抗炎症薬に関する研究 (第 29 報¹⁾)

Tinoridine のラット肝 Lysosome 酵素の遊離および脂質過酸化に対する抑制作用

中西美智夫, 後藤一洋, 久留正生

吉富製薬株式会社研究所²⁾

Studies on Anti-inflammatory Agents. XXIX.¹⁾ Inhibitory Effects of Tinoridine on Release of Lysosome Enzymes and Lipid Peroxidation in Rat Liver

MICHIO NAKANISHI, KAZUHIRO GOTO and MASAO HISADOME

Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.²⁾

(Received October 25, 1974)

Both the release of enzymes and the lipid peroxidation were induced by the addition of hydrogen peroxide to the lysosome suspension prepared from rat liver homogenate. In this experimental model with hydrogen peroxide, Tinoridine inhibited the lipid peroxidation more strongly than the release of enzymes, at concentrations from 1.0 to 100 μ M. At a high concentration of 1000 μ M, Tinoridine did increase the release of enzymes, but markedly inhibited the lipid peroxidation. Moreover, Tinoridine inhibited the spontaneous release of enzymes from lysosomes by incubation without hydrogen peroxide. Tinoridine was also found to inhibit the lipid peroxidation in the 9000 $\times g$ supernatant fraction of rat liver homogenate by incubation with or without hydrogen peroxide at concentrations from 1.0 to 1000 μ M.

These properties of Tinoridine seem to be different from those of acetylsalicylic acid, prednisolone, or α -tocopherol. These evidences suggest that Tinoridine has not only a membrane-stabilizing activity on lysosomes but also an inhibitory activity against the lipid peroxidation.

白血球の過度の貪食作用により, 細胞内過酸化水素含量は増加することが知られている。³⁾ Desai ら⁴⁾ によれば, 過酸化水素の分解に比例して lysosome から aryl sulfatase が遊離する。また抗酸化物の欠乏した状態で生体組織は過酸化水素のような過酸化物の影響を受け易く, 脂質から脂質過酸化物が容易に生成され,⁵⁾ これが生体膜の障害作用を示す。⁶⁾ したがって細胞内 lysosome は酸化的膜破壊や脂質過酸化物により脆弱化し, lysosome 内起炎物質の放出により炎症反応の進展に関与するものと推定される。一方, 抗炎症作用を有する tinoridine (2-amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridine, y-3642 の一般名) は, *in vitro* で各種生体膜の安定化作用を有し,⁷⁾ 多核白血球 lysosome に対しても同様の作用を示すことから,⁸⁾ このような性質が本薬物の抗炎症作用の発現に寄与しているものと考えられる。また Fujita ら⁹⁾ によれば, tinoridine は

1) 第 28 報: 中西美智夫, 後藤一洋, 薬誌, 95, 672 (1975).

2) Location: Koiwai, Yoshitomi-cho, Chikugo-gun, Fukuoka.

3) G. Iyer, M. Islam, J. Quastel, *Nature*, 192, 535 (1961); B. Paul, A. Sbarra, *Biochim. Biophys. Acta*, 156, 168 (1968).

4) I. Desai, P. Sawant, A.L. Tappel, *Biochim. Biophys. Acta*, 86, 277 (1964).

5) H. Zalkin, A.L. Tappel, *Arch. Biochem. Biophys.*, 88, 113 (1960); J. Bunyan, J. Green, E. Edwin, A. Diplock, *Biochem. J.*, 77, 47 (1960).

6) A. L. Tappel, *Fed. Proc.*, 32, 1870 (1973).

7) M. Nakanishi, H. Imamura, K. Ikegami, K. Goto, *Arzneim. Forsch.*, 20, 1004 (1970).

8) a) 中西美智夫, 後藤一洋, 薬誌, 94, 660 (1974); b) M. Nakanishi, K. Goto, *Biochem. Pharmacol.*, 24, 421 (1975).

9) T. Fujita, M. Yasuda, *Japan. J. Pharmacol.*, 23, 899 (1973).

抗酸化剤である α -tocopherol と同様に α -tocopherol 欠乏ラットにおける肝 lysosome の脂肪酸組成の変動を *in vivo* で抑制する。そこで、tinoridine が lysosome 膜安定化作用以外の性質を有するか否かについて調べる目的で、本報ではラット肝 lysosome を用い、過酸化水素による酵素遊離および脂質過酸化に対する作用について *in vitro* で検討し、本薬物は両者を強く抑制することが明らかにされた。またこのような性質は acetylsalicylic acid, prednisolone あるいは α -tocopherol とは異なることが示唆されたので報告する。

実験の部

材料および方法

1). 被検化合物および被検液の調製 Tinoridine HCl, acetylsalicylic acid, ibuprofen, hydrocortisone, prednisolone および α -tocopherol (半井化学薬品 K.K. 製) を用い、すべて EtOH (特級) に溶解し、被検液とした。なお反応液中の EtOH の最終濃度は 1.0% (v/v) とした。

2). Heavy Lysosome Suspension の調製 飯塚らの方法¹⁰⁾ に準じて行なった。すなわち、体重 250 g 前後の wistar 系雄性ラットを頸動脈より放血後開腹し、10 ml の氷冷 0.25M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (sucrose buffer, pH 7.4) または Ca^{2+} -free Hanks solution (containing 0.1% (w/v) glucose, without phenol red, pH 7.4) で門脈より灌流し、血液を除去した肝を得た。これを細切したのち、5 または 10 倍量の sucrose buffer または 0.1% glucose-Hanks solution (without phenol red) を加え、teflon homogenizer を用い、10 回の up-down により 10% または 20% homogenate を調製した。これをガーゼでろ過したのち、ろ液を 700 g, 10 min 間遠心分離した。上清をさらに 3500 g, 15 min 間遠心分離し、得られた pellet に最初の homogenate の 1/2 量の sucrose buffer または Hanks solution (without phenol red) を加えけん濁後、3500 g, 15 min 間遠心分離し洗浄した。得られた pellet に sucrose buffer または Hanks solution (without phenol red) を加え、0.2 g liver/ml または 0.4 g liver/ml となるように調製し、lysosome suspension として用いた。以上の操作はすべて 4° 以下で行なった。

3). Lysosome Suspension からの酵素遊離および脂質過酸化に対する作用 4.0 ml の lysosome suspension (0.2 g liver/ml) に 40 μ l の被検液 (対照として EtOH) を加え反応液とした。過酸化水素を加える系では、2.0 ml の lysosome suspension (0.4 g liver/ml) に 40 μ l の被検液 (対照として EtOH) を加え、室温 (約 25°) で 5 min 間放置後 2.0 ml の過酸化水素-緩衝液 (sucrose buffer または Hanks solution) を加え反応液とした。2.0 ml の反応液をとり出し、ただちに 27000 g, 15 min 間 4° で遠心分離後、上清について酵素活性および脂質過酸化物を測定し反応前の値とした。残りの反応液を 37° で 30, 60 または 90 min 間振盪 (75 回/min) しながら incubate し、同一条件で遠心分離後、上清について酵素活性および脂質過酸化物を測定した。Total activity は 2.0 ml の lysosome suspension に 0.2 ml の 2% Triton X-100-緩衝液を加え、37° で 30 min 間 incubate し、同一条件で遠心分離し、得られた上清について測定した。

4). 肝 homogenate の 9000 g 上清の調製 Ghoshal らの方法¹¹⁾ に準じて行なった。すなわち、10% homogenate (medium: Ca^{2+} -free Hanks solution without phenol red, pH 7.4) を 9000 g, 15 min 間 4° で遠心分離した。過酸化水素を加える系では、20% homogenate を同一条件下で遠心分離し、9000 g 上清を得た。

5). 9000 g 上清の脂質過酸化に対する作用 4.0 ml の 10% homogenate の 9000 g 上清に 40 μ l の被検液 (対照として EtOH) を加え、37° で 15, 30, 45 または 60 min 間振盪 (75 回/min) しながら incubate した。過酸化水素を加える系では 2.0 ml の 20% homogenate の 9000 g 上清に 40 μ l の被検液 (対照として EtOH) と、2.0 ml の過酸化水素 (最終濃度 0.3%) を含む Ca^{2+} -free Hanks solution (without phenol red) を加え、37° で 15, 30 または 45 min 間同一条件下で incubate した。反応前後に 2.0 ml の反応液をとり出し、2.0 ml の 10% 三塩化酢酸溶液を加え 30 min 間放置後、2500 rpm, 15 min 間遠心分離し、反応前後の上清中の脂質過酸化物を測定した。

6). 酵素活性および脂質過酸化物の測定 a) Acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2, orthophosphoric monoester phosphohydrolase) および aryl sulfatase (E.C. 3.1.6.1., aryl sulfatase sulfohydrolase) は基質としてそれぞれ *p*-nitrophenyl phosphate および *p*-nitrocatechol sulfate を用い、すでに報告した方法⁸⁾ により測定した。

b) 脂質過酸化物は、thiobarbituric acid (TBA) 法¹²⁾ により測定した。すなわち、lysosome suspension を用いた実験では、1.0 ml の 27000 g 上清に 1.0 ml の 10% 三塩化酢酸溶液を加え、30 min 間放置後 2500 rpm, 15 min 間遠心分離し除たん白を行なった。9000 g 上清に関しても前述のように除たん白した。1.0 ml の 2500 rpm 上清に 1.2 ml の 0.67% (w/v) TBA 溶液を加え、100° で 5 min 間加熱したのち、530 nm における吸光度 (OD_{530}) を測定し、TBA value として示した。

10) 飯塚義夫, 小林 和, 田中喜一郎, 薬誌, 92, 311 (1972).

11) A.K. Ghoshal, R.O. Recknagel, *Life Sci.*, 4, 1521 (1965).

12) C. Mengel, H. Kann, *J. Clin. Invest.*, 45, 1150 (1966).

結果および考察

I. ラット肝 Lysosome に対する作用

1) Lysosome からの酵素遊離および脂質過酸化におよぼす過酸化水素および Incubation Medium の影響 (Fig. 1, Fig. 2) 生体膜は、過酸化水素により障害を受け易いことが知られている。⁶⁾ 小友ら¹³⁾ はイヌ赤血球を lysosome のモデルとして用い、過酸化水素による溶血および脂質過酸化に対する抗炎症薬の作用について検討し、非ステロイド抗炎症薬が抗溶血作用および抗脂質過酸化作用を有することを報告している。また Ignarro¹⁴⁾ は、lysosome の incubation medium として一般に用いられている sucrose-buffer 中の、sucrose が抗炎症薬と lysosome との interaction を妨害することを、Desai ら⁴⁾ は sucrose が TBA 反応を阻害することをそれぞれ報告している。そこで lysosome からの酵素遊離および脂質過酸化に対する過酸化水素および incubation medium の影響について調べ、さらに tinoridine の作用についても検討した。

Fig. 1. Effects of Hydrogen Peroxide on Aryl Sulfatase and Lipid Peroxidation from Rat Liver Lysosomes in Hanks Solution or Sucrose Buffer

The lysosome suspension was incubated with hydrogen peroxide for 30 min at 37° in Hanks solution without phenol red(a) or 0.25M sucrose-0.04M Tris acetate buffer(b). the enzyme activity in control: before the incubation=3.5, total activity=107.4 μ g of *p*-nitrophenol formed/0.1 ml/hr. Lipid peroxide contents of control in TBA value at OD₅₃₀: before the incubation=0.06.

Results are shown as the mean $\pm$ S.E. of two separate experiments (N=4).

—: control, —: tinoridine HCl (30 μ M),
●: aryl sulfatase, ▲: lipid peroxidation

Fig. 2. Time-course of Enzyme Release and Lipid Peroxidation from Rat Liver Lysosomes

The lysosome suspension was incubated without (a) or with 0.3% hydrogen peroxide(b) at 37° in Hanks solution without phenol red. the total activity in control: 110.9 μ g of *p*-nitrophenol formed/0.1 ml/hr for acid phosphatase; 108.0 μ g of *p*-nitrocatechol formed/0.1 ml/hr for aryl sulfatase. Results are shown as the mean $\pm$ S.E. of two separate experiments (N=4).

—: control,
---: tinoridine HCl (30 μ M),
■: acid phosphatase,
●: aryl sulfatase,
▲: lipid peroxidation

13) a) 小友 進, 藤平栄一, 薬誌, 90, 1347 (1970); b) 藤平栄一, 小友 進, 薬誌, 90, 1355 (1970); c) 小友 進, 藤平栄一, 薬誌, 93, 782 (1973).

14) L.J. Ignarro, *Biochem. Pharmacol.*, 22, 1269 (1973).

反応前の aryl sulfatase 活性および TBA value は、1.0% の過酸化水素の添加により、無添加群に比較してわずかに上昇した。Fig. 1 には 30 min 間の incubation により遊離した酵素活性 (%) および上昇した TBA value を示した。Incubation medium として Hanks solution を用いた場合、Fig. 1 に示すように過酸化水素濃度の上昇に比例して酵素遊離は亢進し、TBA value は上昇した。この成績は、Desai ら⁴⁾ の過酸化水素の分解と lysosome からの aryl sulfatase の遊離が比例するという報告を支持しうるものである。また、TBA value は脂質過酸化物そのものの測定ではなく、脂質の過酸化が起ったことを示す¹⁵⁾ ものであるから、lysosome は過酸化水素により脂質の過酸化を受けたものと考えられる。30 μ M の tinoridine は 0.1, 0.3 および 1.0% の過酸化水素による lysosome 酵素の遊離亢進をそれぞれ約 29, 27 および 21%, また TBA value の上昇をそれぞれ約 33, 39 および 45% 抑制した。したがって、tinoridine は酵素遊離抑制作用と同時に抗脂質過酸化作用を有するものと推定される。両者の抑制率は、過酸化水素濃度の上昇に対し相反する傾向を示すことから、両作用の間に直接的な関係はないものと推定される。また sucrose buffer を incubation medium として用いても同様の成績が得られることから (Fig. 1b), この反応に用いた濃度の sucrose では TBA 反応または tinoridine の lysosome に対する作用にほとんど影響をおよぼさないものと考えられる。

つぎに Hanks solution を incubation medium として用い、過酸化水素を加えた系と加えない系での lysosome からの酵素遊離および脂質過酸化の経時変化と、これに対する tinoridine の作用について検討した。過酸化水素を加えない系で acid phosphatase および aryl sulfatase は 90 min まで直線的に遊離し、30 μ M の tinoridine はこの遊離を抑制した (Fig. 2a)。

この反応条件での TBA value の上昇は少いので、tinoridine は脂質の過酸化とは無関係に酵素遊離を抑制するものと推定される。

この反応系に過酸化水素を加えると lysosome からの酵素遊離および脂質過酸化は平行して亢進し、60 min まで直線性を示した。したがって lysosome 膜は過酸化水素により障害を受けているものと考えられる。Tinoridine (30 μ M) は 30 および 60 min で酵素遊離および脂質過酸化の両者を抑制し、特に後者を 120 min まで強く抑制した (Fig. 2b)。Tinoridine は高濃度 (1.0%) の過酸化水素 (Fig. 1) または 120 min 間の incubation による脂質過酸化を強く抑制するが、この場合の酵素遊離抑制作用は減弱し、両作用は相関しないことが確認された。また sucrose buffer を用いても同様の成績が得られた。これらの知見から、反応時間を 30 min、過酸化水素の

TABLE I. Effects of Anti-inflammatory Agents and α -Tocopherol on Aryl Sulfatase Release from Rat Liver Lysosomes

Compound	Incubation medium ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, N=3—5) in μ M			
		1.0	10	100	300
Tinoridine HCl	SB	2.9 $\pm$ 1.8	15.5 $\pm$ 1.4 ^{b)}	40.2 $\pm$ 1.3 ^{b)}	31.2 $\pm$ 2.3 ^{b)}
	HS	5.2 $\pm$ 1.9	13.3 $\pm$ 1.9 ^{b)}	37.9 $\pm$ 2.0 ^{b)}	28.8 $\pm$ 1.4 ^{b)}
Acetylsalicylic acid	SB	—	3.3 $\pm$ 1.2	18.5 $\pm$ 1.7 ^{b)}	31.7 $\pm$ 1.2 ^{b)}
	HS	—	3.9 $\pm$ 2.1	18.0 $\pm$ 1.6 ^{b)}	32.8 $\pm$ 1.2 ^{b)}
Ibuprofen	SB	3.8 $\pm$ 1.7	10.7 $\pm$ 2.3 ^{b)}	25.8 $\pm$ 1.9 ^{b)}	19.3 $\pm$ 1.6 ^{b)}
	HS	5.4 $\pm$ 1.5	12.3 $\pm$ 1.7 ^{b)}	27.7 $\pm$ 1.3 ^{b)}	22.0 $\pm$ 1.5 ^{b)}
Prednisolone	SB	—	7.1 $\pm$ 1.7	13.5 $\pm$ 1.5 ^{b)}	22.0 $\pm$ 2.1 ^{b)}
	HS	—	5.8 $\pm$ 2.1	12.8 $\pm$ 1.7 ^{b)}	18.8 $\pm$ 2.3 ^{b)}
α -Tocopherol	SB	—	3.8 $\pm$ 2.1	10.7 $\pm$ 1.7 ^{b)}	15.5 $\pm$ 1.8 ^{b)}
	HS	—	2.7 $\pm$ 1.9	8.5 $\pm$ 2.3	14.6 $\pm$ 1.9 ^{b)}

a) The lysosome suspension was incubated with each test solution for 30 min at 37° in 0.25M sucrose-0.04M Tris acetate buffer (pH 7.4, SB) or Hanks solution (HS) without phenol red.

b) $p < 0.01$ significant
the enzyme activity (μ g of *p*-nitrocatechol formed/0.1 ml/hr) in control: before the incubation=2.4, after the incubation=15.2, total activity=121.0 for the SB. before the incubation=2.8, after the incubation=14.3, total activity=108.0 for the HS

15) C. Kenaston, K. Wilbur, A. Ottolenghi, F. Bernheim, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **32**, 33 (1955).

最終濃度を 0.3% とし, tinoridine の酵素遊離および脂質過酸化に対する作用について, 対照抗炎症薬および α -tocopherol と比較しながら詳細に検討することとした。

2) Aryl Sulfatase 遊離に対する作用 (濃度作用相関, Table I) 過酸化水素を加えない系での被検化合物の作用について比較検討すると, tinoridine は 1.0—100 μ M で被検化合物中もっとも強く酵素遊離を抑制するが, 300 μ M での抑制率は低下した。この傾向は ibuprofen でも同様であったが, acetylsalicylic acid および prednisolone は 300 μ M でも抑制率の低下を示さなかった。

Marker enzyme として acid phosphatase を用いても同様の成績が得られた (データ省略)。またいずれの被検化合物の添加によっても反応前の酵素活性に差がなく, aryl sulfatase および acid phosphatase に対する直接阻害作用は認められなかった。したがって, tinoridine および対照抗炎症薬は酵素遊離抑制作用を有し, この反応系には脂質過酸化がほとんど関与しない (Fig. 2a) ことから, lysosome 膜に直接作用し, 膜を安定化しているものと考えられる。この知見は, 実験条件は異なるがすでに報告した著者らの成績⁷⁾ に一致し, tinoridine が肝 lysosome 膜安定化作用を有することを強く支持するものである。また抗酸化剤である α -tocopherol は 300 μ M で酵素遊離を約 15% 抑制し, その活性は弱いものであった。

3) 過酸化水素による酵素遊離および脂質過酸化に対する作用 (濃度作用相関, Table II) Tinoridine は 1.0—100 μ M で acid phosphatase および aryl sulfatase の遊離を濃度に比例して抑制し, 1000 μ M で酵素遊離を促進した。

このような逆転現象は, すでに報告した lysosome⁷⁾ や赤血球¹⁶⁾ を用いた実験でも認められており, tinoridine

TABLE II. Effects of Anti-inflammatory Agents and α -Tocopherol on Enzyme Release and Lipid Peroxidation from Rat Liver Lysosomes by Hydrogen Peroxide

Compound	Marker ^{a)}	% inhibition (mean $\pm$ SE, N=3—5) in μ M				
		HS ^{b)}				SB ^{c)}
		1.0	10	100	1000	
Tinoridine HCl	AP	6.8 $\pm$ 1.2	15.2 $\pm$ 1.7 ^{d)}	28.7 $\pm$ 2.1 ^{d)}	-74.5 $\pm$ 5.4 ^{d)}	24.6 $\pm$ 1.9 ^{d)}
	AS	4.9 $\pm$ 1.9	16.4 $\pm$ 1.6 ^{d)}	30.3 $\pm$ 2.6 ^{d)}	-62.6 $\pm$ 4.8 ^{d)}	27.7 $\pm$ 0.5 ^{d)}
	LP	10.9 $\pm$ 1.8	32.6 $\pm$ 2.3 ^{d)}	47.9 $\pm$ 1.9 ^{d)}	69.3 $\pm$ 2.7 ^{d)}	45.7 $\pm$ 1.4 ^{d)}
Acetylsalicylic acid	AP	2.1 $\pm$ 1.7	8.2 $\pm$ 1.2	14.8 $\pm$ 1.8 ^{d)}	19.0 $\pm$ 1.2 ^{d)}	19.0 $\pm$ 1.8 ^{d)}
	AS	6.3 $\pm$ 1.7	9.9 $\pm$ 1.8 ^{d)}	23.5 $\pm$ 0.7 ^{d)}	38.5 $\pm$ 2.7 ^{d)}	22.2 $\pm$ 2.1 ^{d)}
	LP	7.7 $\pm$ 1.4	13.9 $\pm$ 1.3 ^{d)}	15.8 $\pm$ 1.8 ^{d)}	21.6 $\pm$ 1.9 ^{d)}	13.7 $\pm$ 1.5 ^{d)}
Ibuprofen	AP	3.5 $\pm$ 1.8	6.6 $\pm$ 2.5	15.5 $\pm$ 2.1 ^{d)}	-49.8 $\pm$ 5.0 ^{d)}	12.8 $\pm$ 2.1 ^{d)}
	AS	2.9 $\pm$ 1.9	7.5 $\pm$ 1.3	16.5 $\pm$ 2.7 ^{d)}	-47.2 $\pm$ 3.9 ^{d)}	18.2 $\pm$ 2.5 ^{d)}
	LP	4.0 $\pm$ 1.4	15.5 $\pm$ 1.6 ^{d)}	32.5 $\pm$ 1.5 ^{d)}	46.8 $\pm$ 2.3 ^{d)}	26.1 $\pm$ 1.8 ^{d)}
Prednisolone	AP	2.8 $\pm$ 1.7	8.8 $\pm$ 1.7	17.0 $\pm$ 2.1 ^{d)}	20.6 $\pm$ 1.2 ^{d)}	9.0 $\pm$ 2.3
	AS	5.9 $\pm$ 2.2	10.0 $\pm$ 2.1 ^{d)}	18.8 $\pm$ 1.1 ^{d)}	22.8 $\pm$ 0.3 ^{d)}	12.5 $\pm$ 2.1 ^{d)}
	LP	7.2 $\pm$ 1.9	13.6 $\pm$ 1.4 ^{d)}	20.8 $\pm$ 1.4 ^{d)}	25.4 $\pm$ 1.3 ^{d)}	9.2 $\pm$ 2.9
α -Tocopherol	AP	0.4 $\pm$ 0.6	5.3 $\pm$ 1.7	8.7 $\pm$ 1.2	11.4 $\pm$ 1.6 ^{d)}	7.8 $\pm$ 1.6
	AS	2.4 $\pm$ 1.2	8.7 $\pm$ 1.9	12.8 $\pm$ 1.4 ^{d)}	15.2 $\pm$ 1.2 ^{d)}	9.8 $\pm$ 1.9 ^{d)}
	LP	11.5 $\pm$ 1.7 ^{d)}	32.2 $\pm$ 1.5 ^{d)}	47.5 $\pm$ 2.1 ^{d)}	70.2 $\pm$ 2.5 ^{d)}	44.1 $\pm$ 2.8 ^{d)}

a) AP: acid phosphatase, AS: aryl sulfatase, LP: lipid peroxidation

b) The lysosome suspension was incubated with each test solution and hydrogen peroxide (final concn.=0.3%) for 30 min at 37° in Hanks solution (HS) without phenol red. The enzyme activity in control: before the incubation=3.5, after the incubation=27.4, total activity=106.8 μ g of *p*-nitrophenol formed/0.1 ml/hr for AP; before the incubation=3.4, after the incubation=28.1, total activity=110.2 μ g of *p*-nitrocatechol formed/0.1 ml/hr for AS. Lipid peroxide contents of control in TBA value at OD₅₃₀: before the incubation=0.06, after the incubation=0.34.

c) Incubation medium: 0.25M sucrose-0.04 M Tris acetate buffer.

the enzyme activity in control: before the incubation=3.2, after the incubation=27.8, total activity=107.7 μ g of *p*-nitrophenol formed/0.1 ml/hr for AP; before the incubation=5.3, after the incubation=29.9, total activity=116.7 μ g of *p*-nitrocatechol formed/0.1 ml/hr for AS. Lipid peroxide contents of control in TBA value at OD₅₃₀: before the incubation=0.06, after the incubation=0.25.

d) $p < 0.01$ significant

16) 中西美智夫, 今村 博, 後藤一洋, 薬誌, 90, 548 (1970).

が lysosome 膜に直接作用していることを示唆するものと考えられる。Tinoridine は酵素遊離よりも脂質過酸化をより強く抑制し、1000 μM まで濃度作用相関を示すことから、lysosome 膜の安定化作用により二次的に膜の脂質過酸化を抑制することは考えられず、また tinoridine の酵素遊離抑制作用が抗脂質過酸化作用に起因するものとも考えられない。後者に関しては脂質過酸化の関与しない系での成績 (Table I) から説明される。また、実験に用いた 700—3500 g fraction には lysosome の他に mitochondria も混入していることから、tinoridine の抗脂質過酸化作用は、mitochondria に対し 1000 μM まで発現されている可能性が考えられる。したがって、tinoridine は直接的な lysosome 膜安定化作用と同時に抗脂質過酸化作用をも有するものと推定される。なおすべての被検化合物は試験濃度で TBA 反応を阻害しないことを確認した。Ibuprofen もその活性は弱い酵素遊離および脂質過酸化に対し tinoridine と類似の性質を示した。一方、acetylsalicylic acid および prednisolone は 1000 μM まで両者を同程度に抑制し、その活性が弱いことから tinoridine とは異なる性質を有するものと推定される。これら被検化合物の酵素遊離抑制作用は Table I の成績と著しく異なるものではなく、また Hanks solution の代りに sucrose buffer を incubation medium として用いてもほぼ同様の成績が得られ、Fig. 1. および Fig. 2. の知見に一致するものであった。 α -Tocopherol は tinoridine と同程度の強力な抗脂質過酸化作用を有するにもかかわらず、酵素遊離抑制作用は極めて弱い。したがって本実験系では、 α -tocopherol の抗脂質過酸化作用による間接的な膜安定化作用への寄与はないものと考えられる。また、 α -tocopherol は 700—3500 g fraction の lysosome よりも mitochondria に対し、より強力な抗脂質過酸化作用を示すことも推定される。小友^{13c)} はイヌ赤血球を lysosome のモデルとして用い、acetylsalicylic acid が脂質過酸化を、また prednisolone および α -tocopherol が溶血と脂質過酸化の両者をほとんど抑制しないと報告している。しかし前述のように lysosome を用いると上記被検化合物は過酸化水素による酵素遊離と脂質過酸化とを有意に抑制する。特に prednisolone の抗脂質過酸化作用は、hydrocortisone が紫外線 (UV) 照射による家兎肝 lysosome の脂質過酸化を阻止するという Weissmann らの成績¹⁷⁾ に対応する。このような成績の相異は、おそらく赤血球と lysosome 膜とで不飽和脂肪酸組成および含量がちがう、それにより膜と薬物との親和性が異なることなどによるものと考えられ、赤血球は lysosome のモデルとして必ずしも適当ではないように思われる。また前述のように prednisolone の肝 lysosome 膜安定化作用は弱い、この薬物はモルモット^{8a)} および家兎^{8b)} の多核白血球 lysosome に対し tinoridine と同程度の強い活性を示す。しかもステロイド抗炎症薬は tinoridine と異りある程度脆弱化した lysosome の stabilizer としても作用する。^{8b)} したがって抗炎症薬の lysosome に対する作用は、lysosome の起源とその安定度によっても異なるものと推定される。

つぎに tinoridine の抗脂質過酸化作用を確認するため、主として microsome を含有するラット肝 9000 g 上清分画を用いて検討した。

II. 肝 Homogenate の 9000 g 上清の脂質過酸化に対する作用

1) 脂質過酸化の経時変化と Tinoridine の影響 (Fig. 3)

Incubation のみにより TBA value は 60 min まで直線的に上昇し、その速度は lysosome suspension におけるそれ (Fig. 2a) に比較して著しく速い。このような脂質過酸化の速度の相異は、9000 g 上清に混入する lysosome の他に主として含まれている microsome と、700—3500 g fraction に含まれる lysosome および mitochondria とにおける不飽和脂肪酸の違

Fig. 3. Time-course of Lipid Peroxidation in 9000 g Supernatant Fraction of Rat Liver Homogenates

The mixture of 9000 g supernatant fraction and test solution was incubated without (---) or with hydrogen peroxide (0.3%; —) at 37° in Hanks solution without phenol red. Results are shown as the mean values of two separate experiments.

▲: control
△: tinoridine HCl (30 μM)

17) G. Weissmann, L. Thomas, *Present Progress in Hormone Research*, 20, 215 (1964).

TABLE III. Effects of Anti-inflammatory Agents and α -Tocopherol on Lipid Peroxidation in 9000 g Supernatant Fraction of Rat Liver Homogenate

Compound	H_2O_2	% inhibition (mean $\pm$ SE, $N=3-5$) in μM			
		1.0	10	100	1000
Tinoridine HCl	—	6.4 $\pm$ 1.0	14.3 $\pm$ 1.7 ^{a)}	31.8 $\pm$ 2.5 ^{a)}	63.9 $\pm$ 2.8 ^{a)}
	+	12.0 $\pm$ 2.5 ^{b)}	30.7 $\pm$ 2.1 ^{a)}	50.5 $\pm$ 2.1 ^{a)}	75.8 $\pm$ 1.6 ^{a)}
Acetylsalicylic acid	—	—	—	7.3 $\pm$ 3.5	18.3 $\pm$ 4.2 ^{b)}
	+	—	—	3.5 $\pm$ 1.0	7.8 $\pm$ 1.2
Ibuprofen	—	11.4 $\pm$ 1.2 ^{b)}	20.4 $\pm$ 1.8 ^{a)}	44.9 $\pm$ 1.8 ^{a)}	66.2 $\pm$ 2.2 ^{a)}
	+	5.4 $\pm$ 1.6	13.0 $\pm$ 2.0 ^{b)}	25.3 $\pm$ 2.3 ^{a)}	36.0 $\pm$ 1.1 ^{a)}
Hydrocortisone	—	—	—	6.2 $\pm$ 2.6	17.1 $\pm$ 2.4 ^{a)}
	+	19.7 $\pm$ 1.7 ^{a)}	30.7 $\pm$ 1.6 ^{a)}	48.2 $\pm$ 1.6 ^{a)}	65.5 $\pm$ 1.8 ^{a)}
Prednisolone	—	—	—	4.7 $\pm$ 1.5	8.8 $\pm$ 2.6
	+	19.0 $\pm$ 1.3 ^{a)}	30.6 $\pm$ 1.0 ^{a)}	44.2 $\pm$ 2.8 ^{a)}	61.2 $\pm$ 0.4 ^{a)}
α -Tocopherol	—	—	—	4.4 $\pm$ 1.2	10.8 $\pm$ 2.1 ^{b)}
	+	11.8 $\pm$ 2.9 ^{b)}	26.3 $\pm$ 2.2 ^{a)}	51.4 $\pm$ 2.5 ^{a)}	78.4 $\pm$ 1.8 ^{a)}

The mixture of 9000 g supernatant fraction and each test solution was incubated without (—) or with hydrogen peroxide (0.3%, v/v; +) for 30 min at 37° in Hanks solution (without phenol red). Lipid peroxide contents of control in TBA value at OD₅₃₀: without hydrogen peroxide, before the incubation=0.054, after the incubation=0.244; with hydrogen peroxide, before the incubation=0.103, after the incubation=0.474.

a) $p < 0.01$

b) $p < 0.05$ significant

いによるものと思われる。⁹⁾ 30 μM の tinoridine は 30—60 min の間で脂質過酸化を抑制した。この反応系に最終濃度 0.3% の過酸化水素を加えると、脂質過酸化は著しく亢進し、45 min まで直線性を示した。Tinoridine は 30 min まで強く抑制し、45 min での抑制率は低下した。

この現象は lysosome を用いた Fig. 2b の成績と異るが、microsome の不飽和脂肪酸含量は高く脂質過酸化を受け易い⁹⁾ ので、tinoridine は一定限度以上の過酸化をもはや抑制することができないものと思われる。この実験から tinoridine は、microsome の脂質過酸化をも抑制し得ることが示唆されたので、つぎに濃度を変えて検討した。

2) 濃度作用相関 (Table III) Tinoridine は incubation のみによる脂質過酸化を 1000 μM まで濃度に比例して抑制し、過酸化水素による脂質過酸化の亢進をさらに強力に抑制した。後者の成績は過酸化水素による lysosome の脂質過酸化に対する抑制作用 (Table II) とよく一致する。

したがって本化合物は抗脂質過酸化作用を有するものと推定され、これらの知見から *in vivo* における lysosome⁹⁾ および microsome¹⁸⁾ に対する tinoridine の α -tocopherol に類似した作用を説明することができる。一方、 α -tocopherol は抗炎症作用を示すと報告されており、¹⁹⁾ tinoridine のこのような活性は *in vivo* における lysosome の膜安定化に二次的に寄与するものと推定される。Acetylsalicylic acid の抗脂質過酸化作用は弱く、lysosome 酵素の遊離抑制作用に関与していないものと考えられる。Ibuprofen は lysosome に対し tinoridine と同様の性質を示すが (Table II), 9000 g 上清における抗脂質過酸化作用は過酸化水素の添加により減弱することから (Table III), tinoridine とは若干性質を異にするものと考えられる。Prednisolone および hydrocortisone は α -tocopherol と同じく過酸化水素による 9000 g 上清の脂質過酸化のみを強く抑制するが、前者の lysosome における抗脂質過酸化作用は弱く (Table II), その性質は tinoridine または α -tocopherol と異なるものと推定される。このようなステロイド抗炎症薬の過酸化水素による microsome の脂質過酸化に対する抑制作用については、その作用機作を含めてさらに検討する必要がある。

18) 藤田 直, 松本研一, 薬誌, 94, 147 (1974).

19) V.W. Stuyvesant, W.B. Jolley, *Nature*, 216, 585 (1967).

以上の諸知見から, tinoridine は lysosome 膜の安定化作用により, 過酸化水素や脂質過酸化物による lysosome の脆弱化を抑制し, 抗炎症活性の発現に寄与しているものと推定される. また tinoridine の抗脂質過酸化作用は *in vivo* における lysosome 膜の安定化に間接的に関与するものと考えられる. なお, 本実験に用いた lysosome fraction には mitochondria が多く含まれていることから, tinoridine は mitochondria, lysosome あるいは microsome などの生体膜の脂質過酸化を抑制することが示唆された.