2-Aminothiazoline (2-AT) の骨格筋に対する作用様式の解明¹⁾

小澤 光, 久保田克己

東北大学医学部薬学科²⁾The Mode of Action of 2-Aminothiazoline on Skeletal Muscle¹⁾

HIKARU OZAWA and KATSUMI KUBOTA

Pharmaceutical Institute, Tohoku University School of Medicine²⁾

(Received March 21, 1968)

The Effects of 2-amino-2-thiazoline hydrobromide (2-AT) on several skeletal muscle preparations were examined, and the following results were obtained.

2-Amino-2-thiazoline hydrobromide (2-AT) blocked neuromuscular transmission in the sciatic-sartorius of the frog and in the phrenic-diaphragm of the rat followed by an initial facilitation of the twitch; this block was not antagonized by cholinesterase inhibitors such as neostigmine. In chicks, intravenous injection of 2-AT produced a spastic paralysis resemble that of depolarizing agents and in gastrocnemius preparations of hen, close arterial administration of 2-AT gave a contracture.

Close arterial administration of 2-AT on tibialis anterior preparation of the cat produced a block of the neuromuscular transmission elicited by electrical stimulation of the sciatic nerve; this block was not antagonized by neostigmine as in the case of diaphragm. The neuromuscular block produced by *d*-tubocurarine was recovered by 2-AT and *vice versa*. Furthermore no fall in tension occurs during the tetanic stimulation.

From the results mentioned above it might be concluded that 2-AT was a depolarizing neuromuscular blocking agent and that its potency was one hundredth that of decamethonium bromide in the phrenic-diaphragm preparation of the rat.

Doherty 等³⁾により 2-(2-aminoethyl)isothiuronium (AET) の放射線障害防護作用が報告されて以来, 多数の関連化合物が合成され, 放射線障害防護作用について検討されてきた。

一方, Distefano 等⁴⁻¹¹⁾ および小澤等¹²⁻¹⁶⁾ は AET 関連化合物の薬理作用に注目し, その構造活性相関について報告している。2-Amino-2-thiazoline hydrobromide (2-AT) は AET の脱アミノ化による閉環により得られた化合物で, Distefano⁶⁾ 等により循環器系の薬理作用が報告されているが骨格筋に対する作用はいまだ知られていない。

1) 日本薬学会東北支部例会第 24 回例会で発表, 仙台, 1968 年 5 月。

2) Location: Kitayobancho, Sendai.

3) D.G. Doherty, W.T. Burnett, *Proc. Soc. Biol.*, **89**, 312 (1955).

4) V. Distefano, D.E. Leary, D.G. Doherty, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **117**, 425 (1956).

5) V. Distefano, D.E. Leary, K.D. Litte, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **126**, 158 (1959).

6) V. Distefano, D.E. Leary, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **126**, 304 (1959).

7) V. Distefano, P.S. Korn, D.E. Leary, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **134**, 341 (1961).

8) V. Distefano, J.J. Klahn, D.E. Leary, *Radiation. Res.*, **17**, 792 (1962).

9) V. Distefano, P.S. Korn, D.E. Leary, *Radiation. Res.*, **18**, 177 (1963).

10) V. Distefano, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **114**, 588 (1964).

11) V. Distefano, J.J. Klahn, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **151**, 236 (1965).

12) 小澤光, 原洋一, 薬誌, **88**, 156 (1968).

13) 小澤光, 原洋一, 薬誌, **88**, 314 (1968).

14) 小澤光, 原洋一, 薬誌, **88**, 747 (1968).

15) 小澤光, 原洋一, 薬誌, **88**, 933 (1968).

16) 小澤光, 原洋一, 日薬理誌, **64**, 467 (1968).

ところで AET は骨格筋に対してシロネズミ横隔膜神経筋標本で興奮作用を示すことが Distefano 等¹⁾により報告されているが、この閉環された 2-AT も著者等の実験で、同じ標本で興奮作用が認められ、さらにひきつづき抑制という興味ある作用を示した。著者等はこの 2-AT の骨格筋に対する作用をトノサマガエル坐骨神経縫工筋、シロネズミ横隔膜神経筋標本、ニワトリ坐骨神経腓腹筋、ネコ坐骨神経前脛骨筋標本およびヒヨコを用いて検討し、作用様式を解明したので報告する。

実験の部

実験材料

試験化合物の化学構造式は下に示すよう
Doherty 等¹⁷⁾の方法にしたがって合成した。す

なわちブロムエチルアミン臭化水素酸塩とチオ尿素を propylalcohol 中で還流して得られた AET (mp 193—194°) を水に溶解後に水浴上で 1.5 hr 還流して脱アミノ化により閉環させ白色結晶 2-AT を得た。mp 175—176°。

実験方法

1. トノサマガエル坐骨神経縫工筋標本に対する作用 トノサマガエル坐骨神経筋標本を 10 ml の Ringer 液を入れた Magnus 管中に懸垂し、約 20° で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。坐骨神経には単一電気刺激 (duration: 0.4 msec, submaximal rectangular pulse, 0.1 cps) を与えた (日本光電 MSE-20)。

2. シロネズミ横隔膜神経筋標本に対する作用 Bülbring¹⁸⁾の方法で摘出した横隔膜神経筋標本を 40 ml の Tyrode 液を入れた Magnus 管中に懸垂し、37° で酸素を泡出させながら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。横隔膜神経に単一電気刺激 (duration: 1—4 msec, submaximal rectangular pulse, 0.05 cps) を与え間接刺激とし、肋骨付着部と膜様部間に単一電気刺激 (duration: 5—15 msec, supramaximal rectangular pulse, 0.05 cps) を与え直接刺激とした。電子管刺激装置は日本光電 MSE-3 型を用いた。

3. ヒヨコに対する作用 ヒヨコに約 50% 致死量の薬物を翼下静脈内注射し、その時の paralysis の姿勢を観察した。

4. ニワトリ坐骨神経腓腹筋標本に対する作用 ニワトリを chloralose 1% soln 8 ml/kg 静注麻酔後、人工呼吸下で Brown 等¹⁹⁾(1938)の方法に準じて作製した坐骨神経腓腹筋標本に電気刺激を与えて、それによる攣縮および緊縮を Force Displacement Transducers (日本光電 SB-1T) を介してペン書オシログラフに記録した。なお血圧や心拍数も同時に電気血圧計およびタコグラフ (日本光電 RT-2) に記録した。薬物は生理食塩液に溶解し close arterial に適用した。

5. ネコ坐骨神経前脛骨筋標本に対する作用 実験は雌雄を問わず体重 2—4 kg のネコを用いた。エーテル導入後、chloralose 1% soln 8ml/kg 静注麻酔後、人工呼吸下 Brown²⁰⁾(1938)の方法に準じて作製した標本に単一電気刺激 (duration: 0.1—3 msec, supramaximal rectangular pulse, 0.1 cps) を与え、攣縮を Force Displacement Transducers (日本光電 SB-1T) を介してペン書オシログラフに記録した。また tetanic stimulation として、電気刺激 (duration: 0.1—3 msec, supramaximal rectangular pulse, 50 cps) を 10 sec 与えた。薬物はすべて生理食塩液に溶解し、close arterial に適用した。

6. 急性毒性 ハツカネズミの静脈注射による LD₅₀ を up and down 法で算出した。

結 果

1. トノサマガエル坐骨神経縫工筋に対する作用

縫工筋の間接刺激による攣縮において、2-AT は 5×10^{-4} — 10^{-3} g/ml で攣縮の増強作用が著明に観察され、幾分抑制効果も認められた。

2. シロネズミ横隔膜神経筋標本に対する作用

横隔膜神経筋標本の間接刺激による攣縮に対して、2-AT は 2.7 — 5.3×10^{-3} M で攣縮の増強作用を示したのち

17) D.G. Doherty, R. Shapira, W.T. Burnett, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5663 (1959); *Radiation Res.*, **7**, 22 (1957).

18) E. Bülbring, *Brit. J. Pharmacol.*, **1**, 38 (1946).

19) G.L. Brown, A.M. Harvey, *J. Physiol. (London)*, **93**, 285 (1938).

20) G.L. Brown, *J. Physiol. (London)*, **92**, 22 (1938).

抑制作用を示し、抑制効力は decamethonium bromide の 1/100 程度であった。またこの抑制作用は Fig. 1a に示したように tetraethylammonium chloride (TEA): 10^{-3} M, K^+ : 5×10^{-3} M でわずかに拮抗され、caffeine (Caff): 1.5×10^{-3} M で拮抗された。d-Tubocurarine chloride (d-Tc) 10^{-6} M の筋弛緩作用に対して neostigmine methylsulfate (Neost): 10^{-5} M, TEA, K^+ , decamethonium bromide (C_{10}): 1.5×10^{-5} M, 2-AT: $2.7-5.3 \times 10^{-3}$ M および Caff は程度の差こそあれ拮抗した。Procaine hydrochloride (Proc) $0.5-1 \times 10^{-5}$ M の筋弛緩は Neost, K^+ , Caff で拮抗された。なお 2-AT は間接、直接刺激による筋攣縮をともに促進するが、抑制効果は間接刺激に対して著明に現われた。

Fig. 1a. Effect of Several Compounds on Rat Diaphragm Preparation

Muscle twitch was elicited electrically and compounds and antagonists were administered at open and closed circle respectively.

Neost: neostigmine methylsulfate TEA: tetraethylammonium chloride
d-Tc: d-tubocurarine chloride C_{10} : decamethonium bromide
Proc: procaine hydrochloride Caff: caffeine

2-AT 5×10^{-4} g/ml

Fig. 1b. Effect of 2-AT on Rat Diaphragm

Twitch responses were recorded alternately to direct and indirect stimulations.

D: responses to direct stimulation (rectangular pulses, duration 10 msec, supramax.)

I: responses to indirect stimulation (rectangular pulses, duration 3 msec, submax.)

Fig. 2. Effect of 2-AT, C_{10} and d-Tc on Chicks

Each of the compounds was injected intravenously.

TABLE I. LD_{50} of Several Compounds in Chicken (Up and Down Method *i.v.*)

Compounds	LD_{50} (mg/kg)
d-Tubocurarine	0.73
Decamethonium	0.07
2-Aminothiazoline	281.2

3. ヒヨコに対する作用

Fig. 2 に示したように 2-AT はヒヨコ翼下静脈内注射により、 C_{10} にみられた四肢の rigid extension および頭部の retraction, いわゆる spastic paralysis を示した。なお non-depolarizers である d-Tc は flaccid paralysis を示した。

4. ニワトリ坐骨神経腓腹筋標本に対する作用

Fig. 3 に示したように、close arterial injection により acetylcholine chloride (ACh) $1 \mu\text{g}-1 \text{mg}$, C_{10} $0.25-0.5 \mu\text{g}$, 2-AT $5-10 \text{mg}$ は "contracture" を示し、d-Tc $0.1-0.3 \text{mg}$ で flaccid paralysis を示した。

5. ネコ坐骨神経前脛骨筋標本に対する作用

a. Tetanic Stimulation の影響 Fig. 4 に示したように、 C_{10} および 2-AT は tetanic stimulation がなされている間、tetanic contraction をよく維持したが、d-Tc では維持できなかった。また d-Tc で抑制された

Fig. 3. Effect of 2-AT, C_{10} , ACh and d -Tc on Hen Gastrocnemius

Maximal twitches of hen gastrocnemius muscle elicited indirectly once every 10 sec.
Each of the compounds was injected close arterially.

Fig. 5. Effect of Neostigmine (Neost) on the N-M Blocking induced by 2-AT, C_{10} and d -Tc injected Close Arterially in Cat Tibialis Anterior Muscle

Maximal twitches of tibialis anterior muscles elicited by stimulation of the nerves once every 10 sec.
When 10 mg 2-AT was injected close arterially, electrical stimulation was temporarily stopped.

Fig. 6a. Effect of 2-AT and C_{10} on the N-M Blocking induced by d -Tc in Cat Tibialis Anterior Muscle

Maximal twitches of a tibialis anterior muscle elicited by stimulation of the nerve once every 10 sec.
Each of the compounds was injected close arterially.

Fig. 4. Effect of Tetanic Stimulation on the N-M Blocking induced by 2-AT, C_{10} and d -Tc in Cat Tibialis Anterior Muscle

Maximal twitches of tibialis anterior muscles elicited by stimulation of the nerves once every 10 sec.
T: Tetanus was elicited by stimulation of the nerve at 50/sec for 10 sec.
Each of the compounds was injected close arterially.

twitch において posttetanic facilitation が観察された。

b. Neost による影響 2-AT および C_{10} は Neost 50 μ g close arterial injection によりその抑制作用が増強された。 d -Tc は Neost 50 μ g により完全に拮抗された。実験例を Fig. 5 に示した。

c. d -Tc の影響 Fig. 6a,b に示したように C_{10} および 2-AT は d -Tc の筋弛緩作用に拮抗し、また d -Tc は C_{10} および 2-AT の筋弛緩作用に拮抗した。

d. 2-AT は抑制作用に先がけ攣縮の増強がみられた。また間接刺激停止時、close arterial injection により攣縮様の筋の収縮が観察された (Fig. 4)。

6. 急性毒性

マウス静注 up and down 法による急性毒性は 2-AT の LD_{50} 83.3mg/kg, AET の LD_{50} 140.6 mg/kg であ

Fig. 6b. Effect of d -Tc on the N-M Blocking induced by 2-AT and C_{10} in Cat Tibialis Anterior Muscle

Maximal twitches of tibialis anterior muscle elicited by stimulation of the nerve once every 10 sec.
Each of the compounds was injected close arterially.

った。中毒症状はいずれも自発運動が活発となり強直性痙攣をおこしたのち呼吸麻痺で死亡した。

考 察

2-AT の骨格筋作用をネコ前脛骨筋、ニワトリ腓腹筋、ヒヨコ、その他諸種諸筋を用いて検討し、その作用様式の解析を試みた。

その結果、骨格筋弛緩作用は C_{10} 類似、すなわち脱分極性筋弛緩作用であることが次の実験事実から明らかにされた。

- 1) ヒヨコで Zaimis 等²¹⁾ が脱分極性筋弛緩薬によって生ずると報告している spastic paralysis を示した。
- 2) ニワトリ腓腹筋標本の close arterial injection により “contracture” を示した。
- 3) ネコ前脛骨筋標本で抑制に先がける攣縮の促進、ならびに間接刺激停止時の close arterial injection により攣縮様の収縮が観察された。また同標本で tetanic contraction はよく維持されるが tetanic stimulation によって twitch の抑制作用は回復しなかった。さらに Neost により抑制作用が増強された。および *d*-Tc の筋弛緩に拮抗し、また *d*-Tc により 2-AT の筋弛緩作用は拮抗された。以上の作用態度は C_{10} に関して著者が行なった実験事実とよく一致し、また文献上の C_{10} 、すなわち脱分極性筋弛緩薬に関する報告²²⁻²⁸⁾ と完全に一致した。

ところで Morrison,²⁹⁾ Trendelenburg³⁰⁾ の方法にしたがって 2-AT をネコ上頸交感神経節に適用すると瞬膜収縮をひきおこし、またこの収縮作用は hexamethonium bromide で選択的に抑制されることが著者等³¹⁾ の実験で観察されている。このことは 2-AT の脱分極作用を支持しうることを示唆している。ところで 2-AT は AET の閉環によって得られるので 2-AT と AET の構造と作用の関係は興味深い。AET は著者等の実験によると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筋標本において 5×10^{-4} g/ml 程度から著明な攣縮の増強を示し、横隔膜神経筋標本では C_{10} および procaine の筋弛緩作用に拮抗するが *d*-Tc の筋弛緩作用にはむしろ協力的であった。この AET の筋興奮作用がいかなるものであるかも興味のあるところであり、検討の余地がある。一方 2-AT は同じく横隔膜および縫工筋では筋興奮作用を有している。この筋興奮という面は構造上の類似によるものと考えられるが、さらに 2-AT は興奮の後に抑制を示す。この抑制作用が閉環によって発現したものであろうか、あるいは 2-AT も AET も副交感神経終末では弱いながらもスカリン作用を有していることから、単に効力の強弱に関与しているだけのものであるのか、両者の作用の異同という点でも興味がある。構造上でもう一つの大きな差は AET の amidine 基が 2-AT では単に第一級 amino 基になっていることである。Amidine 基を有する化合物で筋興奮を示す代表的な例は guanidine であるが、guanidine 系化合物でも筋興奮作用を示すには amidine 基と、それに結合する amino 基には chain の短い化合物であることが必要とされている。また Distefano¹⁰⁾ によれば AET 関連化合物では、AET の N' , N'' に置換基が導入されると、筋弛緩作用を示すようになることが、また小澤等¹⁴⁾ によっては AET の N に置換基が導入されても筋弛緩作用に変化をきたすことが報告されているが、これらのことから考えると 2-AT も AET の筋興奮作用から弛緩作用への移行体として考えられる。しかし 2-AT の筋弛緩作用が先に述べたように脱分極性のものであることは、AET 関連化合物中にも類似作用をもつ化合物が少ないこと、構造上 C_{10} や ACh と異なることなどさらに今後電気生理学の立場からの検索が必要であらう。なお筋弛緩作用と急性毒性の強さの関係も興味深い。

結 論

2-Aminothiazoline hydrobromide (2-AT) の骨格筋作用に関して、数種の標本を用い検討し、つぎの結果を得

- 21) G.A.H. Buttle, E.J. Zaimis, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1**, 991 (1949).
- 22) W.D.M. Paton, E.J. Zaimis, *Brit. J. Pharmacol.*, **4**, 381 (1949).
- 23) W.D.M. Paton, E.J. Zaimis, *Pharmacol. Rev.*, **4**, 219 (1952).
- 24) W.D.M. Paton, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **54**, 342 (1951—52).
- 25) O.F. Hutter, *J. Physiol. (London)*, **112**, 216 (1952).
- 26) E. Zaimis, “Curare and Curare-like Agents,” Elsevier, Amsterdam, 1959, p. 191.
- 27) L.C. Blaker, W.C. Bownan, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **138**, 185 (1962).
- 28) G.L. Brown, *J. Physiol. (London)*, **93**, 39 (1938).
- 29) B. Morrison, W.D.M. Paton, *Brit. Med. J.*, **1**, 1299 (1953).
- 30) V. Trendelenburg, *Fed. Proc.*, **18**, 1001 (1959).
- 31) 小澤光, 久保田克己, 未発表.

た。

1. トノサマガエル坐骨神経縫工筋, シロネズミ横隔膜神経筋標本で攣縮の増強の後に抑制作用を示した。この抑制作用はシロネズミ横隔膜神経筋標本で decamethonium の 1/100 の効力で, また succinylcholine chloride の 1/50 の効力であった。
2. ヒヨコ翼下静脈内注射により spastic paralysis を示した。
3. ニワトリ坐骨神経腓腹筋標本で “contracture” を示した。
4. a. ネコ前脛骨筋標本で抑制に先がけ攣縮の増強, 刺激停止時の close arterial injection により攣縮様の収縮が観察された。
b. Tetanic contraction はよく維持されるが, 2-AT の抑制作用は tetanus により影響をうけなかった。
c. Neostigmine により抑制作用が増強された。
d. *d*-Tc の筋弛緩作用と拮抗し, 逆に *d*-Tc は 2-AT の抑制作用に拮抗した。
5. 以上の事実から 2-AT の筋弛緩作用は C_{10} 類似の脱分極性筋弛緩作用と考えられるが, その効力はシロネズミ横隔膜神経筋標本では, C_{10} の 1/100 程度であった。

謝辞 本研究にあたり助言を得た当教室五味保男助教授, 原洋一氏に深く感謝する。