塩基性テオフィリン誘導体の薬理学的研究 (第2報¹⁾) 毒性, 気管平滑筋に
対する作用およびヒスタミン遊離作用

久保田和彦,^{2a)} 河野重治,^{2b)} 是枝忠子^{2a)}

東京理科大学薬学部,^{2a)} エーザイ株式会社製薬研究所^{2b)}

Pharmacological Studies of Basic Theophylline Derivatives. II. Toxicity,
Effects on Tracheal Smooth Muscle and Histamine Release

KAZUHIKO KUBOTA,^{2a)} SHIGEHARU KONO,^{2b)} and TADAKO KOREÉDA^{2a)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo^{2a)}
and Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.^{2b)}

(Received April 1, 1968)

Antihistaminic effects in guinea-pig tracheal smooth muscle and acute toxicity of basic theophylline derivatives were examined.

The compounds which have polar substituents generally showed lower toxicities and stronger antihistaminic activities, and several of them gave broader safety margins than theophylline.

Histamine releasing action of a derivative containing piperazine group was tested by using mast cells and rat paw edema.

テオフィリンに塩基性置換基を導入すると心臓に対し抑制作用を現わす場合がある。置換基が極性の高いものにあつては概して心臓血管系に対する薬理作用が弱くなることを前報³⁾ で明らかにした。しかし気管平滑筋に対する作用, 毒性などを調べてみると, 置換基に極性を持たせることは必ずしも不利ではないことが判明した。すなわち極性置換基の導入によって毒性は必ず低下し, 一方気管平滑筋における抗ヒスタミン作用ではむしろ強化される傾向も見られる。

本報ではテオフィリンにおける塩基性置換基の薬理学的意義について前報に引き続き検討を加えるとともに, 前報で示唆しておいた No. 3 (Table I) のヒスタミン遊離作用について実験的証明を試みたので報告する。

実 験 の 部

急性毒性 成熟した雄性ハツカネズミを用い, 水に不溶の検体は塩酸塩などの形で水溶性にし, 生理食塩水に溶かして腹腔内に投与し 72 hr 後の生死を判別した。検体の量が多いものは Litchfield-Wilcoxon 法により, また検体の量が少ないものは Brownlee 等の up and down 法により LD₅₀ の値を求めた。

気管平滑筋における抗ヒスタミン作用 高木⁴⁾ 等の方法に準じ, モルモットの気管を摘出して tracheal chain を作り, マグヌス法でヒスタミン 10⁻⁵ g/ml により気管平滑筋を攣縮せしめ, 15 min 後にテオフィリン 2×10⁻⁵ g/ml を作用させる。テオフィリン適用 15 min 後にテオフィリンがヒスタミンによる気管平滑筋収縮に対してこれを緩解した率 (%) を求め, これをテオフィリン低用量の効果とする。ついでテオフィリン 2×10⁻⁵ g/ml を追加適用し, 同様に 15 min 後の緩解率を求め, はじめのテオフィリン 2×10⁻⁵ g/ml との累積値をテオフィリン高用量による効果とする。検体についてまったく同様にヒスタミン 10⁻⁵ g/ml に対する攣縮抑制率を累積法で求め, それぞれ検体の高低二用量に対応する効果とし, 4 点法による平行線検定法によりテオフィリンに対する検体の抗ヒスタミン作用の効力比を算出した (Table I, Fig. 1)。テオフィリンと検体との効力比は日によって有意の差が認められたので日を変えて 2 ないし 3 回検定し, これを pool して効力比を算出した。また本法による用量-作用曲線の平行性, 直線性は良好である (Fig. 2)。

1) 日本薬学会第 88 年会で発表, 東京, 1968 年 4 月。

2) Location: a) Ichigayafunagawara-cho, Shinjuku-ku, Tokyo; b) Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo.

3) 久保田和彦, 河野重治, 是枝忠子, 薬誌, 89, 441 (1969).

4) K. Takagi, I. Takayanagi, K. Fujie, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 6, 716 (1958).

TABLE I. Toxicity and Antihistaminic Effects of Basic Theophylline Derivatives

	Compd. No.	Substituents		Antihistaminic effects ^{b)} (theophylline = 1.0)	LD 50 mg/kg mouse (<i>i. p.</i>)
		R ₁	R ₂		
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{CO} \\ \quad \\ \text{OC} \quad \text{C}-\text{N}^{\text{R}_1} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{N}^{\text{R}_2} \end{array}$	1	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C} \begin{array}{l} \text{NOH} \\ \text{NH}_2 \end{array}$	-H	c)	HCl salt ca. 1150
	2	$-\text{CH}_2\text{C} \begin{array}{l} \text{NOH} \\ \text{NH}_2 \end{array}$	-H	5.3×10^{-1}	HCl salt ca. 1030
	3	$-\text{CH}_2\text{COCH}_3$	$-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \end{array}$	1.6×10^{-1}	HCl salt ca. 2050
	4	$-\text{CH}_2\text{COCH}_3$	$-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array}$	c)	HCl salt ca. 250
	5	-H	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	4.8×10^{-1}	HCl salt 42.0 (39.3—44.9)
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{CO} \\ \quad \\ \text{OC} \quad \text{C}-\text{N}^{\text{R}_1} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{N}^{\text{R}_2} \quad \text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}^{\text{R}_1} \end{array}$	6	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	8.2×10^{-2}	HCl salt ca. 400
	7		$-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \end{array}$	2.4×10^{-1}	HCl salt 162 (132—198)
	8		$-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array}$	4.8×10^{-2}	c)
	9		$-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \end{array}$	7.4×10^{-2}	c)
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{CO} \\ \quad \\ \text{OC} \quad \text{C}-\text{N}^{\text{R}_1} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{N}^{\text{R}_2} \quad \text{CH}=\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{R}_1 \end{array}$	10	$-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \end{array}$	$-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	4.8×10^{-1}	HCl salt ca. 180
	11	$-\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	$-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	9.0×10^{-2}	HCl salt ca. 210
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{CO} \\ \quad \\ \text{OC} \quad \text{C}-\text{N}^{\text{R}_1} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{N}^{\text{R}_2} \end{array}$	12	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})$	-H	4.5×10^{-1}	1650 (1355—1990)
	13 ^{a)}	-H	-H	1.0	195

a) theophylline

b) in guinea pig tracheal smooth muscle

c) Could not examined owing to their small quantities.

Fig. 1. 4-Point Assays of Antihistaminic Potencies of Basic Theophylline Derivatives with Reference to Theophylline in Guinea-pig Tracheal Smooth Muscle

Each number corresponds to the No. of compound in Table I.
p: papaverine, 13: theophylline Fig. 2. Dose-response Curves for Anti-histaminic Effects of Papaverine, Theophylline and No. 6 in Guinea-pig Tracheal Smooth Muscle Contracted by 10^{-5} g/ml Histamine

× — × papaverine
 o — o theophylline
 □ — □ No. 6

ヒスタミン遊離作用 Demaree 等⁵⁾の方法にしたがい、体重 300 g 前後のシロネズミを pentobarbital-Na 40 mg/kg の腹腔内注射で麻酔し、37° に加温した変型 Tyrode⁶⁾ 液 (NaCl 8 g/liter, KCl 0.25 g/liter, CaCl₂ 0.15 g/liter, MgCl₂ 0.01 g/liter, dextrose 0.9 g/liter, NaH₂PO₄ 0.05 g/liter, NaHCO₃ 1 g/liter) 20—25 ml を腹腔内に注入する。シロネズミを時々軽く揺動し、15 min 後に断頭開腹して肥肝細胞浮遊液を採取する。細胞浮遊液から 5 ml ずつをとって 2000 rpm で冷時 10 min 遠心分離、上清を去り沈殿した mast cell に No. 3 を一定量含む Tyrode 液 2.5 ml を加え mast cell を再浮遊させそれぞれ 37°, 60 min incubate し 2000 rpm で 10 min 遠沈、上清をとりおのおのについてヒスタミン含量を定量する。遠沈によって沈殿した mast cell には別々に Tyrode 液 2.5 ml を加え沸騰水浴上 3 min 加熱して残留ヒスタミンを完全に遊離せしめ、遠沈して上清につきヒスタミン含量を定量する。Incubation によって遊離したヒスタミン量と 100° 加熱により遊離したヒスタミン量を合してこれを 100% とし、incubation によって遊離されたヒスタミンの % を算出する (Table II, Fig. 3). Tyrode 液のみで incubate した場合を自然遊離 (control) とするとこれが 9.4%, No. 3 は 10⁻³ g/ml で 35.8% のヒスタミンを mast cell から遊離せしめた。ヒスタミンの定量は Code⁶⁾ 等の方法により atropinize した摘出モルモット腸管を用いマグヌス法により bioassay した。ただし No. 3 はヒスタミン遊離実験に使用した濃度では bioassay に支障をきたすような影響をモルモット腸管に与えなかった。

TABLE II. *In Vitro* Histamine Release from Rat Peritoneal Cells by No. 3

	Concentration g/ml	Histamine release % ± S.E.
Control		9.4 ± 3.4
No. 3	10 ⁻⁴	11.7 ± 0.9
	2 × 10 ⁻⁴	17.4 ± 1.9
	10 ⁻³	35.8 ± 1.6

Fig. 3. *In Vitro* Histamine Release from Rat Peritoneal Cells by No. 3

Mean spontaneous histamine release after incubation for 60 minutes was 9.4%.

Fig. 4. Inhibition of No. 3-induced swelling in the Rat Paw by Diphenhydramine

×—× No. 3 1000 µg
 ×---× No. 3 1000 µg 30 min after 30 mg/kg of subcutaneous diphenhydramine
 ○—○ theophylline 1000 µg
 ○---○ physiological saline solution

No. 3 による炎症性浮腫とジフェンヒドラミンの拮抗 体重 120 g 前後の雄性シロネズミ 4 匹を 1 群とし 4 群用意、第 1 群に生理食塩水 0.1 ml、第 2 群にテオフィリン 1 mg を含む生理食塩液 0.1 ml、第 3 群に No. 3 1 mg を含む生理食塩液 0.1 ml をそれぞれ足趾皮下に注射する。第 4 群はジフェンヒドラミン 30 mg/kg を皮下注射し、30 min 後に No. 3 1 mg を含む生理食塩水 0.1 ml を足趾皮下に注射する。各群について足趾の浮腫強度を容積法⁷⁾で測定すると、生理食塩水とテオフィリン処置群の間に浮腫強度の差なく、No. 3 処置群は著しい浮腫をきたし、ジフェンヒドラミンで前処置して No. 3 を投与した群はジフェンヒドラミン無処置で No. 3 を投与したものに比し統計的に有意に浮腫強度が小さい (Fig. 4)。

5) G. E. Demaree, R. L. Mundy, M. H. Heiffer, D. P. Jacobus, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **144**, 380 (1964).

6) C. F. Code, F. C. McIntire, "Methods of Biochemical Analysis," 3, Interscience Publ., Inc., New York, 1956, p. 49.

7) C. G. Van Arman, A. T. Begany, L. M. Miller, H. H. Pless, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **150**, 328 (1965).

考 察

気管平滑筋における抗ヒスタミン活性をみると、Table I に記載するテオフィリン誘導体ではテオフィリンより作用の強い物質は見られないが、No. 2, 5, 10, 12 などではテオフィリンのほぼ 1/2 の活性を有する。これらのうち No. 12 は塩基性誘導体ではないが極性の高い OH 基が 2 個入っており、No. 2 は塩基性で極性も高い。このように心臓血管系とは異なり極性の高い置換基は気管平滑筋における抗ヒスタミン活性を弱めず、むしろ強める傾向が見られる。No. 1 は試料を消耗しつくして抗ヒスタミン作用を検定できなかったがおそらくその活性は高いと想像される。No. 12 は血管拡張作用（前報）は皆無であるにもかかわらず、気管平滑筋における抗ヒスタミン作用のみは強く、さらに毒性がテオフィリンの LD_{50} , 195 mg/kg に対し 1650 mg/kg（ハツカネズミ腹腔内投与）と低く注目に値する化合物であろう。No. 2 も同様な意味で血管拡張作用はほとんどなく抗ヒスタミン作用強く毒性は LD_{50} 1030 mg/kg と低いので興味ある化合物である。すなわち極性置換基の導入によって抗ヒスタミン作用は維持されるが毒性は低下し血管拡張作用も弱くなる。

つぎに No. 3 のヒスタミン遊離作用であるが、本品の化学構造をみるとピペラジン環を有し、いわゆるジアミンタイプの化合物であり、ヒスタミン遊離作用は十分予想し得る。前報において、No. 3 がヒスタミン遊離作用の強いツボクラリンと類似の効果を血管におよぼすことを述べたが、シロネズミの mast cell を使った今回の実験でも No. 3 は明らかにヒスタミンを遊離させた。またシロネズミの足蹠の浮腫実験でもその浮腫効果がジフェンヒドラミンで有意に抑制された。これらの事実から No. 3 が持続的に血管を拡張させた原因はそのヒスタミン遊離作用に基づくものと推測される。