抗炎症薬に関する研究 (第 17 報¹⁾) 2-Amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno [2,3-*c*]pyridine (Y-3642) Hydrochloride のラット肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化, 膨化および Adenosine Triphosphatase に対する影響

中西美智夫, 今村 博, 池上清輝

吉富製薬株式会社研究所²⁾

Studies on Anti-inflammatory Agents. XVII.¹⁾ Effects of 2-Amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridine (Y-3642) Hydrochloride on Oxidative Phosphorylation, Swelling and Adenosine Triphosphatase of Rat Liver Mitochondria

MICHIO NAKANISHI, HIROSHI IMAMURA and KIYOTERU IKEGAMI

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.²⁾

(Received December 26, 1970)

Oxidative phosphorylation (expressed as ADP/O ratio) in liver mitochondria of rats was uncoupled by 2-amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridine (Y-3642) hydrochloride *in vitro*. The concentration of 20% inhibition of the compound was about 90 μ M, which is lower than that of acetylsalicylic acid or Ibufenac, but higher than that of phenylbutazone, Indomethacin, or flufenamic acid. The ADP/O ratio of the mitochondria obtained from rats after oral administration of Y-3642 in a dose of 100 mg/kg was not different from that of untreated control.

Y-3642 showed a reverse action on mitochondria swelling; it promoted at 1000 μ M and inhibited the swelling at 500 μ M.

Activation of mitochondria ATPase in the presence of Y-3642 at a concentration of 100 μ M was only 12%, against 227% at 5 μ M of flufenamic acid.

These results may suggest that Y-3642 produces a functional change in the mitochondria without a structural change and that production or hydrolysis of ATP does not play an important role in the mechanism of anti-inflammatory activity of this compound.

2-Amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno [2,3-*c*] pyridine (Y-3642) は抗炎症作用を有する化合物³⁻⁵⁾ でその抗炎症作用機作の一つとしてライソゾーム膜などの生体膜安定化作用が推定された。^{6,7)}

Whitehouse ら⁸⁾ は抗炎症作用を有する化合物の作用機作の一つとして酸化的リン酸化の uncoupling 作用について報告している。そこでラット肝ミトコンドリアを用いて本化合物の酸化的リン酸化, 膨化および adenosine triphosphatase に対する作用を検討した。

実 験 の 部

実験材料および方法 1) 試薬——Adenosine diphosphate sodium salt (ADP, Sigma) は 100 μ mole/ml に再留水に溶解した。

- 1) 第 16 報: 今村 博, 松井英一, 加藤安之, 古田哲弥, 薬誌, 91, 546 (1971).
- 2) Location: 1-26-1, Nishigahara, Kita-ku, Tokyo, 114, Japan.
- 3) 中西美智夫, 今村 博, 丸山 裕, 薬誌, 90, 272 (1970).
- 4) 中西美智夫, 今村 博, 丸山 裕, 薬誌, 90, 277 (1970).
- 5) 中西美智夫, 今村 博, 丸山 裕, 薬誌, 90, 284 (1970).
- 6) 中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋, 薬誌, 90, 548 (1970).
- 7) 中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋, 薬誌, 90, 557 (1970).
- 8) M.W. Whitehouse, J.M. Haslam, *Nature*, 196, 1323 (1962).

Adenosine triphosphate disodium salt (ATP, Sigma) は 40 mM に再留水に溶解し、溶液の pH を 7.4 に tris-hydroxyaminomethane (Tris) で調整した。その他の試薬は市販の特級試薬をそのまま使用した。

2) 緩衝液——(M-1): 62.5 mM sucrose, 187.5 mM mannitol, 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 5 mM potassium phosphate (pH 7.2), 5 mM MgCl₂ および 0.2 mM ethylenediamine tetraacetic acid.

(M-2): 150 mM KCl, 100 mM sucrose, および 100 mM Tris-acetate (pH 7.4).

(M-3): 125 mM KCl および 20 mM Tris-HCl (pH 7.4).

3) 被検化合物および被検液の調整——2-Amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno [2,3-c] pyridine (Y-3642) は塩酸塩を使用した。また acetylsalicylic acid (日局), ibufenac, indomethacin, flufenamic acid および phenylbutazone を用いた。

酸化のリン酸化およびミトコンドリア膨化に対する作用の実験では、被検化合物を dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し、adenosine triphosphatase (ATPase) の実験には被検化合物を再留水に溶解あるいはけん濁し、それぞれ Tris で pH を調整して被検液とした。

Y-3642 をラットに経口投与する場合は、1% tween 80 生理食塩液にテフロンホモジナイザーを用いてけん濁して使用した。

4) 動物——体重 120—150 g の雄性呑竜ラットを使用した。

5) ミトコンドリアの調整——萩原ら⁹⁾の方法にしたがった。ラットの頸動脈を切断し放血させた後ただちに肝臓を摘出して、氷冷した 0.25 M sucrose で洗い附着物を除いた。次にビーカー中でハサミを用いて肝臓を細切した後、肝重量の 3 倍の氷冷した 0.25 M sucrose を加え攪拌し上澄液を傾斜して捨てた。肝細切片 1 容に 9 容の 0.25 M sucrose を加え、組織塊が認められなくなるまでテフロンホモジナイザーを用いて氷冷下にホモジナイズした。ホモジネートは 600 g, 10 min, 4° で遠心分離して核、未破壊細胞などを除き、上清を 8000 g, 10 min, 2° で遠心分離した。沈渣にもとの容量の 0.25 M sucrose を加えホモジナイズし、8000 g, 10 min, 2° で遠心し沈渣を分離した。さらに 1 回同様に沈渣を洗浄し、得られた沈渣を肝原重量と等量の 0.25 M sucrose でホモジナイズしてけん濁し、ミトコンドリア分画として酸化のリン酸化の測定に用いた。

ATPase 活性の測定および膨化の測定に用いたミトコンドリアは第 1 回目の 8000 g, 10 min 遠心分離して得られた沈渣を、肝試料の 9 倍容量の 0.25 M sucrose を加えてホモジナイズし、18000 g, 10 min 遠心分離し、得られた沈渣を肝原重量と等量の 0.25 M sucrose でホモジナイズしてけん濁し、ミトコンドリア分画として用いた。蛋白量は Lowry 法¹⁰⁾により測定した。

Y-3642 をラットに投与した場合は、投与 1 時間後に肝臓を摘出し、上に述べたと同様にミトコンドリアを調製した。

対照群には溶媒 (1% tween 80 生理食塩液) を 1 ml/100 g 投与した。ラットは 1 群 3 匹を用いた。

6) 酸化のリン酸化の測定——Hagihara¹¹⁾のポーログラフイー法に準じ、gas analyzer (Bekmann model 160) を用いて測定した。25° で十分攪拌し空気を飽和させた M-1 2.6 ml, 被検液 0.1 ml およびミトコンドリアけん濁液 0.2 ml を反応セルに入れ、マグネチックスターラーで約 3 sec 攪拌後静止し、1 min 酸素消費を測定し記録した (stage 1)。次に 0.1 M コハク酸ナトリウム 0.1 ml を加えて 3 sec 攪拌後静止し、1 min 酸素消費を記録 (stage 2)、続いて ADP 1000 n moles (10 μl) を加え ADP 添加による酸素消費の促進 (stage 3) が stage 2 の状態にもどるまで (stage 4) 測定記録した。Stage 2 と 3 および stage 3 と 4 の変曲点から酸素消費量 (n atoms) を算出した。1 濃度につき少なくとも 3 回の測定を行ない、stage 3 における酸素消費量と、加えた ADP の比からそれぞれ ADP/O 比を求めた。阻害率は次式から算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = \frac{b-a}{a} \times 100$$

a : 検体存在下の平均 ADP/O 比

b : 対照の平均 ADP/O 比

濃度と阻害率の関係から 20% 阻害濃度 (IC₂₀) をグラフ上から求めた。

Y-3642 を投与したラット肝から調製したミトコンドリアの酸化のリン酸化の測定は M-1 2.7 ml, ミトコンドリアけん濁液 0.2 ml を反応セルに入れ攪拌後酸素消費を測定し、次に 0.1 M コハク酸ナトリウム 0.1 ml を添加して以下同様に上に述べた方法で測定した。

7) ミトコンドリア膨化——Gómez-puyou ら¹²⁾の方法にしたがった。M-3 2.8 ml, プロピレングリコール 0.1 ml および被検液 (対照は DMSO) 0.1 ml を試験管に加えよく振り混ぜた後、ミトコンドリアけん濁液 0.04 ml を加え手早く振り混ぜ、25°, 30 min 放置後 520 mμ の吸光度 (OD₅₂₀) を測定した。膨化の経時の変化を測定する場合には反応容器として分光器用セルを使用した。各濃度について 3 回の測定を行ない平均値を求め、次式から算出した値を膨化 % として示した。

9) 萩原文二, 押野礼子, “生体膜実験技術,” 南江堂, 1967, p. 236.

10) E. Layne, “Method in Enzymology,” Vol. 3, Academic Press, 1957. p. 447.

11) B. Hagihara, *Biochem. Biophys. Acta*, **46**, 134 (1961).

12) Gómez-puyou, M. Tuena, J. Guzman-Garcia, A. Pena, *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 669 (1963).

$$\text{膨化(\%)} = \frac{b-a}{a} \times 100$$

a : 検体存在下の平均 OD₅₂₀

b : 対照の平均 OD₅₂₀

8) Adenosine Triphosphatase—Charnock ら¹³⁾ の方法にしたがった。すなわち M-2 1.0 ml, 被検液 (対照は再留水) 0.5 ml, 再留水 0.3 ml 40 mM ATP 0.1 ml を試験管に加えて振り混ぜた後, ミトコンドリアけん濁液 0.1 ml (蛋白量 100—200 μg) を加え, 25°, 30 min incubation した。Incubation 後試験管を氷冷し, 1% 牛血清アルブミン 1 滴続いて 10% トリクロル酢酸 2 ml を加えて振り混ぜ, 3000 rpm, 10 min 温室で遠心分離した。得られた上清中の無機リン (Pi) を Fiske-Sabbarow¹⁴⁾ の方法により定量して ATPase 活性 (Pi μmoles/mg protein/30 min) を求めた。1 濃度について 3 回の測定を行ない平均値を求め, 下式から相対活性を算出し表示した。

$$\text{相対 ATPase 活性(\%)} = \frac{a}{b} \times 100$$

a : 検体存在下の平均 ATPase 活性

b : 対照の平均 ATPase 活性

結果および考察

Y-3642 の抗炎症機作としてライソゾーム膜などの生体膜安定化が関与していると想像される成績について報告した。^{6,7)} 抗炎症作用機作としては, 膜安定化のほか種々の生化学的機作が推定されているが, Whitehouse ら⁸⁾ による酸化的リン酸化の uncoupling 作用もその一つである。そこで Y-3642 についてラット肝ミトコンドリアを用いて検討した。

1) 酸化的リン酸化の Uncoupling 作用 (Table I, II, III)

酸化的リン酸化能は従来 P/O 比で表わされているが, ポーログラフィー法による測定の場合には, P/O 比は反応液に加えられた ADP と, それがすべて ATP に転換されるに要する酸素量との比, すなわち ADP/O 比として示され, この値は P/O 比と一致することが認められている。¹¹⁾

Table I の無処置対照群の ADP/O 比の平均は 1.72 であり文献値⁸⁾ の 1.7 とよく一致した。被検化合物を溶解性の高い DMSO に溶解して DMSO の最終濃度が 3.3% になるように反応液に加えた。この濃度の DMSO は ADP/O 比に影響を与えなかった (Table I)。

Table I に示したように被検化合物はいずれも酸化的リン酸化に対し uncoupling 作用を示し, 濃度依存性であった。Flufenamic acid は被検化合物中最も低濃度で uncoupling 作用がみられた。

酸化的リン酸化 20% uncoupling に対応する各被検化合物の濃度 (IC₂₀) を先に報告したラット肝ライソゾームからの acid phosphatase 遊離阻害作用の IC₂₀⁷⁾ と比較して Table II に表示した。

Y-3642 の acid phosphatase 遊離阻害の IC₂₀ は 4.7 μM であるのに対し, 酸化的リン酸化 uncoupling のそれは 90 μM で, かなり前者より高濃度であった。Acetylsalicylic acid も両者の間にかんがりの開きが認められた。これに比べ phenylbutazone, flufenamic acid および ibufenac では両濃度は比較的近接した値を示した。³⁵S-Y-3642 をカラゲニン浮腫を十分に抑制する量である 100 mg/kg²⁾ をラットに経口投与した 1 hr 後の血中放射能濃度¹⁵⁾ は約 15 μM の Y-3642 に相当し, 酸化的リン酸化を *in vitro* で有意に阻害する濃度より低い。このことから Y-3642 の抗炎症機作への酸化的リン酸化 uncoupling 作用の関与は少なく, もし関与があってもライソゾーム膜安定化作用と比較して関与の程度は少ないものと考えられる。

Adams ら¹⁶⁾ はモルモットにおける紫外線紅斑抑制作用と酸化的リン酸化 uncoupling 作用がよく平行することを phenylbutazone や salicylic acid 誘導体について報告している。Table II に示した既知抗炎症薬の酸化的リン酸化 uncoupling 作用の IC₂₀ は水島¹⁷⁾ の報告している紫外線紅斑に対する 50% 抑制用量とよく平行した。しかし Y-3642 は ibufenac, acetylsalicylic acid より強い酸化的リン酸化 uncoupling 作用を示したが, 紫

13) J.S. Charnock, L.J. Opit, *Biochem. J.*, **83**, 596 (1962).

14) 中尾順子, “生体膜実験技術,” 南江堂, 1967, p. 227.

15) 今村 博, 松井英一, 加藤安之, 古田哲弥, 薬誌, **90**, 1126 (1970).

16) S.S. Adams, R. Cobb, *Nature*, **181**, 772 (1958).

17) 水島 裕, “炎症と抗炎症剤,” 南江堂, 1967, p. 96.

TABLE I. Effect on Oxidative Phosphorylation of Rat Liver Mitochondria

Compound	Concentration (μM)	ADP/O ratio	Inhibition %
DMSO	0	1.79 ± 0.03	—
	3.3%	1.81 ± 0.04	0.0
Y-3642	0	1.29 ± 0.02	—
	10	1.22 ± 0.03	5.6
	50	1.17 ± 0.02	9.4
	0	1.69 ± 0.04	—
	100	$1.30 \pm 0.02^a)$	23.0
Phenylbutazone	0	1.75 ± 0.27	—
	25	1.61 ± 0.03	8.0
	50	$1.30 \pm 0.02^a)$	25.7
	100	$1.03 \pm 0.02^a)$	41.1
Flufenamic acid	0	1.83 ± 0.04	—
	1	1.75 ± 0.04	4.3
	2.5	$1.42 \pm 0.02^a)$	22.4
	5	$1.15 \pm 0.02^a)$	37.1
Indomethacin	0	1.83 ± 0.04	—
	25	$1.52 \pm 0.02^a)$	16.9
	50	$1.40 \pm 0.03^a)$	23.5
	100	$0.96 \pm 0.04^a)$	47.5
Ibuprofen	0	1.90 ± 0.16	—
	100	$1.60 \pm 0.09^a)$	15.8
	250	$1.38 \pm 0.05^a)$	27.4
	500	$1.08 \pm 0.03^a)$	43.2
Acetylsalicylic acid	0	1.70 ± 0.07	—
	500	1.71 ± 0.10	0.0
	1000	$1.44 \pm 0.00^a)$	15.3

a) $p < 0.05$

TABLE II. Uncoupling of Oxidative Phosphorylation of Rat Liver Mitochondria and Inhibition of Release of Acid Phosphatase from Rat Liver Lysosome

Compounds	IC ₂₀ (μM)	
	Oxidative phosphorylation	Release of acid phosphatase ^{a)}
Y-3642	90	4.7
Phenylbutazone	40	76
Flufenamic acid	2.2	6
Indomethacin	25	
Ibuprofen	130	100
Acetylsalicylic acid	1300	180

a) reference 7)

TABLE III. Effect of Y-3642 on Oxidative Phosphorylation of Rat Liver Mitochondria after Oral Administration

Compound	ADP/O ratio
Control	1.302 ± 0.038
Y-3642 100 mg/kg	1.343 ± 0.025

Fig. 1. Effect of Y-3642 on mitochondrial swelling

外線紅斑に対してこれら2化合物よりかなり作用が弱いことが認められている。¹⁸⁾ このことは Y-3642 が従来の抗炎症作用を有する化合物と性質を異にすることを示唆するものと考えられる。

Y-3642 を 100 mg/kg 経口投与 1 hr 後に得られたラット肝ミトコンドリアの ADP/O 比は 1.343 であり、対照との間に有意な差は認められず、抗浮腫作用との相関を明らかにすることはできなかった (Table III).

2) ミトコンドリア膨化に対する作用 (Fig. 1, Table IV)

ミトコンドリア膨化は対照では 20—30 min ではほぼ一定の値に達した。

Y-3642 の 1000 μM により、膨化は著しく促進され、反応開始 30 sec 後にはすでに 78%, 30 min 後には 92% まで達した。これに対し Y-3642 が 500 μM 存在した場合には膨化は逆に抑制された。

Table IV には各薬物のミトコンドリア膨化に対する作用を示した。

Flufenamic acid および indomethacin は 100—1000 μM で両化合物ともほぼ同程度の膨化促進作用を示したが、抑制作用は認められなかった。Acetylsalicylic acid では 100—1000 μM で膨化を抑制する傾向を示したが、促進作用は見られなかった。

Gómez-puyou ら¹²⁾ は triamcinolone が酸化的リン酸化などのミトコンドリアの機能を阻害するのは、同化合物がミトコンドリアの構造に変化を与えることによるものと推定している。

Y-3642 では、酸化的リン酸化 uncoupling 作用は膨化促進作用の認められるよりも低い濃度で見られるところから、機能変化が先行すると考えられる。したがって本化合物の場合、ミトコンドリアに構造変化を与えることによる二次的な酸化的リン酸化 uncoupling 作用とは考えられない。Y-3642 のミトコンドリア膨化に対する作用はミトコンドリアの膜に対する作用と考えられるが、500 μM における膨化抑制作用はライソゾーム膜安定

TABLE IV. Effect on Mitochondrial Swelling after 30 min

Compounds	Concentration (μM)	Swelling (%)
Y-3642	100	-1.7
	500	-19.7
	1000	92.0
Flufenamic acid	5	-4.7
	10	4.2
	100	29.0
	500	37.0
	1000	55.2
Phenylbutazone	100	-3.8
	500	-3.2
	1000	-4.4
Indomethacin	100	28.7
	500	47.4
	1000	56.5
Ibuprofen	100	6.8
	500	15.6
	1000	17.0
Acetylsalicylic acid	100	-11.5
	500	-8.9
	1000	-14.9

18) M. Nakanishi, H. Imamura, Y. Maruyama, *Arzneimittel. Forsch.*, 20, 998 (1970).

TABLE V. Effect on Mitochondria ATPase

Compounds	Concentration (μM)	ATPase activity (%) ^{a)}
Y-3642	10	93.8
	50	102.3
	100	112.0
Phenylbutazone	10	105.2
	50	129.0
	100	143.6
Flufenamic acid	10	122.6
	50	145.5
	100	326.5
Indomethacin	10	106.0
	50	206.0
	100	214.0
Ibufenac	50	138.8
	100	130.5
	500	197.3
Acetylsalicylic acid	100	124.0
	500	150.0
	1000	144.0

a) ATPase activity of control: 0.44–0.67 $\mu\text{mol Pi/mg protein/30 min}$

化, 赤血球加熱溶血抑制作用^{6,7)} に, 1000 μM の膨化促進作用は赤血球加熱溶血促進作用に対応する現象と考えられる。

3) ミトコンドリア ATPase に対する作用 (Table V)

いずれの被検化合物も酸化的リン酸化 uncoupling 作用を示す濃度で, ラット肝ミトコンドリアの ATPase 活性化作用を認めたが, Y-3642 は 100 μM で約 12% の活性化作用を示しただけで, 被検化合物中最も弱い作用であった。Flufenamic acid は被検化合物中最も強い ATPase 活性化作用を示した。

Whitehouse¹⁹⁾ は salicylic acid 誘導体の酸化的リン酸化の uncoupling 作用とミトコンドリア ATPase 活性化作用がよく平行することを報告している。Table V の結果もほぼ酸化的リン酸化の uncoupling 作用と平行する傾向が認められた。

また Whitehouse²⁰⁾ は抗炎症薬が酸化的リン酸化の uncoupling 作用によって ATP 産生を低下し, 同時に ATPase を活性化して ATP を分解し, この両作用によって ATP 量を減少させ抗炎症作用を発揮するものと考えている。

Y-3642 の抗炎症作用に対するミトコンドリア ATP 産生抑制および分解亢進作用の関与は少ないものと推定される。

19) M.W. Whitehouse, *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 319 (1964).

20) M.W. Whitehouse, "Progress in Drug Research," Birkhauser, 1965, p. 231.