

論文の内容の要旨

論文題目 3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オン
(エダラボン) の脳保護作用機序に関する研究

氏名 渡邊 和俊

1. はじめに

脳卒中は日本人の死亡原因の第2位であり、このうち脳出血による死亡率は激減したが、脳内の血管が閉塞して虚血状態となる脳梗塞による死亡率・有病率は日本社会の高齢化に伴って年々増加している¹⁾。さらに麻痺や失語症など重篤な後遺症を起こすことが多く、患者のQOLを低下させ、家族にも介護等の多大な負担を要求するため、有効な治療法の開発が強く望まれている。脳梗塞の病態においては、活性酸素種によるラジカル的な生体内物質の酸化反応が脳虚血時の神経細胞死の主要因子の1つとされている^{2,3)}。そこで旧三菱化学社（現三菱ウエルファーマ社）ではラジカル消去作用を有する化合物が脳保護作用を有する薬剤になりうると考えて開発研究を行い、2001年6月に脳梗塞急性期治療薬としてラジカット注（一般名：エダラボン、図1）を上市した。本研究ではエダラボンの薬効発現に対する作用機序に関する研究を行なった。

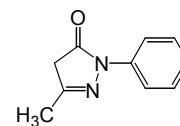


図1 エダラボン 1

2. エダラボンの構造活性相関について

フェノール類のラジカル消去作用に着目し、ケト-エノール平衡によってヒドロキシル基が結合する芳香化した複素環になりうる化合物がフェノールと同様のラジカル消去作用を有するものと考えられ、(図2)。種々の化合物が

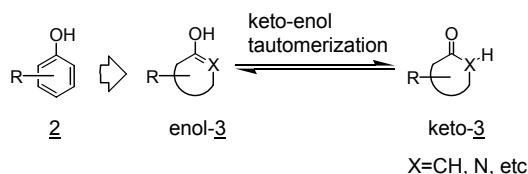


図 2

合成され、3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オン（エダラボン、図1）が活性化合物として見出された。活性の向上を目指して置換基の最適化を行ったところ、脂溶性置換基の導入により脂質過酸化抑制作用が向上し、親水性置換基の導入により活性が低下した。In vivo 試験等によりエダラボンを開発化合物として選択した。

3. エダラボンの抗酸化作用

前項で見出されたエダラボンの抗酸化作用について詳細な検討を行なった。

エダラボンとペルオキシラジカルの反応生成物の時間変化の検討では、主要反応生成物として4,5-dione 7およびOPB 9が同定され、少量の中間生成物としてBPOH 8が確認された。他のラジカル種を用いた場合でも同様のラジカル反応生成物が確認され、エダラボンのラジカル消去はラジカル種によらず、また消去後はOPBに変化することが示唆された。

上記の検討よりエダラボンのラジカル消去機構は図3のように考えられる。

ラジカル消去における活性種はエダラボンアニオン 4と考えられ、4よりラジカル(X \cdot)に電子が移動してアニオン(X $^-$)に還元し、自らはエダラボンラジカル 5になり、溶存酸素が付加してエダラボンペルオキシラジカル 6に変化後、さらに4,5-dione 7に変化する。7は未反応のエダラボン存在下で平衡的にBPOH 8を生成するが、単独では加水分解されてOPB 9に変化する。従ってラジカル消去後の反応生成物はラジカルの種類によらずOPB 9であると考えられる。

反応途中で生成するエダラボン由来ラジカルは共鳴安定化により反応性が低下していると考えられ、モデル化合物を用いた分子化

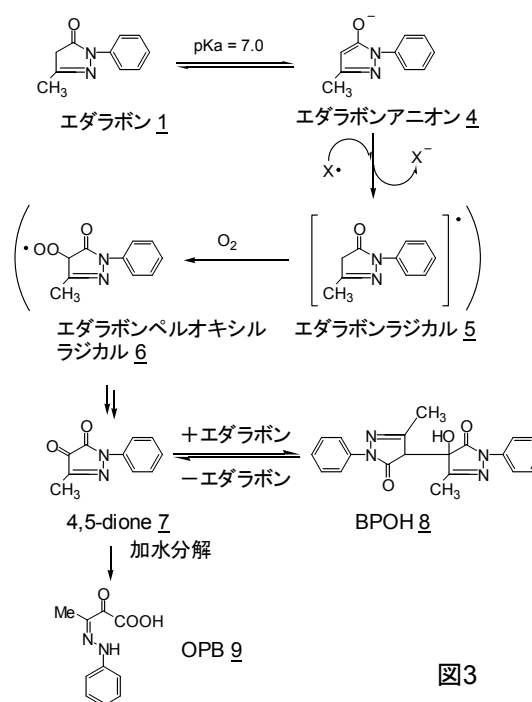


図3

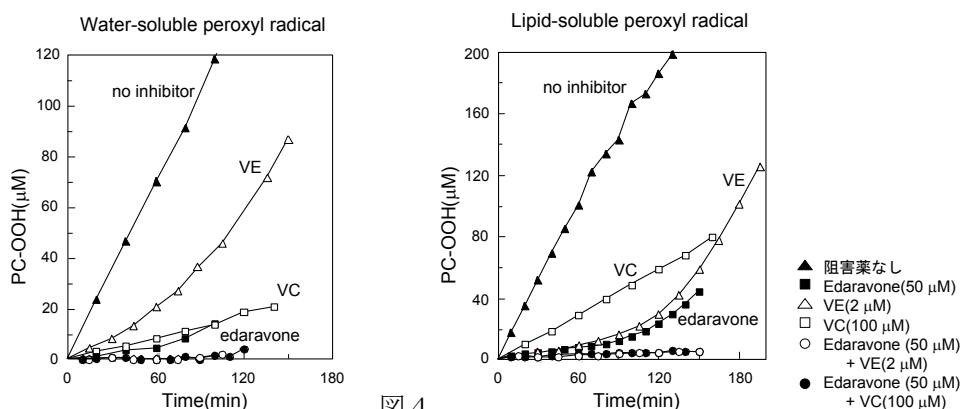


図4

学計算においても活性酸素ラジカルより反応性ははるかに低いことが示されている⁴⁾ことから、エダラボン由来ラジカルによる脂質成分からの新たな脂質ラジカルの誘起はないと考えられる。さらにエダラボンのダイズホスファチジルコリン(PC)リポソーム膜に対する抗酸化作用に対する検討を行ない、既知の抗酸化物質と比較した(図4)。水溶性ペルオキシラジカルに対しては、エダラボンはビタミンC(VC)と同等の抗酸化作用を示し、両者の共存により一層強い作用が示された。脂溶性ペルオキシラジカルに対しては、エダラボンはビタミンE(VE)と同等の抗酸化作用を示し、両者の共存により一層強い作用が示された。エダラボンは水溶性、脂溶性いずれのラジカルに対しても抗酸化作用を示したことから、エダラボンはリポソーム膜や膜表面付近に存在し、水相及び脂質相双方のペルオキシラジカルを消去していると考えられる。さらにエダラボンの共存によりVE、VCが通常作用が弱い水溶性及び脂溶性ペルオキシラジカルに対しても完全にPCリポソームの酸化を抑制し、エダラボンは細胞系においても極めて良好な抗酸化作用を発揮する可能性が示唆された。

4. エダラボンの代謝物の合成

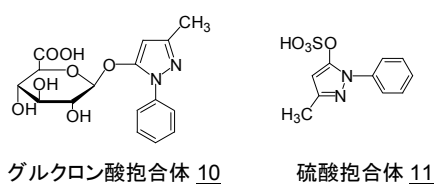


図5

エダラボンの主代謝物と推定されていたグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の合成を行なった。グルクロン酸抱合体の合成はジクロロメタン中トリフルオロメタンスルホン酸銀(I)の存在下で2- α -ブromo-3,4,5-トリアセトキシグルクロン酸メチル 12 とエダラボンを反応させ、加水分解して脱保護を行うことにより合

成した。硫酸抱合体はエダラボンを三酸化硫黄-ピリジン錯体で処理することにより合成した。合成した各代謝物は生体より得られた各代謝物とその分析化学的なデータが一致したことにより構造が同定された。

エダラボンには互変異性体が存在するので代謝物についても異性体が存在する可能性がある(図6)が、X線結晶構造解析の結果より得られたグルクロン酸抱合体

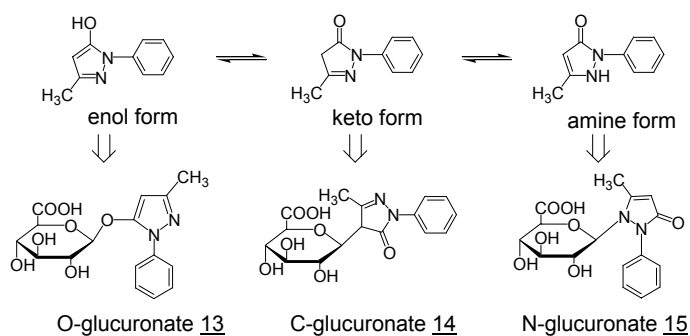


図6

はO-グルクロン酸抱合体 13 であり、C-グルクロン酸抱合体 14 やN-グルクロン酸抱合体 15 ではないことが明らかとなった。また2-位の立体配置は β -体であることもわかった。

5. 脳梗塞モデルにおける酸化ストレスマーカーの変動及びエダラボンの作用

血漿中モノ不飽和脂肪酸が四塩化炭素投与ラット肝障害モデル⁵⁾や生体内での金属の蓄積を起こすLECラットモデル⁶⁾などのラジカル障害モデルにおいて有用な酸化障害マーカーである

ことに着目し、ラット中脳動脈(MCA)閉塞再開通モデルを用いて脳梗塞における酸化ストレス障害について検討した。さらにエダラボンの14日間投与に対する薬理学的効果を考察するためにエダラボンの本マーカーに対する影響を検討した。同時に薬理学的な指標として神経症状・運動機能障害に対するエダラボンの反復投与による改善作用を評価した。

酸化ストレスマーカーと

して総遊離脂肪酸に対するパルミトオレイン酸(16:1)、オレイン酸(18:1)の割合(%16:1, %18:1)に注目したところ、対照群では閉塞再開通後1~5日目(%16:1)、1~14日目(%18:1)に有意に上昇した

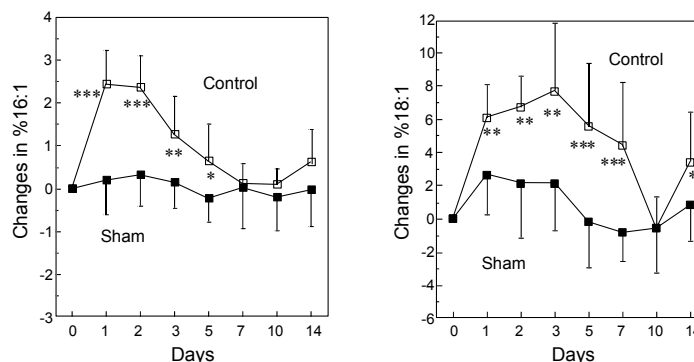


図 7

(図 7)。これは虚血再灌

流による膜脂質中の高度不飽和脂肪酸の酸化による減少を補うために細胞中の脂肪酸不飽和酵素が活性化して 18:1、16:1 への変換が進行し、細胞死により血流中に漏出したためと考えられる。またこの実験より虚血再灌流障害は 14 日間まで継続することが明らかとなった。

一方、エダラボン単回投与群、14 日間連続投与群における上記マーカーへの作用では、%16:1 については単回投与群、反復投与群いずれの場合も上昇が有意に抑制されたが、%18:1 については反復投与群でのみ有意な上昇の抑制がみられた。上記の結果よりエダラボンは酸化ストレスマーカーの上昇、すなわち虚血再開通後の脂質過酸化障害の抑制を示唆すると同時に、反復投与によりより広範囲な改善がもたらされることを示唆している。

さらに薬理学的な指標として神経症状・運動機能障害に対する改善作用によりエダラボンの反復投与の効果を評価した。神経症状では反復投与群でのみ有意な改善が認められた。運動機能障害については四肢協調運動障害を測定する Rota-rod 実験では反復投与群にのみ有意な改善が認められ、全身運動障害を測定する suspension 実験においては、反復投与群の方がより早期より改善が見られ、エダラボンの効果は反復投与においてより有効であることが示された。

引用文献

1. 阿部康二、「脳梗塞急性期治療の進歩：エダラボンの臨床」、大友英一編著、医薬ジャーナル社、pp 10-21, 2002
2. Kontos HA, *Circ. Res.* 57, 508-516, 1985
3. Schmidley JW, *Stroke*, 21, 1086-1090, 1990
4. Ono S et al., *J. Phys. Chem. A* 101, 3769-3775, 1997
5. Yamamoto Y et al., *Redox Report*, 2, 121-125, 1996
6. Yamamoto Y et al., *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 10, 129-134, 1997