検量線はこの濃度範囲では直線性を示し (Fig. 6), 反応呈色液は安定であるからこの方法はスルファジアジンの定量法として十分成立すると考えられる。

錠剤および注射液の定量 錠剤——粉末にしたもの約 600 mg を秤取して 2N 塩酸または 2N 水酸化ナトリウム溶液の必要最少量に溶解し水を加えて 100 ml とした後不溶物を汙去し汙液の 1 ml をさらに 1000 ml に希釈したものを検液とする。これは検液 1 ml 中に約 5 μ g/ml のスルファジアジンを含むように希釈したものである。この検液につきさきに述べた定量操作により吸光度を測定し、同時に作成した検量線からスルファジアジンの量を求める。

注射液——注射液を水で適当に希釈し、1 ml 中に約 5 μ g/ml のスルファジアジンを含むようにした検液につき定量操作を行ない、同時に作成した検量線よりその量を求める。

以上のようにして求めた錠剤および注射液の定量結果は Table I のように局方による分析値とよく一致し、Table II のように回収率は良好であった。

なお錠剤の賦形剤として考えられるデンプンおよび乳糖についてその影響を検討した結果、それぞれスルファジアジンの 50 倍量が共存していても呈色反応に影響はなかった。

〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
88 (7) 933 — 936 (1968)

UDC 615.31'298.5.015.43

2-Aminoethylisothiuronium (AET) 関連化合物の薬理作用 (第 4 報¹⁾) 2-Aminoethylisothiuronium の N',N''-置換体を中心とした関連化合物の酵素阻害作用

小澤 光, 原 洋一

東北大学医学部薬学科²⁾

Pharmacological Actions of 2-Aminoethylisothiuronium (AET) Derivatives. IV.¹⁾ Inhibitory Activity of N',N''-Substituted-2-Aminoethylisothiuronium Derivatives on Enzymes

HIKARU OZAWA and YOICHI HARA

Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine²⁾

(Received December 22, 1967)

Inhibitory activities of N',N''-substituted-AET on rat liver monoamine oxidase and on cholinesterase of mouse plasma and rabbit red cell were investigated.

Among the tested compounds, N'-arylated-AET markedly inhibited monoamine oxidase and plasma cholinesterase, but these compounds did not inhibit red cell cholinesterase.

Relationship between the inhibitory activities of the enzyme and the pharmacological actions was discussed.

すでに著者等³⁾は一連の amidine 系化合物の構造活性相関の研究の一環として、2-aminoethylisothiuronium (AET) の N',N''-置換体を中心とした 11 種の関連化合物を合成し、その薬理作用について検討したが、本報は特に酵素に対する作用として、シロネズミ肝臓 monoamine oxidase (MAO) とハツカネズミ血漿およびウサギ血球の cholinesterase (ChE) に対する阻害作用を検討し、すでに報告した薬理作用との関連性を考察した。

実 験 の 部

実験材料

試験化合物は第 1 報³⁾と同じく Table I に示す 11 種である。

1) 第 3 報: 小澤光, 原洋一, 薬誌, 88, 747 (1968).

2) Location: Kitayobancho, Sendai.

3) 小澤光, 原洋一, 薬誌, 88, 156 (1968).

TABLE I. Chemical Structures of Test Compounds

$$\begin{array}{c} \text{R}_1 \backslash \\ \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SC} \begin{array}{l} \text{NHR}_2 \\ \text{NHR}_3 \end{array} \\ \text{R}_1 / \end{array} \cdot \text{X} \cdot \text{HX}$$

Compd. No.	R ₁	R ₂	R ₃	X
I a)	H	H	H	Br
II	H		H	Br
III	H	-CH ₂ •CH ₂ -	H	Br
IV	H	CH ₃	CH ₃	Br
V	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	Br
VI	H		H	Br
VII	H		H	Br
VIII	CH ₃	H	H	Cl
IX	C ₂ H ₅	H	H	Cl
X	C ₂ H ₅		H	Br
XI	C ₂ H ₅	-CH ₂ •CH ₂ -	H	Cl

a) 2-aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide

実験方法

MAO に対する作用および ChE に対する作用の検定は第 3 報⁴⁾ と同様に, それぞれ Creasey⁵⁾ の方法および Michel⁶⁾ の方法に準じて行なった. MAO の場合の反応液の組成は Table II に, ChE の場合の反応液は Table IIIA, および B に示した.

TABLE II. Composition of Incubation Mixture

Main chamber and side arm	
Centrifuged rat liver homogenate 500 mg wet wt./ml	
KCN	1 × 10 ⁻³ M
Semicarbazide • HCl	1 × 10 ⁻² M
Substrate (Tyramine • HCl)	1 × 10 ⁻² M
Inhibitor	ad. lib.
m/15 Na phosphate buffer (pH 7.4)	ad. lib.
Total volume	2.0 ml
Center well	
20% KOH	0.1 ml
gas phase, air; incubation temp., 37.5°	

TABLE III A. Composition of Incubation Mixture (Plasm)

Mouse plasm		0.04 ml	
0.9% NaCl		0.04 ml	
Buffer (pH 8.0)	{	barbital sodium	0.006 M
		KH ₂ PO ₄	0.001 M
		NaCl	0.3 M
		0.1N HCl	11.6 ml/liter

4) 小澤光, 原洋一, 薬誌, 投稿中

5) N.H. Creasey, *Biochem. J.*, **64**, 178 (1956).6) H.O. Michel, *J. Lab. Clin. Med.*, **34**, 1564 (1949).

Substrate (Acetylcholine•Cl 0.165M)	0.4 ml
Inhibitor	0.4 ml
incubation temp., 25°	

TABLE III B. Composition of Incubation Mixture (Red Cell)

Rabbit red cell	0.2 ml
0.9% NaCl	0.2 ml
Buffer (pH 1.8)	{ barbital sodium 0.02 M
	{ KH_2PO_4 0.004 M
	{ KCl 0.6 M
	{ 0.1N HCl 28.0 ml/liter
Substrate (Acetylcholine•Cl 0.11 M)	0.4 ml
Inhibitor	0.4 ml
Total volume	4.0 ml
incubation temp., 25°	

結果および考察

Monoamine Oxidase (MAO) に対する作用 Table IV に示したように試験化合物の中では II, VII および X に強い阻害作用が認められた。これらはいずれも AET の N'-環状置換体であるが、同じ環状置換体でも imidazoline 核の III や XI, benzimidazoline 核である VI などにはほとんど阻害作用が認められなかった点は興味深い。なお阻害作用が認められた II, VII および X の実験例を、同一条件下で行なった phenethylhydrazine の場合と比較して Fig. 1 に示したが、5 例の実験例からそれぞれの化合物の ID₅₀ を算出すると phenethylhydrazine の $1.5 \times 10^{-4}M$ に対して、II は $4.5 \times 10^{-4}M$, VII は $6.8 \times 10^{-5}M$, X は $1.2 \times 10^{-3}M$ であった。なおこの ID₅₀ は基質添加の 60 分後に判定したものである。

X の薬理作用についてはすでに第 2 報⁷⁾ で報告したが、その中で X が spinal cat で tyramine の昇圧作用および瞬膜収縮作用を増強し、X を投与後の reserpine が血圧上昇や瞬膜の収縮などの交感神経興奮性作用を示すことを認めた。Chessin 等⁸⁾ が *p*-phenylethylhydrazine 系化合物について同様の薬理作用を認め、*in vitro* の実験と平行してこれらの作用が MAO 阻害作用によるものであると報告している。著者等の場合も X は *in vitro* で MAO 阻害作用を示し、薬理作用で認められた結果も MAO 阻害によるものであることを裏付ける有力な根拠となると考えられる。しかし X より強い MAO 阻害を示した II や VII は第 1 報³⁾ で報告したように弱いながら adrenergic α -receptor の遮断作用があり、MAO 阻害による薬理作用は mask されているものと考えられる。

Cholinesterase (ChE) に対する作用 ハツカネズミ血漿 ChE (pseudo ChE) およびウサギ血球 ChE (true ChE) に対する試験化合物の各濃度における阻害率を Table V に示した。なお阻害率の判定は基質添加の 30 分後に行なった。

血漿 ChE に対しては II, VI, VII, X などの AET の N',N''-環状置換体に阻害作用が認められた。とくに VII は neostigmine や physostigmine などと同程度の阻害活性を示した。一方血球 ChE に対してはこれらの

Fig. 1. Effects of II, VII and X on Monoamine Oxidase on Rat Liver

●—● control
 △—△ X 10⁻⁴M
 ×—× II 10⁻⁴M
 ○—○ phenethylhydrazine 10⁻⁴M
 □—□ VII 10⁻⁴M

7) 小澤光, 原洋一, 薬誌, 88, 314 (1968).

8) M. Chessin, B. Dubnick, G. Leeson, C.C. Scott, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 80, 597 (1959).

TABLE IV. Activities of Test Compounds as Inhibitor of Monoamine Oxidase

Concn. (M) Compd. No.	Percentage of inhibition						50% Inhibitory concn. (M)
	10^{-5}	5×10^{-5}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-3}	
I		0		0			
II			46.6	53.2	72.1		4.5×10^{-4}
III				0			
IV				0			
V				0			
VI				0			
VII	20.6	36.4	65.4	78.1			6.8×10^{-5}
VIII				2.4	18.6	39.0	
IX				0			
X	1.2		8.4	35.1	36.7	78.8	1.2×10^{-3}
XI				0			
Phenethyl- hydrazine		17.2	47.5	89.9			1.5×10^{-4}

化合物はほとんど阻害作用を示さず、わずかに III が $5 \times 10^{-4}M$ で約 80% の阻害を示したにすぎなかった。

骨格筋では ChE 阻害により、twitch の増強が認められるが、血漿 ChE を阻害した II, VI, VII, X などは第 1 報¹⁾ で報告したように、シロネズミ横隔膜神経筋標本およびトノサマガエル坐骨神経縫工筋標本ではいずれも twitch を抑制した。また AET は twitch を増強したが ChE 阻害作用はなく、このようにこれら試験化合物の骨格筋に対する薬理作用と *in vitro* での血漿および血球 ChE に対する作用とは平行せず、薬理作用は ChE とは無関係であるように考えられる。

一般に MAO や ChE などの酵素に対し AET 関連化合物は構造上での差が作用を異にし、とくに N', N'' の位置での環状置換体と alkyl 置換体では著明な差が認められた。

TABLE V. Activities of Test Compounds as Inhibitors of Cholinesterase

Concn. (M) Compd. No.	Percentage of inhibition							
	Mouse plasm					Rabbit red cell		
	5×10^{-6}	10^{-5}	5×10^{-5}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-3}
I					1.2		4.3	
II				62.2	63.7		27.3	33.2
III					24.7	17.5	77.1	
IV					27.5		33.9	
V					32.2		8.0	
VI				56.5	62.9		35.2	
VII	45.6	68.3	79.9	89.1	100.0		33.5	44.0
VIII					21.4		6.3	
IX					23.4		18.5	
X				48.8	53.0		7.9	13.9
XI					25.5		24.6	
Neostigmine		38.6	82.2	86.1			$81.7 (10^{-5} M)$	
Physostigmine	33.8	73.2					$75.2 (10^{-5} M)$	