薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
115 (2) 114—119 (1995)

2-(3,4-ジメトキシフェニル) エチルアミン誘導体 (Ecabapide, DQ-2511)
及びその代謝物のラット水浸拘束ストレス潰瘍に対する効果

細上 徹,* 田淵圭章, 古濱和久
第一製薬株式会社 探索第三研究所

Effects of 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamine Derivative (Ecabapide,
DQ-2511) and Its Metabolites on Water-Immersion Restraint
Stress-Induced Gastric Ulcers in Rats

Toru HOSOKAMI,* Yoshiaki TABUCHI, and Kazuhisa FURUHAMA
*Exploratory Research Laboratories III, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.,
16-13, Kita-kasai 1-chome, Edogawa-ku, Tokyo 134, Japan*

(Received September 20, 1994)

Ecabapide (DQ-2511) has been demonstrated to be effective in preventing water-immersion restraint stress ulceration of rats. In the present study, we aimed to define the active molecular features of ecabapide. Seven of 9 degraded materials identified as ecabapide metabolites were synthesized and their antiulcer activities were compared with that of the parent compound. Ecabapide was potent to prevent gastric ulcer formation at the doses of 30—300 mg/kg i.p. Three metabolites (V, VIII and IX) were also active to inhibit ulceration induced by the stress. The antiulcer activity of IX was similar to that of ecabapide, whereas V and VIII had less activities. After the oral administration of ecabapide, the plasma levels of IX reached to less than 15% of that of ecabapide and also IX was largely excreted into the feces. Therefore, the potential implication of the metabolite (IX) as the active component in the antiulcer effect of ecabapide could be excluded. Furthermore, it is also unlikely that the high polar metabolites (IV and VII) are implicated in significant contribution for antiulcer action. In conclusion, we have shown that ecabapide prevents water-immersion restraint stress-induced gastric ulcers, and that this activity is probably mediated by the action of the parent compound.

Key words—ecabapide (DQ-2511); metabolite; aminobenzamide; phenethylamine; stress ulcer

緒 言

フェネチルアミンのアシル誘導体 ecabapide (3-[[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]carbonyl]-methyl]amino-*N*-methylbenzamide; Fig. 1) は, ラット水浸拘束ストレス潰瘍に対して強い抑制作用を示し,¹⁾ また, 胃粘膜血流増加及び酸分泌抑制作用を有し, 各種実験潰瘍の発生を抑制するのみならず治癒促進作用を有することも報告されている.²⁾ 幅広い抗潰瘍スペクトルを有する ecabapide のラットでの代謝研究から, 経口投与後の尿中及び糞中には ecabapide の他にカテコール系代謝物とフェネチルアミン系代謝物及び7種のアミノベンズアミド系代謝物が排

泄されることが明らかにされている。³⁾

本研究では、ecabapide の主要代謝物 7 種を合成し、これらの化合物の抗潰瘍作用を母化合物の活性と比較することにより、ecabapide の抗潰瘍活性がその代謝物に起因するか否かを調べることを目的に次のような実験を行った。

Fig. 1. Chemical Structure of Ecabapide (DQ-2511)

実験材料及び方法

1. 使用動物 実験には、Donryu 系雄性ラット（10 週齢，体重 290—340 g）を使用した（日本チャールス・リバー社）。動物は、糞食を避けるため金属網を敷いたケージを用い，温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 15\%$ の環境下で飼育し，市販の固形飼料（F-2，船橋農場）及び上水道水を自由に摂取させた。

2. 使用薬物 当社研究所にて合成した薬物を用い，すべて 0.5% carboxymethylcellulose sodium (CMC) 水溶液に懸濁し，5 ml/kg の割合で投与した。

Ecabapide (3-[[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]carbamoyl]methyl]amino-*N*-methylbenzamide)¹⁾ 及び対照薬 cimetidine⁴⁾ は文献記載の方法に従って合成した。文献に合成法が記載されていない 3-acetamido-*N*-methylbenzamide (I)，3-acetamido-*N*-hydroxymethylbenzamide (III)，3-acetamidobenzamide (V)，5-acetamido-2-hydroxybenzamide (VI)，*N*-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-oxamic acid (VIII)，3-[[[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]carbamoyl]methyl]amino-*N*-methylbenzamide (IX) 及び文献記載化合物ではあるが異なった方法を用いた 5-acetamido-2-hydroxy-*N*-methylbenzamide (II)⁵⁾ の合成法を示す。

3-Acetamido-*N*-methylbenzamide (I)——3-Amino-*N*-methylbenzamide⁶⁾ を乾燥ピリジンに溶解し，氷冷撹拌下無水酢酸を加え，室温で 20 時間撹拌する。反応混合物を氷水中に注ぎ，濃縮乾固後エタノール-エーテルより再結晶し無色結晶 (I)，mp $174\text{—}175^\circ\text{C}$ ，を得る。

5-Acetamido-2-hydroxy-*N*-methylbenzamide (II)——5-Amino-2-hydroxybenzoic acid を塩化チオニル-メタノール混合液に加え，室温下 2 日間懸濁撹拌して methyl 5-amino-2-hydroxybenzoate, mp $96\text{—}97^\circ\text{C}$ ，を得る。これをクロロホルムに懸濁し，氷冷下無水酢酸及び濃硫酸を加え，室温下 20 時間撹拌して methyl 5-acetamido-2-acetoxybenzoate, mp $134\text{—}135^\circ\text{C}$ ，とする。これを 40% メチルアミン水溶液に懸濁し，室温下 20 時間撹拌して，無色結晶 (II)，mp $197\text{—}199^\circ\text{C}$ （含水エタノールより再結晶），を得る。

3-Acetamido-*N*-hydroxymethylbenzamide (III)——3-Acetamidobenzamide, 37% ホルムアルデヒド水溶液及び炭酸カリウムをテトラヒドロフラン (THF) に加え，5 時間加熱還流，冷却後有機層を濃縮し，ダイヤイオン HP20 を用いたカラムクロマトグラフィーにて精製（展開溶媒：3% THF 含有水溶液）。流出液を減圧下 40°C にて濃縮し無色結晶 (III)，mp $136\text{—}140^\circ\text{C}$ ，を得る。

3-Acetamidobenzamide (V)——3-Aminobenzamide を乾燥ピリジンに溶解し，無水酢酸を加え室温下撹拌。一夜放置後，反応混合物を氷水に加え，無色結晶 (V)，mp $219\text{—}220^\circ\text{C}$ （メタノールより再結晶），を得る。

5-Acetamido-2-hydroxybenzamide (VI)——Methyl 5-acetamido-2-acetoxybenzoate を 28% アンモニア水に懸濁し，室温下 2 日間撹拌後濃縮乾固して，無色結晶 (VI)，mp $211\text{—}212^\circ\text{C}$ （エタノールより再結晶），を得る。

N-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]oxamic Acid (VIII)—2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylamine 及びトリエチルアミンをジクロルメタンに溶解. 氷冷下 ethyl chloroglyoxylate を加えて攪拌し ethyl *N*-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]oxamate, mp 66—69°C (エタノール-エーテルより再結晶), を得る. これを 1*N* 水酸化ナトリウム溶液-エタノール混液に加え, 室温で 2 時間攪拌. この溶液を塩酸にて酸性とし, 酢酸エチルエステルにて抽出, 濃縮して無色結晶 (VIII), mp 129—131°C (クロロホルム-トルエンより再結晶), を得る.

3-[[[2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethyl] carbamoyl] methyl] amino-*N*-methylbenzamide (IX)—Ecabapide をジクロルメタンに溶解し, ドライアイス-アセトンで冷却下三臭化ホウ素を滴下, 攪拌. 反応混合物を氷水に注ぎ, 水層より淡黄色結晶 (IX), mp 222—224°C (メタノールより再結晶), を得る.

3. 実験方法 1) 水浸拘束ストレス潰瘍の惹起——水浸拘束ストレス潰瘍は高木らの方法⁷⁾に準拠して作出した. すなわち, 非絶食ラットを水浸拘束ストレスケージに入れ, 動物の剣状突起レベルまで水に没し 21°C で 7 時間水浸拘束負荷を施した. エーテル麻酔下にラット腹部を正中線に沿って切開し, 胃を摘出後, 胃管腔側に 2% ホルマリン緩衝液 10 ml を注入し, さらに同ホルマリン緩衝液中で室温, 20 分間軽度固定した. その後, 固定した胃を大弯に沿って切開し, 潰瘍係数を算出した. すなわち, 個々の動物の出血壊死病変部の長軸の長さをノギスで計測し, 合計したものを潰瘍係数とした. 被験薬はストレス負荷 30 分前に腹腔内投与した. ただし, 対照薬 cimetidine は経口投与した.

2) 統計学的処理——結果は平均±標準誤差で示した (*N*=8). 各試験の群間の有意差検定は, Dunnett の多重比較法により行い, 有意水準 5% で判定した. ED₅₀ 値は用量反応曲線から算出し, μmol/kg で表した.

結 果

水浸拘束ストレス潰瘍モデルを用い, ecabapide 及びその代謝物 (I, II, III, V, VI, VIII, IX) を腹腔内投与し, それらの抗潰瘍作用を評価した. 水浸拘束ストレス負荷 (21°C, 7 時間) により対照群のラットでは全例に胃体部粘膜に線状の出血性黒色胃粘膜壊死が形成された. 対照群の潰瘍係数は, 実験群間で 28.0±4.0 から 44.6±6.8 の範囲で変動がみられたが, 薬物効果の評価には対照群に常時 cimetidine 投与群を設け, その顕著な抗潰瘍効果 (実験群間で 81—98%, 平均 92%) を確かめ, 被験薬の効果を代謝物投与群の潰瘍係数とそれに対する対照群の潰瘍係数から潰瘍抑制率として算出し, 比較した.

Cimetidine (200 mg/kg) を経口投与, ecabapide 及びその 7 種の代謝物 (300 mg/kg) を腹腔内投与した時の抑制作用を Fig. 2 に示す. 対照薬 cimetidine は再現性の高い顕著な抗潰瘍作用

Fig. 2. Antiulcer Effects of Ecabapide, Its Metabolites and Cimetidine on Water-Immersion Restraint Stress-Induced Gastric Ulcers in Rats

Ecabapide (E) or its metabolites (300 mg/kg, i.p.) and cimetidine (Cim; 200 mg/kg, p.o.) were administered 30 min prior to the stress loading. All data indicate means±S.E.M. (*N*=8).

a) *p*<0.05, b) *p*<0.01 vs. vehicle control group (Dunnett's multiple comparison).

TABLE I. Antiulcer Effects of DQ-2511 and Its Metabolites on Water-Immersion Restraint Stress-Induced Gastric Ulcers in Rats

Compound	Dose (mg/kg)				ED ₅₀ (μ mol/kg)
	0	30	100	300	
Ecabapide	44.6 $\pm$ 6.8	25.7 $\pm$ 5.1 ^{a)} (42)	12.0 $\pm$ 3.3 ^{b)} (73)	5.8 $\pm$ 3.2 ^{b)} (87)	105
V	28.0 $\pm$ 4.0	22.4 $\pm$ 7.3 (20)	15.8 $\pm$ 6.6 (44)	8.6 $\pm$ 3.4 ^{a)} (69)	707
VIII	32.5 $\pm$ 5.4	27.4 $\pm$ 7.7 (16)	11.6 $\pm$ 5.2 ^{a)} (64)	8.7 $\pm$ 3.8 ^{a)} (73)	367
IX	32.9 $\pm$ 4.0	17.0 $\pm$ 5.5 ^{b)} (48)	3.7 $\pm$ 2.8 ^{b)} (89)	1.6 $\pm$ 1.0 ^{b)} (95)	76

Each compound was administered intraperitoneally 30 min prior to the stress loading. All data indicate means $\pm$ S.E.M. ($N=8$). ^{a)} $p<0.05$, ^{b)} $p<0.01$ vs. vehicle control group (0 dose) (Dunnett's multiple comparison). Figures in the parentheses indicate the percent inhibition.

(81—98%)を示した。Ecabapideの腹腔内投与は潰瘍発生を有意に抑制し、その抑制率は87%であった。また、アミノベンズアミド系代謝物(V)も潰瘍発生を有意に抑制し、その抑制率は60%以上であったが、その他のアミノベンズアミド系代謝物(I, II, III, VI)は有意な抑制作用を示さず、抑制率はいずれも50%未満であった。Ecabapideの酸化的代謝物で、アミノベンズアミドの3位アミノ基とメチレンとの結合が開裂して生じた代謝物(VIII)は潰瘍発生を有意に抑制し、その抑制率は70%を上回るものであった。また、ecabapideのメチル基が脱離して生じたカテコール体(IX)はecabapideと同等の有意な抗潰瘍作用を示した。

投与量300 mg/kgで50%以上の抑制作用を示したecabapide, V, VIII及びIXについて、30—300 mg/kgの範囲で水浸拘束ストレス潰瘍に対する抑制作用について用量反応関係を調べ、ED₅₀値を算出し、活性比を比較した(Table I)。Ecabapideの30, 100及び300 mg/kgの腹腔内投与はストレス誘発潰瘍を用量に依存して有意に抑制し、それぞれの抑制率は42, 73及び87%であり、そのED₅₀値は105 μ mol/kgであった。また、Vは300 mg/kg腹腔内投与時のみ潰瘍発生を有意に抑制し(69%), ED₅₀値は707 μ mol/kgであった。VIIIの100及び300 mg/kgの腹腔内投与は潰瘍発生を有意に抑制し、それぞれの抑制率は64及び73%であり、ED₅₀値は367 μ mol/kgであった。カテコール体(IX)の30, 100及び300 mg/kgの腹腔内投与は、用量に依存して有意に潰瘍を抑制し、それぞれの抑制率は48, 89及び95%であり、ED₅₀値は76 μ mol/kgであった。

考 察

Fig. 3に、現在までに同定されているラットでのecabapideの代謝物と代謝経路を示す。

ラットでの薬物代謝の研究はecabapideの2種の¹⁴C標識体を用い、HPLC法による代謝物の同定を中心に行われてきた。すなわち、ベンズアミドのベンゼン環炭素の¹⁴C標識体を用いた検討によりアミノベンズアミド系代謝物として、I, II, III, 5-acetamido-2-hydroxy-*N*-hydroxy-methylbenzamide (IV), V, VI及びVII(IIのグルクロン酸抱合体)が尿中より同定されている。この結果から、ecabapideのアミノベンズアミド部分の3位アミノ基とメチレンとの結合が開裂し、生成したアミノベンズアミドは、*N*-アセチル化、ベンゼン環の水酸化とグルクロン酸抱合体化、*N*-メチル基の水酸化及び*N*-脱メチル化等の代謝を受けて尿中へ排泄されることが明らかとなった。また、フェニルエチルアミノ基の1位炭素の¹⁴C標識体を用いた検討より、VIIIが尿中より検出されている。この結果もecabapideは主にアミノベンズアミドの3位アミノ基とメチレンとの結合が開裂し、代謝を受けることを示唆している。さらに、カテコール体(IX)

Fig. 3. Tentative Metabolic Pathways of Ecabapide in Rats

がラット糞中より単離同定され, ecabapide が *O*-脱メチル化される代謝経路の存在する可能性も示されている。³⁾

今回, ecabapide の抗潰瘍作用が ecabapide 自体の作用によるのか, 代謝物の作用によるものを明らかにすることを目的として, ecabapide 及びラット尿または糞中より見いだされている代謝物の活性を比較検討した. その結果, 検討した 8 化合物の中で 300 mg/kg 腹腔内投与で有意な抗潰瘍作用を示したのは ecabapide 及び V, VIII, IX の 4 化合物であった. Ecabapide は 30, 100 及び 300 mg/kg の腹腔内投与で水浸拘束ストレス潰瘍を用量依存的かつ有意に抑制し, それぞれの抑制率は 42, 73 及び 87% で, その ED_{50} 値は 105 $\mu\text{mol/kg}$ であった. V の抗潰瘍作用は, 抑制率 69% (300 mg/kg 腹腔内投与), ED_{50} 値 707 $\mu\text{mol/kg}$ であり, ecabapide に比べかなり弱かった. また, ecabapide (100 mg/kg) を経口投与し, 血漿中濃度が最高値に達する 2 時間後では未変化体が 29% と最も高い存在率を示す一方, V の血漿中存在率は 4.9% であった³⁾ことから, ecabapide の抗潰瘍作用発現に対する V の寄与は極めて小さいものと考えられた. VIII は 100 mg/kg 及び 300 mg/kg 腹腔内投与時に抑制作用を示したが, その ED_{50} 値は ecabapide の 3 倍以上であった. また, VIII は尿中に見いだされた代謝物であり, その血漿中存在率は ecabapide と比較すると低く作用発現への寄与は小さいと考えられた. IX は 30 mg/kg 腹腔内投与から用量依存的に抗潰瘍作用を示し, この作用は ecabapide とほぼ同等もしくはそれ以上の強い (ED_{50} 値: 76 $\mu\text{mol/kg}$) ものであった. しかし, IX は糞中には多く存在するものの, ecabapide 経口投与 2 時間後の IX の血漿中存在率は 4.2% と低く, 未変化体 (29%) に比べ血漿中には少量認められたのみであった. これらの結果を考え合わせると, IX の潰瘍発生抑制作用への寄与は, V 及び VIII と同様にわずかであると考えられた. また, その他の代謝物 (I, II, III, VI) の 300 mg/kg 腹腔内投与は有意な抑制作用を示さず, これらの代謝物も抑制作用発現の本体とは

なり得ないと考えられた。

I, II, III の抗潰瘍作用は 300 mg/kg の用量でも弱く有意な作用が認められなかったことから、IV 及び VII が活性本体とは考えにくいいため、これらの水浸拘束ストレス潰瘍抑制作用については検討しなかった。

今回の検討結果からは、単離同定されている I から IX の代謝物のいずれかが活性本体とは考え難く、未変化体 ecabapide が抗潰瘍作用に大きく寄与していることが示唆された。

引用文献

- 1) T. Hosokami, M. Kuretani, K. Higashi, M. Asano, K. Ohya, N. Takasugi, E. Mafune, T. Miki, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2712 (1992).
- 2) M. Asano, Y. Kurebayashi, Y. Ryoukawa, T. Hashizume, A. Akashi, *Arzneim.-Forsch.*, **40**, 276 (1990).
- 3) 藤巻ゆう子, 小野健司, 伯水英夫, 薬物動態, **5**, 546 (1990).
- 4) D. J. Graham, E. C. John, G. R. Charon, Ger. Patent 2344779 (1974) [*Chem. Abstr.*, **80**, 146168j (1974)].
- 5) B. Grandnik, A. Pedrazzoli, G. Cipelletti, Br. Patent 1047028 (1966) [*Chem. Abstr.*, **66**, 37667m (1967)].
- 6) M. R. Purnell, W. J. D. Wish, *Biochem. J.*, **185**, 775 (1980).
- 7) K. Takagi, S. Okabe, *Jpn. J. Pharmacol.*, **18**, 9 (1968).