薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
85 (6) 539 ~ 543 (1965)

UDC 615.78[612.816.7]-015:547.495.9

85. 小澤 光, 竹田正明: 筋弛緩薬およびその拮抗薬の研究(第4報^{*1}) Diphenyl-aminoethylguanidine Sulfate の筋弛緩の作用様式の解明

Hikaru Ozawa and Masaaki Takeda: Studies on Muscle Relaxants and their Antagonists. IV. The Mechanism of Action of Diphenyl-aminoethylguanidine as a Skeletal Muscle Relaxant.

(Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine^{*2})

The mode and site of muscle relaxing action of diphenylaminoethylguanidine (I) were investigated by observing (1) influence of stimulus frequency, (2) effect on muscle membrane potential, (3) interaction with other muscle relaxants and their antagonists, and (4) inhibitory effect on acetylcholine (ACh)-induced contracture.

Diphenylaminoethylguanidine (I) blocked neuromuscular transmission in the *sciatic-sartorius* preparation of a frog, which might be due to the reduction of amplitude of the end-plate potential. This block was recovered by potassium ion, guanidine, and tetanic stimulation, but deepened by neostigmine, succinylcholine, and *d*-tubocurarine. The mode of neuromuscular blocking action of I was more similar to that of procaine than to those of succinylcholine or *d*-tubocurarine. On the other hand, I inhibited the contracture of frog rectus caused by ACh. It is suggested that one of the possible mechanisms of I is the inhibition of the effect of ACh in postjunctional region. However presynaptic inhibition of I could not be ruled out.

(Received January 5, 1965)

さきに小澤, 佐藤¹⁾ は guanidino 基1個を有する化合物数種の骨格筋に対する作用をスクリーニング試験し, aminoethylguanidine 誘導体5種に筋弛緩作用を認め, なかでも 1-[2-(N,N-diphenylamino)ethyl]guanidine sulfate (I) が最も強力で, トノサマガエル坐骨神経縫工筋標本において, *d*-tubocurarine (*d*-Tc) の 1/10 程度の筋弛緩作用を有することを報告した. つづいて小澤, 五味, 渡辺²⁾ は I の筋弛緩の作用様式を同標本で検討し, I の筋弛緩作用は K⁺ では拮抗されるが, コリンエステラーゼ阻害薬の neostigmine や edrophonium では拮抗されないところから, 従来の *d*-Tc 類似あるいは succinylcholine (SCh) 類似筋弛緩薬のいずれの型にも属さない新しい型の作用であることを示唆した.

本報ではさらに詳しく I の筋弛緩の作用機序を解明する目的で, 電気生理学的方法などをも加えて検討をおこない, その作用点が神経筋接合部であること, さらに小澤等²⁾ の主張するごとくその作用様式は *d*-Tc 類似でもなくまた SCh 類似でもないことを確認した.

実 験 の 部

実験方法

実験にはすべてトノサマガエル *Rana nigromaculata* の摘出した神経, 骨格筋を冷血用リンゲル液中で温度約 20° で使用した.

1) 縫工筋の攣縮に対する作用 前報²⁾ と同じく坐骨神経縫工筋標本を 10 ml. のリンゲル液を入れたマグナス管中に懸垂し, 筋の攣縮を等張性ヘーベルを介して煤煙紙上に描記した. 坐骨神経に単一電気刺激 (duration 0.4 m sec., submaximal rectangular pulse, 0.1 c.p.s.) を与え間接刺激とし, 縫工筋の恥骨端に単一電気刺激 (duration 0.4~2.0 m sec., supramaximal rectangular pulse, 0.1 c.p.s.) を与え直接刺激とした.

2) 縫工筋の静止電位および活動電位に対する作用 主として Fatt, Katz³⁾ の方法に準拠して行なった. す

*1 第3報: 本誌, 85, 147 (1965).

*2 Kita-4-bancho, Sendai-shi, Miyagi-ken.

1) 小澤, 佐藤: 本誌, 84, 421 (1964).

2) 小澤, 五味, 渡辺: 本誌, 84, 724 (1964).

3) P. Fatt, B. Katz: J. Physiol. (London), 115, 320 (1951).

Fig. 1. Diagram of Experimental Set-up

S₁: stimulating electrode (Ag-AgCl)
 S₂: recording electrode (Ag-AgCl)
 M: gastrocnemius muscle
 N: sciatic nerve trunk

に誘導し観察記録した。

4) 腹直筋に対する作用 常法にしたがい腹直筋を 10 ml. のリンゲル液を入れたマグヌス管中に懸垂し、筋の緊縮を煤煙紙上に描記した。

実験成績

1. 作用点の解析 縫工筋の間接刺激に対する反応が抑制された時、遮断部位は坐骨神経幹か、神経筋接合部または筋自体の3点に大別して考えられるのでこの点に関して検討した。

実験方法 1) における成績は Fig. 2 のごとく I の $2 \times 10^{-5} M$ の濃度で 10 min. の観察では、縫工筋の直接刺激に対する攣縮にほとんど影響を与えないが、間接刺激に対しては縫工筋の攣縮を 50% 以上抑制した。さらに I の高濃度の $3.2 \times 10^{-5} M$ では間接刺激を 100% 抑制するが、筋直接刺激に同じくほとんど影響を与えなかった。

Fig. 3. Effect of Diphenylaminoethylguanidine sulfate (I) on Conductivity in Frog Sciatic Nerve Trunk

A: no treatment, B: procaine · HCl $10^{-4} M$, C: I $10^{-3} M$,
 D: procaine · HCl $10^{-3} M$, E: procaine · HCl $10^{-2} M$

において縫工筋に対する間接刺激の頻度変化が I の神経筋伝達遮断にいかに関与するかを検討した。

I $2 \times 10^{-5} M$ を作用させ 0.1, 0.5 c.p.s. の間接刺激を 30 sec. ずつ交互に与え、刺激頻度の攣縮におよぼす影響を時間的に追求した。また I の適当量を与えほとんど一定の遮断状態を生じさせた後、0.1, 0.5, 1.0, 2.0 c.p.s. の間接刺激をこの順に 30 sec. ずつ与え、刺激頻度と単一刺激時の遮断程度との関係を求めた。その結果 I の神経筋伝達遮断作用は刺激頻度が高いと強くあらわれることが判った。また Fig. 4 のごとくこの頻度依存性は単一刺激時の遮断程度が大きいと著明であった。この点に関しては I の作用は *d*-Tc の作用と類似しており、procaine

なわち坐骨神経縫工筋標本を 25 ml. のリンゲル液を入れた bath 中に浸漬し、約 20 メグオームの細胞内微小電極を神経筋接合部と思われるところに刺入し、細胞内電位を 12 AU 7 の cathode follower, DC-amplifier を経て dual beam oscilloscope に誘導し観察、記録した。

3) 坐骨神経幹に対する作用 若林等⁴⁾の方法を改良して行なった。Fig. 1 のように 5 個の compartments を有する bath 中に坐骨神経幹を置き、各 compartment 間はワセリン綿で絶縁し、リンゲル液を充たした。薬液は compartment C 中に添加し、最大刺激 (duration 0.05 msec., rectangular pulse) により誘発される神経線維の活動電位を AC-amplifier を経て dual beam oscilloscope

Fig. 2. Effect of Diphenylaminoethylguanidine sulfate (I) on Frog Sartorius Muscle

Twitch responses were recorded alternately to direct and indirect stimulation.

A: responses to direct stimulation (rectangular pulses, duration 1 msec., supramax.)
 B: responses to indirect stimulation (rectangular pulses, duration 0.4 msec., submax.)

つぎに実験方法 3) において、I の坐骨神経幹に対する作用は Fig. 3 のごとく、 $10^{-3} M$, 120 min. の条件でもコントロールの活動電位のスパイクに対しわずかに 20% の抑制を示す程度で、procaine · HCl に比して $\frac{1}{10}$ 程度の効力にすぎなかった。

以上の事実から I は坐骨神経幹に対する作用はきわめて弱く、また縫工筋の直接作用による抑制も認められないところから、その作用点は神経筋接合部であると考えられる。

2. 刺激頻度の影響 実験方法 1) に

4) 若林, 佐藤: 日生理誌, 25, 473 (1963).

Fig. 4. Effect of Stimulus Frequency on Steady Partial Block of Neuromuscular Transmission

The sciatic nerve was stimulated for 30 sec. Stimulus frequencies were A: 0.1, B: 0.5, C: 1, and D: 2 c.p.s. At arrows adequate doses of diphenylaminoethylguanidine were administered successively (final concn.: approximately $2 \times 10^{-5} M$).

Fig. 5. Effect of Diphenylaminoethylguanidine sulfate (I) on Membrane Potential in Frog Sartorius Muscle

A: control, B: 10, C: 11, and D: 15 min. after administration of I, E: recovery

Fig. 6. Effect of Diphenylaminoethylguanidine (I) on End-plate Potential in Frog Sartorius Muscle

A: 20 min. after 1st administration, B: 2, C: 3, D: 5, and E: 10 min. after 2nd addition of I respectively. S: stimulus artifact

動電位は悉無律的に消失し、端板電位は最初に残るが漸次減少した。

4. 拮抗および協力作用 実験方法 1) の縫工筋の間接刺激による攣縮において, Table I に示すごとく *d*-Tc $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.4 \times 10^{-6} M$ の筋弛緩作用は neostigmine $1 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-5} M$ で拮抗されるが, I $1.0 \times 10^{-5} \sim 3.2 \times 10^{-5} M$ の筋弛緩作用は neostigmine $10^{-6} \sim 3 \times 10^{-5} M$ の前処置または後処置により逆に増強された。つぎに I の筋弛緩作用は K^+ によって拮抗され non-depolarizers と類似の作用を示した。他方 *d*-Tc による神経筋伝達の不完全遮断は SCh によって拮抗されたが, I の場合は拮抗されず, I は *d*-Tc および SCh のいずれの筋弛緩作用にも協力作用を示した。

TABLE I. Influence of Curare Antagonists on Muscle Relaxants in Frog Sartorius Muscle

	K^+	Neostigmine ^{c)}	Guanidine·HNO ₃	TEA ^{a)}
I ^{b)}	+	—	+	+
<i>d</i> -Tubocurarine chloride	+	+	+	+
Decamethonium "	—	±	+	+
Procaine · HCl	±	±	+	+

Several doses of curare antagonists were administered, when neuromuscular transmission was partially blocked.

a) tetraethylammonium chloride, b) diphenylaminoethylguanidine sulfate

+: antagonism, ±: undetermined, -: synergism c) neostigmine methyl sulfate

TABLE II. 50% Inhibitory Dose to Acetylcholine-induced Contracture of Frog Rectus Abdominis Muscle

ACh (M)	I ^{a)} ($\times 10^{-6}M$)	d-Tc ^{b)} ($\times 10^{-6}M$)	Procaine · HCl ($\times 10^{-3}M$)
10^{-5}	2.6 ± 0.3^c	1.4 ± 0.3	1.1 ± 2.3
10^{-4}	7.1	4.7	1.8

a) diphenylaminoethylguanidine sulfate, b) d-tubocurarine chloride, c) standard error of mean

Fig. 7. Dose-Inhibition Curve of Diphenylaminoethylguanidine sulfate (I) and d-Tubocurarine to Acetylcholine $10^{-4}M$ in Frog Rectus

A: I, B: d-Tc

ることもなかった。このため I の脱分極作用も、また eserine 類似のコリンエステラーゼ阻害作用も否定できる。つぎに Fig. 8 に示すごとく、用量反応曲線の解析からは I $8 \times 10^{-6}M$ では競合的要素と非競合的要素とを有するものと解釈される。

考 察

monoguanidino 化合物の筋弛緩の作用機序については、Dixit 等⁵⁾ 小澤等²⁾ が報告している程度でありよく知られていない。そこで I の筋弛緩作用に関して、作用点および作用機序が従来からよく知られている d-Tc, Sch, procaine, Mg^{2+} などと比較検討した。

その結果 I の作用点が神経筋接合部であることは確実であるが、その中で presynaptic

site であるか、postsynaptic site であるか、またはこの両方であるかを明らかにする必要がある。最近になって $d-Tc$ が postsynaptic site 以外に presynaptic site にも作用するとの報告⁶⁾ もあり、また Mg^{2+} ⁷⁾ や低濃度

5. 腹直筋に対する作用 実験方

法 4) において、Table II に示すごとく I は $2.6 \times 10^{-6}M$ で ACh $10^{-5}M$ による腹直筋の緊縮を 50% 抑制した。他方腹直筋は K^+ によっても緊縮をおこすが、I $3.2 \times 10^{-5}M$ でも KCl $3.2 \times 10^{-2}M$ による腹直筋の緊縮を抑制しなかった。

Fig. 7 のごとく、ACh $10^{-4}M$ に対する抑制曲線の解析から、I の抑制曲線の勾配は d-Tc のそれより大であった。またこのとき I を ACh 添加の 5 min. 前に作用させたので、この間 I の単独作用が観察されたが、I $10^{-6} \sim 10^{-4}M$ で腹直筋の緊縮をひきおこすこともなくまた ACh の作用を増強す

Fig. 8. Effect of Diphenylaminoethylguanidine sulfate (I) and d-Tubocurarine on Dose-Response Curve of Acetylcholine in Frog Rectus

A: ACh only, B: d-Tc $3.6 \times 10^{-6}M$, C: I $8 \times 10^{-6}M$

5) B. N. Dixit, O. D. Gulati, S. D. Gokhale: Brit. J. Pharmacol., 17, 372 (1961).

6) F. G. Standaert: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 143, 181 (1964).

7) J. Del Castillo, L. Engbaek: J. Physiol. (London), 124, 370 (1954).

の procaine⁸⁾ は presynaptic site の遮断すなわち ACh の遊離の阻害と端板部位の ACh 感受性の低下とが報告されている。他方縫工筋伝達を遮断する濃度を用いて, ACh による腹直筋の緊縮を抑制する程度を求めたところ, Mg^{2+} , procaine の抑制作用は弱く, *d*-Tc は強い抑制作用を示した。このことから縫工筋と腹直筋とでの実験条件の差はあるとしても presynaptic site に作用する薬物は ACh 緊縮の抑制作用は弱いと考えられる。以上の文献的考察と, 縫工筋および腹直筋の実験成績によって, I の作用点についても限定的部位は考えにくい。腹直筋での ACh の作用を抑制したことから postsynaptic site での遮断が支持されるが, 他方縫工筋における他薬物に対する態度が procaine に類似したところから presynaptic site での遮断も否定できない。

つぎに作用様式について, I が depolarizing action をもたないこと, すなわち SCh, decamethonium と異なっていることは以下の実験事実から明らかである。すなわち I は縫工筋の間接刺激に対する反応を抑制する一過性の攣縮増強作用の相を伴わないこと, またこの攣縮抑制作用は K^+ で拮抗されること, および端板部位における静止電位に影響を与えず, さらに腹直筋の緊縮をひきおこさないことなどからである。

他方 I は電気生理学的方法において, 静止電位を変化させずに活動電位を消失させ, 端板電位を徐々に減少させたことなど, non-depolarizer の *d*-Tc の作用と類似していた。また *d*-Tc に類似の使用も報告⁹⁾ されている低濃度の procaine とも類似していた。

以上の点から I は *d*-Tc 類似と考えられるが, neostigmine や SCh との相互作用において I の作用は *d*-Tc の作用とは明らかに異なっていたが, procaine の作用との間にはっきりした差異は認められなかった。

つぎに prestonal¹⁰⁾ [1,16-(*N*-methyl-*N*-propoxycarbonylmethylamino)-3,14-dioxadecane dimethobromide], guanethidine,⁵⁾ hexafluorenum (HFL)¹¹⁾ 等が K^+ , neostigmine, SCh 等に対する作用態度から *d*-Tc 型でもなく, また SCh 型でもないことが報告されている。prestonal, guanethidine については前報²⁾ で論じたので, 文献上の HFL の作用と I の作用とについて比較するとつぎのごとくである。すなわち Nastuk 等¹¹⁾ は詳細な実験から, HFL の作用機序は postsynaptic site での脱分極機構の抑制であると説明している。I による神経筋伝達遮断が neostigmine や SCh で回復されないことは HFL と類似の作用機序をもっと考えられるが, tetanic stimulation や guanidine で回復されることは説明しにくい。この理由として外部から適用した ACh,¹²⁾ SCh あるいはコリンエステラーゼ阻害薬を作用させた時の ACh は, 生理的状態での神経性の ACh と必ずしも同一作用を有するとは考えられないところに, Nastuk 等¹¹⁾ の HFL に関する説明が, I にあてはまる場合とそうでない場合とがあると考えられる。

結 論

Diphenylaminoethylguanidine sulfate (I) の筋弛緩作用に関して, トノサマガエル摘出標本を用いて実験し, その作用点ならびに作用様式について次の結論を得た。

1. 坐骨神経縫工筋標本の間接および直接刺激に対する反応の差異と, 坐骨神経幹に対する影響から I の作用点は神経筋接合部であると推定される。
2. 坐骨神経縫工筋標本において, I の神経筋接合部の伝達遮断作用は間接刺激の頻度が高くなると増強される。
3. 坐骨神経縫工筋標本における電気生理学的検索では, I は静止膜電位に変化を与えずに, 活動電位の消失をきたした。これは端板電位の減少に起因すると思われる。
4. 腹直筋において I は ACh と拮抗するが, K^+ とは拮抗せず, また縫工筋において I は neostigmine では拮抗されず, K^+ , guanidine, tetraethylammonium 等では拮抗された。
5. 以上の事実から, I の筋弛緩の作用点は神経筋接合部であり, その作用様式は *d*-Tc のごとき competitors とともに, また SCh のごとき depolarizers と異なると考えられる。

本研究にあたり御教示を得た東北大応用生理学教室 鈴木泰三教授および当教室 五味助教授, また検体を合成された佐藤 進氏に深く感謝致します。
東北大学医学部薬学科

8) D. W. Straughan: J. Pharm. Pharmacol., 13, 49 (1961).

9) A. M. Harvey: Bull. Johns Hopkins Hosp., 65, 223 (1939).

10) J. M. van Rossum, E. J. Ariens, G. H. Linssen: Biochem. Pharmacol., 1, 193 (1958).

11) W. L. Nastuk, J. H. Karis: J. Pharmacol. Exptl. Therap., 144, 236 (1964).

12) B. Katz, S. Thesleff: J. Physiol. (London), 138, 63 (1957).