Cholestanyl Phosphate の研究 (第 1 報¹⁾) 3β - および 3α -Cholestanyl Phosphate の合成と抗炎症作用

新保正府, 肥後盛明, 工藤俊博, 砂崎和彦, 吉野和廣
ライオン歯磨株式会社基礎研究所²⁾

Studies on Cholestanyl Phosphate. I.¹⁾ Studies on the Synthesis and Anti-inflammatory Activity of 3β - and 3α -Cholestanyl Phosphate

MASAFU SHINBO, MORIAKI HIGO, TOSHIHIRO KUDŌ,
KAZUHIKO SUZAKI and KAZUHIRO YOSHINO
Basic Research Laboratories, Lion Dentifrice Co., Ltd.,²⁾

(Received November 19, 1976)

In order to examine their anti-inflammatory activity 3β - (VIa) and 3α -cholestanyl phosphate (VIb) were synthesized. The reaction of 3β - (Ia) and 3α -cholestanol (Ib) with phosphoryl chloride at a low temperature, followed by hydrolysis of products, afforded 3α - (VIa) and 3β -cholestanyl phosphate (VIb) in a good yield. In addition, phosphorylation of Ia and Ib were investigated with diphenyl phosphorochloridate, dibenzyl phosphorochloridate, and β -cyanoethyl phosphate.

Significant anti-inflammatory effect, such as inhibition of edema formation in carrageenin- and albumin-injected rats, inhibition of granuloma formation with cotton pellets implanted under the skin of rats, was recognized in 3β -cholestanyl phosphate.

Keywords—anti-inflammatory activity; phosphorylation; 3α -cholestanol; 3β -cholestanol; 3α -cholestanyl phosphate; 3β -cholestanyl phosphate

ステロイド抗炎症剤としての必須の構造は炭素数 21 のステロイド骨格を有し, C-4 位, C-5 位に二重結合, C-11 位にケトンまたは水酸基, C-17 位に α -水酸基をもつことが Boland³⁾ により報告されていた. その後, 梅原⁴⁾ は C-17 位に水酸基をもたない fluorocortorone に抗炎症作用があることを報告している. また, 菅野⁵⁾ は, C-3 位に α -水酸基をもつ 3α -cholestanol に抗炎症作用, 鎮痛作用があり, 従来のステロイド抗炎症剤に比べ, 副作用が少ないことを報告していることから, 3β -および 3α -cholestanol とステロイド抗炎症剤の構造活性相関に興味深いものがある. そこで 3β -および 3α -cholestanol の種々の誘導体の合成を試み, 今回, 3β -および 3α -cholestanyl phosphate の合成と抗炎症作用を中心に検討したので報告する.

目的化合物の合成は, 3β -cholestanol (Ia) および 3α -cholestanol (Ib) の各種リン酸化試薬によるリン酸化を経由する Chart 1 の方法により検討された.

Ia の phosphoryl chloride によるリン酸化については Cremlyn⁶⁾ により試みられたが, VIa を得ることはできなかった. また, Ib の phosphoryl chloride によるリン酸化は行なっていない. 著者は, まず, リン酸化剤としてもっとも一般的な phosphoryl chloride による Ia のリン酸化を行なった. Ia を pyridine 溶液とし, 室温攪拌下 phosphoryl chloride の acetone 溶液に滴下, 攪拌を行なったところ, 3α -cholestanyl chloride (VIIa)⁷⁾ と Δ^2 or Δ^3 -cholestene (VIII) をそれぞれ 27%, 8% の収率で得たが, 3β -cholestanyl phosphorodichloridate (IIa) は得られなかった. 一方, Ib を同様にリン酸化を行なったところ, 3β -cholestanyl chloride

1) 日本化学会第 30 春季年会で一部発表, 名古屋, 1974 年 4 月.

2) Location: 100 Tajima Odawara-shi Kanagawa.

3) E. W. Boland, *Amer. J. Med.*, **31**, 581 (1961).

4) 梅原千治, 最近医学, **22**, 2479 (1967).

5) 菅原次郎, 山本正治, 松本 博, 三好 豊, 大迫 登, 黒沢秋雄, 歯界展望, **17**, 1034 (1960).

6) R. J. W. Cremlyn, N.A. Olsson, *J. Chem. Soc.*, **1971**, 203; *idem, ibid.*, **1969**, 2305.

7) C. W. Shoppee, *J. Chem. Soc.*, **1970**, 1124.

Chart 1

Chart 2

(VIIb) と VIII を 55%, 22% で得たが、目的物 3 α -cholestanyl phosphorodichloridate (IIb) は得られなかった。Ia および Ib の phosphoryl chloride によるリン酸化で得られた chloride VIIa, VIIb は、出発物質の Ia, Ib に対し、それぞれに configuration の反対のものが得られた (Chart 2)。このことは本反応が S_N2 反応または、 S_Ni 反応によるものと考えられるが、後述する方法で得た IIa および IIb を acetone または、acetone-pyridine 溶液中 25° または、60° で加温しても chloride VIIa, VIIb を得られず、原料回収であったことより上記反応は S_N2 反応であると考えた。

そこで phosphoryl chloride による Ia, Ib のリン酸化を低温で行なえば、Cl⁻アニオンによる S_N2 反応が押えられるものと考え、Ia, Ib をそれぞれ -78° でリン酸化を行なったところ、Ia については 79% の収率で IIa を得たが、Ib は原料回収であった。Ib については、反応温度を -30° で行なったところ、56% で IIb を得ることができた。

IIa, IIb を常法により加水分解し、目的物 VIa, VIb を 38%, 56% の収率で得た。つぎに、phosphoryl chloride 以外のリン酸化試薬を用いる方法を検討した。まず、Ia を diphenyl phosphorochloridate^{8,9)} と pyridine 中で反応を行なうと、3 β -cholestanyl diphenyl phosphate (IIIa) が定量的に得られた。IIIa をアルカリにより加水分解した後、酸化白金触媒を用いて水素添加を行なうと、64% の収率で VIa を得ることができた。一方、Ib を同様にリン酸化を行なったところ、IIIb は得られず、原料回収に終わった。リン酸化剤として di-

8) P. Brige, H. Müller, *Ber.*, **72**, 2121 (1939).9) J. M. Gulland, M. Smith, *J. Chem. Soc.*, **1947**, 338.

TABLE I. Phosphorylation of Ia and Ib

Phosphorylating agent	Yield ^{a)} of phosphate	
	VIa	VIb
POCl_3	38%	56%
$(\text{PhO})_2\text{POCl}$	64%	—
$(\text{PhCH}_2\text{O})_2\text{POCl}$	18%	2%
$\text{NC}(\text{CH}_2)_2\text{OP}(\text{OH})_2$	70%	—

a) based on the starting alcohol Ia and Ib

Fig. 1. Effect of 3 α -Cholestanol, 3 α -Cholestanyl Phosphate(K) and Hydrocortisone Acetate on Swelling of Rat Hind Paw induced by Carageenin (1%, 0.1 ml)

—: control, —○—: 3 α -cholestanol, 100 mg/kg,
 —●—: 3 α -cholestanyl phosphate (K), 100 mg/kg,
 —□—: hydrocortisone acetate, 50 mg/kg

Effect of 3 α -Cholestanol and 3 α -Cholestanyl phosphate (Na) on Swelling of Rat Hind Paw induced by Egg's Albumin (2%, 0.1 ml)

—: control,
 —○—: 3 α -cholestanol, 50mg/kg,
 —●—: 3 α -cholestanyl phosphate(Na), 50 mg/kg

benzyl phosphorochloridate¹⁰⁾ を用いた場合は, VIa および VIb がそれぞれ 18%, 2% の収率であった. また, リン酸化剤にアルカリで容易に分解する β -cyanoethyl 基を保護基にもつ β -cyanoethyl phosphate^{11,12)} を用いて Ia, Ib についてのリン酸化を検討した. Ia と β -cyanoethyl phosphate に dicyclohexylcarbodiimide (DCC) を用いて室温下, 脱水縮合反応を行ない, ほぼ定量的に 3 β -cholestanyl β -cyanoethyl phosphate (Va) を得た. Va を methanol 中 NH_4OH で加水分解¹³⁾ すると, 収率 70% で VIa を得ることができた. Ib については, 3 α -cholestanyl β -cyanoethyl phosphate (Vb) は得られず, 構造不明の油状物であった.

各種リン酸化試薬による Ia のリン酸化は, いずれの場合でも容易に反応が進み, 目的物を得ることができたが, Ib は phosphoryl chloride, dibenzyl phosphorochloridate の場合に目的物が得られた. 以上の結果について Table I に示す.

合成した化合物のアルカリ金属塩の抗炎症作用は, 体重 130—140 g の wistar 系雄性ラットを用いて 1 群 7 匹とし, carrageenin 法および albumin 法による浮腫抑制作用, 体重 120—130 g の wistar 系雌性ラットを用

10) J. Baddiley, A. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1947**, 648.11) G. M. Tenner, *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 159 (1961).12) R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 4801, (1967).13) R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, P.S. Miller., *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 3360 (1967).

いて1群6匹とし、cotton pellet 法による肉芽腫抑制作用を調べた。3 β -cholestanyl phosphate (VIa) のアルカリ金属塩は活性がなく、3 α -cholestanyl phosphate (VIb) のアルカリ金属塩に活性が認められた。その50%有効量(ED₅₀)が浮腫抑制作用で30 mg/kg でhydrocortisone の約1/2の活性を示した。持続性抗炎症作用のモデルとして用いたcotton pellet 法による肉芽腫抑制作用での有効量は43.9 mg/kg で浮腫抑制作用の場合と同様にhydrocortisone の約1/2の活性であった。3 α -cholestanyl phosphate (VIb) のアルカリ金属塩を投与したラットではhydrocortisone にみられる胸腺萎縮、副腎肥大は認められなかった。

Fig. 2. Effect of 3 α -cholestanyl Phosphate (K₂) and Hydrocortisone Acetate on the Formation of Granulation Tissue (Cotton Pellet Method)

Each group included 6 rats.

実験の部

Phosphoryl Chloride によるリン酸化 1) Ia 3.0 g, 無水 pyridine 15 ml の溶液を POCl₃ 4.4 g, 無水 (CH₃)₂CO 15 ml の溶液に室温攪拌下滴下。滴下後、室温で 1.5 hr 攪拌、一昼夜室温放置、H₂O 200 ml を加え、遠心分離、沈殿物を分取、乾燥、シリカゲル薄層板を用いて *n*-hexane を展開溶媒とし、分離精製。VIIa 0.85 g (27%) mp 104.5—105.5°, VIII 0.23 g (8%) mp 71—73°。2) 同様に Ib 3.0 g から VIIb が 1.6 g (55%) mp 114—115°, VIII 0.66 g mp 71—73° が得られた。3) Ia 3.0 g, 無水 pyridine 15 ml の溶液を POCl₃ 4.4 g, 無水 (CH₃)₂CO 15 ml の溶液に -78° で攪拌下 1.5 hr を要し滴下。引き続き -78° で 1.5 hr 攪拌、H₂O 200 ml を加え、遠心分離、沈殿物を分取、乾燥、無色粉末 3.1 g を得。90% dioxane 水溶液 75 ml を加え、3 hr 加熱還流。冷後、析出する結晶をろ取、0.35 N KOH に溶かし、amberlite IR-120 (H⁺) でイオン交換処理。処理液を濃縮乾固、残留物を C₆H₆-EtOH から再結晶して無色板状晶の VIb を 1.5 g (38%) 得。mp 183—184°。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 2300 (P-O-H), 1230 (P=O), 1010 (P-O-C)。NMR (pyridine-*d*₅) δ : 4.15 (1H, 3C-H axial)。Anal. Calcd. C₂₇H₄₉O₄P: C, 69.20; H, 10.54。Found: C, 69.58; H, 10.92。[α]_D²⁵ = +19 (*c* = 1.00 CHCl₃)。4) Ib 3.0 g, 無水 pyridine 15 ml の溶液を POCl₃ 4.4 g, 無水 (CH₃)₂CO 15 ml の溶液に -35—-30° で 2.5 hr を要し攪拌下滴下。引き続き -78° で 1.5 hr 攪拌、H₂O 200 ml を加え、CHCl₃ 抽出、水洗、無水 Na₂SO₄ 乾燥、溶媒留去、残留物に 90% dioxane 水溶液 75 ml を加え、3 hr 加熱還流。冷後、遠心分離、沈殿物を分取、dil. KOH に溶かして amberlite IR-120 (H⁺) で処理。処理液を濃縮乾固、残留物を C₆H₆-EtOH から再結晶して無色板状晶の VIb を 2.0 g (56%) 得。mp 162—165°。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 2250 (P-O-H), 1230 (P=O), 1025 (P-O-C)。NMR (pyridine-*d*₅) δ : 4.55 (1H, 3C-H equatorial)。Anal. Calcd. C₂₇H₄₉O₄P: C, 69.20; H, 10.54。Found: C, 69.69; H, 10.54。[α]_D²⁵ = +9 (*c* = 1.00 CHCl₃)。

Diphenyl Phosphorochloridate によるリン酸化 Ia 0.97 g, 無水 pyridine 10 ml の溶液に -20° で diphenyl phosphorochloridate 0.74 g, 無水 pyridine 10 ml の溶液を 15 min を要し攪拌下滴下。滴下後、液温を 0° まで徐々に上げながら 1 hr 攪拌、一夜室温に放置。H₂O 10 ml を加え、溶媒減圧留去。残留物を C₆H₆ に溶かし、H₂O, 0.1 M K₂CO₃, H₂O の順で洗浄。無水 Na₂SO₄ 乾燥、溶媒留去、残留物を (CH₃)₂CO-CH₃CN から再結晶して無色針状晶を 1.55 g 得。mp 91.5—92.5°。上記 3 β -cholestanyl diphenyl phosphate 0.93 g, Ba(OH)₂ 1.89 g, *n*-BuOH 1 ml, H₂O 10 ml を加え、4.5 hr 加熱還流。還流後、H₂O 5 ml を加え、熱時 CO₂ ガスを吸収。生成する沈殿物を分取、50% AcOH で数回洗浄、乾燥、無色粉末の 3 β -cholestanyl phenyl phosphate の Ba 塩得。0.1 N H₂SO₄ 30 ml, THF 25 ml の混液に溶かし、1 hr 加熱攪拌、冷所に放置、析出する沈殿物を除去、濃縮乾固、残留物を水洗、乾燥、AcOH より再結晶して無色針状晶の 3 β -cholestanyl phenyl phosphate 0.5 g を得。mp 192—194°。上記 3 β -cholestanyl phenyl phosphate 0.11 g, PtO₂ 0.11 g および AcOH 5 ml の混液に常温常圧下水素添加。水添後、触媒をろ別、溶媒減圧留去、残留物を AcOH より再結晶して無色板状晶の VIa を 0.095 g (64%) 得。mp 184—185°。

Dibenzyl Phosphorochloridate によるリン酸化 N₂ 気流中 dibenzyl phosphite 1.35 g の CCl₄ 17 ml 溶液に sulfuryl chloride 0.70 g の CCl₄ 3 ml 溶液を室温攪拌下滴下。滴下後 N₂ ガスを激しく注入、2 hr 攪拌。生成した dibenzyl phosphorochloridate を直ちに CHCl₃ 10 ml, pyridine 1 ml の混液に溶かした Ia に -45—-40° で攪拌下滴下。2 hr 攪拌、H₂O 4 ml を加え、室温で放置、濃縮乾固、残留物をエーテル抽出。0.1 M Ba(OH)₂, H₂O で洗浄、乾燥、溶媒留去、残留物を 99.5% EtOH 60 ml に懸濁、PdO 0.14 g を加え、常温常圧下水素添加。水添後、触媒をろ別、溶媒留去、Ba 塩とし、amberlite IR-120 (H⁺) で処理。処理液を濃縮乾固、残留物を C₆H₆ から再結晶して無色針状晶 Ia を 0.22 g (18%) 得。mp 183—184°。

β -Cyanoethyl Phosphate によるリン酸化 Ia 0.78 g, β -cyanoethyl phosphate 9.32 g に無水 pyridine 20 ml を加え, 混和. 室温で溶媒減圧留去, 残留物に無水 pyridine 40 ml を加え, 上記同様な操作を 2 回くり返し, 反応系内の水分を十分に除いた後, 無水 pyridine 20 ml を加え, 透明溶液となったら, DCC 2.47 g を加え, 密栓. 室温下 2 hr 攪拌, H_2O 5 ml 加え, 溶媒減圧留去. 残留物に H_2O を加え, 析出する 1,3-cyclohexyl-urea をろ別, ろ液に 1 N NaOH 40 ml を加え, 1 hr 加熱還流. 冷後, 析出する無色粉末をろ取, 水洗. H_2O に懸濁, amberlite IR-120 (H^+) で処理. 処理液を濃縮乾固, 残留物を AcOH より再結晶して無色板状晶 VIa を 0.67 g (70%) 得. mp 182—185°.

I. 足蹠浮腫抑制作用 1) Carrageenin 浮腫抑制作用. 体重 120—130 g の wistar 系雄性ラットを使用し, Van Arman¹⁴⁾ の方法に従って足の容積を測定した. ラットの左後肢足蹠皮下に 1% carrageenin の 0.1 ml を注射し, 以後 1 hr 毎に 6 hr までの足の容積を測定した. 起因物質による腫張率は $(V_i - V_s)/V_s \times 100$ で表わした. V_s は起因物質投与前の足の容積. V_i は起因物質投与後の足の容積. 被検薬物は起因物質投与 15 min 前に 100 mg/kg を腹腔内投与した. 2) Albumin 浮腫抑制作用. 体重 130—140 g の wistar 系雄性ラットを使用し, 2% egg's albumin 0.1 ml を左後肢足蹠皮下に注射し, carrageenin の場合と同様な操作を行なった. 被検薬物は起因物質投与 15 min 前に 50 mg/kg を腹腔内投与した.

2. 肉芽腫抑制作用 (Cotton Pellet 法) 体重 120—130 g の wistar 系雄性ラットを pentobarbital 麻酔下肩甲骨上部皮下に, 滅菌綿球 (20 ± 1 mg) を 1 個挿入埋没し, 切開した皮膚を縫合. 感染防止のため penicillin G (1000 I. U./rat) を大腿筋肉内に注射した. 被検薬物は実験開始日より 1 日 1 回, 7 日間連続腹腔内投与した. 対照群には生理食塩水を投与した. 被検薬物最終投与日の翌日, 肉芽を綿球と共に摘出, 60° で 24 hr 乾燥後, 肉芽腫重量を算出した.

謝辞 終りに本研究の機会を与えられ発表を許可されたライオン歯磨株式会社基礎研究所長 松村輝男博士に深謝します.

14) C.G. Van. Arman, A. J. Begany, L.M. Miller, H.H. Pless, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 150, 328 (1965).