薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
87 (4) 376 ~ 380 (1967)

UDC 615[547.454]-015

60. 行方正也,*¹ 松尾敦子, 百瀬 篤, 高木道郎: Oligo 糖および単糖硫酸エステル
の薬品的研究 (第1報) 二糖類硫酸エステルの抗ペプシン作用と
実験的消化性潰瘍抑制作用について*²

Masaya Namekata,*¹ Atsuko Matsuo, Atsushi Momose, and Michiro Takagi :
Studies on Oligo Saccharides Sulfates and Monosaccharides
Sulfates for Medical Purposes. I Anti-peptic
and Anti-ulcerogenic Properties of the
Disaccharides Sulfates.*²

(Research Laboratories Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.*³)

Examinations were made on the sodium salts of sucrose, lactose, and maltose sulfates on their *in vitro* action on pepsin inhibition and their inhibitory action of peptic ulceration in pylorus-ligated rats. It was thereby found that even these low-molecular compounds like disaccharide sulfates had a strong anti-pepsin and anti-ulcer activities, comparable to those of sulfate esters of polysaccharides when highly sulfated, and these activities were found to increase with increasing number of the sulfate radical.

Comparison among the disaccharides showed that the nonreducing sugar-type sucrose sulfate, having three primary hydroxyls in its molecule, had the strongest activity, and the reducing-type disaccharides, lactose and maltose sulfates, showed approximately the same effect. These facts seemed to suggest that the sulfate radical bonded to the primary hydroxyl took part in the appearance of the activity rather than that bonded to the secondary hydroxyl. Since the disaccharide sulfates showed a strong inhibitory action comparable to that of polysaccharide sulfates, the chief group responsible for the appearance of anti-ulcer effect of the sulfate esters of saccharides is the sulfate radical and that the degree of molecular polymerization was a supplementary factor in this effect.

(Received June 20, 1966)

多糖体硫酸エステルにペプシンの蛋白分解活性を抑制する作用 (以下抗ペプシン作用と略す) と実験的消化性潰瘍を抑制する作用 (以下抗潰瘍作用と略す) があることは広く認められている。¹⁻⁸⁾

著者等も多糖体硫酸エステルの抗ペプシン, 抗潰瘍作用に早くから着目して, これらの作用を十分に発揮しかつ副作用としてもっとも危惧される血液凝固阻止作用を極力消失させることを目的として多糖体硫酸エステルの化学的組成ことにその分子重合度および硫酸基含量と上記各作用との関連を追究し, その結果として多糖体硫酸エステルの血液凝固阻止作用の発現にはその分子重合度および硫酸基がともに強く関与しており, そのいずれか一方を低下せしめても作用は減弱または消失する. これに対して抗ペプシン, 抗潰瘍作用の発現には硫酸基が強く関与しており分子重合度の作用発現への影響はきわめて少ないことを明らかにして報告した。⁶⁾

そこで今回は抗潰瘍作用を目的とする糖類硫酸エステルとしては多糖体のように構造的にも不明な点が多くか

*¹ 現在は財団法人競走馬理化学研究所に在籍.

*² 本報の概要は特許公報: 昭 40-2866 (昭 40.12.20), 昭 41-659 (昭 41.1.22) で公告された.

*³ Takadaminami-cho, Toshima-ku, Tokyo.

1) S. Levey, S. Sheinfeld: *Gastroenterology*, **27**, 625 (1954).

2) W. Anderson, J. Watt: *J. Pharm. and Pharmacol.*, **11**, 173T (1959).

3) W. Anderson, J. Watt: *J. Physiol. (London)*, **147**, 529 (1959).

4) S. Bonfils, M. Dubrasquet, A. Lambling: *Rev. franc. et udes clin. et biol.*, **5**, 71 (1960).

5) W. Hawkins, B. Leonard: *J. Lab. Clin. Med.*, **60**, 641 (1962).

6) M. Namekata: *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **10**, 171 (1962); *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **10**, 177 (1962).

7) W. Anderson, P. Soman: *Nature*, **199**, 389 (1963).

8) 富沢, 近藤: *慶応医学*, **41**, 499 (1964).

つ血液凝固阻止作用を伴うおそれのあるものよりも、構造も明確でしかも低分子のため副作用を伴う危険のない少糖類を用いることがより合理的であるとの考えからまず少糖類として入手しやすい二糖類のショ糖、乳糖および麦芽糖をえらびそのそれぞれの硫酸エステルについて硫酸基含量と抗ペプシン、抗潰瘍作用との関連を検討したので報告する。

実験の部

実験材料および方法

ショ糖、乳糖および麦芽糖の各硫酸エステルは当研究所でピリジン溶媒中でピリジン-無水硫酸 complex で反応させて得たものを使用した。

結晶ペプシンは Worthington Biochemical Cop. の2回再結、結晶ペプシンを用いた。

基質は市販乾燥人血漿を用いた。

ペプシンの蛋白分解活性の測定 Bonfils 等⁴⁾の方法に準じて測定した。塩酸で pH 1.6 に調整した 1 mg./ml. の結晶ペプシン溶液 1.0 ml. を試験管に採り、これに同じく pH 1.6 とした二糖類硫酸エステルの試料溶液 1.0 ml., または pH 1.6 の塩酸溶液を加え, 37° で約 10 min. incubate し, ついで基質溶液として pH 1.6 に調整した乾燥人血漿の 3% 水溶液 1.0 ml. を加え 37° で incubate し, 正確に 30 min. 後, 10% トリクロール酢酸 10.0 ml. を加えて反応を中止する。ついで生成した沈殿を濾別し, この濾液を波長 275 mμ を用いて日立分光光度計で吸光度を測定して遊離チロジン量を求めた。

ペプシンの蛋白分解活性の表示 ペプシンの蛋白分解活性は対照ペプシン溶液 1 mg. が蛋白基質を分解して遊離させるチロジン量を 100% 活性として, 二糖類硫酸エステルを添加したときの遊離チロジン量とを比較して残存するポプシン活性を % で表わした。

幽門結紮ラット 体重 170~220 g. の呑竜系雄性ラットをおのおの単独の飼育箱に入れ, Shay⁹⁾ の原報に準じて確実に絶食させて 48 hr. 目にエーテル麻醉下に開腹して幽門部を結紮する。手術終了後ただちに試料溶液または水を胃ゾンデを用いて経口投与し, 続けて絶食, さらに水も断って, 18 hr. 後にクロロホルム麻醉下で再び開腹して胃を剔出する。胃液は目盛付試験管に採り, ついで胃を大彎曲を切開して, 胃粘膜面の潰瘍数および大きさを肉眼的に測定した。

胃液検査 胃液は 2000 回転で 10 min. 遠心分離し, 胃液量および残渣を測定した。酸度は胃液 2.0 ml. を採りジメチルアミノベンゾール 0.5% のアルコール溶液と, 1% フェノールフタレイン溶液を指示薬として 0.02N-NaOH で滴定してその消費 ml. 数の 10 倍した値を酸度(臨床単位)とした。pH は日立 pH メータ(EHM-2 型)で測定した。

ペプシン活性は胃液を 20 倍に希釈しその 2.0 ml. を用いて前述の方法で測定し, 胃液 1.0 ml. が遊離させるチロジンの mg. 量で表わした。

硫黄の定量 英国薬局方¹⁰⁾ デキストラン硫酸の硫黄定量法にしたがって定量した。

実験結果

I) In vitro における抗ペプシン作用 まず非還元二糖で分子内に 1 級 OH 基 3 個を有するショ糖を硫酸エステル化して得たショ糖硫酸エステル Na 塩について結晶ペプシンの抑制作用を検討した。その結果は Table I および Fig. 1 に示すように, ショ糖硫酸エステルのような低分子化合物であっても多糖体硫酸エステルと同様に抗ペプシン作用を示し, その作用は硫酸基含量の基含量の増加とともに増強された。また同一試料では 1~5

TABLE I. Effect of Sucrose Sulfates on the Proteolytic Action of Pepsin

Compound ^{a)}	S (%)	Inhibitory action of samples in various concentrations (mg./ml.) ^{b)}				
		0	1	3	5	7
Su-S II	13.8	100	100	88.7	78.2	74.4
Su-S III	15.2	100	91.9	64.8	46.2	42.4
Su-S IV	17.1	100	87.7	62.4	44.7	40.2
Su-S V	18.4	100	84.0	58.2	40.3	38.0
Su-S VI	21.2	100	80.3	54.0	36.7	34.2

a) Su-S: sucrose sulfate

b) expressed in % against the value of reference pepsin

9) H. Shay: Gastroenterology, 5, 43 (1945).

10) British Pharmacopoeia p. 207 (1958).

Fig. 1. Inhibitory Activity of Sucrose Sulfates on Pepsin

mg./ml. の範囲内では用量-反応曲線はほぼ直線性を示した。

ついで還元二糖で分子内に1級OH基2個を有する乳糖および麦芽糖の各硫酸エステルについて同様に検討した。その結果はTable IIに示したようにショ糖硫酸エステルと同様に抗ペプシン作用を示すが、硫黄含量をほぼ同じくするショ糖硫酸エステルと比較すると、乳糖、麦芽糖の還元二糖類硫酸エステルの抑制効果は劣った。

つぎに多糖体硫酸エステルと比較した。結果はTable IIIに示すように硫黄含量を多く含む二糖類硫酸エステルでは、多糖体硫酸エステルとはほぼ匹敵する抑制効果を示した。

II) 幽門結紮ラット (Shay rat) に対する抗潰瘍作用 まず *in vitro* で強い抗ペプシン作用を示した硫黄含量 21.2% のショ糖硫酸エステル Na 塩の抗潰瘍作用を検討するため、体重 200 g. 前後の雄性ラット 25 匹を用い5匹1群として5群に分け、幽門結紮直後各群にそれぞれ試料溶液 (100 mg./ml.)

TABLE II. Effect of Lactose Sulfates and Maltose Sulfates on the Proteolytic Action of Pepsin

Compound ^{a)}	S (%)	Inhibitory action of samples in various concentrations (mg./ml.)				
		0	1	3	5	7
La-S I	15.4	100	91.4	72.2	58.9	53.1
La-S II	17.8	100	89.2	70.0	54.0	52.7
La-S III	20.6	100	84.4	61.7	43.0	40.4
Ma-S I	15.9	100	91.0	70.2	56.0	53.3
Ma-S II	17.1	100	85.0	63.1	53.2	48.6
Ma-S III	20.4	100	83.1	60.4	48.8	45.7

a) La-S: lactose sulfate Ma-S: maltose sulfate

TABLE III. Comparative Effect of Sucrose Sulfate and Polysaccharides Sulfates on the Proteolytic Action of Pepsin

Compound	S (%)	Inhibitory action of samples in various concentrations (mg./ml.)			
		0	1	3	5
Heparin	9.4	100	90.8	73.2	58.4
Chondroitin sulfate	6.6	100	100	85.9	75.2
Dextran sulfate	17.8	100	81.9	45.8	27.6
Oxidized starch sulfate	14.6	100	75.6	49.0	32.9
Sucrose sulfate	21.2	100	82.7	56.1	38.2

を1匹あたり 25, 50, および 75 mg. を経口投与し、さきに報告した酸化澱粉硫酸エステル Na 塩の 30 mg. 投与群と比較した。その結果はTable IVに示すように最少量の 25 mg. 投与群でも潰瘍発生ラットは1匹も認めず、多糖体硫酸エステルと同等の抑制効果を示すことを確認した。

ついで二糖類硫酸エステル塩について抗潰瘍作用と硫黄含量との関係を詳細に検討する目的から硫黄含量の異なるショ糖、乳糖、麦芽糖の各硫酸エステル Na 塩を選び各試料の 25~100 mg. を Shay rat と経口投与して実験的消化性潰瘍の抑制効果を比較した。

結果はTable Vに示した。対照群では潰瘍発生率 100%, 平均潰瘍数 24.3 以上で高度に潰瘍発生を認めた。

TABLE IV. Effect of Sucrose Sulfate (S=21.2%) and Oxidized Starch Sulfate on Ulcer Formation in Shay rats

Compound ^{a)}	S (%)	Doses (mg.)	No. of rats	Ulcer		Gastric juice				
				Ave. No./rat	No. ulcers rats/group	Vol.	pH	Free HCl	Total acid	Pepsin (as mg. tyrosine)
Su-S VI	21.2	25	5	0	0/5	13.4	2.1	26.1	61.3	11.3
		50	5	0	0/5	12.7	1.6	32.5	50.7	9.4
		75	5	0	0/5	13.0	1.8	34.9	67.8	9.2
OS-S	14.6	30	5	0	0/5	12.3	1.4	40.1	73.2	7.2
Control		0	5	18.4	5/5	12.5	1.5	39.0	84.1	25.4

a) Su-S: sucrose sulfate

OS-S: oxidized starch sulfate

TABLE V. Comparative Effect of Disaccharide Sulfates with various S content on Ulcer Formation in Shay rat

Compound ^{a)}	S (%)	Doses (mg.)	No. of rats	Ulcer		Gastric juice			
				Ave. No./rat	No. ulcers rats/group	Vol.	pH	Pepsin (as mg. tyrosine)	
Su-S I	11.8	100	5	17.2	5/5	13.2	1.2	16.6	
	13.5	100	10	10.1	10/10	12.0	1.3	17.3	
	15.2	50	10	1.8	2/10	11.7	1.5	11.0	
	15.2	25	8	8.5	8/8	12.6	1.4	13.6	
	16.8	50	5	0	0/5	13.1	1.8	8.6	
	16.8	25	10	3.8	2/10	11.9	1.6	11.8	
	18.4	25	5	0	0/5	14.1	1.6	9.8	
Su-S VI	21.2	25	10	0	0/10	13.5	1.7	9.2	
			20	24.3	20/20	13.0	1.5	24.7	
			5	0.4	1/5	12.4	2.0	12.1	
	15.4	50	5	4.1	4/5	11.2	1.8	12.9	
	17.8	50	5	0	0/5	12.7	1.6	9.6	
	17.8	25	10	1.6	5/10	13.3	1.9	11.1	
	20.6	50	5	0	0/5	12.0	1.4	9.2	
La-S I	20.6	25	10	0	0/10	12.8	1.5	9.9	
	15.9	100	5	0	0/5	11.7	1.7	10.7	
	15.9	50	5	3.4	3/5	12.1	1.4	11.4	
	17.1	50	5	0.8	1/5	13.0	1.5	10.2	
	17.1	25	5	4.0	3/5	11.8	1.6	11.6	
	20.4	50	5	0	0/5	12.4	1.3	9.7	
	20.4	25	7	0	0/7	13.3	1.6	10.2	
Control			15	36.2	15/15	12.7	1.5	21.8	

a) Su-S: sucrose sulfate

La-S: lactose sulfate

Ma-S: maltose sulfate

これに対してショ糖硫酸エステル Na 塩は硫黄含量 (以下 S, % と略す) 13% 以下の試料は 100 mg. 投与群で潰瘍発生率 100%, 平均潰瘍数 17.2, 10.1, S, 15% の試料 50 mg. 投与群で潰瘍発生率 20%, 平均潰瘍数 1.8, S, 18% 以上の試料は 25 mg. 投与群でいずれも潰瘍発生率 0% であった。

また乳糖および麦芽糖の各硫酸エステル Na 塩では S, 15% の試料 50 mg. 投与群ではそれぞれ潰瘍発生率 80 および 60% で平均潰瘍数は 4.1, および 3.4, S, 17% の試料は 50 mg. 投与群で潰瘍発生率 0 および 10%, 平均潰瘍数 0, 0.8, S, 20% の試料は 25 mg. 投与で潰瘍発生率は 0% であって, 二糖類硫酸エステル Na 塩投与群では対照群に比して明らかに潰瘍発生の減少が認められた。

胃液分析の結果 ペプシン活性は対照群でにチロシン量として 21.8~24.7 mg. であるが, 二糖類硫酸エステル Na 塩投与群では 17.3~9.2 mg. と減少を示し殊に硫黄含量が 17% 以上を含む試料投与群では著明な減少を

示した。胃液量および pH 値は対照群、投与群間に殆んど差が認められなかった。

以上の結果から二糖類硫酸エステルの Shay rat に対する潰瘍抑制効果と胃液ペプシン活性とは密接な関係があるとともに、*in vitro* における抗ペプシン作用と同じく硫酸基含量の増加に伴って抗潰瘍作用は増強されることを確認した。また二糖類相互の比較においてはショ糖硫酸エステルが乳糖、麦芽糖各硫酸エステルよりまさり、乳糖、麦芽糖硫酸エステルはほぼ同一の効果であった。

III) ショ糖硫酸エステルの皮下投与による抗潰瘍作用 経口投与で強い抗潰瘍作用を示した硫黄含量 21.2% のショ糖硫酸エステル Na 塩の 100 mg./ml. 水溶液を幽門結紮前の 6, 4, 2 hr. 前および結紮直後, 2 hr. 後の計 5 回, 0.1 ml. ずつ, 合計 50 mg. を背部皮下に注射して, 皮下投与による抗潰瘍作用を検討した。結果は, (Table VI) 潰瘍発生動物数, 平均潰瘍数, 胃液 pH, および胃液ペプシン活性ともに対照群と相異が認められず, ショ糖硫酸エステル Na 塩は皮下投与では抗潰瘍作用が認められなかった。

TABLE VI. Effect of Sucrose Sulfate on Ulcer Formation in the Shay Rat (administred subcutaneously)

Compound ^{a)}	No. of rats	No./rat	No. ulcers rat/group	Vol.	pH	Pepsin (as mg. tyrosine)
Su-S VI	5	19.4	5/5	12.4	1.7	26.8
Control	5	16.6	5/5	10.5	2.2	23.2

a) Su-S VI: sucrose sulfate (S=21.2%)

考察および結論

以上の実験結果より二糖類硫酸エステル Na 塩の抗ペプシン, 抗潰瘍作用は硫酸基含量の増加に伴って増強され, 高度に硫酸化された試料では多糖体硫酸エステル Na 塩と同様の強い抑制効果を示すことを確認した。

また Shay rat 潰瘍の抑制と胃液ペプシン活性の減少とは密接な関係にあり, 経口投与では有効, 皮下投与で無効の結果から考えると二糖類硫酸エステル Na 塩の抗潰瘍作用は多糖体硫酸エステル Na 塩と同じく, 直接に胃液ペプシン活性を低下せしめて潰瘍の発生を抑制すると考える。

以上, 著者等は, さきの酸化澱粉硫酸エステルの研究⁹⁾ 結果から予想していたように, 糖類硫酸エステル Na 塩の抗ペプシン, 抗潰瘍作用の発現には硫酸基が主作用団で分子重合度はほとんど関与しないという主張が証明された。

しかしながら比較的低重合度 ($[\eta]$ 0.007~0.015) の酸化澱粉硫酸エステルで, 硫黄含量 10~15% (単位構成糖当り, SO_3Na として 1~1.5 mole) で十分な抗ペプシン, 抗潰瘍作用を発揮するのに対して, 二糖類硫酸エステル Na 塩では, 硫黄含量 17~20% (単位構成糖当り, SO_3Na として 2~3.5 mole) とより高度に硫酸基含量を必要とすることから考えると, 分子重合度は作用発現に補助的な因子として関与しているものと推定するのが妥当であろう。

また二糖類硫酸エステル Na 塩の相互の比較においては, 分子内に 1 級 OH 基と結合した硫酸基 3 個を有するショ糖硫酸エステル Na 塩が 1 級 OH 基と結合した硫酸基を 2 個しかもたない乳糖および麦芽糖の硫酸エステル Na 塩よりも, 少ない硫酸基含量で作用効果が認められる点から考えて, 1 級 OH 基に結合した硫酸基のほうが 2 級 OH 基と結合した硫酸基よりも, 作用発現に強く関与しているものと推定される。

また副作用としてもっとも危惧される血液凝固阻止作用は二糖類硫酸エステルでは, それ自体が二糖という低分子化合物であるため硫酸基を高度に含んだ硫黄含量 21.2% の試料でも, 日本薬局方ヘパリン定量法で測定した結果はわずか 0.4 U/mg. 以下でほとんど作用を示さなかった。

多糖体硫酸エステルが実験的消化性潰瘍に抑制効果を示すことはすでに多くの報告があり広く知られているが二糖類のように少糖類硫酸エステルについての報告はいまだ見当たらない。著者等は本研究において糖類硫酸エステルの抗ペプシン, 抗潰瘍作用発現の主作用団は硫酸基であり, 分子重合度の関与は補助的因子にすぎないことを証明するとともに, 消化性潰瘍治療剤として開発するには二糖類硫酸エステルが, 副作用および製品化の均一性という観点からしても多糖体硫酸エステルよりすぐれていると結論した。

本研究にあたり, 御指導を賜った東京大学名誉教授 石館守三先生, 発表の機会を与えられた当研究所長 秋葉朝一郎博士に謹謝するとともに実験に協力された坂本典子, 加納外記雄の両氏に感謝する。

中外製薬研究所