抗炎症薬に関する研究 (第 9 報¹⁾) 2-Amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine (Y-3642) の赤血球加熱溶血に対する作用

中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋
吉富製薬株式会社研究所²⁾

Studies on Anti-inflammatory Agents. IX.¹⁾ Effect of 2-Amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine (Y-3642) on Heat-induced Hemolysis

MICHIO NAKANISHI, HIROSHI IMAMURA and KAZUHIRO GOTO

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.²⁾

(Received September 30, 1969)

Effect of 2-amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine (Y-3642) on heat-induced hemolysis was studied and its results were compared with the pharmacological effect *in vivo*. Y-3642 had an affinity for erythrocytes and markedly inhibited heat-induced hemolysis of rat erythrocytes. The inhibition of heat-induced hemolysis by test compounds correlated well with the inhibiting activity on the carrageenin edema, and with analgesic activities on benzoquinone writhing in mice or on inflammatory pain of rat paw induced by carrageenin.

Thienopyridine 誘導体である, 2-amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine (Y-3642) が, 著明な鎮痛, 解熱および消炎作用を有することについては, すでに報告³⁾ した. Y-3642 は, この種の薬理作用を有する既知化合物と基本骨格をまったく異にすることから, この化合物の生化学的活性について検討し, 赤血球加熱溶血に対する作用と薬理作用との関連性について若干の知見を得た.

実 験 の 部

実験材料および実験方法 (1) 被検化合物と被検液調製法——Y-3642 は, 塩酸塩 (Y-3642 HCl) を使用した. Y-3642 HCl, flufenamic acid, mefenamic acid, oxyphenbutazone, phenylbutazone, ibufenac および sodium salicylate は, dimethylsulfoxide (第一化学薬品株式会社) に, benzydamine HCl は, りん酸緩衝液に溶解し被検液とした. 標識化合物として ¹⁴C-Y-3642 の塩酸塩⁴⁾ を使用した.

(2) 赤血球膜安定化作用——赤血球膜安定化作用は, Glenn らの方法⁵⁾ に準じ, 加熱による赤血球の溶血に対する被検化合物の抑制効果を測定した. 体重 150—200 g の雄性 donryu ラット (日本ラット供給) から採血し, 1500 rpm, 15 分間遠心分離し, 沈渣として赤血球を得た. この赤血球を 0.15M りん酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し, 5% 赤血球懸濁液とした. この 3.8 ml に 0.2 ml の被検液 (または, 対照として溶媒) を加え, よく振盪後 53° の水浴中で加熱した. 20 min 後に水道水で急冷し, 3000 rpm, 15 分間遠心分離後, 得られた上清について 540 mμ における吸光度を分光光度計 (日立, model EPS-3T) で測定した. 実験は 2 例を同時に行ない, 2 回以上くり返し, 得られた結果を平均値で示した.

(3) ラット赤血球との親和性——i) (2) と同様の方法で得た 5% 赤血球懸濁液の 3.8 ml に 0.2 ml の被検液を加え, 室温 (25°) で 20 min 間放置後, 3000 rpm, 15 min 間遠心分離し, 上清中に残存する被検化合物の濃度を紫外吸収により定量した. 対照として赤血球懸濁液の代りに, 0.15M りん酸緩衝液 (pH 7.4) を, また盲検として被検液の代りに溶媒を用いた.

ii) 0.2 ml (0.1 mM, 最終濃度) の ¹⁴C-Y-3642 を 3.8 ml の赤血球懸濁液に加え, 室温 (25°), または 53° で

1) 第 8 報: 中西美智夫, 今村 博, 丸山 裕, 薬誌, 90, 329 (1970).

2) Location: Nishigahara-1-26-1, Kita-ku, Tokyo, 114, Japan.

3) 中西美智夫, 今村 博, 丸山 裕, 薬誌, 90, 272 (1970); 中西美智夫, 今村 博, 丸山 裕, 薬誌, 90, 277 (1970); 中西美智夫, 今村 博, 丸山 裕, 薬誌, 90, 284 (1970).

4) 今村 博, 松井英一, 加藤安之, 薬誌, 90, 296 (1970).

5) E.M. Glenn, B.J. Bowman, J.C. Koslowske, Biochem. Pharmacol. Supplement, 1968, 27.

放置し一定時間ごとに 3000 rpm, 15 min 間遠心分離し上清 0.2 ml の放射活性をジオキサン・シンチレーター⁶⁾を用いて測定した。

結果および考察

(1) 赤血球膜安定化作用 (Fig. 1, Fig. 2)

Inglot ら⁷⁾ は赤血球の低張圧による溶血を, また Glenn ら⁵⁾ は熱による溶血を非ステロイド抗炎症薬が抑制することをそれぞれ報告している. そこで赤血球の加熱溶血に対する Y-3642 の作用を検討し, 既知抗炎症薬の作用と比較した. Y-3642 および phenylbutazone の作用を Fig. 1 に示した. 対照の放出ヘモグロビン量を 100 として, Y-3642 および phenylbutazone の効果を相対値で示した. Y-3642 は 0.1 mM でヘモグロビンの放出を約 60% 抑制し, 0.25 mM 以上では逆にヘモグロビンの放出を促進した. Phenylbutazone は 2.5 mM でヘモグロビンの放出をもっとも強く抑制し, 抑制率は 54% であった. 5 mM では放出されるヘモグロビン量は増加し, また 0.25 mM では 17% の抑制を示した.

この成績は, Glenn ら⁵⁾ の結果とよく一致した. しかも Seeman ら⁸⁾ により報告されているトランキライザー, および抗ヒスタミン薬, または Inglot ら⁷⁾ により報告されている非ステロイド抗炎症薬の場合と同様に, 赤血球膜に対し安定化作用と不安定化作用の二相性の反応を示した. 類似の現象は今回検討したすべての化合物について観察された.

赤血球膜安定化作用の強度を比較するため, これらの化合物がもっとも強くヘモグロビンの放出を抑制する濃度までの範囲で抑制率を求め, 用量作用曲線を Fig. 2 に示した.

Fig. 1. Effect of Y-3642 and Phenylbutazone on Heat-induced Hemolysis

○—○: Y-3642
●—●: phenylbutazone

Fig. 2. Inhibition of Heat-induced Hemolysis

○: Y-3642 □: oxyphenbutazone
●: flufenamic acid ■: phenylbutazone
△: benzydamine ▽: ibufenac
▲: mefenamic acid ×: sodium salicylate

被検化合物が, ヘモグロビンの放出を 50% 抑制する濃度を図上から求め IC_{50} とした. Y-3642, benzydamine, flufenamic acid, mefenamic acid, oxyphenbutazone, phenylbutazone, ibufenac および sodium salicylate の IC_{50} は, それぞれ 0.072, 0.2, 0.25, 0.3, 0.88, 1, 5 および 7 mM であった. 0.01 mM における抑制率は Y-3642 よりも flufenamic acid の方がわずかに強く, 0.05 mM 以上では Y-3642 がもっとも強い抑制を示した. また benzydamine, flufenamic acid, mefenamic acid は 0.5 mM 以上, oxyphenbutazone は 2.5 mM 以上, phenylbutazone は 5 mM 以上で溶血を促進した.

水島ら⁹⁾ は phenylbutazone, flufenamic acid などの酸性抗炎症薬による赤血球膜安定化作用は, 細胞膜のたん白質を安定化することによるものであろうとしている. しかし, 著者らがすでに報告¹⁰⁾ したように, Y-3642

6) 今村 博, 松井英一, 加藤安之, 薬誌, **90**, 302 (1970).

7) A.D. Inglot, E. Wolna, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 269 (1968).

8) P. Seeman, T. Weinstein, *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 1737 (1966).

9) Y. Mizushima, S. Sakai, *J. Pharm. Pharmacol.*, **21**, 327 (1969).

10) M. Nakanishi, H. Imamura, K. Ikegami, K. Goto, *Arzneimittel Forsch.*, in press.

の bovine serum albumin の熱変性抑制作用は極めて弱く、しかもピリドキサルリン酸と bovine serum albumin との結合をこの化合物は抑制しないことから、Y-3642 とたん白質との結合はきわめて弱いと考えられる。したがって Y-3642 のような塩基性化合物と flufenamic acid のような酸性化合物とでは、細胞膜に対する結合様式が異なるものと推定される。Kwant ら¹¹⁾ は塩基性化合物である chlorpromazine がヒトの赤血球膜安定化作用を有し細胞膜構造との相互反応の可能性を指摘している。そこで Y-3642 について赤血球との親和性を検討した。

TABLE I. Interaction of Erythrocytes and Test Compounds

Compounds tested	$\lambda_{\max}$ m μ	Concn. (mM)	O.D. at max. of		% of free form
			Control	Test	
Y-3642	305	0.1	0.189 $\pm$ 0.001	0.147 $\pm$ 0.023	77.8
Benzydamine	307.5	0.1	0.360 $\pm$ 0.001	0.280 $\pm$ 0.009	77.8
Flufenamic acid	289	0.1	1.079 $\pm$ 0.025	0.466 $\pm$ 0.055	43.2
Mefenamic acid	288	0.1	0.570 $\pm$ 0.004	0.407 $\pm$ 0.021	71.4
Phenylbutazone	264	0.1	0.991 $\pm$ 0.006	0.839 $\pm$ 0.006	84.7
Ibufenac	265	1.0	0.361 $\pm$ 0.004	0.316 $\pm$ 0.012	87.6

Y-3642, flufenamic acid, mefenamic acid were dissolved in dimethylsulfoxide and the others in phosphate buffer. Results are shown as mean $\pm$ S.D.

(2) 赤血球との親和性 (Table I, Fig. 3)

5% の赤血球懸濁液に被検液を加えて室温で 20 min 間放置後、上清に残る化合物の残存量を求め結果を Table I に示した。0.1 mM における残存量は Y-3642, benzydamine, mefenamic acid がそれぞれ 70—80%, flufenamic acid が 43%, phenylbutazone が 85%, ibufenac は 1 mM で 87% であった。すなわちこれらの化合物は、赤血球膜を安定化する濃度 (Fig. 1) で、赤血球に結合することを示すものと考えられる。

さらに Y-3642 が赤血球に結合する可能性のあることを明らかにするために、 ^{14}C -Y-3642 を用いて検討した。0.1 mM の ^{14}C -Y-3642 を赤血球と 25° または 53° で放置し、一定時間ごとに遠心分離し、上清中の放射活性

Fig. 3. Incorporation of ^{14}C -Y-3642 to Erythrocytes

—●—: 25° —▲—: 53°
a) hemolysis
b) initial activity of suspension

Fig. 4. Relationship between Erythrocytes Stabilization and Inhibition of Carrageenin-induced Edema

●: Y-3642 ○: benzydamine
▲: mefenamic acid △: flufenamic acid
■: phenylbutazone □: oxyphenbutazone

11) W.O. Kwant, J. Van Steveninck, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2215 (1968).

の経時変化を求め Fig. 3 に示した。

最初の赤血球懸濁液の放射活性は、 2.15×10^4 dpm/0.2 ml であった。これを初期濃度とすると ^{14}C -Y-3642 の添加直後 (0 min) の上清中の活性は、 1.67×10^4 dpm/0.2 ml であり、初期濃度に比較して 25% 減少するが 25° で放置した場合には上清中の放射活性の変化は 60 min まで認められなかった。この減少率は、Table I に示した Y-3642 の結果と一致した。一方、53° で加温した場合には、上清中の放射活性は経時的に減少し、20 min 後の放射活性は、 1.4×10^4 dpm/0.2 ml で初期濃度に比較して約 30% 低下した。すなわち加温により Y-3642 の赤血球への取り込みは増加する傾向を示した。しかし、さらに加熱状態を続行すると Y-3642 の溶血抑制作用は認められなくなり、上清中の放射活性は再び増加した。60 min 後では 25° におけるよりも高い活性を示した。この成績は Y-3642 が赤血球と一度結合するが、53° の加温による溶血に伴いふたたび溶媒中に遊離することを示しているものと考えられる。

Fig. 5. Relationship between Erythrocytes Stabilization and Effects on Benzoquinone Test

○ : benzydamine ● : Y-3642
△ : mefenamic acid ▲ : flufenamic acid
□ : oxyphenbutazone ■ : phenylbutazone

Fig. 6. Relationship between Erythrocytes Stabilization and Anti-inflammatory Pain

○ : Y-3642 ● : benzydamine
△ : oxyphenbutazone ▲ : mefenamic acid
□ : phenylbutazone

(3) 赤血球膜安定化作用と薬理作用 (Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6)

Y-3642 は強い鎮痛および消炎作用を有し、しかも生体膜安定化作用を有する。両者の関連性について検討を加えた。カラゲニン浮腫に対する抑制効果の ED_{50} (mg/kg, $p.o.$ ³⁾) と赤血球膜安定化作用の IC_{50} (mM) の関係を Fig. 4 に図示した。

赤血球膜安定化作用のもっとも強い Y-3642 がカラゲニン浮腫に対してもっとも低用量で有効であり、逆に赤血球膜安定化作用の弱い phenylbutazone のカラゲニン浮腫抑制効果は弱い。このように両者の間には正の相関が認められ、相関係数 r は 0.88 で推計学的な有意性 ($p < 0.01$) が認められた。

Benzoquinone test による鎮痛効果の ED_{50} (mg/kg, $p.o.$ ³⁾) との間にも有意の相関 ($r = 0.95$, $p < 0.01$) が認められた。両者の関係を Fig. 5 に示した。

また Fig. 6 に図示したように、炎症性疼痛抑制効果 (IT_{50} , mg/kg, $p.o.$ ³⁾) との間にも相関傾向を示した。

以上の成績から、Y-3642 を含めた抗炎症作用を有する化合物の薬理作用と、赤血球膜安定化作用との間には有意な関連性が認められた。

結 論

Y-3642 は赤血球との親和性を有し、加熱による赤血球の溶血を著明に抑制する。この赤血球膜安定化作用は、動物実験におけるカラゲニン浮腫抑制効果、benzoquinone 刺激抑制効果、および炎症組織より発する痛みに対する鎮痛効果と相関することが認められた。