のわれわれの検討でも、3種のカルシウム拮抗薬にはスーパーオキシドの産生自体に対する影響がないことが示された。

抗酸化物質とは、低濃度で被酸化物質の酸化を明らかに防止する物質であり、逆に生体における被酸化物質としてはタンパク質、脂質、核酸、炭水化物などの生体構成成分のほとんどが挙げられる。その抗酸化機構は、活性酸素種やその前駆物質の捕捉、生成抑制、遷移金属のキレート、内因性抗酸化防御系の増強などを含む。防御物質としての重要性は、どのような活性酸素種がどこでどのように発生し、活性酸素種のターゲットが何であるかに左右される。また、すべての抗酸化物質が生体内で発生するすべての活性酸素種と反応するとは限らず、むしろ抗酸化物質の構造によって反

応しやすい活性酸素種が決定されることが考えられている。

アゼルニジピンをはじめとするカルシウム拮抗薬のヒドロキシラジカルに対する*in vitro*反応性試験をESR法で行った結果、2次反応定数が最も大きかったのはアゼルニジピンであり、今回用いた薬剤中ヒドロキシラジカル消去能が最も強いことが示唆された(図2)。

今回行った*in vitro*の実験系において、カルシウム拮抗薬の直接的抗酸化作用が示唆されたが、ヒドロキシラジカルは $10^9 M^{-1} S^{-1}$ の速度で多くの生体構成成分と反応するため、実際に生体内において薬剤が抗酸化作用を示すかどうかは、薬剤が標的細胞や分子、細胞小器官近傍に十分に分布可能か否かが重要であると考えられる。

カルシウム拮抗薬のスーパーオキシドに対する消去能は $10^4 \sim 10^5 M^{-1} S^{-1}$ 程度であったが、生体内で効率良くスーパーオキシドを消去しているSODの $10^5 M^{-1} S^{-1}$ と比較すると小さいものの、生体内で抗酸化物質として作用しているグルタチオンの $10^3 M^{-1} S^{-1}$ よりは1桁大きく、カルシウム拮抗薬が膜近傍に分布してスーパーオキシド消去にも関わる可能性が示唆された。

アゼルニジピンが高い脂溶性を示すことから考えて、本剤が効率よく細胞膜に分布することが予測され、虚血再灌流、炎症などによって発生する活性酸素種から細胞膜を保護し、細胞保護的に働く可能性が推測される。

文 献

- 1) Sugawara, H. et al.: Antioxidant effects of calcium antagonists on rat myocardial membrane lipid peroxidation. *Hypertens. Res.* 19: 223-228, 1996
- 2) Finkelstein, E. et al.: Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* 200(1): 1-16, 1980
- 3) Hasebe, N. and Kikuchi, K.: "Hypertension" in Calcium in Internal Medicine. pp.417-432, Springer, London, 2002
- 4) 長谷部直幸, 佐藤元彦, 菊池健次郎: 本態性高血圧とカルシウム拮抗薬. カルシウム拮抗薬のすべて(第2版), pp.171-179, 先端医学社, 東京, 1999
- 5) Janero, D. R. et al.: Antiperoxidant effect of dihydropyridine calcium antagonist. *Biochem. Pharmacol.* 38: 4344-4348, 1989