336. 小沢 光, 奥田朝晴, 松本 滋: ルチン類似化合物の薬理学的並びに化学的研究
(第1報) 毛細血管脆弱性に対する各種 Flavonol 類の化学構造と効力との関係

Hikaru Ozawa, Tomoharu Okuda and Shigeru Matsumoto: Pharmacological and Chemical Studies on Rutin-like Compounds. I. Relation between Chemical Structure of Flavonols and their Effects on Capillary Fragility.

(Tokyo Research Laboratory, Gohei Tanabe & Co., Ltd.*)

ルチンが毛細血管脆弱性を回復する所謂 capillary stabilizer としての効力が確認されて以来, 著者等はその製品化を試みたが, ソバからの抽出は収量が悪く, 又豊富な含有量を有する槐花も我が国では資源的に少い所から, その解決策としてルチン以外の同等の効果を有する化合物の検索に着手した. capillary stabilizer の効力検定法としては当時決定の方法は確定されておらず, 専ら臨床的に確認されていたような実情にあつたので, 先ずこの点について検討した. しかしルチン作用を実験する数種の方法¹⁾は発表されていたので, これらの中, 最も適当と思われる減圧下肺出血防止作用による方法を選んだ. その理由として, 第一に他の方法に比し毛細血管脆弱度と直接関連を有する検定法と考えられること. 第二にマウスを使用する所から, 薬物の検体量が少なくて済み, 所謂 screening test に好都合であること等の利点があるからである. ところで, 本法は Majovske等²⁾が, レモン汁等に含まれるビタミンP因子を検定する目的で考察したもので, 当時ルチンの効力は知られておらず, 主として不純なヘスペリジン等を標準として試験を行っていたので確定的な成績が得られず, Kibrick³⁾等は之に対し検定法としては不適當ではないかと反駁している. しかし著者等は本法を追試し条件を適当に選べば相当正確なデータも得られ, 又得られたデータを推計学的に整理すれば, 比較的信頼すべき成績を得たので多数の flavonol の選択試験に採用した訳である.

実験方法 この原理は急激な減圧下でマウスを窒息致死せしめ, この際生ずる肺臓の出血状態を薬物投与の場合と無処置の場合と比較する方法である. 装置は Fig. 1 の如くで大瓶(約20 l)を真空ポンプで約 60 mmHg の減圧としておき, コックを有するガラス管で連結した小さいガラス容器 (230 cc) にマウスを入れ密栓し, コックを開き小容器を減圧にすると 70 mm $\pm$ 2 mmHg 柱 (もしこの範囲以上に出れば始めの圧を調節す) になる. 同時にストップウォッチを押し, 60 秒正確に経つたらコックを開き常圧にし死亡したマウスを取出し, 注意して横隔膜の方から胸腔を開き, 先ず内出血の状態を見, 次いで肋骨を切つて肺臓を取出し観察する. 肺臓は収縮状態にあるが, この条件で無投与 (対照) は大体殆んど全出血か, 胸腔内出血を起している. 次いで薬物を投与したものについて同様操作を行つて観察するが, 出血度の標準として Fig. 2 の如く決めた. 出血度は肉眼的にも大体判定できるが, 主観が入りやすいので, 水及びベンゾールに対する浮き沈みから客観的に判定した. 薬物は一定量を実験前 1~1.5 hr. に胃ゾンデで投与した. 剖見によれば, この時間に吸収が充分行われたと考えられるからである.

Fig. 1 検定装置

* 731, 1-Chome, Daita, Setagaya-ku, Tokyo. 1) 小沢, 奥田: 薬学 4, 264 (1950).

2) Majovski, Lesser, Lawson, Carne, Thienes: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 80, 1 (1944).

3) Kibrick, Goldfarb: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 82, 211 (1944).

Fig. 2 出血度判定標準

符 号	マ ウ ス 肺 臓		比 重	
	背 面	腹 面	水	ベンゾール (Sp Gr=0.89)
—			浮	浮
±			浮	浮
+			浮	浮
++			浮	浮
+++			浮	沈
++++			沈	沈
++++	胸 腔 内 出 血		—	—

前記各標準の出血度を有する肺臓の組織標本を作成してその状態を観察した。

例 1. マウス 12.0 g ♂, ルチン 10 mg/10 g 経口投与後 1.5 hr. 70 mmHg 柱減圧, 60 秒。

肉眼的所見: 全く出血を認めず。出血度 (—)。水, ベンゾールに浮遊。

組織的変状: 肺中心部の毛細血管は極度に拡張充血するも赤血球漏出を認めず。肺胞壁は密着し, 漿液浸潤を認む。気管附近は極限性の微小出血点あり。

例 2. マウス 9.0 g ♂, ルチン 10 mg/10 g 経口投与。1 hr. 後 70 mmHg 柱減圧, 60 秒。

肉眼的所見: 軽度出血を認む。出血度 (+)。水, ベンゾールに浮遊。

組織的変状: 肺中心部の毛細血管は極度に拡張充血し, 所々に極限性の出血点を認む。又全般的に漿液浸潤あり, 肺胞は不完全に退縮し, 気管支の圧縮を認む。

例 3. マウス 9.0 g ♂, 無投与。70 mmHg 柱減圧, 60 秒。

肉眼的所見: 肺の $\frac{3}{4}$ 以上出血。水に浮遊, ベンゾールに沈下, 出血度 (卅)。

組織的変状: 全般的に血管拡張し, 中心部実質全面にわたり赤血球漏出を認め, この出血は葉間結合組織に及び, 肺胞は完全に退縮す。

例 4. マウス 11.0 g ♂, 無投与。70 mmHg 柱減圧 60 秒。

肉眼的所見: 全出血。水, ベンゾールに沈下, 出血度 (卅)。

組織的変状: 肺全般に出血が認められ, 肺胞は完全に退縮し, 気管支も収縮し, 気管支内にも出血を認められる。

以上の実験から考察するに減圧によつて肺臓は最後には肺胞の破損も起るが, それ以前に毛細血管が拡張し, 遂に破損されて出血するものと考えるのが妥当であろう。この点からすれば毛細血管脆弱性を回復する薬物の効果を敏感に反映するものと考えて差支えないであろう。

2) 天然フラボノール類の効力 著者等が常法により抽出または之より誘導して製造した天然の flavone 類の効力は Table I の通りであるが, 之等のデータを推計学的に処理した。即ち卅と卅を境として卅以上のものを出血動物とし, 卅以下のものを非出血動物として, 非出血動物の % を取り, 無投与のもの % とを, 標本百分率の比較検定により, 有意の差があるか否かを検定した。先ず始めに全く無投与のものと, 胃が充満したものとでは出血度が違つかどうかを検定するため, 澱粉 10 mg/10 g を投与したものと比較した。その結果, 両者の間には有意の差なく, 同じ母集団のサンプルと考えられるので, 無投与群を対照として, 一定量の各フラボノールを投与したものと順次比較検定した。その判定として 5 % 以下の危険率即ち 95 % 以上の信頼度で有意の差ありと認められたものを (+) とし, 1 % 以下の危険率, 即ち 99 % 以上の信頼度で有意の差ありと認められたものを (++)

フラボノール類はいずれも水に不溶なので, 水に浮遊させ, 投与量が 0.2~0.3 cc になる様な濃度 (大体 10 %) で用いた。実験動物としては 10~15 g のマウスを用い, 1 週間以上フラボンを含有する恐れのある野菜を断ち, 麦または大根等で飼育し, 前日より絶食させた。このことは重要でこの点を見落とすとデータが狂う事がある。又室温が 20° 以上となる場合は望ましくないとと思われる。

実験成績

1) 各出血度の肺の組織的変状 上記の減圧による外観的な肺出血が果して如何なる組織的变化によつて起るか毛細血管脆弱性に影響を及ぼす薬物検定上問題となる点である。考え方によつては強烈な減圧で肺胞その他の肺組織が破壊されて二次的に起る出血で, 単に肺毛細血管に対する影響のみでないとも考えられるので,

として、何れも有効と判定した。その結果、有効と判定されたものは quercetin, dihydroquercetin, quercitrin, rutin, hesperidin, myricitrin 及び myricetin である。しかしフラボノールの OH をメチル又はアセチルで塞いだものは無効である。

ところでこの成績からルチンと同等に有効だと思われるものは quercetin と quercitrin がある。quercetin はルチンから分解して得られるものであり、quercitrin はドクダミ等に含まれるが含量が少く、大量生産の見込もなく、資源的にルチンに優るものとは考えられなかつた。

Table I 天然フラボン類の効力

薬 物	用 量 mg/10 g	出 血 度						非出血数/動物数	効力判定
		冊	冊	冊	冊	冊	冊		
無 投 與 (対照)		37	6	4	4	—	—	8/51	
澱 粉 (対照)	10	6	4	—	1	—	—	1/11	—
Hesperidin (1)	5	1	3	2	—	—	—	2/6	—
	10	2	1	3	1	1	2	7/10	冊
	20	4	2	2	4	3	4	13/19	冊
Rutin (2)	5	—	2	3	1	—	—	4/6	+
	10	—	3	1	2	7	5	15/18	冊
	20	—	—	3	1	1	4	9/9	冊
Quercitrin (3)	5	3	1	1	2	—	3	6/10	+
	10	1	2	2	1	1	3	7/10	冊
Quercetin (4)	5	3	1	1	1	2	3	7/11	冊
	10	2	1	2	1	3	5	11/13	冊
2,3-Dihydroquercetin (5)	5	1	2	1	3	3	—	7/10	冊
	10	1	1	—	4	2	2	8/10	冊
Pentamethyl-quercetin (6)	10	4	5	2	1	1	—	4/13	—
Pentaacetyl-quercetin (7)	5	7	3	—	—	—	—	0/10	—
	10	10	2	—	—	1	—	0/13	—
Myricitrin (8)	10	5	6	1	2	3	1	7/18	—
	20	1	4	2	4	2	3	11/16	冊
Myricetin (9)	10	4	2	2	1	1	—	4/10	+
	20	4	—	—	1	2	4	7/11	冊

効力判定: — 対照と有意の差なし (無効). + 5% 以下の危険率で有意の差あり (有効). 冊 1% 以下の危険率で有意の差あり (有効).

(1) 市販品を精製す, 帯黄白色 mp 251°.

(2) 槐花 (*Sophora japonica* の花蕾) を 50% メタノールにて抽出. 再結晶して製す. 淡黄色針狀品 mp 192~196°.

(3) ドクダミ (*Houttuynia cordata* Thumb.) の葉茎より, 中村, 大田, 福地: 本誌 56, 531 (1936) の方法により抽出す. 微黄色小葉鱗片狀品 mp 182~185°.

(4) ルチンを Krewson, Couch: J. Am. Chem. Soc. 70, 256 (1948) の方法に従つて 5% H₂SO₄ にて加水分解して製す. 黄色針狀品 mp 313° (decomp).

(5) Pew: J. Am. Chem. Soc. 70, 303 (1948) の方法により quercetin を Na hydrosulfite にて還元して製す. 帯黄白色針狀品 mp 224~224.5°.

(6) Freudenberg: Ann. 433, 236 (1923) の方法により pentaacetylquercetin をメタノール中 50% KOH 溶液と (CH₃)₂SO₄ にて製す. 白色針狀品 mp 147~149°.

(7) Freudenberg: Ann. 433, 236 (1923) の方法によりビリジン中で冷時 quercetin に無水酢酸を作用せしめて製す. 白色針狀晶 mp 193~194°.

(8) 楊梅皮 (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc. の樹皮) より熱湯で抽出後再結晶す. 黄色鱗片狀晶 mp 199~200°.

(9) myricitrin を稀 H_2SO_4 にて加水分解して製す. 濃黄色針狀晶 mp 357°.

3) 合成フラボノール類の効力 第2報において報告する各種合成フラボノール類について同じ条件で効力を検定したが, その成績は Table II の通りである. その結果有効と判定されたものは 3',4'-dihydroxyflavonol, 6-chloro-3',4'-dihydroxyflavonol 及び 6-methyl-3',4'-dihydroxyflavonol で, 水溶性の形にした 3',4'-dihydroxyflavonol- SO_3Na も皮下注射によつて有効である. 之に対し 4'-hydroxyflavonol, 3,3',4'-triacetoxylavonol, 3',4'-dimethoxyflavonol は無効か効力が弱い.

Table II 合成フラボノール類の効力

薬 物	用 量 mg/10 g	出 血 度						非出血* 血数/動物 数	効力判定
		冊	冊	冊	冊	冊	冊		
4'-Hydroxyflavonol (1)	5	5	2	2	1	—	—	3/10	—
	10	4	4	3	2	—	—	5/13	+
3',4'-Dihydroxyflavonol (2)	5	—	—	—	2	5	6	13/13	冊
	10	1	—	1	3	3	6	13/14	冊
3',4'-Dimethoxyflavonol (3)	5	2	3	2	3	1	—	6/11	+
	10	3	1	2	1	2	1	6/10	+
3,3',4'-Triacetoxylavonol (4)	5	7	1	—	—	1	1	2/10	—
	10	5	1	1	1	1	—	3/9	—
6-Methyl-3',4'-dihydroxyflavonol (5)	5	2	2	—	3	2	2	7/11	冊
	10	2	—	—	4	1	3	8/10	冊
6-Chloro-3',4'-dihydroxyflavonol (6)	*5	—	1	—	4	3	3	10/11	冊
	10	—	1	1	3	3	2	9/10	冊
3',4'-Dihydroxyflavonol- SO_3Na (7)	**1	5	3	—	4	2	—	6/13	+
	**5	3	1	—	4	6	10	20/24	冊

* 冊 以下を非出血動物とす

** 皮下注射後 30~40 分に試験す

結 論 以上の成績からフラボノールの化学構造と capillary stabilizer としての効力との関係を考察すれば次の事が云える。

1) ルチン以外の天然又は合成フラボノール類も強弱の差はあるが、毛細血管強化作用を有するものが多い。
 2) フラボノール類は必ずしもルチンやヘスペリヂンの如く配糖体の形でなくとも有効で、却つてアグリコンのみで作用が一層強いものがある。3) フラボノール類の -OH 基をメチル又はアセチル基で塞ぐと効力が減弱又は消失する。4) Clark, Geissman⁴⁾ はフラボノール類が adrenalin-antioxidant 作用を有する条件として C-3', C-4' に vicinal の OH の存在する事 (A) 及び C-3 の OH と C-4 の >CO の存在する事 (B) をあげているが、著者の実験からもこの条件は毛細血管を強化するための必要条件と考えて差支えないものと思われる。5) これらフラボノールの大体の効力順位を決める為に、推計学的には多少厳密を欠くかも知れないが、出血度を数量化して(冊0, 冊1, 冊2, +3, ±及び-4) 変量分析法で順位を定めたところ、3',4'-dihydroxyflavonol が最も強く、次いで 6-chloro 体、可溶性の SO₃Na 塩、6-methyl 体、rutin, quercetin 等の順位である。

本研究に当り、終始懇篤なる御指導と鞭撻を賜つた恩師菅沢教授並びに東大薬理学教室小林教授に対し謹んで感謝の意を表する。尙植物学方面で種々御教示を得た東大理学部服部静夫教授、薬学科柴田教授並びに推計学的方面で御教示を得た東大薬学科伊藤教授、統計数値研究所坂元平八氏及び組織標本につき御援助を得た東京獣医畜産大学川田信平博士に謝意を表する。

田辺製薬株式会社東京研究所

Summary

Compounds were tested for the activity of decreasing the capillary fragility by the prevention of pulmonary hemorrhage in mice under reduced pressure. Compounds effective were found to be natural quercetin, 2,3-dihydroquercetin, rutin, hesperidin, myricitrin and myricetin, and the synthetic 3',4'-dihydroxyflavonol, 6-chloro-3',4'-dihydroxyflavonol, 6-methyl-3',4'-dihydroxyflavonol and water-soluble 3',4'-dihydroxyflavonol-SO₃Na, of which, 3',4'-dihydroxyflavonol was the most effective. It was assumed that for a compound to be effective as a capillary stabilizer, it was necessary for the flavonols or flavones to possess vicinal hydroxyls in the 3'- and 4'-positions, and a hy-

4) Clark, Geissman: J. Pharmacol. Exptl. Therap. 95, 363 (1949).

droxyl at 3-and a carbonyl at 4-position, since the methylation or acetylation of this hydroxyl decreases or obliterates this efficacy. (Received May 12, 1951)

337. 小沢 光, 奥田朝晴, 川西正純, 藤井輝一: ルチン類似化合物の薬理学的並びに化学的研究(第2報¹⁾) 3',4'-Dihydroxyflavonol 及び同族体の合成

Hikaru Ozawa,* Tomoharu Okuda,* Masazumi Kawanishi* and Kiichi

Fujii** : Pharmacological and Chemical Studies on Rutin-like Compounds. II.

Synthesis of 3',4'-Dihydroxyflavonol and Related Compounds.

(Tokyo* and Osaka** Research Laboratory, Gohei Tanabe & Co. Ltd.)

第1報で, 3',4'-dihydroxyflavonol がルチン様作用を有する化合物として最も強力である事を報告したが, これと併行して本物質の合成法をも種々検討し工業的に有利な方法を確定した. 3',4'-dihydroxyflavonol は古く Kostanecki²⁾が合成しているが, 同氏の方法は迂遠なので, 先ずフラボノール合成法として比較的新しい Baker 反応⁴⁾の應用を試みた. Baker 反応は一般に 2-benzoylacetophenone 類をベンゾール又はトルオール中, 無水炭酸カリと煮沸すると2位の benzoyl 基が離脱して1位の ω の H と置換する反応である. この反応を 2-veratroyloxy- ω -ethoxyacetophenone (IV) に適用して 2-hydroxy- ω -veratroyl- ω -ethoxyacetophenone (V) を合成し(1)式の経路で目的物に到達しようと企てたが, その前工程の ω -ethoxyphenyl acetate (II) に於ける Fries 転位が進行せず, 2-hydroxy- ω -ethoxyacetophenone は得られず, 原料 (II) 及び分解したフェノールを回収するのみで, 工業的製法としては見込みのないものと考え本法を断念した.

次いで止むなく, 早急に動物実験の材料を得る為, 確実な方法である Kostanecki 法を追試した. ここに後述の方法と優劣を比較する意味で各工程の得量を記録すれば(2)式の如くワニリンを基点として最終得量は 10% 以下と云う状態であつた.

以上の如く Kostanecki 法では工業的製法の確定は困難であることが判つたので, 最近フラボノールの合成法として興味ある方法と云われる小山田⁴⁾の方法を採することとした. 小山田法は原法に次いで村上⁵⁾により追試

* 1-Chome, Daita, Setagaya-ku, Tokyo.

** Honjo-Kawasaki, Oyodo-ku, Osaka.

1) 第1報: 本誌 71, 1173 (1951).

2) Kostanecki: Ber. 37, 773 (1904).

3) Kostanecki: Ber. 38, 2178 (1905).

4) Baker: J. Chem. Soc. 1933, 1381.