抗炎症薬の赤血球膜安定化作用 (第 3 報¹⁾) 非 Steroid
系抗炎症薬と α -Tocopherol の比較²⁾

小友 進, 藤平栄一
大正製薬株式会社研究部³⁾

Stabilizing Effect of Anti-inflammatory Drugs on Erythrocyte Membrane. III.¹⁾
Comparison of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and α -Tocopherol²⁾

SUSUMU OTOMO and EIICHI FUJIIHARA

Research Laboratory, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.³⁾

(Received October 31, 1972)

Non-steroidal anti-inflammatory drugs and α -tocopherol were tested *in vitro* for inhibition against hemolysis and lipid peroxidation induced by H_2O_2 in erythrocytes from healthy mongrel dogs. In concentration over the range of 10^{-6} to $4.5 \times 10^{-4}M$, anti-inflammatory drugs inhibited both hemolysis and lipid peroxidation, while α -tocopherol had no effect. Against peroxidation of free unsaturated fatty acids caused by various means (H_2O_2 , UV irradiation, ascorbic acid + Fe^{+2} , and hemoglobin), antioxidants including α -tocopherol showed a marked inhibition, whereas almost all anti-inflammatory drugs had no effect. H_2O_2 was not destroyed directly by both antioxidants and anti-inflammatory drugs.

Diphenyl-*p*-picrylhydrazyl, a model compound of free radical, was reduced powerfully with antioxidants but not with anti-inflammatory drugs.

炎症の慢性化には、過度の貪食による多核白血球の細胞内顆粒 lysosome の破壊と酵素遊離、ひき続く細胞の死滅と起炎物質の放出が一つの誘因といわれている。⁴⁾ 一方、抗炎症薬には lysosome 膜を安定化し、酵素遊離を防止する作用が認められ、⁵⁾ 薬理作用を説明するものとして重要視されている。抗炎症薬の生体膜安定化作用は赤血球、⁶⁾ 血小板⁷⁾ においても確かめられているが、その機作についてはまだ十分に解明されていない。一般には抗炎症薬が蛋白質と結合し、⁸⁾ 熱変性に拮抗し、⁹⁾ また S-S 交換反応を促進する¹⁰⁾ などから、膜蛋白質との相互作用にあるとする考え方が有力である。

著者らは、貪食多核白血球内での H_2O_2 産生増加¹¹⁾ に注目し、酸化的な lysosome 膜の脆弱化の可能性を考

1) 第 2 報：藤平栄一，小友 進，薬誌，90, 1355 (1970).

2) 日本薬学会第 91 年会で発表，福岡，1971 年 4 月.

3) Location: No. 34-1, 3 chome Takata, Toshimaku, Tokyo.

4) G. Weissmann, "The interaction of drugs and subcellular components in animal cells," ed. by Campbell, J. and A. Churchill, London, 1968, p. 203.

5) a) G. Weissmann, *New Engl. J. Med.*, 273, 1084, 1143 (1965); b) W.S. Miller, J.G. Smith, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 122, 634 (1966); c) K. Tanaka, Y. Iizuka, *Biochem. Pharmacol.*, 17, 2023 (1968).

6) a) J.H. Brown, H.K. Mackey, D.A. Riggilo, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 125, 837 (1967); b) A.D. Inglot, E. Wolna, *Biochem. Pharmacol.*, 17, 267 (1968); c) H. Sheppard, W.H. Tsien, C. Burghardt, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 2215 (1969); d) D.A. Kalbhen, P. Gelderblom, R. Domenjoz, *Pharmacology*, 3, 353 (1970).

7) a) E.M. Glenn, B.J. Bowman, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 130, 1327 (1969); b) J.R. O'Brien, W. Finch, E. Clark, *J. Clin. Pathol.*, 23, 522 (1970); c) M.B. Zucker, J. Peterson, *J. Lab. Clin. Med.*, 76, 66 (1970).

8) a) C.F. Chignell, *Mol. Pharmacol.*, 5, 244 (1969); b) C.F. Chignell, *Mol. Pharmacol.*, 5, 455 (1969).

9) a) Y. Mizushima, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, 149, 1 (1964); b) Y. Mizushima, S. Sakai, M. Yamaura, *Biochem. Pharmacol.*, 19, 227 (1970).

10) D.A. Gerber, N. Cohen, R. Giustra, *Biochem. Pharmacol.*, 16, 115 (1967).

11) B. Paul, A.J. Sbarra, *Biochim. Biophys. Acta*, 156, 168 (1968).

え、前報^{1,12)}では、イヌ赤血球を lysosome のモデルとして、 H_2O_2 、紫外線、および lipid peroxide による溶血と膜 lipid peroxidation にたいする抗炎症薬の作用を検討し、抗炎症薬の膜安定化作用には膜構成脂質の酸化変化にたいする作用も考えられると述べた。酸化的膜破壊と膜 lipid peroxidation の関係については、すでに vitamin E 欠乏性の赤血球などで検討され、¹³⁾ α -tocopherol などの抗酸化剤が強い抗溶血作用を示すことはよく知られている。¹⁴⁾

本報では、イヌ赤血球の H_2O_2 溶血において、非 steroid 系抗炎症薬の抗 lipid peroxidation 作用がいかなる意味を持つかわかりにすするため、lipid peroxidation を起す諸条件下で α -tocopherol などの抗酸化剤と、作用の相違を検討した。

実 験 の 部

材料 Flufenamic acid (FA), mefenamic acid (MA), phenylbutazone (Phb), oxyphenbutazone (o-Phb), acetylsalicylic acid (AsA), salicylic acid (SA), aminopyrine (Amp), chloroquine diphosphate (Q) は前報¹²⁾ と同じものを使用した。 α -Tocopherol は Sigma 社から、また linolenic acid, arachidonic acid は K&K Laboratories からそれぞれ試薬特級品を購入して使用した。その他の試薬は全て市販の試薬特級品を用いた。水に可溶の検体は生理食塩液に溶かし、pH を 7.4 に調整し、また水に不溶の α -tocopherol, N,N'-diphenyl-p-phenylendiamine (DPPD), nordihydroguaiaretic acid (NDGA) は ethanol 溶液として使用した。緩衝液は全て NaCl で等張化した 1/15M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。

H_2O_2 による溶血と Lipid Peroxidation の実験法 ほぼ前報¹²⁾ に従った。雑種犬赤血球を冷生理食塩液で 3 回洗い、緩衝液を加えて 10% 懸濁液とし、その 0.5 ml に薬物液 0.05 ml、緩衝液 0.45 ml および 0.6% H_2O_2 含有緩衝液 1.0 ml を加え 37° で反応させた。実験は全て duplicate で行ない、反応時間は、溶血については 30 min, lipid peroxidation については 2 hr とした。反応終了後反応液に生理食塩液 4.0 ml を加え攪拌、遠心分離した上清について、hemoglobin 量を cyanomethohemoglobin 法¹⁵⁾ により、また lipid peroxide 量を TBA 法^{13a)} によりそれぞれ測定した。結果は薬物を含まない時の強度をいずれも 1.0 として相対的に表わした。

H_2O_2 分解実験法と残存 H_2O_2 測定法 薬物液 3.75 ml に 0.6% H_2O_2 緩衝液 5 ml 及び生理食塩液 1.25 ml を混和し、37° で 0, 30, 60, 90 min 反応させ、チオ硫酸ナトリウム法¹⁵⁾ で残存 H_2O_2 を定量した。

不飽和脂肪酸の Peroxidation 実験法 Wills の方法¹⁶⁾ に従い、linolenic acid 及び arachidonic acid の emulsion を調製し、以下のように実験した。(1) H_2O_2 法: $2 \times 10^{-2}M$ Arachidonic acid emulsion 0.5 ml に 0.6% H_2O_2 緩衝液 1.0 ml, $10^{-3}M$ 薬物液 0.5 ml を加え、37° で 120 min 反応させた。(2). 紫外線照射法: $2 \times 10^{-2}M$ Linolenic acid emulsion 1.25 ml に $10^{-3}M$ 薬物液 3.75 ml を加え、前報¹⁾ と同じく 90 min 間照射した。(3). Ascorbic Acid+ Fe^{++} 法: $2 \times 10^{-2}M$ Linolenic acid emulsion 1.0 ml にそれぞれ $5 \times 10^{-4}M$ ascorbic acid と $FeSO_4(NH_4)_2 SO_4 \cdot 6H_2O$ の生理食塩液 0.5 ml, $6.25 \times 10^{-5}M$ 薬物液 1.0 ml を加え、37° 120 min 間反応させた。(4). Hemoglobin 法: Mellows と Tappel の方法¹⁷⁾ に従い、1% linolenic acid emulsion 2.97 ml に $10^{-2}M$ 薬物液 30 μ l を加え、37° で攪拌しつつ 2 μ M hemoglobin 緩衝液 10 μ l を添加し、lipid peroxidation にともなう酸素吸収量を生理ガス分析計 (Beckman-Toshiba LTD) で測定した。

Diphenyl-p-picrylhydrazyl (DPPH) 還元法 Mellows と Tappel の方法¹⁷⁾ に従い、 $10^{-3}M$ DPPH ethanol 液 3.0 ml に薬物の ethanol 液 0.5 ml を混和し、混和直後と 10 min 後に 517m μ の吸光度を測定し、その差を DPPH 還元量とした。

結 果

1. 犬赤血球の H_2O_2 溶血と Lipid Peroxidation にたいする抑制

Fig. 1 に示すように、用いた非 steroid 系抗炎症薬のほとんどは犬赤血球の H_2O_2 溶血と lipid peroxidation を抑制した。特に FA, MA, o-Phb, Amp の抑制作用が顕著であった。AsA は抗溶血作用が強く、抗 lipid peroxidation 作用が弱かったが、Phb は AsA と逆の結果を示した。薬物の各濃度における両抑制作用の間には、程度に多少の違いがあり、また高濃度域において溶血抑制作用の減少あるいは消失があったが、概して平行した

12) 小友 進, 藤平栄一, 薬誌, 90, 1347 (1970).

13) a) C.E. Mengel, H.E. Kann, Jr., *J. Clin. Invest.*, 45, 1150 (1966); b) C.C. Tsen, H.B. Collier, *Canad. J. Biochem.*, 38, 957 (1960).

14) A.L. Tappel, *Fed. Proc.*, 24, 73 (1965).

15) 高木誠司, “定量分析の実験と計算,” 共立出版, 東京, 1950.

16) E.D. Wills, *Biochim. Biophys. Acta*, 98, 238 (1965).

17) A. Mellors, A.L. Tappel, *J. Biol. Chem.*, 241, 4353 (1966).

Fig. 1. Effect of Anti-Inflammatory Drugs and α -Tocopherol on H_2O_2 -Induced Hemolysis and Lipid Peroxidation

I: phenylbutazone, II: oxyphenbutazone, III: flufenamic acid, IV: mefenamic acid, V: acetylsalicylic acid, VI: aminopyrine, VII: chloroquine, VIII: α -tocopherol
 ○: hemolysis ●: lipid peroxidation

関係がみられた。これにたいし、 α -tocopherol は犬赤血球の H_2O_2 溶血と lipid peroxidation をほとんど抑制しなかった。

2. 不飽和脂肪酸の Peroxidation にたいする抑制

H_2O_2 , 紫外線照射, ascorbic acid + Fe^{++} , および hemoglobin による不飽和脂肪酸の peroxidation にたいする

TABLE I. Effect of Anti-Inflammatory Drugs and Antioxidants on Unsaturated Fatty Acid Peroxidation

Drug	Inhibition percent (mean $\pm$ SE)			
	H_2O_2	UV	Ascorbic acid-ferrous ion	Hemoglobin
Flufenamic acid	6.5 $\pm$ 4.1	24.6 $\pm$ 1.7	0.0 $\pm$ 1.1	13.0 $\pm$ 3.8
Mefenamic acid	1.5 $\pm$ 3.2	14.4 $\pm$ 6.4	2.9 $\pm$ 1.7	15.6 $\pm$ 2.7
Phenylbutazone	0.7 $\pm$ 3.2	-9.5 $\pm$ 1.9	0.0 $\pm$ 1.0	-1.6 $\pm$ 3.8
Oxyphenbutazone	-3.9 $\pm$ 5.7	45.6 $\pm$ 9.2	14.0 $\pm$ 4.7	3.0 $\pm$ 0.6
Acetylsalicylic acid	12.3 $\pm$ 10.2	21.7 $\pm$ 2.8	0.0 $\pm$ 2.2	-0.6 $\pm$ 5.8
Salicylic acid	7.4 $\pm$ 2.9	-32.8 $\pm$ 12.4	0.4 $\pm$ 1.1	12.9 $\pm$ 2.8
Aminopyrine.	-10.3 $\pm$ 3.2	31.2 $\pm$ 5.3	15.2 $\pm$ 3.4	97.3 $\pm$ 1.8
Chloroquine	4.2 $\pm$ 2.0	24.3 $\pm$ 12.5	0.0 $\pm$ 2.0	-24.4 $\pm$ 0.8
α -Tocopherol	—	42.1 $\pm$ 6.3	92.0 $\pm$ 2.9	68.6 $\pm$ 8.2
DPPD	—	54.8 $\pm$ 2.8	100.0 $\pm$ 2.8	93.7 $\pm$ 5.5
NDGA	—	48.0 $\pm$ 3.7	74.0 $\pm$ 5.3	80.0 $\pm$ 3.9

抗炎症薬と抗酸化剤の作用を比較検討した。Table I に示すように、 α -tocopherol, DPPD, NDGA らの抗酸化剤は強い抑制作用を示したが、抗炎症薬の作用はどの場合にもほとんど認められなかった。例外として Amp が hemoglobin による lipid peroxidation を強く抑制し、また *o*-Phb が紫外線照射による lipid peroxidation を α -tocopherol と同程度の強さで抑制した。

3. H_2O_2 および DPPH にたいする作用

抗炎症薬が H_2O_2 と直接反応し、分解、消失せしめるかどうかを検討したが、 H_2O_2 は用いた全ての薬物 ($7.5 \times 10^{-4}M$) により 90 min の反応時間で分解されなかった。(データ省略)。さらに lipid peroxidation が free radical 反応であることから、DPPH をモデルとして free radical との反応性を検討したところ、Table II に示すように、 α -tocopherol などの抗酸化剤は DPPH に強く反応したが、抗炎症薬は、*o*-Phb と Phb がごく僅か反応したのみで、他は全く反応性を示さなかった。なお、 α -tocopherol などの抗酸化剤は、arachidonic acid の peroxidation で TBA 反応の発色を阻害するため表中データを省略した。

TABLE II. Reduction of Diphenyl-*p*-picrylhydrazyl

Drug	Decrease in Abs. at 517 m μ	
	$2.9 \times 10^{-5}M$	$2.9 \times 10^{-4}M$
Flufenamic acid	0.008	0.022
Mefenamic Acid	0.004	0.009
Phenylbutazone	0.069	0.380
Oxyphenbutazone	0.210	0.394
Acetylsalicylic Acid	0.007	0.010
Aminopyrine	0.002	0.015
α -Tocopherol	0.569	0.601
DPPD	0.556	—
NDGA	0.493	—
Control (EtOH)	0.006	0.004

考 察

α -Tocopherol の生体膜安定化作用は主として vitamin E 欠乏状態でみられており、Tappel¹⁴⁾ は α -tocopherol がその水酸基の抗酸化力により膜 lipid の不飽和結合を酸化的環境より保護し、膜を安定化させると述べているが、Skinner ら¹⁸⁾ は α -tocopherol 誘導体の抗酸化性と赤血球の膜安定性の間に相関関係はみられないと報告している。また Lucy と Dingle¹⁹⁾ は膜 lipid 構造に平板状と球状の二つがあり、互いに平衡関係にあるが、赤血球が vitamin E 欠乏状態でなくとも、 α -tocopherol は球状構造を安定化し、vitamin A 溶血のようなある種の膜破壊を防ぐことを報告している。

健康イヌ赤血球の H_2O_2 溶血とその際の膜 lipid peroxidation にたいし、非 steroid 系抗炎症薬は強い抑制作用を示すが、 α -tocopherol は何ら影響しない (Fig. 1)。しかし遊離不飽和脂肪酸そのものの peroxidation は逆に α -tocopherol などの抗酸化剤が強く抑制し、抗炎症薬は抑制しない (Table I)。さらに抗酸化剤は free radical と強く反応するが、抗炎症薬にはこのような反応性はみられない (Table II)。つまり健康イヌ赤血球の H_2O_2 溶血系では α -tocopherol の抗酸化性は生体膜安定化作用としてあらわれず、抗酸化性のない非 steroid 系抗炎症薬が抗溶血作用と抗 lipid peroxidation 作用を示した。

膜 lipid は蛋白質と疎水結合した状態にあり、²⁰⁾ 物理化学的性質も free の場合とかなり異なることが考えられる。Victoria と Barber²¹⁾ は lipid が micelle 状で単独に存在するよりも膜の構造蛋白質と結合している状態の

18) W.A. Skinner, H.L. Johnson, M. Ellis, R.M. Parkhurst, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 643 (1971).

19) J.A. Lucy, J.T. Dingle, *Nature*, **204**, 156 (1964).

20) D.F.H. Wallach, A.S. Gordon, "Regulatory functions of biological membranes," ed. by J. Järnefelt, Elsevier Publishing, Amsterdam, 1968.

21) E.J. Victoria, A.A. Barber, *Lipid*, **4**, 582 (1969).

ほうが lipid peroxidation を受けにくいと報告している。このことは膜 lipid の安定性に蛋白質が重要な意味を持つことを示している。抗炎症薬はおそらく膜蛋白質との相互作用により、抗溶血作用を示すとともに、二次的に膜 lipid peroxidation を抑制するものと考えられる。

抗炎症薬の膜 lipid peroxidation 抑制作用は薬物濃度とともに増加するが、抗溶血作用は高濃度域において低下し、二相性を示す (Fig. 1)。抗炎症剤の膜安定作用の二相性は低張圧溶血,^{8b)} 熱溶血,^{8d)} あるいは lysosome の破壊^{5c)} などでもみられる現象である。ヒト血清 albumin には Phb, o-Phb と結合する二種以上の異なる binding site があるといわれており,²²⁾ 溶血にたいし抗炎症薬が二相性の作用をあらわすことは、赤血球膜面にも抗炎症薬が結合して膜を安定化させる site と脆弱化させる site があるように思われる。

結 論

1) イヌ赤血球の H_2O_2 溶血と膜 lipid peroxidation にたいし、非 steroid 系抗炎症薬は強い抑制作用を示したが、 α -tocopherol は何ら影響をあたえなかった。

2) H_2O_2 , 紫外線照射, ascorbic acid + Fe^{++} および hemoglobin による遊離不飽和脂肪酸の peroxidation は、抗炎症薬 ($10^{-4}M$ — $2.5 \times 10^{-5}M$) により抑制されず、抗酸化剤の α -tocopherol, DPPD, NDGA により強く抑制された。

3) H_2O_2 の分解性は抗炎症薬、抗酸化剤ともに認められず、free radical モデルの DPPH との反応性は抗炎症薬 ($2.9 \times 10^{-5}M$) にみられず、抗酸化剤に顕著にみられた。

謝辞 本研究を通じ、終始御指導、御鞭撻いただいた東北大学薬学部 小澤 光教授、大正製薬株式会社常務 井川俊一博士ならびに研究部長 田中一郎博士に深謝いたします。

22) H. Rosen, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2075 (1970).